

Aus dem
Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

Optimierung eines bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpers

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sindel, geb. Ehnes, Isabelle

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D.Schneidawind

Tag der Disputation: 11.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antikörper	1
1.1.1	Struktur von Antikörpern.....	2
1.1.2	Funktion und Wirkungsweise von Antikörpern	5
1.2	Antikörpertherapie	7
1.2.1	Immunogenität.....	8
1.2.2	Pharmakokinetik.....	9
1.2.3	Effektivität	10
1.2.4	Bispezifische Antikörper	15
1.3	Akute myeloische Leukämie.....	20
1.3.1	FLT3-Rezeptor	22
1.3.2	Antikörpertherapie bei der Behandlung der AML	23
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Glas und Plastikwaren	27
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.4	Puffer und Medien	30
2.1.5	Enzyme	33
2.1.6	Größenmarker für die Gelelektrophorese	33
2.1.7	Gebrauchsfertige Kits	34
2.1.8	Software.....	34
2.1.9	Oligonukleotide	34
2.1.10	Bakterienstämme	35

2.1.11	Plasmide.....	35
2.1.12	Antikörper.....	35
2.1.13	Zelllinien.....	37
2.1.14	Primäre humane Zelllinien	37
2.2	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....	37
2.2.2	Agarosegelelektrophorese zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA.....	38
2.2.3	Aufreinigung von DNA-Fragmente aus einem Agarosegel	38
2.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
2.2.5	Aufreinigung von Plasmiden	39
2.2.6	Herstellung von kompetenten Bakterien	39
2.2.7	Transformation von kompetenten Bakterien	40
2.2.8	Anlegen von Bakterienkulturen.....	40
2.2.9	Sequenzierung	40
2.3	Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen.....	41
2.3.1	Passagieren und Ernten von Zellen	41
2.3.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	41
2.3.3	Kryokonservierung von Zellen.....	41
2.3.4	Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes	42
2.3.5	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	43
2.3.6	Inaktivierung von Tumorzellen	43
2.4	Chromatographische Verfahren.....	43
2.4.1	Aufreinigung bispezifischer Antikörper aus Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A.....	43
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösung mittels NanoDrop	44

2.5	Analytische Methoden	44
2.5.1	Analytische Gelfiltration	44
2.5.2	Diskontinuierliche SDS Gelelektrophorese.....	44
2.5.3	Schmelzpunktbestimmung.....	45
2.5.4	Durchflusszytometrie.....	45
2.6	Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern	46
2.6.1	³ [H]-Thymidin-Proliferationstest.....	46
2.6.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der antikörpervermittelten Lyse .	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Vergleich des bivalenten und tetravalenten FLT3xCD3 Antikörpers	49
3.1.1	Klonierung und Generierung eines tetravalenten FLT3xCD3 Antikörpers 49	
3.1.2	Proteinbiochemische Analyse.....	51
3.1.3	Bindungsanalyse	53
3.1.4	Induktion von T-Zellproliferation	54
3.2	Optimierung der CD3-Affinität	56
3.2.1	Klonierung bispezifischer tetravalenter Antikörper unterschiedlicher CD3- Affinitäten.....	57
3.2.2	Proteinbiochemische Analyse.....	57
3.2.3	Bindungsanalyse	60
3.2.4	Zielzelllyse.....	61
3.3	Humanisierung und Optimierung der FLT3-Affinität	66
3.3.1	Klonierung bispezifischer tetravalenter Antikörper unterschiedlicher FLT3- Affinitäten.....	67
3.3.2	Proteinbiochemische Analyse.....	67
3.3.3	Bindungsanalyse	69
3.3.4	Zielzelllyse.....	70

3.4	Das optimiertes Molekül hCC2	72
3.4.1	Zielzelllyse.....	72
4	Diskussion	74
4.1	Affinität.....	74
4.1.1	Antikörperformat	74
4.1.2	CD3-Affinität.....	75
4.1.3	FLT3-Affinität	76
4.2	Zielzelllyse	78
4.2.1	Lyse von Nalm-16-Zellen mit PBMCs gesunder Spender	78
4.2.2	Lyse im autologen System mit PBMCs von AML-Patienten.....	78
4.3	Ausblick	80
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literaturverzeichnis.....	82
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	94
8	Eigene Publikationen.....	95
9	Danksagung.....	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Schematische Darstellung des I γ -Moleküls	3
Abbildung 1.2.1: Antikörperformate	19
Abbildung 3.1.1: Schematische Übersicht der Antikörperformate	50
Abbildung 3.1.2: Analytische Größenausschlusschromatographie des Fabsc- und IgGsc-Formats	51
Abbildung 3.1.3: Gelelektrophoretische Analyse des bivalenten und tetravalenten bisppezifischen Antikörpers	52
Abbildung 3.1.4: Schmelzpunktbestimmung des bivalenten und tetravalenten bisppezifischen Antikörpers	53
Abbildung 3.1.5: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse der bisppezifischen Antikörper	54
Abbildung 3.1.6: Spezifische T-Zellproliferation im ³ H-Thymidin- Proliferationsassay	55
Abbildung 3.1.7: Unspezifische T-Zellproliferation im ³ H-Thymidin- Proliferationsassay	56
Abbildung 3.2.1: Analytische Chromatographie der CD3-Varianten	58
Abbildung 3.2.2: Gelelektrophoretische Analyse der CD3-Varianten	59
Abbildung 3.2.3: Schmelzpunktbestimmung der CD3-Varianten	60
Abbildung 3.2.4: Durchflusszytometrische CD3-Bindungsanalyse der bisppezifischen Antikörper	61
Abbildung 3.2.5: Antikörpervermittelte Zielzelllyse von Nalm 16 Zellen und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen	62
Abbildung 3.2.6: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung autologer T-Zellen bei Patient #1	64
Abbildung 3.2.7: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung autologer T-Zellen bei Patient #3	65
Abbildung 3.2.8: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten durch Antikörper mit unterschiedlicher CD3-Affinität	66
Abbildung 3.3.1: Analytische Chromatographie der FLT3-Varianten	68
Abbildung 3.3.2: Gelelektrophoretische Analyse der FLT3-Varianten	68
Abbildung 3.3.3: Schmelzpunktbestimmung der FLT3-Varianten	69

Abbildung 3.3.4: Durchflusszytometrische FLT3-Bindungsanalyse der bispezifischen Antikörper	70
Abbildung 3.3.5: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen mit Konstrukten unterschiedlicher FLT3-Affinitäten	71
Abbildung 3.4.1: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch hCC2.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1-1: Unkonjugierte Antikörper	36
Tabelle 2.1-2: Konjugierte Antikörper	36
Tabelle 2.1-3: Zelllinien	37
Tabelle 3.2-1: IgGsc-Konstrukte unterschiedlicher CD3-Affinitäten des scFv	57
Tabelle 3.3-1: IgGsc-Konstrukte unterschiedlicher FLT3-Affinitäten.....	67

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADIN	Antibody dependent intracellular neutralization
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
APC	Antigen-presentig cell
BiTE	Bispecific T-cell enganger
°C	Grad Celsius
CAR	chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
C _H	Konstante Domäne der schweren Kette
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette
CDR	Complementarity determining region
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
cpm	Counts per minute
CR	Complete remission
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FR	Framework region
g	Gramm
h	Stunde
IL	Interleukin
HAMA	Human anti-mouse antibody
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
k	Kilo
L	Liter
MAC	Membrane Attack Complex
MHC	Major-histocompatibility complex
ml	Milliliter
min	Minute
μ l	Mikroliter
nM	Nanomol
N-Terminus	Amino-Terminus
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell(s)
PD1	Programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
scFv	Single chain Fragment variable
SDS	Sodium-(Natrium-)dodecylsulfat
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TCR	T-cell receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Antikörper

Ende des 19. Jahrhunderts trugen Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato in ihrer Arbeit „Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und Tetanusimmunität bei Thieren“ einen ersten grundlegenden Schritt zur Entdeckung und Erforschung der Antikörpermoleküle bei. Nach der Infektion von Versuchstieren mit Tetanus- und Diphtherietoxin konnte das Serum dieser immunisierten Tiere gesunde Tiere vor der jeweiligen Infektion schützen, bzw. erkrankte Tiere heilen. Durch diese passive Immunisierung, also der Übertragung des Serums, konnte eine Immunität erzeugt werden. Die beiden Forscher gingen davon aus, dass antitoxische Substanzen im Serum die entsprechenden bakteriellen Toxine neutralisieren oder zerstören würden.

Ab 1893 wurde ein Antitoxin für die Behandlung der Diphtherie beim Menschen eingesetzt und Emil von Behring erhielt 1901 für seine Arbeiten den Nobelpreis (Gronski et al., 1991). Paul Ehrlich prägte in diesem Zusammenhang den Begriff des „Antikörpers“ für das im Serum enthaltene Antitoxin (Ehrlich, 1891). Darüber hinaus erklärte er im Jahr 1900 mit der Seitenkettentheorie die Bildung der Antikörper auf Grund einer Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen Toxin und körpereigener Zelle. Eine Zelle exprimiert viele verschiedene Seitenketten. Kommt nun ein Antigen mit der Zelloberfläche in Kontakt und passt, entsprechend nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, genau zu einer Seitenkette, führt dies zur erhöhten Produktion dieser speziellen Seitenkette. Werden diese dann auf Grund der hohen Proliferation von der Zelloberfläche ins Blut sekretiert, können die entsprechenden freien Toxine im Blut neutralisiert werden (Ehrlich, 1900). Für seine Arbeiten zur Serumtherapie und Grundlagen der Immunologie erhielt er 1908 ebenfalls den Nobelpreis.

In den folgenden Jahren wurden Untersuchungen zur Struktur der Antikörper durchgeführt. So konnten Felton und Bailey 1926 nachweisen, dass es sich bei Antikörpern um Proteine handelt (Felton and Bailey, 1926). Tiselius und Kabat, die mittels Elektrophorese die Serumanalyse vorantrieben, gelang die Zuordnung der Antikörper zur γ -Globulinfraktion. Die Serumproteine werden in der Elektrophorese in

vier Fraktionen aufgetrennt: Albumin, sowie die α -, β -, und γ -Globulinfraktion. Nach der Immunisierung von Kaninchen mit Ovalbumin konnte eine starke Erhöhung der γ -Globulinfraktion festgestellt werden. Wurden die gebildeten Antikörper mittels Antigen adsorbiert, kam es einzig bei der γ -Globulinfraktion zu einer signifikanten Reduktion (Tiselius, 1937). Bezüglich der Fragestellung nach der antikörperproduzierenden Zelle konnte Astrid Fagraeus 1948 in Milzkulturen zeigen, dass Plasmazellen für die Antikörperproduktion von entscheidender Bedeutung sind (Fagraeus, 1948). Der tatsächliche Nachweis der Antikörperproduktion in Plasmazellen wurde 1955 mittels Immunfluoreszenz erbracht (Leduc et al., 1955). Die zelluläre Bedeutung für die humorale Immunantwort und spezifische Proliferation eines Lymphozytenklons erklärte Frank Macfarlane Burnet wenige Jahre später mit der von ihm entwickelten klonalen Selektionstheorie (Burnet, 1959).

1.1.1 Struktur von Antikörpern

In den 1960iger Jahren wurden entscheidende Arbeiten zur Struktur des I γ -Globulins veröffentlicht. Mit unterschiedlichen Methoden arbeiteten unabhängig voneinander sowohl Gerald Edelman, als auch Rodney Porter an der chemischen Strukturaufklärung des I γ -Globulins. Durch Spaltung des Moleküls in verschiedene Untereinheiten gelang es, die Struktur im Gesamten nachzuvollziehen. Die beiden Wissenschaftler erhielten im Jahr 1972 für ihre Arbeiten den Nobelpreis.

Das I γ -Globulin besitzt eine Y-förmige Struktur und ist symmetrisch aus vier Polypeptidketten mit einem N- bzw. C-Terminus aufgebaut. Man unterscheidet zwei leichte, sowie zwei schwere Ketten. Eine leichte Kette L (*light chain*) ist mit einer schweren Kette H (*heavy chain*) über eine Disulfidbrücke verbunden, wobei außerdem die beiden schweren Ketten ebenfalls über Disulfidbrücken in der sogenannten *Hinge-Region* verbunden sind. Die schwere Kette besteht aus vier Domänen, die leichte Kette aus zwei, womit ein I γ -Molekül aus 12 Domänen aufgebaut ist. Die loopförmige Domäne aus 110 Aminosäuren enthält ebenfalls eine Disulfidbrücke (Edelman et al., 1969).

Das I γ -Molekül lässt sich mit dem Enzym Papain in seiner Struktur in drei Untereinheiten spalten, wobei das Molekül damit in seine funktionellen Einheiten unterteilt ist. Die Untereinheit, welche verantwortlich für die Bindung von Effektorzellen

ist, bezeichnet man als Fc-Fragment. Das Fragment lässt sich kristallisieren, weshalb es die Bezeichnung *fragment crystallizable*, abgekürzt Fc-Fragment, erhielt.

Die zwei antigenbindenden Fragmente werden aufgrund dieser Eigenschaft *fragments of antigenbinding*, abgekürzt Fab-Fragmente, genannt. Das Fab-Fragment enthält die leichte Kette mit ihren zwei Domänen, sowie zwei Domänen der schweren Kette. Die für die Antigenbindung verantwortliche Domäne nennt man variable Domäne V, für die schwere Kette V_H und für die leichte Kette V_L . Die restlichen Domänen werden als konstante Domänen C bezeichnet, für die leichte Kette C_L und die Domäne der schweren Kette, entsprechend nummeriert, als C_{H1} bis C_{H3} . (Porter, 1959). Für die Spezifität und die Antigenbindung selbst sind drei bestimmte Bereiche der variablen Domäne verantwortlich. Sie werden als hypervariable Regionen (HV1 bis HV3) oder auch als *complementarity determining regions* (CDR1 bis CDR3) bezeichnet. Sie werden von weniger variablen Gerüstregionen (*framework region*) FR1 bis FR4 begrenzt, deren Bezeichnung ihrer Eigenschaft zu Grunde liegt, die Konformität der Domäne zu bestimmen. Die hypervariablen Regionen aus schwerer und leichter Kette bilden zusammen die Antigenbindungsstelle des Moleküls (Wu and Kabat, 1970).

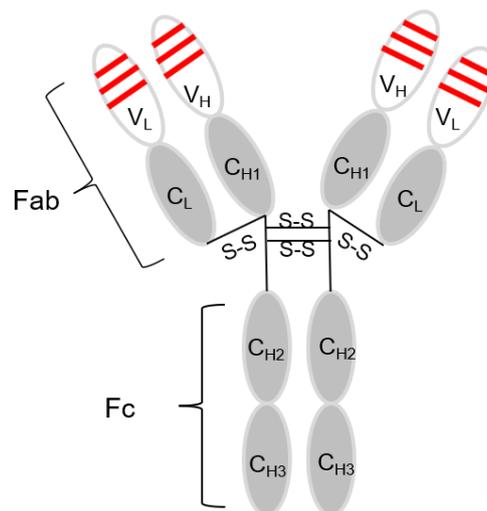


Abbildung 1.1.1: Schematische Darstellung des Iγ-Moleküls

Dargestellt ist die Struktur eines Iγ-Moleküls, bestehend aus zwei leichten Ketten (V_L und C_L), sowie aus zwei schweren Ketten (V_H und C_{H1} bis C_{H3}). Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrücken (S-S) verbunden, sowie die schwere mit der leichten Kette. Die Fab-Fragmente enthalten die antigenspezifische Einheit (V_L und V_H), wobei die CDR-Regionen (■) verantwortlich für die Erkennung des Antigenepitops sind. Die Fc-Region besteht aus den Domänen C_{H2} und C_{H3}

Das Immunsystem kann durch die humorale Antwort mittels Antikörper spezifisch auf die Antigene der Umwelt reagieren. Diese hohe Diversität ist bedingt durch das Prinzip der somatischen Rekombination, also der Umlagerung der Gensegmente V, D, und J an dem Genlocus der schweren bzw. leichten Kette. Im Folgenden wird nur die Anzahl der funktionellen Gensegmente genannt. Auf Chromosom 14 liegen für die schwere Kette 38-46 V-Segmente, gefolgt von 23 D-Segmenten und 6 J-Segmenten. Bei der leichten Kette unterscheidet man zwischen dem Genlocus der κ -Leichtkette mit 34 V-Segmenten auf Chromosom 2 und der λ -Leichtkette mit 30 V-Segmenten auf Chromosom 22. Bei der leichten Kette schließen sich direkt 4-5 J-Segmente an, die D-Segmente fehlen. Durch die somatische Rekombination der V(D)J-Segmente innerhalb der schweren und leichten Kette und der Kombination der schweren und leichten Ketten ergeben sich aus der kombinatorischen Vielfalt mehrere Millionen verschiedene Antikörperspezifitäten. Darüber hinaus werden bei der V(D)J-Rekombination die nicht benötigten Gensequenzen ausgeschnitten und die benötigten Segmente durch regulatorische Proteine verknüpft. Diese verbinden die Segmente durch Hinzufügen oder Ausschneiden von Nukleotiden zu einem komplementären DNA-Strang, weshalb sich auch bei Kombination gleicher V(D)J-Segmente unterschiedliche Produkte ergeben können. Hier spricht man von der junktionalen Diversität, die entscheidend für die hohe Anzahl möglicher Antikörperspezifitäten ist. Diese wird durch somatische Hypermutation noch weiter erhöht, womit man insgesamt von einem Antikörperrepertoire von 10^{12} bis 10^{14} ausgeht (Tonegawa, 1983) (Wardemann and Busse, 2017). Die Expression der variablen Region wird in der Entwicklungsphase der B-Zellen festgelegt, die V(D)J-Rekombination ist nicht mehr veränderbar. Ebenfalls auf dem Genlocus der schweren Kette liegen die Gensegmente C_H . Diese codieren die konstante Region des Antikörpers und bestimmen dessen Isotyp.

Entsprechend der Gensegmente C_{μ} , C_{δ} , C_{γ_3} , C_{γ_1} , C_{α_1} , C_{γ_2} , C_{γ_4} , C_{ϵ} , C_{γ_2} , die auch in dieser Reihenfolge im Genlocus an die J-Segmente anschließen, werden die fünf Isotypen, mit ihren Subklassen unterschieden: IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, sowie IgA (IgA1 und IgA2). Für den Klassenwechsel ist die Interaktion zwischen B-Zellen und T_2 -Helferzellen entscheidend, außerdem haben Zytokine wie IL4, TNF α und Interferon γ einen wichtigen Einfluss. Die Isotypen unterscheiden sich strukturell. Sie variieren unter anderem in der Anzahl ihrer konstanten Domänen und der Länge bzw. dem

Vorhandensein einer Gelenkregion, sowie der Anzahl der Glykosylierungen (Stavnezer, 1996, Matsuda and Honjo, 1996, Arnold et al., 2007). Dies bedeutet, dass der Isotyp einen entscheidenden Einfluss auf die spezielle Effektorfunktion des Antikörpers hat. So kann er seine Funktion in unterschiedlichen Kompartimenten ausüben. Auf die Wirkungsmechanismen wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.1.2 Funktion und Wirkungsweise von Antikörpern

Antikörper sind in löslicher oder in gebundener Form zu finden. So können die Isotypen IgM und IgD auch membrangebunden als B-Zellrezeptor vorliegen. Die Wirkungsweise von sezernierten, löslichen Antikörpern wird im Folgenden durch drei Funktionsbereiche kategorisiert: die Neutralisation, Opsonierung und Komplementaktivierung.

Neutralisation

Krankheitserreger wie Bakterien oder Viren lösen durch unterschiedliche Mechanismen eine Zellschädigung aus, die meist mit der Bindung an die Zelloberfläche initiiert wird. Viele Bakterien führen beispielsweise durch Sezernierung von Toxinen zu Zellschädigungen. Antikörper verhindern durch die Bindung an Toxine deren Bindung an eine Zelle und haben damit eine neutralisierende Wirkung. Dies gilt zum Beispiel für das Diphtherietoxin (Pappenheimer et al., 1972). Die Bindung des Antikörpers an das Pathogen kann also zum einen die Bindung, und damit oft das Eindringen in die Zelle, verhindern, sie kann aber auch zu einer funktionellen oder strukturellen Blockade führen und damit das Pathogen unschädlich machen (Corti et al., 2011). Antikörper führen jedoch nicht nur extrazellulär zur Neutralisierung von Pathogenen, wie am Beispiel von Adenoviren gezeigt werden konnte. In diesem Fall konnte die Bindung von Antikörper am Virus zwar nicht dessen Einschleusen in die Zelle verhindern, führte aber durch die Bindung am intrazellulären Fc-Rezeptor TRIM21 zum Abbau und damit zur Neutralisierung des Virus. Dieser Prozess wird als ADIN (*antibody dependent intracellular neutralization*) bezeichnet (Mallery et al., 2010). Allerdings wirft die Kopplung an einen intrazellulären Effektormechanismus die Frage auf, ob es sich hierbei nicht viel mehr schon um eine Opsonierung handelt. Dieses Prinzip wird im Weiteren behandelt.

Opsonierung

Die Neutralisation kann vor Infektion und der Schädigung durch Pathogene schützen, allerdings führt sie nicht zur direkten Abtötung und zum Abbau. Opsonierung beschreibt die Auslösung von Effektormechanismen nach Bindung der Antikörper am Antigen. Die Erkennung des Antigens erfolgt über das Fab-Fragment, während das Fc-Fragment mit Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen wechselwirkt. Damit verbinden Fc-Rezeptoren die humorale Antwort des adaptiven Immunsystems mit zellulären Effektoren des angeborenen Immunsystems. Sie werden auf Phagozyten, also Makrophagen und neutrophilen Zellen, aber auch auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen exprimiert. Es gibt unterschiedliche, aktivierende und supprimierende Fc-Rezeptoren, welche in ihrem molekularen Aufbau und in ihren Subklassen als Gruppen unterschieden werden können. Im Folgenden werden die wichtigsten, durch Fc-Rezeptorbindung ausgelösten Effektormechanismen, welche in Verbindung mit Opsonierung stehen, kurz erläutert.

Ein Großteil der im Blut zirkulierenden Antikörper sind IgG-Moleküle, die an aktivierenden Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI, Fc γ RII-A, Fc γ RIII) auf Phagozyten binden. Monomere, das heißt nicht am Antigen gebundene Antikörper, führen nicht zu einer Aktivierung. Diese findet nur statt, wenn Antikörper an das Antigen gebunden sind und dadurch multimerisieren (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Auch IgA kann über den Fc α RI-Rezeptor (Fc α -Rezeptoren: Fc α RI, Fc α / μ R) Phagozytose auslösen. Fc ϵ -Rezeptoren (Fc ϵ RI, Fc ϵ RII) binden IgE Moleküle und werden auf Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen exprimiert. IgE Moleküle werden als Monomere an den hochaffinen Fc ϵ RI Rezeptor gebunden und führen bei Quervernetzung durch Bindung von Antigenen zur Ausschüttung der Granula von Mastzellen und damit zur Entzündungsreaktion (Kraft and Kinet, 2007, Bournazos et al., 2009). Für die Regulation der Immunantwort ist der inhibierende Fc γ RII-B1 und Fc γ RII-B2 verantwortlich, der ebenso auf den Effektorzellen exprimiert wird. Ausgenommen davon sind die NK-Zellen, die aber den aktivierenden Fc γ RIII-Rezeptor exprimieren und eine Antikörpervermittelte Lyse, ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), über die Freisetzung von Perforin und Granzyme, vermitteln. Sie gehören zu den wichtigsten Effektorzellen der ADCC (Caligiuri, 2008, Clynes et al., 2000).

Komplementaktivierung

Eine weitere Funktion der Antikörper besteht in der Aktivierung des Komplementsystems. Dabei handelt es sich um Plasmaproteine, die in einer kaskadenförmigen Reihe durch proteolytische Spaltung der jeweiligen Vorstufe aktiviert werden und so wiederum das folgende Protein aktivieren. Sie binden an die Oberfläche eines Pathogens, lösen Entzündungsreaktionen aus und bilden einen membranangreifenden Komplex MAC (*Membrane Attack Complex*), der durch die Formation von Poren zu Zellyse führen kann. Dies bezeichnet man als Komplementvermittelte Zytotoxizität, CDC (*complement-dependent cytotoxicity*).

Diese Kaskade kann durch drei verschiedene Wege ausgelöst werden. Die antikörperabhängige Aktivierung des Komplementsystems wird als *klassischer Weg* bezeichnet. Dabei wird das Protein C1, bestehend aus C1r, C1s und C1q durch die Bindung am Fc-Fragment der antigengebundenen IgG oder IgM Moleküle aktiviert. Mindestens zwei gebundene IgG Moleküle oder das als Pentamer vorliegende IgM Molekül binden an C1q. Dies löst eine enzymatische Aktivität aus, die zur Aktivierung der Komplementkaskade führt. Auch Immunkomplexe lösen die Aktivierung des Komplementsystems aus, dessen Spaltprodukt C3b zur Opsonierung dient und durch Bindung an Komplementrezeptoren auf Phagozyten den Phagozytose-Prozess unterstützt (Sarma and Ward, 2011, Feinstein et al., 1986).

Das Wissen über die physiologische Funktion und Wirkmechanismen von Antikörpern war Grundlage für eine verbesserte therapeutische Anwendung von Antikörpern. Der wichtigste Schritt war dabei die Entwicklung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein 1975. Die medizinische Bedeutung und Weiterentwicklung von therapeutischen Antikörpern werden in den folgenden Kapiteln näher diskutiert.

1.2 Antikörpertherapie

Historisch bedeutete die Entwicklung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein 1975 zur Herstellung monoklonaler Antikörper einen wichtigen Meilenstein zur gezielten therapeutischen Nutzung von Antikörpern. Dabei werden Plasmazellen einer immunisierten Maus mit Plasmozytomzellen fusioniert. Diese Hybridome können murine Antikörper gegen das zur Immunisierung gewählte Antigen produzieren (Kohler and

Milstein, 1975). 1986 wurde der erste monoklonale murine (-omab) Antikörper zugelassen. Der Antikörper Muronomab, gegen das CD3-Molekül auf T-Zellen gerichtet, sollte nach Nierentransplantationen Abstoßungsreaktionen verhindern.

Allerdings waren weitere Entwicklungsschritte erforderlich, um sowohl die Immunogenität als auch die Pharmakokinetik und schließlich insgesamt die therapeutische Aktivität von murinen Antikörpern zu verbessern. Im Folgenden wird auf Verbesserungen in drei wichtigen Bereichen eingegangen, der Immunogenität, Pharmakokinetik und Effektorfunktion.

1.2.1 Immunogenität

Bei der Applikation muriner monoklonaler Antikörper kann es zur Bildung von humanen Anti-Mausantikörper (*HAMA human anti-mouse antibody*) kommen, die die Wirksamkeit der Antikörpertherapie verringert (Schroff et al., 1985, Shawler et al., 1985). Diese Reaktion sollte durch die Herstellung chimärer (-ximab) Antikörper herabgesetzt werden. Mit der rekombinanten Antikörpertechnologie wurden die humanen Gensequenzen mit den variablen murinen Sequenzen kombiniert, sodass der chimäre Antikörper aus einem humanen Fc-Fragment mit variablen murinen Domänen bestand (Morrison et al., 1984). Durch diese Chimärisierung konnte zum einen die Immunogenität verringert, und zum anderen die Aktivität verbessert werden, da humane Fc-Teile besser mit humanen Fc-Rezeptoren interagieren. Ein weiterer Schritt war die Humanisierung von Antikörpern mittels CDR-Grafting. Bei einem so humanisierten (-zumab) Antikörper sind die Gensequenzen der CDR-Regionen eines humanen Antikörpers mit beliebiger Spezifität durch murine CDR-Sequenzen ersetzt (Jones et al., 1986, Queen et al., 1989).

