

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

**Strategien zur Verstärkung der antikörpervermittelten Effektorzellaktivierung
beim Multiplen Myelom**

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

vorgelegt von
Klara Marie Eichholz
aus Kiel

Kiel 2023

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

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Petra Bacher, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2026

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10.09.2025

gez.: Prof. Dr. Matthias Peipp
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Multiple Myelom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Einteilung	1
1.1.3 Symptome und Diagnostik	2
1.1.4 Therapie.....	2
1.2 Antikörper in der Tumorthherapie.....	3
1.2.1 Antikörperstruktur	4
1.2.2 Formate monoklonaler Antikörper	5
1.3 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	6
1.3.1 Direkte Wirkmechanismen.....	6
1.3.2 Fc-vermittelte Wirkmechanismen.....	6
1.4 CD38 als Zielantigen	10
1.5 Daratumumab	11
1.5.1 Wirkmechanismen von Daratumumab	11
1.6 Strategien zur Optimierung therapeutischer Antikörper.....	12
1.6.1 Fc-Engineering zur Optimierung von monoklonalen Antikörpern	14
1.7 Synergistische Verstärkung von Antikörpereffekten durch Signalblockade	16
1.7.1 SIRP α und CD47.....	16
1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Zellkulturmedium und –zusätze	20
2.1.2 Zelllinien	20
2.1.3 Bakterienstämme	21
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	21

2.1.5	Puffer und Lösungen	22
2.1.6	Kits	23
2.1.7	Einmalmaterialien	23
2.1.8	Laborgeräte und -utensilien	24
2.1.9	Messgeräte	25
2.1.10	Enzyme	25
2.1.11	Antikörper	26
2.1.12	Plasmide	27
2.1.13	Softwareprogramme	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	DNA-Gelelektrophorese	29
2.2.2	Restriktionsverdau	29
2.2.3	Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten	29
2.2.4	Ligation von linearer DNA	29
2.2.5	Transformation von Plasmid-DNA.....	29
2.2.6	Analyse von Klonierungsprodukten	30
2.2.7	Isolation von Plasmid-DNA.....	30
2.2.8	DNA-Sequenzanalyse.....	30
2.2.9	Zellkultur.....	30
2.2.10	Expression mittels Kalziumphosphat-Transfektion	30
2.2.11	Proteinreinigung.....	31
2.2.12	Protein-Gelelektrophorese.....	32
2.2.13	Western Blot.....	32
2.2.14	Durchflusszytometrie	33
2.2.15	Präparation von Mononukleären Zellen	33
2.2.16	Differenzierung von MNC zu Makrophagen.....	34
2.2.17	Verwendung von Makrophagen für experimentelle Analysen	34
2.2.18	⁵¹ Chrom-Freisetzungsversuch	35

2.2.19	Detektion von Phagozytose mittels Durchflusszytometrie	36
2.2.20	Detektion von Phagozytose mittels <i>Life Cell Imaging</i>	37
2.2.21	Proliferationsversuche	37
2.2.22	Statistische Analyse	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung des Fc-optimierten CD38-Antikörpers Dara-DE.....	39
3.1.1	Herstellung von Dara-DE mittels eines konstruierten Expressionsvektors.....	39
3.1.2	Proteinexpression und Reinigung von Dara-DE	39
3.1.3	Analyse der Bindungseigenschaften von Dara-DE	40
3.2	Vermittlung von Effektorzellmechanismen durch Dara-DE	41
3.2.1	Untersuchung der ADCC-Vermittlung durch Dara-DE.....	41
3.2.2	Untersuchung der ADCP-Vermittlung durch Dara-DE.....	44
3.2.3	Analyse der verwendeten Makrophagen.....	45
3.3	Herstellung und Charakterisierung des Fusionsproteins SIRP α -Fc σ	47
3.3.1	Konstruktion eines Expressionsvektors zur Herstellung von SIRP α -Fc σ	47
3.3.2	Proteinexpression und Reinigung von SIRP α -Fc σ	47
3.3.3	Analyse der Bindungseigenschaften von SIRP α -Fc σ	48
3.4	Vermittlung von Effektorzellmechanismen durch SIRP α -Fc σ	49
3.4.1	Untersuchung der Effekte von SIRP α -Fc σ auf die Zellproliferation.....	49
3.4.2	Untersuchung der ADCP-Vermittlung durch SIRP α -Fc σ	49
4	Diskussion.....	56
4.1	Protein-Engineering als Strategie zur Optimierung therapeutischer Antikörper	57
4.2	CD47-Blockade zur Steigerung der ADCP-Aktivität monoklonaler Antikörper	61
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis.....	68
7	Anhang	87
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	87
7.2	Tabellenverzeichnis	88

Eidesstattliche Erklärung	89
Danksagung	90
Publikationen.....	91

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> , antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i> , antikörperabhängige zelluläre Phagozytose
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
C _H	konstante Region der schweren Kette (eines Antikörpers)
C _L	konstante Region der leichten Kette (eines Antikörpers)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i> , komplementabhängige Zytotoxizität
CDR	<i>complementarity-determining region</i> , komplementaritätsbestimmende Region
CFSE	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i> , Ereignisse pro Minute
CRAB	Akronym: hypercalcaemia, renal failure, anaemia, bone lesions
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E:T Ratio	Ratio von Effektorzelle zu Zielzelle (<i>target</i>)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
Fab	<i>fragment antigen-binding</i> , Fragment der Antigenbindung

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , konstanter Teil eines Antikörpers
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	<i>hour</i> , Stunde
H ₂ O	Wasser
HAMA	<i>human anti-mouse antibody</i> , humane Anti-Maus-Antikörper
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharide
LRS	<i>leucocyte reduction system</i> , Leukozytenreduktionssystem
m	Meter
M	Molar
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i> , Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , mittlere Fluoreszenzintensität
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MNC	<i>mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzelle
PBA	Phosphatgepufferte Albuminlösung
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SIRP α	<i>signal regulatory protein α</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i> , TRIS-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TH	T-Helfer(-Zelle)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
V _H	variable Region der schweren Kette (eines Antikörpers)
V _L	variable Region der leichten Kette (eines Antikörpers)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse (<i>weight</i>)/Volumen

1 Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Das multiple Myelom ist ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, charakterisiert durch eine maligne Expansion monoklonaler Plasmazellen (Terpos et al. 2018). Die Myelomzellen zeichnen sich durch eine Infiltration des Knochenmarks und Produktion monoklonaler Immunglobuline oder ihrer Fragmente aus (Rajkumar 2018; Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2019b).

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz in Deutschland von etwa 5/100.000 jährlich ist das Multiple Myelom eine seltene Erkrankung, gehört aber zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen (Krebs in Deutschland 2021). Es macht etwa 10% aller malignen hämatologischen Erkrankungen und etwa 1% aller Krebserkrankungen aus (Rajkumar 2020; Rajkumar et al. 2014). Beim multiplen Myelom handelt es sich um eine Erkrankung des älteren Menschen. Das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnose beträgt bei Männern 72 Jahre und bei Frauen 74 Jahre (Krebs in Deutschland 2021). In Zukunft ist aufgrund der Veränderung der Bevölkerungsstruktur mit steigender Lebenserwartung mit einer zunehmenden Prävalenz zu rechnen (Herold 2018; Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2019b; Surveillance, Epidemiology, & End Results [SEER] 2019; Krebs in Deutschland 2021). Die Zahlen zu Prognose und Überlebensraten variieren je nach Datenbasis (Rajkumar 2020). Prognose und Überlebenszeit sind vom Stadium der Erkrankung, prognostischen zytogenetischen Markern, Alter und Allgemeinzustand der Patienten sowie dem Therapieansprechen abhängig (Rajkumar 2020; Herold 2018). Innerhalb der letzten 20 Jahre konnten durch die Einführung der Stammzelltransplantation und neuer Medikamente erhebliche Fortschritte in der Therapie erzielt werden, sodass die Überlebenszeiten gestiegen sind und vorübergehende Remissionen häufiger erreicht werden können (Cazaubiel et al. 2020). Trotz dieser Fortschritte ist die Prognose nach wie vor eher ungünstig mit relativen 5-Jahres-Überlebensraten in den Jahren 2017 - 2018 von 54% bei Frauen und 56% bei Männern (Krebs in Deutschland 2021). Zudem kann auch mit maximaler Therapie bisher keine dauerhafte Heilung des Multiplen Myeloms erzielt werden. Durch aktuelle Therapien ist lediglich eine Verzögerung der Progression möglich (Herold 2018; Cazaubiel et al. 2020).

1.1.2 Ätiologie und Einteilung

Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist derzeit ungeklärt, obgleich es Hinweise auf eine genetische Disposition gibt. Es wird angenommen, dass es Risikofaktoren gibt, die die Entwicklung eines Multiplen

Myeloms begünstigen. Diskutiert werden etwa ionisierende Strahlung, Pestizide sowie Produkte der Petrochemie und Gummiverarbeitung, Adipositas und chronische Infektionen (Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2019b). Ausgang für die Entwicklung eines Multiplen Myeloms ist eine zunächst asymptomatische Vermehrung klonaler Plasmazellen. Lassen sich monoklonale Immunglobuline laborchemisch als sogenanntes M-Protein oder Paraprotein nachweisen, spricht man von einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS). Diese stellt eine Vorstufe für die Entwicklung eines Multiplen Myeloms dar, während eine intermediäre Stufe zwischen MGUS und Multiplen Myelom als Smouldering Myelom (englisch: *to smoulder* - schwelen, glimmen) bezeichnet wird. Eine Klassifikation des Multiplen Myeloms erfolgt anhand des Isotyps des produzierten monoklonalen Immunglobulins. Den größten Anteil machen IgG- und IgA-Myelome aus (ca. 80 %), gefolgt von Leichtkettenmyelomen (ca. 20 %). Myelome vom IgD- und IgE-Typ und asekretorische Myelome sind selten (van de Donk et al. 2021; Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2019b, 2019a).

1.1.3 Symptome und Diagnostik

Beim Übergang einer asymptomatischen MGUS in ein Multiples Myelom entstehen Symptome, die der Proliferation maligner Plasmazellen im Knochenmark sowie dem Anfall großer Mengen monoklonaler Immunglobuline oder Immunglobulinbestandteile geschuldet sind. Die für das Multiple Myelom typischen Osteolysen bedingen Knochendestruktion mit Frakturneigung und Hyperkalzämie. Eine hämatopoetische Insuffizienz durch die Verdrängung der Hämatopoese äußert sich in Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie und Infektneigung, mitbedingt durch den Mangel an funktionstüchtigen Antikörpern. Durch Ablagerung der kompletten oder inkompletten monoklonalen Immunglobuline kann eine AL-Amyloidose entstehen, die prinzipiell jedes Organ betreffen kann, aber am häufigsten zu renalen Funktionsstörungen führt (Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2019b; Herold 2018; Rajkumar 2020). Die Diagnosekriterien wurden von der International Myeloma Working Group (IMWG) erstellt und umfassen den Knochenmarksbefall durch klonale Plasmazellen von 10% oder mehr sowie Zeichen der Endorganschädigung im Sinne von Hyperkalzämie, renale Insuffizienz, Anämie oder Knochenläsionen, zusammengefasst unter dem englischen Akronym CRAB-Kriterien (*hypercalcaemia, renal failure, anaemia, bone lesions*). Die Diagnosekriterien wurden 2014 durch die IMWG um weitere Biomarker erweitert, welche stark mit dem nahe bevorstehenden Auftreten von Symptomen der CRAB-Kriterien assoziiert sind (Rajkumar et al. 2014).

1.1.4 Therapie

Die Einleitung einer Therapie erfolgt nach den Kriterien der International Myeloma Working Group (Rajkumar et al. 2014). Die Art der Therapie richtet sich nach dem Alter und der körperlichen

Verfassung der Patienten. Patienten, die für eine Hochdosischemotherapie geeignet sind, können eine autologe Stammzelltransplantation erhalten. Bei Hochrisikopatienten ist eine allogene Stammzelltransplantation eine Option, die sich in der Erprobung befindet und nur im Rahmen von klinischen Studien empfohlen wird (Gemeinsamer Bundesausschuss 2017; Gahrton et al. 2020). Demgegenüber stehen verschiedene medikamentöse Kombinationstherapien zur Induktions- und Erhaltungstherapie für Patienten, deren körperliche Verfassung keine Stammzelltransplantation zulässt. In der Therapie kommen Glukokortikoide wie Dexamethason und Prednison zum Einsatz. Des Weiteren spielen Zytostatika aus der Gruppe der Alkylantien (z. B. Melphalan, Cyclophosphamid) und Anthrazykline (z. B. Doxorubicin) eine Rolle. Zu den relativ neuen Substanzen gehören die Proteasom-Inhibitoren (z. B. Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib) und immunmodulierende Substanzen wie Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid, die das Überleben der Patienten erheblich verbessert haben (Kazandjian 2016; Dimopoulos et al. 2020; Gulla & Anderson 2020). Eine neue Entwicklung in der Therapie des Multiplen Myeloms sind Immuntherapien, zum Beispiel unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern (Rasche et al. 2020). Die therapeutischen Antikörper Daratumumab, Elotuzumab und neuerdings auch Isatuximab befinden sich bereits im klinischen Einsatz (Gulla & Anderson 2020). Der humane CD38-Antikörper Daratumumab war der erste monoklonale Antikörper, der für die Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen wurde (Lonial et al. 2016; Lokhorst et al. 2015). Elotuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen das Zelloberflächenantigen *signaling lymphocytic activation molecule F7* (SLAMF7; alternative Namen: *CD2 subset-1*, CS1; CD319), der kurz darauf (2015 in den USA und 2016 in der EU) zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen wurde (Lonial et al. 2015; Dimopoulos et al. 2018). Neben Daratumumab wurden weitere CD38-gerichtete Antikörper entwickelt, zu denen der kürzlich zugelassene Isatuximab und der sich in klinischer Entwicklung befindende MOR202 gehören (Martin et al. 2019; Raab et al. 2020; van de Donk & Usmani 2018).

1.2 Antikörper in der Tumortherapie

Monoklonale Antikörper spielen heutzutage eine wichtige Rolle in der Therapie vieler maligner Erkrankungen und haben die Therapieoptionen der Patienten deutlich verbessert (Carter & Lazar 2018). Sowohl für hämatologische als auch für solide Tumore wurden inzwischen zahlreiche therapeutische Antikörper gegen verschiedene Zielantigene entwickelt. Derzeit sind in der EU 33 bzw. in den USA 40 monoklonale Antikörper für die klinische Anwendung in der Onkologie zugelassen (Stand 21.12.2020) und weitere befinden sich in der Zulassungsprüfung (The Antibody Society 2020). Gleichzeitig sind monoklonale Antikörper auch für die Therapie von Autoimmunerkrankungen, inflammatorischen und degenerativen Erkrankungen unverzichtbar (The Antibody Society 2020; Elgundi et al. 2017; Heliopoulos & Patousi 2018; Samaan et al. 2019; McGregor et al. 2019).

Stoffwechselerkrankungen und Virusinfektionen oder auch bakterielle Infektionen zählen ebenfalls zu den Anwendungsgebieten monoklonaler Antikörper (The Antibody Society 2020; Jacob et al. 2020; Greig 2016; Rosenson et al. 2018). Ein prominentes Beispiel eines therapeutischen Antikörpers ist Rituximab, ein chimärer CD20-Antikörper, der zur Behandlung von diversen B-Zell-Lymphomen und Leukämien eingesetzt wird (Salles et al. 2017). In der Behandlung von Brustkrebs sowie von weiteren HER2-positiven soliden Tumoren nimmt Trastuzumab, ein gegen das Antigen *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) gerichteter, humanisierter Antikörper, einen festen Platz ein (Albanell & Baselga 1999). Der chimäre Antikörper Cetuximab richtet sich gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und wird unter anderem in der Darmkrebstherapie eingesetzt (Scott et al. 2012; Weiner et al. 2012).

1.2.1 Antikörperstruktur

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, bilden eine Familie von Glykoproteinen (Cooper 2015). Antikörper zeichnen sich speziell durch ihre Fähigkeit aus, ein spezifisches Antigen zu binden. Immunglobuline werden von B-Lymphozyten produziert und können als lösliche Antikörper oder membranständig als Bestandteil des B-Zellrezeptors auf Zelloberflächen von B-Lymphozyten vorkommen. Lösliche Antikörper werden von Plasmazellen, dem letzten Differenzierungsstadium der B-Lymphozyten, sezerniert. Es unterscheiden sich fünf Antikörperklassen bzw. -isotypen, die unterschiedliche Eigenschaften wie Struktur und Funktion aufweisen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Goulet & Atkins 2020). Humane Antikörper der Klasse IgG kommen am häufigsten vor. Sie bestehen aus je zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Aminosäureketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Edelman et al. 1969; Silverton et al. 1977). Die schweren und leichten Ketten besitzen jeweils einen konstanten und einen variablen Teil. Man unterscheidet leichte Ketten vom Typ κ und λ . Die variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) bilden zusammen die Antigenbindestelle eines Antikörpers: Hier bilden drei hypervariable Regionen die sogenannte *complementarity-determining region* (CDR 1-3), welche mit dem Epitop in Verbindung tritt. Die konstanten Domänen (analog als C_L und C_H 1-3 bezeichnet) sind für die Vermittlung von Effektorfunktionen verantwortlich (Bournazos et al. 2017). Eine weitere Unterteilung erfolgt in zwei Fragmente der Antigenbindung (*fragment antigen-binding, Fab*) oberhalb der Gelenkregion und das kristallisierbare Fragment (*fragment crystallisable, Fc*). Die Fc-Region besitzt verschiedene Funktionen und interagiert u.a. mit Bestandteilen des Komplementsystems und Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immuneffektorzellen. Durch diese Interaktionen werden wichtige Effekte von Antikörpern vermittelt. Die Antikörperklasse IgG lässt sich weiterhin in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilen, welche sich in der Aminosäuresequenz ihrer konstanten Regionen unterscheiden. Diese weisen jeweils unterschiedliche Bindungsverhalten zu Fc γ -Rezeptoren und C1q

auf, sodass sich für jede Subklasse ein eigenes Effektorfunktionsmuster ergibt (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Vidarsson et al. 2014; Murphy & Weaver 2018). Ein Antikörper der Klasse IgG ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

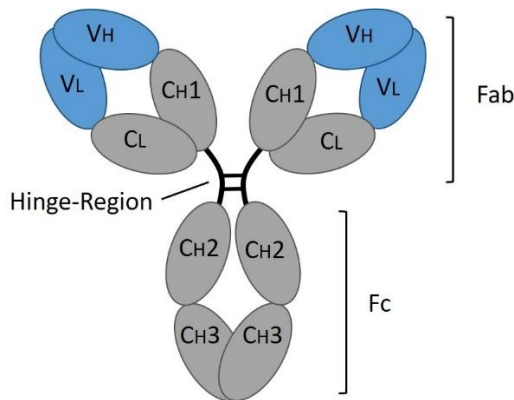


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers.

Die Domänen eines IgG1 sind hier schematisch dargestellt. Ein IgG1 besteht aus zwei schweren Ketten (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) und zwei leichten Ketten (V_L , C_L). Die variablen Domänen sind blau und die konstanten Domänen sind grau dargestellt. Disulfidbrücken verbinden die beiden schweren Ketten in der Gelenkregion (Hinge-Region) miteinander sowie jeweils die konstanten Domänen C_{H1} der schweren Ketten mit den konstanten Domänen C_L der leichten Ketten (nicht dargestellt). Abgewandelt nach (Goulet & Atkins 2020).

1.2.2 Formate monoklonaler Antikörper

Der erste therapeutische Antikörper Muromonab-CD3 wurde 1986 zugelassen und war murinen Ursprungs (Wang et al. 2022; Köhler & Milstein 1975). Murine Antikörper verursachen als körperfremde Proteine im Menschen eine Immunreaktion mit Bildung von humanen anti-Maus-Antikörpern (HAMAs, *human anti-mouse antibodies*), welche durch ihre neutralisierende Wirkung den therapeutischen Effekte erheblich einschränken (Wang et al. 2022; Meeker et al. 1985). Um den Problemen der Immunogenität muriner Antikörper zu begegnen, wurden Antikörper entwickelt, die in ihrer Struktur menschlichen Immunglobulinen stärker ähneln: Chimäre Antikörper enthalten konstante Regionen humanen Ursprungs und variable Regionen murinen Ursprungs (Wang et al. 2022; Morrison et al. 1984), (Abbildung 2). Da auch chimäre Antikörper durch ihre Immunogenität das Entstehen von HAMAs auslösen können, wurden im Verlauf der Jahre humanisierte Antikörper entwickelt, indem mit Ausnahme der Aminosäuresequenzen der CDR alle Anteile durch humane Strukturen ersetzt wurden (Wang et al. 2022; Jones et al. 1986). Mithilfe der Phagen-Display Technologie konnten schlussendlich auch vollständig humane Antikörper in großem Stil hergestellt und charakterisiert werden (Wang et al. 2022; Clackson et al. 1991). Das transgene Mausmodell stellt eine weitere Methode für die Herstellung humaner Antikörper dar (Wang et al. 2022; Lonberg 2005).

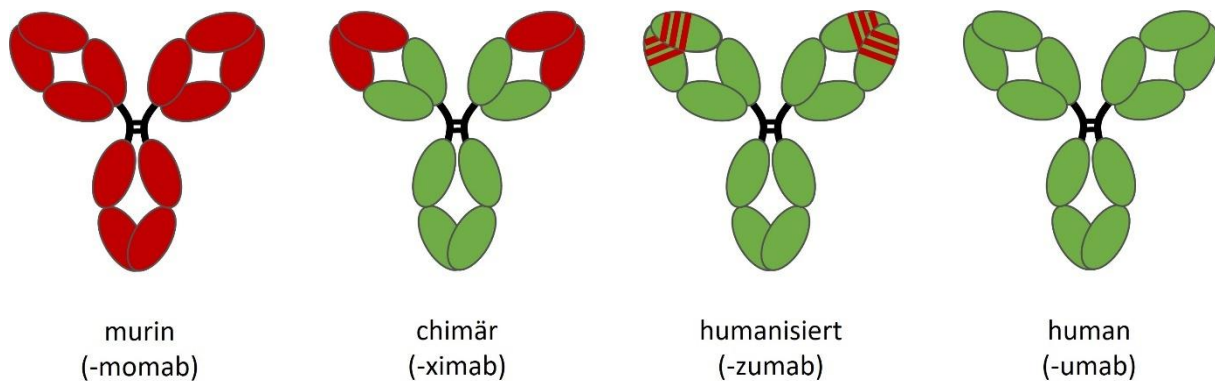


Abbildung 2: Schematische Darstellung und Nomenklatur von Antikörperformaten.

Murine Anteile sind rot, humane Anteile grün dargestellt. Abgewandelt nach (Wang et al. 2022).

1.3 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Zur Wirkung therapeutischer Antikörper auf ihre Zielstrukturen und Zielzellen tragen unterschiedliche Mechanismen bei (Carter & Lazar 2018). Direkte Effektorfunktionen sind Effekte, die allein durch die Antikörperbindung an das entsprechende Antigen entstehen. Indirekte Effekte werden über die Fc-Rezeptor-Bindung von weiteren Bestandteilen des Immunsystems vermittelt.

1.3.1 Direkte Wirkmechanismen

Die Bindung eines Antikörpers an ein Zelloberflächenantigen kann durch Blockade oder Aktivierung von Rezeptoren oder Signalproteinen direkte Effekte auf Zielzellen auslösen. Antagonistische Aktivität eines Antikörpers auf einen Wachstumsrezeptor, beispielsweise eine direkte Blockade der Bindungsstelle eines essenziellen Wachstumsfaktors, kann zur Inhibition von Zellproliferation oder zu Apoptose führen. Umgekehrt können Antikörper signalisierend wirken, indem sie durch Bindung an Zelloberflächenrezeptoren Signalkaskaden auslösen, die zum Zelltod führen oder die Zellproliferation inhibieren. Des Weiteren können Antikörper die Neutralisation von Enzymen und den Abbruch einer Signaltransduktion bewirken. Konjugierte Antikörper, die mit einem Zellgift gekoppelt sind, können durch Bindung dieses der Tumorzelle zielgerichtet zuführen. (Scott et al. 2012; Redman et al. 2015)

1.3.2 Fc-vermittelte Wirkmechanismen

Auch indirekte Effektorfunktionen sind wichtige Mechanismen zur Eliminierung von Tumorzellen (Redman et al. 2015). Sie entstehen nach Antikörper-Antigen-Bindung durch die Aktivierung weiterer Komponenten des Immunsystems über die Fc-Domäne des Antikörpers. Zu den Fc-abhängigen Effektormechanismen gehören die komplementabhängige Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) sowie die Rekrutierung von Effektorzellen über Fc-Rezeptoren zur Induktion der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*,

ADCC) oder der antikörperabhängigen zellulären Phagozytose (*antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*, ADCP).

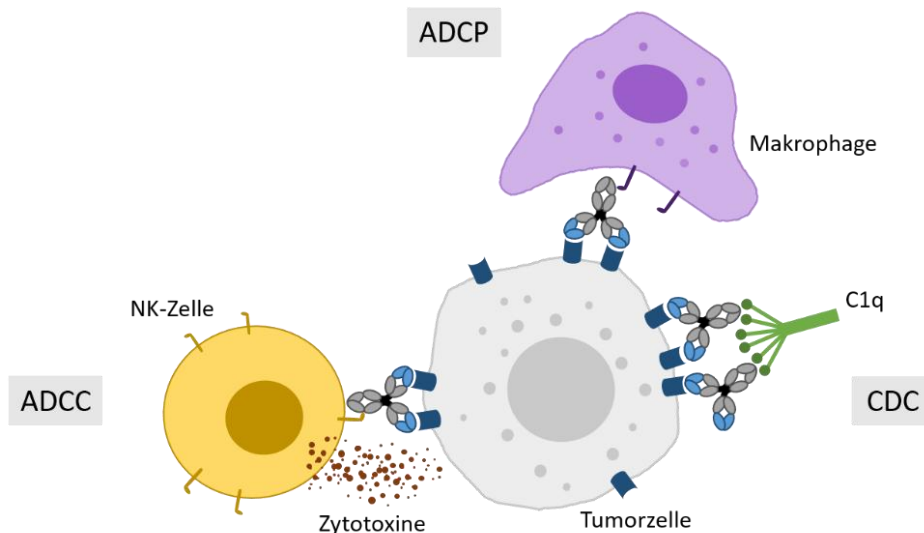


Abbildung 3: Schematische Darstellung wichtiger Fc-abhängiger Effektormechanismen.

Antigene auf der Zelloberfläche einer Zielzelle (hier Tumorzelle, grau) werden durch Antikörper erkannt und gebunden, es entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe. Rekrutierung von Effektorzellen: Über die Fc-Regionen der Antigen-bindenden Antikörper gelangen Effektorzellen mit Hilfe ihrer membranständigen Fc-Rezeptoren in Kontakt zur Zielzelle und werden über Weiterleitung intrazellulärer Signalkaskaden aktiviert. ADCC: Die aktivierte Effektorzelle (hier NK-Zelle, gelb) schüttet Zytotoxine aus und schädigt somit die Zielzelle bis hin zum Zelltod. ADCP: Die Effektorzelle (hier Makrophage, violett) beginnt nach ihrer Aktivierung mit der Phagozytose und anschließend Lyse der Zielzelle. CDC: An die Antigen-Antikörper-Komplexe lagern sich die Komplementfaktoren C1q, C1r und C1s an. Diese bilden zusammen den C1-Komplex, mit dem der klassische Weg der Komplementkaskade startet. Am Ende der Komplementkaskade steht die Bildung eines Membranangriffskomplexes, der zu Lyse der Zielzelle führt. Abbildung abgewandelt nach (Vukovic et al. 2021)

1.3.2.1 Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der Immunglobuline und werden von einer Vielzahl hämatologischer Zellen exprimiert. Zu diesen Effektorzellen gehören Lymphozyten, wie zum Beispiel natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie myeloische Zellen wie Monozyten, Granulozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen. Fc-Rezeptoren binden Immunkomplexe, die aus Antigenen und Antikörpern bestehen. Durch Kreuzvernetzung (*crosslinking*) bewirken sie verschiedene Signalwege in den Effektorzellen, wobei der resultierende Effekt abhängig von der Art des Fc-Rezeptors ist. Fc γ -Rezeptoren interagieren mit der Fc-Region von Antikörpern der Klasse IgG. Es existieren drei Klassen von Fc γ -Rezeptoren, welche mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen IgG-Subklassen binden und aktivierend oder inhibierend wirken können (Tabelle 1). (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Cohen-Solal et al. 2004)

Tabelle 1: Humane Fcγ-Rezeptoren

	FcγRI (CD64)	FcγRIIA (CD32a)	FcγRIIB (CD32b)	FcγRIIC (CD32c)	FcγRIIIA (CD16a)	FcγRIIIB (CD16b)
Effekt	aktivierend	aktivierend	inhibierend	aktivierend	aktivierend	aktivierend
Affinität	hoch	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig
Expression	Monozyten Makrophagen Granulozyten Dendritische Zellen	Monozyten Makrophagen Granulozyten	Monozyten Makrophagen Granulozyten B-Zellen	Monozyten Makrophagen NK-Zellen	NK-Zellen Monozyten Makrophagen	Granulozyten

Tabelle der humanen Fcγ-Rezeptoren, abgewandelt nach (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Murphy & Weaver 2018)

Die Aktivierung von Fcγ-Rezeptoren trägt entscheidend zur Antitumoraktivität von therapeutischen Antikörpern bei. Sowohl aktivierende als auch inhibierende Fcγ-Rezeptoren beeinflussen die von Antikörpern vermittelten Effekte. Experimente mit genetisch manipulierten, Fcγ-defizienten Mäusen verdeutlichen die Rolle der FcγR-abhängigen Wirkmechanismen von Antikörpern. Bei Mäusen ohne funktionierenden inhibitorischen FcγRIIB zeigten therapeutische Antikörper eine erhöhte ADCC. Umgekehrt induzierten Antikörper in *Knockout*-Mäusen ohne aktivierende Fcγ-Rezeptoren schlechtere Anti-Tumor-Effekte (Clynes et al. 2000). Das zytotoxische Potential eines Antikörpers wird durch seine Bindungsaffinität zu aktivierenden und inhibierenden Fcγ-Rezeptoren bestimmt (Nimmerjahn & Ravetch 2005). Klinisch wurde die Bedeutung der Fcγ-Rezeptoren für die therapeutische Effektivität monoklonaler Antikörper durch die Auswirkung von Polymorphismen der Fcγ-Rezeptor-Gene auf das Ansprechen deutlich. Es wurden funktionelle Allelvarianten des FcγRIIIA (158 V/F) und des FcγRIIA (131 H/R) identifiziert, die aufgrund unterschiedlich ausgeprägter Affinitäten zu IgG1 und IgG2 die Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern beeinflussen (Weng & Levy 2003; Dall'Ozzo et al. 2004). Das FcγRIIIa-158V-Allel und das FcγRIIA-131H-Allel zeigen höhere ADCC-Aktivität *in vitro* und sind in klinischen Studien mit besseren Ansprechraten auf Antikörpertherapien assoziiert (Musolino et al. 2008; Mellor et al. 2013). Angesichts dieser Beobachtungen erscheint die Entwicklung von Antikörpern mit optimierten Fc-Domänen für höhere Bindungsaffinitäten zu den aktivierenden Fcγ-Rezeptoren und niedrigere Bindungsaffinitäten zum inhibierenden FcγRIIB für eine verbesserte Antitumoraktivität aussichtsreich (Nimmerjahn & Ravetch 2008).

1.3.2.2 Indirekte Wirkmechanismen

Die komplementabhängige Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) ist ein indirekter, Fc-vermittelter Effektormechanismus. Die CDC wird durch Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen auf der Zelloberfläche induziert. An die gebundenen Antikörper bindet das Komplementprotein C1q, wodurch der klassische Weg der Komplementkaskade gestartet wird, an dessen Ende die Lyse der

Zielzelle durch einen Membran-angreifenden Komplex und die Freisetzung proinflammatorischer Stoffe stehen (Golay & Introna 2012; Dunkelberger & Song 2010; Redman et al. 2015). Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) und die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (*antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*, ADCP) sind Mechanismen, die über die Rekrutierung von Immuneffektorzellen entstehen. Die ADCC ist wahrscheinlich für die Wirkung von therapeutischen Antikörpern in der Krebstherapie von großer Bedeutung (Haij et al. 2010). Eine besonders wichtige Rolle bei der ADCC-Vermittlung spielen die NK-Zellen, aber auch Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten können ADCC vermitteln (Golay & Introna 2012; Wang et al. 2015; Redman et al. 2015). Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt über die Fc γ -Rezeptoren Fc γ RIIIA und Fc γ RIIC. Mit Antikörpern opsonierte Zielzellen werden über die Bindung zwischen Fc-Teilen und Fc γ -Rezeptoren erkannt und die NK-Zelle aktiviert. Der NK-Zell-Aktivierung folgt die Freisetzung von Zytokinen und Degranulation zytotoxischer Enzyme, wie den Perforinen und Granzymen, welche zur Perforation der Zellmembran und zur Lyse und Apoptose der Zielzellen führen (Golay & Introna 2012; Wang et al. 2015; Redman et al. 2015).