Für die Generierung vollständig humaner (-umab) Antikörper wird überwiegend die „*phage display*“ Technologie angewandt. Diese Methode nutzt die Möglichkeit mittels gentechnisch veränderter Bakteriophagen Proteine zu exprimieren (Smith, 1988). Aus großen humanen Genbibliotheken können die Gensequenzen der variablen Region aus schwerer und leichter Kette als single chain Fragment (scFv), bestehend aus V_H und V_L, oder im Fab-Format auf den Phagen exprimiert werden. Das exprimierte Antikörperfragment bindet spezifisch an das entsprechende Antigen (McCafferty et al., 1990). So kann eine gezielte Selektion gewünschter Antikörperfragmente erfolgen. Neben der „*phage display*“ Technologie gibt es weitere Displaytechniken, z.B. mittels

Hefe (*yeast display*) (Boder and Wittrup, 1997), Ribosomen (*ribosome display*) (Hanes and Pluckthun, 1997) oder Zellen (Ho et al., 2006). So kann die Selektion eines spezifischen Antiköpers ohne Immunisierung erfolgen, allerdings erfolgt hierbei keine Affinitätsreifung.

Eine alternative Möglichkeit der Humanisierung ist die Verwendung „humanisierter Mäuse“. Bei solchen Mäusen wird die Sequenz des Genlocus für Immunglobuline durch die entsprechende humane Sequenz ausgetauscht, weshalb bei diesen Tieren nach deren Immunisierung vollständig humane und auch affinitätsgereifte Antikörper sezerniert werden (Bruggemann et al., 1989, Osborn et al., 2013).

1.2.2 Pharmakokinetik

Im Folgenden wird die Entwicklung der Optimierung pharmakokinetischer Eigenschaften in der Antikörpertherapie anhand der Plasmahalbwertszeit betrachtet.

Die Plasmahalbwertszeit ist für murine therapeutische Antikörper verkürzt, was auch auf die bereits beschriebenen HAMAs zurückzuführen ist (Larson et al., 1983). Wichtig ist in diesem Zusammenhang außerdem der neonatale Fc-Rezeptor FcRn. In der Schwangerschaft spielt dieser eine wichtige Rolle, da mittels FcRn und dessen Bindung an die Fc-Region der Transport des IgG-Moleküls über die Plazenta zum Fetus möglich ist. Darüber hinaus wird allgemein durch Bindung der IgG-Moleküle am FcRn deren Serumhalbwertszeit verlängert. Allerdings bindet der humane FcRn kaum bzw. nur sehr schwach an murines IgG (Roopenian and Akilesh, 2007, Ober et al., 2001). Dies erklärt eine Verbesserung der Halbwertszeit und damit verbunden eine höhere Wirksamkeit des Antiköpers bei Molekülen mit einer humanen Fc-Region, wie sie durch Chimärisierung oder Humanisierung erzielt wird. Durch verschiedene Ansätze zur Optimierung der Bindung am FcRn-Rezeptor konnten weitere Verbesserungen erzielt werden (Zalevsky et al., 2010, Dall'Acqua et al., 2006). Aber auch Veränderungen in der variablen Region bis in die CDR-Region zeigten positive Effekte in den pharmakokinetischen Eigenschaften von Antikörpermolekülen (Igawa et al., 2010, Datta-Mannan et al., 2015). Darüber hinaus wird die Elimination des Antikörpermoleküls durch die Interaktion mit dem Antigen beeinflusst (Tabrizi et al., 2006). Dieser Effekt (*target mediated drug disposition*) kommt besonders bei niedrigen Antikörperdosen zum Tragen. Damit hat die

Affinität zum Zielantigen einen Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften (Liu, 2018).

1.2.3 Effektivität

Bei der Anwendung therapeutischer Antikörper ging mit den bereits beschriebenen Verbesserungen bezüglich der Immunogenität und Pharmakokinetik auch eine erhöhte Effektivität einher. Die Antikörpertherapie ist mittlerweile unentbehrlich in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, in der Transplantationsmedizin und in der Onkologie (Schäffner and Kabelitz, 2001). Dabei lag in den letzten Jahren ein Schwerpunkt auf der Entwicklung von Antikörpern zur Krebstherapie. Allein 2018 waren 80% der in Phase I getesteten Antikörper aus dem Bereich der Onkologie (Kaplon and Reichert, 2019). Deshalb sollen nun die Wirkungsmechanismen und Optimierung der Antikörpertherapie im Gebiet der Onkologie näher beleuchtet werden. Es wird dabei zwischen direkter und indirekter Zytotoxizität, sowie immunmodulatorische Wirkungsmechanismen auf T-Zellen unterschieden.

Direkte Wirkungsmechanismen

Durch die Bindung des Antikörpers an der Tumorzelle über tumorassoziierte Antigene (TAA) können antitumorale Effekte ausgelöst werden. Eine Möglichkeit, das Wachstum solider Tumoren zu hemmen ist die Blockierung von Wachstumsfaktoren zur Angiogenese, wie beispielsweise durch den 2005 zugelassenen Antikörper Bevacizumab (*Avastin*) (Hurwitz et al., 2004). Darüber hinaus wird über Konjugat-Antikörper (*ADC antibody-drug conjugat*) eine Tumorlyse induziert. Dabei wird ein monoklonaler Antikörper über einen chemischen Linker mit einem Toxin verbunden. Nach Bindung an der Tumorzelle und Internalisierung des Antikörpers wird der Wirkstoff spezifisch in der Tumorzelle freigesetzt. Der monoklonale Antikörper Brentuximab Vedotin (*Adcetris*) bindet an CD30 positiven Tumorzellen und setzt nach Internalisierung das Zellgift Monomethylauristatin E (MMAE) frei, das als Tubulininhibitor zur Apoptose der Tumorzelle führt. *Adcetris* kommt bei der Behandlung des CD30 positiven Hodgkin-Lymphoms zum Einsatz (Okeley et al., 2010, Younes et al., 2012). Zu den direkten antitumoralen Wirkmechanismen gehört außerdem die Rezeptorblockade von Wachstumsrezeptoren, wie etwa des epidermalen Wachstumsrezeptor HER2. Dieser

kann auf Zellen bei Brustkrebs überexprimiert werden und geht mit einer schlechten Wirksamkeit der Hormon- oder Chemotherapie einher. Der Antikörper Trastuzumab, Handelsname *Herceptin*, bindet an den Rezeptor und wirkt antiproliferativ auf die Tumorzelle. So konnte die Prognose der Patientinnen mit Expression des Rezeptors deutlich verbessert werden und ist fester Bestandteil der Therapie (Carter et al., 1992, Senkus et al., 2015). Für Trastuzumab wird neben der Rezeptorblockierung auch ein antitumoraler Effekt auf Grund zellulärer, antikörpervermittelter Zytotoxizität ADCC diskutiert (Varchetta et al., 2007). Diese zählt zu den indirekten Wirkungsmechanismen und wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Indirekte Wirkungsmechanismen

Über die Effektorfunktion der Fc-Region des Antikörpers wird eine „indirekte Zytotoxizität“ vermittelt, da die tatsächliche Lyse der Tumorzellen von Fc-Rezeptor exprimierenden Zellen abhängig ist. Die unter 1.1.2 beschriebenen Mechanismen der zellulären, antikörpervermittelten Zytotoxizität ADCC, sowie die komplementabhängige Zytotoxizität CDC, werden für therapeutische Zwecke genutzt. 1998 wurde mit Rituximab im Bereich der Onkologie der erste therapeutische Antikörper zugelassen. Der monoklonale Antikörper besitzt eine Spezifität für CD20, ein Oberflächenmolekül, das auf Zellen vieler maligner B-Zellerkrankungen aber auch auf normalen B-Zellen exprimiert wird. Rituximab etablierte sich in der Therapie von Lymphomen und der chronischen lymphatischen Leukämie und zeigte unter anderem via ADCC sowie CDC einen antitumoralen Effekt (Reff et al., 1994, Golay et al., 2006, Storz, 2014).

Allgemein konnte die indirekt vermittelte Zytotoxizität verbessert werden, indem durch Veränderungen der Fc-Region des IgG-Moleküls die für die ADCC nötige Bindung des IgG-Moleküls an Fc γ IIIa-Rezeptoren verstärkt, und damit eine erhöhte Wirksamkeit erzielt wurde. Dies wurde durch Aminosäureaustausch in der Fc-Region erreicht (Lazar et al., 2006), sowie durch Glykooptimierung (Shields et al., 2002).

Gegen CD20 wurde beispielsweise der Antikörper Obinutuzumab entwickelt, der durch Glykooptimierung im Fc-Fragment eine erhöhte ADCC, einhergehend mit verbesserter Effektorfunktion, aufwies (Mössner et al., 2010). Obinutuzumab ist unter dem Handelsnamen *Gazyvaro* in der Behandlung der CLL und des follikulären Lymphoms zugelassen (European Medicines Agency, 2017a). Neben der ADCC konnte auch die

CDC therapeutischer Antikörper durch erhöhte Bindung der Fc-Region an den Komplementfaktor C1q verbessert werden (Idusogie et al., 2001, Natsume et al., 2008) .

Die T-Zellfunktion und deren therapeutische Modulierung durch Antikörper

Fc γ -Rezeptor exprimierende Zellen stellen zwar eine wichtige Effektorzellpopulation in der Antikörpertherapie dar, T-Zellen, die in der Regel keinen Fc-Rezeptor tragen, gelten jedoch als die effizientesten Effektorzellen des Immunsystems.

T-Zellen erkennen mithilfe ihres T-Zellrezeptors (*TCR*) ein Antigen, allerdings nur wenn es über den MHC-Komplex (*major-histocompatibility complex*) als Peptidfragment präsentiert wird. Die meisten T-Zellen exprimieren einen T-Zellrezeptor, der aus einer α -Kette, sowie einer β -Kette besteht. Dieses α : β Heterodimer ähnelt dem Fab-Fragment eines Antikörpers mit einer konstanten, sowie einer für die Antigenbindung nötigen, variablen Region. Der TCR ist mit dem Rezeptor CD3 assoziiert, der für die Weiterleitung der Signalkaskade zur Differenzierung und Proliferation der T-Zellen verantwortlich ist, nachdem die Antigenerkennung mittels TCR am MHC-Komplex von antigenpräsentierenden Zellen (*APC antigen-presenting cell*) stattgefunden hat (Kane et al., 2000).

T-Zellen können zunächst in zwei Populationen unterteilt werden, die sich durch die Expression der CD4- bzw. CD8-Korezeptoren unterscheiden. CD8 positiven T-Zellen werden zytolytische Peptide über MHC I, CD4 positiven T-Zellen endosomale Peptide über MHC II präsentiert (Konig, 2002). Die Aktivierung einer naiven T-Zelle durch Antigenpräsentation ist streng restringiert und benötigt mehrere Signale. Zunächst findet zwischen der APC und der T-Zelle ein schwacher Kontakt über Adhäsionsmoleküle statt, der aber noch kein aktivierendes Signal auslöst (Underhill et al., 1999). Der antigenspezifische Kontakt zwischen MHC:Peptidkomplex, und des TCR/CD3 Komplex, sowie des entsprechenden Korezeptors CD4/CD8 führt schließlich zur Aktivierung der T-Zelle. Zur Differenzierung und Proliferation ist allerdings ein zweites Signal durch Bindung der APC an kostimulierende Moleküle auf der T-Zelle nötig, wie des Korezeptors CD28, der an das B7-Molekül auf der APC bindet. Weitere mittlerweile identifizierte kostimulierende Moleküle sind: CD40-Ligand, 4-1BB (CD137) oder OX40. Diese haben eine aktivierende Wirkung auf die T-Zelle (Chen and Flies, 2013). Die Aktivierung der T-Zelle geht mit Zytokinproduktion sowohl durch die APC als auch

durch die T-Zelle einher. So wird durch die T-Zelle beispielsweise der Interleukin 2 Rezeptor exprimiert und es erfolgt auch die autokrine Produktion des Zytokins Interleukin 2 (Acuto and Michel, 2003). Schließlich wird die Differenzierung in die spezifischen Effektorpopulationen maßgeblich durch die Freisetzung von Zytokinen bestimmt (Seder and Ahmed, 2003). Unter den CD4 positiven T-Zellen unterscheidet man zwischen den inflammatorischen T_H1 -Zellen (T-Helferzellen) und den B-Zellaktivierenden T_H2 -Zellen. Bei den CD8 positiven T-Zellen spricht man von den cytotoxischen T-Zellen (*CTL cytotoxic T-Lymphocyte*), die mittels Zytotoxine oder Expression des Fas-Ligand (CD95) spezifisch zur Apoptose der Zielzelle führen (Raphael et al., 2015, Russell and Ley, 2002).

Zur Regulierung der T-Zelle wird auf aktivierten T-Zellen mit der Expression von CD28 auch das Molekül CTLA4 exprimiert, das ebenfalls an den Ligand B7-1 (CD80), sowie B7-2 (CD86) bindet, damit aber zur Hemmung der T-Zelle führt. Das sogenannte B7/CTLA4/CD28 System bildet somit ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung der T-Zelle (Greenwald et al., 2005). Ein weiteres wichtiges Molekül zur Hemmung der Immunantwort ist der PD1-Rezeptor (*programmed cell death protein 1*), der über die Bindung an PDL-1 (B7-H1) und PDL-2 (B7-DC) ebenfalls zur Hemmung der aktivierten T-Zelle führt (Saresella et al., 2012).

Therapeutisch lassen sich diese Regulationswege in der Krebstherapie nutzen. Sogenannte Checkpoint-Inhibitoren wurden entwickelt, um durch Blockierung inhibierender Co-Rezeptoren wie PD-1 und CTLA-4 die Tumorabwehr durch T-Zellen zu erhöhen. Aktuell zugelassene Antikörper sind gegen PD-1 (Pembrolizumab oder Nivolumab) oder gegen CTLA-4 (Ipilimumab) gerichtet (Heinzerling et al., 2019). Bei der Behandlung des fortgeschrittenen malignen Melanoms zeigte deren Einsatz beeindruckende Erfolge. Für Ipilimumab konnte in einer Metaanalyse ein 3-Jahresüberleben von 22% festgestellt werden, das bis zu einer Dauer von 10 Jahren gleichbleibend war (Schadendorf et al., 2015). Mit dem Anti PD-1 Antikörper Pembrolizumab konnte gegenüber Ipilimumab sowohl das progressionsfreie Überleben, als auch die 1-Jahresüberlebensrate noch gesteigert werden (Robert et al., 2015). Auch Nivolumab zeigte sich gegenüber Ipilimumab sowohl hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens (6,9 Monaten gegenüber 2,9 Monaten), als auch für das mediane

Gesamtüberleben nach 4 Jahren (36,9 Monaten gegenüber 19,9 Monaten) überlegen. Noch bessere Ergebnisse konnten mit einer Kombinationstherapie von Nivolumab und Ipilimumab erzielt werden, allerdings traten bei der Kombinationstherapie auch Nebenwirkungen am häufigsten auf (Hodi et al., 2018). Trotzdem bedeutete die Einführung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren einen Meilenstein, da bei metastasierten Tumoren erstmals eine langanhaltende Remission erzielt werden konnte. Immun-Checkpoint-Inhibitoren finden derzeit nicht nur in der Melanomtherapie, sondern auch bei der Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (Reck et al., 2016) oder des Hodgkin Lymphoms (Ansell et al., 2015) Anwendung.

In der Entwicklungsphase sind außerdem sogenannte Immunzytokine, womit die Effektivität des gegen ein Tumorantigen gerichteten Antikörpers gesteigert werden soll. Dabei wird das Antikörpermolekül mit Zytokinen wie IL2 fusioniert. Zytokine, die systemisch verabreicht zu schweren Nebenwirkungen führen, sollen so lokal am Tumor zur Aktivierung des Immunsystems führen (Klein et al., 2017, Bachanova et al., 2015). Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Applikation von CAR T-Zellen. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Form des adaptiven Zelltransfers. *Ex vivo* wird in die DNA autologer T-Zellen mithilfe eines viralen Vektors die Gensequenz für einen Fusionsrezeptor inseriert. Die autologen T-Zellen exprimieren daraufhin einen chimären Antigenrezeptor (*CAR chimeric antigen receptor*). Dieser besteht aus einer extrazellulären Antikörperdomäne, sowie der intrazellulären Signaldomäne des CD3-Rezeptors und einem kostimulierenden Rezeptor, wie CD28 oder 4-1BB. Die CAR T-Zellen werden dem Patienten infundiert und können MHC unabhängig stimuliert werden, sobald eine Bindung über den Antikörperteil erfolgt ist. Dabei werden die intrazellulären Signaldomänen aktiviert (Sadelain et al., 2013). 2018 wurden zwei CAR T-Zell Therapien mit CD19-Spezifität zugelassen: Tisagenlecleucel (*Kymriah*) für refraktäre oder rezidierte ALL im Kindes- und Jugendalter, außerdem auch für Erwachsene mit mehrfach vorbehandelten großzelligen B-Zelllymphom (DLBCL), wie auch Axicabtagene Ciloleucel (*Yescarta*) (European Medicines Agency, 2018a, European Medicines Agency, 2018c). Die individualisierte CAR T-Zelltherapie ist mit erheblichem Aufwand verbunden. Eine weitere und im klinischen Alltag möglicherweise adäquatere Möglichkeit zur zielzellrestringierten Rekrutierung cytotoxischer T-Zellen bietet sich durch die Applikation bispezifischer Antikörper.

1.2.4 Bispezifische Antikörper

Mittels bispezifischer Antikörper können Effektorzellen wie Neutrophile, Makrophagen oder NK-Zellen über deren Fc-Rezeptoren gezielt gegen Tumorzellen gerichtet werden (Weiner et al., 1995, Valone et al., 1995, Stockmeyer et al., 2000). T-Zellen, die effektivsten Zellen zur Immunabwehr, tragen keine Fc-Rezeptoren, mittels bispezifischer Antikörper mit CD3-Spezifität ist es aber möglich, diese Zellen zielzellrestringiert zu aktivieren. Die Entwicklungsschritte bispezifischer Antikörper, aber auch weitere Optimierungspotentiale, werden nun genauer erläutert. Die beschriebenen Antikörperformate sind in Abbildung 1.2.1 dargestellt.

Die Aktivierung von T-Zellen durch einen monoklonalen CD3 Antikörper konnte 1980 nachgewiesen werden (Van Wauwe et al., 1980). Bei monoklonalen Antikörper gegen CD3 ist für die Aktivierung der T-Zelle durch Quervernetzung der TCR/CD3 Komplexe auf der Zelloberfläche die Immobilisierung der Antikörper über Bindung des Fc-Fragment auf einer Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zelle notwendig (Landegren et al., 1984). Dieses Prinzip liegt auch der Funktionsweise bispezifischer Antikörper zugrunde, wobei die Immobilisierung durch die Bindung am TAA und gleichzeitig am CD3-Rezeptor erzielt wird, und damit eine Quervernetzung der TCR/CD3 Komplexe, verbunden mit einer Aktivierung der T-Zelle, erfolgt. Diese Funktionsweise bispezifischer Antikörper wurde in Form chemischer Heterokonjugation zweier monoklonaler IgG-Antikörper, gerichtet gegen ein TAA sowie gegen den TCR/CD3 Komplex, schon in den 1980er Jahren gezeigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die zielgerichtete Aktivierung von T-Zellen sowohl durch murine (Staerz et al., 1985), als auch durch humane T-Zellen (Perez et al., 1985, Jung et al., 1986) zur einer MHC-unabhängigen, aber antigenspezifischen Tumorzelllyse führt.

Zur selben Zeit wurde mit der Quadrom- oder Hybrid-Hybridom-Technologie eine weitere Technologie zur Produktion bispezifischer Antikörper entwickelt. Hierbei werden zwei Hybridome unterschiedlicher Spezifität fusioniert, wobei es sich durch die zufällige Assoziation von leichter und schwerer Kette der beiden Antigenespezifitäten bei einer aus zehn möglichen Paarungen um den gewünschten bispezifischen Antikörper handelt (Milstein and Cuello, 1983). Bei dem ersten in Europa 2009 zugelassenen Antikörper Catumaxomab (*Removab*) handelt es sich um einen trifunktionalen,

bispezifischen Antikörper, hergestellt mittels Hybrid-Hybridom-Technologie. Er besteht aus einer leichten und schweren Kette eines IgG-Moleküls aus der Ratte mit CD3-Spezifität, sowie aus einer murinen leichten und schweren Kette eines IgG-Moleküls, gerichtet gegen das TAA Ep-CAM (*epithelial cell adhesion molecule*). Die spezifische Rekrutierung des Immunsystems zum TAA erfolgt zum einen über die CD3-Spezifität, zum anderen über die Fc γ -Rezeptor-Bindung des IgG-Moleküls (Zeidler et al., 1999). Catumaxomab wurde zur Behandlung des malignen Aszites bei Ep-CAM positiven Karzinomen angewandt (Seimetz, 2011). Aus kommerziellen Gründen wurde der Antikörper mittlerweile aber vom Markt genommen. Der Ansatz der Hybrid-Hybridom-Technologie wurde mit der *knob-into-hole* Technologie weiterentwickelt, wobei durch Mutationen in der CH₃-Domäne die Assoziation der schweren Ketten mit identischer Antigen-spezifität vermieden werden sollte (Ridgway et al., 1996). Die Heterodimerisierung zwischen unterschiedlicher leichter und schwerer Kette sollte durch den Austausch der schweren und leichten Domäne im Fab-Fragment innerhalb einer Antikörperspezifität verhindert werden (Schaefer et al., 2011).

Beide vorgestellte Konzepte arbeiteten zunächst mit einem funktionellen Fc-Teil. Bei bispezifischen Antikörpern mit CD3-Spezifität kann dies aber zu einer *off-target* Aktivierung der T-Zellen führen. Ohne Anwesenheit von Zielzellen kommt es durch die Bindung an der Fc-Region zur Quervernetzung und damit Aktivierung der T-Zellen (Weiner et al., 1994). Jung et al. gelang es durch Generierung von Fc-freien bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten eine zielrestringierte Aktivierung von T-Zellen zu erzielen (Jung et al., 1991). Die Generierung von single chain Fv-Molekülen (scFv) war die Basis für die Entwicklung noch kleinerer bispezifischer Moleküle als F(ab')₂-Antikörper. Bei scFv-Molekülen handelt es sich um die antigenbindende Einheit V_H und V_L, verbunden über einen Peptidlinker (Bird et al., 1988).

Basierend auf scFv-Molekülen wurden in der Folgezeit verschiedene bispezifische Antikörperformate generiert, eine Auswahl wird nun vorgestellt: Bei *bispecific diabodies* handelt es sich um zwei Polypeptidketten, wobei die V_L-Domäne der einen mit der V_H-Domäne der anderen Antigen-spezifität über einen kurzen Peptidlinker verbunden ist. Bei Heterodimerisierung der beiden Ketten kommt es zur Anlagerung der komplementären

Variablen und eine Antigenbindung ist möglich (Holliger et al., 1993). Aus der Entwicklung des *bispecific scFv* (bsscFv/bssc), bestehend aus zwei scFv-Molekülen unterschiedlicher Spezifität (Mallender and Voss, 1994, Mack et al., 1995) gelang mit der Auswahl der Antigene CD19 und CD3 mit Blinatumomab der Sprung in die Klinik. Der 2014 zugelassene BiTE-Antikörper (*bi-specific T-cell engager*) Blinatumomab (*Blinicyto*) ist aktuell der einzige, therapeutisch angewandte bispezifische Antikörper. Er wird in der Therapie der CD19 positiven ALL verwendet (Buie et al., 2015). Kleine bispezifische Moleküle haben allerdings den Nachteil einer stark verkürzten Halbwertszeit. Hinzu kommt der fehlende Fc-Teil und damit keine Interaktion mit dem FcRn-Rezeptor, was ebenfalls zu einer verkürzten Halbwertszeit führt (Holliger and Hudson, 2005, Kontermann, 2009). Im Falle von Blinatumomab, mit einer Halbwertszeit von circa 1,25 Stunden, erfolgt die klinische Anwendung deshalb in Form einer vierwöchigen Dauerinfusion (Topp et al., 2015, Klinger et al., 2012). Neben dem finanziellen Aspekt stellt vor allem die Belastung der Patienten durch eine solche Therapieform einen wichtigen Grund zur Entwicklung bispezifischer, funktioneller Antikörper mit verlängerter Halbwertszeit dar.

Durben et al entwickelte 2015 mit dem FLT3xCD3 Fabsc-Konstrukt ein neues bispezifisches Antikörperformat basierend auf den Arbeiten von Coloma und Morrison (Coloma and Morrison, 1997). Bei dem bispezifische Molekül handelt es sich nun aber um einen sogenannten „halbarm“ Antikörper, dargestellt in Abbildung 1.2.1 J. N-terminal besitzt der Antikörper eine Spezifität gegen den FLT3-Rezeptor exprimiert auf entarteten Zellen der myeloischen Reihe, wie bei der akuten myeloischen Leukämie (AML). Die schwere Kette besteht aus der Domäne C_{H1} und C_{H2}, welche als Linker zu dem scFv fungiert, das eine CD3-Antigenspezifität besitzt. Durch Aminosäureaustausch in der C_{H2} Domäne wurde eine Attenuierung der FcR γ -Rezeptorbindung erzielt. Um die Dimerisierung zweier Fabsc-Moleküle zu verhindern, wurden in der Hinge Region ebenfalls Aminosäuren ausgetauscht, sowie die C_{H3} Domäne fast vollständig deletiert. Dadurch ist keine Bindung an den FcRn-Rezeptor möglich, was mit einer erniedrigten Halbwertszeit einhergeht. Zwar besitzt das Fabsc-Molekül mit 90 kDa ein höheres Molekulargewicht als das 50kDa schwere FLT3xCD3 bssc-Molekül, es weist allerdings keine wesentliche Verbesserung in der Halbwertszeit auf. Diese lag lediglich bei circa 3 Stunden (Durben et al., 2015). Durch Coloma und Morrison wurde in ihrer Arbeit zur

Generierung eines bispezifischen, tetravalenten IgGsc-Antikörpers ebenfalls die Fusion von scFv-Fragment an der schweren Kette beschrieben, allerdings bei einem IgG-Molekül am C-Terminus der CH₃-Domäne bzw. in der Hinge-Region (Coloma and Morrison, 1997).