Auch die Phagozytose durch Makrophagen leistet einen wichtigen Beitrag zur antikörperabhängigen Tumorzelleliminierung (Gül & van Egmond 2015). Die ADCP von antikörperopsonierten Tumorzellen durch Makrophagen erfolgt über den hochaffinen Fc γ RI und die niedrigaffinen Fc γ RIIA und Fc γ RIIIA (Munn et al. 1991). Über die Interaktion zwischen dem Fc-Teil der Antikörper und den Fc γ -Rezeptoren erlangen Makrophagen Kontakt zu den Tumorzellen und phagozytieren und verdauen diese. Unter Antikörpertherapie können hierbei Makrophagen Tumorzellen durch ADCP effektiv eliminieren (Gül et al. 2014). In der Tumorthherapie erfolgreich eingesetzte Antikörper wie Rituximab und Trastuzumab entfalten ihre Wirkung unter anderem über die effektorzellvermittelten Mechanismen ADCC und ADCP (Manches et al. 2003; Cartron et al. 2004; Collins et al. 2012; Valabrega et al. 2007).

1.3.2.3 Makrophagen als Effektorzellen

Makrophagen exprimieren alle Klassen von Fc γ -Rezeptoren und die durch sie vermittelte ADCP ist vermutlich von großer Bedeutung in der antikörpervermittelten Tumorzelleliminierung (Weiskopf & Weissman 2015). Da Makrophagen nicht im Blut zirkulieren, sind sie schwer zugänglich und können nicht in ausreichenden Mengen für Experimente isoliert werden. Ersatzweise können Monozyten aus dem Blut isoliert und über mehrere Tage in Kultur zum Beispiel mit Stimulatoren wie M-CSF zu Makrophagen differenziert werden. Mit diesen generierten Makrophagen können dann *in vitro* Phagozytose-Experimente durchgeführt werden (Munn & Cheung 1990; Becker et al. 1987).

Die Gruppe der Monozyten und Makrophagen zeichnet sich insbesondere durch ihre Diversität und Plastizität aus (Sica & Mantovani 2012). Die Rekrutierung von Makrophagen wird durch Stimulatoren

in Form von Zytokinen oder mikrobiellen Stoffen in der Mikroumgebung der Zellen beeinflusst (Ribatti et al. 2014; Mantovani et al. 2002). Je nach Art und Zusammensetzung der Stimulatoren entwickeln sich Makrophagen mit unterschiedlicher Aktivierung bzw. unterschiedlicher Polarisierung. Aufgrund ihrer Oberflächenantigene und Funktionen werden Makrophagen grob in M1 (klassisch aktiviert) und M2 (alternativ aktiviert) kategorisiert, wobei der Übergang zwischen diesen funktionellen Aktivierungszuständen fließend ist und auch hier wiederum Subpopulationen unterschieden werden können (Ribatti et al. 2014; Martinez 2008). Die Aktivierung zu M1-Makrophagen wird typischerweise durch IFN- γ und LPS begünstigt. M1-Makrophagen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu sezernieren und zeichnen sich funktionell durch ihre verstärkte Phagozytoseaktivität und ihre Fähigkeit, intrazelluläre Erreger zu eliminieren und TH1-Antworten herbeizuführen, aus (Martinez 2008). Interleukine wie IL-4, IL-13 und IL-10 hingegen fördern die Aktivierung von M2-polarisierten Makrophagen (Mantovani et al. 2002), die TH2-Antworten unterstützen und außerdem eine Rolle bei der Auflösung von inflammatorischem Geschehen spielen (Martinez 2008). Bei der *ex vivo*-Differenzierung von Monozyten mit M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) werden Makrophagen generiert, die erhöhte Level von Fc γ RIIIA (CD16A) und Fc γ RI (CD64) exprimieren und sich durch eine hohe Plastizität, also das Potential, durch weitere Stimulatoren polarisiert zu werden, auszeichnen (Ambarus et al. 2012).

In der Pathologie des Multiplen Myeloms spielen tumorassoziierte Makrophagen eine tragende Rolle, die dem Profil der M2-polarisierten Makrophagen ähneln (Mantovani et al. 2002). Bei einem aktiven Myelom rekrutieren und aktivieren die Plasmazellen myelomassoziierte Makrophagen im Knochenmark, die wiederum die Myelomzellen zu Proliferation stimulieren und vor Apoptose schützen (Ribatti et al. 2014; Zheng et al. 2009).

1.4 CD38 als Zielantigen

CD38 ist ein Molekül, das erstmals 1980 als T10 auf Thymozyten und T-ALL-Zellen beschrieben wurde (Reinherz et al. 1980). Es handelt sich um ein Typ II-Transmembran-Glykoprotein von 46 kDa (Malavasi et al. 1994). In seiner Funktion als Rezeptor spielt CD38 zusammen mit seinem Liganden CD31 eine Rolle bei der Lymphozytenadhäsion und -migration (Deaglio et al. 1998). Weiterhin ist CD38 durch seine enzymatische Funktion in Form von Zyklase- sowie Hydrolaseaktivität am NAD⁺- und NADP⁺-Metabolismus und somit an der Ca²⁺-Mobilisation beteiligt, die wiederum wichtig für die zelluläre Signaltransduktion ist (Howard et al. 1993). Im gesunden Gewebe wird CD38 auf lymphatischen und myeloischen Zellen exprimiert, darunter B-Vorläuferzellen, Plasmazellen, Thymozyten, zirkulierende NK-Zellen und einige Monozyten. Niedrige Expressionslevel sind auch auf Erythrozyten und Thrombozyten sowie einigen nicht-hämatologischen Geweben vorhanden (van de Donk et al. 2016; Funaro et al. 2000). Eine übermäßige CD38-Expression geht mit einigen Tumorerkrankungen einher,

insbesondere mit malignen hämatologischen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom, chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), akuter myeloischer Leukämie (AML) oder der Plasmazellleukämie (PCL) (van de Donk et al. 2016; Deaglio et al. 2001). Insbesondere die neoplastischen Plasmazellen des Multiplen Myeloms zeichnen sich durch eine hohe CD38-Expression aus, sodass sich CD38 hier als gutes Zielantigen für die Entwicklung therapeutischer Antikörper anbot (Lin et al. 2004).

1.5 Daratumumab

Daratumumab ist ein humaner monoklonaler IgG1 κ -Antikörper gegen das CD38-Antigen, welcher zur Behandlung des Multiplen Myeloms verwendet wird (Lonial et al. 2016). Der Antikörper wurde von Genmab entwickelt und wird von Janssen Biotech unter dem Produktnamen DARZALEX[®] hergestellt (Weers et al. 2011). Die Zulassung von Daratumumab erfolgte 2015 durch die Food and Drug Administration (FDA) in den USA und 2016 durch die European Medicines Agency (EMA) in Europa als Monotherapie bei rezidivierender und refraktärer Erkrankung (Lonial et al. 2016). Ein Jahr später wurde die Zulassung auf eine Kombinationstherapie mit Bortezomib/Dexamethason oder Lenalidomid/Dexamethason bei vorbehandelten Patienten erweitert (Palumbo et al. 2016; Dimopoulos et al. 2016). Seit August 2018 darf Daratumumab auch in der Erstlinientherapie in Kombination mit Bortezomib/Melphalan/Prednison verwendet werden, sodass von da an auch neu diagnostizierte, für eine Stammzelltransplantation ungeeignete Patienten von dem Antikörper profitierten (Mateos et al. 2018). Die häufigsten Nebenwirkungen der Therapie mit Daratumumab sind infusionsbedingte Reaktionen, des weiteren Hämatotoxizität, die sich vor allem in Neutropenie, Thrombozytopenie, Anämie und Infektionen äußern kann (Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2019b; Fachinformation DARZALEX[®] 2023). Im Vergleich zu den klassischen Chemotherapeutika hat Daratumumab ein günstiges Nebenwirkungsprofil und die Kombination mit bisherigen Therapeutika führt zu keiner zusätzlichen Toxizität (Im & Pavletic 2017). Neben seiner erfolgreichen Anwendung in der Therapie des Multiplen Myeloms, wird die Wirkung von Daratumumab bei anderen CD38-positiven malignen hämatologischen Erkrankungen untersucht, unter anderem bei T-ALL (Bride et al. 2018; Vogiatzi et al. 2019), CLL (Matas-Céspedes et al. 2017) und verschiedenen weiteren Subtypen der Non-Hodgkin-Lymphome (Salles et al. 2019). Auch Autoimmunerkrankungen kommen als mögliche Anwendungsgebiete von Daratumumab in Frage (Cole et al. 2018).

1.5.1 Wirkmechanismen von Daratumumab

Daratumumab wurde durch Immunisierung von human-IgG-transgenen Mäusen mit rekombinantem CD38 entwickelt und aufgrund seiner starken CDC-Induktion aus einem Panel von 42 CD38-Antikörpern

ausgewählt (Weers et al. 2011). Der Anti-Tumor-Effekt von Daratumumab beruht unter anderem auf Fc-vermittelten Wirkmechanismen, zu denen sowohl effektorzellabhängige (ADCC, ADCP) als auch – unabhängige (CDC, PCD) Mechanismen gehören. Gleichzeitig tragen Fab-abhängige Wirkungen auf das Zielantigen zu dem Effekt bei. Der Beitrag dieser individuellen Mechanismen zur therapeutischen Wirksamkeit im Patienten ist jedoch noch nicht vollständig verstanden.

1.5.1.1 Fc-vermittelte Wirkmechanismen

In *in vitro* Versuchen induzierte Daratumumab CDC sowohl von Daudi-Zellen als auch von frisch isolierten Myelomzellen aus dem Knochenmark von Myelompatienten. Zudem vermittelte Daratumumab ADCC von CD38-positiven Myelomzelllinien im Beisein von NK-Zellen, ebenso ADCC von Patientenmyelomzellen im autologen und allogenen Setting (Weers et al. 2011). Die Effektivität von ADCC und CDC unterschied sich hierbei nicht zwischen neu diagnostizierten Patienten und vielfach mit Lenalidomid und Bortezomib vorbehandelten Patienten mit refraktärer Erkrankung. Dagegen hatte das CD38-Expressionslevel einen Einfluss auf die Daratumumab-vermittelte ADCC und CDC (Nijhof et al. 2015). Die ADCP ist ein weiterer Mechanismus, über den Daratumumab zur Tumorzelleliminierung beiträgt. Wie Overdijk et al. zeigen konnten, induzierte Daratumumab die Phagozytose von Myelomzelllinien und Burkitt-Lymphomlinien sowie von Myelomzellen aus Patientenproben durch humane Makrophagen. Der Beitrag von ADCP zur Anti-Tumor-Aktivität von Daratumumab konnte außerdem in Xenograft-Mausmodellen gezeigt werden (Overdijk et al. 2015).

1.5.1.2 Fab-vermittelte Wirkmechanismen

Darüber hinaus zeigt Daratumumab Fab-vermittelte Wirkungen. Durch Ligandenblockade von CD38 führt der Einsatz von Daratumumab zu einer Proliferationsinhibition der Tumorzellen. Außerdem moduliert Daratumumab die enzymatische Aktivität von CD38: die Zyklaseaktivität wird herabgesetzt und die Hydrolaseaktivität verstärkt (van de Donk et al. 2016). Über eine Fc γ -Rezeptor-vermittelte Kreuzvernetzung kann Daratumumab zudem die direkte Apoptose (PCD) von CD38-exprimierenden Myelomzellen induzieren (Overdijk et al. 2016). Nicht zuletzt zeigt Daratumumab immunmodulatorische Effekte. Durch Elimination CD38-positiver Suppressorzellen wie regulatorischer T-Zellen, regulatorischer B-Zellen und myeloider Suppressorzellen in der Tumormikroumgebung führt Daratumumab zu einer gesteigerten Anti-Tumor-Immunität (Krejci et al. 2016).

1.6 Strategien zur Optimierung therapeutischer Antikörper

Der Einsatz monoklonaler Antikörper ermöglicht in vielen Fällen eine sehr gezielte und spezifische Therapie verschiedener Erkrankungen. Um die Vorteile der Antikörpereigenschaften für die Therapie auszureizen und sie zu optimieren und zu verstärken, wurden vielfältige Antikörperformate und -derivate entwickelt. Über Protein-Engineering und Glyko-Engineering können gezielte Veränderungen

am Antikörper vorgenommen und somit sowohl Effektorfunktionen als auch pharmakokinetische Eigenschaften beeinflusst werden (Goulet & Atkins 2020). Das Fc-Engineering, die gezielte Veränderung des Fc-Teils eines Antikörpers, zielt darauf ab, Antikörper mit verstärkten Effektorfunktionen wie CDC, ADCC oder ADCP durch gesteigerte Bindungsaffinitäten zu Komplement oder aktivierenden Fc-Rezeptoren zu generieren (Kellner et al. 2014). Im Vergleich zu Antikörpern in ihren natürlich vorkommenden Formen haben Antikörperfragmente aufgrund ihres reduzierten Molekulargewichts den Vorteil einer erhöhten Diffusionsrate ins Gewebe und somit höherer Bioverfügbarkeit (Goulet & Atkins 2020, 2020; Xenaki et al. 2017). Gleichzeitig bedingt die geringere Größe eine schnellere Elimination. Häufig genutzte Formen der Antikörperfragmente sind Fab-Fragmente oder das scFv (single chain Fv), welches aus den variablen Domänen V_H und V_L besteht, die mit einer Peptidkette verbunden sind (Abbildung 4). Der aus dem fehlenden Fc-Teil resultierende Verlust von Effektormechanismen macht die Fragmente interessant für Therapien, bei denen keine Immunaktivierung erwünscht ist (Goulet & Atkins 2020). Antikörpermultimere wiederum haben den Vorteil einer erhöhten Bindung zum Antigen, sind jedoch aufwändiger in der Herstellung und bringen ein hohes Molekulargewicht mit sich (Goulet & Atkins 2020). Antikörperkonjugate kombinieren Antikörper oder Antikörperfragmente mit weiteren Wirkstoffen wie Immunstimulatoren, Toxinen oder wiederum Antikörperfragmenten, wodurch die Wirkung verstärkt oder Eigenschaften wie Stabilität verbessert werden können (Goulet & Atkins 2020; Shin et al. 2021). Besonders Antikörper-Wirkstoff-Konjugate mit Toxinen sind interessant für anti-neoplastische Therapien, da sie die zytotoxische Wirkung mit der Spezifität des Antikörpers vereinen (Ponziani et al. 2020). Fusionsproteine sind eine weitere Kategorie der Antikörperkonjugate, sie verbinden die erwünschten Eigenschaften des Antikörpers mit den biologischen Wirkungen des konjugierten Proteins. Unter anderem können auch Biomoleküle aus Gründen der Stabilisierung und Verlängerung der Halbwertszeit mit Antikörperfragmenten wie Fc kombiniert werden (Goulet & Atkins 2020; Jafari et al. 2017). Multispezifische Antikörper resultieren aus der Kombination unterschiedlicher Antikörperdomänen und sind ein vielversprechendes Feld der Immuntherapie. Bispezifische Antikörper besitzen zwei verschiedene variable Fragmente und können somit zwei Epitope binden. Die Bispezifität ermöglicht das gleichzeitige Blockieren zweier Signalwege oder eine spezifischere Bindung bestimmter Zelltypen (Fan et al. 2015). *Bispecific T cell engagers* (BiTE) kombinieren ein gegen CD3 gerichtetes Einzelkettenfragment der variablen Regionen (scFv) mit einem scFv gegen ein Tumorantigen. Dadurch bringen BiTE-Moleküle wie Blinatumomab Antikörper, T-Zellen und Tumorzellen zusammen, um T-Zell-Zytotoxizität gegen die malignen Zellen hervorzurufen (Im & Pavletic 2017; Fan et al. 2015). Ebenfalls eine interessante Entwicklung sind die sogenannten CAR T-Zellen (*Chimeric Antigen Receptor T-Cells*). Es handelt sich um genetisch so modifizierte T-Zellen, welche auf ihrer Oberfläche einen Antigenrezeptor für ein spezifisches Tumorantigen exprimieren, wodurch eine HLA-unabhängige

Tumorerkennung, verstärkte T-Zell-Aktivierung und somit eine langanhaltende Antitumor-Aktivität im Patienten erzielt werden kann (Im & Pavletic 2017; Maus et al. 2014). Auch für die Therapie des Multiplen Myeloms sind diese Strategien bereits zugelassen (Nishida & Yamada 2019).

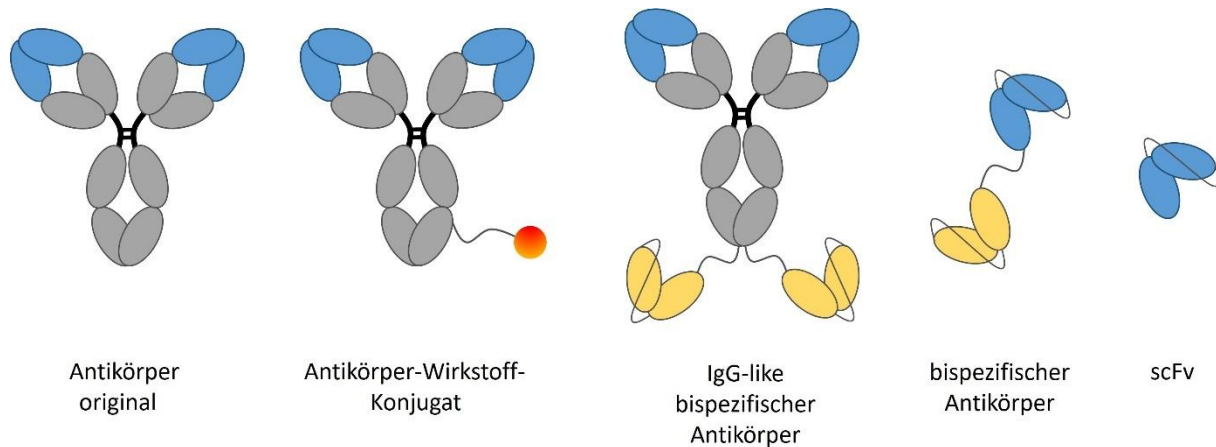


Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperformate und -derivate.

Links abgebildet ist ein originaler Antikörper vom Typ IgG. Ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat entsteht durch Kopplung mit einem zumeist zytotoxischen Agens am Fc-Teil. Bispezifische Antikörper können das Format eines vollständigen Antikörpers enthalten (IgG-like bispezifischer Antikörper) oder sich aus scFv zusammensetzen. Abgewandelt nach (Wang et al. 2022).

1.6.1 Fc-Engineering zur Optimierung von monoklonalen Antikörpern

Eine Strategie zur Optimierung von Antikörperwirkungen stellt die gezielte Veränderung der Fc-Domäne dar, um die Bindungsaffinitäten zu Fc-Rezeptoren und somit die Effektorfunktionen eines Antikörpers zu beeinflussen und zu verbessern. Ziel dieses sogenannten Fc-Engineerings ist es, eine erhöhte Affinität zu aktivierenden Fc γ -Rezeptoren und eine verminderte Affinität zum inhibitorischen Fc γ R1IB zu erreichen (Kellner et al. 2014; Cartron et al. 2004). Sowohl die Aminosäuresequenz des Fc-Teils als auch die Glykosylierung bestimmen die Bindungsstärken zu den verschiedenen Fc-Rezeptortypen (Shields et al. 2001; Wright & Morrison 1997). Durch gezieltes Fc-Engineering in diesen Bereichen können einzelne oder mehrere Effektormechanismen verstärkt werden. Antikörper gegen bestimmte Antigene wie zum Beispiel CD19, die als native IgG1-Moleküle bisher wenig Effekte zeigen, können durch Fc-Engineering der Tumorthherapie zugänglich gemacht werden (Kellner et al. 2018). Ein Vorteil des Fc-Engineerings ist zudem, dass optimierte Antikörper bei unterschiedlich hohen Expressionslevel des Ziel-Antigens und auch bei geringer Antigenexpression eine Verstärkung der antikörperabhängigen Zytotoxizität bewirken können (Lazar et al. 2006). Da Veränderungen einer Fc-Bindestelle oft wiederum Auswirkungen auf die Funktion anderer Bindestellen haben, ist es schwierig alle

Effektormechanismen gleichzeitig zu steigern. Jedoch können Antikörper mit verschiedenen Wirkprofilen erstellt werden (Lazar et al. 2006).

Modifikationen im Bereich der Kohlenhydratketten werden als Glyko-Engineering bezeichnet. Hier führt beispielsweise ein reduzierter Fucose-Gehalt im Fc-Teil zu einer verbesserten ADCC-Induktion (Shinkawa et al. 2003). Der CD20-Antikörper Obinutuzumab ist ein glyko-optimierter monoklonaler Antikörper, der zur Therapie von B-Zell-Lymphomen eingesetzt wird. Er zeichnet sich durch eine durch das Fc-Engineering erzielte erhöhte ADCC-Funktion aus. Aufgrund des gebundenen CD20-Epitops induziert der Antikörper zusätzlich Zelltod, besitzt aber eine verminderte Komplementbindung und CDC-Funktion (Im & Pavletic 2017; Mössner et al. 2010).

Protein-Engineering hingegen bezeichnet Modifikationen im Bereich der Aminosäuresequenz. Shields und Kollegen identifizierten verschiedene Aminosäurereste im Fc-Teil von IgG, die zu verstärkten Bindungen zu einzelnen oder mehreren Fc γ -Rezeptoren führten oder auch die Bindung zu bestimmten Fc γ -Rezeptoren verstärkten und gleichzeitig zu anderen Fc γ -Rezeptortypen reduzierten (Shields et al. 2001). Fc-Varianten mit erhöhter Fc γ RIIIA-Bindung zeigten auch eine erhöhte ADCC-Aktivität (Shields et al. 2001). Durch Protein-Engineering können also Antikörper mit optimalen Effektorfunktionen generiert werden. Lazar et al. generierten durch Aminosäureaustausch an der Fc γ R-Bindestelle eine Fc-Variante mit verbesserten Effektorfunktionen. Die Fc-Variante S239D/I332E besaß eine stark erhöhte Affinität zu Fc γ RIIIa sowie erhöhte Affinität zu Fc γ RIIa und Fc γ RIIb. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sie verbesserte ADCC- und ADCP-Funktionen bei unverminderter CDC-Funktion, welches an PBMC von Spendern mit den Fc γ RIIIa-Varianten V158 und F158 getestet wurde (Lazar et al. 2006). Inzwischen wurden einige Fc-optimierte Antikörper der Variante S239D/I332E hergestellt, darunter der CD19-Antikörper Tafasitamab (MOR208, XmAb5574). Tafasitamab konnte die ADCC gegen B-Lymphom- und Leukämiezelllinien im Vergleich zum Wildtyp stark vervielfachen (Horton et al. 2008), zeigte sowohl ADCC-Aktivität gegen ALL-Zellen von Patienten (Kellner et al. 2013) als auch eine effiziente B-Zell-Depletion *in vivo* (Zalevsky et al. 2009) und führte zu einer Eradikation von aus Patienten stammenden ALL im Xenograft-Modell (Schewe et al. 2017). Auch in einer klinischen Phase-IIa-Studie zeigte MOR208 Effektivität bei B-NHL-Patienten, insbesondere in Kombination mit Lenalidomid (Jurczak et al. 2018), sodass diese Kombinationstherapie 2020 zur Behandlung erwachsener Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem DLBCL zugelassen wurde. Dem ebenfalls Fc-optimierten CD133-Antikörper 293C3-SDIE konnte eine gesteigerte ADCC gegen CD133-positive AML-Zellen (Koerner et al. 2017) und gegen Kolonkarzinom-Zelllinien (Schmied et al. 2019b) nachgewiesen werden. Wie diese Beispiele belegen, demonstriert die Fc-Variante S239D/I332E eine vielversprechende Wirkung und stellt eine potenzielle Möglichkeit dar, Antikörper mit verschiedenen Zielantigenen insbesondere hinsichtlich ihrer ADCC-Funktion zu optimieren.

Sowohl Glyko-Engineering als auch Protein-Engineering eignen sich zur Optimierung von Antikörpern. Beide Strategien können auch erfolgreich miteinander kombiniert werden. Hiervon zeugen ein doppelt Fc-optimierter CD20-Antikörper (Wirt et al. 2017) und doppelt optimierte CD19-Antikörper (Roßkopf et al. 2020).

1.7 Synergistische Verstärkung von Antikörperereffekten durch Signalblockade

Bisher wurden vor allem Strategien zur Verbesserung der antikörpervermittelten Effektormechanismen dargestellt, die auf Veränderung der Antikörperstruktur basieren. Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Antikörperwirkung besteht in der Kombination des Antikörpers mit synergistisch wirkenden Substanzen, die in inhibitorische Signalwege der Immunantwort eingreifen, also sogenannte Immun-Checkpoints angreifen. Die Interaktion des myeloischen inhibitorischen Immunorezeptors *signal regulatory protein α* (SIRP α) und seines Bindungspartners CD47 stellt ein inhibitorisches Signal dar, das die Phagozytose durch Makrophagen hemmt. Die Blockade dieses antiphagozytotischen ‚Don’t-eat-me‘-Signals bietet eine Möglichkeit, die durch Antikörper vermittelte Phagozytose von Tumorzellen zu erhöhen (Barclay & van den Berg 2014).

1.7.1 SIRP α und CD47

CD47 ist ein auf allen Zellen, inklusive Erythrozyten und Thrombozyten, exprimiertes Protein mit fünf Transmembranregionen und einer Ig-ähnlichen Domäne, die mit SIRP α interagiert (Barclay & van den Berg 2014). SIRP α , auch bezeichnet als SHPS-1 oder CD172a, erstmals 1996 beschrieben (Fujioka et al. 1996), besitzt drei Ig-ähnliche extrazelluläre Domänen, eine Transmembranregion und ein ITIM-Motiv in der zytoplasmatischen Region, über welches es seine inhibierende Signalwirkung generiert. Über die N-terminale extrazelluläre V-Domäne findet die Bindung zum Liganden CD47 statt. (Barclay & van den Berg 2014; Matlung et al. 2017; van den Berg et al. 2004; Liu et al. 2007). Obwohl CD47 auf allen Zellen vorkommt, variiert die CD47-Expression je nach Immunstatus oder Krankheit. Hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen zeigen eine hohe CD47-Expression, die bei Mobilisierung noch steigt. Die Hochregulierung von CD47 senkt die Wahrscheinlichkeit für diese Zellen phagozytiert zu werden (Jaiswal et al. 2009). Hohe CD47-Level wurden aber auch auf vielen verschiedenen Krebszellen festgestellt, sowohl hämatologischen (Jaiswal et al. 2009; Majeti et al. 2009) als auch nicht-hämatologischen Ursprungs (Willingham et al. 2012). Hohe CD47-Level scheinen von Bedeutung für das Überleben der Krebszellen zu sein (Chao et al. 2010a; Majeti et al. 2009), während eine Herunterregulierung von CD47, wie sie bei der Hämophagozytischen Lymphohistiozytose auf hämatopoetischen Stammzellen stattfindet, bewirkt, dass diese Zellen eher phagozytiert werden (Kuriyama et al. 2012). Im Gegensatz zu CD47, lassen sich bei SIRP α stabile und selektive Expressionslevel beobachten (Adams et al. 1998). Die Expression von SIRP α findet sich vorwiegend auf

myeloischen Zellen (Fujioka et al. 1996), darunter Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen, aber auch auf neuronalen Zellen (Adams et al. 1998).

Früh wurde CD47 als Ligand des SIRP α identifiziert, zunächst als an der Zelladhäsion beteiligte Interaktion (Seiffert et al. 1999). Den Hinweis auf die Rolle von CD47 in der Homöostase hämatopoetischer Zellen gaben Versuche mit CD47-defizienten Erythrozyten, die, nachdem sie Wildtyp-Mäusen infundiert wurden, innerhalb von Stunden durch Milzmakrophagen eliminiert wurden (Oldenborg 2000; Barclay & van den Berg 2014). Auf normalen Erythrozyten verhinderte CD47 diese Eliminierung durch die Bindung von SIRP α auf den Makrophagen (Oldenborg 2000; Barclay & van den Berg 2014). Der CD47-SIRP α -Interaktion wurde dementsprechend eine wichtige Rolle bei der Hämostase und der immunologischen Selbsterkennung zugeschrieben (van den Berg & van der Schoot 2008). Es besteht ein relevanter Zusammenhang des CD47-SIRP α -vermittelten ‚Don’t-eat-me‘-Signals und Krebserkrankungen (Matlung et al. 2017; Zhao et al. 2011). CD47-Überexpression auf Tumorzellen ist mit einer gesteigerten Pathogenität und schlechteren Prognose assoziiert (Majeti et al. 2009; Chao et al. 2010a; Jaiswal et al. 2009) und steht zudem im Zusammenhang mit einem schlechteren Ansprechen auf eine tumorgerichtete Antikörpertherapie (Zhao et al. 2011; Chao et al. 2010a; Majeti et al. 2009; Willingham et al. 2012). Die CD47-Blockade durch einen CD47-gerichteten Antikörper führte bei verschiedenen Malignomen zu gesteigerter Phagozytose von Tumorzellen durch Makrophagen, darunter hämatologische Malignome wie AML (Majeti et al. 2009), ALL (Chao et al. 2011; Majeti et al. 2009) und NHL (Chao et al. 2010a) und solide Malignome (Willingham et al. 2012). Auch Zellen des Multiplen Myeloms überexprimieren CD47 und blockierende CD47-Antikörper zeigten hier eine Anti-Tumor-Wirkung. Gegen RPMI 8226-Myelomzellen eingesetzt erhöhten sie die Phagozytose und hemmten das Myelomzellwachstum *in vitro* und *in vivo* Xenograft-Mausmodellen (Kim et al. 2012). Ein blockierender CD47-Antikörper steigerte die Phagozytose von NHL-Zellen durch Makrophagen und die Kombination mit Rituximab führte zur Eliminierung von NHL im Xenograft-Model. Der Synergismus schien dabei sowohl Fc γ R-abhängig als auch –unabhängig zu funktionieren (Chao et al. 2010a). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die CD47-SIRP α -Achse vielversprechende Zielstrukturen zur Verbesserung der Tumorthherapie mit therapeutischen Antikörpern enthält. Untersuchungen der Kombinationen aus CD47/SIRP α -Blockade und klinisch eingesetzten Antikörpern wie Rituximab, Trastuzumab und Cetuximab können bereits gute Ergebnisse vorweisen (Weiskopf et al. 2013; Chao et al. 2010a; Zhao et al. 2011). Der humanisierte IgG4-CD47-Antikörper Hu5F9-G4 bewirkte in Kombination mit Rituximab die Eliminierung von AML und NHL im Xenograft-Model (Liu et al. 2015a). Die Blockierung von CD47 durch Hu5F9-G4 in Kombination mit Rituximab resultierte in kompletten Remissionen bei NHL-Patienten in einer klinischen Phase-I-Studie (Advani et al. 2018), sodass weitere klinische Studien folgten (Sikic et al. 2019) und der Antikörper auch in Kombination mit Cetuximab und als single-agent getestet wird (Weiskopf 2017). Die Unterbindung des CD47/SIRP α -

vermittelten Signals erweist sich also als effektiv und vielversprechend in der Kombination mit Tumorantikörpern, nicht nur vom IgG-Typ, sondern auch vom IgA-Typ (Treffers et al. 2020). Die Arbeitsgruppe um Petrova und Kollegen erstellten ein Fusionsprotein SIRP α Fc TTI-621, welches die N-terminale V-Domäne des humanen SIRP α mit einer humanen IgG1-Fc-Region verbindet (Petrova et al. 2017). TTI-621 zeigte potente Anti-Tumor-Aktivität *in vitro* und *in vivo*, die einerseits auf die CD47-Blockade des SIRP α , zu einem beachtlichen Teil aber auch auf die Fc-vermittelten Effektorfunktionen der IgG1-Region zurückzuführen ist. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass TTI-621 eine gesteigerte Phagozytose durch tumorassoziierte Makrophagen unterschiedlicher Polarisierung bewirkt, sowohl durch Makrophagensubpopulationen mit Expression hochaffiner Fc γ R als auch durch Subpopulationen mit Expression niedrigaffiner Fc γ R (Lin et al. 2017). Da CD47 auf allen Geweben exprimiert wird, kann der Einsatz eines CD47-Antikörpers mit funktionellem Fc-Teil, der Fc γ R-abhängige Effektormechanismen wie CDC-, ADCC- oder ADCP-Aktivität hervorruft, problematische Nebenwirkungen für gesunde Körperzellen mit sich bringen. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurden andere potentielle Therapeutika zur Blockade der CD47–SIRP α -Interaktion entwickelt, darunter CD47- und SIRP α -Antikörper, rekombinante Proteine und Fab-Fragmente oder bispezifische Antikörper, die nicht mehr mit FcR interagieren und deren Effekt allein auf der Zielantigenbindung beruht (Weiskopf 2017; Zhao et al. 2011; Ring et al. 2017). Ein bivalentes *single-chain* Antikörperfragment gegen CD47 demonstrierte *in vivo* Aktivität gegen Myelomzellen auch durch Apoptoseinduktion (Kikuchi et al. 2005). Die Antagonisierung von CD47 durch SIRP α -Varianten zeigte ausgeprägte synergistische Anti-Tumor-Wirkung mit diversen tumorspezifischen Antikörpern, aber allein zeigten die SIRP α -Varianten keine Phagozytose-Induktion (Weiskopf et al. 2013). Die Unterbindung von CD47–SIRP α -Interaktionen verstärkt die Eliminierung von Tumorzellen mittels Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten insbesondere in Kombination mit therapeutischen Antikörpern (Barclay & van den Berg 2014). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die CD47–SIRP α -Blockade über eine verbesserte Antigenpräsentation auch die T-Zell-Antwort und damit die Anti-Tumor-Immunität unterstützt (Matlung et al. 2017; Tseng et al. 2013; Liu et al. 2015b). Die Verbesserung der spezifischen Antikörpertherapie könnte eine Reduzierung anderer Tumormedikamente, wie Chemotherapeutika oder auch Bestrahlung erleichtern. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass Chemotherapien Leukopenien verursachen und somit das Immunsystem und die zellvermittelten Effektorfunktionen von Antikörpern schwächen, von Interesse (Barclay & van den Berg 2014). Bei der CD47–SIRP α -Blockade handelt es sich also um eine vielversprechende Strategie, mit der der klinische Effekt von therapeutischen Antikörpern und möglicherweise die Tumorthherapie insgesamt erheblich verbessert werden könnte.