Auf Grundlage der beiden vorgestellten Formate wurde durch Zekri et al ein tetravalentes, bispezifisches IgGsc-Konstrukt entwickelt, abgebildet unter 1.2.1 E. Wie das beschriebene Fabsc-Molekül enthält es einen attenuierten Fc-Teil in der C_{H2} Domäne. Da es sich um ein vollständiges IgG-Molekül mit C_{H3} Domäne handelt, besitzt das IgGsc-Molekül eine deutlich verlängerte Halbwertszeit (Zekri et al., 2021). C-Terminus an der schweren Kette ist das IgG-Konstrukt jeweils mit einem single-chain Fragment (scFv) gegen CD3 fusioniert. In der vorliegenden Arbeit soll das FLT3xCD3 Fabsc-Format in Form eines FLT3xCD3 IgGsc-Moleküls zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie optimiert werden. Ziel war die Generierung eines bispezifischen Antikörpers gegen die akute myeloische Leukämie, der, anders als das Fabsc-Konstrukt, durch eine längere Serumhalbwertszeit für die klinische Anwendung besser geeignet ist. Im Folgenden wird zunächst auf die AML mit dem Zielantigen FLT3 und auf verschiedene Behandlungsansätze eingegangen.

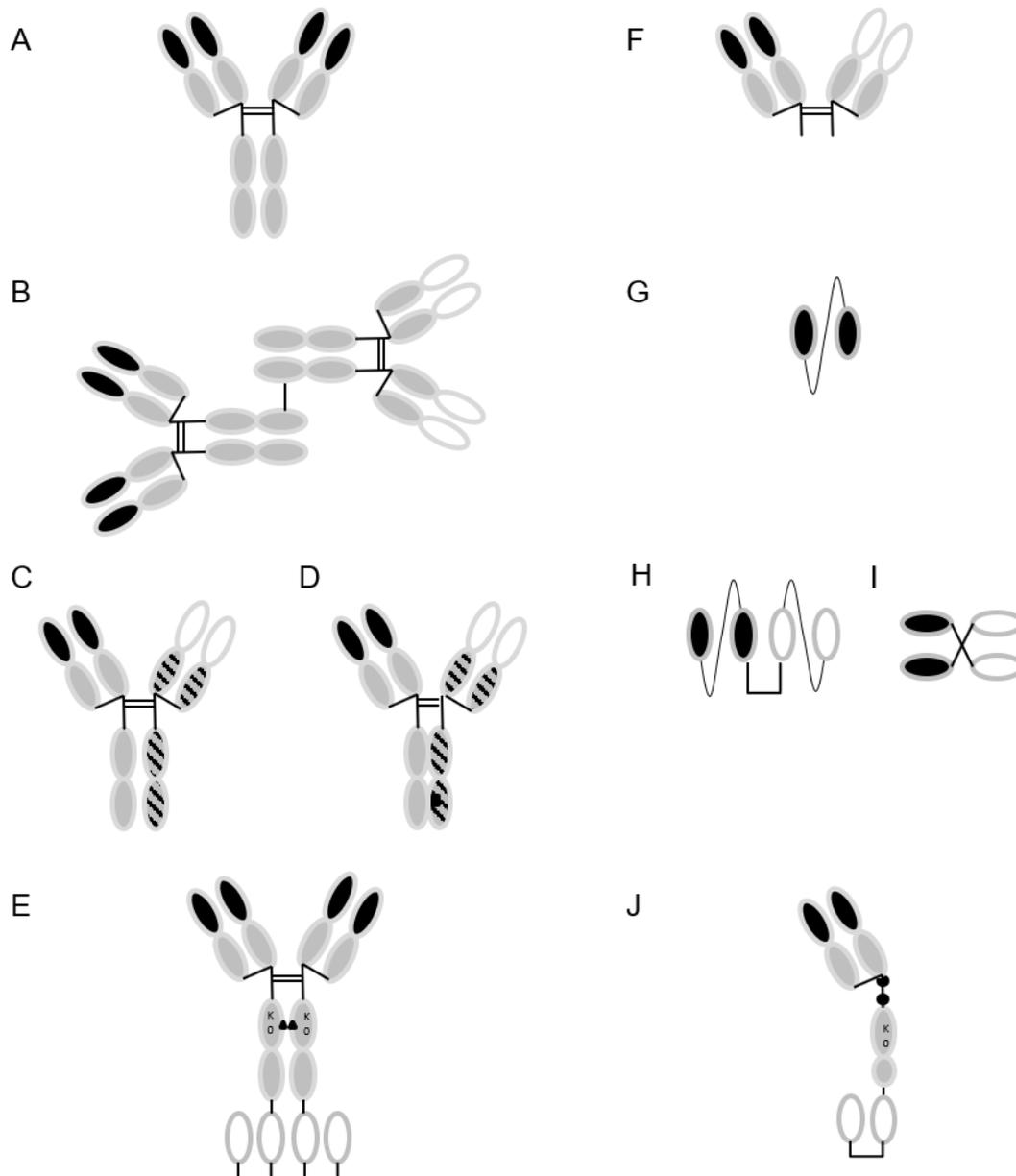


Abbildung 1.2.1: Antikörperformate

- A: monospezifisches IgG-Molekül
- B: bispezifisches chemisches Heterokonjugat aus zwei IgG-Molekülen
- C: bispezifisches IgG-Molekül, hergestellt mittels Hybrid-Hybridom-Technologie
- D: knob-into-hole Format
- E: bispezifisches tetravalentes IgGsc-Molekül
- F: bispezifisches chemisch konjugierte F(ab)₂-Molekül
- G: single-chain Fragment scFv
- H: *bispecific scFv*
- I: *bispecific diabody*
- J: bispezifisches Fabsc-Molekül („halbarm“ Antikörper)

1.3 Akute myeloische Leukämie

Bei Leukämien handelt es sich um eine Krebsform des hämatopoetischen Systems. Eine gestörte Differenzierung und unkontrollierte Teilung einer Stamm- oder Progenitorzelle im Knochenmark führt zur Beeinträchtigung der Blutbildung. Es kommt in der Regel zur Ausschwemmung der unreifen, nicht funktionsfähigen Zellen, sogenannte Blasten, in das Blut. Dabei wird zwischen der Entartung der lymphatischen Stammzellreihe (Lymphozyten) und der myeloischen Stammzellreihe (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten) unterschieden. Außerdem erfolgt eine Differenzierung zwischen der chronischen und der akuten Leukämie. Knochenmarkserkrankungen wie die myeloproliferativen Erkrankungen und myelodysplastischen Erkrankungen können in eine Leukämie übergehen. Ab einem Blastenanteil über 20% im peripheren Blut oder im Knochenmark spricht man per definitionem von der akuten myeloischen Leukämie (Röllig et al., 2018).

Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich 3,05 Personen/100.000 Einwohner im Erwachsenenalter an der akuten myeloischen Leukämie (AML); die Inzidenzrate für Leukämieerkrankungen liegt nur für die chronische lymphatische Leukämie (CLL) höher. Die AML ist eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters, der Altersgipfel liegt mit 47,7% bei Patienten älter als 70 Jahren. Die Prognose für das relative 5-Jahre-Überleben ist für die AML mit 24,1% deutlich schlechter als bei anderen Leukämieformen. Hinzu kommt, dass bei AML Patienten über 70 Jahren, die den größten Anteil der Betroffenen bilden, nur 8% ein relatives 5-Jahre-Überleben aufweisen (Nennecke et al., 2014).

Klassifikation

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine Erkrankung mit großer biologischer Heterogenität. Verschiedenste molekular-zytogenetische Veränderungen, wie chromosomale Aberrationen und Genmutationen, sind kennzeichnend für die AML. Deshalb ist neben der mikroskopischen und immunphänotypischen Analyse auch eine zytogenetische und molekularbiologische Untersuchung bei Diagnosestellung notwendig. Diese sind entscheidend für die Einteilung nach WHO-Klassifikation, die die morphologische Einteilung nach der FAB (*French-American-British*)-Klassifikation in

der Klinik mittlerweile abgelöst hat (Arber et al., 2016). Außerdem lassen sich aufgrund zytogenetischer und molekularer Veränderungen nach der ELN (*European Leukemia Network*)-Klassifikation Risikogruppen bilden, die Einfluss auf die Therapieentscheidung nehmen und eine Einschätzung zur Prognose liefern. Deshalb sollte neben zytogenetischen Veränderungen, wie Translokationen, etwa t(8;21) und (15;17), oder der Inversion inv(16), immer eine genetische Analyse der Gene NPM1, CEBPA und RUNX1 (Transkriptionsfaktoren), FLT3 (Signaltransduktion), ASXL1 (Chromatinmodifikator), sowie TP53 (Tumorsuppressorgen) erfolgen (Döhner et al., 2017). Entscheidend für die Zuordnung in die günstige, intermediäre oder ungünstige Risikogruppe sind Mutationen im Gen NPM1 sowie die interne Tandemduplikation im FLT3-Gen (FLT3-ITD). Genmutationen von RUNX1, ASXL1 und TP53 führen zur Zuordnung in die ungünstige Risikogruppe. Im Weiteren wird die Therapie und der Einfluss der molekular-zytologischen Diagnostik beschrieben. Abzugrenzen davon ist die akute promyelozytäre Leukämie, die mit einem anderen Therapieschema als das im weiteren Verlauf beschriebene, und damit verbunden einer günstigeren Prognose einhergeht (Röllig et al., 2018).

Therapie

Für das Therapieschema ist neben molekular-zytogenetischen Faktoren auch die Unterscheidung zwischen jungen und älteren Patienten über 65 Jahren zu berücksichtigen. Zu Therapiebeginn erfolgt eine Induktionstherapie mit dem Ziel, eine Komplettremission (*CR complete remission*) zu erreichen. Daran soll sich dann eine Konsolidierungstherapie anschließen, um die CR zu erhalten. Die Induktionstherapie erfolgt meist in dem sogenannten „7+3-Schema“ mit Cytarabin und einem Anthrazyklin; das genaue Therapieschema ist altersabhängig. Wichtig ist hier FLT3-Mutationen zu beachten, da dann zusätzlich ein Multikinaseinhibitor, Midostaurin, verwendet wird. Wird nach der Induktionstherapie eine Komplettremission erreicht, erfolgt die Postremissionstherapie bzw. Konsolidierungstherapie. Hier ist die Zuordnung der Risikogruppe entscheidend. Für Patienten der ungünstigen Risikogruppe ist eine hochdosierte Chemotherapie nicht ausreichend, sondern es muss eine allogene Stammzelltransplantation erfolgen (Röllig et al., 2018, Spiekermann and Shen, 2019). Zusammengefasst zeigt sich also die prognostische therapeutische Bedeutung der molekularen und zytogenetische Analyse im klinischen Alltag am Beispiel des FLT3-

Gens besonders deutlich. Prognostisch ist eine Mutation des FLT3-Gens wie die ITD-Mutation ungünstig, da diese mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergeht (Thiede et al., 2002, Whitman et al., 2001). Allerdings gibt es in diesem Fall auch neue Therapieansätze: so kann durch die Anwendung des Multikinaseinhibitors Midostaurin (*Rydapt*) bei FLT3 Mutationen das Gesamtüberleben verlängert und die 4-Jahres-Überlebensrate erhöht werden (Stone et al., 2017). Es ist seit 2017 in Kombination mit der Standard-Induktionschemotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie in der Konsolidierungsphase zugelassen (European Medicines Agency, 2017b). Wegen seiner prognostischen Bedeutung für die AML-Erkrankung soll nun der FLT3-Rezeptor genauer beleuchtet werden.

1.3.1 FLT3-Rezeptor

Der FLT3-Rezeptor (FMS-like tyrosine kinase 3 Receptor) ist auch bekannt als FLK-2 (fetal liver kinase-2), STK-1 (human stem cell kinase-1) oder als CD135. FLT3 gehört zu der Familie der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen, wie c-KIT (*stem cell factor receptor*) oder PDGFR (*platelet-derived-growth factor receptor*) und weist den typischen strukturellen Aufbau auf.

Struktur und Expression des FLT3-Rezeptors

Die extrazelluläre Region besteht aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen, verbunden über eine Transmembrandomäne zu der intrazellulären Juxtamembrandomäne (JM) und einer geteilten Kinase-Domäne (Rosnet et al., 1993, Agnes et al., 1994). Durch Bindung des FLT3-Liganden kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und durch Transphosphorylierungen der JM zur Konformationsänderung und Aktivierung der Kinaseaktivität (Griffith et al., 2004). Dies führt zur Induktion von Signaltransduktionskaskaden die zur Proliferation und Differenzierung der Zelle führen (Choudhary et al., 2005). So ist der FLT3-Rezeptor für die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen von großer Bedeutung (Lyman et al., 1993). Er wird auf CD34 positiven hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, sowie auf unreifen Vorläuferzellen der myeloiden Reihe und der B-Zellreihe (Turner et al., 1996, Rosnet et al., 1993). Er ist außerdem in sehr niedriger Expression auf Monozyten zu finden (Rappold et al., 1997, Hofmann et al., 2012), sowie auf Zellen der Plazenta, Leber oder des Thymus (Rosnet et al., 1993). Darüber hinaus wird der FLT3-Rezeptor bei akuter

Leukämie, sowohl bei der ALL als auch vor allem bei der AML auf rund 90% der malignen Zellen überexprimiert, was durch Bindung des FLT3-Liganden zum Überleben und Proliferation der malignen Zelle führen kann (Carow et al., 1996, Birg et al., 1992).

Mutationen des FLT3-Rezeptors

Wie bereits beschrieben, erfolgt bei Diagnostik der AML eine molekulare Analyse des FLT3-Gens. Bei etwa 20-25% der AML-Patienten lässt sich eine interne Tandemduplikation (ITD) in der Gensequenz, codierend für die juxtamembrane Domäne, finden (Nakao et al., 1996). Bei ca 7% liegt eine Punktmutation in der Tyrosinkinase vor (Spiekermann et al., 2005). Die Mutationen bedingen eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors und damit eine Auslösung aktivierender Signalkaskaden in der malignen Zelle (Hayakawa et al., 2000, Yamamoto et al., 2001). Wie schon beschrieben, lassen sich durch die Inhibierung dieser Signaltransduktionen bei Mutationen im FLT3-Gen mit dem Multikinaseinhibitor Midostaurin therapeutische Erfolge erzielen. Midostaurin zählt zur ersten Generation der FLT3-Inhibitoren, die ebenso Kinasen wie c-Kit oder PDGFR inhibieren. FLT3-Inhibitoren der neuen Generation, wie Crenolanib oder Gilterinib, richten sich spezifischer gegen die FLT3 Tyrosinkinase, wovon man sich eine höhere Wirksamkeit verspricht (Short et al., 2019). Neben Tyrosinkinaseinhibitoren werden weitere innovative Therapiemöglichkeiten der AML entwickelt, wie beispielsweise die Antikörpertherapie.

1.3.2 Antikörpertherapie bei der Behandlung der AML

Checkpoint-Inhibitoren haben in den letzten Jahren eine große Bedeutung in der Onkologie gewonnen (vgl. 1.2.3). Auch in der Behandlung der AML gibt es vielversprechende klinische Studien mit Checkpoint-Inhibitoren (Berger et al., 2008, Davids et al., 2016). Darüber hinaus werden zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie verschiedene Antikörperformate mit unterschiedlichen Zielantigenen entwickelt. Dabei werden verschiedene, mit der Erkrankung assoziierte Moleküle, wie CD33, CD123 (Interleukin-3 Rezeptor), CLEC12A (*CLL1 c-type lectin-like molecule-1*) oder der bereits vorgestellte FLT3 Rezeptor als Zielantigen verwendet (Beyar-Katz and Gill, 2018). Für die Behandlung der AML ist aktuell nur der monospezifische Konjugatantikörper Gentuzumab ozogamicin (*Mylotarg*) zugelassen. Gerichtet gegen das Oberflächenmolekül CD33 wird nach Internalisierung das konjugierte Toxin

Calicheamicin freigesetzt und wirkt zytotoxisch auf die Zelle. Nachdem die im Jahr 2000 erlassene Zulassung 2010 widerrufen worden war, konnten Studien mit einer niedrigeren, fraktionierten Dosierung die Wirksamkeit, bezogen auf ein verlängertes ereignisfreies Überleben, nachweisen (Castaigne et al., 2012). Gentuzumab ozogamicin ist seit 2018 in der Behandlung neu diagnostizierter, unbehandelter, CD33 positiver AML bei Erwachsenen und Kindern ab fünfzehn Jahren in der Kombination mit Daunorubicin und Cytarabin zugelassen (European Medicines Agency, 2018b). Ein bispezifischer CD33xCD3 Antikörper (AMG 330) im BiTE-Format befindet sich in einer Phase 1 Studie (Krupka et al., 2014). Bei CD33 handelt es sich allerdings um einen panmyelozytären Marker, der unter anderem auch stark auf Monozyten im Blut und auf Makrophagen im Gewebe exprimiert wird (Griffin et al., 1984, Hoyer et al., 2008). Gegen weitere Zielantigene befinden sich derzeit ebenfalls bispezifische und monospezifische Antikörper in klinischen Studien, wie beispielsweise gegen CD123 gerichtete Antikörper (Uy et al., 2017, Akiyama et al., 2015, Kovtun et al., 2018). Es gilt aber zu bedenken, dass CD123 auch auf basophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird (Valent, 1994). Wie unter 1.3.1 beschrieben handelt es sich hingegen bei dem FLT3-Rezeptor um ein Oberflächenmolekül mit einem restringierten Expressionsprofil. Ein monospezifischer Fc-optimierter FLT3 Antikörper (*FLYSYN*) (Hofmann et al., 2012) befindet sich aktuell in einer Phase 1 Studie, außerdem konnte in *ex vivo* Experimenten mit AML-Zellen bereits die Wirksamkeit des unter Kapitel 1.2.4 beschriebenen bispezifischen FLT3xCD3 Fabsc-Antikörper nachgewiesen werden (Durben et al., 2015). Bei FLT3 handelt es sich also um ein vielversprechendes Zielantigen der Antikörpertherapie. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit FLT3 als Zielantigen für das unter Kapitel 1.2.4 beschriebenen IgGsc-Konstrukt ausgewählt. So sollte ein bispezifischer Antikörper mit verlängerter Halbwertszeit zur Behandlung der AML entwickelt werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war vor dem oben geschilderten Hintergrund die Optimierung eines bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpers zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie. Es wurde in folgender Weise vorgegangen:

1. Vergleich der Affinität des Fabsc- und IgGsc-Moleküls

Unter 1.2.4 wird das bispezifische Fabsc-Format, sowie das durch Zekri et al optimierte IgGsc-Format vorgestellt. Es erfolgte die Charakterisierung und Analyse der Fähigkeit zur Rekrutierung der Zielzellen des tetravalenten bispezifischen FLT3xCD3 IgGsc-Antikörper im Vergleich mit dem FLT3xCD3 Fabsc.

2. Optimierung der Affinität des IgGsc-Moleküls

Affinitätsveränderungen des IgGsc-Moleküls an CD3 werden auf deren Einfluss bezüglich Bindung und Zielzellyse untersucht. Ebenso wird die Wirkung der Affinitätsveränderung zum Tumorzielantigen FLT3 analysiert. So sollte neben dem Format auch die Affinität des Antikörpers zu Ziel- und Effektorzellen optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System	ThermoFisherScientific, Schwerte
Äkta pure	GE Healthcare, München
Brutschrank Heraeus function line	Thermo Electron, Waltham, USA
Brutschrank APT.line® CB	Binder, Tuttlingen
Dispensor Multipette	Eppendorf, Hamburg
DryEasy Mini-Gel Drying System	Novex, San Diego, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1	GE Healthcare, München
Einkanalschreiber Rec101	GE Healthcare, München
Heizrührer MR 2002	HeidolphInstruments, Schwabach
MicroBeta Counter 1450 Plus	PerkinElmer, Rodgau
MicroBeta2 2450 Microplate Counter	PerkinElmer, Rodgau
NanoDrop™ 1000	ThermoFisherScientific, Schwerte
Peristaltikpumpe P-1	GE Healthcare, München
pH-Messgerät Seven Multi	Mettler-Toledo, Giessen
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, CH
Schüttler Multitron	Infors, Bottmingen, CH
SMART SYSTEM	GE Healthcare, München
Sterilbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Chur, CH
Thermocycler PTC-100	BioRad, Waltham, USA
Trockenschrank Heraeus ET	Thermo Electron, Waltham, USA
UV-Tisch FLX-20M und TFX-20M	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer Vibro-Fix VF2	Ika Labortechnik, Staufen

Waagen (Fein- und Tischwaage)	Satorius, Göttingen
Wippe Rocky RT-1	Fröbel, Lindau
Zell-Harvester ICH-110-96	Inotech, Dottikon, CH
Zentrifugen	
Heraeus Biofuge A und Biofuge fresco	Thermo Electron, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0 und 2.0R	Thermo Electron, Waltham, USA
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC 50 Plus	Thermo Electron, Waltham, USA

2.1.2 Glas und Plastikwaren

Bechergläser, Glas	Schott, Mainz
Bechergläser, Plastik	Vitalab, Großostheim
Bottletop Filter (0,22µm Porengröße)	Millipore, Schwalbach
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cryobox	Merck, Darmstadt
Einmalpipetten Plastik	BD, Heidelberg
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	
Einmalpipetten Plastik 50 ml	Corning, Kaiserslautern
Einmalspritzen Plastik	BD, Heidelberg
Erlenmeyerkolben Simax 500ml, 1 l	Bohemia Cristal, Selb
Filtermatten Melti Lex A	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Glasflaschen 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l	Schott, Mainz
Messzylinder Plastik	Vitalab, Großostheim
100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l	
Mikrokonzentratoren Amicon Ultra-15	Millipore, Schwalbach
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Weinheim
Pasteurpipetten, Long size	WU, Mainz
PCR-Softtubes 0,5 ml	Biozym, Oldenburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

20 µl, 200 µl, 1000 µl	
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen, gefiltert	Biozym, Oldendorf
10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Röhrchen 15 ml	BD, Heidelberg
Präzisions-Küvetten Suprasil® halbmikro	Hellma, Basel, CH
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten 96-well flat / round bottom	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenbecher 500 ml	Nalgene, Hereford, UK
Zentrifugenröhrchen SS34	Nalgene, Hereford, UK
Zentrikon Amicon Ultra 10 kDa und 30 kDa	Millipore, Schwalbach

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

3[H]-methyl-Thymidin (1 mCi/ml)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Agarose	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD, Heidelberg
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Lonza, Basel, CH
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt

Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethanol, vergällt (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol, zur Analyse (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr) 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse	BD, Heidelberg
HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg	GE Healthcare, München
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lymphocyte Separation Media LSM1077	Lonza, Basel, CH
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Phytohemagglutinin (PHA-L)	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Steinheim
Rekombinantes Protein A, Agarose-immobilisiert	GE Healthcare, München
Superdex™ 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare München
Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer, Rodgau
Triton® X-100	Sigma, Steinheim
Trizma Base (Tris-Base)	Sigma, Steinheim
Trypanblau (0,4%)	Sigma, Steinheim
Tuerk'sche Lösung	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim

2.1.4 Puffer und Medien

Zellkulturlösungen und Reagenzien

Fötale Kälberserum (FCS)	Lonza, Basel, CH
IMDM	Lonza, Basel, CH
L-Glutamin (200 mM)	Lonza, Basel, CH
MEM-non-essential amino acids (100x)	PAA Pasching, A
Natrium-Pyruvat (100mM)	Merck, Darmstadt
RPMI 1640	Lonza, Basel, CH

Zellkulturmedien

Einfriermedium	90 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Serumfreies RPMI	RPMI 1640 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Trypan-Blau	0,1 % Trypan-Blau in DPBS

Puffer und Medien für die Molekularbiologie

Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml)	Ampicillin in H ₂ O (bidest.)
dNTP-Stocklösung	dATP, dCTP, dGTP, dTTP [je 10 mM] in H ₂ O (bidest)
DNA-Ladepuffer (6x)	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA in H ₂ O (bidest, pH 7,6)
DNA-Ladepuffer Orange G (6x)	0,6 ml Orange G (10x) 1,8 ml Glycerin 3,6 ml TAE-Puffer (1x)
EtBr-Stocklösung [10 mg/ml]	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (flüssig)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl H ₂ O (bidest.) ad 1 l
LB-Medium (Platten)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar H ₂ O (bidest.) ad 1 l 1 ml Ampicillin-Stocklösung
Orange G (10x)	200 mg Orange G in 5 ml H ₂ O (bidest.)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure

	50 mM EDTA n H ₂ O (bidest.), pH 8,5
TfbI	30 mM Kaliumacetat (CH ₃ COOK) 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% (w/v) Glycerin mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt sterilfiltriert
TfbII	10 mM MOPS pH 7 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% (w/v) Glycerin sterilfiltriert
Puffer für die SDS Page	
10x Tris/Glycin/SDS Puffer	Bio-Rad, München
2x Laemmli Sample Puffer	Bio Rad, München
Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	0,1% Brilliant Blue 10% Essigsäure 40% Methanol 50 H ₂ O (bidest.)

Chromatographische Verfahren

0,1 M Glycin-Puffer pH 2,5	0,1 M Glycin in H ₂ O (bidest.) mit HCl auf pH 2,3 justiert
-------------------------------	--

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer	1% FCS (hitzeinaktiviert) 0,02% NaN ₃ in DPBS
FACS-Puffer II	1% FCS (hitzeinaktiviert) 0,02% NaN ₃ 50 µg/ml humIgG (Flebogamma)
7-Aminoactinomycin (7-AAD Viability staining solution)	Biolegend, Fell

2.1.5 Enzyme

Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt
KAPA HiFi Polymerase	KAPA BIOSYSTEMS, Boston, USA
Restriktionsenzyme, diverse	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	Roche, Mannheim

2.1.6 Größenmarker für die Gelelektrophorese

1kB Plus Marker und 100 bp Marker	New England Biolabs, Frankfurt
1kB+ Gene Ruler	ThermoFisher Scientific, Schwerte
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	ThermoFisher Scientific, Schwerte

2.1.7 Gebrauchsfertige Kits

BD™ Anti-Mouse Ig, kappa /Negative control (FBS) Compensation Particles Set	BD Biosciences, Heidelberg
Mini-PROTEAN® TGX 10% Precast Gele	Bio-Rad, München
ExpiCHO™ Expression System Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
BioTrap Gelelutions-Starterkit	Schleicher & Schuell, Dassel
2x Laemmli Sample Puffer	Bio-Rad, München
10x Tris/Glycin/SDS-Puffer	Bio-Rad, München
PROTEOSTAT® Thermal shift stability assay kit	Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen
QIAGEN® Plasmid-DNA Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

2.1.8 Software

CellQuest Pro	BD, Heidelberg
FlowJo	TreeStar Inc., Ashland, USA
GATC Viewer	GATC Biotech, Konstanz
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
MS Excel 2010	Microsoft, München
MS Powerpoint 2010	Microsoft, München
MS Word 2010	Microsoft, München
7500 Fast Software v2.0.6	ThermoFisherScientific, Schwerte

2.1.9 Oligonukleotide

pGH1 insert forward	5'-cgccaccagacataatagctga-3'
pGH1 insert reverse	5'-cagatggctggcaactagaagg-3'

2.1.10 Bakterienstämme

E.coli DH5 α , MBI Fermentas, St. Leon Rot.

2.1.11 Plasmide

Für die Expression des FLT3xCD3 IgGsc-Antikörpers in ExpiCHO-S Zellen wurde der Vektor pGH1.2-HC-NP-(h10B3_PSMA)CO(UCHT-1)VL-VH benötigt. Dieser wurde für die Klonierung der schweren Kette, verbunden mit dem CD3 single-chain-fragment verwendet. Die variable Domäne für PSMA, flankiert von PsPOMI und BamHI, wurde mit dem Insert der variablen Domäne mit muriner FLT3-Spezifität des Plasmids pGH1.2-FLT3_4G8_SDIE_CDSL über die bereits genannten Schnittstellen PsPOMI und BamH ausgetauscht. Für die Expression der leichten Kette mit muriner FLT3-Spezifität wurde der Vektor pGH1-LC_4G8kappa verwendet.

2.1.12 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper werden in den folgenden Tabellen 2.1-1 und 2.1-2 beschrieben. Es wird unterschieden zwischen konjugierten und nicht konjugierten Antikörper.

Tabelle 2.1-1: Unkonjugierte Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Format	Spezies	Bezugsquelle
CC2	murines FLT3 und humanisiertes CD3	IgGsc	chimärer Maus/Mensch AK	selbst hergestellt
M8	murines FLT3 und hum. CD3	IgGsc	chimärer Maus/Mensch AK	Dr. Martin Pflügler
M18	murines FLT3 und hum. CD3	IgGsc	chimärer Maus/Mensch AK	Dr. Martin Pflügler
K74D	murines FLT3 und hum. CD3	IgGsc	chimärer Maus/Mensch AK	Dr. Martin Pflügler
Fabsc	murines FLT3 und hum. CD3	Fabsc	chimärer Maus/Mensch AK	Dr. Martin Pflügler
hCC2	hum. FLT3 und hum. CD3	IgGsc	humanisiert	Dr. Martin Pflügler
hextCC2	hum. FLT3 und hum. CD3	IgGsc	humanisiert	Dr. Martin Pflügler
I55A	hum. FLT3 und hum. CD3	IgGsc	humanisiert	Dr. Martin Pflügler
MOPC	unbekannt und hum. CD3	IgGsc/Fabsc	humanisiert	Dr. Martin Pflügler
Flebogamma	polyklonal		human	Grifols international S.A.

Tabelle 2.1-2: Konjugierte Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
humanes CD4	PacificBlue	OKT4	Maus I γ 2b, κ	Biologend, Fell
humanes CD4	FITC	HP2/6	Maus I γ 2a, κ	Abteilung für Immunologie
humanes CD8a	APC/Cy7	HIT8a	Maus I γ 1, κ	Biologend, Fell
humanes CD8	FITC	OKT8	Maus I γ 2a, κ	Abteilung für Immunologie
humanes CD14	APC/Cy7	HCD14	Maus I γ 1, κ	Biologend, Fell
humanes CD14	Pe/Cy7	HCD14	Maus I γ 1, κ	Biologend, Fell
humanes CD19	PacificBlue	HIB19	Maus I γ 1, κ	Biologend, Fell
humanes CD33	APC	WM53	Maus I γ 1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
humanes CD45	Amcyan	2D1	Maus I γ 1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
humanes CD69	PE	FN50	Maus I γ 1, κ	Biologend, Fell
humanes CD117	PeCy7	104D2	Maus I γ 1, κ	Biologend, Fell
humanes IgG, Fc γ spez.	RPE		Ziege F(ab') ₂ Fragment	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

2.1.13 Zelllinien

Alle in der Arbeit verwendeten Zelllinien werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.1-3: Zelllinien

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
Jurkat	humane akute T-Zellen-Leukämie	DSMZ Braunschweig
Nalm-16	humane B-Vorläuferzellen-Leukämie	DSMZ Braunschweig
REH	humane B-Vorläuferzellen-Leukämie	DSMZ Braunschweig
ExpiCHO-S cells	Subklon aus Ovarialzellen eines chinesischen Hamsters	ThermoFisher Scientific, Schwerte

2.1.14 Primäre humane Zelllinien

Blutproben gesunder Spender (Votum 156/2012B01, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen) wurden mit deren Einverständnis bearbeitet.

Blutproben von AML-Patienten (Votum 13/2007V, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen) wurden von Prof. H. Salih (Klinische Kooperationsseinheit Translationale Immunologie, Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung, Department für Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Der Restriktionsverdau der DNA wurde für die Analyse oder Präparation von DNA-Sequenzen benötigt. Sowohl der analytische Verdau als auch der präparative Verdau erfolgte bei optimaler Temperatur und je nach Restriktionsendonuklease im entsprechenden Puffer.

Analytischer Restriktionsverdau

Damit Bakterienklone auf die Insertion des entsprechenden DNA Fragments in ein Plasmid überprüft werden konnten, war ein analytischer Verdau nötig.

Die analytische Reaktion erfolgte in einem Volumen von 10 µl für 30-60 Minuten.

Plasmid-DNA	1µl
10x Reaktionspuffer	1µl
Restriktionsendonuklease	10 U
H ₂ O (bidest.)	ad 10 µl

Präparativer Restriktionsverdau

Ein präparativer Verdau war nötig, um DNA-Fragmente aus bereits bestehenden Vektoren zu isolieren. Hier erfolgte die analytische Reaktion in einem Volumen von 100 µl und wurde mit Mineralöl überschichtet. Es folgte eine Inkubation für mindestens 14-16 Stunden.

Plasmid-DNA	10 µl
10x Reaktionspuffer	10 µl
Restriktionsendonukleasen	10 U
H ₂ O (bidest.)	ad 100 µl

2.2.2 Agarosegelelektrophorese zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA

Über die Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem elektrischen Spannungsfeld auftrennen und werden mit Markerbanden verglichen, die entsprechend ihrer elektrischen Ladung Richtung der Anode wandern. Für die Auftrennung wurde ein 1% (w/v) Agarosegel in 1x TAE mit Ethidiumbromid benötigt. Zunächst wurde die aufzutrennende DNA-Lösung mit einem 6-fach Ladebuffer (Gel Loading Dye, Purple, New England Biolabs) versetzt. Außerdem wurde ein Größenmarker von 1kb plus und als Laufpuffer 1x TAE verwendet. Die Auftrennung erfolgte für das präparative Gel bei 100 V, bei 120 V für das analytische Gel.

Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA-Helix konnten die DNA-Banden über Fluoreszenz unter UV-Licht visualisiert werden.

2.2.3 Aufreinigung von DNA-Fragmente aus einem Agarosegel

Zunächst wurden die DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Da die Länge der Fragmente 10kB nicht überschritt, konnten diese mithilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus der Agarose

isoliert werden. Ein Teil der gewonnenen DNA wurde direkt weiterverwendet, der nicht benötigte Anteil konnte bei -20°C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor mussten zunächst sowohl der Vektor, als auch das Insert mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten werden, sodass komplementäre DNA-Überhänge für die zu ligierenden Elemente vorhanden waren. Anschließend wurde die verdaute DNA aufgereinigt und für die Ligation Insert-DNA mit Vektor-DNA im molaren Verhältnis 5:1 angesetzt. Da auch das Längenverhältnis berücksichtigt werden musste, wurde zur Berechnung der Menge an Insert-DNA folgende Formel benutzt:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Die entsprechenden Volumina wurden mit 10x T4 DNA Ligasepuffer und 1µl T4-DNA-Ligase (5U/µl) angesetzt, und auf ein Volumen von 20 µl mit H₂O (bidest.) aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion vor der Verwendung zur Transformation kompetenter Bakterien bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5 Aufreinigung von Plasmiden

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden Kits der Firma Quiagen (Hilden) verwendet, basierend auf der Grundlage der alkalischen Lyse. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Entsprechend der gewünschten Menge an Plasmid-DNA wurde entweder das QIAprep® Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit (Quiagen, Hilden) oder das QIAGEN® Plasmid-DNA Maxiprep Kit (Quiagen, Hilden) benutzt.

2.2.6 Herstellung von kompetenten Bakterien

Kompetente Bakterien sind Bakterien, die freie DNA aufnehmen können. Für diesen Zweck wurden zur Herstellung kompetenter Bakterien aus einem Glycerol-Stock des *E.coli* Stammes DH5α Bakterien auf einer LB-Blatte ausgestrichen. Es folgte die Inkubation bei 37°C über Nacht. Einzelklone wurden anschließend erneut bei 37°C und 250 rpm über Nacht in 5 ml LB Medium inkubiert. Daraufhin mussten davon 50 µl in 5 ml LB-Medium übertragen werden, und bei 37°C und 250 rpm für zwei Stunden in Kultur bleiben. Anschließend wurden weitere 95 ml LB-Medium hinzugegeben und es schloss

sich eine Kultivierung an, bis eine optische Dichte (OD_{550nm}) von 0,2-0,3 erreicht wurde. Nach dem Zentrifugieren der Zellen bei 1560 x g und 4°C für 10 Minuten wurden die Zellpellets in 20 ml TfbI-Puffer auf Eis resuspendiert und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wieder zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen erneut auf Eis in 4 ml TfbII-Puffer aufgenommen und Aliquouts à 100 µl bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt.

2.2.7 Transformation von kompetenten Bakterien

Ein Aliquot kompetenter *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α, aufbewahrt bei -80° C, wurde auf Eis aufgetaut, woraufhin zur Bakteriensuspension Plasmid DNA oder der Ligationsansatz gegeben wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis schloss sich ein Hitzeschock für eine Minute bei 42°C an. Anschließend wurden 300 µl LB Medium hinzugefügt und es folgte eine weitere Inkubation für 1h, nun bei 37°C und 180 rpm. Schließlich wurde der Transformationsansatz in unterschiedlichen Verdünnungen auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen. Es sollten so Einzelklone der transformierten Bakterien gewonnen werden, die ein ampicillinresistentes Plasmid aufgenommen hatten. Die LB-Platte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.8 Anlegen von Bakterienkulturen

Mithilfe einer sterilen Pipettenspitze wurden differenzierbare Einzelklone auf eine LB-Platte (Masterplatte) überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Außerdem wurde mit derselben Pipettenspitze ein Ansatz aus 5 ml LB Medium und 5 µl Ampicillin für die Mini-Plasmid-Präparation angesetzt, worauf eine Inkubation bei 37°C und 200 rpm für 12-16 h auf einem Horizontalschüttler folgte.

Das Ansetzen von Maxikulturen lief ab wie zuvor beschrieben, allerdings bedurfte es eines Ansatzes von 250 ml LB –Ampicillin –Lösung, da eine größere Anzahl an Bakterien nötig war.

2.2.9 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte extern über die Firma GATC Biotech (Konstanz). Die Sequenzierung basiert auf der von Sanger *et al.* publizierten Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Im Unterschied dazu werden aber heute fluoreszenzmarkierte, statt radioaktivmarkierte Didesoxynukleotide verwendet.

Für die Sequenzanalyse wurde ein Ansatz mit einem Forward-Primer sowie ein Ansatz mit Reverse-Primer benötigt, um die gesamte eingefügte DNA zu sequenzieren. Es wurden jeweils 2,5 µl Primer mit jeweils 0,5 µg DNA versetzt und mit H₂O auf 10µl aufgefüllt. Per Post wurden die Proben zur Analyse an GATC Biotech verschickt.

2.3 Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden standardgemäß in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.3.1 Passagieren und Ernten von Zellen

Es wurden Suspensionszellen und leicht adhärent wachsende Zellen benutzt. Solche Zellen lösten sich durch leichtes Klopfen seitlich an der Zellkulturflasche. Nach dem Resuspendieren der Zellsuspension wurde je nach Zelldichte ein Teil des Volumens belassen und mit frischem Medium angereichert.

2.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Probe Zellsuspension in dem Verhältnis 1:2, 1:4 oder 1:10 mit 0,1 %-Trypanblaulösung gemischt. Durch die gestörte Membranintegrität toter Zellen gelangt der Farbstoff in die Zelle, weshalb unter dem Lichtmikroskop tote Zellen blau erscheinen. So können diese von lebenden Zellen unterschieden und nicht mitgezählt werden. Das Auszählen erfolgte mithilfe der Neubauerzählkammer, wobei vier Großquadrate ausgezählt wurden. Die Zellkonzentration lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl/ml Zellsuspension} = \text{Arithmetischer Mittelwert lebender Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor (Trypanblau)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}$$

2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur kurzzeitigen Lagerung wurden Zellen bei -80°C aufbewahrt. Hierfür wurden, wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben, die Zellen geerntet und anschließend abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4°C kaltem Einfriermedium (90 % hitzeinaktiviertem FCS, 10 % DMSO) aufgenommen, sodass pro Kryoröhrchen 1 ml Medium mit einer

Zellkonzentration von $2-10 \times 10^6$ Zellen überführt werden konnte. Die Zellen wurden in einem Isopropanonkühler bei -80°C eingefroren, um eine gleichmäßige Abkühlung ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) zu gewährleisten. Nach 24h konnten die Zellen diesem entnommen werden und wurden entweder kurzzeitig bei -80°C , oder langfristig bei -196°C in flüssigen Stickstoff gelagert.

Um Zellen aufzutauen, wurde das Kryoröhrchen zunächst kurz im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend die Zellsuspension in 40 ml Zellkulturmedium überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei $300 \times g$ für 5 min an, um dann das Zellpellet zu resuspendieren und in eine Zellkulturflasche zu überführen.

2.3.4 Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes

Humane periphere mononukleäre Zellen des Blutes (*PBMCs peripheral blood mononuclear cells*) dienen in verschiedenen Experimenten als Effektorzellen. Diese wurden mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut gesunder Spender gewonnen.

Die im Folgenden verwendete Biocoll-Trennlösung (Biocoll™ Separation Solution, Merck) besitzt einen Dichtegradienten von $1,007\text{g}/\text{ml}$. Tote Zellen, Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren aufgrund der höheren Dichte als die Trennlösung bei Zentrifugation durch die Trennschichten, während Thrombozyten und Plasma im Überstand zu finden sind. Lymphozyten und Monozyten sammeln sich dagegen in der Interphase und können dort isoliert werden.

Dafür wurde heparinisiertes Vollblut mit DPBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. In einem 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen wurden auf 15 ml Biocoll Lösung 25 ml des verdünnten Vollbluts geschichtet. Daran schloss sich eine Zentrifugation über 30 Minuten bei $560 \times g$ und ausgeschalteter Bremse an. Dann wurde die Interphase mit einer 10 ml Glaspipette abgenommen, in ein neues Plastikzentrifugationsröhrchen übertragen und einmal bei $300 \times g$, dann bei $200 \times g$ für je 10 Minuten gewaschen. So sollte sichergestellt werden, dass Reste der Biocoll Lösung, sowie Erythrozyten und Thrombozyten entfernt wurden. Die isolierten PBMCs wurden in Vollmedium aufgenommen und deren Lebendzellzahl mit Trypanblau, beziehungsweise die Anzahl der Leukozyten mit Tuerk'scher Lösung ($10 \mu\text{l}$ Zellsuspension + $90 \mu\text{l}$ Tuerk'sche Lösung), bestimmt.

2.3.5 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Bei der transienten Transfektion kommt es nicht zu einer chromosomalen Integration der DNA in das Genom der Zielzelle, allerdings verbleibt die DNA bis zur nächsten Zellteilung im Zellkern und kann so abgelesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) verwendet. Da für die Expression der leichten und schweren Kette zwei unterschiedliche Vektoren benutzt wurden, wurden diese im Verhältnis schwere Kette zu leichter Kette von 6:4 (229 µl: 164 µl) verwendet. Die Transfektion der CHO Zellen und Kultivierung erfolgte mit dem *ExpiCHO™ Expression System Kit* nach Herstellerprotokoll.

2.3.6 Inaktivierung von Tumorzellen

Um in funktionellen Tests die Proliferation der Effektorzellen messen zu können, musste die Proliferation der Zielzelle, also der Tumorzelle, inhibiert werden. Die Bestrahlung durch eine ¹³⁷Cäsiumquelle mit einer Strahlendosis von etwa 130 Gy führte zur Inaktivierung der Tumorzelle.

2.4 Chromatographische Verfahren

Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich um ein Verfahren der Adsorptionschromatographie. Ein bestimmter Stoff aus einem Gemisch soll über eine stationäre Phase isoliert werden. Ein Ligand, gebunden an ein Trägermaterial, bindet mit hoher Affinität zum Beispiel an den zu isolierenden Antikörper und adsorbiert diesen somit von anderen Proteinen, die in der gleichen Lösung enthalten sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Aufreinigung von Antikörpern Protein A verwendet.

2.4.1 Aufreinigung bispezifischer Antikörper aus Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A

Der Überstand der transfizierten CHO-Zellen wurde mit der ÄKTA pure (GE Healthcare) auf eine Protein-A Säule aufgetragen, anschließend mit PBS gewaschen und mit 0,1 mM Glycin pH 2,5 eluiert. Im Anschluss wurde das Eluat zur präparativen Größenaufreinigung auf eine HiLoad 16/600 aufgetragen und das Eluat fraktioniert. Fraktionen, die das Monomer des Antikörpers enthielten, wurden dann gepoolt, mit einem

Spritzenvorsatzfilter (0,22 μ m) steril filtriert und die sterile Antikörper-Lösung in einem Kryoröhrchen bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösung mittels NanoDrop

Mithilfe eines NanoDrop™ 1000-Spektrophotometers (Extinktionskoeffizient „IgG“) wurde die Konzentration der Antikörper-Lösung gemessen. Dabei wurde aus drei gemessenen Proben der arithmetische Mittelwert der Konzentration des Eluats ermittelt.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration dient dazu, die aufgereinigten Antikörperlösungen auf deren Homogenität, Molekulargewicht beziehungsweise Aggregation und Degradation zu überprüfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das UHPLC-System „Dionex Ulti-Mate 3000 BioRS“ mit der Säule „Superdex 200 Increase 10/300 GL“ gebraucht. Dabei wurden ca. 15 μ g Antikörper in einem maximalen Volumen von 50 μ l aufgetragen. Die Retention der Proteine auf der Säule wurde bei einer Adsorption von 220 nm gemessen, wobei eine Eichkurve mit Proteinen einer definierten Größe (Standard Bio-Rad) benutzt wurde, um das Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln.

2.5.2 Diskontinuierliche SDS Gelelektrophorese

Um die Reinheit und das Molekulargewicht der Antikörper zu ermitteln, wurde die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) angewandt. Durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) wird die Eigenladung der Proteine überlagert, weshalb sich die gleich geladenen Proteine in der Elektrophorese dann nur nach Molekulargewicht auftrennen. Für die elektrophoretische Trennung wurden 10 % Mini-PROTEAN® TGX Precast Gele sowie eine Mini- PROTEAN® TetraCell verwendet. Zunächst wurden die entsprechenden Proben mit SDS Ladepuffer (2x) angesetzt und für 5 Minuten bei 95° denaturiert. Um neben nicht reduzierten Proben auch reduzierte Proben zu analysieren, wurde dem Ladepuffer der reduzierten Proben noch β -Mercaptoethanol zugefügt. Weil dadurch die Disulfidbrücke reduziert wird, dissoziieren leichte und schwere Kette des Antikörpers. Die Proben wurden im Gel bei 120 V für circa 80 Minuten

getrennt und anschließend das Gel auf dem Plattenschüttler für etwa eine Stunde in Coomassie Brilliant Blue Färbelösung inkubiert. Durch die Waschung mit H₂O (bidest.) wurde die Hintergrund-Färbung des Gels entfernt, während die Proteinbanden durch die Färbung visualisiert werden konnten.

2.5.3 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung wurde durchgeführt, um die Temperatur zu ermitteln, bei der das Protein in einer denaturierten Form vorliegt, und damit an Funktionalität verliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür das PROTEOSTAT® Thermal Shift Stability Assay Kit verwendet. Die Probe des Proteins wird mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzt und in einem Fast Real-Time PCR Cycler von 30°C auf 99°C schrittweise erhöht. Im komplett denaturierten Zustand kann sich das maximale Volumen an Farbstoff anlagern, was über eine maximale Fluoreszenz detektiert wird. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können kleinste Teilchen, wie zum Beispiel Zellen, in einem laminaren Flüssigkeitsstrom über ihre Größe, Oberflächeneigenschaften und Granularität anhand der Absorption und Streuung eines Laserstrahls unterschieden werden. Bei der durchflusszytometrischen FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) Analyse wird dieses Prinzip, basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die über Fluorochrom-markierte Antikörper detektiert wird, angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden direktkonjugierte und unkonjugierte Antikörper verwendet. Die Inkubation mit den Antikörpern fand im Dunkeln bei 4°C statt. Für die folgenden Schritte wurde FACS-Puffer verwendet. Um eine unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurde der FACS-Puffer mit humanen Ig (FleboGamma) á 50 µg/ml versetzt, allerdings nur, wenn kein human-spezifisches Detektionsreagenz gebraucht wurde.

Für die Analyse wurden pro Messpunkt 0,1-0,5x10⁶ Zellen in 200 µl in einer 96-well Rundbodenplatte verwendet. Diese wurden für 3 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl der jeweiligen Antikörper-Lösung in der erforderlichen Verdünnung, je nach Herstellerangaben, für 30

Minuten bei 4°C inkubiert. Daran schlossen sich zwei Waschungen in 200 µl FACS-Puffer, bei einer Zentrifugation von 3 Minuten bei 600 x g, an.

Wurden unkonjugierte Antikörper verwendet, folgte die Färbung mit 50 µl RPE-konjugierten Sekundärantikörper, verdünnt in FACS Puffer im Verhältnis 1:200. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C erfolgten, wie bereits beschrieben, zwei Waschungen. Schließlich wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 7AAD (0,5 µg/ml) aufgenommen, um darüber die viablen Zellen zu identifizieren.

Wurden konjugierte Antikörper verwendet, konnten die Zellpellets nach den Waschungen direkt nach der Inkubation in 200 µl in FACS-Puffer mit 7AAD resuspendiert werden.

Um die Fc-rezeptorabhängige, unspezifische Bindung zu kontrollieren, wurden entsprechende Isotyp- und Negativkontrollen mitgeführt.

2.6 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

2.6.1 ³[H]-Thymidin-Proliferationstest

Für die Messung der antikörperinduzierten Zellproliferation wurde ein ³[H]-Thymidin-Inkorporationsassay angewandt, der darauf beruht, dass proliferierende Zellen tritiiertes Thymidin aufnehmen. Alle Proben wurden in RPMI-Komplettmedium mit einem Endvolumen von 200 µl als Triplikate angesetzt.

Auf einer 96-well Flachbodenplatte wurden je Probe $0,2 \times 10^6$ Effektorzellen (humane PBMC) mit $0,1 \times 10^6$ bestrahlten, also inaktivierten, Zielzellen ausplattiert. Außerdem wurden die entsprechenden Konzentrationen des Antikörpers hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37°C für 48 Stunden inkubiert, um dann mit 0,5 µCi ³[H]-Thymidin per Well versetzt zu werden. Nach einer weiteren Inkubation für 16 Stunden bei 37 °C wurde der Ansatz schließlich mit dem Cell Harvester auf Printet Filtermat A Matten geerntet. Nachdem die Filtermatten getrocknet waren, wurde der Szintillationscocktail Ultima Gold hinzugefügt, sodass das inkorporierte Thymidin mithilfe des 2450 Microplate Counters detektiert und quantifiziert werden konnte.

2.6.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der antikörpervermittelten Lyse

Die Lyse von Zielzellen, induziert durch den Antikörper, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Alle Proben wurden in Duplikaten mit einem Endvolumen von 200 µl mit RPMI Medium und 10 % AB-Serum oder autologen Serum auf einer 96-well Flachbodenplatte angesetzt. Die zu analysierenden Zellen wurden mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen bei 37 °C im CO₂ Begasungsschrank inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine 96-well Rundbodenplatte übertragen und mit FACS Puffer (hier immer mit 50 µg/ml FleboGamma) zweimal bei 600 x g für 3 Minuten gewaschen und dann mit 50 µl FACS-Puffer je Probe für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptoren zu blockieren. Nach zwei weiteren Waschungen, bei 600 x g für 3 Minuten, folgte die Färbung der Zellen mit den entsprechenden direkt markierten Antikörpern (Verdünnung nach Herstellerangabe) in einem Volumen von 50 µl je Probe. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 200 µl FACS Puffer, 12 µl 7AAD pro 1 ml Puffer und zwei Tropfen BD™ CompBead negative Beads pro ml aufgenommen, um dann in FACS Röhren überführt zu werden.

Außerdem wurden Kontrollen, sogenannte FMOs (*Fluorescence minus one*), mitgeführt, bei denen jeweils einer der direkt-markierten Antikörper aus der Gesamtfärbung fehlte. So sollte eine unspezifische Bindung erkannt werden. Für die Kompensationskontrollen wurden einfachgefärbte Kompensationspartikel (Compensation Particles, BD Biosciences) verwendet. Wie bereits beschrieben, diente 7AAD als Marker für apoptotische und tote Zellen. Die Beads wurden für die Standardisierung der Messung der Proben benötigt, sodass Zellzahlen verglichen werden konnten. Eine definierte Anzahl aufgenommener Beads stellte eine gleich hohe Datenaufnahme über alle Proben hinweg sicher. Die Messung erfolgte am FACSCanto II, die Auswertung mit der FlowJo Software Version 10.0.7 (Becton Dickinson GmbH).

Zellvermittelte Zytotoxizität im allogenen System

Um die antikörpervermittelte Lyse zu untersuchen, wurden als Zielzellen die Tumorzelllinie Nalm-16 verwendet, als Effektorzellen aufgereinigte mononukleäre Zellen eines gesunden Spenders. Die Zellen wurden, wie unter 2.3 beschrieben, vorbereitet und

Effektorzellen und Zielzellen in einem Verhältnis von 2:1 ($0,2 \times 10^6$ PBMCs und $0,1 \times 10^6$ Nalm-16-Zellen) in einem Endvolumen von 200 μ l RPMI mit 10 % AB-Serum ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erfolgte das weitere Vorgehen wie bereits oben unter Kapitel 2.6.2 beschrieben.

Zellvermittelte Zytotoxizität im autologen System

Um die antikörpervermittelte Lyse auch im autologen System zu prüfen, wurden bereits gereinigte und kryokonservierte PBMCs von AML Patienten, wie unter Kapitel 2.3.3 beschrieben, vorbereitet. In einem Endvolumen von 200 μ l RPMI mit 10% AB-Serum, oder wenn möglich mit 10% des autologen Serums, wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Test pipettiert. Nach 120 Stunden Inkubationszeit wurde wie unter Kapitel 2.6.2 beschrieben vorgegangen.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Weiterentwicklung eines bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpers zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie. Dabei wurden zunächst verschiedene Antikörperformate miteinander verglichen, um dann sowohl die T-Zellaktivierung über CD3, als auch die tumorspezifische Bindung am FLT3-Rezeptor zu optimieren. Dafür wurde das Bindungsverhalten sowie die T-Zellaktivierung und Zielzellyse der Antikörper untersucht.