1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Therapeutische Antikörper finden heutzutage unverzichtbare Anwendung in der Therapie vieler maligner Erkrankungen. Ihre Vorteile gegenüber anderen Therapieformen liegen in ihrer Zielgenauigkeit und ihrem vergleichsweise günstigen Nebenwirkungsprofil. Der therapeutische CD38-Antikörper Daratumumab erzielt seit seiner Zulassung für das Multiple Myelom große Erfolge. Allerdings profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen von der Therapie mit Daratumumab und das Multiple Myelom gilt nach wie vor als unheilbar, weshalb weitere Verbesserungen in der Antikörpertherapie nötig sind.

Zur Wirkung von Daratumumab tragen Fc-vermittelte Effektormechanismen wie CDC, ADCC oder ADCP entscheidend bei. Daratumumab besitzt im Vergleich zu anderen CD38-Antikörpern bereits eine herausragende CDC-Aktivität. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Strategien zur Verstärkung der ADCC- und ADCP-Aktivität untersucht. Diese Strategien basierten zum einen auf der Modifizierung des Antikörpers durch Fc-Engineering und zum anderen auf der Blockade eines inhibitorischen sogenannten ‚Don't-eat-me'-Signals auf Makrophagen.

Zur Steigerung der ADCC sollte durch Protein-Engineering ein Fc-optimierter CD38-Antikörper durch Einführung der Aminosäuresubstitution DE (S239D/I332E) hergestellt werden. Dieser sollte hinsichtlich seines Bindungsverhaltens, seiner Zytotoxizität und seiner ADCP-Vermittlung mit dem klinisch eingesetzten nativen IgG1-Antikörper Daratumumab verglichen werden.

Um die durch Daratumumab hervorgerufene ADCP zu steigern, sollte zusätzlich ein Fusionsprotein aus einer SIRP α -Domäne und einer nicht mit Fc γ R interagierenden Variante der IgG2-Fc-Domäne generiert werden, um die Interaktion zwischen dem inhibitorischen Rezeptor SIRP α auf Makrophagen und seinem Liganden CD47 zu blockieren. Auf diese Art sollte der durch die SIRP α -CD47-Interaktion vermittelte anti-phagozytotische Signalweg gehemmt werden. Das Fusionsprotein sollte auf sein Bindungsverhalten und sein Potential zur Verbesserung der Daratumumab-vermittelten ADCP getestet werden.

Mithilfe der so erzielten Ergebnisse sollten neue potenzielle therapeutische Antikörper und Antikörper-Protein-Kombinationen zur Behandlung des Multiplen Myeloms und anderen CD38-positiven Malignomen bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkulturmedium und -zusätze

Tabelle 2: Zellkulturmedium und -zusätze

Name	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
M-CSF	R&D Systems, Minneapolis, USA
Monocyte Attachment Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
XVIVO 15	Lonza, Verviers, Belgien

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien

Name	Zelltyp	Passagierung, Dichte	Medium	Quelle
CHO-K1	Chinesischer Hamster, Ovar	1:10	D10 ⁺	DSMZ (Puck et al. 1958; Kao & Puck 1968; Ham 1965)
CHO-CD38	Chinesischer Hamster, Ovar, stabil CD38-transfiziert	1:10	D10 ⁺ + Geneticin 500µg/ml	M. Peipp, unpubliziert
L363	Human, Plasmazelleukämie	1:2 - 1:3, 0.5 x 10 ⁶ - 1.5 x 10 ⁶ Zellen/ml	R10 ⁺	DSMZ (Diehl et al. 1978)
Lenti-X™ 293T	Human, embryonale Nierenzellen, HEK 293-Subclon	1:10 3 x 10 ⁶ - 40 x 10 ⁶ Zellen/175 cm ²	D10 ⁺	DSMZ (DuBridge et al. 1987; Rio et al. 1985; Pear et al. 1993)
Raji	Human, Burkitt Lymphom, EBV-positiv	1:5, 0.5 x 10 ⁶ - 1 x 10 ⁶ Zellen/ml	R10 ⁺	DSMZ (Pulvertaft 1964)
RPMI 8226	Human, Multiples Myelom	1:2 - 1:3, 0.5 x 10 ⁶ - 1 x 10 ⁶ Zellen/ml	R10 ⁺	DSMZ (Matsuoka et al. 1967)

* D10⁺: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % inaktiviertem (d. h. 56 °C für 20 min) fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin

** R10⁺: Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 mit 10 % inaktiviertem (durch Erhitzen auf 56 °C für 20 min) fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin

DSMZ: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 4: Bakterienstämme

Name	Hersteller
<i>E. coli</i> One Shot Top 10 Competent cells	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> XL1 Blue Chem. Competent Cells	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
100 bp DNA ladder	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2 x YT Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2 x YT Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
⁵¹Chrom (Na₂CrO₄)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
7-AAD Viability Dye	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Accutase	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %, 37,5:1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Albumin Bovin Serum, Fraktion V	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CaCl₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CaptureSelect™ human IgG-Fc Affintiy Matrix	Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
CaptureSelect™ IgG-CH1 Affintiy Matrix	Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DPBS (10X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Flow-Count™ Fluorespheres	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England BioLabs® Inc., Ipswich, USA
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
H₂O	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
H₂O Distilled Water	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
Intratect® 50 g/l	Biotest, Birmingham, GB

Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na₂HPO₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
OmniPur® TEMED	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
OptiPhase SuperMix	PerkinElmer, Waltham, USA
Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Restriktionspuffer NEBuffer™ 2.1 10X	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA
Roti®-Blue	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
SeaKem® GTG™ Agarose	Lonza, Basel, Switzerland
SeaKem® LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA
TRIS(hydroxymethyl)aminomethane	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	gibco®, Life technologies™, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
1 x TAE	40 mM TRIS-Acetat 1 mM EDTA
1 x TBS	7,7 mM TRIS 150 mM NaCl pH: 7,5
1 x TRIS	1 M TRIS pH: 8,0
2 x HBS	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH: 7,05
5 x Proteinladepuffer (reduzierend)	313 mM TRIS 10 % w/v SDS 0,05 % Bromophenolblau 50 % v/v Glycerin 0,5 M DTT

Elutionspuffer Human-Fc-Affinitätsmatrix	0,1 M Glycin pH: 3,0
Laufpuffer (SDS-Gel)	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % w/v SDS pH: 8,3
PBA (Protein blocking agent)	1 x PBS 1 % Bovines Serum
TBS-T	7,7 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % v/v Tween 20 pH: 7,5
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % v/v Methanol pH: 8,3

2.1.6 Kits

Tabelle 7: Kits

Name	Hersteller
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
CFSE Cell Division Tracker Kit	BioLegend®, San Diego, USA
IncuCyte® pHrodo® Red Cell Labeling Kit	IncuCyte®, Essen BioScience, Ann Arbor, USA
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

2.1.7 Einmalmaterialien

Die verwendeten Einmalmaterialien wurden von Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) oder Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

Tabelle 8: Einmalmaterialien

Name	Hersteller
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt, Inc., Newton, USA
Costar® Assay Plate, 96 Well	Corning Inc., Corning, USA
Counterplatte ADCC	Perkin-Elmer, Waltham, USA
Einwegskalpel	Feather®, Osaka, Japan
Parafilm M®	Bemis®, Neenah, USA
Poly-Prep® Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
S-Monovette® 8.2 mL 9NC	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Acrodisc® Syringe Filters	Pall Corporation, Port Washington, New York, USA
Steritop®	Merck Millipore, Billerica, USA
TopSeal™-A Plus	PerkinElmer, Waltham, USA
Vivaspin® 6	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Extra Thick Blot Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Immuno-Blot® PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
ZelluTrans Dialyseschlauch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.8 Laborgeräte und -utensilien

Tabelle 9: Laborgeräte und -utensilien

Name	Hersteller
5075 EL Autoklaviergerät	Systec GmbH, Linden, Deutschland
AF 206	Scotsman Ice Systems USA, Vernon Hill, USA
Bio Vortex V1	Lab4You GmbH, Berlin, Deutschland
BIOFUGE pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Block heater SBH130D	Stuart®, Stone, GB
Heraeus T12 Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5417R	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Certomat® BS-T Schüttelinkubator	B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Consort E143	Consort, bvba, Turnhout, Belgium
Cytosperm 2 Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
DryEase® Gel Drying System	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
E.A.S.Y®Doc UV Transilluminator	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
ECOM-P 4153 Absaugpumpe	eppendorf, Hamburg, Deutschland
ED Heating Immersion Circulator	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Function Line Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Galaxy Mini	VWR International, Radnor, USA
GVM20 GelVue UV Light Box	Syngene, Cambridge, GB
HERAsafe Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
LB 124 Kontaminationsmonitor	Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Milli-Q® Synthesis A10®	Millipore Corporation, jetzt Merck, Millipore, Burlington, Massachusetts, United States
Mini-PROTEIN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 3S+	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA
Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH

PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
RCT basic <i>Magnetrührgerät</i>	IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland
Shaker 3006	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sorvall®RC 6 <i>Zentrifuge</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA
TE 1502S <i>Waage</i>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vacusafer comfort <i>Vakuumpumpe</i>	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Germany
Waterbath WNB 45	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
XB 2200C <i>Waage</i>	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.9 Messgeräte

Tabelle 10: Messgeräte

Name	Hersteller
1450 MicroBeta TriLux	PerkinElmer, Waltham, USA
BioPhotometer	eppendorf, Hamburg, Deutschland
HI 2211 pH/ORP Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Navios™ Flow Cytometer	Beckman Coulter, Brea, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sunrise™ Photometer	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Axiovert 40 C Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
IncuCyte® Live-Cell Analysis System	IncuCyte®, Essen BioScience, Ann Arbor, USA

2.1.10 Enzyme

Tabelle 11: Enzyme

Name	Hersteller
T4 DNA-Ligase	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Restriktionsenzym BsrGI	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA
Restriktionsenzym NheI	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA

2.1.11 Antikörper

Tabelle 12: Konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Name	Beschreibung	Hersteller
CD138-PE	IgG1 Maus, Klon B-A38	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD14-APC	IgG2a, Maus, Klon RMO52	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD14-FITC	IgG2a, Maus, Klon RMO52	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD16-FITC	IgG1, Maus, Klon 3G8	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD16-PE	IgG1, Maus, Klon 3G8	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD172a (SIRP α)-PE	Humaner IgG1, Klon REA144	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19-PE	IgG1, Maus, Klon J3-119	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD32-PE	IgG2a, Maus, Klon 2E1	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD47-PE	humaner IgG1, Klon REA170	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD64-FITC	IgG1, Maus, Klon 22	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD64-PE	IgG1, Maus, Klon 22	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
CD86-PE	IgG2b, Maus, Klon HA5.2B7	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcγ fragment specific	F(ab') ₂ Fragment, polyklonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., West Grove, USA
IgG1-FITC	Maus, Klon 679.1Mc7	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
IgG1-PE	Maus, Klon 679.1Mc7	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
IgG2a-APC	Maus, Klon 7T4-1F5	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
IgG2a-FITC	Maus, Klon 7T4-1F5	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
IgG2a-PE	Maus, Klon 7T4-1F5	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
REA Control (S)-PE	humaner IgG1, Klon REA293	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 13: Konjugierte Antikörper für den Western Blot

Name	Verwendung	Hersteller
Goat anti-Human IgG HRP	Verdünnung: 1:2000 Puffer: TBS + 5.0 % Blotting-Grade Blocker	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Monoclonal anti-human kappa light chains HRP	Verdünnung: 1:2500 Puffer: BS + 3.2 % BSA + 2.0 % Blotting-Grade Blocker	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 14: Unkonjugierte Antikörper

Name	Beschreibung	Hersteller
4D5-DE	monoklonal, mutierter IgG1, S239D/I332E, anti-HER2	M. Peipp, unpubliziert
4D5-IgG2σ	monoklonal, modifizierter IgG2, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, anti-HER2	M. Peipp, unpubliziert
CD3-IgG2σ	monoklonal, modifizierter IgG2, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, CD3	M. Peipp, unpubliziert
B6H12	monoklonal, murin, IgG1, CD47	eBioscience™
(TH-69)	monoklonal, murin, IgG1, CD7	(Baum et al. 2003)
Cetuximab	Erbix® chimär, monoklonal, IgG1, anti-EGFR	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dara-DE	monoklonal, mutierter IgG1, S239D/I332E, CD38	N/A
Daratumumab	Darzalex®, human, monoklonal, IgG1, CD38	Janssen Pharmaceutical, Beerse, Belgien
Rituximab	MabThera®, chimär, monoklonal, IgG1, CD20	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Rituximab-DE	monoklonal, mutierter IgG1, S239D/I332E, CD20	M. Peipp, unpubliziert
SIRPα-IgG2σ (SIRPα-Fcσ)	monoklonal, modifizierter IgG2, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, SIRP α 118mer (V2, AS 31-148)	N/A
Trastuzumab	Herceptin®, humanisiert, monoklonal, IgG1, anti-HER2,	Roche Holding AG, Basel, Schweiz

2.1.12 Plasmide

Tabelle 15: Plasmide

Name	Zuordnung
pSEC-SIRPα-IgG2 K.O.(σ)	<i>Vektor zur Herstellung von SIRPα-Fcσ</i>
pEx-SIRPα for IgG2 K.O.(σ)	<i>Vektor zur Herstellung von SIRPα-Fcσ</i>
pSec-CD3 (=UCHT1)-HC-IgG2 K.O.(σ) (#750)	<i>Vektor zur Herstellung der schweren Kette von CD3-IgG2σ</i>
pSEC-CD3(=UCHT1)-light chain (#737)	<i>Vektor zur Herstellung der leichten Kette von CD3-IgG2σ</i>
pSec-HC-RTX Leader-Dara-V90 (#853)	<i>Vektor zur Herstellung der schweren Kette von Dara-DE</i>
pSec-VL-RTX Leader-Dara-VL (#852)	<i>Vektor zur Herstellung der leichten Kette von Dara-DE</i>
pSec-Trastuzumab-LC (#135)	<i>Vektor zur Herstellung der leichten Kette von 4D5-DE</i>
pSec-HC-4D5-IgG2 K.O.(σ)	<i>Vektor zur Herstellung der schweren Kette von 4D5-DE</i>

(der Arbeitsgruppe M. Peipp, Sektion für Antikörperbasierte Immuntherapie, Innere Klinik II, UKSH Kiel vorliegend)

2.1.13 Softwareprogramme

Tabelle 16: Softwareprogramme

Name	Hersteller
EasyWin 32	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
GraphPad Prism 8.1.2	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
IncuCyte® Analysis Software	IncuCyte®, Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan, USA
Kaluza Analysis-Software v.1.1	Beckman Coulter, Brea, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Quantity 1-D Analysis Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Molekülgröße erfolgte mittels Gelelektrophorese im 1%igen (w/v) Agarosegel. Die DNA wurde mit Farbstoff (Gel Loading Dye Purple (6x), New England BioLabs® Inc.) versetzt und neben einer DNA-Standardleiter (100 bp DNA ladder, Carl Roth GmbH & Co. KG) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 40 Minuten. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Das Gel wurde 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung inkubiert, um die DNA-Banden mithilfe eines UV-Transilluminators (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) sichtbar zu machen und zu dokumentieren.

2.2.2 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsendonukleasen in lineare DNA-Fragmente gespalten, um in einer Ligationsreaktion neu rekombiniert zu werden. Ein Restriktionsansatz beinhaltete jeweils 10 Einheiten zweier Restriktionsenzyme auf 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer verwendet. Auf den Restriktionsansatz wurden 20 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz geschichtet und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine Auftrennung der Restriktionsprodukte mittels DNA-Gelelektrophorese.

2.2.3 Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten

Die entsprechenden DNA-Produkte des Restriktionsverdaus wurden aus dem Gel geschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Eine Probe der extrahierten DNA wurde mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft, bevor sie für eine Ligationsreaktion verwendet wurde.

2.2.4 Ligation von linearer DNA

Für eine Ligationsreaktion wurde ein Ansatz aus 7 µl Vektor-DNA, 10 µl Insert-DNA, 1 µl T4 Ligase (Roche) und 2 µl 10x Ligasepuffer erstellt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Transformation in E. coli Bakterien.

2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA

Transformation bezeichnet die Einschleusung freier DNA in Bakterienzellen. Durch das Bakterienwachstum wird die eingeschleuste Plasmid-DNA vervielfältigt. Für eine Transformation wurden chemisch kompetente E. coli-Zellen (XL1-Blue Competent Cells, Agilent Technologies, Santa Clara, USA oder One Shot Top 10 Competent Cells) auf Eis aufgetaut, mit 10 µg der entsprechenden Plasmid-DNA oder 4 µl eines Ligationsansatzes gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 30 Sekunden. Im Anschluss daran wurden 200 µl

S.O.C. Medium (Raumtemperatur) hinzugegeben und die Bakterien eine Stunde bei 37 °C geschüttelt (250 U/min). Die Bakterien wurden zur Selektion auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) 2X YT-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 Analyse von Klonierungsprodukten

Einzelne Klone wurden ausgewählt und in 3 ml Ampicillin-haltigem 2X YT Medium für 4 h bei 37 °C im Schüttler (250 U/min) kultiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers aus den transformierten Bakterien isoliert. Die klonierte DNA wurde mittels Restriktionsverdau und anschließender DNA-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA zum weiteren Gebrauch wurde ein Bakterienklon mit der gewünschten Plasmid-DNA auf eine 200 ml-Kultur mit Ampicillin-haltigem 2X YT-Medium expandiert und für 18 h bei 37 °C geschüttelt (225 U/min). Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des NucleoBond® Xtra Maxi Kits (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers aus den Bakterienzellen isoliert. Die Konzentration der DNA wurde durch Absorptionsmessungen im BioPhotometer bei 260 nm bestimmt, wobei die $\text{Ratio}_{260/280}$ zur Abschätzung der Reinheit diente.

2.2.8 DNA-Sequenzanalyse

Eine genaue Analyse der die Klonierung erhaltenen DNA-Konstrukte erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung und wurde vom Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

2.2.9 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen und Zelllinien wurden bei 37 °C und 6 % CO₂-Atmosphäre in Zellkulturflaschen der Firma Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Zelllinien in Suspension wurden zweimal pro Woche, adhärenente Zelllinien einmal pro Woche passagiert. Um adhärenente Zellen zu passagieren, wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase oder Trypsin-EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium beendet und die gewünschte Zellzahl in neue Kulturflaschen ausgesät. Die verwendeten Medien und die Passagierverhältnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Auszählung von Zellen erfolgte nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.10 Expression mittels Kalziumphosphat-Transfektion

Die Einschleusung von DNA in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es wurde eine Kalziumphosphat-Transfektion mit Chloroquin an Lenti-X 293T-Zellen durchgeführt, um Antikörper

und Proteinkonstrukte zu exprimieren. Für die Transfektion wurden auf 50 bis 100 Zellkulturschalen (Durchmesser: 10 cm) jeweils 3×10^6 Lenti-X 293T-Zellen in 10 ml D10⁺-Medium ausgesät und für 24 h im Zellinkubationsschrank ruhen gelassen. Am nächsten Tag fand vor der Transfektion ein Mediumwechsel mit Zugabe von 8 ml Frischmedium statt. Es wurde ein Transfektionsansatz mit 1 ml Gesamtvolumen angefertigt, der je Kulturschale 20 µg Plasmid-DNA, 100 µl CaCl₂ (2,5 mol/l) und 5 µl Chloroquin (100 mmol/l) und H₂O enthielt. Der Ansatz wurde dann sehr langsam zu einem gleichen Volumen 2x HBS-Puffer hinzugefügt, indem im Puffer mit einer Pipette ständig vermischt und der Transfektionsansatz darauf getropft wurde. Vom fertigen Transfektionsmix wurden nun 2 ml je Schale auf die Zellen gegeben und vorsichtig verteilt. Die Platten wurden 8 h inkubiert, danach erfolgte ein Mediumwechsel. Alle zwei Tage wurden die Überstände der transfizierten Zellen gesammelt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Die Überstände wurden zur Reinigung von Zellbestandteilen abzentrifugiert (3287 x g, 20 min bei 4 °C), über einen Steritop[®]-Filter steril filtriert und bei 4 °C bis zur Proteinreinigung gelagert.

2.2.11 Proteinreinigung

Die Reinigung von exprimierten Proteinen erfolgte über Affinitätschromatographie mit einer CaptureSelect[™] Affintiy Matrix (Thermo Fisher Scientific). Die aus der Transfektion gewonnenen und zusammengeführten Lösungsüberstände wurden auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Pro Liter Überstand wurde 1 ml CaptureSelect[™] Affintiy Matrix über Nacht langsam bei 4 °C eingerührt. Am nächsten Tag wurde die Antikörper gebundene Matrix durch wiederholte Zentrifugation bei 830 x g für 10 Minuten gesammelt. Um Verluste zu vermeiden, wurden Reste durch Nachspülen mit geringen Mengen PBS aufgefangen. Anschließend wurde die Matrix auf eine mit PBS kalibrierte Poly-Prep-Chromatographiesäule aufgetragen. Es wurden zwei Waschschrte mit 10 ml kaltem 1 x PBS durchgeführt. 100 µl TRIS (1 mol/l, pH 8) wurden in Eppendorfggefäße vorgelegt und es erfolgte die Elution mit 5 ml kaltem Elutionspuffer (0,1 mol/l Glycin, pH 3,0) in 10 Fraktionen à 500 µl. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden anschließend mittels Gelelektrophorese identifiziert und vereinigt. Sie wurden gegen 1x PBS (64.000.000-fach) dialysiert, über eine Vivaspin[®]-Säule konzentriert und steril filtriert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Gelelektrophorese durch Vergleich von Verdünnungsreihen mit einem Protein ähnlicher Größe ermittelt und die Ergebnisse mittels BCA-Proteinbestimmung verifiziert, welche mit einem Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers (Mikrotitrierplattenverfahren) durchgeführt wurden.

Genaue Angaben über die jeweils verwendete CaptureSelect[™] Affintiy Matrix und die Vergleichsproteine zur Konzentrationsbestimmung sind in Kapitel 3.1.1 und 3.3.2 zu finden.

2.2.12 Protein-Gelelektrophorese

Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist in Tabelle 17 aufgeführt. Die Proteine wurden durch reduzierenden Ladebuffer (5 x) und Erhitzen auf 95 °C für 10 min denaturiert und neben 5 µl Protein-Standard (Precision Plus Protein™ Standard Dual Color) aufgetragen. Zum Passieren des Sammelgels wurde zunächst eine Spannung von 120 V für 10 Minuten angelegt, die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 140 V. Das Gel wurde über Nacht zur Visualisierung der Proteinbanden in Coomassie-haltiger Roti®-Blue-Lösung (Carl Roth GmbH & Co. KG) gefärbt und das Ergebnis mit dem Gel Doc™ XR+ Geldokumentationssystem festgehalten.

Tabelle 17: Zusammensetzung von 10%igen Polyacrylamidgelen, Ansatz für zwei Gele

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	3,252 ml	2,292 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	2,668 ml	0,667
TRIS (1,5 mol/l)	2,001 ml	-
TRIS (0,5 mol/l)	-	1,000 ml
SDS 10 %	80 µl	40 µl
APS 10 %	60 µl	20 µl
TEMED	6 µl	4 µl

2.2.13 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektrophorese auf PVDF-Membranen transferiert und durch Peroxidase-gekoppelte Antikörper nachgewiesen. Zur Vorbereitung des Elektrotransfers wurden das Gel und zwei Filterpapiere (Bio-Rad) in Transferpuffer eingelegt. Eine Immuno-Blot® PVDF-Membran (Bio-Rad) wurde für eine Minute in Methanol getaucht, anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Nun wurde das Gel auf die PVDF-Membran gelegt und beide zwischen den Filterpapieren angeordnet. Der Proteintransfer erfolgte in einer *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) bei 15 V für eine Stunde. Um freie Bindestellen für Proteinbindung zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde mit Blockierlösung unter Schwenken inkubiert. Die Blockierlösungen unterschieden sich je nach verwendetem Antikörper und sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es folgten drei Waschschritte mit TBS-T und anschließend die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper zum direkten Proteinnachweis. Zur Visualisierung wurde für 90 Sekunden mit *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fisher) inkubiert und das Ergebnis mit dem *Molecular Gel Doc XR+ system* (Bio-Rad) festgehalten.

2.2.14 Durchflusszytometrie

Die Immunfluoreszenzanalysen wurden mit einem Navios™ Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Fullerton, USA) durchgeführt.

2.2.14.1 Direkte Markierung von Oberflächenantigenen

Für die direkte Markierung zellulärer Oberflächenantigene wurden 500.000 Zellen in ein Messröhrchen überführt, mit 2 ml PBA gewaschen und 5 Minuten bei 544 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 40 µl PBA und 10 µl IVIg (Intratect®, zu 10 mg/ml mit PBS verdünnt) resuspendiert. Nun wurden je 10 µl der gewünschten an ein Fluorochrom gekoppelten Antikörper hinzugegeben und mit PBA auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden gut gemischt und 30 Minuten auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 400 µl PBA hinzugegeben und die Proben im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.14.2 Indirekte Messung

Die Bindung von Antikörpern bzw. Proteinen auf bestimmten Zellen wurde indirekt mithilfe von fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern gemessen. Analog zur direkten Messung wurden 500.000 Zellen in einem Messröhrchen mit PBA gewaschen und der Überstand verworfen. Nun folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer Konzentration von 100 µg/ml in 50 µl PBA für eine Stunde auf Eis. Danach wurde mit 4 ml PBA gewaschen (5 min Zentrifugation bei 544 x g bei 4 °C), der Überstand verworfen und es folgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, 1:20 verdünnt in 30 µl PBA, für 30 Minuten in Dunkelheit auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift mit 4 ml PBA wurden 500 µl PBA hinzugegeben und die Proben im Durchflusszytometer analysiert.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden in jeder Probe 10.000 Ereignisse gemessen. Tote Zellen und Zellmaterial wurden aus allen Messungen durch entsprechende Analysefenster über den Forward- und Sidewardscatter (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) ausgeschlossen.

2.2.15 Präparation von Mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden aus dem peripheren Blut freiwilliger Spender, die ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten, isoliert. Das periphere Blut wurde in Form von Vollblut in Citrat-Monovetten und aus Leukozytenreduktionssystem(LRS)-Kammern erhalten. LRS-Kammern enthalten Blut mit einem hohen Anteil MNC, welches bei routinemäßigen Thrombozytenspenden durch Abtrennung von den Thrombozyten anfällt. Die Isolierung der MNC erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll-Hypaque-Lösung, bei der die Blutbestandteile anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt werden.

2.2.15.1 MNC-Präparation aus Citrat-Vollblut

Zur Präparation von MNC aus Citrat-Vollblut wurden jeweils 7 ml Blut vorsichtig auf 6 ml Ficoll-Paque™ PLUS ohne Vermischung aufgeschichtet und 20 Minuten bei 1320 x g ohne Bremsvorgang zentrifugiert. Die Auftrennung der Blutbestandteile wurde mit folgenden Schichten von oben nach unten sichtbar: Blutplasma, mononukleäre Zellen, Ficoll-Hypaque, polymorphkernige Leukozyten, Erythrozyten. Nach Entfernung der Plasmaschicht wurden die als schmale, weißliche Schicht erkennbaren mononukleären Zellen entnommen. Sie wurden dreimal mit 50 ml PBS gewaschen, bei 544 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aufgeklopft. Die Kontamination mit Erythrozyten wurde durch eine hypotone Lyse minimiert. Dafür wurden die Zellen mit 45 ml eiskaltem destilliertem Wasser gemischt und für maximal 30 Sekunden inkubiert. Die Lyse wurde durch 5 ml 10 x PBS gestoppt. Die erhaltenen MNC wurden gezählt und in R10⁺-Medium zu gewünschter Konzentration aufgenommen.

2.2.15.2 MNC-Präparation aus LRS-Blut

Blut aus LRS-Kammern wurde zur Präparation zunächst verdünnt, indem es mit PBS auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt wurde. Auf 15 ml Ficoll-Paque™ PLUS wurden dann 10 ml des verdünnten Blutes aufgeschichtet. Die weitere Präparation erfolgte analog zur Präparation aus Citrat-Vollblut.

2.2.16 Differenzierung von MNC zu Makrophagen

Um Makrophagen zu erhalten, wurden die Monozyten aus MNC isoliert und zu Makrophagen differenziert. Die Isolierung der Monozyten erfolgte durch ein physikalisches Verfahren, das die starke Adhärenz der Monozyten an Oberflächen nutzt. Es wurden 80×10^6 MNC in 10 ml Attachmentmedium in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und für 30 Minuten bei 37 °C zur Adhäsion am Flaschenboden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgezogen und verworfen und die Zellen dreimal mit 10 ml PBS abgespült, womit schwächer haftende Lymphozyten entfernt wurden. Die Kultivierung erfolgte zunächst in 10 ml XVIVO15-Medium (1 % Penicillin/Streptomycin). Nach 24 h und nach 72 h erfolgten Medienwechsel mit erneutem Abspülen der Zellen mit PBS. Zur Differenzierung wurde dem XVIVO15-Medium M-CSF (50 ng/ml auf 10 ml) beigefügt. Die Makrophagen wurden 7 Tage nach dem Aussäen für funktionale Analysen verwendet. Im Zuge der Experimente wurde regelmäßig die Expression von Fc-Rezeptoren und anderen Makrophagen-Antigenen durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.17 Verwendung von Makrophagen für experimentelle Analysen

Um die Makrophagen aus den Kulturflaschen herauszulösen, wurden sie zuerst mit PBS gewaschen und dann mit Accutase behandelt. War das Ablösen der Makrophagen mit Accutase allein nicht möglich, wurde zusätzlich sehr vorsichtig ein Zellschaber verwendet. Die Makrophagen wurden in

R10⁺-Medium aufgenommen, gezählt und bei 544 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pelett wurde in R10⁺-Medium suspendiert und die Makrophagen für Experimente verwendet.

2.2.18 ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuch

Die ADCC wurde in ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuchen bestimmt. Radioaktives ⁵¹Chrom in Form von Natriumchromat wird von Zellen aufgenommen und beim Tod der Zellen durch Zelllyse ins Medium freigesetzt. Die Radioaktivität des freigesetzten ⁵¹Chroms kann mit einem Szintillationszähler detektiert werden und dient als Maß der Zelllyse.

2.2.18.1 Chromierung der Zielzellen

Für eine Versuchsplatte wurden 1,2 x 10⁶ Zielzellen in ein 50 ml-Falcon überführt und bei 850 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig aufgeklopft. Die Zellen wurden mit 100 µl ⁵¹Chrom versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit 7 ml Medium gewaschen und 5 Minuten bei 670 x g zentrifugiert, und anschließend in 10 ml Medium aufgenommen. Bei einem Verlust von 0,2 x 10⁶ Zellen (20 %) durch die Prozedur resultierte eine Zielzellsuspension mit 10⁵ Zellen/ml.

2.2.18.2 Versuchsdurchführung

Die ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuche wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einem Effektorzell-Zielzell (E:T)-Verhältnis von 40:1 und einem Endvolumen von 200 µl durchgeführt. In die Wells wurden zunächst 100 µl R10⁺-Medium vorgelegt und Antikörper in vorgesehener Konzentration pipettiert, danach wurden 200.000 Effektorzellen und 5.000 chromierte Zielzellen in jeweils 50 µl Medium hinzugegeben. Um die Maximalfreisetzung (Maximallyse) zu bestimmen, wurden die Zielzellen mit 100 µl Triton X-100 versetzt. Die basale Freisetzung (Basallyse) wurde ohne Zusatz von Effektorzellen und Antikörpern bestimmt. Der Versuch wurde für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Platte für 5 Minuten bei 830 x g zentrifugiert. Auf eine Counter-Platte (PerkinElmer, Waltham, USA) wurden 125 µl OptiPhase SuperMix pro Well vorgelegt. Dann wurden 25 µl der Versuchsüberstände auf die Counterplatte übertragen und diese mit Folie (TopSeal™-A Plus, PerkinElmer) verschlossen und 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend in einem Szintillations- und Lumineszenzzähler 1450 MicroBeta TriLux (PerkinElmer). Zur Berechnung der spezifischen Lyse wurden Maximallyse und Basallyse herangezogen:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{Messwert [cpm]} - \text{Basallyse [cpm]}}{\text{Maximallyse [cpm]} - \text{Basallyse [cpm]}} \times 100$$

2.2.19 Detektion von Phagozytose mittels Durchflusszytometrie

2.2.19.1 Detektion von ADCP durch Analyse der Makrophagen

Die Detektion von ADCP gelang durch Analyse der Makrophagen und ihrer Phagozytoseaktivität im Durchflusszytometer. In diesen Phagozytoseversuchen wurden die Zielzellen zunächst mit einem fluoreszierenden Membranfarbstoff markiert und anschließend mit den Makrophagen inkubiert. Nach Ablauf des Phagozytoseversuchs wurden zwei weitere Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der Makrophagen (CD14-APC) und zur Markierung der Zielzellen (Myelomzellen: CD138-PE, Raji-Zellen: CD19-PE) angewendet. So konnten die Makrophagen mittels Fluoreszenzanalyse nach ihrer Beteiligung an der Phagozytose unterschieden werden. Für einen Phagozytoseversuch wurden auf eine 24-Well-Platte 100.000 Makrophagen in 300 ml R10⁺-Medium je Well pipettiert. Die Makrophagen wurden bei 37° C ruhen gelassen, während die Zielzellen mit den fluoreszierenden Membranfarbstoffen PKH67 (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA) oder CFSE (BioLegend®, San Diego, USA) angefärbt wurden. Die Färbung erfolgte nach Herstellerprotokoll des PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit bzw. nach Herstellerprotokoll des CFSE Cell Division Tracker Kit (Färbung der Zellen in 0,1 µM CFSE-Lösung). Die Antikörper wurden in gewünschter Konzentration auf die Versuchsplatte pipettiert und 300.000 membrangefärbte Zielzellen in 100 ml Medium hinzugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 400 ml und ein E:T-Verhältnis von 1:3 resultierte. Der Versuch wurde für 2 h bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde der gesamte Inhalt jedes Wells abgezogen, jeweils in ein FACS-Messröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Um möglichst alle adhärenenten Makrophagen aus den Versuchsansätzen zu erhalten, wurden die Wells mit je 1 ml PBS ausgespült, das ebenfalls in den Messröhrchen gesammelt wurde. Zum Ablösen der verbliebenen Makrophagen wurde 5 Minuten bei 37 °C mit 300 ml Accutase behandelt und diese ebenfalls mit den vorherigen Überständen zusammengeführt. Den gesammelten Überstände der jeweiligen Probenansätze wurden 2 ml PBA hinzugefügt und die Röhrchen bei 535 x g bei 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereitet und gemessen (siehe Abschnitt 2.2.11 Durchflusszytometrie). Für die Auswertung der FACS-Analyse wurden durch entsprechende Analysefenster nur die CD14-positiven Makrophagen betrachtet. Es wurde dann der prozentuale Anteil der Makrophagen ermittelt, die ein Signal im grünen (PKH67) bzw. gelben (CFSE) Spektrum emittierten, aber kein Signal im hellroten PE-Kanal. Somit gingen Makrophagen in die Auswertung mit ein, die im Versuch membrangefärbte Zielzellen phagozytiert hatten, während alle Makrophagen, die Zielzellen an ihrer Oberfläche gebunden hatten, ausgeschlossen wurden.

2.2.19.2 Detektion von ADCP mittels Quantifizierung der Zielzellen

Die Detektion von ADCP durch Quantifizierung der Zielzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Zur Quantifizierung der Zielzellen diente Flow-Count™ (Beckmann Coulter), das eine definierte

Konzentration an fluoreszenzgekoppelten Beads enthält. Diese Beads können im Durchflusszytometer zeitgleich mit den Zielzellen detektiert werden. Durch definierte, einheitliche Messzeiten können die Zellzahlen der Proben gemessen und verglichen werden. Der Einsatz des Farbstoffes 7-AAD ermöglichte zudem die Unterscheidung zwischen intakten und nicht-viablen Zellen. Ein Depletionsversuch wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Je Well wurden 50.000 Makrophagen in 100 µl R10⁺-Medium ausgesät. Die Zielzellen wurden mit dem PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit nach Anleitung des Herstellers gefärbt. Die Antikörper wurden in gewünschter Konzentration pipettiert und 10.000 Zielzellen in 100 µl Medium hinzugegeben, sodass ein Endvolumen von 200 µl und ein E:T-Verhältnis von 5:1 resultierte. Der Versuch wurde 20 h bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden aus jedem Well 180 µl des Ansatzes entnommen und in FACS-Messröhrchen überführt. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.11 (Durchflusszytometrie) beschrieben mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern CD14-APC und CD138-PE sowie dem Farbstoff 7-AAD (10 µl pro Messröhrchen) vorbereitet. Vor der Messung wurden in jedes Messröhrchen 180 µl Flow-Count gegeben. Jede Probe wurde 5 Minuten lang im Durchflusszytometer gemessen und die Menge der CD14-negativen Zielzellen in erfasst.

2.2.20 Detektion von Phagozytose mittels *Life Cell Imaging*

Im *Life Cell Imaging* wird die Entwicklung und das Verhalten von lebenden Zellen mit mikroskopischen Aufnahmen verfolgt. Die Versuche wurden in einem IncuCyte[®] Live-Cell Analysis System (IncuCyte[®], Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt, das fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Versuchsansätze in regelmäßigen Abständen ermöglichte. Dafür wurden die Zielzellen vor der Inkubation mit dem pH-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff pHrodo (IncuCyte[®] pHrodo[®] Red Cell Labeling Kit, Essen BioScience) gefärbt. Der Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass seine Fluoreszenz im sauren Milieu deutlich zunimmt. Somit verstärkt sich das Signal einer phagozytierten Zelle, die mit dem sauren Milieu im Phagolysosom der Makrophagen in Kontakt kommt. Die ADCP wurde quantifiziert, indem die fluoreszierende Bildfläche über die Zeit ermittelt wurde. Die Versuche erfolgten in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einem Makrophagen-Zielzellverhältnis von 3:1 und einem Gesamtvolumen von 200 µl in R10⁺-Medium. Die Färbung der Zielzellen mit IncuCyte[®] pHrodo[®] erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Versuchsansätze wurden über 8 h in Zeitintervallen von 15 bis 30 Minuten mikroskopisch dokumentiert.

2.2.21 Proliferationsversuche

Die Beeinflussung der Zellproliferation durch Antikörper wurde in MTT-basierten Zellproliferationsassays getestet. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird durch metabolisch aktive Zellen unter Beteiligung der Co-Faktoren

NADH und NADPH reduziert und es entstehen violette Formazankristalle. Durch photometrische Absorptionsbestimmung kann somit die metabolische Aktivität von Zellen erfasst und indirekt Rückschlüsse auf die Zellmenge gezogen werden.

In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 25.000 Zellen je Well in 100 µl Kulturmedium gegeben. Die gewünschten Antikörperverdünnungen wurden hinzupipettiert. Ansätze ohne Antikörperzugabe und reine Mediumansätze dienten als Referenzwert sowie Kontrolle und erhielten zusätzlich 4 µl 1 x PBS. Der Versuch wurde 72 h bei 37 °C und 6 % CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Herstellerprotokoll des Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) behandelt und die Absorption bei 570 nm Wellenlänge mit einem Sunrise™-Photometer (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt.

2.2.22 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und graphische Darstellung der Experimente erfolgte mithilfe der GraphPad Prism 8.1.2 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) oder im Einzelfall auch mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Datensätze wurden unter Verwendung von gepaartem bzw. ungepaartem, zweiseitigem t-Test oder ein- bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse (Analysis of variance, ANOVA) auf Unterschiede hin analysiert. Für multiple Vergleiche zwischen den Datensätzen wurden die Bonferroni-Korrektur oder der Tukey post-hoc Test verwendet. Unterschiede zwischen Datensätzen wurden bei einem p-Wert von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant anerkannt und in den Abbildungen gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Fc-optimierten CD38-Antikörpers Dara-DE

3.1.1 Herstellung von Dara-DE mittels eines konstruierten Expressionsvektors

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Fc-optimierte Antikörper Dara-DE hergestellt. Der rekombinante Antikörper besitzt die variablen Domänen des klinisch etablierten CD38-Antikörpers Daratumumab, welche mit einer modifizierten Fc-Domäne kombiniert wurden. Die modifizierte Fc-Domäne IgG1k besitzt durch Einführung von Aminosäuresubstitutionen (S239D/I332E) verbesserte Immuneffektorfunktionen (Lazar et al. 2006). Die Expressionsvektoren mit den kodierenden Sequenzen für die leichten und schweren Ketten des Antikörpers Dara-DE wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde durch transiente Transfektion in Lenti-X Zellen exprimiert.

3.1.2 Proteinexpression und Reinigung von Dara-DE

Die erfolgreiche Expression des Fc-optimierten CD38-Antikörpers Dara-DE und dessen Reinigung über Affinitätschromatographie mit der CaptureSelect™ IgG-CH1 Affinity Matrix wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Comassiefärbung oder im Western Transfer-Experiment nachgewiesen. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Protein-Gelelektrophorese von Dara-DE im Vergleich zum klinisch eingesetzten Antikörper Daratumumab unter reduzierenden Konditionen. Im Coomassie-gefärbten Gel wurden zwei Banden mit gelelektrophoretischen Mobilitäten von 50 kDa bzw. 25 kDa nachgewiesen. Die bestimmten molekularen Massen entsprachen den erwarteten, anhand der Aminosäuresequenz berechneten molekularen Massen der schweren bzw. leichten Ketten der Antikörper. Im Western Transfer-Experiment wurde die Identität der Proteinbanden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 5 B). Die Färbung mit einem gegen humane κ -Leichtketten gerichteten Antikörper erzeugte Signale bei 25 kDa und die Färbung mit einem Antikörper gegen humanes IgG erzeugte Signale bei 50 kDa.

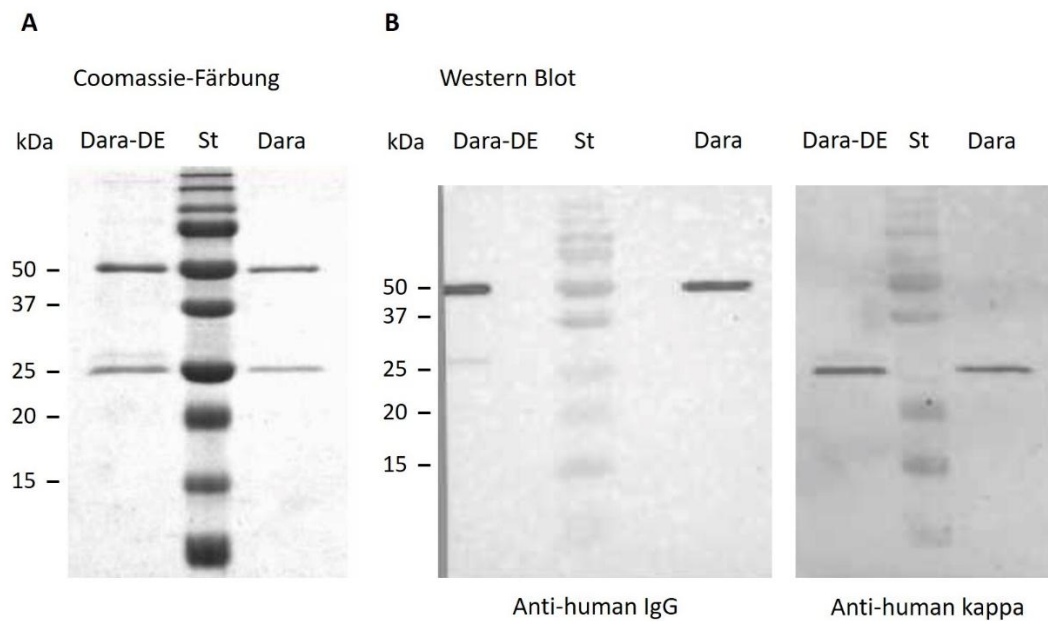


Abbildung 5: Analyse des gereinigten Antikörpers Dara-DE mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse.

Coomassie-Färbung der reduzierten Antikörper im SDS-Gel (A) und Immundetektion auf PVDF-Membranen zum Nachweis der schweren Kette mit einem Anti-Human IgG Antikörper und Nachweis der leichten Kette mit einem Antikörper gegen die humane κ -Leichtkette (B). Für den Vergleich mit dem ursprünglichen Antikörper wurde Dara-DE (Dara-DE) neben Daratumumab (Dara) getestet. St: Standard.

3.1.3 Analyse der Bindungseigenschaften von Dara-DE

Mittels Durchflusszytometrie wurde das Bindungsverhalten von Dara-DE mit dem von Daratumumab verglichen. Die Bindung der Antikörper an das spezifische Antigen CD38 wurde an transfizierten CD38-exprimierenden CHO-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse sind in Form von Bindungskurven in Abbildung 6 dargestellt. Dara-DE und Daratumumab wiesen eine ähnliche Avidität zu ihrem Antigen CD38 auf. Die mittlere effektive Konzentration EC_{50} als Maß für die Avidität eines Antikörpers betrug bei Daratumumab $3,0 \mu\text{g/ml}$ (95%-KI: $2,5$ bis $3,5 \mu\text{g/ml}$) und bei Dara-DE $2,3 \mu\text{g/ml}$ (95%-KI: $2,0$ bis $2,7 \mu\text{g/ml}$). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Für beide Antikörper konnte zudem nachgewiesen werden, dass auf CD38-negativen CHO-Zellen keine Bindung stattfand (nicht dargestellt), die Bindung der Antikörper war also CD38-abhängig und Antigen-spezifisch.

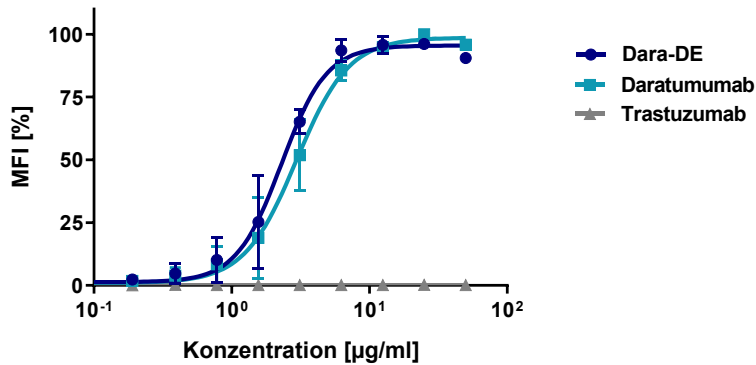


Abbildung 6: Antigenbindung von Dara-DE auf mit CD38 transfizierten CHO-Zellen.

Getestet wurde das Bindungsverhalten von Dara-DE im Vergleich zu Daratumumab. Trastuzumab diente als Negativkontrolle. Der Nachweis erfolgte mit einem Sekundärantikörper, dem FITC gekoppelten F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG. Dargestellt ist die normalisierte MFI in % (bezogen auf den höchsten erreichten Wert). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit SEM zweier unabhängiger Experimente.

3.2 Vermittlung von Effektorzellmechanismen durch Dara-DE

3.2.1 Untersuchung der ADCC-Vermittlung durch Dara-DE

3.2.1.1 ADCC von Tumorzelllinien

Der Fc-optimierte CD38-Antikörper Dara-DE wurde in ⁵¹Chromfreisetzungsversuchen auf sein Potential ADCC zu induzieren getestet und mit dem bereits erfolgreich zur Myelomtherapie klinisch eingesetzten nativen IgG1-Antikörper Daratumumab verglichen. Sowohl für zwei Myelomzelllinien (Abbildung 7) als auch für eine Burkitt-Lymphom-Linie (Abbildung 8 A) konnte nachgewiesen werden, dass die Fc-optimierte Variante Dara-DE im Vergleich zum unveränderten Daratumumab signifikant höhere Lysen der Tumorzellen bewirkt. Abbildung 7 A zeigt die ADCC-Testung an der Myelomzelllinie RPMI 8226 mit humanen MNC als Effektorzellen. Dara-DE und Daratumumab vermittelten beide eine dosisabhängige Lyse der malignen Plasmazellen. Die maximale durch Dara-DE vermittelte Lyse lag zwischen 19 - 21 % bei Konzentrationen von 0,4 und 2,0 µg/ml und war damit höher als die durch Daratumumab vermittelte Maximallyse (13 - 15 %). Die höheren Lyseraten von Dara-DE waren ab einer Konzentration von 0,08 µg/ml statistisch signifikant gegenüber der durch Daratumumab erzielten Zelllyse. Die EC₅₀-Konzentration von Dara-DE (0,03 µg/ml, 95%-KI: 0,01 bis 0,07 µg/ml) war niedriger als die von Daratumumab (0,11 µg/ml, 95%-KI: 0,02 bis 0,53 µg/ml). Die als Kontrollen eingesetzten Antikörper Trastuzumab und 4D5-DE waren nicht effektiv.

Die ADCC-Testung an der Myelomzelllinie L363 ist in Abbildung 7 B dargestellt. In diesen Experimenten erreichte Dara-DE ebenfalls ab einer Konzentration von 0,08 µg/ml signifikant höhere Lyseraten als Daratumumab. Die maximale durch Dara-DE vermittelte Lyse betrug bei 0,4 µg/ml etwa 16 %, während Daratumumab etwa 11 % maximale Lyse erreichte. Die als Negativkontrollen eingesetzten Antikörper

blieben wirkungslos. Die EC_{50} -Konzentration von Dara-DE (0,01 $\mu\text{g/ml}$, 95%-KI: 0,00 bis 0,27 $\mu\text{g/ml}$) lag wiederum unter der von Daratumumab (0,03 $\mu\text{g/ml}$, 95%-KI: 0,00 bis 15,89 $\mu\text{g/ml}$).

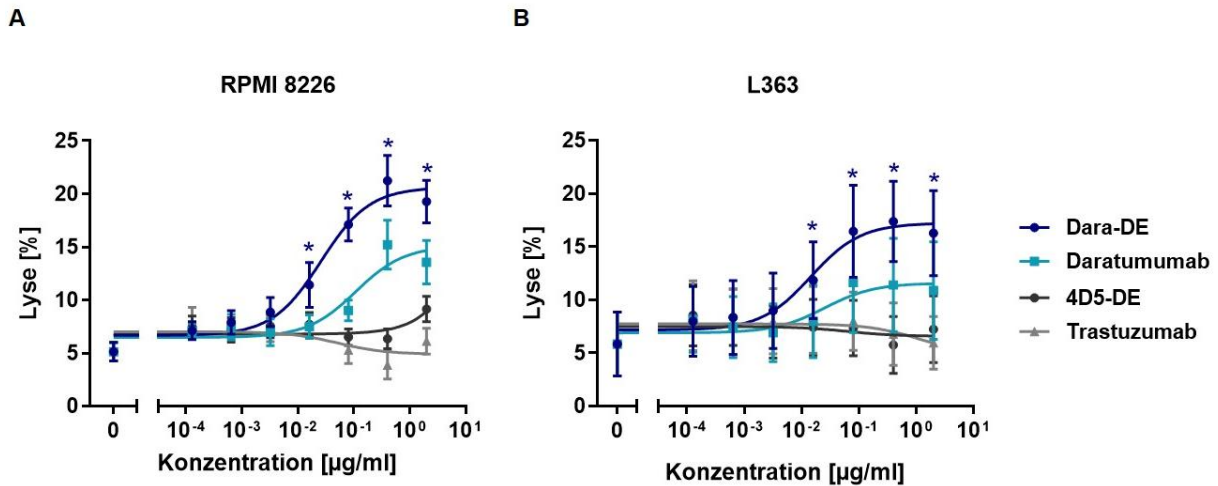


Abbildung 7: Ergebnisse der ⁵¹Chromfreisetzungsversuche zur Testung der ADCC-Induktion durch Dara-DE an Myelomzelllinien.

Die Experimente wurden an zwei verschiedenen Myelomzelllinien durchgeführt, RPMI 8226 (A) und L363 (B). Als Effektorzellen dienten aus frischem Vollblut isolierte MNC gesunder Spender. Die Effektor-Ziell-Zell-Ratio betrug 40:1. Trastuzumab und seine Fc-optimierte Variante (4D5-DE) dienten als Negativkontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM von jeweils 5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen Dara-DE und Daratumumab sind mit * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

Das CD38-Antigen wird auch bei anderen Non-Hodgkin Lymphomen exprimiert und könnte auch bei diesen Erkrankungen eine Zielstruktur für eine Antikörpertherapie darstellen. Daher wurde die Fähigkeit von Dara-DE zur ADCC-Induktion zudem an der Burkitt-Lymphom-Linie Raji untersucht (Abbildung 8 A). Um die Effektivität von Dara-DE und Daratumumab hier besser abschätzen zu können, wurden zusätzlich der für die Lymphomtherapie zugelassene CD20-Antikörper Rituximab und seine Fc-optimierte Variante Rituximab-DE in vier von sechs ADCC-Experimenten eingesetzt (Abbildung 8 B). Alle vier Antikörper vermittelten eine dosisabhängige Lyse der Lymphomzellen mit MNC als Effektorzellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Dara-DE und Daratumumab bestand bereits ab einer Konzentration von 0,016 $\mu\text{g/ml}$. Die durch Dara-DE vermittelte Lyse erreichte ihr Maximum von 25 - 28 % bei Konzentrationen von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ und überstieg die maximale Lyse von Daratumumab, die bei 20 % lag. Rituximab-DE vermittelte ähnlich hohe maximale Lyseraten von 29 %, während Rituximab in diesen Experimenten eine deutlich geringere Maximallyse von 12 % erreichte. Die Negativkontrollen Trastuzumab und 4D5-DE blieben auch hier wirkungslos. Die EC_{50} -Konzentrationen von Dara-DE (0,01 $\mu\text{g/ml}$, 95%-KI: 0,00 bis 0,05 $\mu\text{g/ml}$) und Daratumumab

(0,06 µg/ml, 95%-KI: 0,01 bis 0,25 µg/ml) verhielten sich ähnlich wie in den ADCC-Experimenten mit Myelomzelllinien.

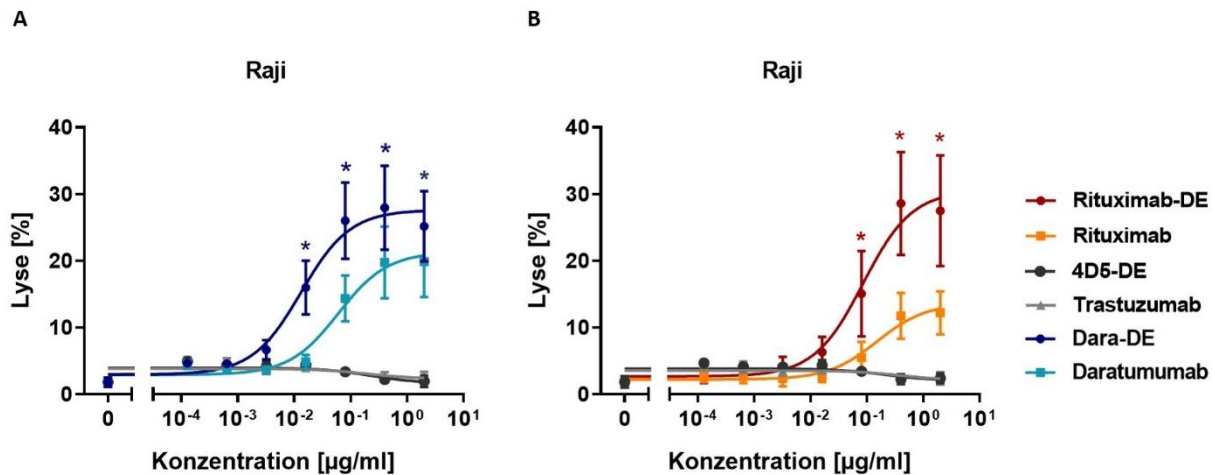


Abbildung 8: Ergebnisse der ⁵¹Chromfreisetzungsversuche zur Testung der ADCC-Induktion durch Dara-DE an Raji-Zellen.

Die ADCC-Induktion durch Dara-DE im Vergleich zu Daratumumab wurde an der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji getestet (A). Zusätzlich wurden der CD20-Antikörper Rituximab und seine Fc-optimierte Variante Rituximab-DE an Raji getestet (B). Als Effektorzellen dienen aus frischem Vollblut isolierte MNC gesunder Spender. Die Effektor-Zielzell-Ratio betrug 40:1. Trastuzumab und seine Fc-optimierte Variante (4D5-DE) dienen als Negativkontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM von sechs (A) und vier (B) unabhängigen Experimenten. Die Negativkontrollen sind in vier Experimenten identisch. Signifikante Unterschiede zwischen Dara-DE und Daratumumab bzw. Rituximab-DE und Rituximab sind mit * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

3.2.1.2 ADCC-Induktion mit autologen Effektorzellen

Neben den Testreihen an Tumorzelllinien wurde das Potential von Dara-DE zur ADCC-Induktion auch in autologen Experimenten untersucht, in denen sowohl die Effektorzellen als auch die Zielzellen von Myelompatienten stammten. Limitationen der Verfügbarkeit des Patientenmaterials verhinderten hier allerdings eine umfassendere Antikörperanalyse.

In Abbildung 9 A ist das Ergebnis eines autologen ⁵¹Chromfreisetzungsversuchs mit NK-Zellen aus dem peripheren Blut und Tumorzellen aus dem Knochenmark eines Myelompatienten gezeigt, der mit einer E:T-Ratio von 10:1 und Antikörperkonzentrationen von 10 µg/ml erfolgte. Dara-DE vermittelte mit 59 % eine sichtbar höhere Lyse als Daratumumab (37 %).

In zwei weiteren autologen Zytotoxizitätsexperimenten wurden MNC und Myelomzellen analysiert, die beide aus dem Knochenmark der Patienten gewonnen wurden, und in einem E:T-Verhältnis von 80:1 eingesetzt (Abbildung 9 B). Dara-DE bewirkte 15 % antikörpervermittelte Lyse, die damit deutlich höher ausfiel als die der Negativkontrolle Trastuzumab mit 3 %.

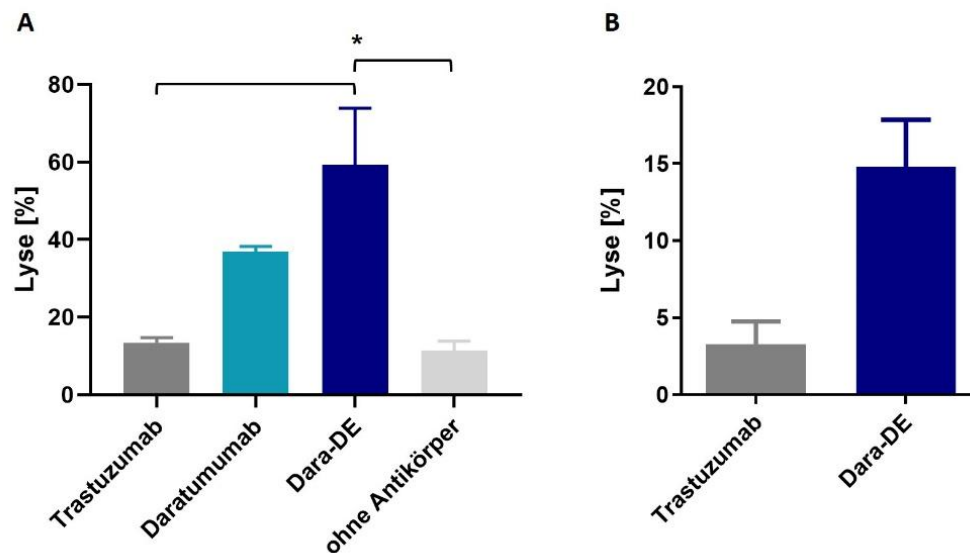


Abbildung 9: Ergebnisse der ⁵¹Chromfreisetzungsversuche mit Dara-DE im autologen Setting.

Die ADCC-Induktion von Dara-DE wurde mit Material von Myelompatienten getestet. A) Die Myelomzellen wurden aus Knochenmark gewonnen und über CD138 positiv selektiert. Als Effektorzellen dienten autologe mit IL-15 (10 ng/ml) stimulierte NK-Zellen (CD56-negative Selektion der MNC) aus peripherem Vollblut. Es handelt sich um einen Einzelversuch mit einer E:T-Ratio von 10:1 und einer Antikörperkonzentration von 10 µg/ml. Die Inkubationszeit betrug 3 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der 3er-Replikationen und deren Standardabweichung. B) In zwei unabhängigen autologen Experimenten wurden aus Knochenmark gewonnene MNC durch MACS in CD138-positive Myelomzellen und restliche, CD138-negative Zellen sortiert. Die CD138-negativen MNC wurden mit IL-15 stimuliert und im Verhältnis 80:1 als Effektorzellen gegen die CD138-positiven Myelomzellen eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 4 h, die Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Dargestellt ist die antikörperabhängige Lyse in Form von Mittelwerten und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden mit $p < 0,05$ akzeptiert und mit * gekennzeichnet.

3.2.2 Untersuchung der ADCP-Vermittlung durch Dara-DE

Neben NK-Zellen gelten Makrophagen als wichtige Effektorzellpopulation für therapeutische Antikörper in der Tumorthherapie (Weiskopf & Weissman 2015). Daher wurde der Fc-optimierte Antikörper Dara-DE auch auf seine Fähigkeit untersucht, Makrophagen zu ADCP zu aktivieren. Dazu wurden humane Makrophagen aus Monozyten ex vivo differenziert. Dabei wurde Dara-DE mit dem klinisch eingesetzten, nativen Antikörper Daratumumab in Phagozytoseversuchen mit Raji-Zellen verglichen. Da es sich bei Raji-Zellen um eine CD20-positive Burkitt-Lymphom-Linie handelt, wurde zum weiteren Vergleich der CD20-Antikörper Rituximab eingesetzt, der als therapeutischer Antikörper bei Lymphomen klinisch zum Einsatz kommt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Unter den Makrophagen bewirkte Dara-DE eine Phagozytoserate von 23 %, Daratumumab sowie Rituximab bewirkten 25 %. Die Negativkontrollen Cetuximab und 4D5-DE erreichten lediglich 4 % und induzierten gegenüber einer Kontrollreaktion ohne Antikörper keine Phagozytose. Es konnte kein statistischer Unterschied zwischen Dara-DE, Daratumumab und Rituximab festgestellt werden. Das Potential von Dara-DE zur ADCP-Induktion ist also vergleichbar hoch wie das von Daratumumab.