3.1 Vergleich des bivalenten und tetravalenten FLT3xCD3 Antikörpers

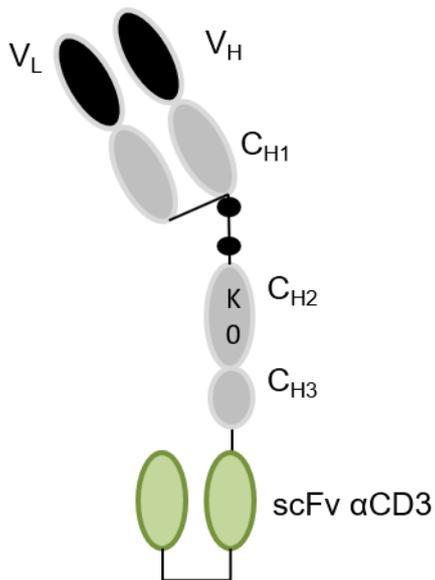
Thema der Arbeit war die Suche nach dem optimalen Format für einen FLT3xCD3 Antikörper. Zum einen kam das bivalente (Fabsc-)Format, entwickelt von Michael Durben (Durben et al., 2015) und zum anderen das tetravalente (IgGsc-)Format in Frage (Zekri et al., 2021). Es konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die unspezifische Aktivierung von Effektorzellen (also ohne Anwesenheit von Tumorzellen) bei dem bivalenten Antikörperformat höher war als im tetravalenten Format. Darüber hinaus wies ein Antikörper im Fabsc-Format eine deutliche kürzere Serumhalbwertszeit als das IgGsc-Konstrukt auf (Zekri et al., 2021). Daher wurde zunächst untersucht, wie sich der FLT3xCD3 Antikörper im tetravalenten Format im Vergleich zu dem bivalenten FLT3xCD3 Format in Bindungsverhalten und Aktivierung von T-Zellen verhält.

3.1.1 Klonierung und Generierung eines tetravalenten FLT3xCD3 Antikörpers

Um die beiden Konstrukte miteinander vergleichen zu können, erfolgte zunächst die Klonierung des FLT3xCD3 IgGsc-Antikörpers. Grundlage dafür war das durch Zekri et al. generierte IgGsc-Format. An den beiden schweren Ketten ist dieses Format C-Terminal jeweils mit einem single-chain Fragment (scFv), in der V_L-V_H Orientierung, fusioniert. Das scFv ist gerichtet gegen das Oberflächenantigen CD3 und basierend auf dem CD3 Antikörper UCHT-1, Klon v9 (Rodrigues et al., 1992). N-terminal besitzt das Konstrukt den FLT3 Antikörper 4G8 (Bühning and Rappold, 1999). Das Plasmid der schweren Kette, das die konstanten Domänen des IgGsc-Konstrukts, die variablen Domänen des 4G8 Antikörpers und den UCHT-1 scFv enthielt, wurde zusammen mit dem Plasmid der leichten Kette des 4G8 Klons in CHO Zellen transfiziert und der

tetravalente FLT3xCD3 Antikörper CC2 wurde aus dem Überstand aufgereinigt. Die beiden Antikörperformate, die nun im Folgenden verglichen werden sollen, sind in Abbildung 3.1.1 dargestellt. Wie bei dem FLT3xCD3 Fabsc-Antikörper sind auch im tetravalenten Format die variablen FLT3-Domänen murinen Ursprungs. Aminosäuresubstitutionen in der Hinge-Region des Fabsc-Formats verhindern eine Anlagerung der Moleküle, ebenso wie die fast vollständige Deletion der C_{H3}-Domäne im Fabsc-Format. Aminosäureveränderungen in der C_{H2}- und C_{H3}-Domäne bei beiden Formaten führen zu einer Attenuierung des Fc-Teils, um so die Fc-Rezeptorbindung zu verhindern. Stattdessen werden über die CD3 scFv-Fragmente am C-Terminus eine spezifische Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, und damit eine fokussierte Zielzellyse, erreicht (Durben et al., 2015).

A: Fabsc



B: IgGsc

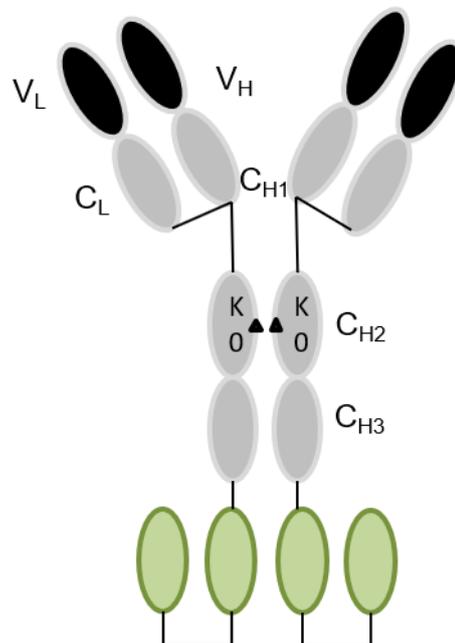


Abbildung 3.1.1: Schematische Übersicht der Antikörperformate

In Abbildung A ist der Fabsc-Antikörper im bivalenten Format dargestellt. In Abbildung B wird der tetravalente (IgGsc-)Antikörper gezeigt. Die variablen Domänen (schwarz) sind gegen das Zielantigen FLT3 gerichtet. Über das single-chain Fragment (scFv) CD3 (grün) sollen spezifisch T-Zellen als Effektorzellen rekrutiert werden. KO beschreibt den Austausch von Aminosäuren zur Attenuierung des Fc-Teils. Aminosäuresubstitutionen der zwei Cysteine zu Serinen in der Hinge-Region in Bild A sind mit (●) gekennzeichnet. In Bild B werden Glykosylierungen mittels (▲) dargestellt

3.1.2 Proteinbiochemische Analyse

Zunächst wurde der aufgereinigte IgGsc-Antikörper mittels analytischer Gelfiltration auf Homogenität, Molekulargewicht und mögliche Aggregation und Degradation überprüft. Dies wurde vergleichend auch mit dem bereits früher produzierten Fabsc-Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 3.1.2 zu sehen, zeigte sich im Elutionsprofil für beide Antikörperformate ein klarer Hauptpeak. Aggregate waren nur in Spuren sichtbar. Das Molekulargewicht im Fabsc-Format beträgt ca. 80 kDa, für das IgGsc sind es ca. 200 kDa.

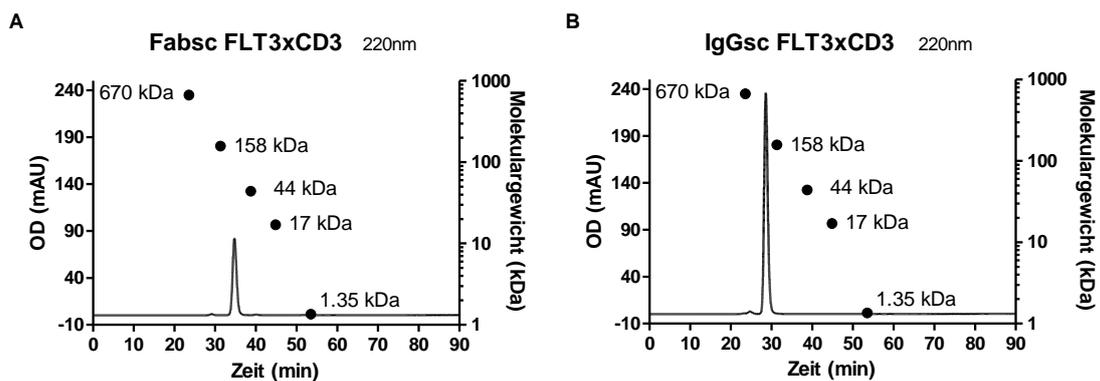


Abbildung 3.1.2: Analytische Größenausschlusschromatographie des Fabsc- und IgGsc-Formats

Elutionsprofil des gereinigten bispezifischen bivalenten FLT3xCD3 Antikörpers (A) und des bispezifischen tetravalenten FLT3xCD3 Antikörpers (B). Zur Analyse wurden 15 µg des Proteins aufgetragen. Eichproteine (●) dienen zur Bestimmung des Molekulargewichts des zu analysierenden Proteins.

Die Reinheit und das Molekulargewicht der Antikörper konnten in der diskontinuierlichen SDS Gelelektrophorese bestätigt werden (Abbildung 3.1.3). Unter nicht reduzierenden Bedingungen waren für den IgGsc-Antikörper ein Molekulargewicht von ca. 200 kDa (errechnetes Molekulargewicht 206 kDa) und für den kleineren Fabsc-Antikörper von ca. 90 kDa (errechnetes Molekulargewicht 87 kDa) auszumachen. Unter reduzierenden Bedingungen zeigten sich bei beiden Formaten jeweils zwei Banden, die die schwere und leichte Kette repräsentieren.

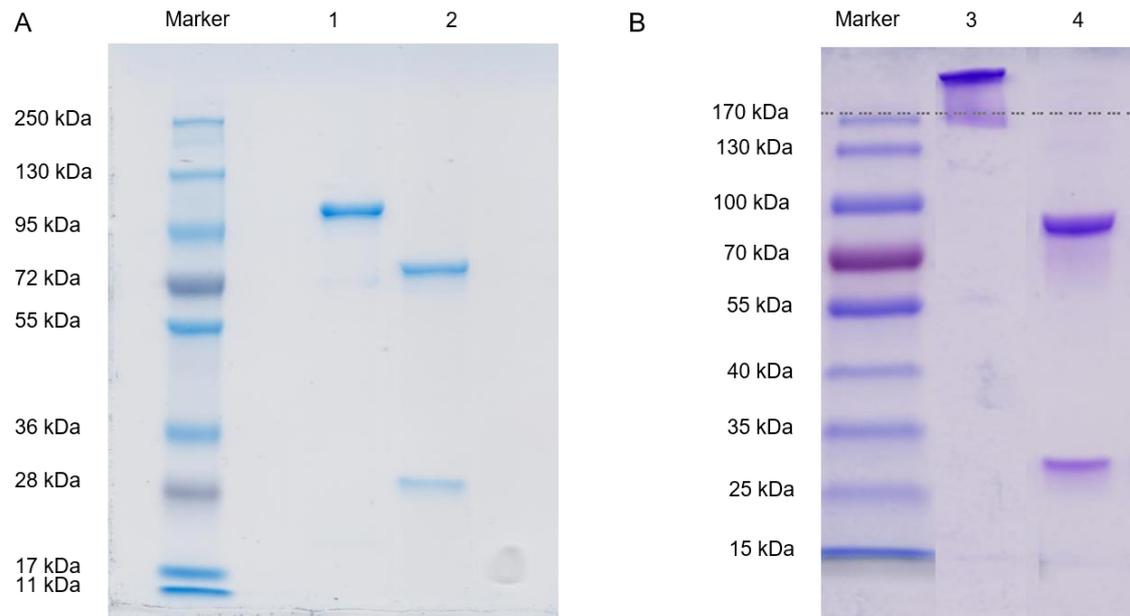


Abbildung 3.1.3: Gelelektrophoretische Analyse des bivalenten und tetravalenten bispezifischen Antikörpers

In Abbildung A wird die gelelektrophoretische Analyse des Fabsc-Konstrukts im nicht reduzierten Zustand (1) und reduzierten Zustand (2) gezeigt. Analog dazu in Abbildung B das IgGsc-Konstrukt im nichtreduzierten (3) und reduzierten Zustand. Die Marker zeigen das Molekulargewicht des Größenstandards.

Darüber hinaus wurde über eine Schmelzpunktbestimmung die Temperatur ermittelt, bei der die Antikörper denaturieren, und damit an Funktionalität verlieren. Diese lag beim Fabsc-Konstrukt bei 64,3 °C und unterschied sich damit vom IgGsc-Konstrukt nur unwesentlich. Dort lag das Protein ab 66,3 °C in der denaturierten Form vor (Abbildung 3.1.4).

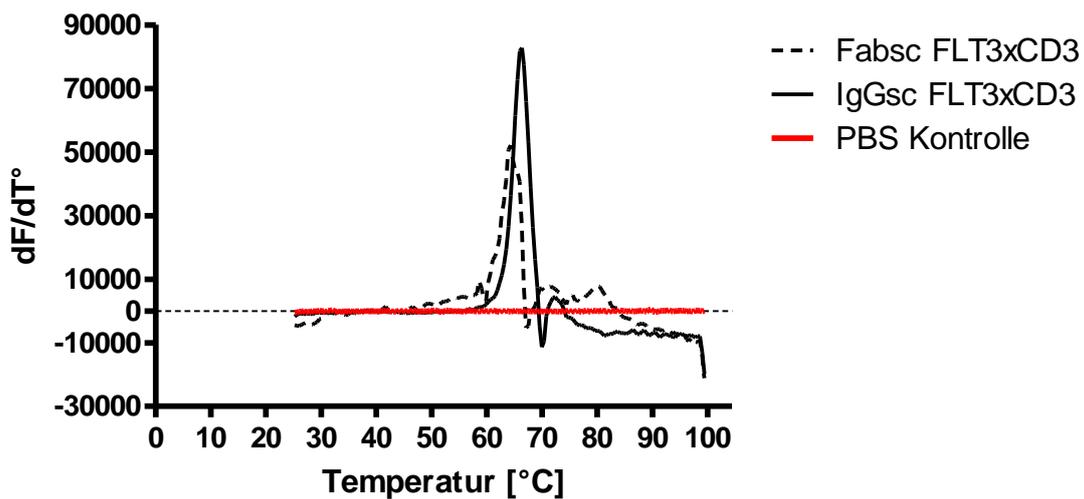


Abbildung 3.1.4: Schmelzpunktbestimmung des bivalenten und tetravalenten bispezifischen Antikörpers

Zusammen mit einem fluoreszierenden Farbstoff wurden die Proteinproben bis auf 99 °C erhitzt. Auf der Abszisse ist die Temperatur [°C] abgebildet. Die Ordinate zeigt die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Temperatur [°C]. Die Änderung an Farbstoffaufnahme je Temperaturzeitpunkt entspricht dem Denaturierungszustand des Proteins.

3.1.3 Bindungsanalyse

Die Bindung und Affinität der Antikörper wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Für die Bindungsanalyse an das Zielantigen FLT3 wurden FLT3 positive Nalm-16- oder Reh-Zellen verwendet. Es erreichten beide Konstrukte bei 15-50 nM eine Sättigung. Das IgGsc-Konstrukt wies eine höhere Affinität als das Fabsc-Konstrukt auf. Für die Analyse des Bindungsverhaltens an Effektorzellen wurden CD3 positive Jurkat-Zellen benutzt. Bei beiden Konstrukten konnte zwischen 50 bis 150 nM eine Sättigung nachgewiesen werden. Das Fabsc-Konstrukt zeigte hier nun eine höhere Affinität als das IgGsc-Konstrukt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die beiden C-terminalen single-chain Antikörper des IgGsc-Formats möglicherweise gegenseitig inhibieren. In Abbildung 3.1.5. wird die Bindungsanalyse für beide Proteine gezeigt.

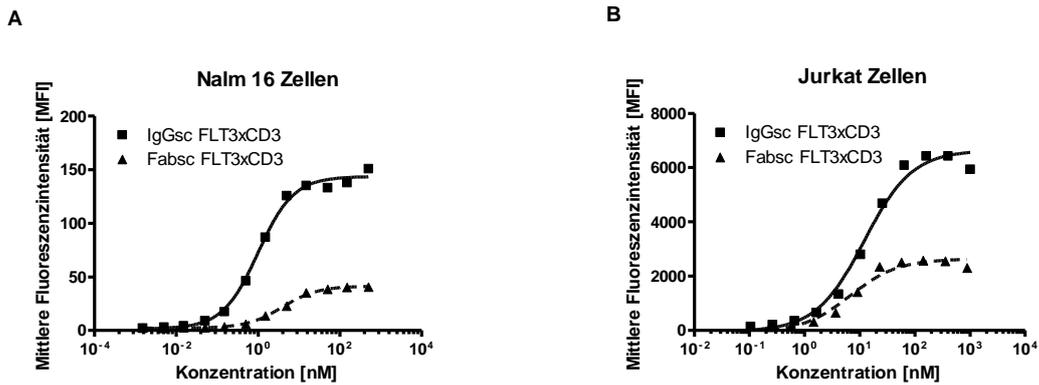


Abbildung 3.1.5: Durchflusszytometrische Bindungsanalyse der bispezifischen Antikörper

Die auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörper wurden mittels RPE-konjugierten Sekundärantikörper durchflusszytometrisch detektiert.

3.1.4 Induktion von T-Zellproliferation

Die Fähigkeit die Proliferation von T-Zellen zu induzieren, wurde durch einen ³H-Thymidin-Proliferationsassay gemessen. Dabei wurden Zielzellen, Nalm-16-Zellen oder REH-Zellen (FLT3⁺) bestrahlt, um im weiteren Verlauf eine Proliferation dieser Zelllinie auszuschließen. Die Zielzellen wurden im Verhältnis 1:2 mit PBMCs und dem jeweiligen Antikörperkonstrukt für 48 h Stunden inkubiert. Dann wurde den Proben ³H-Thymidin hinzugegeben und es folgte eine Inkubation von 16 Stunden. Bei beiden Antikörperkonstrukten kam es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Proliferation, wobei das Fabsc-Konstrukt eine leicht höhere Aktivität induzierte. In Abbildung 3.1.6 ist repräsentativ eines von drei Experimenten abgebildet.

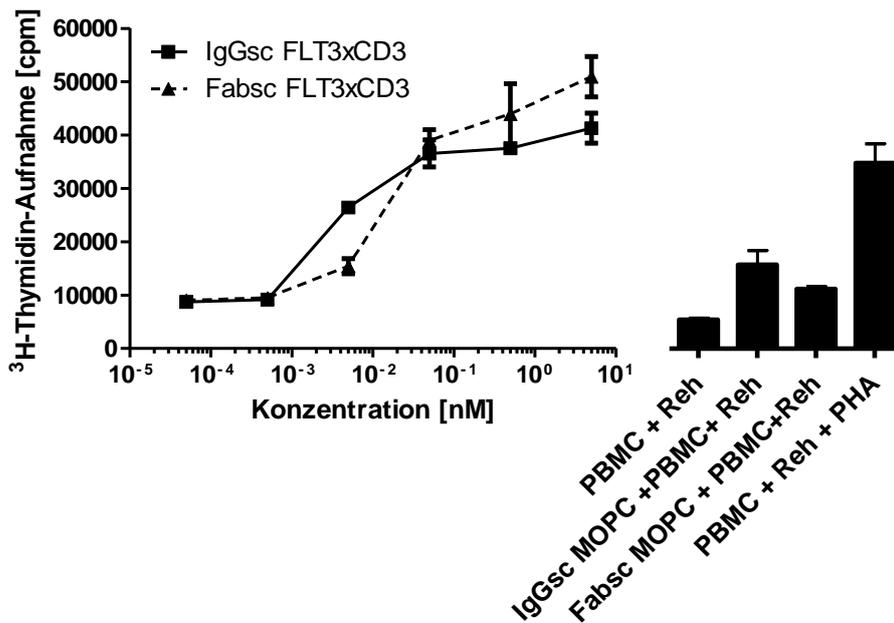


Abbildung 3.1.6: Spezifische T-Zellproliferation im ³H-Thymidin-Proliferationsassay

PBMCs wurden mit inaktivierten REH-Zellen im Verhältnis 2:1 mit dem IgGsc-Konstrukt (■) beziehungsweise dem Fabsc-Konstrukt (▲) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Proben, die nur PBMCs und REH-Zellen oder beide in Kombination enthielten, dienten als Negativkontrolle. Ebenso wurden Proben mit Ziel- und Effektorzellen zusammen mit MOPC IgGsc- bzw. MOPC Fabsc-Antikörper, irrelevanter Spezifität, angesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus Triplikaten.

Neben der Proliferation in Anwesenheit von Zielzellen wurde auch untersucht, welchen Effekt eine Inkubation der Antikörper allein mit PBMCs hat. Dies wird oft als „off-tumor“-Proliferation bezeichnet, trifft in diesem Fall allerdings nicht streng zu, da Monozyten in PBMC Präparationen ebenfalls FLT3 exprimieren. Somit könnten diese als mögliche Zielzellen eine Proliferation von T-Zellen auslösen. Es handelt sich hierbei also eher um eine „off-tumor/on-target“ Situation. Auch dies wurde wie oben beschrieben mittels eines ³H-Thymidin-Proliferationsassays überprüft. Abbildung 3.1.7 zeigt exemplarisch eines von drei Experimenten. In Bild A ist die Proliferation der beiden Antikörper in Ab- und in Anwesenheit von Zielzellen (Reh-Zellen) dargestellt, wobei deutlich wird, dass in Abwesenheit von Zielzellen keine nennenswerte spezifische Proliferation von T-Zellen nachweisbar ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Expression von FLT3 auf Monozyten unter den gewählten Bedingungen nicht zu einer wesentlichen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führt. Dennoch zeigt sich bei näherer

Betrachtung (Abbildung B) ein Unterschied zwischen den Antikörperkonstrukten. Ab Konzentrationen von 0,5 nM induziert das Fabsc-Konstrukt eine niedrige, aber nachweisbare Proliferation, die höher ist als mit dem IgGsc-Molekül.

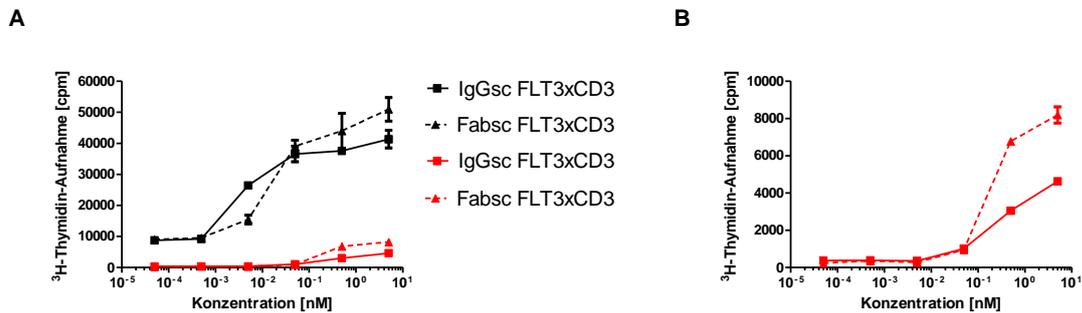


Abbildung 3.1.7: Unspezifische T-Zellproliferation im ^3H -Thymidin-Proliferationsassay

In Abbildung A wurden PMBCs und inaktivierte REH-Zellen im Verhältnis 2:1 inkubiert (in schwarz). Zusätzlich ist die Aktivierung durch das IgGsc-Konstrukt, beziehungsweise durch das Fabsc-Konstrukt in Abwesenheit von Zielzellen dargestellt (in rot). Abbildung B zeigt diesen Fall nochmals, wobei der Maßstab auf der Ordinate anders gewählt wurde, um die Unterschiede zwischen den Konstrukten deutlich zu machen. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Triplikaten.

In den proteinbiochemischen Eigenschaften wie Reinheit oder Schmelzpunkt zeigten sich die zwei Antikörperformate gleichwertig. Bei der Bindungsanalyse zeigte das IgGsc-Konstrukt am FLT3-Antigen eine höhere Affinität.

Zusammengefasst erwies sich an der CD3-Bindungsstelle zwar das Fabsc-Konstrukt als höher affin, allerdings zeigten in den Proliferationsassays beide Konstrukte eine deutliche Proliferation von T-Zellen. Die unspezifische T-Zellproliferation fiel dabei beim IgGsc-Konstrukt niedriger aus. Neben den bereits zu Beginn genannten Vorteilen des IgGsc-Konstrukts spricht auch dies dafür, weiter mit dem IgGsc-Konstrukt zu arbeiten.

3.2 Optimierung der CD3-Affinität

Wie unter Kapitel 3.1 gezeigt, war vor allem in den Bindungsanalysen zwischen den beiden Antikörperformaten ein Unterschied auszumachen. An der CD3-Bindungsstelle erwies sich das IgGsc-Format als niedriger affin, was für die T-Zellproliferation allerdings keine negativen Auswirkungen hatte. Stattdessen zeigte sich bei der unspezifischen T-Zellproliferation mit dem IgGsc-Konstrukt ein geringerer Effekt, was

als positiv zu bewerten ist. Daher stellte sich die Frage ob, beziehungsweise welche Auswirkung eine Änderung der Affinität zu CD3 auf die Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen hat.

3.2.1 Klonierung bispezifischer tetravalenter Antikörper unterschiedlicher CD3-Affinitäten

Auf Grundlage der Arbeit von Zhu und Carter (Zhu and Carter, 1995) und Shalaby et al. (Shalaby et al., 1992) wurden durch Dr. Martin Pflügler IgGsc-Konstrukte mit unterschiedlicher Affinität der CD3 scFv kloniert, transfiziert und aufgereinigt. Dabei wurden Aminosäureveränderungen in den CDRs des CD3 scFv vorgenommen, oder die Orientierung des scFv verändert. Eine Übersicht dieser Veränderungen ist in Tabelle 3.2-1 zusammengestellt. Dort werden auch die jeweiligen Bezeichnungen der Antikörperkonstrukte eingeführt, die im Laufe der Arbeit so fortgeführt werden.

Tabelle 3.2-1: IgGsc-Konstrukte unterschiedlicher CD3-Affinitäten des scFv

Bezeichnung des IgsC-Konstrukts	Veränderungen am CD3 scFv
CC2	Ausgangskonstrukt (vgl. 3.1)
K74D	Austausch von AS der CDR (Shalaby et al., 1992)
M8	Ausgehend von K74D Austausch von AS der CDR (Zhu and Carter, 1995)
M18	Ausgehend von K74D Austausch von AS der CDR (Zhu and Carter, 1995)
V_H-V_L	Veränderung der Orientierung des scFv von V _L -V _H zu V _H -V _L

3.2.2 Proteinbiochemische Analyse

Zu Beginn wurde das Molekulargewicht und die Reinheit der aufgereinigten Proteine mithilfe der analytischen Gelfiltration bestimmt, zu sehen in Abbildung 3.2.1. Wie das tetravalente Ausgangskonstrukt zeigten auch hier alle tetravalenten bispezifischen Antikörperkonstrukte einen klaren Hauptpeak und keine Aggregation oder Degradation. Alle Konstrukte wiesen die erwartete Größe von ca. 200 kDa auf.