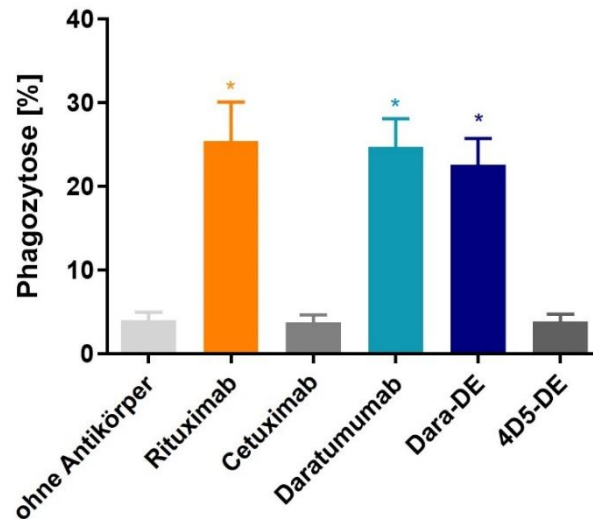


Abbildung 10: Untersuchung der ADCP-Induktion von Dara-DE im Vergleich zu Daratumumab und Rituximab. Die Phagozytoseversuche wurden an Raji-Zellen durchgeführt. Als Effektorzellen dienten Makrophagen aus dem Blut gesunder Spender. Die E:T-Ratio betrug 3:1, die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der an der Phagozytose beteiligten Makrophagen. Cetuximab und 4D5-DE dienten als Negativkontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM von neun unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollantikörpern wurden mit $p < 0,05$ akzeptiert und mit * gekennzeichnet.

3.2.3 Analyse der verwendeten Makrophagen

Das Vorhandensein makrophagentypischer Oberflächenantigene auf den hergestellten Makrophagen wurde regelmäßig im Durchflusszytometer bestätigt, bevor diese in Phagozytose-Experimenten verwendet wurden (Abbildung 11). Untersucht wurden die Oberflächenantigene CD14, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), das B7-Molekül CD86 und der inhibitorische Rezeptor SIRPα (CD172a) für CD47. In den Analysen konnten alle Antigene regelhaft auf den Makrophagen nachgewiesen werden.

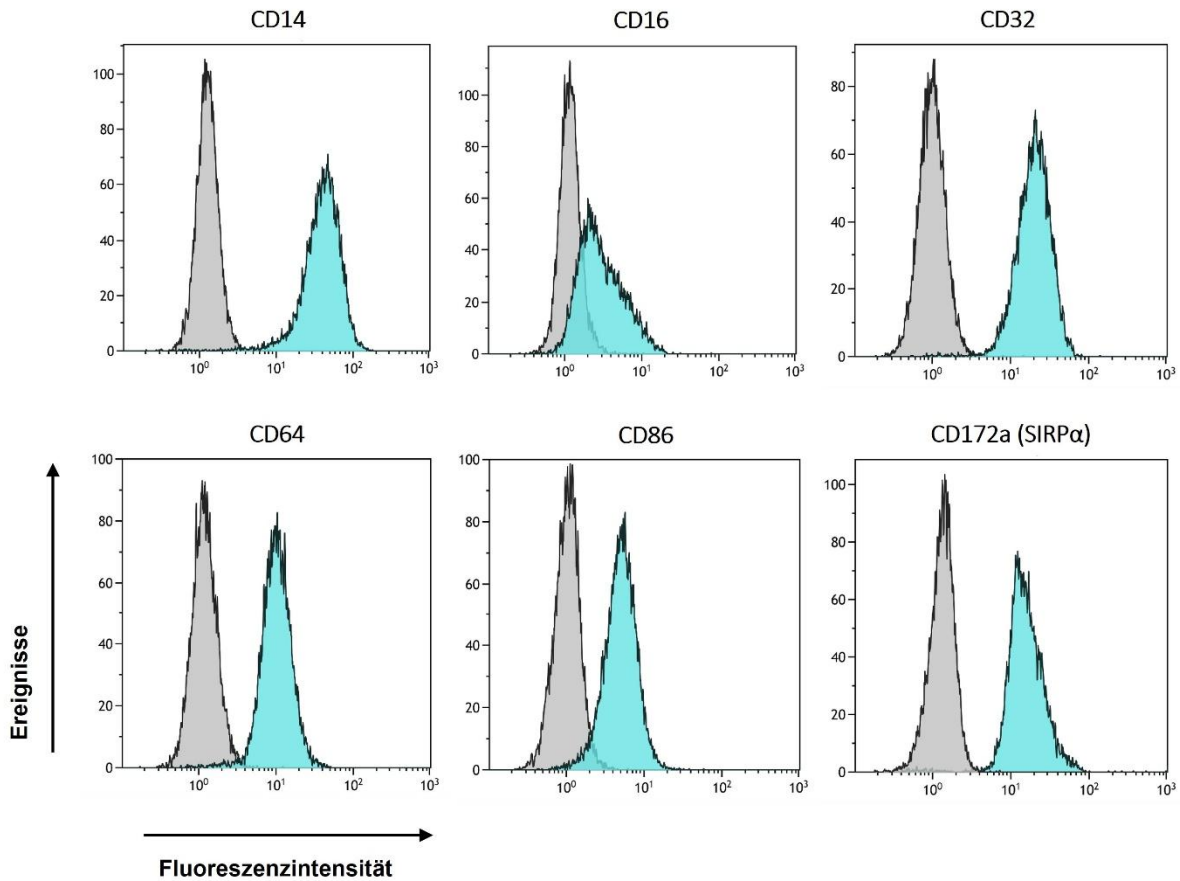


Abbildung 11: Analyse der Zelloberflächenantigene der hergestellten Makrophagen.

Mittels Durchflusszytometrie wurden die für Phagozytose-Experimente verwendeten Makrophagen auf das Vorhandensein makrophagentypischer Oberflächenantigene untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von fünf unabhängigen Experimenten. Die Antikörper gegen das zu detektierende Antigen sind blau dargestellt. Die graue Färbung entspricht der jeweiligen IgG-Kontrolle.

3.3 Herstellung und Charakterisierung des Fusionsproteins SIRP α -Fc σ

Die Blockade der CD47-SIRP α -Interaktion könnte einen Ansatz darstellen, die durch CD38-Antikörper induzierte ADCP von Myelomzellen weiter zu steigern. Zur Blockade dieser inhibitorischen Signalachse wurde ein SIRP α -Fusionsprotein hergestellt, welches an die SIRP α -Bindestelle von CD47 bindet und sie für das membranständige SIRP α auf Makrophagen unzugänglich macht. Das antiphagozytotische Signal der CD47-SIRP α -Interaktion sollte so verhindert und die Phagozytose durch Makrophagen verbessert werden.

3.3.1 Konstruktion eines Expressionsvektors zur Herstellung von SIRP α -Fc σ

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Fusionsprotein SIRP α -Fc σ konstruiert. Das rekombinante Protein besteht aus einer SIRP α -Variante, die mit einer modifizierten Fc-Domäne IgG2 σ kombiniert wurde. Die kodierende Sequenz der SIRP α -Variante SIRP α 118mer (Aminosäuren 31-148 der V2-Form von SIRP α) wurde in Auftrags-synthese hergestellt. Die Klonierung in den Expressionsvektor pSec-CD3-HC-IgG2 σ erfolgte über die Restriktionsenzyme NheI und BsrGI. Der Expressionsvektor pSec-CD3-HC-IgG2 σ enthält eine modifizierte Fc-Domäne IgG2 σ , in der durch Einführung von Aminosäuresubstitutionen (V234A/G237A /P238S/H268A/V309L/A330S/P331S) die C1q- und Fc γ R-Bindung und somit Immuneffektorfunktionen eliminiert worden waren (Vafa et al. 2014). Dadurch sollte sichergestellt werden, dass das Fusionsprotein selbst keine Fc γ R aktivieren konnte und nur Antigen-blockierende Funktionen besaß. Zur Sequenzierung des hergestellten DNA-Vektors wurden die Primer pSec CMV For (GGTAGGCGTG TACGGTGGGAGG) und pSec poly A Rev (TTCCTCATT TTA TTAGGAAAGGACAGTGGG) verwendet.

3.3.2 Proteinexpression und Reinigung von SIRP α -Fc σ

Die erfolgreiche Expression des Fusionsproteins SIRP α -Fc σ und seine Reinigung über Affinitätschromatographie mit der CaptureSelect™ IgG-Fc Affintiy Matrix wurde mittels Protein-Gelelektrophorese nachgewiesen. Abbildung 12 zeigt das Coomassie-gefärbte Gel nach der Auftrennung von SIRP α -Fc σ mit Rituximab als Vergleich unter reduzierenden Konditionen. SIRP α -Fc σ zeigt sich als Doppelbande mit einer Größe von ca. 40 kDa.

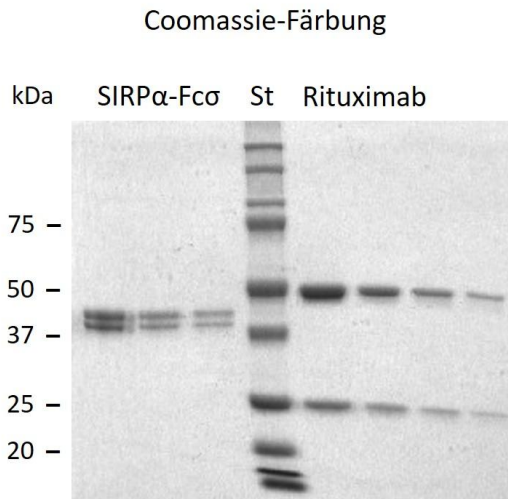


Abbildung 12: Analyse des gereinigten Fusionsproteins SIRP α -Fc γ mittels SDS-PAGE.

Nach der affinitätschromatographischen Reinigung wurde SIRP α -Fc γ in einer Verdünnungsreihe und unter reduzierenden Konditionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Rituximab diente als Kontrolle. St: Standard.

3.3.3 Analyse der Bindungseigenschaften von SIRP α -Fc γ

Die Bindung von SIRP α -Fc γ auf CD47-positiven Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abbildung 13). Die Bindungsanalysen wurden an CD47-exprimierenden RPMI 8226 und CHO-Zellen als Kontrollpopulation durchgeführt. Bei Inkubation von CHO-Zellen mit SIRP α -Fc γ fand keinerlei Fluoreszenzanstieg über die Negativkontrollen CD3-IgG2 σ bzw. ohne Antikörperzugabe hinaus statt. Die Hamsterzellen reagierten somit nicht mit dem humanen Fusionsprotein SIRP α -Fc γ . Bei Inkubation von CD47-positiven RPMI 8226 Myelomzellen mit SIRP α -Fc γ hingegen ließ sich als Nachweis für die Bindung ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität um das Hundertfache der Negativkontrollen feststellen.

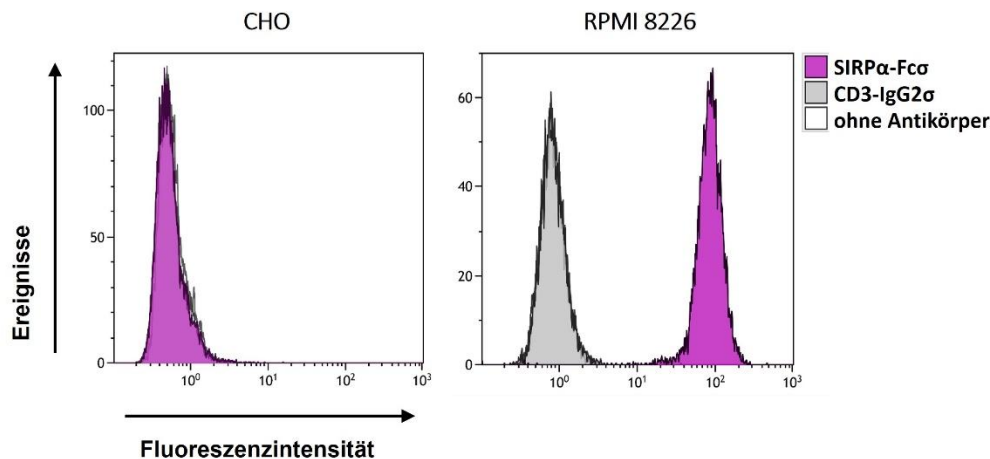


Abbildung 13: Bindung von SIRP α -Fc γ auf Myelomzellen.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Bindung von SIRP α -Fc γ auf CD47-exprimierenden RPMI 8226 und CHO-Zellen getestet. Als Negativkontrolle dienten CD3-IgG2 σ oder nur mit Puffer behandelte Zellen. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte der Nachweis mit einem FITC-gekoppelten Ziege-Anti-Human IgG Sekundärantikörper. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Vermittlung von Effektorzellmechanismen durch SIRP α -Fc γ

3.4.1 Untersuchung der Effekte von SIRP α -Fc γ auf die Zellproliferation

Um den Einfluss von SIRP α -Fc γ auf die Zellproliferation festzustellen, wurden MTT-basierte Proliferationsversuche an RPMI 8226 durchgeführt (nicht gezeigt). Nach 72 h Inkubation bei einer Konzentration von 10 μ g/ml bewirkte SIRP α -Fc γ eine Inhibition der Zellproliferation mit einer Reduktion der Zellzahl auf 90 % der Vergleichspopulation, die ohne Antikörperzugabe kultiviert wurde. Die Inhibition war damit weniger stark ausgeprägt als bei einem murinen CD47-IgG1-Antikörper, der die Zellzahl auf 73 % viable Zellen reduzierte. Die Reduktion der Zellzahl durch den CD47-Antikörper wurde zudem bereits ab einer Konzentration von 1 μ g/ml sichtbar, während SIRP α -Fc γ bei dieser Konzentration keine Effekte zeigte. Die mitgeführten Proteine CD3-IgG2 σ und ein muriner CD7-IgG1-Antikörper wiesen als Negativkontrollen keine Inhibition der Zellproliferation auf. Insgesamt war eine Tendenz zu erkennen, dass SIRP α -Fc die Zellviabilität weniger beeinflusst als der CD47-Antikörper. Die Unterschiede in der Proliferation zwischen den Versuchsgruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.4.2 Untersuchung der ADCP-Vermittlung durch SIRP α -Fc γ

3.4.2.1 ADCP von Tumorzelllinien

Das Fusionsprotein SIRP α -Fc γ bindet CD47 und bewirkt so eine Blockade des Phagozytose-inhibierenden Signals auf Makrophagen. In ADCP-Experimenten mit Raji und RPMI 8226 wurde

untersucht, ob die Kombination von Daratumumab mit SIRP α -Fc γ mehr Phagozytose bewirkt als der Antikörper oder das Fusionsprotein allein. In einer Versuchsreihe mit Analyse der Makrophagen auf stattgefundene Phagozytose im Durchflusszytometer wurde der Effekt von SIRP α -Fc γ bei verschiedenen Dosierungen von Daratumumab untersucht (Abbildung 14). Da die Versuche an CD20-positiven Raji-Zellen durchgeführt wurden, wurde außerdem die Kombination vom CD20-Antikörper Rituximab mit SIRP α -Fc γ getestet. SIRP α -Fc γ wurde in einer immer gleichen Konzentration von 100 μ g/ml eingesetzt, da möglichst alle CD47-Moleküle blockiert sein sollten.

Daratumumab und Rituximab allein zeigten wie zu erwarten eine dosisabhängige Steigerung der Phagozytoserate unter den Makrophagen im Vergleich zur Negativkontrolle Cetuximab und erreichten beide ihre maximale Phagozytoserate ab einer Konzentration von 1 μ g/ml.

Ab einer Antikörperkonzentration von 0,1 μ g/ml ließ die Kombination von Rituximab mit SIRP α -Fc γ eine Steigerung der Phagozytoserate im Vergleich zu Rituximab allein erkennen. Die maximale Phagozytoserate von Rituximab (26 %) erhöhte sich mit SIRP α -Fc γ auf 31 %, allerdings konnte keine statistische Signifikanz auf dem 5 %-Niveau erreicht werden. Der Kurvenverlauf von Daratumumab lässt vermuten, dass eine Kombination mit SIRP α -Fc γ die Phagozytose im niedrigeren Konzentrationsbereich von ca. 0,1 μ g/ml bzw. im halbmaximalen Konzentrationsbereich verbessern könnte, ein Effekt auf die maximale Phagozytoserate blieb in diesen Experimenten jedoch aus (beide 21 %). Unter Cetuximab als Negativkontrolle wurde eine Phagozytoserate von 3 % erreicht.

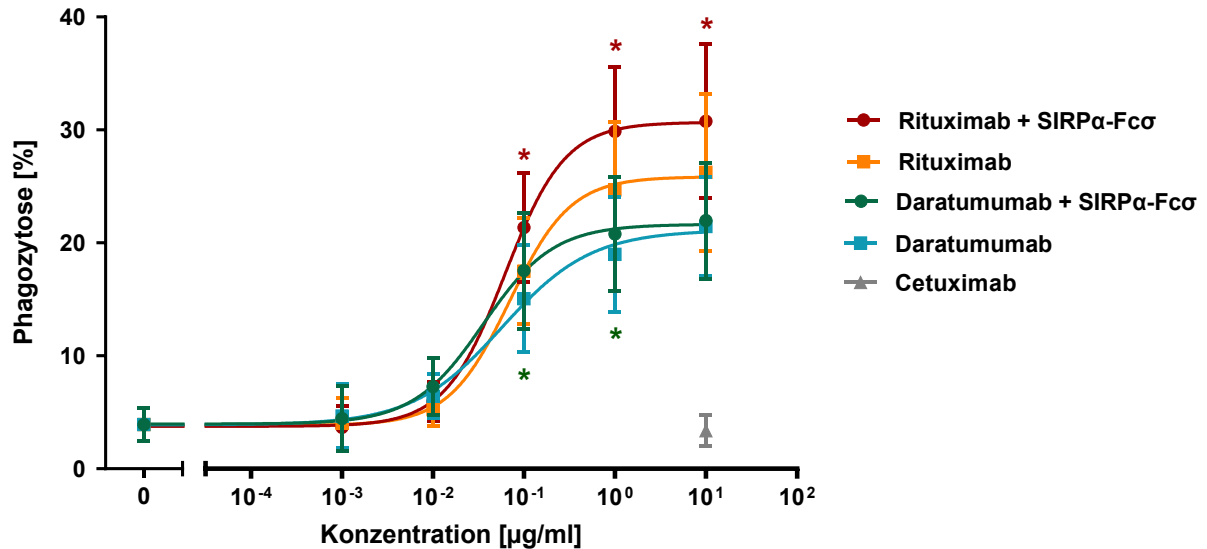


Abbildung 14: Untersuchung der ADCP-Verstärkung durch Kombination von Daratumumab sowie Rituximab mit SIRPα-Fcα mittels Durchflusszytometrie.

Die Phagozytoseversuche wurden mit Zellen der Burkitt-Lymphom-Linie Raji und Makrophagen aus dem Blut gesunder Spender durchgeführt. Die E:T-Ratio betrug 3:1. SIRPα-Fcα wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Cetuximab diente als Negativkontrolle. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der an der Phagozytose beteiligten Makrophagen. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM von 6 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen Rituximab und Rituximab + SIRPα-Fcα bzw. Daratumumab und Daratumumab + SIRPα-Fcα wurden mit $p < 0,05$ akzeptiert und mit * gekennzeichnet.

Weitere ADCP-Versuche an der Raji-Zelllinie wurden ausschließlich mit der höchsten Antikörperkonzentration durchgeführt, um einen zusätzlichen Effekt von SIRPα-Fcα auf die maximale Phagozytoserate zu untersuchen. Eine Übersicht der ADCP-Experimente mit Antikörperkonzentrationen von 10 µg/ml wurde erstellt und ist in Abbildung 15 zu sehen. Die Verteilung der Datenpunkte zeigt, dass der Einsatz von Daratumumab und Rituximab sowie deren Kombination mit SIRPα-Fcα eine große Spannweite von Phagozytoseraten bei den verschiedenen Blutspendern ergibt. Die Kontrollen Cetuximab (nativer IgG1-Antikörper) und keine Antikörperzugabe bzw. SIRPα-Fcα allein und dessen Negativkontrolle allein zeigten keinen Effekt und wiesen bei basalen Phagozytoseraten von 4 % eine deutlich kleinere Spannweite der Datenverteilung auf. Die Phagozytoserate von Rituximab lag im Mittel bei 25,5 % und konnte durch Kombination von Rituximab mit SIRPα-Fcα auf 29,8 % gesteigert werden. Die durch Daratumumab vermittelte Phagozytose wurde durch Kombination von SIRPα-Fcα gering von 23,5 % auf 24,6 % und ohne statistische Signifikanz gesteigert. SIRPα-Fcα allein zeigte keinen Effekt auf das Phagozytoseverhalten der Makrophagen im Vergleich zu seiner Kontrolle (CD3-IgG2α oder 4D5-IgG2α), was der Anforderung an das Fusionsprotein, keine Immuneffektorfunktionen zu vermitteln, entsprach.

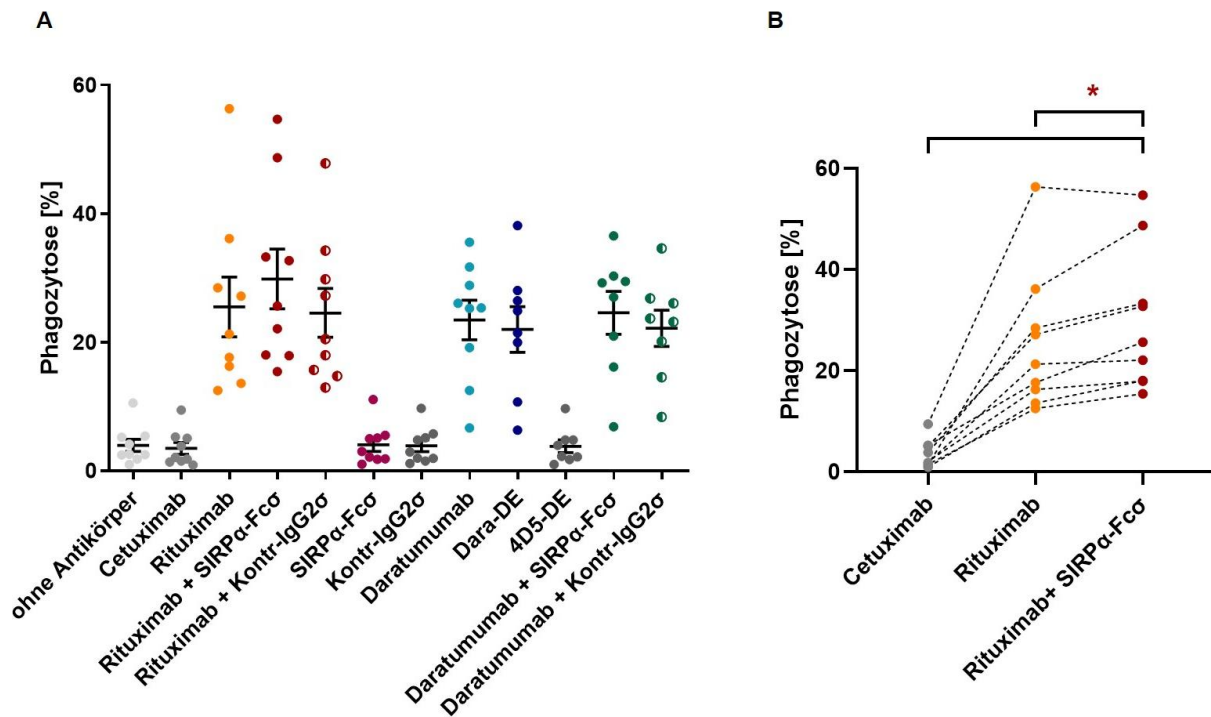


Abbildung 15: Zusammenfassung der ADCP-Experimente mit Raji-Zellen.

A) Die Ergebnisse aller ADCP-Experimente an der Raji-Zelllinie mit SIRP α -Fc σ mit Makrophagen gesunder Spender sind hier dargestellt. Der Vollständigkeit halber werden auch die bereits vorgestellten Versuche mit Dara-DE aus Abbildung 14 mit aufgeführt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der an der Phagozytose beteiligten Makrophagen. Die Antikörper wurden in Konzentrationen von 10 μ g/ml eingesetzt, SIRP α -Fc σ und seine Negativkontrolle (Kontr-IgG2 σ : CD3-IgG2 σ oder 4D5-IgG2 σ) in einer Konzentration von 100 μ g/ml. Dargestellt sind einzelne Datenpunkte (bunte Kreise) sowie deren Mittelwerte (schwarze Querstriche) und SEM. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollen (Negativkontrollen: ohne Antikörper, Cetuximab, 4D5-DE, sowie SIRP α -Fc σ und Kontr-IgG2 σ) mit $p < 0,05$ ist bei allen Antikörperkombinationen gegeben, aber der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet. B) Ausschnitt aus A: Die gestrichelten Linien verbinden die zusammengehörigen Datenpunkte der einzelnen Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Daten wurden mit * ($p < 0,05$) gekennzeichnet. (n=9 für Rituximab + SIRP α -Fc σ n=8 für Dara-DE und Daratumumab + SIRP α -Fc.)

In ADCP-Experimenten an Zellen der Myelomlinie RPMI 8226, die mittels *Life Cell Imaging* erfolgten, wies die Kombination von Daratumumab mit SIRP α -Fc σ eine deutliche Verstärkung der Phagozytose auf. Die Experimente wurden mit einem IncuCyte[®] Live-Cell Analysis System durchgeführt. Abbildung 16 zeigt zwei Experimente, in denen die phagozytierten Zielzellen über die Zeit ermittelt wurden. In beiden Experimenten stieg die Menge der aufleuchtenden Zielzellen in den ersten Stunden an, bis sie nach etwa 5 h in Experiment 1 (Abbildung 16 A) bzw. 4 h in Experiment 2 (Abbildung 16 B) ein Plateau erreichte. Die Kombination von Daratumumab mit SIRP α -Fc σ resultierte bereits ab einer Stunde Inkubationszeit in einer vermehrten Phagozytose der Zielzellen im Vergleich zu Daratumumab allein sowie Daratumumab in Kombination mit CD3-IgG2 σ als Kontrolle. Die Steigerung im Plateaubereich lag in beiden Experimenten bei etwa 40 % und mehr in Bezug auf die Phagozytose durch Daratumumab allein. Durch SIRP α -Fc σ allein konnte im Vergleich zu CD3-IgG2 σ und der Negativkontrolle Cetuximab

kein Effekt auf die Phagozytose nachgewiesen werden, obwohl die Rate in Experiment 2 höher ausfiel als erwartet. Gleichzeitig wies Daratumumab allein und in Kombination mit CD3-IgG2 σ keine signifikant höhere ADCP als Cetuximab auf.

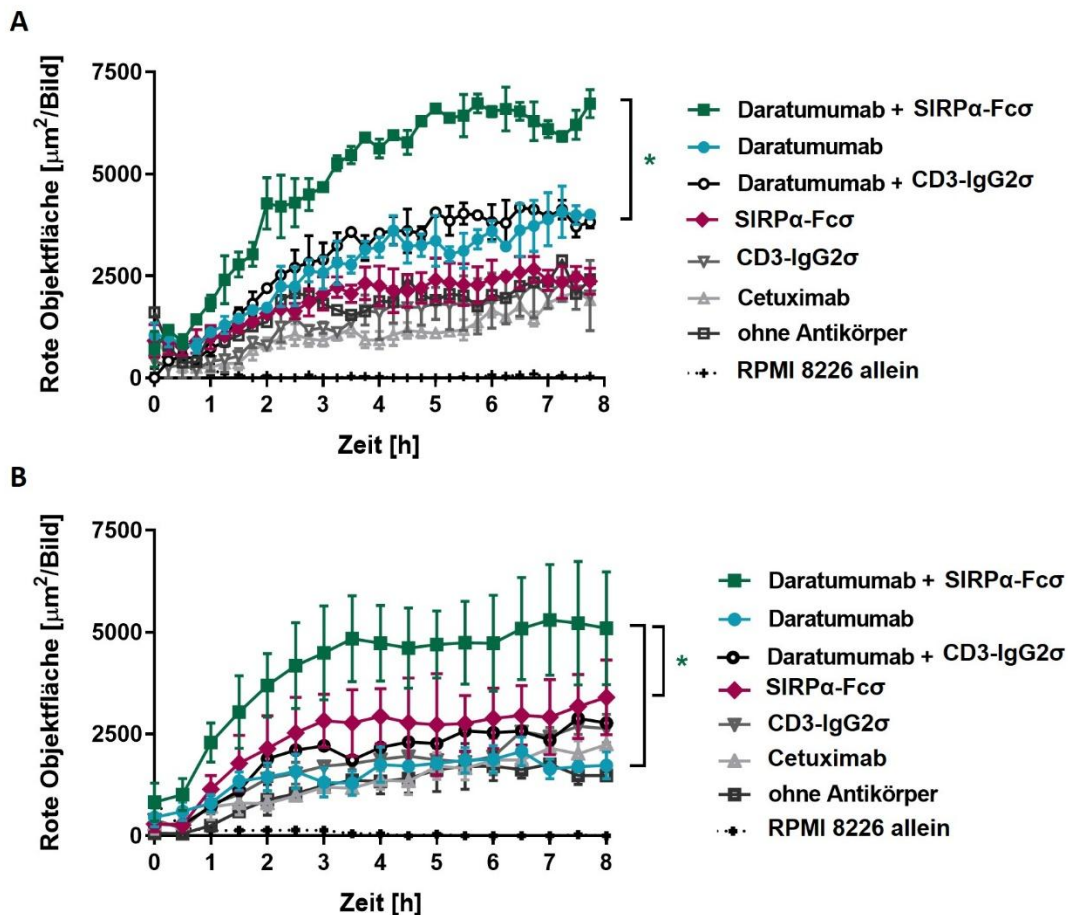


Abbildung 16: ADCP-Verstärkung durch Kombination von Daratumumab mit SIRP α -Fc σ im Life Cell Imaging.

Die Experimente wurden mit RPMI 8226 und Makrophagen gesunder Spender mit einer E:T-Ratio von 3:1 durchgeführt. Ermittelt wurde die rot fluoreszierende Bildfläche über die Zeit, welche den phagozytierten Zielzellen entspricht. Die Antikörper und SIRP α -Fc σ wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente in ihrem zeitlichen Verlauf. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte und SEM. Signifikante Unterschiede wurden mit $p < 0,05$ akzeptiert und mit * gekennzeichnet.

3.4.2.2 ADCP in autologen Versuchen

Auch im Falle von SIRP α -Fc σ bot sich die Möglichkeit, Effekte auf die ADCP im autologen Setting zu testen. Dazu standen gereinigte Tumorzellen eines Myelompatienten und MNC desselben Patienten zur Herstellung von Makrophagen zur Verfügung, sodass ein Experiment mit Analyse der Makrophagen (Abbildung 17 A) und ein Experiment mit Ermittlung der Zielzelldepletion (Abbildung 17 B) durchgeführt werden konnte. Diese beiden Experimente konnten zwei Wochen später mit neuem

Material desselben Patienten wiederholt werden (Abbildung 17 C und D). Wegen der unterschiedlich ausgeprägten basalen Phagozytose wurden die Ergebnisse jeweils getrennt abgebildet. Im ersten Versuch mit Analyse der Makrophagen resultierte ein leichter Anstieg der Phagozytose, wenn SIRP α -Fc σ mit Daratumumab kombiniert wurde (51 %), im Vergleich zu Daratumumab allein (47 %) oder mit CD3-IgG2 σ als Kontrolle (47 %). Dieser Effekt zeigte sich auch im zweiten Experiment, wo durch SIRP α -Fc σ eine Steigerung der durch Daratumumab vermittelten ADCP von 25 % auf 32 % beobachtet werden konnte. SIRP α -Fc σ allein zeigte im ersten Experiment eine geringgradig höhere Phagozytose (29 %) als CD3-IgG2 σ (26 %), jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau. Im zweiten Experiment hingegen war kein Unterschied feststellbar.

Die Resultate der Experimente mit Ermittlung der Tumorzelldepletion unterstützten die zuvor genannten Ergebnisse. Durch Kombination mit SIRP α -Fc σ konnte die Depletion der Myelomzellen durch Daratumumab induziert von 56 % auf 40 % und in der Wiederholung des Versuchs von 42 % auf 19 % verstärkt werden, allerdings ohne statistische Signifikanz. Die Kombination mit CD3-IgG2 σ als Kontrolle zeigte derweil keinen oder geringeren Effekt. SIRP α -Fc σ allein bewirkte in beiden Versuchen ebenso wie CD3-IgG2 σ und die Negativkontrolle Cetuximab bzw. Trastuzumab keine Depletion.

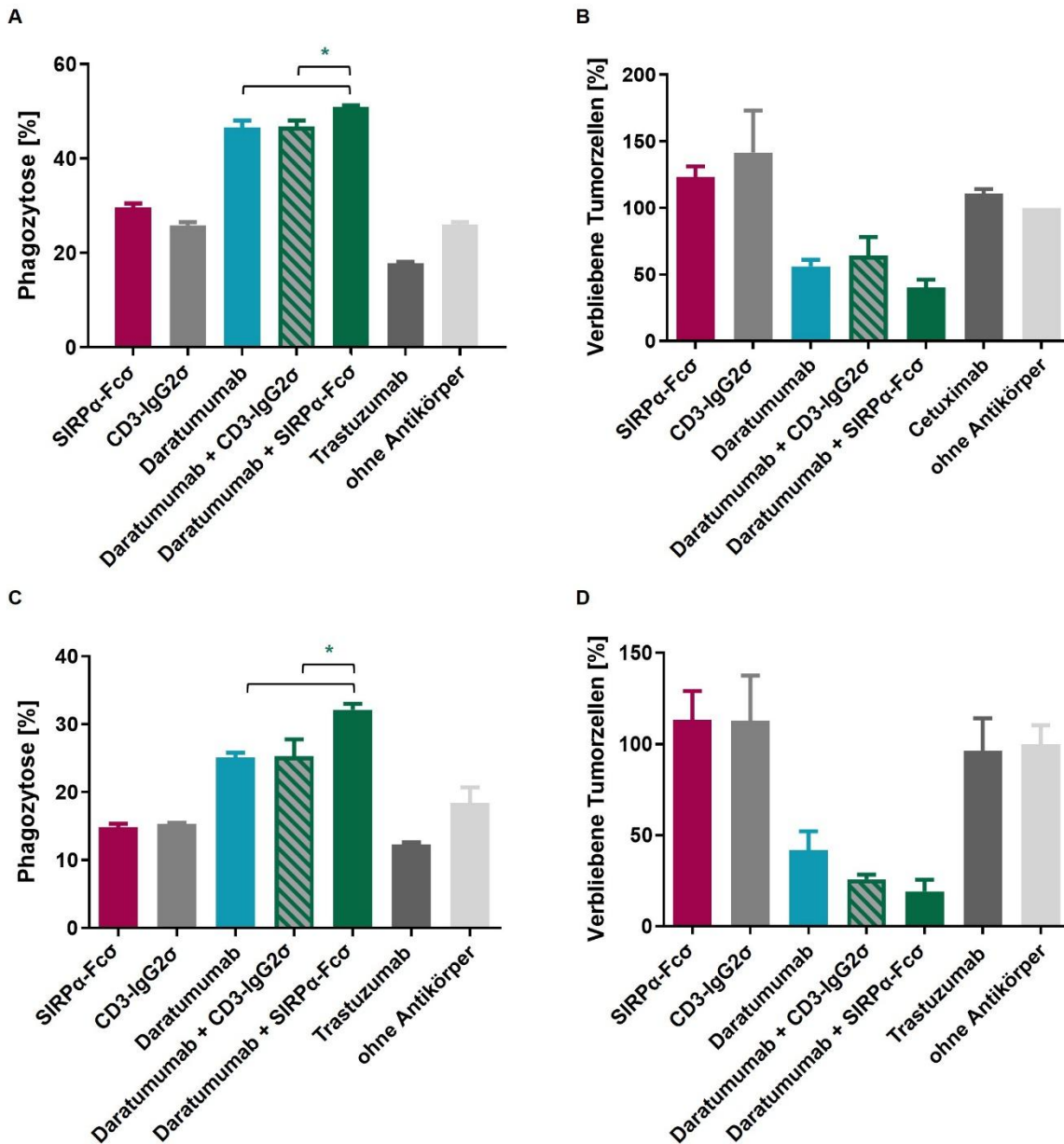


Abbildung 17: SIRPα-Fcσ in Kombination mit Daratumumab in autologen ADCP-Experimenten an Myelomzellen.

Verwendet wurden Tumorzellen aus dem Pleuraerguss eines Myelompatienten und Makrophagen desselben Patienten. Getestet wurde der Effekt von Daratumumab in Kombination mit SIRPα-Fcσ im Vergleich zu Daratumumab allein bzw. mit CD3-IgG2σ als Kontrolle. 4D5-DE diente als Negativkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM von vier Einzelexperimenten. Signifikante Unterschiede wurden mit $p < 0,05$ akzeptiert und mit * gekennzeichnet. A) Erster ADCP-Versuch mit Analyse der Makrophagen auf stattgefundene Phagozytose. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der an der Phagozytose beteiligten Makrophagen. B) Erster ADCP-Versuch mit Ermittlung der Zielzelledepletion. Dargestellt ist die Zahl der Zielzellen in Relation zur Inkubation ohne Antikörper. C) Zweiter ADCP-Versuch mit Analyse der Makrophagen auf stattgefundene Phagozytose, zwei Wochen nach dem ersten Versuch mit Material desselben Patienten. D) Zweiter ADCP-Versuch mit Ermittlung der Zielzelledepletion, zwei Wochen nach dem ersten Versuch mit Zellmaterial desselben Patienten.

4 Diskussion

Die letzten Jahre haben erhebliche Verbesserungen in der Therapie des Multiplen Myeloms hervorgebracht und die Überlebenszeiten von betroffenen Patienten signifikant verlängert. Trotz der verbesserten Therapiemöglichkeiten gibt es allerdings Patientengruppen, die nicht oder nur gering von den neuen Therapieoptionen profitieren. So sind bestimmte Hochrisikomutationen wie zum Beispiel die del(17p)-Mutation weiterhin mit einer schlechten Prognose assoziiert (Corre et al. 2021; Chalopin et al. 2021). Auch bei gutem Ansprechen auf die neuen Therapien sind Rezidive und die Entwicklung von Resistenzen häufig (Moreau & Wit 2017). Aus diesen Gründen ist es wichtig, neue Therapieansätze zu schaffen, um mehr Patienten ein rezidivfreies Überleben zu ermöglichen.

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern verbuchte in unterschiedlichen Bereichen der Medizin große Erfolge. Unabhängig vom Einsatzgebiet weisen therapeutische monoklonale Antikörper besondere Vorteile auf: eine hohe Spezifität, eine präzise Wirkung sowie eine lange Halbwertszeit, welche die Verabreichung in größeren Abständen möglich macht (Hansel et al. 2010). So wurde für den Antikörper Daratumumab eine Halbwertszeit von mehreren Tagen bis etwa drei Wochen, abhängig von der Infusionshäufigkeit, ermittelt (Lokhorst et al. 2015). Monoklonale Antikörper hingegen werden in der Regel gut vertragen. Unerwünschte Nebenwirkungen therapeutischer Antikörper fallen in der Regel geringer aus als die konventioneller Tumortherapien (Chemotherapien, Radiotherapie und operative Therapien) und können sich unter anderem in Immunreaktionen äußern, weshalb Methoden zur Reduktion der Immunogenität entwickelt wurden (Presta 2008). Infektionen als Nebenwirkungen einer Antikörpertherapie sind oft der Funktion des spezifischen Liganden geschuldet, welcher durch die Therapie eliminiert wird (Hansel et al. 2010). Durch eine Optimierung der monoklonalen Antikörper konnten Nebenwirkungen insgesamt weiter reduziert werden, was sich in hohen Zulassungsraten widerspiegelt (Kaplon et al. 2023; The Antibody Society 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien zur Verbesserung der Antikörpertherapie beim Multiplen Myelom analysiert. Ansätze zur Optimierung der Wirkung therapeutischer monoklonaler Antikörper wurden in Form der Methode des Fc-Engineerings und der synergistisch wirkenden Signalblockade verfolgt. Hieraus gingen der Fc-optimierte CD38-Antikörper Dara-DE und das Fusionsprotein SIRP α -Fc α hervor, welche jeweils charakterisiert und hinsichtlich ihres Bindungsprofils und ihrer Wirkung in *in vitro* Studien untersucht wurden.

Daratumumab bindet als humaner monoklonaler IgG1-Antikörper das Antigen CD38. Die Überexpression von CD38 auf Myelomzellen macht CD38 zu einem attraktiven Zielantigen in der Tumortherapie. Seit seiner Zulassung 2016 kommt Daratumumab in der Myelomtherapie in Europa zum Einsatz (Goldsmith et al. 2021).

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte der Fc-optimierte CD38-Antikörper Dara-DE im Vergleich zum bereits etablierten Daratumumab ein erhöhtes Potential zur ADCC-Induktion bei ebenso guter Phagozytose-Induktion.

Das Antigen CD47 ist in Interaktion mit dem vorwiegend auf myeloischen Zellen vorkommenden SIRP α an einem Phagozytose-hemmenden Signalweg beteiligt. Zur Unterbrechung dieses Signalweges wurde das Fusionsprotein SIRP α -Fc α erstellt. Die Untersuchungen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Kombination von Daratumumab mit SIRP α -Fc α eine gesteigerte antikörpervermittelte Phagozytose von Tumorzellen bewirken kann.

4.1 Protein-Engineering als Strategie zur Optimierung therapeutischer Antikörper

Das Fc-Engineering wird zur Optimierung therapeutischer Antikörper zunehmend genutzt (Liu et al. 2020). Durch gezielte Veränderung des Antikörpers können bestimmte Bindungseigenschaften und Wirkungsprofile erzielt werden. Eine Strategie des Fc-Engineerings besteht in der Veränderung der Aminosäurestruktur eines Antikörpers, bezeichnet als Protein-Engineering. Eine erste Arbeit hierzu lieferten Shields et al. Sie tauschten alle exponierten Aminosäuren der IgG1-Fc-Domäne durch Alanin aus und identifizierten Varianten mit verschiedenen FcR-Bindungsprofilen (Shields et al. 2001). Dem Austausch einzelner Aminosäuren gegenüber steht der Austausch ganzer Aminosäurestränge, wie beim Cross-Isotyp-Engineering angewandt. Auf diese Weise können beispielsweise Kombinationen aus IgA und IgG erstellt werden (Kelton et al. 2014). Als weitere Strategie des Fc-Engineerings steht das Glyko-Engineering zur Verfügung. Durch gezielte Veränderung der Zuckerreste eines Antikörpers können Bindungseigenschaften beeinflusst werden. Das Resultat ist eine Auswahl einiger Antikörper mit verbesserten Funktionen, wie z.B. einem veränderten Fc-Rezeptor-Bindungsprofil und daraus folgende verbesserte Effektorfunktionen. Beide Strategien, Protein-Engineering und Glyko-Engineering können auch kombiniert werden (Roßkopf et al. 2020).

Die Anforderungen an die Funktionen therapeutischer Antikörper sind unterschiedlich, je nachdem, welche Zielstruktur sie binden. Ein Antikörper, der gegen ein Tumorantigen gerichtet ist, sollte Immunzellen rekrutieren, um seine Wirkung zu entfalten. Demgegenüber gibt es Antikörper, deren Wirkung auf der Antigenbindung beruht, beispielsweise in der Neutralisation des Antigens. Hier wäre es in der Regel von Nachteil, wenn neutralisierende Antikörper Immunreaktionen hervorrufen. Von Vorteil wäre in diesem Fall hingegen ein Antikörper ohne weitere Fc-Funktion, um unerwünschte Nebenwirkungen durch Immunreaktionen zu vermeiden (Kellner et al. 2017). Letztendlich ist jedoch der Effekt therapeutischer Antikörper im Individuum nicht absehbar. Für die Tumorthherapie erscheint es daher sinnvoll, möglichst viele Effektorfunktionen gleichzeitig zu optimieren und in einem

optimierten Antikörper zu vereinen, um so zu einem Medikament zu gelangen, welches in möglichst vielen Individuen eine therapeutische Wirkung entfaltet (Kellner et al. 2017; Natsume et al. 2008).

Die Effektivität eines Antikörpers muss als ein komplexes Zusammenspiel aus Bindungsaffinitäten und Induktion verschiedener Mechanismen betrachtet werden, die sowohl komplementabhängig als auch effektorzellvermittelt sein können. Veränderungen an der Aminosäuresequenz und somit Struktur eines Antikörpers, die zur Verstärkung eines Wirkmechanismus führen, haben Auswirkungen auf die weiteren Bindungseigenschaften des Antikörpers. Dies kann wiederum Auswirkungen auf andere Funktionen des Antikörpers haben und führt so mitunter sogar zu einer Einbuße des Potentials zur Vermittlung anderer Wirkmechanismen. Beispielsweise kann der Austausch von Aminosäuren, welcher zu einer stärkeren C1q-Bindung und somit zu verstärkter CDC führt, gleichzeitig in einer verminderten ADCC-Induktion resultieren (Kellner et al. 2017; Moore et al. 2014). Solche Wechselwirkungen müssen bedacht und beachtet werden, wenn möglichst viele Effektorfunktionen verbessert werden sollen. Die nicht-fukosylierte EFTAE-Fc-Variante eines CD20-Antikörpers erzielte durch die Kombination aus Protein- und Glyko-Engineering gute Ergebnisse. Sie wies eine verbesserte CDC-Funktion und verbesserte ADCC-Funktion bei gesteigerter C1q-Bindung und FcγRIIIa-Bindung auf (Wirt et al. 2017). Das Beispiel dieses CD20-Antikörpers verdeutlicht, dass es sinnvoll sein kann, verschiedene Strategien zur Antikörperoptimierung zu kombinieren, um mehrere Effektorfunktionen gleichzeitig zu verbessern.

Wie eingangs beschrieben, besitzt Daratumumab sehr gute CDC-Aktivität (Weers et al. 2011). Im Hinblick auf die beschriebene wichtige Rolle der Effektorzellrekrutierung wurde der Fokus dieser Arbeit auf Ansätze zur Steigerung von ADCC und ADCP gelegt. Aufgrund ihrer gesteigerten ADCC-Induktion wurde das Profil der S239D/I332E-Variante für diese Arbeit ausgewählt (Lazar et al. 2006). Eine glyko- und proteinoptimierte Variante mit der S239D/I332E Modifikation und reduziertem Fucose-Gehalt konnte jedoch keine weiter verbesserte ADCC-Aktivität aufweisen (Repp et al. 2011). Hier scheint es eine Grenze zu geben, ab welcher eine weitere Steigerung der ADCC-Aktivität nicht möglich ist. Ist eine bestimmte FcγRIIIa-Bindung überschritten, wird zumindest *in vitro* eine maximale NK-Zell-vermittelte Lyse erreicht, die durch weitere Erhöhung der FcγR-Affinität nicht weiter gesteigert werden kann (Masuda et al. 2007). Diese Bindungsstärke wird wohl schon allein durch entweder Protein-Engineering, in diesem Fall durch die Aminosäuresubstitution S239D/I332E, oder Fucose-Reduktion erreicht, sodass eine Kombination beider Strategien keine weitere Verbesserung bringt (Repp et al. 2011; Masuda et al. 2007). Zur Steigerung der ADCC-Induktion reicht also die Umsetzung einer Optimierungsstrategie. Eine komplexere Produktion von glyko-optimierten Antikörpern könnte zu einem Kostennachteil gegenüber Protein-optimierten Antikörpern führen (Kellner et al. 2017; Li et al. 2017). Für dieses Projekt wurde daher ein rein Proteinbasiertes Fc-Engineering durchgeführt und eine S239D/I332E -Variante von Daratumumab generiert, um eine Verbesserung der ADCC zu erzielen.

Im direkten Vergleich mit dem IgG1-Wildtyp Daratumumab wurde das Bindungsverhalten von Dara-DE untersucht. In den Bindungsstudien konnte die unverminderte Bindung der Fc-optimierten Variante Dara-DE an das spezifische Antigen CD38 im Vergleich zu Daratumumab nachgewiesen werden. Die Antigenbindungsstelle im variablen Teil des Antikörpers wurde bei der Entwicklung von Dara-DE nicht verändert. Daher war eine vergleichbar hohe Affinität für das Zielantigen wie beim Wildtyp Daratumumab zu erwarten, welche in den Bindungsuntersuchungen bestätigt werden konnte. Dies bestätigt die Erwartungen, welche vorausgegangene Untersuchungen an Antikörpern der Mutation S239D/I332E vermuten ließen: dass die Affinität der Antigenbindung durch diese Veränderung in der Aminosäuresequenz nicht beeinflusst wird (Lazar et al. 2006). Diese Erkenntnis stellte die Voraussetzung für weitere Untersuchungen von Dara-DE, da Daratumumab sich durch eine hohe Affinität zu seinem Antigen CD38 auszeichnet und hier ein Zusammenhang zum stark ausgeprägten Potential zur CDC-Induktion hergestellt werden kann (Weers et al. 2011). Die Ergebnisse der Bindungsstudien decken sich zudem mit dem unveränderten Bindungsverhalten anderer Antikörper, die mit der gleichen Aminosäuresubstitution S239D/I332E optimiert wurden, wie dem CD133-Antikörper 293C3-SDIE (Schmied et al. 2019b) oder dem FLT3-Antikörper 4G8-SDIEM (Schmied et al. 2019a).

Bezüglich der Steigerung der ADCC wies das Profil der S239D/I332E-Aminosäuresubstitution bereits bei verschiedenen Antikörpern positive Untersuchungsergebnisse auf. Der mit der Aminosäuresubstitution S239D/I332E Fc-optimierte CD133-Antikörper 293C3-SDIE zeigt eine gesteigerte ADCC gegen CD133-positive AML-Zellen (Koerner et al. 2017), Kolonkarzinom-Zelllinien (Schmied et al. 2019b) und B-ALL-Zellen auf (Riegg et al. 2021). Ein weiterer Fc-optimierter Antikörper mit der Aminosäuresubstitution S239D/I332E ist der FLT3-Antikörper 4G8-SDIEM, welcher bereits in einer klinischen Studie bei AML-Patienten erprobt wird und zudem NK-Zell-abhängige ADCC gegen B-ALL-Zellen induziert (Schmied et al. 2019a). Der Fc-optimierte CD19-Antikörper Tafasitamab mit der Aminosäuresubstitution S239D/I332E wies ebenfalls Wirksamkeit in klinischen Studien nach. Seine Wirksamkeit konnte bei Leukämien und Lymphomen gezeigt werden (Horton et al. 2008). Die Forschungsgruppe um Schewe und Kollegen konnte nachweisen, dass ein Tafasitamab Surrogat-Antikörper („CD19-DE“) die MRD von aus Patienten stammenden ALL im Xenograftmodell eradizierte (Schewe et al. 2017). Tafasitamab wurde für die FcγR-Bindung optimiert, die CDC-Aktivität fehlt jedoch (Kellner et al. 2013). Die positiven Eigenschaften führten dazu, dass Tafasitamab von der FDA für eine Kombinationstherapie mit Lenalidomid für das Diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) zugelassen wurde (Salles et al. 2020). Was für herkömmlich konfigurierte Antikörper gilt, konnten Raab und Kollegen auch für ein Fusionsprotein NKG2D-IgG1 zeigen. Das Fusionsprotein mit der Aminosäuresubstitution S239D/I332E in seiner Fc-Domäne vermittelte verstärkt ADCC gegen

Brustkrebszellen (Raab et al. 2014). Eine deutliche Steigerung der ADCC wies das Fusionsprotein auch im Zusammenhang mit Leukämie-Zellen auf (Steinbacher et al. 2015).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Dara-DE reihen sich in bisherige positive und erfolgversprechende Studienergebnisse zu Antikörpern mit der S239D/I332E-Aminosäuresubstitution ein. *In vitro* Experimente an Tumorzelllinien zeigten in Chromfreisetzungsversuchen signifikant höhere Lyseraten, welche auf die S239D/I332E-Mutation zurückgeführt werden können. Es ergab sich sowohl eine gesteigerte Effektivität als auch Potenz der ADCC-Vermittlung (im Mittel ca. 3 bis 6-fach im Vergleich zum Wildtyp Daratumumab). Die schon bei anderen mit dieser Mutation optimierten Antikörpern nachgewiesene gesteigerte ADCC-Induktion wurde somit auch beim CD38-Antikörper Dara-DE bestätigt. In einigen Experimenten konnten Tumorzellen von Myelompatienten mit Patienteneigenen Effektorzellen inkubiert werden. Diese autologen Experimente zur ADCC-Induktion von Dara-DE geben Hinweise darauf, dass die ADCC-Induktion durch die Optimierung mittels S239D/I332E-Mutation auch in diesem Setting der Wildtyp-Variante überlegen ist. Für verlässliche Ergebnisse müssten diese allerdings in umfangreicheren Experimenten erhärtet werden.

Beim Betrachten der Ergebnisse zur Dara-DE induzierten ADCC fällt auf, dass die absoluten Lyseraten, die in den durchgeführten Untersuchungen erreicht wurden, im Vergleich zu den Untersuchungen anderer Forschungsgruppen eher gering erscheinen. Bei den Untersuchungen handelt es sich um dynamische Experimente mit Immunzellen verschiedener Spender. Eine nachgewiesene Auswirkung auf antikörpervermittelte Effektorzellmechanismen haben bestimmte genetische Polymorphismen. So zeigt der Polymorphismus 158F/F des FcγRIIIa eine höhere Affinität zu IgG1 und führt in der Folge bei Myelompatienten zu einem besseren Ansprechen auf die Therapie mit Daratumumab (Mata-Molanes et al. 2022). Mögliche genetische Varianten unter den Blutspendern können für eine breite Streuung der Lyseraten in den ADCC-Experimenten sorgen. Nachträglich eruieren lässt sich dies für die durchgeführten Versuche jedoch nicht.

Bei Antikörpern wie Tafasitamab (Horton et al. 2008) oder dem CD19-EFTAE (Roßkopf et al. 2020) zeigt sich der Effekt durch das Fc-Engineering besonders deutlich, da diese CD19-Antikörper in der jeweiligen Wildtyp-Variante nicht effizient ADCC oder CDC vermitteln. Daratumumab besitzt als klinisch erprobter Antikörper bereits eine hohe Wirksamkeit, weshalb hier geringere Unterschiede in der ADCC-Induktion zwischen der Fc-optimierten Variante und Daratumumab zu erwarten waren. Dies erklärt die zwar statistisch signifikante, aber vergleichsweise geringere Steigerung der Maximallyse durch das Fc-Engineering. Jedoch ist das Maß an Auswirkung des Fc-Engineerings im Patienten nicht absehbar. Es müsste geklärt werden, inwieweit die Verbesserungen, die das Fc-Engineering in *in vitro* Experimenten zeigt, sich letztendlich klinisch als relevant erweisen. Noch sind die Auswirkungen in der *in vivo* Anwendung von Dara-DE nicht absehbar. Generell ist es schwierig, die verbesserte Wirksamkeit optimierter Antikörper endgültig zu bewerten, da der direkte Vergleich zu Wildtyp-Varianten in

klinischen Studien schwierig zu realisieren ist (Kellner et al. 2017). Transgene Fc γ R-humanisierte Mäuse (Bournazos et al. 2014), mit humanen Effektorzellen humanisierte Mäuse (Lux et al. 2014; Lux & Nimmerjahn 2013) oder Primaten (Zalevsky et al. 2009) dienen als *in vivo* Modelle zur Untersuchung von IgG-Effektorfunktionen und könnten weiterführende Erkenntnisse über die *in vivo* Wirkung von Dara-DE geben.

Die Untersuchungen zur Phagozytose-Induktion bescheinigen der Fc-optimierten Variante Dara-DE eine unverändert stark ausgeprägte ADCP-Induktion im Vergleich zum Wildtyp Daratumumab. Die Ausprägung antikörperabhängiger Effektormechanismen und damit die Tumorzelldepletion ist abhängig vom Verhältnis aktivierender und inhibitorischer Fc γ -Rezeptorbindung (Nimmerjahn & Ravetch 2005). Die Mutation S239D/I332E bewirkt neben einer gesteigerten Affinität zu den aktivierenden Fc γ -Rezeptoren auch eine Affinitätssteigerung zum inhibitorischen Fc γ -Rezeptor IIb (CD32b) um ein vielfaches (im Vergleich zum Wildtyp um das 69-fache), wodurch sich erklären könnte, warum Dara-DE ein unverändertes Potential zur ADCP-Induktion besitzt (Lazar et al. 2006). Auf die ADCC durch NK-Zellen hat die gesteigerte Fc γ RIIb-Affinität vermutlich keine inhibitorischen Auswirkungen, da NK-Zellen kein CD32b exprimieren (Ernst et al. 2002). Eine Steigerung der antikörpervermittelten Phagozytose von Tumorzellen durch Makrophagen kann durch eine optimierte Bindung zum Fc γ RIIa erzielt werden (Richards et al. 2008). Um jedoch simultan sowohl eine Steigerung der ADCC als auch eine Steigerung der Daratumumab-vermittelten ADCP zu erreichen, erschien es sinnvoll das Protein-Engineering mit einer weiteren Optimierungsstrategie zu kombinieren. Zur Steigerung der Daratumumab-vermittelten Phagozytose wurde daher eine zusätzliche CD47-Blockade mit dem Fusionsprotein SIRP α -Fc σ getestet.

4.2 CD47-Blockade zur Steigerung der ADCP-Aktivität monoklonaler Antikörper

Um eine hohe Tumorzellelimination durch eine Antikörpertherapie in möglichst vielen Individuen zu erreichen, könnte es zielführend sein, möglichst viele Wirkmechanismen eines Antikörpers zu optimieren. Eine Optimierung der ADCC-Induktion von Daratumumab wurde über das Protein-Engineering erreicht. Wie eingangs beschrieben, leistet auch die ADCP durch Makrophagen einen wichtigen Beitrag zur Tumorelimination mittels monoklonaler therapeutischer Antikörper (Weiskopf & Weissman 2015). Jedoch ließ sich durch das Protein-Engineering mittels der Mutation S239D/I332E keine gleichzeitige Verstärkung der ADCP erreichen. Um die durch Daratumumab vermittelte Phagozytose-Induktion zu steigern, wurde daher die Strategie der CD47-Signalblockade angewendet, welche durch das rekombinant hergestellte Fusionsprotein SIRP α -IgG2 σ realisiert wurde. Das Fusionsprotein SIRP α -Fc σ diente zur Unterbindung des inhibitorischen 'Don't-eat-me'-Signals, welches

durch die CD47-SIRP α -Interaktion ausgelöst wird, und zeigte in den Untersuchungen in Kombination mit Daratumumab einen ADCP-steigernden Effekt.

Die Blockade der CD47-SIRP α -Achse stellt ein wichtiges, aktuelles Forschungsthema dar, weil Tumoren verschiedener Genese häufig eine hohe CD47-Expression aufweisen. Die Strategie erwies sich bereits in einigen Studien als effektiv: Der humanisierte CD47-Antikörper Hu5F9-G4 (Magrolimab) ermöglichte die Phagozytose und Elimination von Tumorzellen sowohl allein als auch in Kombination mit Rituximab (Liu et al. 2015a). In einer klinischen Phase-I-Studie führte die Kombination von Hu5F9-G4 mit Rituximab zur kompletten Remission bei NHL-Patienten (Advani et al. 2018). Durch Kombination von Hu5F9-G4 mit Trastuzumab konnte eine Verstärkung der Phagozytose und damit der Trastuzumab-vermittelten Effektivität gegen HER2-positive Brustkrebszellen erreicht werden, die bereits eine ADCC-Toleranz gegenüber Trastuzumab erworben hatten (Upton et al. 2021). In einer Phase-Ib/II-Studie zeigte Hu5F9-G4 in Kombination mit Azacitidin und Venetoclax Wirksamkeit bei AML (Daver et al. 2022). Auch die Kombination mit IgA-Antikörpern erwies sich als vielversprechend (Treffers et al. 2020).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigten eine signifikante Steigerung der durch Daratumumab vermittelten Phagozytose, die auf die CD47-Blockade durch die Kombination mit SIRP α -Fc γ zurückzuführen sind. Die Ergebnisse lieferten einen guten Effekt bei Myelomzelllinien und einen mäßigen Effekt bei der untersuchten Lymphomzelllinie. Ob dieser Effekt auch eine biologische Relevanz besitzt, ist mit den Experimenten nicht zu bewerten. Die Experimente im autologen Setting zeigten einen Effekt durch SIRP α -Fc γ und geben einen ersten Hinweis darauf, dass SIRP α -Fc γ auch hier eine positive Wirkung haben könnte.

Die Phagozytose-Experimente wurden mit *ex vivo* gereiften Makrophagen durchgeführt, da kein Zugang zu Gewebemakrophagen bestand. Die *in vitro* Experimente können eine komplexe Tumorumgebung nicht abbilden. Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) spielen beim Multiplen Myelom eine bedeutsame Rolle in der Mikroumgebung des Tumors (Sun et al. 2022). Sie können das Tumorstadium unterstützen und sind mitunter mit einer negativen Prognose verbunden (Suyani et al. 2013; Wang et al. 2019). Die TAM können jedoch durch Antikörpertherapie aktiviert werden und zur Tumorelimination beitragen. In Studien am Glioblastom konnte nachgewiesen werden, dass eine CD47-Blockade die Phagozytose von Tumorzellen durch Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) *in vitro* steigerte. Außerdem wurde eine Polarisation der TAM-Phänotypen von antitumorigenen M1 zu protumorigenen M2 unter CD47-Blockade *in vivo* beobachtet (Zhang et al. 2016). Auch das CD47-blockierende Fusionsprotein TTI-621 steigerte die Phagozytose von Lymphomzellen durch sowohl M1 als auch M2 Maus-TAM (Lin et al. 2017). Die Kombination einer Fc-funktionslosen Variante des CD47-Antikörpers Magrolimab mit einer LILRB1-Blockade (LILRB1, *leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1*) verstärkte die Rituximab-vermittelte Phagozytose von Lymphomzellen, unter

anderem durch Lymphom-assoziierte Makrophagen (Zeller et al. 2022). Dass auch SIRP α -Fc γ eine Auswirkung auf die TAM beim Multiplen Myelom hat, kann vermutet werden. *In vivo* Untersuchungen wären notwendig, um den Effekt von SIRP α -Fc γ auf die Phagozytose von Tumorzellen genauer zu untersuchen.

Studienergebnisse zeigen, dass die Antitumorwirkung der CD47-Blockade über den Effekt der gesteigerten ADCP durch Makrophagen hinaus geht. Matlung und Kollegen zeigten, dass eine Unterbrechung der SIRP α -CD47-Interaktion auch die antikörpervermittelte Trogozytose und Trogoptose durch Neutrophile verstärken kann (Matlung et al. 2018). Zudem konnte eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems im Rahmen der CD47-SIRP α -Blockade festgestellt werden. Tseng und Kollegen beobachteten, dass dendritische Zellen abhängig von einer CD47-SIRP α -Blockade Krebszellen vermehrt phagozytierten. Die dendritischen Zellen rekrutierten CD8-positive T-Zellen, so dass eine sekundäre T-Zell-Antwort initiiert wurde, die in den durchgeführten Untersuchungen Mäuse anschließend vor dem Tumor schützte (Tseng et al. 2013). Die Wirkung einer CD47-Blockade ist also nicht nur an das native Immunsystem gebunden. Zur vollen Wirkungsentfaltung ist auch das adaptive Immunsystem von Bedeutung (Liu et al. 2015b). Es würde jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus gehen, diese Effekte für das Fusionsprotein SIRP α -Fc γ im Speziellen nachweisen zu wollen.

Insgesamt zeigten bisher untersuchte CD47-Antikörper eine gute Verträglichkeit. Untersuchungen zur Toxizität zeigten, dass solche CD47-Antikörper, die in der Lage waren Effektorfunktionen zu vermitteln, Zytotoxizität aufwiesen, welche sich *in vivo* in erniedrigten Erythrozytenzahlen, Hämatokrit und Hämoglobinwerten äußerte (Pietsch et al. 2017). Darüber hinaus sind Hämagglutination und Plättchenaggregation weitere Probleme, die durch aktivierende CD47-Antikörper auftreten (Uno 2007). So zeigte beispielsweise der CD47-Antikörper Hu5F9-G4 in einer Phase-Ib-Studie in Kombination mit Rituximab insgesamt eine gute Verträglichkeit unter den Probanden. Eine Anämie ließ sich durch eine niedrigere Erstdosis abmildern (Advani et al. 2018). Zu den unerwünschten Nebenwirkungen der Phase-I-Studie zur Sicherheit, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Hu5F9-G4 zählten Fatigue, Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber, Schüttelfrost sowie Infusionsreaktionen, außerdem transiente Anämie, Hämagglutination und Lymphopenie (Sikic et al. 2019). Dahingegen hatten CD47-Antikörper ohne Fc-Effektorfunktion kaum einen Einfluss auf diese Werte der Zellzahlen (Pietsch et al. 2017). CD47-SIRP α -Blockade führt zu Apoptosesignalen, Phagozytose und Ausbildung Tumorspezifischer T-Zell-Antworten. Intakte Zellen ohne weitere Stresssignale jedoch bleiben durch die Phagozytose weitestgehend verschont: CD47-Blockade auf normalen Zellen löst scheinbar keine Phagozytose ohne weitere prophagozytotisch wirkende Signale, wie sie durch Calreticulin, Phosphatidylserin oder Fc γ R-Aktivierung vermittelt werden, aus (Russ et al. 2018; Gardai et al. 2005; Chao et al. 2010b). Dies erklärt die geringe Toxizität nicht-aktivierender CD47-Antikörper. Mit ALX-148 wurde ein Fusionsprotein erstellt, bestehend aus zwei hoch CD47-affinen SIRP α -Varianten verbunden mit einer inaktiven Fc-

Region von humanem IgG, welches allein keine Phagozytose induzierte, aber in Kombination mit Antikörpern synergistische Effekte zeigte und bereits in einer klinischen Phase-I-Studie untersucht wurde (Russ et al. 2018; Weiskopf et al. 2013; Lakhani et al. 2021).