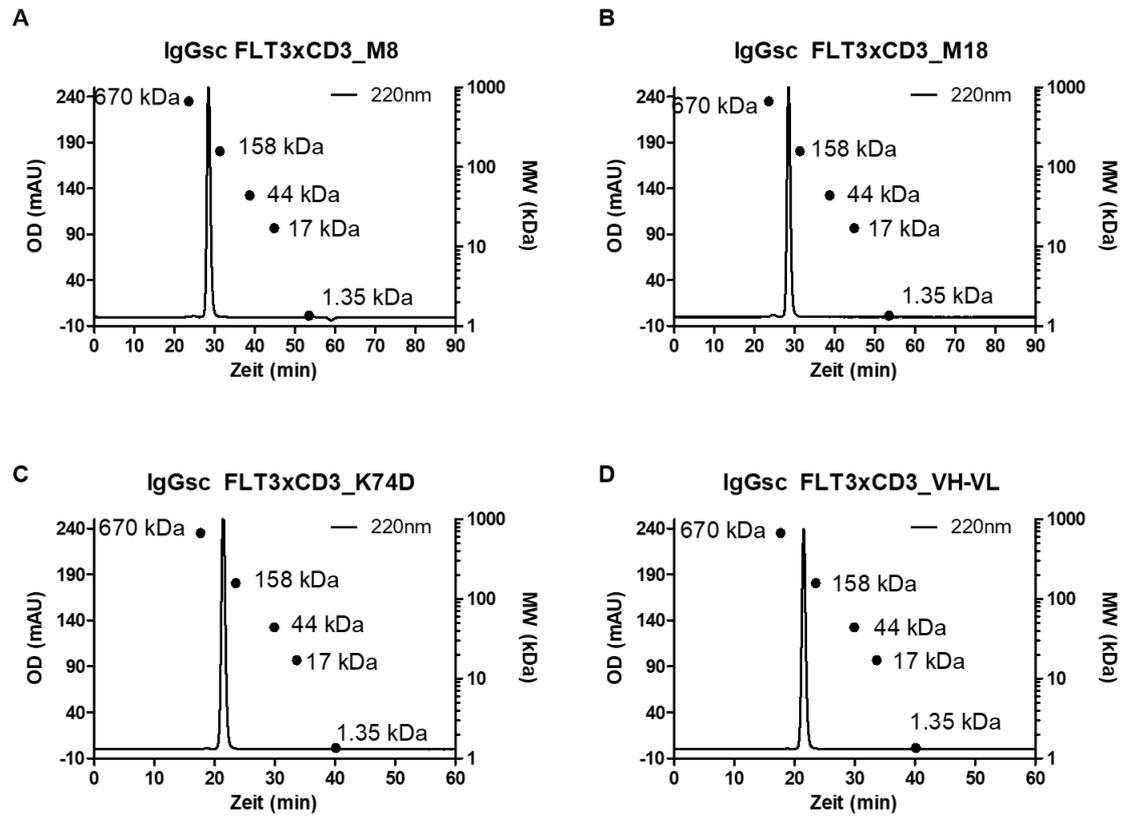
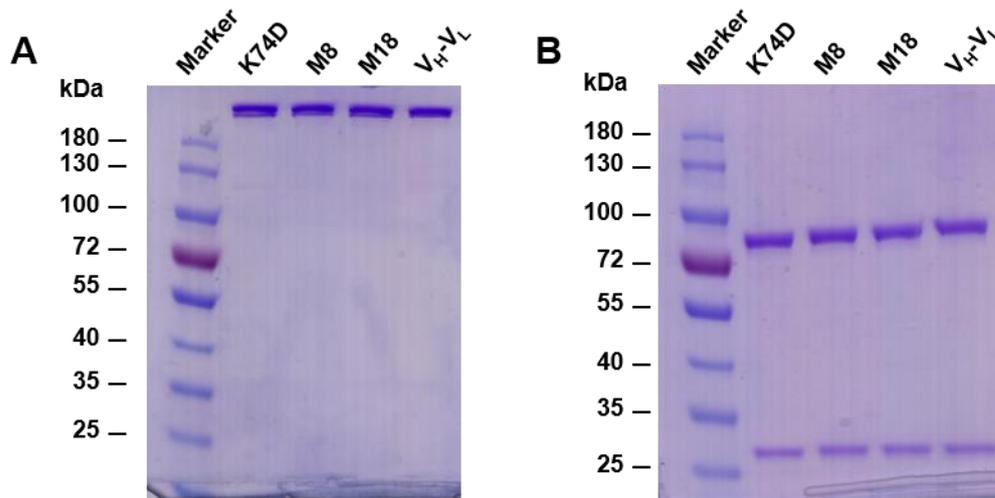


Abbildung 3.2.1: Analytische Chromatographie der CD3-Varianten

Elutionsprofil der gereinigten tetravalenten bispezifischen FLT3xCD3 Antikörper. Zur Analyse wurden 15 µg des Proteins aufgetragen. Eichproteine (●) dienen zur Bestimmung des Molekulargewichts des zu analysierenden Proteins

Mittels der diskontinuierlichen SDS Gelelektrophorese konnte die Reinheit der Proteine ebenfalls belegt werden. In Abbildung 3.2.2 ist die Analyse der Moleküle unter nicht reduzierenden Bedingungen, sowie unter reduzierenden Bedingungen zu sehen. Die tetravalenten Konstrukte weisen dabei das erwartete Molekulargewicht von ca. 200 kDa auf. Unter reduzierten Bedingungen sind zwei Banden zu erkennen, die die leichte und schwere Kette des Antikörpers darstellen.

**Abbildung 3.2.2: Gelelektrophoretische Analyse der CD3-Varianten**

In Abbildung A wird die gelelektrophoretische Analyse der CD3-Varianten unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. In Abbildung B sind die Proteine unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Marker zeigen das Molekulargewicht des Größenstandards.

Anschließend wurde überprüft, ab welcher Temperatur die Proteine im denaturierten, und damit funktionslosen Zustand vorliegen. Dazu erfolgte die Schmelzpunktbestimmung in einem Thermal-Shift-Stability-Assay. Für alle Antikörper zeigte sich hier ein Schmelzpunkt ab ca. 66,0 °C (M8: 66,09 °C, M18: 66,09 °C, K74D: 66,5 °C, V_H-V_L: 65,7 °C). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.3 dargestellt.

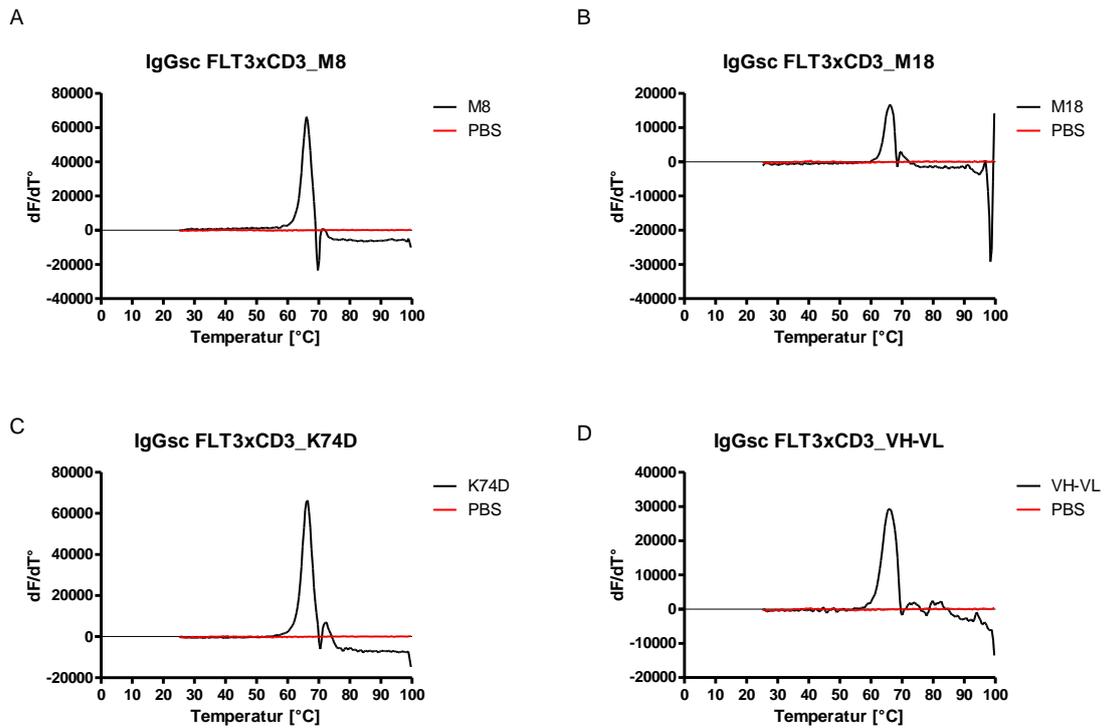


Abbildung 3.2.3: Schmelzpunktbestimmung der CD3-Varianten

Zusammen mit einem fluoreszierenden Farbstoff wurden die Proteinproben bis auf 99 °C erhitzt. Auf der Abszisse ist die Temperatur [°C] abgebildet. Die Ordinate zeigt die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Temperatur [°C]. Die Änderung an Farbstoffaufnahme je Temperaturzeitpunkt geht einher mit dem Denaturierungszustand des Proteins.

3.2.3 Bindungsanalyse

Die Affinität und Bindung der IgGsc-Konstrukte mit verschiedenen CD3 scFv-Varianten wurde mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse auf CD3 positiven Jurkat-Zellen gemessen. Bei allen Konstrukten war eine konzentrationsabhängige Bindung an das CD3 Oberflächenantigen festzustellen. Die Varianten M8 und M18 zeigten die niedrigste Affinität, und auch die Variante K74D war niedriger affin als das Ausgangskonstrukt CC2. Deutlich höher in der Affinität erwies sich die Variante V_H-V_L. In Abbildung 3.2.4 wird ein Experiment mit den verschiedenen Konstrukten exemplarisch gezeigt.

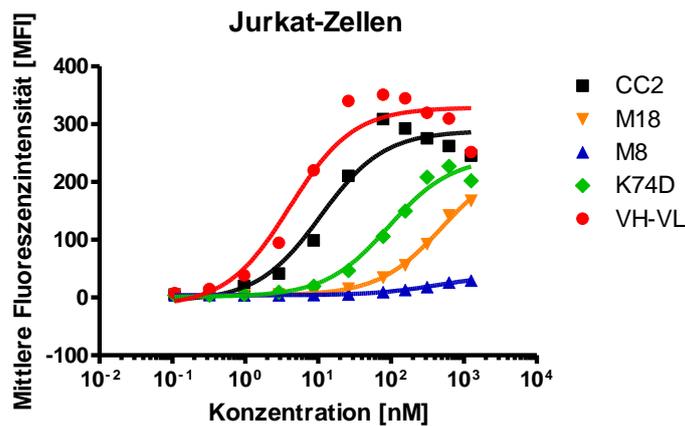


Abbildung 3.2.4: Durchflusszytometrische CD3-Bindungsanalyse der bispezifischen Antikörper

Die Zellen wurden mit den verschiedenen Antikörperkonstrukten (siehe Legende) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mittels RPE-konjugierten Sekundärantikörper detektiert.

Damit lagen nun wie beabsichtigt verschiedene IgGsc-Konstrukte unterschiedlichster CD3-Affinitäten vor, die in ihrer Funktionalität verglichen werden konnten. M8 wurde im weiteren Verlauf nicht mehr verwendet, da dieses Konstrukt eine äußerst niedrige Affinität zeigte. Mit M18 und K74D lagen zwei weitere niederaffine Varianten vor, die für die weiteren Experimenten verwendet wurden.

3.2.4 Zielzellyse

Um neben der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen simultan die Funktionalität in Form der Zielzellyse zu überprüfen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse gewählt. PBMCs und Zielzellen (Nalm-16 Zellen) wurden im Verhältnis 2:1 zusammen mit den jeweiligen Antikörperkonstrukten für 72 h inkubiert und anschließend mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern im FACS Canto analysiert. Dabei konnte sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation der zytotoxischen T-Zellen genau bestimmt werden. Dies erfolgte mittels Sekundärantikörper gegen CD4 und CD8 zur Identifizierung der T-Zellen, sowie CD69, ein Zelloberflächenmolekül, exprimiert von aktivierten T-Zellen. Außerdem konnten die Nalm-16-Zellen, die einzigen Zellen in diesem Experiment, die kein CD45 Oberflächenantigen aufwiesen, über Sekundärantikörper identifiziert, quantifiziert, und so deren Lyse bestimmt werden. Eine konzentrationsabhängige Aktivierung der T-Zellen konnte sowohl für V_H-V_L, als auch

für CC2 ab 0,05 nM beobachtet werden. Die Variante K74D zeigte ab 0,5 nM T-Zellaktivierung und Proliferation. Eine Lyse konnte bei der hochaffinen CD3-Variante V_H-V_L bereits ab 0,05 nM, entsprechend der minimalen Konzentration für eine T-Zellaktivierung, festgestellt werden. Obwohl das Konstrukt CC2 bei dieser Konzentration auch zu einer Aktivierung der T-Zellen führte, konnte erst ab 0,5 nM, wie bei K74D, eine deutliche Lyse beobachtet werden. Auch die Variante mit der niedrigsten Affinität, M18 führte zur Lyse der Zielzellen, allerdings erst ab 5 nM. Die Ergebnisse sind repräsentativ für eines von drei Experimenten in Abbildung 3.2.5 dargestellt.

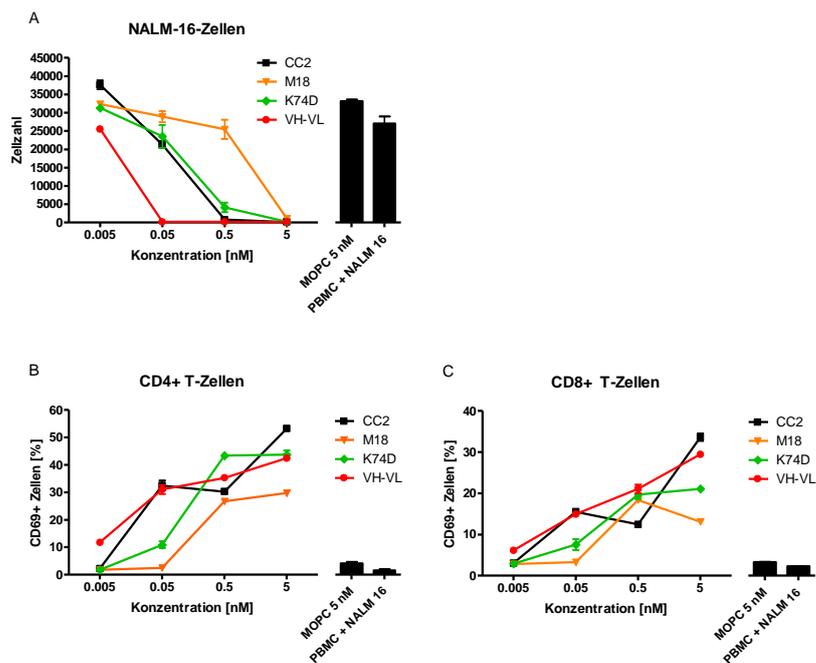


Abbildung 3.2.5: Antikörpervermittelte Zielzellyse von Nalm 16 Zellen und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen mit PBMCs und Nalm-16-Zellen im Verhältnis 2:1 inkubiert. In Bild A ist die antikörperinduzierte Lyse anhand der Zellzahl der Zielzellen Nalm-16 (CD 45 negativ) nach 72 h abgebildet. Bild B zeigt den prozentualen Anteil der aktivierten Zellen der CD4+ T-Zellpopulation, in Bild C ist dies für die CD8+ T-Zellen zu sehen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

Sowohl die niedrigst affine Variante M18, als auch das hochaffine Konstrukt V_H-V_L führten zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und einer Lyse der Zielzellen, allerdings bei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Variante K74D wird im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr berücksichtigt, da sie sich in der Funktionalität nicht deutlich vom

Ausgangskonstrukt CC2 unterschied, und damit nicht mehr als weitere Vergleichsvariante benötigt wurde.

Es galt nun die *in-vivo* Situation einer bispezifischen, antikörpervermittelten Lyse von AML-Zellen *in-vitro* optimal abzubilden. So sollte die durch die Antikörper induzierte Aktivierung von T-Zellen und Lyse von primären AML-Blasten im autologen System überprüft werden. Anders als bei Versuchen mit Nalm-16 Zellen und PBMCs kann hier das Effektor- zu Zielzellverhältnis nicht direkt beeinflusst werden. Bei Versuchen mit AML-Blasten liegen dagegen außerdem wesentlich ungünstigere Zahlenverhältnisse von Effektor- zu Zielzellen vor. Für die Experimente wurden PBMCs von AML-Patienten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Varianten CC2, M18 und V_H-V_L inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Abbildung 3.2.6 ist die konzentrationsabhängige Aktivierung der T-Zellen und Reduktion von AML-Blasten des Patienten #1 abgebildet. Die deutlichste Reduktion der AML-Blasten erreichte das Konstrukt CC2 bei 5 nM. Anders als bei den vorangegangenen Experimenten mit Nalm-16 Zellen kam es erst bei dieser Konzentration zu einer deutlichen Zielzelllyse. Die Variante V_H-V_L induzierte zwar schon bei 0,5 nM eine leichte Lyse, erreichte aber auch in der höheren Konzentration nicht den gleichen Effekt wie CC2. Bei dem niedrig affinen Konstrukt M18 wurde keine Lyse festgestellt. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass bei Patient #1 auch in der Negativkontrollprobe bereits ca. 40% der T-Zellen eine Aktivierung aufwiesen. Das Effektor-: Zielzellverhältnis betrug bei diesen Patienten ca. 2:1.

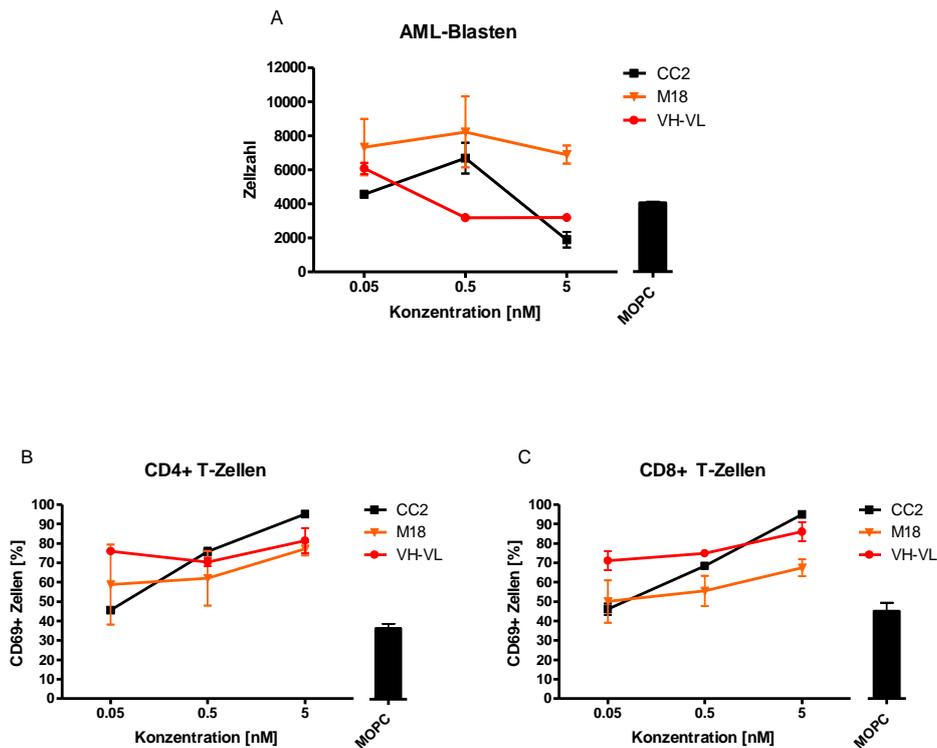


Abbildung 3.2.6: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung autologer T-Zellen bei Patient #1

$0,5 \times 10^6$ PBMCs des AML-Patienten #1 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörper für fünf Tage inkubiert. In Bild A ist die induzierte Blastenreduktion anhand der Zellzahl der AML-Blasten (CD14 negativ/CD33 positiv) dargestellt. Die Aktivierung der T-Zellpopulation wird prozentual als Anteil der CD69+ Zellen der CD4+ Zellen (Bild B) bzw. der CD8+ Zellen (Bild C) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

Eine Reduktion der Blasten konnte nicht bei allen untersuchten Spendern nachgewiesen werden. In Abbildung 3.2.7 ist beispielsweise das Experiment mit PBMCs des Patienten #3 gezeigt. Es fand bei allen Konstrukten eine deutliche konzentrationsabhängige Aktivierung der T-Zellpopulationen statt. Allerdings wurde mit keiner Variante der bispezifischen IgGsc-Konstrukte eine Reduktion der Blasten erzielt. Tatsächlich zeigten sich in den Proben mit Antikörper eine höhere Zellzahl an AML-Blasten als in der Negativkontrolle. In diesem Fall war in der Negativkontrolle keinerlei Voraktivierung der T-Zellen zu erkennen. Das Effektor- zu Zielzellverhältnis bei Patient #3 lag bei ca 1:2.

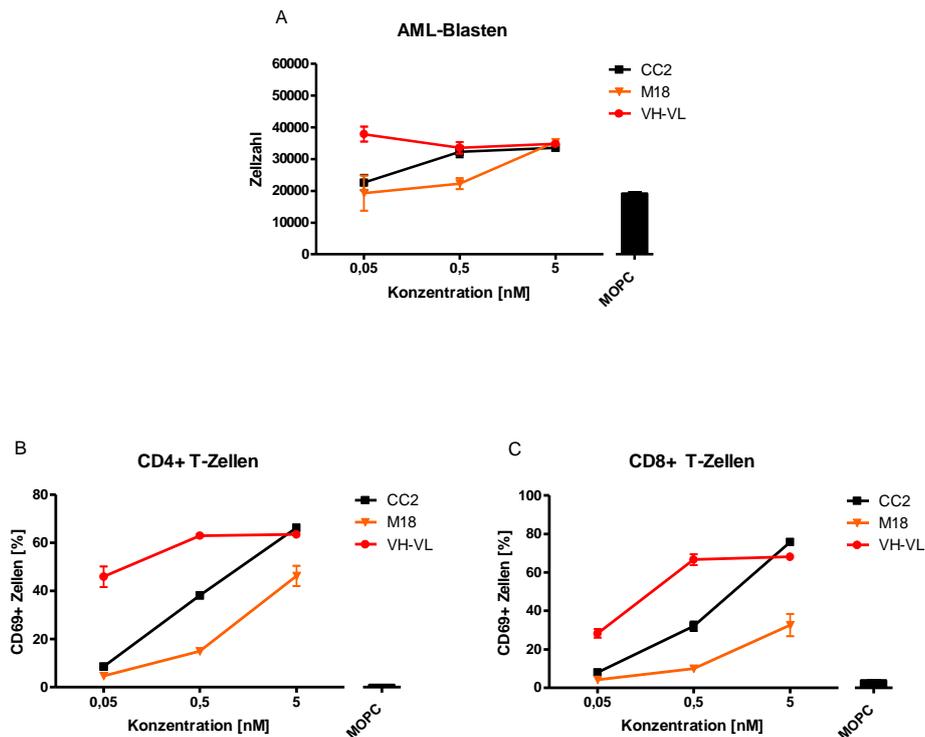


Abbildung 3.2.7: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung autologer T-Zellen bei Patient #3

$0,5 \times 10^6$ PBMCs des AML-Patienten #3 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörper für fünf Tage inkubiert. In Bild A ist die induzierte Blastenreduktion anhand der Zellzahl der AML-Blasten (CD117 positiv) dargestellt. Die Aktivierung der T-Zellpopulation wird prozentual als Anteil der CD69+ Zellen der CD4+ Zellen (Bild B) und CD8+ Zellen (Bild C) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

Insgesamt wurden vier verschiedene Spender (#1, #2, #3, #8) untersucht. Es konnte bei allen vier Spendern eine T-Zellaktivierung detektiert werden. Eine Blastenreduktion konnte mit mindestens einem Konstrukt bei zwei von vier Spendern induziert werden. Das niedrig affine Konstrukt M18 wies ab 5 nM, wie die beiden anderen Konstrukte, zwar eine T-Zellaktivierung auf, führte allerdings bei keinem Spender zu einer Zielzellyse. Dies erreichten CC2 und V_H-V_L bei zwei Spendern (#1 und #8). Anders als bei den Experimenten mit Nalm-16-Zellen zeigte hier das höher affine Konstrukt V_H-V_L keine deutlich bessere Funktionalität gegenüber CC2. Für einen abschließenden Vergleich wurde daher mit AML-Patient #8 die Funktionalität der Konstrukte bei der Konzentration von 5 nM bei dreimaliger Wiederholung überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.8 zu sehen. Für alle Konstrukte konnte bei 5 nM, wie zu erwarten, eine deutliche Aktivierung beider T-Zellpopulationen festgestellt werden. In Bezug auf die Lyse der

Zielzellen zeigte das Ausgangskonstrukt CC2 die erfolgreichste Reduktion der AML-Blasten. Wie in den vorherigen Experimenten erreichte die niedrig affine Variante M18 keine Zielzelllyse. Dass hochaffine Konstrukt V_H-V_L erreichte, verglichen mit CC2, keine überzeugende Blastenreduktion. Die Versuche mit PBMCs des Patienten #8 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Joseph Kauer durchgeführt.

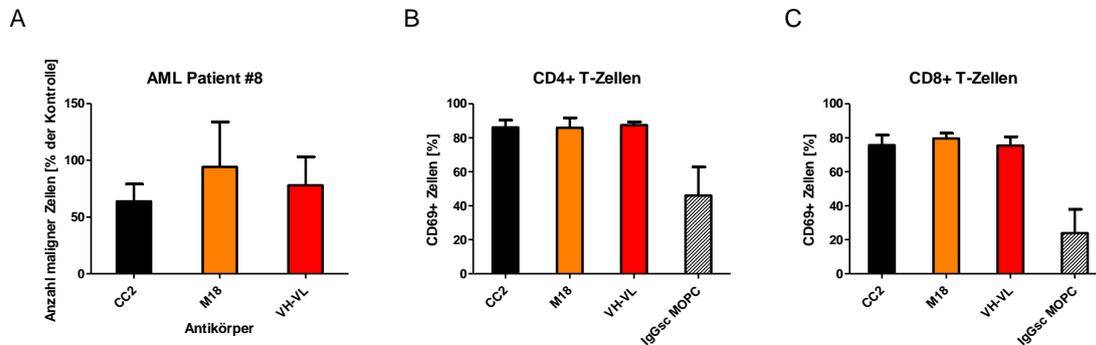


Abbildung 3.2.8: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten durch Antikörper mit unterschiedlicher CD3-Affinität

0,5x10⁶ PBMCs des AML-Patienten #8 wurden jeweils mit den Antikörpern bei einer Konzentration von 5 nM inkubiert. In Abbildung A ist die Lyse der AML-Blasten (CD14 negativ/CD33 positiv) dargestellt, zur Standardisierung im Verhältnis gesetzt zur MOPC IgGsc-Kontrolle des jeweiligen Experiments. Die Veränderung der Aktivierung der T-Zellpopulation (CD69 positiv) ist in Abbildung B (CD4+ T-Zellen) und C (CD8+ T-Zellen) dargestellt. Die Proben wurden in Duplikaten angesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus drei Experimenten.

Die Analyse der verschiedenen CD3-Affinitäten des scFv am IgGsc-Konstrukt zeigte zusammengefasst, dass mit dem Ausgangskonstrukt CC2 bereits die optimale CD3-Affinität für eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen sowie einer erfolgreichen Zielzelllyse erreicht worden war.

3.3 Humanisierung und Optimierung der FLT3-Affinität

Im Folgenden sollte neben der Affinität der CD3-Bindung auch die des FLT3 Antikörpers optimiert werden. Auch hier sollten Varianten unterschiedlicher Affinitäten bezüglich Bindung und Funktionalität verglichen werden.

3.3.1 Klonierung bispezifischer tetravalenter Antikörper unterschiedlicher FLT3-Affinitäten

Bei dem Ausgangskonstrukt CC2 handelte es sich noch um einen chimären Antikörper, da die variablen Domänen gegen FLT3 murinen Ursprungs waren. Durch CDR-Grafting erfolgte eine Humanisierung von CC2. Davon ausgehend wurden durch den Austausch weiterer Aminosäuren in der Framework-Region zwei zusätzliche Varianten erzeugt. Diese sind in der Tabelle 3.3-1 dargestellt und werden dort mit ihren im Verlauf verwendeten Bezeichnungen eingeführt. Klonierung, Transfektion und Aufreinigung dieser Varianten erfolgte durch Dr. Martin Pflügler.