Eine Minimierung der Zytotoxizität auf gesunde Zellen war ausschlaggebendes Argument zur Konzipierung des Fusionsproteins SIRP α -Fc σ , dessen funktionslose Fc-Komponente (IgG2 σ) lediglich zur Stabilisierung des Proteins und zur Verlängerung der Retentionszeit im Blut dienen, um Toxizität auf gesunde CD47-positive Zellen weitestmöglich zu umgehen. Eine Wirkung sollte nur in Kombination mit einem Antikörper, der durch Fc γ R-Aktivierung die Makrophagen zur Phagozytose stimuliert, stattfinden. SIRP α -Fc σ allein zeigte in den Untersuchungen dieser Arbeit keinen Effekt auf die Phagozytose von Tumorzellen durch Makrophagen und erfüllte somit diesen Anspruch. In Proliferations-Assays ergab sich zudem der Hinweis auf eine geringe Toxizität des Fusionsproteins. Dies lässt mutmaßen, dass SIRP α -Fc σ auch *in vivo* keine übermäßige Toxizität aufweisen könnte. Zur besseren Einschätzung der Toxizität von SIRP α -Fc σ müssten zunächst umfassendere Prüfungen an gesunden Zellen, vornehmlich Erythrozyten, durchgeführt werden, insbesondere im Vergleich zu aktivierenden CD47-Antikörpern, wobei Nebenwirkungen nur im Tiermodell und letztlich in umfassenden klinischen Studien zu untersuchen sind.

CD47 wird als anti-phagozytotisch wirkendes Oberflächenprotein ubiquitär auf gesunden Körperzellen exprimiert (Reinhold et al. 1995). Ein Problem bei der CD47-Blockade auf Tumorzellen ist damit der mögliche herabgesetzte pharmakologische Effekt von CD47-bindenden Agenzien. CD47 als Oberflächenrezeptor unterliegt dem Prozess der Endozytose. Die Verbreitung des Rezeptors auf normalen Geweben hat also einen Einfluss auf die Verfügbarkeit des Medikaments, da ein beträchtlicher Teil des Medikaments auf diesen Geweben gebunden und internalisiert und somit die Effektivität gemindert werden kann („antigen sink“) (Awwad & Angkawinitwong 2018; Wang et al. 2012). Von einem potenziellen CD47-bindenden Medikament wären also große Mengen notwendig, um genug CD47 auf Tumorzellen zu blockieren. Eine elegante Lösung die Problematik des „antigen sink“ zu umgehen, ist die Entwicklung von bispezifischen Antikörpern. Das Co-Targeting von CD47 und einem weiteren Tumorspezifischen Oberflächenantigen kann die selektive Bindung an Tumorzellen erleichtern, was zu mehr Phagozytose von Tumorzellen führen kann und möglicherweise auch weniger toxische Nebenwirkungen auf gesunde Gewebe hätte. So testeten Piccione und Kollegen bereits einen gegen CD47 und CD20 gerichteten bispezifischen Antikörper für das Non-Hodgkin-Lymphom mit reduzierter Affinität zu CD47, der eine selektive Bindung an die CD47- und CD20-positiven Zellen zeigte und zu einer Steigerung der Phagozytose von Lymphomzellen führte (Piccione et al. 2015). Ein ähnlicher Ansatz wurde mit einem bispezifischen Antikörperderivat RTX-CD47 verfolgt, bestehend aus einem scFv-Fragment gegen CD20 und einem blockierenden scFv-Fragment gegen CD47. Die resultierende CD20-gerichtete Blockade der CD47-SIRP α -Achse induzierte die Beseitigung von CD20-

und CD47-positiven Zellen durch Phagozytose und zeigte außerdem synergistische Verstärkung der ADCP durch Antikörper wie Daratumumab, Alemtuzumab (CD52) und Obinutuzumab. Auf CD20-negative Zellen hatte das bispezifische Antikörperderivat RTX-CD47 derweil keinen Effekt (van Bommel et al. 2017). Buatois und Kollegen entwickelten einen humanen bispezifischen Antikörper, gerichtet gegen CD19 und niedrig affin gegen CD47: NI-1701 zeigte *in vitro* und *in vivo* hohe Aktivität gegen B-Zell-Tumore durch seine Potenz zur ADCP-Induktion. Im Maus-Model ließ sich ein noch stärkerer Effekt auf die Tumordinhibition bis hin zur Regression durch die Kombination mit Rituximab erzielen. Zudem zeigte sich ein günstiges pharmakokinetisches Profil durch die selektive Bindung an CD47- und CD19-positive Zellen und keine hämatologische Toxizität aufgrund keiner oder sehr schwacher Bindung an Erythrozyten, Thrombozyten oder T-Zellen (Buatois et al. 2018). Derartige bispezifische Therapiekonzepte lassen schlussfolgern, dass die duale Adressierung von CD47 und einem tumorspezifischen Zielantigen in einem bispezifischen Antikörperkonstrukt auch für die zukünftige Myelomtherapie eine vielversprechende Strategie für mögliche neue Therapien darstellt.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit ein Fc-optimierter CD38-Antikörper und ein Proteinkonstrukt zur synergistischen Wirkung mit CD38-Antikörpern erstellt und in *in vitro* Studien charakterisiert und funktionell getestet. Die Anwendung eines etablierten Protein-Engineering erwies auch bei dem klinisch eingesetzten CD38-Antikörper Daratumumab eine weitere Steigerung der ADCC-Aktivität, während seine ADCP-Aktivität davon unbeeinträchtigt bleibt. Ein Fusionsprotein SIRP α -Fc σ wurde generiert, das die auf das Phagozytoseverhalten von Makrophagen inhibitorisch wirkende SIRP α -CD47-Interaktion blockierte und so die durch Daratumumab vermittelte ADCP steigerte. Sowohl der Fc-optimierte CD38-Antikörper Dara-DE als auch das Proteinkonstrukt SIRP α -Fc σ können für einen potenziellen klinischen Einsatz von großem Interesse sein. Die hier erlangten *in vitro* Resultate rechtfertigen ihre weitere Charakterisierung auch in *in vivo* Experimenten. Dabei wäre es auch interessant zu untersuchen, inwieweit die Kombination aus Fc-Engineering und CD47-Blockade sich auf die Tumorelimination auswirkt.

5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, das zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen zählt. Durch antikörperbasierte Immuntherapien wurden in den letzten Jahren große Fortschritte in der Therapie des Multiplen Myeloms erzielt. So stellt der CD38-Antikörper Daratumumab eine erfolgreiche Therapieoption für die Erkrankung dar. Jedoch profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen und das Multiple Myelom gilt nach wie vor als nicht dauerhaft heilbar, sodass weiterer Forschungs- und Entwicklungsbedarf besteht.

Die Rekrutierung von Effektorzellen durch aktivierende Fc γ -Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle in der Krebstherapie mit monoklonalen Antikörpern. Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) sind Effektorzellmechanismen, die nachweislich einen wichtigen Beitrag zur Effektivität von Daratumumab leisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien zur Verstärkung dieser Wirkmechanismen entwickelt, um die CD38-gerichtete Myelomtherapie zu verbessern.

Durch Modifikation der Fc-Domäne (sogenanntes Fc-Engineering) sollte eine optimierte Fc-Rezeptorbindung und somit eine erhöhte ADCC-Aktivität von Daratumumab erreicht werden. Hierfür wurde eine Protein-optimierte Variante Dara-DE mit der zweifachen Aminosäuresubstitution DE (S239D/I332E) generiert. Zur Steigerung der ADCP-Aktivität wurde der Antikörper mit einem immunmodulatorischen Fusionsprotein kombiniert, welches die Phagozytose-hemmende Interaktion zwischen dem *signal regulatory protein* (SIRP) α auf Makrophagen und seinem Liganden CD47 blockiert. CD47 fungiert als sogenanntes ‚Don’t eat me‘-Signal und wird stark auf Tumorzellen exprimiert. Für das Fusionsprotein SIRP α -Fc σ wurde die V2-Form von SIRP α mit der modifizierten, von Immuneffektorfunktionen eliminierten Fc-Domäne IgG2 σ kombiniert.

Der Fc-optimierte Dara-DE und das Fusionsprotein SIRP α -Fc σ wurden mit rekombinanter DNA-Technik generiert. Die Antikörper und Fusionsproteine wurden in eukaryoten Zellen exprimiert, gereinigt, charakterisiert und hinsichtlich ihrer *in vitro* Zytotoxizität analysiert. Die Bindungseigenschaften wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die ADCC durch humane NK-Zellen wurde in ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuchen untersucht. Die ADCP durch humane Makrophagen wurde mittels Durchflusszytometrie und *Live Cell Imaging* analysiert.

Dara-DE zeigte eine spezifische CD38-Bindung. Dara-DE erwies im Vergleich zu Daratumumab eine signifikant gesteigerte ADCC-Aktivität gegenüber zwei Myelomzelllinien und einer Lymphomzelllinie. Dies zeigte sich sowohl in einer niedrigeren mittleren effektiven Konzentration EC₅₀ als auch in einer höheren maximalen Zielzelllyse. Einzelne autologe Experimente mit Patientenmyelomzellen gaben ebenfalls Hinweise auf eine gesteigerte ADCC. Das Potential zur ADCP-Induktion entsprach dem von Daratumumab.

SIRP α -Fc γ zeigte in Kombination mit Daratumumab eine signifikant gesteigerte ADCP maligner Myelomzellen durch Makrophagen im *Live Cell Imaging* und eine gering gesteigerte ADCP in der Durchflusszytometrie. Autologe Phagozytose-Experimente mit Patientenzellen deuteten ebenfalls auf eine Steigerung der Daratumumab-vermittelten Phagozytose durch SIRP α -Fc γ hin. SIRP α -Fc γ allein zeigte keine zytotoxische Wirkung.

Strategien zur Verstärkung der effektorzellvermittelten Tumorzelleliminierung stellen einen attraktiven Ansatz zur Optimierung der CD38-gerichteten Immuntherapie dar. Die erzielten Ergebnisse zur Steigerung der ADCC mittels Fc-Engineerings und zur Steigerung der ADCP mittels CD47-Blockade zeigen neue Möglichkeiten zur Ergänzung und damit weiteren Verbesserung der Antikörpertherapie zur Behandlung des Multiplen Myeloms auf.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, S., van der Laan, L.J., Vernon-Wilson, E., Renardel de Lavalette, C., Döpp, E.A., Dijkstra, C.D., Simmons, D.L., van den Berg, T.K. (1998): Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. *J Immunol* 161, 1853–1859.
- Advani, R., Flinn, I., Popplewell, L., Forero, A., Bartlett, N.L., Ghosh, N., Kline, J., Roschewski, M., LaCasce, A., Collins, G.P., Tran, T., Lynn, J., Chen, J.Y., Volkmer, J.-P., Agoram, B., Huang, J., Majeti, R., Weissman, I.L., Takimoto, C.H., Chao, M.P., Smith, S.M. (2018): CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 379, 1711–1721.
- Albanell, J., Baselga, J. (1999): Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs Today* 35, 931–946.
- Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., Baeten, D.L.P. (2012): Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 375, 196–206.
- Awwad, S., Angkawinitwong, U. (2018): Overview of antibody drug delivery. *Pharmaceutics* 10, 83.
- Barclay, A.N., van den Berg, T.K. (2014): The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47. Structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol* 32, 25–50.
- Baum, W., Steininger, H., Bair, H.-J., Becker, W., Hansen-Hagge, T.E., Kressel, M., Kremmer, E., Kalden, J.R., Gramatzki, M. (1996): Therapy with CD7 monoclonal antibody TH-69 is highly effective for xenografted human T-cell ALL. *Br J Haematol* 95, 327–338.
- Becker, S., Warren, M.K., Haskill, S. (1987): Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol.* 139, 3703–3709.
- Bournazos, S., DiLillo, D.J. & Ravetch, J.V. (2014): Humanized mice to study Fc γ R function. *Curr Top Microbiol Immunol* 382, 237–48.
- Bournazos, S., Wang, T.T., Dahan, R., Maamary, J., Ravetch, J.V. (2017): Signaling by Antibodies. *Recent Progress. Annu Rev Immunol* 35, 285–311.
- Bride, K.L., Vincent, T.L., Im, S.-Y., Aplenc, R., Barrett, D.M., Carroll, W.L., Carson, R., Dai, Y., Devidas, M., Dunsmore, K.P., Fuller, T., Glisovic-Aplenc, T., Horton, T.M., Hunger, S.P., Loh, M.L., Maude, S.L., Raetz, E.A., Winter, S.S., Grupp, S.A., Hermiston, M.L., Wood, B.L., Teachey, D.T. (2018): Preclinical efficacy of daratumumab in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 131, 995–999.
- Buatois, V., Johnson, Z., Salgado-Pires, S., Papaioannou, A., Hatterer, E., Chauchet, X., Richard, F., Barba, L., Daubeuf, B., Cons, L., Broyer, L., D'Asaro, M., Matthes, T., LeGallou, S., Fest, T., Tarte, K., Clarke Hinojosa, R.K., Genescà Ferrer, E., Ribera, J.M., Dey, A., Bailey, K., Fielding, A.K., Eissenberg, L., Ritchey, J., Rettig, M., DiPersio, J.F., Kosco-Vilbois, M.H., Masternak, K., Fischer, N., Shang, L., Ferlin, W.G. (2018): Preclinical development of a bispecific antibody that safely and effectively

- targets CD19 and CD47 for the treatment of B-cell lymphoma and leukemia. *Mol Cancer Ther* 17, 1739–1751.
- Carter, P.J., Lazar, G.A. (2018): Next generation antibody drugs. Pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat Rev Drug Discov* 17, 197–223.
- Cartron, G., Watier, H., Golay, J., Solal-Celigny, P. (2004): From the bench to the bedside. Ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104, 2635–2642.
- Cazaubiel, T., Mulas, O., Montes, L., Schavgoulidze, A., Avet-Loiseau, H., Corre, J., Perrot, A. (2020): Risk and response-adapted treatment in multiple myeloma. *Cancers* 12, 3497.
- Chalopin, T., Vallet, N., Theisen, O., Ochmann, M., Tiab, M., Godmer, P., Barin, C., Héroult, O., Gyan, E., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Benboubker, L., Moreau, P., Touzeau, C. (2021): No survival improvement in patients with high-risk multiple myeloma harbouring del(17p) and/or t(4;14) over the two past decades. *Br J Haematol* 194, 635–638.
- Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Jan, M., Weissman-Tsukamoto, R., Zhao, F., Park, C.Y., Weissman, I.L., Majeti, R. (2011): Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 71, 1374–1384.
- Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Myklebust, J.H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A.C., Chan, C.K., Tan, B.T., Park, C.Y., Zhao, F., Kohrt, H.E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R.D., Lossos, I.S., Levy, R., Weissman, I.L., Majeti, R. (2010a): Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142, 699–713.
- Chao, M.P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A.A., Gentles, A.J., Volkmer, J., Weiskopf, K., Willingham, S.B., Raveh, T., Park, C.Y., Majeti, R., Weissman, I.L. (2010b): Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2, 5821.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G. (1991): Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624–628.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443–446.
- Cohen-Solal, J.F.G., Cassard, L., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C. (2004): Fc gamma receptors. *Immunol Lett* 92, 199–205.
- Cole, S., Walsh, A., Yin, X., Wechalekar, M.D., Smith, M.D., Proudman, S.M., Veale, D.J., Fearon, U., Pitzalis, C., Humby, F., Bombardieri, M., Axel, A., Adams, H., Chiu, C., Sharp, M., Alvarez, J., Anderson, I., Madakamutil, L., Nagpal, S., Guo, Y. (2018): Integrative analysis reveals CD38 as a therapeutic target for plasma cell-rich pre-disease and established rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 20, 85.

- Collins, D.M., O'Donovan, N., McGowan, P.M., O'Sullivan, F., Duffy, M.J., Crown, J. (2012): Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol* 23, 1788–1795.
- Cooper, M.D. (2015): The early history of B cells. *Nat Rev Immunol* 15, 191–197.
- Corre, J., Perrot, A., Caillot, D., Belhadj, K., Hulin, C., LeLeu, X., Mohty, M., Facon, T., Buisson, L., Do Souto, L., Lannes, R., Dufrechou, S., Prade, N., Orsini-Piocelle, F., Voillat, L., Jaccard, A., Karlin, L., Macro, M., Brechignac, S., Dib, M., Sanhes, L., Fontan, J., Clement-Filliatre, L., Marolleau, J.-P., Minvielle, S., Moreau, P., Avet-Loiseau, H. (2021): Del(17p) without TP53 mutation confers a poor prognosis in intensively treated newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Blood* 137, 1192–1195.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., Thibault, G. (2004): Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells. *Cancer Res* 64, 4664–4669.
- Daver, N., Senapati, J., Maiti, A., Loghavi, S., Kadia, T.M., DiNardo, C.D., Pemmaraju, N., Jabbour, E., Montalban-Bravo, G., Tang, G., Sasaki, K., Borthakur, G., Yilmaz, M., Alvarez, J., Pierce, S.A., Nogueras González, G.M., Ning, J., Issa, G.C., Andreeff, M., Abbas, H.A., Ravandi, F., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H. (2022): Phase I/II study of azacitidine (AZA) with venetoclax (VEN) and magrolimab (Magro) in patients (pts) with newly diagnosed (ND) older/unfit or high-risk acute myeloid leukemia (AML) and relapsed/refractory (R/R) AML. *Blood* 140, 141–144.
- Deaglio, S., Mehta, K., Malavasi, F. (2001): Human CD38. A (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk res* 25, 1–12.
- Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C.M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., Malavasi, F. (1998): Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* 160, 395–402.
- Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K.P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz, E., Guggenheim, R. (1978): Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro. A comparative study. *Blut* 36, 331–338.
- Dimopoulos, M.A., Dytfeld, D., Grosicki, S., Moreau, P., Takezako, N., Hori, M., LeLeu, X., LeBlanc, R., Suzuki, K., Raab, M.S., Richardson, P.G., Popa McKiver, M., Jou, Y.-M., Shelat, S.G., Robbins, M., Rafferty, B., San-Miguel, J. (2018): Elotuzumab plus pomalidomide and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med* 379, 1811–1822.
- Dimopoulos, M.A., Jakubowiak, A.J., McCarthy, P.L., Orlowski, R.Z., Attal, M., Bladé, J., Goldschmidt, H., Weisel, K.C., Ramasamy, K., Zweegman, S., Spencer, A., Huang, J.S.Y., Lu, J., Sunami, K., Iida, S., Chng, W.-J., Holstein, S.A., Rocci, A., Skacel, T., Labotka, R., Palumbo, A., Anderson, K.C. (2020): Developments in continuous therapy and maintenance treatment approaches for patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 10, 197.

- Dimopoulos, M.A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N.J., Usmani, S.Z., Rabin, N., Orłowski, R.Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., Plesner, T., Yoon, S.-S., Ben Yehuda, D., Richardson, P.G., Goldschmidt, H., Reece, D., Lisby, S., Khokhar, N.Z., O'Rourke, L., Chiu, C., Qin, X., Guckert, M., Ahmadi, T., Moreau, P. (2016): Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med* 375, 1319–1331.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., Calos, M.P. (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379–387.
- Dunkelberger, J.R., Song, W.-C. (2010): Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20, 34–50.
- Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Gall, W.E., Gottlieb, P.D., Rutishauser, U., Waxdal, M.J. (1969): The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 78–85.
- Elgundi, Z., Reslan, M., Cruz, E., Sifniotis, V., Kayser, V. (2017): The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 122, 2–19.
- Ernst, L.K., Metes, D., Herberman, R.B., Morel, P.A. (2002): Allelic polymorphisms in the FcγRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med* 80, 248–257.
- Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen (2019a): Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS). Leitlinie. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen.
- Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen (2019b): Multiples Myelom. Leitlinie. ICD10: C90.0 Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen.
- Fachinformation DARZALEX® (2023): Janssen DARZALEX® 1 800 mg Injektionslösung, Fachinfoservice Frankfurt. Verfügbar unter:
<https://static.janssen-emea.com/sites/default/files/Germany/SMPC/DE-PL-0063.pdf>
- Fan, G., Wang, Z., Hao, M., Li, J. (2015): Bispecific antibodies and their applications. *J Hematol Oncol* 8, 9.
- Fujioka, Y., Matozaki, T., Noguchi, T., Iwamatsu, A., Yamao, T., Takahashi, N., Tsuda, M., Takada, T., Kasuga, M. (1996): A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol* 16, 6887–6899.
- Funaro, A., Ferrero, E., Mehta, K., Malavasi, F. (2000): Schematic portrait of human CD38 and related molecules. *Chem Immunol* 75, 256–273.
- Gahrton, G., Iacobelli, S., Garderet, L., Yakoub-Agha, I., Schönland, S. (2020): Allogeneic transplantation in multiple myeloma - does it still have a place? *J Clin Med* 9, 2180.

- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasca, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., Henson, P.M. (2005): Cell-Surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321–334.
- Gemeinsamer Bundesausschuss (2017): Abschlussbericht Stammzelltransplantation bei Multiplem Myelom. URL: <https://www.g-ba.de/beschluesse/2840/>.
- Golay, J., Introna, M. (2012): Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies. Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Arch Biochemistry Biophysics* 526, 146–153.
- Goldsmith, S.R., Foley, N., Schroeder, M.A. (2021): Daratumumab for the treatment of multiple myeloma. *Drugs Today* 57, 591.
- Goulet, D.R., Atkins, W.M. (2020): Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *J Pharm Sci* 109, 74–103.
- Greig, S.L. (2016): Obiltoximab. First global approval. *Drugs* 76, 823–830.
- Gül, N., Babes, L., Siegmund, K., Korthouwer, R., Bögels, M., Braster, R., Vidarsson, G., Hagen, T.L.M., ten, Kubes, P., van Egmond, M. (2014): Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J Clin Invest* 124, 812–823.
- Gül, N., van Egmond, M. (2015): Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages. A potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res* 75, 5008–5013.
- Gulla, A., Anderson, K.C. (2020): Multiple myeloma. The (r)evolution of current therapy and a glance into future. *Haematologica* 105, 2358–2367.
- Haij, S. de, Jansen, J.H.M., Boross, P., Beurskens, F.J., Bakema, J.E., Bos, D.L., Martens, A., Verbeek, J.S., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., Leusen, J.H.W. (2010): In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res* 70, 3209–3217.
- Ham, R.G. (1965): Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53, 288–293.
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., George, A.J. (2010): The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9, 325–38
- Heliopoulos, I., Patousi, A. (2018): Therapeutic monoclonal antibodies and multiple sclerosis. The Essentials. *Med Chem* 14, 144–154.
- Herold, G. (2018): Innere Medizin 2019. Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Dr. med. Gerd Herold, Köln.
- Horton, H.M., Bennett, M.J., Pong, E., Peipp, M., Karki, S., Chu, S.Y., Richards, J.O., Vostiar, I., Joyce, P.F., Repp, R., Desjarlais, J.R., Zhukovsky, E.A. (2008): Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-

- engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res* 68, 8049–8057.
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M., Walseth, T.F., Lee, H.C. (1993): Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262, 1056–1059.
- Im, A., Pavletic, S.Z. (2017): Immunotherapy in hematologic malignancies. Past, present, and future. *J Hematol Oncol* 10, 94.
- Jacob, S.T., Crozier, I., Fischer, W.A., Hewlett, A., Kraft, C.S., La Vega, M.-A.d., Soka, M.J., Wahl, V., Griffiths, A., Bollinger, L., Kuhn, J.H. (2020): Ebola virus disease. *Nat Rev Dis Primers* 6, 13.
- Jafari, R., Zolbanin, N.M., Rafatpanah, H., Majidi, J., Kazemi, T. (2017): Fc-fusion proteins in therapy. An updated view. *Curr Med Chem* 24, 1228–1237.
- Jaiswal, S., Jamieson, C.H.M., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., Weissman, I.L. (2009): CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138, 271–285.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G. (1986): Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522–525.
- Jurczak, W., Zinzani, P.L., Gaidano, G., Goy, A., Provencio, M., Nagy, Z., Robak, T., Maddocks, K., Buske, C., Ambarkhane, S., Winderlich, M., Dirnberger-Hertweck, M., Korolkiewicz, R., Blum, K.A. (2018): Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 29, 1266–1272.
- Kao, F.T., Puck, T.T. (1968): Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 1275–1281.
- Kaplon, H., Crescioli, S., Chenoweth, A., Visweswaraiyah, J., Reichert, J.M. (2023): Antibodies to watch in 2023. *MAbs* 15, 5526.
- Kazandjian, D. (2016): Multiple myeloma epidemiology and survival. A unique malignancy. *Semin Oncol* 43, 676–681.
- Kellner, C., Derer, S., Valerius, T., Peipp, M. (2014): Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods* 65, 105–113.
- Kellner, C., Otte, A., Cappuzzello, E., Klausz, K., Peipp, M. (2017): Modulating cytotoxic effector functions by Fc engineering to improve cancer therapy. *Transfus Med Hemother* 44, 327–336.
- Kellner, C., Peipp, M., Gramatzki, M., Schrappe, M., Schewe, D.M. (2018): Perspectives of Fc engineered antibodies in CD19 targeting immunotherapies in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncolimmunology* 7, e1448331.
- Kellner, C., Zhukovsky, E.A., Pötzke, A., Brüggemann, M., Schrauder, A., Schrappe, M., Kneba, M., Repp, R., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M. (2013): The Fc-engineered CD19 antibody MOR208

- (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients. *Leukemia* 27, 1595–1598.
- Kelton, W., Mehta, N., Charab, W., Lee, J., Lee, C.-h., Kojima, T., Kang, T.H., Georgiou, G. (2014): IgGA. A “cross-isotype” engineered human Fc antibody domain that displays both IgG-like and IgA-like effector functions. *Chem Biol* 21, 1603–1609.
- Kikuchi, Y., Uno, S., Kinoshita, Y., Yoshimura, Y., Iida, S.-I., Wakahara, Y., Tsuchiya, M., Yamada-Okabe, H., Fukushima, N. (2005): Apoptosis inducing bivalent single-chain antibody fragments against CD47 showed antitumor potency for multiple myeloma. *Leuk Res* 29, 445–450.
- Kim, D., Wang, J., Willingham, S.B., Martin, R., Wernig, G., Weissman, I.L. (2012): Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* 26, 2538–2545.
- Koerner, S.P., André, M.C., Leibold, J.S., Kousis, P.C., Kübler, A., Pal, M., Haen, S.P., Bühring, H.-J., Grosse-Hovest, L., Jung, G., Salih, H.R. (2017): An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 459–469.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.
- Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe (2021): Kapitel: Multiples Myelom. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin.
- Krejci, J., Casneuf, T., Nijhof, I.S., Verbist, B., Bald, J., Plesner, T., Syed, K., Liu, K., van de Donk, N.W.C.J., Weiss, B.M., Ahmadi, T., Lokhorst, H.M., Mutis, T., Sasser, A.K. (2016): Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* 128, 384–394.
- Kuriyama, T., Takenaka, K., Kohno, K., Yamauchi, T., Daitoku, S., Yoshimoto, G., Kikushige, Y., Kishimoto, J., Abe, Y., Harada, N., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Teshima, T., Akashi, K. (2012): Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120, 4058–4067.
- Lakhani, N.J., Chow, L.Q.M., Gainor, J.F., LoRusso, P., Lee, K.-W., Chung, H.C., Lee, J., Bang, Y.-J., Hodi, F.S., Kim, W.S., Santana-Davila, R., Fanning, P., Squifflet, P., Jin, F., Kuo, T.C., Wan, H.I., Pons, J., Randolph, S.S., Messersmith, W.A. (2021): Evorpaccept alone and in combination with pembrolizumab or trastuzumab in patients with advanced solid tumours (ASPEN-01). A first-in-human, open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol* 22, 1740–1751.
- Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., Vielmetter, J., Carmichael, D.F., Hayes, R.J., Dahiyat, B.I. (2006): Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4005–4010.

- Li, T., DiLillo, D.J., Bournazos, S., Giddens, J.P., Ravetch, J.V., Wang, L.-X. (2017): Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 3485–3490.
- Lin, G.H.Y., Chai, V., Lee, V., Dodge, K., Truong, T., Wong, M., Johnson, L.D., Linderoth, E., Pang, X., Winston, J., Petrova, P.S., Uger, R.A., Viller, N.N., Roberts, D.D. (2017): TTI-621 (SIRP α Fc), a CD47-blocking cancer immunotherapeutic, triggers phagocytosis of lymphoma cells by multiple polarized macrophage subsets. *PLoS One* 12, e0187262.
- Lin, P., Owens, R., Tricot, G., Wilson, C.S. (2004): Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 121, 482–488.
- Liu, J., Wang, L., Zhao, F., Tseng, S., Narayanan, C., Shura, L., Willingham, S., Howard, M., Prohaska, S., Volkmer, J., Chao, M., Weissman, I.L., Majeti, R., Bunting, K.D. (2015a): Pre-clinical development of a humanized anti-CD47 antibody with anti-Cancer therapeutic potential. *PLoS One* 10, e0137345.
- Liu, R., Oldham, R., Teal, E., Beers, S., Cragg, M. (2020): Fc-engineering for modulated effector functions — improving antibodies for cancer treatment. *Antibodies* 9, 64.
- Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W.A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y.-X., Xu, M.M. (2015b): CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med* 21, 1209–1215.
- Liu, Y., Tong, Q., Zhou, Y., Lee, H.-W., Yang, J.J., Bühring, H.-J., Chen, Y.-T., Ha, B., Chen, C.X.-J., Yang, Y., Zen, K. (2007): Functional elements on SIRP α IgV domain mediate cell surface binding to CD47. *J Mol Biol* 365, 680–693.
- Lokhorst, H.M., Plesner, T., Laubach, J.P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M.C., Lassen, U., Krejcik, J., Palumbo, A., van de Donk, N.W.C.J., Ahmadi, T., Khan, I., Uhlar, C.M., Wang, J., Sasser, A.K., Losic, N., Lisby, S., Basse, L., Brun, N., Richardson, P.G. (2015): Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 373, 1207–1219.
- Lonberg, N. (2005): Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117–1125.
- Lonial, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., White, D., Grosicki, S., Spicka, I., Walter-Croneck, A., Moreau, P., Mateos, M.-V., Magen, H., Belch, A., Reece, D., Beksac, M., Spencer, A., Oakervee, H., Orlowski, R.Z., Taniwaki, M., Röllig, C., Einsele, H., Wu, K.L., Singhal, A., San-Miguel, J., Matsumoto, M., Katz, J., Bleickardt, E., Poulart, V., Anderson, K.C., Richardson, P. (2015): Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 373, 621–631.
- Lonial, S., Weiss, B.M., Usmani, S.Z., Singhal, S., Chari, A., Bahlis, N.J., Belch, A., Krishnan, A., Vescio, R.A., Mateos, M.V., Mazumder, A., Orlowski, R.Z., Sutherland, H.J., Bladé, J., Scott, E.C., Oriol, A., Berdeja, J., Gharibo, M., Stevens, D.A., LeBlanc, R., Sebag, M., Callander, N., Jakubowiak, A., White, D., La Rubia, J. de, Richardson, P.G., Lisby, S., Feng, H., Uhlar, C.M., Khan, I., Ahmadi, T., Voorhees, P.M. (2016): Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS). An open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 387, 1551–1560.