Tabelle 3.3-1: IgGsc-Konstrukte unterschiedlicher FLT3-Affinitäten

Bezeichnung des IgsC-Konstrukts	Veränderungen an der FLT3-Bindungsstelle
CC2	Ausgangskonstrukt (vgl. 3.1)
hCC2	Humanisierung durch CDR-Grafting mit Rückmutation der AS nahe der CDR Regionen
I55A	Weiterentwicklung von hCC2, durch Austausch einer weiteren AS
exthCC2 (extrem humanisiert)	Weiterentwicklung von hCC2, durch Austausch mehrerer AS

3.3.2 Proteinbiochemische Analyse

Für die aufgereinigten, humanisierten Varianten des Ausgangskonstrukts CC2 folgten zunächst mittels analytischer Gelfiltration Untersuchungen auf Homogenität, Molekulargewicht oder eine mögliche Aggregation der Moleküle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.1 zu sehen. Die humanisierten Konstrukte wiesen die für das tetravalente Format erwartete Größe von 200 kDa auf. Es war für alle aufgereinigten Proteine ein klarer Hauptpeak zu erkennen, sodass eine Aggregation ausgeschlossen werden konnte.

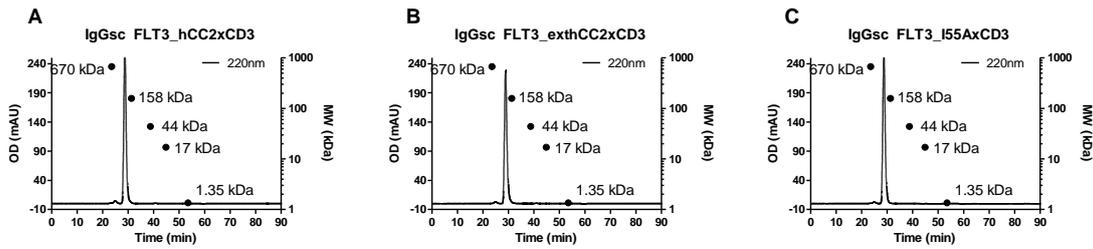


Abbildung 3.3.1: Analytische Chromatographie der FLT3-Varianten

Elutionsprofil der gereinigten tetraivalenten bispezifischen humanisierten FLT3xCD3 Antikörper. Zur Analyse wurden 10 µg des Proteins aufgetragen. Eichproteine (●) dienen zur Bestimmung des Molekulargewichts des zu analysierenden Proteins.

Für die proteinbiochemische Analyse der neu aufgereinigten FLT3-Varianten erfolgte außerdem eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese. Die Proteine wurden unter nicht reduzierenden, sowie reduzierenden Bedingungen aufgetragen, wie in Abbildung 3.3.2 zu sehen ist. Das Molekulargewicht von circa 200 kDa konnte bestätigt werden. Es war keine Aggregation der Proteine zu erkennen, unter reduzierenden Bedingungen ist jeweils die Bande der schweren bzw. leichten Kette zu erkennen.

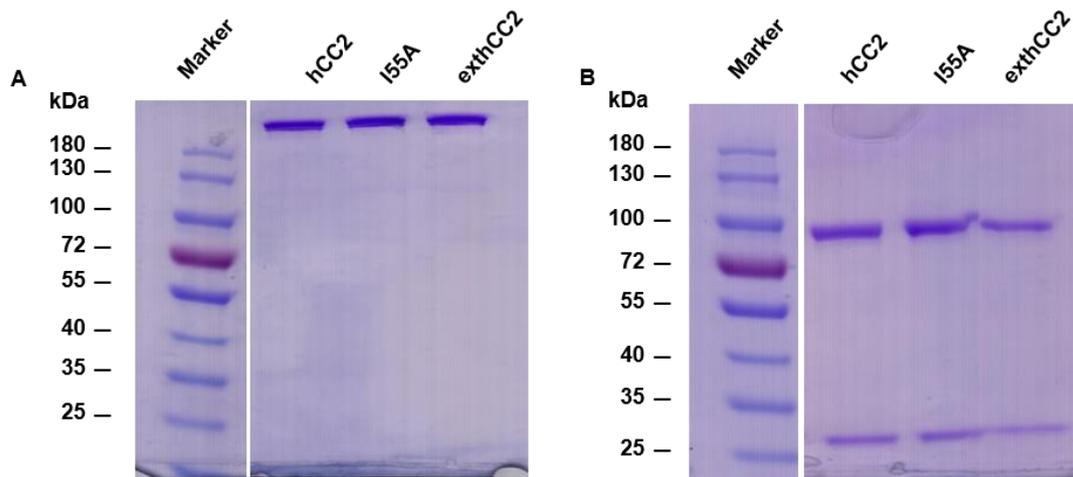


Abbildung 3.3.2: Gelelektrophoretische Analyse der FLT3-Varianten

Abbildung A zeigt die gelelektrophoretische Analyse der FLT3-Varianten unter nicht reduzierenden Bedingungen. In Abbildung B werden die unter reduzierenden Bedingungen analysierten Proteine dargestellt. Die Marker zeigen das Molekulargewicht des Größenstandards.

Es wurde ein Thermo-Shift-Stability-Assay durchgeführt, um den Schmelzpunkt der Proteine festzustellen, dieser lag für alle drei Moleküle bei ca 68 °C, zu sehen in Abbildung 3.3.3.

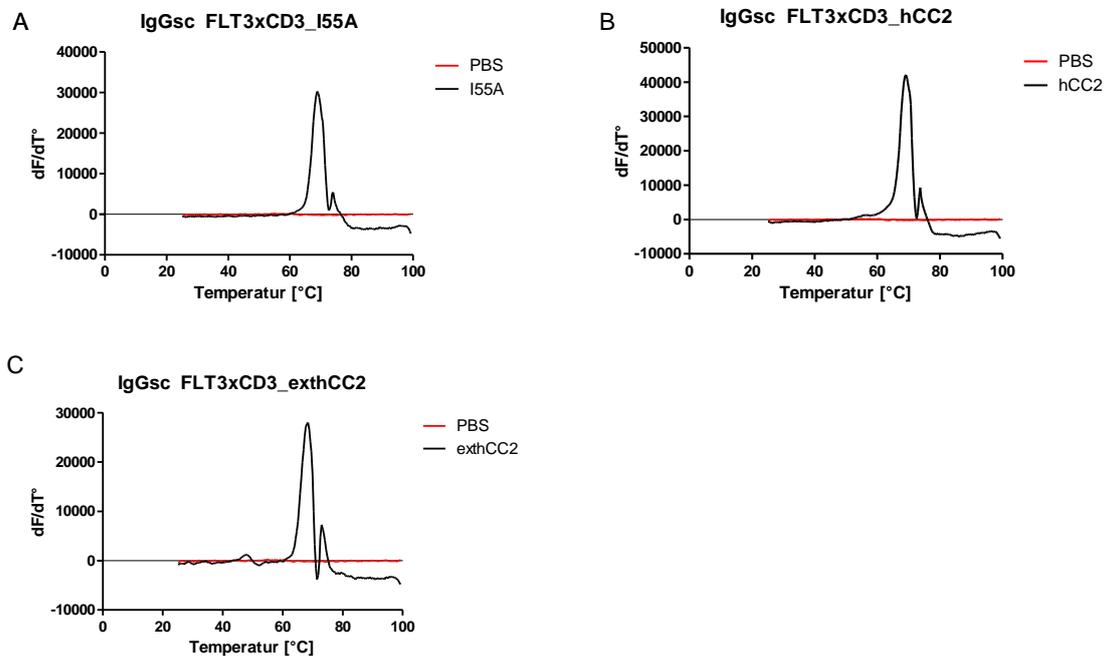


Abbildung 3.3.3: Schmelzpunktbestimmung der FLT3-Varianten

Zusammen mit einem fluoreszierenden Farbstoff wurden die Proteinproben bis auf 99 °C erhitzt. Auf der Abszisse ist die Temperatur [°C] abgebildet. Die Ordinate zeigt die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Temperatur [°C]. Die Änderung an Farbstoffaufnahme je Temperaturzeitpunkt geht einher mit dem Denaturierungszustand des Proteins.

3.3.3 Bindungsanalyse

Zur Ermittlung der Bindung und Affinität an den FLT3-Rezeptor der verschiedenen Varianten erfolgte eine Analyse mittels Durchflusszytometrie. Es wurden FLT3 positive Nalm-16-Zellen verwendet. Alle Konstrukte erreichten eine Sättigung und es konnte für alle Konstrukte eine konzentrationsabhängige Bindung am FLT3-Rezeptor detektiert werden. Das Ausgangskonstrukt CC2 wies zwar eine höhere Affinität als seine humanisierte Variante hCC2 auf. Durch Veränderungen innerhalb der humanisierten Variante konnte aber gegenüber der Variante hCC2 eine leichte Steigerung der Affinität mit dem Konstrukt exthCC2 erreicht werden. Das Konstrukt I55A wies die niedrigste

Affinität auf. In Abbildung 3.3.4 wird ein Experiment mit den verschiedenen Konstrukten exemplarisch gezeigt.

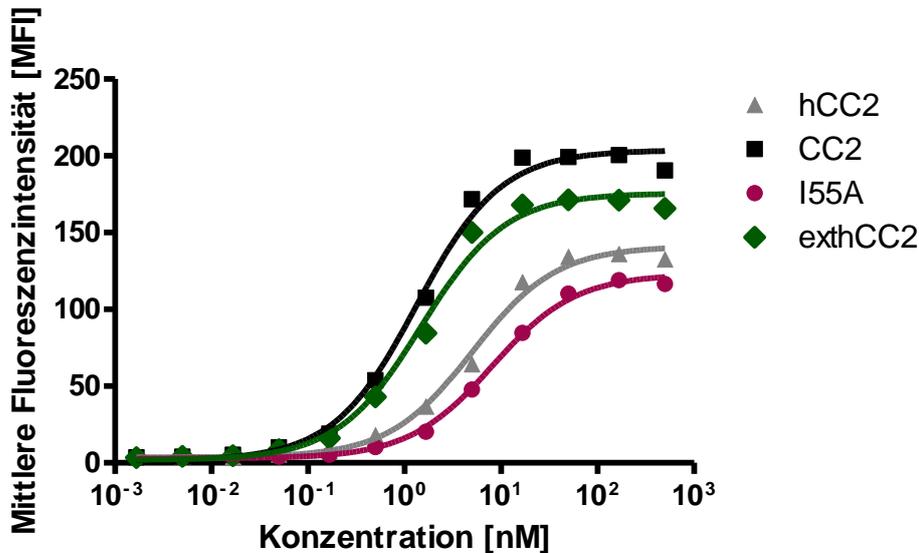


Abbildung 3.3.4: Durchflusszytometrische FLT3-Bindungsanalyse der bispezifischen Antikörper

Die Zellen werden mit den verschiedenen Antikörperkonstrukten (siehe Legende) inkubiert. Die gebundenen Antikörper werden mittels RPE-konjugierten Sekundärantikörper detektiert.

Durch die Humanisierung von CC2 kam es also zu einem leichten Verlust in der Affinität. Durch weitere Veränderungen wurden auch hier verschiedene Varianten produziert, die sich in ihrer Affinität unterschieden. Damit konnte nun überprüft werden, wie sich Affinitätsunterschiede an der N-terminalen Bindungsseite, zum Zielantigen FLT3, auf die Funktionalität auswirkten.

3.3.4 Zielzellyse

Um die verschiedenen Varianten in ihrer Funktion zu vergleichen, wurde die durch die Antikörperkonstrukte induzierte Aktivierung von T-Zellen und die Lyse von primären AML-Blasten im autologen System überprüft. PBMCs des AML-Patienten #8 wurden mit den verschiedenen Antikörpern bei einer Konzentration von 5 nM inkubiert und nach fünf Tagen mittels Durchflusszytometrie wie vorbeschrieben analysiert. Abgebildet sind in Abbildung 3.3.5 die Ergebnisse für Zielzellyse und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen aus insgesamt drei Versuchen. In der Aktivierung zeigte sich I55A für beide T-

Zell Populationen am schwächsten. Das Konstrukt hCC2 erreichte eine höhere Rate als CC2 oder exthCC2. Außerdem erzeugten bei der Blastenreduktion alle Konstrukte mindestens eine gleichwertige Lyse zum Ausgangskonstrukt CC2. Die beiden niederaffinen Varianten hCC2 und I55A erreichten dabei die höchste Reduktion der AML Blasten im Vergleich zur Kontrolle auf 45 %.

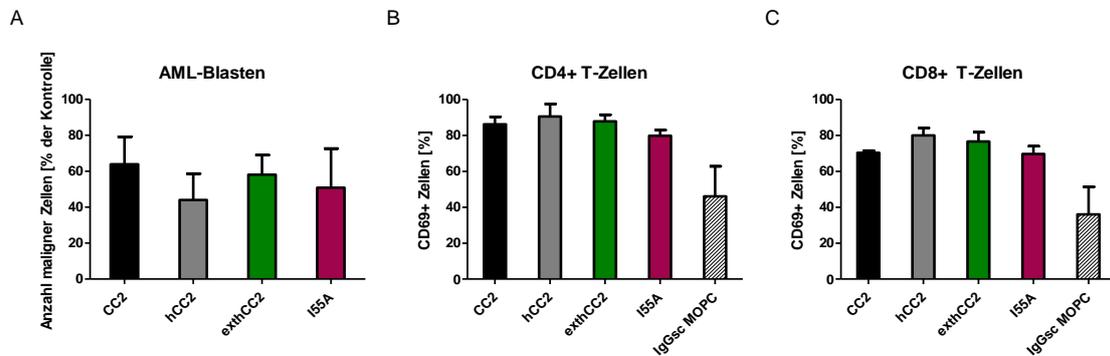


Abbildung 3.3.5: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen mit Konstrukten unterschiedlicher FLT3-Affinitäten

0,5x10⁶ PBMCs des AML-Patienten #8 wurden jeweils mit den Antikörpern bei einer Konzentration von 5 nM inkubiert. In Abbildung A ist die Lyse der AML-Blasten (CD14 negativ/CD33 positiv) dargestellt, zur Standardisierung im Verhältnis gesetzt zur MOPC IgGsc-Kontrolle des jeweiligen Experiments. Die Aktivierung der T-Zellpopulation (CD69 positiv) ist in Abbildung B (CD4+ T-Zellen) und C (CD8+ T-Zellen) dargestellt. Die Proben wurden in Duplikaten angesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus drei Experimenten.

In der Analyse der Funktionalität erwiesen sich die FLT3-optimierten Moleküle alle als mindestens gleichwertig zum Ausgangskonstrukt CC2. Mit der Variante hCC2 konnte durch die Verringerung der Affinität zum Zielantigen FLT3 sowohl eine erhöhte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen als auch vor allem eine verbesserte Zielzelllyse erreicht werden.

3.4 Das optimiertes Molekül hCC2

3.4.1 Zielzellyse

Im Folgenden sollte die Aktivität des Moleküls hCC2 mit weiteren Spendern untersucht werden. Der Antikörper hCC2 induzierte bei allen Spendern eine konzentrationsabhängige Aktivierung der T-Zellpopulationen. Je nach Patientenproben wurden 20-80 % der CD4+ T-Zellen aktiviert, für die CD8+ T-Zellen konnte ebenfalls eine deutliche Aktivierung erzielt werden, abgesehen von Patienten #7. Allerdings wurde bei diesem Spender trotzdem eine deutliche Reduktion der Blasten induziert, bei 5 nM wurde eine nahezu vollständige Lyse erreicht. Bei dem Patienten #3 konnte ab 5 nM eine leichte Lyse der Blasten erzielt werden, genau wie für Patient #5. Die Kontrollen zeigten bei diesen Spendern insgesamt eine höhere Blastenzahl als für die Patienten #1 und #7. Das Effektor -: Zielzellverhältnis lag bei Patient #7 bei 1:18, für Patient #5 bei 1:4 und für Patient 3# bei 1:2. Patient #1 zeigte im Verhältnis Effektorzelle:Zielzelle eine Rate von 1:1. Insgesamt erzielte hCC2 bei allen Spendern eine Lyse der AML-Blasten.

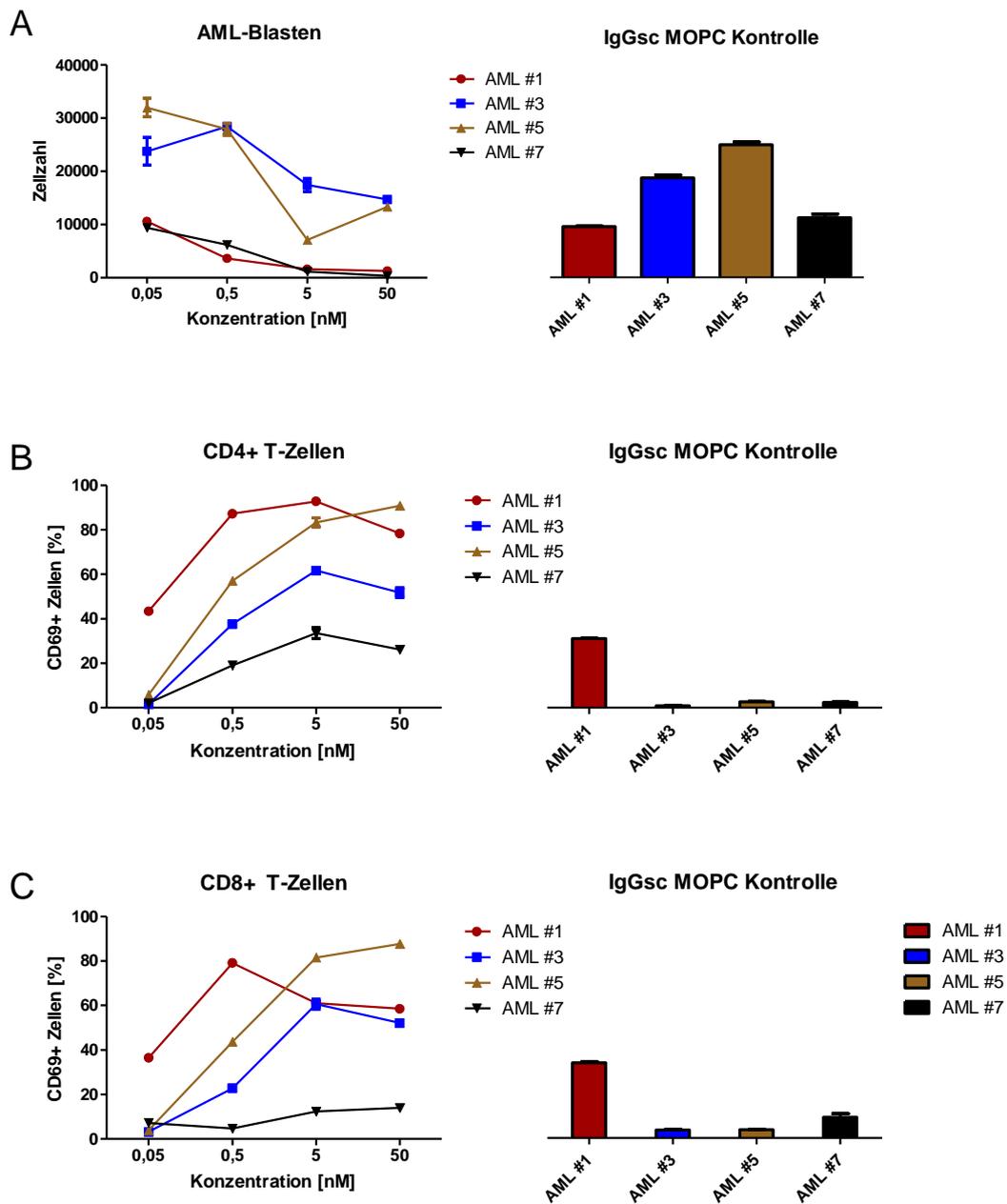


Abbildung 3.4.1: Antikörpervermittelte Lyse primärer AML-Blasten und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch hCC2

0,5x10⁶ PBMCs des jeweiligen Patienten wurden mit einer Titration des Antikörpers hCC2 fünf Tage inkubiert. In Abbildung A ist die Lyse der AML-Blasten der Patienten #1 (CD14-, CD33+), #3 (CD117+), #5 (CD117+), und #7 (CD33+, CD117-) dargestellt. Die Aktivierung der T-Zellpopulation (CD69+) ist in Abbildung B (CD4+ T-Zellen) und C (CD8+ T-Zellen) dargestellt. Die Proben wurden in Duplikaten angesetzt, gezeigt werden die Mittelwerte und deren Standardabweichung.

Das optimierte Molekül induzierte also bei allen vier weiteren Spendern konstant eine Aktivierung und Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen und außerdem eine Reduktion der Blasten. Trotz unterschiedlicher Effektor -: Zielzellverhältnisse der Patientenproben oder unterschiedlich stark präaktivierter T-Zellpopulationen zeigte eine Inkubation mit hCC2 deutliche Effekte. Dies bestätigte die vorangegangenen Optimierungsschritte.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Weiterentwicklung eines bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpers. Zunächst wurden zwei verschiedene Formate, das Fabsc-Konstrukt und IgGsc-Konstrukt (Abbildung 3.1.1) miteinander verglichen. Außerdem wurde durch Veränderung der Affinität sowohl des FLT3 als auch des CD3 Antikörpers versucht, eine Verbesserung der Affinität zu erzielen.

Für eine Untersuchung der Funktionalität, also die Fähigkeit zur Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen und Reduktion der Zielzellen, wurden zunächst *in vitro* Versuche mit FLT3 positiven Tumorzelllinien und PMBCs durchgeführt. Um aber auch *in vitro* die Zielzellyse unter möglichst physiologischen Bedingungen zu analysieren, wurden Experimente mit PBMCs von AML-Patienten durchgeführt. So konnte nun im autologen System die Funktionalität der Antikörper *ex vivo* untersucht werden.

4.1 Affinität

Die Funktionalität eines bispezifischen Antikörpers wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Neben den gewählten Zielantigenen und dem Epitop hat auch das Antikörperformat und vor allem die Affinität des Antikörpers einen großen Einfluss.

4.1.1 Antikörperformat

Das Molekül im IgGsc-Format wies eine höhere Affinität zum Zielantigen FLT3 auf, als das Fabsc-Konstrukt. Dies liegt im Format des Antikörpers begründet. Das IgGsc-Konstrukt kann bivalent an den FLT3-Rezeptor binden, anders als das Fabsc-Konstrukt mit seiner monovalenten Bindungsstelle zu FLT3, und hat somit eine höhere Avidität. Man würde zunächst auch auf der CD3-Bindungsseite eine höhere Avidität des IgGsc-Konstrukts erwarten. Allerdings erweist sich hier das Fabsc-Konstrukt allein mit der

monovalenten Bindungsstelle höher affin als das IgGsc-Konstrukt. Die räumliche Faltung und gegenseitiger Beeinflussung der zwei CD3 scFv beim IgGsc-Konstrukt führen möglicherweise zur Behinderung bei der Bindung an CD3. Daher könnte sich die monovalente Bindung des Fabsc-Konstrukts begünstigend auf die CD3-Affinität auswirken.

Die höhere CD3-Affinität des Fabsc-Konstrukts könnte auch der Grund für die leicht erhöhte T-Zellproliferation des Fabsc-Konstrukts in der *off tumor/on target* Situation sein. Diese Beobachtung wurde auch bereits beim Vergleich des tetravalenten PSMAxCD3 Antikörpers mit dem entsprechenden bivalenten Konstrukt gemacht (Zekri et al., 2021).

4.1.2 CD3-Affinität

Der Einfluss der CD3-Affinität auf die Aktivierung von T-Zellen und deren Zytotoxizität stellt eine interessante Optimierungsgröße dar. In Arbeiten von Zhu und Carter konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die CD3-Affinität mit der Proliferation von T-Zellen korrelierte. Es muss aber berücksichtigt werden, dass niedrige Affinitäten mit einer geringeren Aktivierung von T-Zellen nur in niedrigen Konzentrationen miteinander einhergingen. In höheren Konzentrationen wurde auch bei niedrigen Affinitäten eine gleichwertige Aktivierung beobachtet. Darüber hinaus folgte in hohen Konzentrationen des Antikörpers aus einer erhöhten CD3-Affinität nicht automatisch eine verbesserte Zielzellyse (Zhu and Carter, 1995).

Auch bei unseren Versuchen mit allogenen Zielzellen ergab sich eine Korrelation von hoher CD3-Affinität und Aktivität, das heißt die EC50 Konzentration sinkt mit steigender CD3-Affinität. Allerdings zeigte sich auch hier, dass unabhängig von der CD3-Affinität bei hohen Konzentrationen eine vergleichbare Aktivierung der T-Zellpopulationen und eine Zielzellyse erreicht wurde (Abbildung 3.2.5).

In der Arbeit von Moore et al (Moore et al., 2015) wurde ebenfalls die Affinitätsveränderung der CD3-Bindung bei bispezifischen Antikörpern untersucht. Bei *in vitro* Versuchen gelang mit niederaffinen Konstrukten keine erfolgreiche Zielzellyse. Allerdings zeigte bei Versuchen in Primaten das Molekül mit mittlerer Affinität, trotz niederer T-Zellproliferation, die erfolgreichste therapeutische Aktivität. Zwar wurde

dafür eine weitaus höhere Konzentration benötigt als für das hochaffine Molekül, die Lyse der Zielzellen wurde jedoch auch über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten. Außerdem führte die Antikörpervariante mit einer hochaffinen CD3-Variante bei *in vivo* Versuchen mit Primaten zu einer massiven Zytokinfreisetzung. In unseren Experimenten wurde versucht der *in vivo* Situation durch Versuche im autologen System nahe zu kommen. Dazu wurden Versuche mit PBMCs von AML-Patienten durchgeführt, dargestellt in Kapitel 3.2.4. Hierbei zeigte sich bei dem niederaffinen Konstrukt M18 zwar noch eine konzentrationsabhängige Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, allerdings führte dies nicht zu einer Reduktion der Blasten. Trotzdem wurde auch in dieser Arbeit festgestellt, dass eine weitere CD3-Affinitätserrhöhung des Ausgangskonstrukt CC2 nicht zu einer Verbesserung der Lyse von Blasten führte. Zwar konnte das Konstrukt V_H-V_L schon bei einer niedrigeren Konzentration eine Lyse von Nalm-16 Zellen erzielen als CC2, in Versuchen mit AML-Blasten induzierte jedoch CC2 nach fünf Tagen eine höhere Blastenreduktion. Damit war auch hier eine optimale Funktion bei mittlerer CD3-Affinität gegeben.