- Lux, A., Nimmerjahn, F. (2013): Of mice and men. The need for humanized mouse models to study human IgG activity in vivo. *J Clin Immunol* 33, 4–8.
- Lux, A., Seeling, M., Baerenwaldt, A., Lehmann, B., Schwab, I., Repp, R., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Hartmann, A., Heidkamp, G., Dudziak, D., Nimmerjahn, F. (2014): A humanized mouse identifies the bone marrow as a niche with low therapeutic IgG activity. *Cell Reports* 7, 236–248.
- Majeti, R., Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Pang, W.W., Jaiswal, S., Gibbs, K.D., van Rooijen, N., Weissman, I.L. (2009): CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138, 286–299.
- Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., Mehta, K. (1994): Human CD38. A glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 15, 95–97.
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C., Plumas, J. (2003): In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949–954.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002): Macrophage polarization. Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549–555.
- Martin, T.G., Corzo, K., Chiron, M., van de Velde, H., Abbadessa, G., Campana, F., Solanki, M., Meng, R., Lee, H., Wiederschain, D., Zhu, C., Rak, A., Anderson, K.C. (2019): Therapeutic opportunities with pharmacological inhibition of CD38 with isatuximab. *Cells* 8, 1522.
- Martinez, F.O. (2008): Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453.
- Masuda, K., Kubota, T., Kaneko, E., Iida, S., Wakitani, M., Kobayashi-Natsume, Y., Kubota, A., Shitara, K., Nakamura, K. (2007): Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol* 44, 3122–3131.
- Mata-Molanes, J.J., Rebollo-Liceaga, J., Martínez-Navarro, E.M., Manzano, R.G., Brugarolas, A., Juan, M., Sureda, M. (2022): Relevance of Fc gamma receptor polymorphisms in cancer therapy with monoclonal antibodies. *Front Oncol* 12, 8.
- Matas-Céspedes, A., Vidal-Crespo, A., Rodriguez, V., Villamor, N., Delgado, J., Giné, E., Roca-Ho, H., Menéndez, P., Campo, E., López-Guillermo, A., Colomer, D., Roué, G., Wiestner, A., Parren, P.W.H.I., Doshi, P., van Bueren, J.L., Pérez-Galán, P. (2017): The human CD38 monoclonal antibody daratumumab shows antitumor activity and hampers leukemia-microenvironment interactions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 23, 1493–1505.
- Mateos, M.-V., Dimopoulos, M.A., Cavo, M., Suzuki, K., Jakubowiak, A., Knop, S., Doyen, C., Lucio, P., Nagy, Z., Kaplan, P., Pour, L., Cook, M., Grosicki, S., Crepaldi, A., Liberati, A.M., Campbell, P., Shelekhova, T., Yoon, S.-S., Iosava, G., Fujisaki, T., Garg, M., Chiu, C., Wang, J., Carson, R., Crist, W.,

- Deraedt, W., Nguyen, H., Qi, M., San-Miguel, J. (2018): Daratumumab plus bortezomib, melphalan, and prednisone for untreated myeloma. *N Engl J Med* 378, 518–528.
- Matlung, H.L., Babes, L., Zhao, X.W., van Houdt, M., Treffers, L.W., van Rees, D.J., Franke, K., Schornagel, K., Verkuijlen, P., Janssen, H., Halonen, P., Lieftink, C., Beijersbergen, R.L., Leusen, J.H.W., Boelens, J.J., Kuhnle, I., van der Werff Ten Bosch, J., Seeger, K., Rutella, S., Pagliara, D., Matozaki, T., Suzuki, E., van Menke-van der Houven Oordt, C.W., van Bruggen, R., Roos, D., van Lier, R.A.W., Kuijpers, T.W., Kubes, P., van den Berg, T.K. (2018): Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep* 23, 3946-3959.e6.
- Matlung, H.L., Szilagyi, K., Barclay, N.A., van den Berg, T.K. (2017): The CD47-SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol Rev* 276, 145–164.
- Matsuoka, Y., Moore, G.E., Yagi, Y., Pressman, D. (1967): Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc Soc Exp Biol Med* 125, 1246–1250.
- Maus, M.V., Grupp, S.A., Porter, D.L., June, C.H. (2014): Antibody-modified T cells. CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 123, 2625–2635.
- McGregor, M.C., Krings, J.G., Nair, P., Castro, M. (2019): Role of biologics in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 199, 433–445.
- Meeker, T.C., Lowder, J., Maloney, D.G., Miller, R.A., Thielemans, K., Warnke, R., Levy, R. (1985): A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood* 65, 1349–1363.
- Mellor, J.D., Brown, M.P., Irving, H.R., Zalcborg, J.R., Dobrovic, A. (2013): A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J Hematol Oncol* 6, 2639.
- Moore, G.L., Chen, H., Karki, S., Lazar, G.A. (2014): Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs* 2, 181–189.
- Moreau, P., Wit, E. de (2017): Recent progress in relapsed multiple myeloma therapy: implications for treatment decisions. *Br J Haematol* 179, 198–2018.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., Oi, V.T. (1984): Chimeric human antibody molecules. Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6851–6855.
- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijtenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jäger, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schüll, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., Dabbagh, K., Dyer, M.J.S., Poppema, S., Klein, C., Umaña, P. (2010): Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115, 4393–4402.

- Munn, D.H., Cheung, N.K. (1990): Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 172, 231–237.
- Munn, D.H., McBride, M., Cheung, N.K. (1991): Role of low-affinity Fc receptors in antibody-dependent tumor cell phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Cancer Res* 51, 1117–1123.
- Murphy, K., Weaver, C. (2018): *Janeway Immunologie*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T.M., Ardizzoni, A. (2008): Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/ neu – positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26, 1789–1796.
- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., Niwa, R. (2008): Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res* 68, 3863–3872.
- Nijhof, I.S., Groen, R.W.J., Lokhorst, H.M., van Kessel, B., Bloem, A.C., van Velzen, J., Jong-Korlaar, R. de, Yuan, H., Noort, W.A., Klein, S.K., Martens, A.C.M., Doshi, P., Sasser, K., Mutis, T., van de Donk, N.W.C.J. (2015): Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia* 29, 2039–2049.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V. (2005): Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310, 1510–1512.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V. (2008): Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34–47.
- Nishida, H., Yamada, T. (2019): Monoclonal antibody therapies in multiple myeloma. A challenge to develop novel targets. *J Oncol* 2019, 1–10.
- Oldenburg, P.-A. (2000): Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051–2054.
- Overdijk, M.B., Jansen, J.H.M., Nederend, M., van Lammerts Bueren, J.J., Groen, R.W.J., Parren, P.W.H.I., Leusen, J.H.W., Boross, P. (2016): The therapeutic CD38 monoclonal antibody daratumumab induces programmed cell death via Fcγ receptor-mediated cross-linking. *J Immunol* 197, 807–813.
- Overdijk, M.B., Verploegen, S., Bögels, M., van Egmond, M., van Lammerts Bueren, J.J., Mutis, T., Groen, R.W.J., Breij, E., Martens, A.C.M., Bleeker, W.K., Parren, P.W.H.I. (2015): Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs* 7, 311–321.
- Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A.K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M.V., Mark, T.M., Qi, M., Schecter, J., Amin, H., Qin, X., Deraedt, W., Ahmadi, T., Spencer, A., Sonneveld, P. (2016): Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma. *MMY3004. N Engl J Med* 375, 754–766.

- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., Baltimore, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392–8396.
- Petrova, P.S., Viller, N.N., Wong, M., Pang, X., Lin, G.H.Y., Dodge, K., Chai, V., Chen, H., Lee, V., House, V., Vigo, N.T., Jin, D., Mutukura, T., Charbonneau, M., Truong, T., Viau, S., Johnson, L.D., Linderoth, E., Sievers, E.L., Maleki Vareki, S., Figueredo, R., Pampillo, M., Koropatnick, J., Trudel, S., Mbong, N., Jin, L., Wang, J.C.Y., Uger, R.A. (2017): TTI-621 (SIRP α Fc). A CD47-blocking innate immune checkpoint inhibitor with broad antitumor activity and minimal erythrocyte binding. *Clin Cancer Res* 23, 1068–1079.
- Piccione, E.C., Juarez, S., Liu, J., Tseng, S., Ryan, C.E., Narayanan, C., Wang, L., Weiskopf, K., Majeti, R. (2015): A bispecific antibody targeting CD47 and CD20 selectively binds and eliminates dual antigen expressing lymphoma cells. *MAbs* 7, 946–956.
- Pietsch, E.C., Dong, J., Cardoso, R., Zhang, X., Chin, D., Hawkins, R., Dinh, T., Zhou, M., Strake, B., Feng, P.-H., Rocca, M., Santos, C.D., Shan, X., Danet-Desnoyers, G., Shi, F., Kaiser, E., Millar, H.J., Fenton, S., Swanson, R., Nemeth, J.A., Attar, R.M. (2017): Anti-leukemic activity and tolerability of anti-human CD47 monoclonal antibodies. *Blood Cancer J* 7, e536.
- Ponziani, S., Di Vittorio, G., Pitari, G., Cimini, A.M., Ardini, M., Gentile, R., Iacobelli, S., Sala, G., Capone, E., Flavell, D.J., Ippoliti, R., Giansanti, F. (2020): Antibody-drug conjugates. *The New Frontier of Chemotherapy. Int J Mol Sci* 21, 5510.
- Presta, L.G. (2008): Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 20, 460–470.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J., Robinson, A. (1958): Genetics of somatic mammalian cells. *J Exp Med* 108, 945–956.
- Pulvertaft, R.J.V. (1964): Cytology of Burkitt's tumor (african lymphoma). *Lancet* 283, 238–240.
- Raab, M.S., Engelhardt, M., Blank, A., Goldschmidt, H., Agis, H., Blau, I.W., Einsele, H., Ferstl, B., Schub, N., Röllig, C., Weisel, K., Winderlich, M., Griese, J., Härtle, S., Weirather, J., Jarutat, T., Peschel, C., Chatterjee, M. (2020): MOR202, a novel anti-CD38 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. A first-in-human, multicentre, phase 1–2a trial. *Lancet Haematol* 7, e381-e394.
- Raab, S., Steinbacher, J., Schmiedel, B.J., Kousis, P.C., Steinle, A., Jung, G., Grosse-Hovest, L., Salih, H.R. (2014): Fc-optimized NKG2D–Fc constructs induce NK cell antibody-dependent cellular cytotoxicity against breast cancer cells independently of HER2/neu expression status. *J Immunol* 193, 4261–4272.
- Rajkumar, S.V. (2018): Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 93, 981–1114.

- Rajkumar, S.V. (2020): Multiple myeloma. 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 95, 548–567.
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson, S.Y., Caers, J., Usmani, S.Z., Lahuerta, J.J., Johnsen, H.E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt, H., Terpos, E., Kyle, R.A., Anderson, K.C., Durie, B.G.M., Miguel, J.F.S. (2014): International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15, e538-e548.
- Rasche, L., Hudecek, M., Einsele, H. (2020): What is the future of immunotherapy in multiple myeloma? *Blood* 136, 2491–2497.
- Redman, J.M., Hill, E.M., AlDeghaither, D., Weiner, L.M. (2015): Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol* 67, 28–45.
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H., Schlossman, S.F. (1980): Discrete stages of human intrathymic differentiation. Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1588–1592.
- Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., Brown, E.J. (1995): In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108, 3419–3425.
- Repp, R., Kellner, C., Muskulus, A., Staudinger, M., Mohseni Nodehi, S., Glorius, P., Akramiene, D., Dechant, M., Fey, G.H., van Berkel, P.H.C., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I., Valerius, T., Gramatzki, M., Peipp, M. (2011): Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *J Immunol Methods* 373, 67–78.
- Ribatti, D., Moschetta, M., Vacca, A. (2014): Macrophages in multiple myeloma. *Immunol Lett* 161, 241–244.
- Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., Desjarlais, J.R. (2008): Optimization of antibody binding to FcγRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 7, 2517–2527.
- Riegg, F., Lutz, M.S., Schmied, B.J., Heitmann, J.S., Queudeville, M., Lang, P., Jung, G., Salih, H.R., Märklin, M. (2021): An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against B cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancers* 13, 1632.
- Ring, N.G., Herndler-Brandstetter, D., Weiskopf, K., Shan, L., Volkmer, J.-P., George, B.M., Lietzenmayer, M., McKenna, K.M., Naik, T.J., McCarty, A., Zheng, Y., Ring, A.M., Flavell, R.A., Weissman, I.L. (2017): Anti-SIRPα antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E10578–E10585.

- Rio, D.C., Clark, S.G., Tjian, R. (1985): A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science* 227, 23–28.
- Rosenson, R.S., Hegele, R.A., Fazio, S., Cannon, C.P. (2018): The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 72, 314–329.
- Roßkopf, S., Eichholz, K.M., Winterberg, D., Diemer, K.J., Lutz, S., Münnich, I.A., Klausz, K., Rösner, T., Valerius, T., Schewe, D.M., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M., Kellner, C. (2020): Enhancing CDC and ADCC of CD19 antibodies by combining Fc protein-engineering with Fc glyco-engineering. *Antibodies* 9, 63.
- Russ, A., Hua, A.B., Montfort, W.R., Rahman, B., Riaz, I.B., Khalid, M.U., Carew, J.S., Nawrocki, S.T., Persky, D., Anwer, F. (2018): Blocking “don't eat me” signal of CD47-SIRP α in hematological malignancies, an in-depth review. *Blood Rev* 32, 480–489.
- Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., Wenger, M., Maloney, D.G. (2017): Rituximab in B-cell hematologic malignancies. A review of 20 years of clinical experience. *Adv Ther* 34, 2232–2273.
- Salles, G., Duell, J., González Barca, E., Tournilhac, O., Jurczak, W., Liberati, A.M., Nagy, Z., Obr, A., Gaidano, G., André, M., Kalakonda, N., Dreyling, M., Weirather, J., Dirnberger-Hertweck, M., Ambarkhane, S., Fingerle-Rowson, G., Maddocks, K. (2020): Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND). A multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 21, 978–988.
- Salles, G., Gopal, A.K., Minnema, M.C., Wakamiya, K., Feng, H., Schechter, J.M., Wang, M. (2019): Phase 2 study of daratumumab in relapsed/refractory mantle-cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, and follicular lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 19, 275–284.
- Samaan, M., Campbell, S., Cunningham, G., Tamilarasan, A.G., Irving, P.M., McCartney, S. (2019): Biologic therapies for Crohn's disease. Optimising the old and maximising the new. *F1000Res* 8, 1210.
- Schewe, D.M., Alsadeq, A., Sattler, C., Lenk, L., Vogiatzi, F., Cario, G., Vieth, S., Valerius, T., Roskopf, S., Meyersieck, F., Alten, J., Schrappe, M., Gramatzki, M., Peipp, M., Kellner, C. (2017): An Fc-engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood* 130, 1543–1552.
- Schmied, B.J., Lutz, M.S., Riegg, F., Zekri, L., Heitmann, J.S., Bühring, H.-J., Jung, G., Salih, H.R. (2019a): Induction of NK cell reactivity against B-cell acute lymphoblastic leukemia by an Fc-optimized FLT3 antibody. *Cancers* 11, 1966.
- Schmied, B.J., Riegg, F., Zekri, L., Grosse-Hovest, L., Bühring, H.-J., Jung, G., Salih, H.R. (2019b): An Fc-optimized CD133 antibody for induction of natural killer cell reactivity against colorectal cancer. *Cancers* 11, 789.

- Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J. (2012): Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 278–287.
- Seiffert, M., Cant, C., Chen, Z., Rappold, I., Brugger, W., Kanz L., Brown, E.J., Ullrich, A., Bühring, H. J. (1999): Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood* 94, 3633–3643.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., Presta, L.G. (2001): High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 276, 6591–6604.
- Shin, C., Kim, S.S., Jo, Y.H. (2021): Extending traditional antibody therapies. Novel discoveries in immunotherapy and clinical applications. *Mol Ther Oncolytics* 22, 166–179.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., Shitara, K. (2003): The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278, 3466–3473.
- Sica, A., Mantovani, A. (2012): Macrophage plasticity and polarization. *In vivo veritas. J Clin Invest* 122, 787–795.
- Sikic, B.I., Lakhani, N., Patnaik, A., Shah, S.A., Chandana, S.R., Rasco, D., Colevas, A.D., O'Rourke, T., Narayanan, S., Papadopoulos, K., Fisher, G.A., Villalobos, V., Prohaska, S.S., Howard, M., Beeram, M., Chao, M.P., Agoram, B., Chen, J.Y., Huang, J., Axt, M., Liu, J., Volkmer, J.-P., Majeti, R., Weissman, I.L., Takimoto, C.H., Supan, D., Wakelee, H.A., Aoki, R., Pegram, M.D., Padda, S.K. (2019): First-in-human, first-in-class phase I trial of the anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* 37, 946–953.
- Silverton, E.W., Navia, M.A., Davies, D.R. (1977): Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5140–5144.
- Steinbacher, J., Baltz-Ghahremanpour, K., Schmiedel, B.J., Steinle, A., Jung, G., Kübler, A., André, M.C., Grosse-Hovest, L., Salih, H.R. (2015): An Fc-optimized NKG2D-immunoglobulin G fusion protein for induction of natural killer cell reactivity against leukemia. *Int J Cancer* 136, 1073–1084.
- Sun, J., Park, C., Guenther, N., Gurley, S., Zhang, L., Lubben, B., Adebayo, O., Bash, H., Chen, Y., Maksimos, M., Muz, B., Azab, A.K. (2022): Tumor-associated macrophages in multiple myeloma. *Advances in biology and therapy. J Immunother Cancer* 10, e003975.
- Surveillance, Epidemiology, & End Results [SEER] (2019): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. Verfügbar unter: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/.

- Suyarı, E., Sucak, G.T., Akyürek, N., Şahin, S., Baysal, N.A., Yağcı, M., Haznedar, R. (2013): Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma. *Ann Hematol* 92, 669–677.
- Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., Dimopoulos, M.A. (2018): Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma. From bench to bedside. *Blood Cancer J* 8, 2347.
- The Antibody Society (2020): Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US. Verfügbar unter: <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>.
- Treffers, L.W., Broeke, T. ten, Rösner, T., Jansen, J.M., van Houdt, M., Kahle, S., Schornagel, K., Verkuijlen, P.J.J.H., Prins, J.M., Franke, K., Kuijpers, T.W., van den Berg, T.K., Valerius, T., Leusen, J.H.W., Matlung, H.L. (2020): IgA-mediated killing of tumor cells by neutrophils is enhanced by CD47–SIRP α checkpoint inhibition. *Cancer Immunol Res* 8, 120–130.
- Tseng, D., Volkmer, J.-P., Willingham, S.B., Contreras-Trujillo, H., Fathman, J.W., Fernhoff, N.B., Seita, J., Inlay, M.A., Weiskopf, K., Miyanishi, M., Weissman, I.L. (2013): Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11103–11108.
- Uno (2007): Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. *Oncol Rep* 17, 1189.
- Upton, R., Banuelos, A., Feng, D., Biswas, T., Kao, K., McKenna, K., Willingham, S., Ho, P.Y., Rosental, B., Tal, M.C., Raveh, T., Volkmer, J.-P., Pegram, M.D., Weissman, I.L. (2021): Combining CD47 blockade with trastuzumab eliminates HER2-positive breast cancer cells and overcomes trastuzumab tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, 743193.
- Vafa, O., Gilliland, G.L., Brezski, R.J., Strake, B., Wilkinson, T., Lacy, E.R., Scallon, B., Teplyakov, A., Malia, T.J., Strohl, W.R. (2014): An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations. *Methods* 65, 114–126.
- Valabrega, G., Montemurro, F., Aglietta, M. (2007): Trastuzumab. Mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 18, 977–984.
- van Bommel, P.E., He, Y., Schepel, I., Hendriks, M.A.J.M., Wiersma, V.R., van Ginkel, R.J., van Meerten, T., Ammatuna, E., Huls, G., Samplonius, D.F., Helfrich, W., Bremer, E. (2017): CD20-selective inhibition of CD47–SIRP α “don't eat me” signaling with a bispecific antibody-derivative enhances the anticancer activity of daratumumab, alemtuzumab and obinutuzumab. *Oncol Immunology* 7, e1386361.
- van de Donk, N.W.C.J., Janmaat, M.L., Mutis, T., van Lammerts Bueren, J.J., Ahmadi, T., Sasser, A.K., Lokhorst, H.M., Parren, P.W.H.I. (2016): Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev* 270, 95–112.
- van de Donk, N.W.C.J., Pawlyn, C., Yong, K.L. (2021): Multiple myeloma. *Lancet* 397, 410–427.

- van de Donk, N.W.C.J., Usmani, S.Z. (2018): CD38 Antibodies in multiple myeloma. Mechanisms of action and modes of resistance. *Front Immunol* 9, 1.
- van den Berg, T., Yoder, J., Litman, G. (2004): On the origins of adaptive immunity. Innate immune receptors join the tale. *Trends Immunol* 25, 11–16.
- van den Berg, T.K., van der Schoot, C.E. (2008): Innate immune ‘self’ recognition. A role for CD47–SIRP α interactions in hematopoietic stem cell transplantation. *Trends Immunol* 29, 203–206.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T. (2014): IgG subclasses and allotypes. From structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520.
- Vogiatzi, F., Winterberg, D., Lenk, L., Buchmann, S., Cario, G., Schrappe, M., Peipp, M., Richter-Pechanska, P., Kulozik, A.E., Lentjes, J., Bergmann, A.K., Valerius, T., Frielitz, F.-S., Kellner, C., Schewe, D.M. (2019): Daratumumab eradicates minimal residual disease in a preclinical model of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 134, 713–716.
- Vukovic, N., van Elsas, A., Verbeek, J.S., Zaiss, D.M.W. (2021): Isotype selection for antibody-based cancer therapy. *Clin Exp Immunol* 203, 351–365.
- Wang, B., Lau, Y.Y., Liang, M., Vainshtein, I., Zusmanovich, M., Lu, H., Magrini, F., Sleeman, M., Roskos, L. (2012): Mechanistic modeling of antigen sink effect for mavrilimumab following intravenous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol* 52, 1150–1161.
- Wang, H., Hu, W.-m., Xia, Z.-j., Liang, Y., Lu, Y., Lin, S.-x., Tang, H. (2019): High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages correlate with poor prognosis in multiple myeloma patients receiving bortezomib-based regimens. *J Cancer* 10, 3239–3245.
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., Sondel, P.M. (2015): NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 6, 368.
- Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., Tong, A. (2022): Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Mol Biomed* 3, 495.
- Weers, M. de, Tai, Y.-T., van der Veer, M.S., Bakker, J.M., Vink, T., Jacobs, D.C.H., Oomen, L.A., Peipp, M., Valerius, T., Slootstra, J.W., Mutis, T., Bleeker, W.K., Anderson, K.C., Lokhorst, H.M., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I. (2011): Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* 186, 1840–1848.
- Weiner, L.M., Murray, J.C., Shuptrine, C.W. (2012): Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell* 148, 1081–1084.
- Weiskopf, K. (2017): Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP α axis. *Eur J Cancer* 76, 100–109.
- Weiskopf, K., Ring, A.M., Ho, C.C.M., Volkmer, J.-P., Levin, A.M., Volkmer, A.K., Özkan, E., Fernhoff, N.B., van de Rijn, M., Weissman, I.L., Garcia, K.C. (2013): Engineered SIRP α variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. *Science* 341, 88–91.

- Weiskopf, K., Weissman, I.L. (2015): Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 7, 303–310.
- Weng, W.-K., Levy, R. (2003): Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21, 3940–3947.
- Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., Lovelace, P., Scheeren, F.A., Chao, M.P., Weiskopf, K., Tang, C., Volkmer, A.K., Naik, T.J., Storm, T.A., Mosley, A.R., Edris, B., Schmid, S.M., Sun, C.K., Chua, M.-S., Murillo, O., Rajendran, P., Cha, A.C., Chin, R.K., Kim, D., Adorno, M., Raveh, T., Tseng, D., Jaiswal, S., Enger, P.O., Steinberg, G.K., Li, G., So, S.K., Majeti, R., Harsh, G.R., van de Rijn, M., Teng, N.N.H., Sunwoo, J.B., Alizadeh, A.A., Clarke, M.F., Weissman, I.L. (2012): The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6662–6667.
- 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.
- Wright, A., Morrison, S.L. (1997): Effect of glycosylation on antibody function. Implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* 15, 26–32.
- Xenaki, K.T., Oliveira, S., van Bergen en Henegouwen, P.M.P. (2017): Antibody or antibody fragments. Implications for molecular imaging and targeted therapy of solid tumors. *Front Immunol* 8, 473.
- Zalevsky, J., Leung, I.W.L., Karki, S., Chu, S.Y., Zhukovsky, E.A., Desjarlais, J.R., Carmichael, D.F., Lawrence, C.E. (2009): The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody. Increased Fc γ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood* 113, 3735–3743.
- Zeller, T., Lutz, S., Münnich, I.A., Windisch, R., Hilger, P., Herold, T., Tahiri, N., Banck, J.C., Weigert, O., Moosmann, A., Bergwelt-Baildon, M. von, Flamann, C., Bruns, H., Wichmann, C., Baumann, N., Valerius, T., Schewe, D.M., Peipp, M., Rösner, T., Humpe, A., Kellner, C. (2022): Dual checkpoint blockade of CD47 and LILRB1 enhances CD20 antibody-dependent phagocytosis of lymphoma cells by macrophages. *Front Immunol* 13, 197.
- Zhang, M., Hutter, G., Kahn, S.A., Azad, T.D., Gholamin, S., Xu, C.Y., Liu, J., Achrol, A.S., Richard, C., Sommerkamp, P., Schoen, M.K., McCracken, M.N., Majeti, R., Weissman, I., Mitra, S.S., Cheshier, S.H., Roberts, D.D. (2016): Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes M1 polarized macrophages in vivo. *PLoS One* 11, e0153550.

Zhao, X.W., van Beek, E.M., Schornagel, K., van der Maaden, H., van Houdt, M., Otten, M.A., Finetti, P., van Egmond, M., Matozaki, T., Kraal, G., Birnbaum, D., van Elsas, A., Kuijpers, T.W., Bertucci, F., van den Berg, T.K. (2011): CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18342–18347.

Zheng, Y., Cai, Z., Wang, S., Zhang, X., Qian, J., Hong, S., Li, H., Wang, M., Yang, J., Yi, Q. (2009): Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* 114, 3625–3628.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung und Nomenklatur von Antikörperformaten.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung wichtiger Fc-abhängiger Effektormechanismen.	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperformate und -derivate.....	14
Abbildung 5: Analyse des gereinigten Antikörpers Dara-DE mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse.....	40
Abbildung 6: Antigenbindung von Dara-DE auf mit CD38 transfizierten CHO-Zellen.....	41
Abbildung 7: Ergebnisse der ⁵¹ Chromfreisetzungsversuche zur Testung der ADCC-Induktion durch Dara-DE an Myelomzelllinien.....	42
Abbildung 8: Ergebnisse der ⁵¹ Chromfreisetzungsversuche zur Testung der ADCC-Induktion durch Dara-DE an Raji-Zellen.....	43
Abbildung 9: Ergebnisse der ⁵¹ Chromfreisetzungsversuche mit Dara-DE im autologen Setting.....	44
Abbildung 10: Untersuchung der ADCP-Induktion von Dara-DE im Vergleich zu Daratumumab und Rituximab.....	45
Abbildung 11: Analyse der Zelloberflächenantigene der hergestellten Makrophagen.....	46
Abbildung 12: Analyse des gereinigten Fusionsproteins SIRPα-Fcσ mittels SDS-PAGE.....	48
Abbildung 13: Bindung von SIRPα-Fcσ auf Myelomzellen.....	49
Abbildung 14: Untersuchung der ADCP-Verstärkung durch Kombination von Daratumumab sowie Rituximab mit SIRPα-Fcσ mittels Durchflusszytometrie.....	51
Abbildung 15: Zusammenfassung der ADCP-Experimente mit Raji-Zellen.....	52
Abbildung 16: ADCP-Verstärkung durch Kombination von Daratumumab mit SIRPα-Fcσ im <i>Life Cell Imaging</i>	53
Abbildung 17: SIRPα-Fcσ in Kombination mit Daratumumab in autologen ADCP-Experimenten an Myelomzellen.....	55

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane Fcγ-Rezeptoren	8
Tabelle 2: Zellkulturmedium und -zusätze	20
Tabelle 3: Zelllinien.....	20
Tabelle 4: Bakterienstämme	21
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien.....	21
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 7: Kits	23
Tabelle 8: Einmalmaterialien.....	23
Tabelle 9: Laborgeräte und -utensilien	24
Tabelle 10: Messgeräte	25
Tabelle 11: Enzyme.....	25
Tabelle 12: Konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie	26
Tabelle 13: Konjugierte Antikörper für den Western Blot	26
Tabelle 14: Unkonjugierte Antikörper.....	27
Tabelle 15: Plasmide.....	27
Tabelle 16: Softwareprogramme	28
Tabelle 17: Zusammensetzung von 10%igen Polyacrylamidgelen, Ansatz für zwei Gele	32

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Klara Marie Eichholz, geboren 15.12.1991 in Kiel, die hier vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel angegeben zu haben. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form im Rahmen eines früheren Promotionsverfahrens vorgelegen hat.

Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ein akademischer Grad wurde mir nicht entzogen.

Ort, Datum

Klara Marie Eichholz

Danksagung

Ich möchte all jenen Menschen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Christian Kellner für die Bereitstellung des spannenden Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Ein ebenso besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp für die spätere Übernahme meiner Promotionsbetreuung. Beiden meinen Doktorvätern danke ich herzlich für die engagierte wissenschaftliche Betreuung, das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und die immer freundliche und hilfsbereite Begleitung und Expertise während meiner gesamten Promotionszeit. Die Zusammenarbeit war mir eine große Freude.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki möchte ich mich ausdrücklich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter seiner Institutsleitung anzufertigen.

Mein herzlicher Dank geht zudem an das gesamte Team des Dr. Mildred Scheel-Hauses für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und die außerordentlich freundliche und entgegenkommende Arbeitsatmosphäre. Ich danke insbesondere Dr. Thies Rösner, Dr. Anna Otte, Dr. Sebastian Lutz und Dr. Katja Klausz für ihre wissenschaftliche Unterstützung und dafür, dass auch sie mir jederzeit mit gutem Rat zur Seite standen. Britta von Below und Anja Muskulus gilt außerdem mein großer Dank für die Einführung in die praktische Laborarbeit und ihre wichtige Unterstützung und Hilfestellung bei zahlreichen Experimenten. Ich bedanke mich weiterhin herzlich bei Lea Sellmer, Anca Albici und Janine Dilchert für den wertvollen Austausch und das gemeinsame Arbeiten im Labor, welches mit ihnen immer Spaß und Freude bereitet hat.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern Gudrun und Rolf für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Verständnis in all der anspruchsvollen Zeit. Ihnen bin ich zutiefst dankbar, dass sie mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Klara Marie Eichholz

Publikationen

Zitierfähige Abstracts:

Eichholz, K.M., Rösner, T., Burger, R., Klausz, K., Otte, A., Valerius, T., Schewe, D.M., Gramatzki, M., Peipp, M., Kellner, C. (2018): Improving CD38 antibody therapy in multiple myeloma by enhancing effector cell-mediated killing mechanisms. *Oncol Res Treat*, 41 (4), 137.

Vogiatzi, F., Eichholz, K.M., Lenk, L., Cario, G., Schrappe, M., Gramatzki, M., Peipp, M., Kellner, C., Schewe, D.M. (2018): Targeting CD38 in T-ALL using a novel Fc-engineered antibody. *Klin Pädiatr* 230 (03), 174–175.

Rösner, T., Eichholz, K.M., Otte, A., Winterberg, D., Wichmann, C., Windisch, R., Humpe, A., Schewe, D.M., Gramatzki, M., Valerius, T., Peipp, M., Kellner, C. (2019): Enhanced phagocytotic eradication of leukemia cells by combination of an Fc-engineered CD19 antibody with CD47 immune checkpoint blockade. *Ann Hematol* 98, 59.

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.

Roßkopf, S., Eichholz, K. M., Winterberg, D., Diemer, K. J., Lutz, S., Münnich, I.A., Klausz, K., Rösner, T., Valerius, T., Schewe, D. M., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M., Kellner, C. (2020): Enhancing CDC and ADCC of CD19 Antibodies by Combining Fc Protein-Engineering with Fc Glyco-Engineering. *Antibodies* 9, 63.

Baumann, N., Rösner, T., Jansen, J. H. M., Chan, C., Eichholz, K.M., Klausz, K., Winterberg, D., Müller, K., Humpe, A., Burger, R., Peipp, M., Schewe, D. M., Kellner, C., Leusen, J. H. W., Valerius, T. (2021): Enhancement of epidermal growth factor receptor antibody tumor immunotherapy by glutaminyl cyclase inhibition to interfere with CD47/signal regulatory protein alpha interactions. *Cancer Sci* 112, 3029–3040.

Evers, M., Rösner, T., Dünkel, A., Jansen, J. H. M., Baumann, N., Ten Broeke, T., Nederend, M., Eichholz, K., Klausz, K., Reiding, K., Schewe, D. M., Kellner, C., Peipp, M., Leusen, J. H. W., Valerius, T. (2021): The selection of variable regions affects effector mechanisms of IgA antibodies against CD20. *Blood Adv* 5, 3807–3820.