4.1.3 FLT3-Affinität

Für die Klonierung des tetravalenten bispezifischen Antikörpers FLT3xCD3 wurde für die Tumorzellantigen-spezifität des murinen Klons 4G8 verwendet, der durch Hybridom-Technologie hergestellt wurde. Die genaue Epitopbindung wurde dabei bereits für die Entwicklung des optimierten monospezifischen Antikörper 4G8SDIEM analysiert. So bindet der Klon 4G8 weit proximal an der vierten von fünf extrazellulären immunoglobulinähnlichen Domänen des FLT3-Rezeptors (Hofmann et al., 2012). Dies verspricht bereits eine hohe Funktionalität des Antikörpers, da diese durch eine proximale Bindung am Zielantigen begünstigt wird (Bluemel et al., 2010). Allerdings war, wie bereits erwähnt, der Klon 4G8 noch murinen Ursprungs. Bei der therapeutischen Applikation eines murinen Antikörpers kann es zu einer Reaktion des Immunsystems, einer Antikörperreaktion und einer Neutralisation des therapeutischen Antikörpers kommen (Shawler et al., 1985). Eine Chimärisierung des murinen Antikörpers ist ein wichtiger Schritt, um diese Reaktion zu unterbinden. Daher erfolgte zunächst durch Dr. Martin Pflügler die Humanisierung von CC2 mittels CDR Grafting zu hCC2. Murine Sequenzen der Framework Region wurden mit der passenden humanen Sequenz

getauscht. Die Rückmutationen, die nahe der CDRs vorgenommen wurden, können Einfluss auf die Affinität haben und erklären somit die unterschiedlichen Affinitäten der neuen humanisierten Konstrukte (Chatellier et al., 1996). In der Arbeit von Root et al (Root et al., 2016) konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Erhöhung der Affinität zum Zielantigen auch mit einer erhöhten Zielzellyse einherging. Allerdings wurden hier über Veränderungen der CDRs nicht nur Moleküle unterschiedlicher Affinität erzeugt, sondern auch eine unterschiedliche Epitopbindung an das Tumorzellantigen erwirkt. Mit exthCC2 war im Rahmen dieser Arbeit zwar ein stärker affiner humanisierter FLT3 Antikörper generiert worden, allerdings zeigte sich dieser in der Zielzellyse dem niederaffineren hCC2 nicht überlegen. Affinitätsveränderungen, hervorgerufen durch AS-Austausch in der FR-Region scheinen mit der Zielzellyse also nicht direkt zu korrelieren.

Verglichen mit dem chimären Ausgangskonstrukt CC2 führte die Humanisierung bei allen FLT3-Varianten trotz geringerer FLT3-Affinität zu einer verbesserten Zielzellyse. Die Variante hCC2, deutlich niedriger affin zu FLT3 als CC2, zeigte dabei die höchste Wirksamkeit. In diesem Fall brachte also ein Affinitätsverlust zum Tumorzellantigen eine gesteigerte Aktivität. Dies verdeutlicht, dass bei Überlegungen zur optimalen Affinität immer auch das Zielantigen berücksichtigt werden muss. So handelt es sich bei dem hier verwendeten Zielantigen, dem FLT3-Rezeptor, um eine Klasse III Rezeptortyrosinkinase. Die Bindung des natürlichen Liganden FLT3L führt zu einer Dimerisierung und Internalisierung des Rezeptors sowie zur Rekrutierung verschiedener Signaltransduktoren und damit zu einer Differenzierung oder Proliferation der exprimierenden Zelle (vgl. Kapitel 1.3.1). Für den hier verwendeten Klon 4G8 ist eine leichte agonistische Wirkung zum Rezeptor bekannt, die mit einer Internalisierung des Rezeptors einhergehen könnte (Bühning and Rappold, 1999). Daraus lässt sich schließen, dass eine Affinitätsverminderung zum Tumorzellantigen die leicht agonistische Wirkung verringert, und damit eine höhere Reduktion der Zielzellen ermöglicht. So ließe sich erklären, weshalb die Variante hCC2 eine stärkere Lyse der Zielzellen als die höher affinen Varianten exthCC2 oder CC2 induzierte. Eine weitere Affinitätsminderung wie bei I55A brachte jedoch keinen weiteren Vorteil mehr und war für eine T-Zellspezifische Lyse nicht mehr ausreichend. Durch die Humanisierung und leichte Affinitätsminderung der FLT3-Spezifität konnte also mit hCC2 eine Optimierung des tetravalenten bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpers erreicht werden.

4.2 Zielzelllyse

Nach der Charakterisierung der Antikörper war der Vergleich in ihrer Funktionalität entscheidend. Dabei wurde die spezifische Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen und eine Reduktion der Zielzellen beurteilt. Dabei zeigte sich, dass für eine differenzierte Unterscheidung der Antikörpervarianten anhand der Zielzelllyse *in vitro* Versuche im autologen System mit PBMCs von AML-Patienten nötig waren.

4.2.1 Lyse von Nalm-16-Zellen mit PBMCs gesunder Spender

Um die durch die Antikörper induzierte Aktivierung von T-Zellen, sowie die Reduktion der Zielzellen analysieren zu können, wurden mit den verschiedenen CD3-Konstrukten zunächst Versuche mit der Tumorzelllinie Nalm-16 (FLT3 positiv) und PBMCs im Effektor-: Zielzellverhältnis 2:1 durchgeführt. Nalm-16-Zellen exprimieren circa 6800 FLT3-Rezeptoren pro Zelle (Hofmann et al., 2012). Das Effektor-: Zielzellverhältnis von 2:1, die gegenüber Blasten relativ hohe Expression der FLT3-Rezeptoren auf den Zielzellen sowie die allogene Effektorzellen in Form der PBMCs stellten jedoch keine realistischen Versuchsbedingungen dar. Damit waren diese Versuche zwar wichtig, um einen ersten Eindruck zur Wirksamkeit der Antikörper zu erhalten, boten jedoch noch keine ausreichende Grundlage für eine endgültige Bewertung der verschiedenen Moleküle.

4.2.2 Lyse im autologen System mit PBMCs von AML-Patienten

Durch Versuche mit PBMCs der AML-Patienten war es möglich, die Funktionalität der Antikörper im autologen System *ex vivo* zu überprüfen. Anders als etwa bei Versuchen mit einer Tumorzelllinie wie Nalm-16-Zellen wurden in dieser experimentellen Anordnung autologe Ziel- und Effektorzellen verwendet. Außerdem war das numerische Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen vorgegeben und ging meist „physiologischer Weise“ mit niedrigen Effektor-: Zielzellverhältnissen einher. Darüber hinaus exprimieren AML-Blasten in der Regel weniger FLT3 Zielantigene als die Nalm-16-Zelllinie (Durben et al., 2015). Durch all diese Faktoren lässt sich womöglich erklären, weshalb eine deutliche Lyse der Blasten in Versuchen mit PMBCs von AML-Patienten erst bei 5 nM auftritt. Außerdem kann die Inkubationszeit von nur fünf Tagen einen weiteren limitierenden Faktor darstellen. In Langzeitkulturen im autologen System mit einem

CD33xCD3 BiTe Antikörper konnten Krupka et al. 2014 zeigen, dass eine Aktivierung von T-Zellen und eine deutliche Blastenreduktion oft erst zwischen Tag vier bis zwölf stattfinden. Ein solches System ist allerdings mit hohem technischem Aufwand verbunden. Neben den AML-Zellen müssen murine Knochenmarkstromazellen (MS-5) kokultiviert werden, außerdem wird alle vier Tage Medium mit dem entsprechenden Volumen ausgetauscht, welches Antikörper enthält. Dieses System ist also auch anfällig für externe Störfaktoren. Bei einem Assay mit AML-Zellen in einem herkömmlichen Zellkultursystem, wie er in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ist allerdings nach acht Tagen die Zellviabilität insgesamt zu gering, um die Antikörperinduzierte Blastendepletion zu bewerten (Krupka et al., 2014). Da ab vier Tagen oft eine Lyse zu erkennen war, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine im bekannten und bewährten Zellkultursystem sinnvolle und technisch mögliche Inkubationszeit von fünf Tagen gewählt.

Neben der Inkubationszeit können wie bereits erwähnt die große Spendervariabilität bezüglich der Effektor-: Zielzellverhältnisse oder die Präaktivierung der T-Zellen die Zielzelllyse beeinflussen und wie im Falle der CD3-Varianten möglicherweise die hohe Spendervariabilität in der Zielzelllyse erklären. All diese Besonderheiten können außerdem dazu beitragen, dass im autologen System die Korrelation von CD3-Affinität und Aktivität insofern abweicht, als dass es bei hohen Affinitäten wieder zu einer Reduktion der Aktivität kommt.

Das Molekül hCC2 konnte bei Versuchen mit PBMCs von AML Patienten im autologen System spenderunabhängig, und auch schon nach fünf Tagen eine Aktivierung der T-Zellen sowie eine Lyse der Blasten und induzieren, was die hohe Wirksamkeit des Moleküls unterstreicht.

4.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bispezifischer bivalenter chimärer FLT3xCD3 Antikörper zu einem bispezifischen tetravalenten humanisierten FLT3xCD3 Antikörper weiterentwickelt. Dieser zeigte eine effektive Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen und eine, durch den Antikörper vermittelte, spezifische Lyse der Zielzellen. Neben der Wirksamkeit könnten Untersuchungen zur möglichen Toxizität des Antikörpers folgen.

Das Zielantigen FLT3 wird auch auf CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, wobei dort die Expression des Rezeptor pro Zelle jedoch weitaus niedriger als bei einer Zellreihe der akuten myeloischen Leukämie ist (Turner et al., 1996). Um eine antikörpervermittelte Zytotoxizität gegenüber hämatopoetischen Vorläuferzellen auszuschließen, wären Versuche mit hCC2 und Zellen des gesunden, humanen Knochenmarks ein interessanter Ansatz. Darüber hinaus gibt es noch keine vollständigen Daten zur Zytokinfreisetzung des optimierten Moleküls hCC2. Durch die Anwendung therapeutischer T-Zellaktivierender Substanzen, wie etwa der bispezifische CD19xCD3 Antikörper Blinatumomab, kann es zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen kommen. Je nach Ausmaß gehen damit schwere systemische Nebenwirkungen für den Patienten, wie hohes Fieber, Schüttelfrost, Hypertonie, neurologische Symptome bis hin zum Versagen einzelner Organsysteme einher (Aldoss et al., 2019). Wie in Kapitel 3.2 dargestellt, enthält hCC2 ein scFv-Fragment mit mittlerer CD3-Affinität. Deshalb ist zunächst, basierend auf weiteren Arbeiten mit bispezifischen CD3 Antikörpern unterschiedlicher Affinitäten, keine massive Zytokinfreisetzung zu erwarten (Leong et al., 2017, Zuch de Zafra et al., 2019).

5 Zusammenfassung

Bispezifische Antikörper sind ein vielversprechender Ansatz für die Tumorthherapie. Neben der Spezifität zu einem Zielantigen, wie einem tumorassoziierten Oberflächenmolekül, besitzen die meisten bispezifischen Antikörper eine Spezifität zu CD3, das mit dem spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) assoziiert ist. Damit können T-Zellen, unabhängig von ihrer Antigenspezifität, antikörperabhängig rekrutiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei bispezifische Antikörper gegen das leukämieassoziierte Antigen FLT3 in zwei verschiedenen Formaten, dem Fabsc-Format und dem IgGsc-Format (Abbildung 3.1.1), verglichen. Beide Konstrukte zeigten ein ähnliches Bindungsverhalten und führten bei Inkubation zusammen mit FLT3 positiven Zellen und PBMCs zur Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen. Das IgGsc-Konstrukt (CC2) wies neben der bereits bekannten längeren Serumhalbwertszeit auch eine geringere unspezifische T-Zellproliferation auf, und wurde deshalb weiter optimiert. Dazu wurden Varianten mit Affinitätsveränderungen an der CD3-Bindungsseite untersucht, wobei mit dem Ausgangskonstrukt CC2 bereits die optimale CD3-Affinität zur Aktivierung der T-Zellen sowie der Zielzelllyse erreicht worden war. Auch für die FLT3-Bindung erfolgte die Analyse verschiedener Varianten mit unterschiedlichen Affinitäten. Durch eine leichte Affinitätsminderung im Zuge der Humanisierung der variablen FLT3-Domäne wurde mit dem Konstrukt hCC2 eine verbesserte Zielzelllyse erreicht, und konnte spenderunabhängig in *ex vivo* Experimenten mit AML-Proben die beste Blastenreduktion erzielen. Damit ist ein affinitäts- und formatoptimiertes, humanisiertes, bispezifisches Molekül mit FLT3xCD3 Spezifität entwickelt worden, das zur Behandlung von Patienten mit FLT3 positiver akuter myeloischer Leukämie verwendet werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Acuto, O & Michel, F 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology*, 3(12): 939-51.
- Agnes, F, Shamoon, B, Dina, C, Rosnet, O, Birnbaum, D & Galibert, F 1994. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, 145(2): 283-8.
- Akiyama, T, Takayanagi, S-I, Maekawa, Y, Miyawaki, K, Jinnouchi, F, Jiromaru, T, Sugio, T, Daitoku, S, Kusumoto, H & Shimabe, M 2015. First preclinical report of the efficacy and PD results of KHK2823, a non-fucosylated fully human monoclonal antibody against IL-3R α . *Blood*, 126(23): 1349.
- Aldoss, I, Khaled, S K, Budde, E & Stein, A S 2019. Cytokine Release Syndrome With the Novel Treatments of Acute Lymphoblastic Leukemia: Pathophysiology, Prevention, and Treatment. *Current Oncology Reports*, 21(1): 4.
- Ansell, S M, Lesokhin, A M, Borrello, I, Halwani, A, Scott, E C, Gutierrez, M, Schuster, S J, Millenson, M M, Cattry, D, Freeman, G J, Rodig, S J, Chapuy, B, Ligon, A H, Zhu, L, Grosso, J F, Kim, S Y, Timmerman, J M, Shipp, M A & Armand, P 2015. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 372(4): 311-9.
- Arber, D A, Orazi, A, Hasserjian, R, Thiele, J, Borowitz, M J, Le Beau, M M, Bloomfield, C D, Cazzola, M & Vardiman, J W 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20): 2391-405.
- Arnold, J N, Wormald, M R, Sim, R B, Rudd, P M & Dwek, R A 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 25: 21-50.
- Bachanova, V, Lansigan, F, Quick, D P, Vlock, D, Gillies, S & Nakamura, R 2015. Remission induction in a phase I/II study of an anti-CD20-interleukin-2 immunocytokine DI-Leu16-IL2 in patients with relapsed B-Cell lymphoma. *Blood*, 126(1533).
- Berger, R, Rotem-Yehudar, R, Slama, G, Landes, S, Kneller, A, Leiba, M, Koren-Michowitz, M, Shimoni, A & Nagler, A 2008. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clinical Cancer Research*, 14(10): 3044-51.
- Beyar-Katz, O & Gill, S 2018. Novel Approaches to Acute Myeloid Leukemia Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 24(22): 5502-5515.
- Bird, R E, Hardman, K D, Jacobson, J W, Johnson, S, Kaufman, B M, Lee, S M, Lee, T, Pope, S H, Riordan, G S & Whitlow, M 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877): 423-6.
- Birg, F, Courcoul, M, Rosnet, O, Bardin, F, Pebusque, M J, Marchetto, S, Tabilio, A, Mannoni, P & Birnbaum, D 1992. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*, 80(10): 2584-93.
- Bluemel, C, Hausmann, S, Fluhr, P, Sriskandarajah, M, Stallcup, W B, Baeuerle, P A & Kufer, P 2010. Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a

- large melanoma surface antigen. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(8): 1197-209.
- Boder, E T & Wittrup, K D 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15(6): 553-7.
- Bournazos, S, Woof, J M, Hart, S P & Dransfield, I 2009. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clinical & Experimental Immunology*, 157(2): 244-54.
- Bruggemann, M, Caskey, H M, Teale, C, Waldmann, H, Williams, G T, Surani, M A & Neuberger, M S 1989. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(17): 6709-13.
- Bühning, H J D & Rappold, I. 1999. *Monoklonaler Antikörper 4G8B4B12 gegen humanes FLT3/FLK2*. EP 0 889 125 B1.
- Buie, L W, Pecoraro, J J, Horvat, T Z & Daley, R J 2015. Blinatumomab: A First-in-Class Bispecific T-Cell Engager for Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Annals of Pharmacotherapy*, 49(9): 1057-67.
- Burnet, S F M 1959. *The clonal selection theory of acquired immunity*, TN, Vanderbilt University Press Nashville.
- Caligiuri, M A 2008. Human natural killer cells. *Blood*, 112(3): 461-469.
- Carow, C E, Levenstein, M, Kaufmann, S H, Chen, J, Amin, S, Rockwell, P, Witte, L, Borowitz, M J, Civin, C I & Small, D 1996. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*, 87(3): 1089-96.
- Carter, P, Presta, L, Gorman, C M, Ridgway, J B, Henner, D, Wong, W L, Rowland, A M, Kotts, C, Carver, M E & Shepard, H M 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10): 4285-9.
- Castaigne, S, Pautas, C, Terre, C, Raffoux, E, Bordessoule, D, Bastie, J N, Legrand, O, Thomas, X, Turlure, P, Reman, O, De Revel, T, Gastaud, L, De Gunzburg, N, Contentin, N, Henry, E, Marolleau, J P, Aljijakli, A, Rousselot, P, Fenaux, P, Preudhomme, C, Chevret, S & Dombret, H 2012. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 379(9825): 1508-16.
- Chatellier, J, Van Regenmortel, M H, Vernet, T & Altschuh, D 1996. Functional mapping of conserved residues located at the VL and VH domain interface of a Fab. *Journal of Molecular Biology*, 264(1): 1-6.
- Chen, L & Flies, D B 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4): 227-42.
- Choudhary, C, Müller-Tidow, C, Berdel, W E & Serve, H 2005. Signal transduction of oncogenic Flt3. *International Journal of Hematology*, 82(2): 93-9.
- Clynes, R A, Towers, T L, Presta, L G & Ravetch, J V 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*, 6(4): 443-6.
- Coloma, M J & Morrison, S L 1997. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-63.
- Corti, D, Voss, J, Gamblin, S J, Codoni, G, Macagno, A, Jarrossay, D, Vachieri, S G, Pinna, D, Minola, A & Vanzetta, F 2011. A neutralizing antibody selected from

- plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*, 333(6044): 850-856.
- Dall'acqua, W F, Kiener, P A & Wu, H 2006. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *Journal of Biological Chemistry*, 281(33): 23514-24.
- Datta-Mannan, A, Thangaraju, A, Leung, D, Tang, Y, Witcher, D R, Lu, J & Wroblewski, V J 2015. Balancing charge in the complementarity-determining regions of humanized mAbs without affecting pI reduces non-specific binding and improves the pharmacokinetics. *Monoclonal antibodies* 7(3): 483-93.
- Davids, M S, Kim, H T, Bachireddy, P, Costello, C, Liguori, R, Savell, A, Lukez, A P, Avigan, D, Chen, Y-B & Mcsweeney, P 2016. Ipilimumab for patients with relapse after allogeneic transplantation. *New England Journal of Medicine*, 375(2): 143-153.
- Döhner, H, Estey, E, Grimwade, D, Amadori, S, Appelbaum, F R, Büchner, T, Dombret, H, Ebert, B L, Fenaux, P, Larson, R A, Levine, R L, Lo-Coco, F, Naoe, T, Niederwieser, D, Ossenkoppele, G J, Sanz, M, Sierra, J, Tallman, M S, Tien, H F, Wei, A H, Löwenberg, B & Bloomfield, C D 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4): 424-447.
- Durben, M, Schmiedel, D, Hofmann, M, Vogt, F, Nübling, T, Pyz, E, Bühring, H J, Rammensee, H G, Salih, H R, Große-Hovest, L & Jung, G 2015. Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia. *Molecular Therapy*, 23(4): 648-55.
- 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(1): 78-85.
- Ehrlich, P 1891. Experimentelle untersuchungen über immunität. II. Ueber abrin. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 17(44): 1218-1219.
- Ehrlich, P 1900. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life. *Proceedings of the royal Society of London*, 66(424-433): 424-448.
- European Medicines Agency. 2017a. *Gazyvaro: EPAR - Summary for the public* [Online]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/gazyvaro>. [Zugriff 25.05. 2019].
- European Medicines Agency. 2017b. *RYDAPT : EPAR - Public assessment report* [Online]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt>: European Medicine Agency. [Zugriff 07.06 2019].
- European Medicines Agency. 2018a. *Kymriah : EAPR - Public assessment report* [Online]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah#authorisation-details-section>. [Zugriff 28.05. 2019].
- European Medicines Agency. 2018b. *Mylotarg : EPAR - Public assessment report* [Online]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mylotarg-0>. [Zugriff 12.06. 2019].
- European Medicines Agency. 2018c. *Yescarta : EPAR - Public assessment report* [Online]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>. [Zugriff 28.05. 2019].
- Fagraeus, A 1948. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *Journal of Immunology*, 58(1): 1-13.

- Feinstein, A, Richardson, N & Taussig, M I 1986. Immunoglobulin flexibility in complement activation. *Immunology Today*, 7(6): 169-74.
- Felton, L D & Bailey, G H 1926. Biologic significance of the soluble specific substances of pneumococci. *The Journal of Infectious Diseases*, 38(2): 131-144.
- Golay, J, Cittera, E, Di Gaetano, N, Manganini, M, Mosca, M, Nebuloni, M, Van Rooijen, N, Vago, L & Introna, M 2006. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica*, 91(2): 176-83.
- Greenwald, R J, Freeman, G J & Sharpe, A H 2005. The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology*, 23: 515-48.
- Griffin, J D, Linch, D, Sabbath, K, Larcom, P & Schlossman, S F 1984. A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *Leukemia Research*, 8(4): 521-34.
- Griffith, J, Black, J, Faerman, C, Swenson, L, Wynn, M, Lu, F, Lippke, J & Saxena, K 2004. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell*, 13(2): 169-78.
- Gronski, P, Seiler, F R & Schwick, H G 1991. Discovery of antitoxins and development of antibody preparations for clinical uses from 1890 to 1990. *Molecular immunology*, 28(12): 1321-1332.
- Hanes, J & Pluckthun, A 1997. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10): 4937-42.
- Hayakawa, F, Towatari, M, Kiyoi, H, Tanimoto, M, Kitamura, T, Saito, H & Naoe, T 2000. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*, 19(5): 624-31.
- Heinzerling, L, De Toni, E N, Schett, G, Hundorfean, G & Zimmer, L 2019. Checkpoint Inhibitors: The Diagnosis and Treatment of Side Effects. *Deutsches Ärzteblatt International*, 116(8): 119-26.
- Ho, M, Nagata, S & Pastan, I 2006. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(25): 9637-42.
- Hodi, F S, Chiarion-Sileni, V, Gonzalez, R, Grob, J-J, Rutkowski, P, Cowey, C L, Lao, C D, Schadendorf, D, Wagstaff, J & Dummer, R 2018. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 19(11): 1480-1492.
- Hofmann, M, Große-Hovest, L, Nübling, T, Pyż, E, Bamberg, M L, Aulwurm, S, Bühring, H J, Schwartz, K, Haen, S P, Schilbach, K, Rammensee, H G, Salih, H R & Jung, G 2012. Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*, 26(6): 1228-37.
- Holliger, P & Hudson, P J 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9): 1126-36.
- Holliger, P, Prospero, T & Winter, G 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14): 6444-8.
- Hoyer, J D, Grogg, K L, Hanson, C A, Gamez, J D & Dogan, A 2008. CD33 detection by immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues: a new antibody shows excellent specificity and sensitivity for cells of myelomonocytic lineage. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(2): 316-23.

- Hurwitz, H, Fehrenbacher, L, Novotny, W, Cartwright, T, Hainsworth, J, Heim, W, Berlin, J, Baron, A, Griffing, S, Holmgren, E, Ferrara, N, Fyfe, G, Rogers, B, Ross, R & Kabbinavar, F 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23): 2335-42.
- Idusogie, E E, Wong, P Y, Presta, L G, Gazzano-Santoro, H, Totpal, K, Ultsch, M & Mulkerrin, M G 2001. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *Journal of Immunology*, 166(4): 2571-5.
- Igawa, T, Tsunoda, H, Tachibana, T, Maeda, A, Mimoto, F, Moriyama, C, Nanami, M, Sekimori, Y, Nabuchi, Y, Aso, Y & Hattori, K 2010. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(5): 385-92.
- 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(6069): 522-5.
- Jung, G, Freimann, U, Von Marschall, Z, Reisfeld, R A & Wilmanns, W 1991. Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments. *European Journal of Immunology*, 21(10): 2431-5.
- Jung, G, Honsik, C J, Reisfeld, R A & Muller-Eberhard, H J 1986. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(12): 4479-83.
- Kane, L P, Lin, J & Weiss, A 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Current opinion in immunology*, 12(3): 242-9.
- Kaplon, H & Reichert, J M 2019. Antibodies to watch in 2019. *Monoclonal antibodies*, 11(2): 219-238.
- Klein, C, Waldhauer, I, Nicolini, V G, Freimoser-Grundschober, A, Nayak, T, Vugts, D J, Dunn, C, Bolijn, M, Benz, J, Stihle, M, Lang, S, Roemmele, M, Hofer, T, Van Puijenbroek, E, Wittig, D, Moser, S, Ast, O, Brünker, P, Gorr, I H, Neumann, S, De Vera Mudry, M C, Hinton, H, Cramer, F, Saro, J, Evers, S, Gerdes, C, Bacac, M, Van Dongen, G, Moessner, E & Umaña, P 2017. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology*, 6(3).
- Klinger, M, Brandl, C, Zugmaier, G, Hijazi, Y, Bargou, R C, Topp, M S, Gokbuget, N, Neumann, S, Goebeler, M, Viardot, A, Stelljes, M, Bruggemann, M, Hoelzer, D, Degenhard, E, Nagorsen, D, Baeuerle, P A, Wolf, A & Kufer, P 2012. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*, 119(26): 6226-33.
- Kohler, G & Milstein, C 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495-7.
- Konig, R 2002. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Current opinion in immunology*, 14(1): 75-83.
- Kontermann, R E 2009. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs*, 23(2): 93-109.
- Kovtun, Y, Jones, G E, Adams, S, Harvey, L, Audette, C A, Wilhelm, A, Bai, C, Rui, L, Laleau, R, Liu, F, Ab, O, Setiady, Y, Yoder, N C, Goldmacher, V S, Chari, R V J, Pinkas, J & Chittenden, T 2018. A CD123-targeting antibody-drug conjugate,

- IMGN632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Advances*, 2(8): 848-858.
- Kraft, S & Kinet, J P 2007. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 7(5): 365-78.
- Krupka, C, Kufer, P, Kischel, R, Zugmaier, G, Bogeholz, J, Kohnke, T, Lichtenegger, F S, Schneider, S, Metzeler, K H, Fiegl, M, Spiekermann, K, Baeuerle, P A, Hiddemann, W, Riethmuller, G & Subklewe, M 2014. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*, 123(3): 356-65.
- Landegren, U, Andersson, J & Wigzell, H 1984. Mechanism of T lymphocyte activation by OKT3 antibodies. A general model for T cell induction. *European Journal of Immunology*, 14(4): 325-8.
- Larson, S M, Brown, J P, Wright, P W, Carrasquillo, J A, Hellström, I & Hellström, K E 1983. Imaging of melanoma with I-131-labeled monoclonal antibodies. *Journal of Nuclear Medicine*, 24(2): 123-129.
- 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 & Dahiya, B I 2006. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11): 4005-10.
- Leduc, E H, Coons, A H & Connolly, J M 1955. Studies on antibody production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. *Journal of Experimental Medicine*, 102(1): 61-72.
- Leong, S R, Sukumaran, S, Hristopoulos, M, Totpal, K, Stainton, S, Lu, E, Wong, A, Tam, L, Newman, R, Vuilleminot, B R, Ellerman, D, Gu, C, Mathieu, M, Dennis, M S, Nguyen, A, Zheng, B, Zhang, C, Lee, G, Chu, Y W, Prell, R A, Lin, K, Laing, S T & Polson, A G 2017. An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood*, 129(5): 609-618.
- Liu, L 2018. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell*, 9(1): 15-32.
- Lyman, S D, James, L, Vanden Bos, T, De Vries, P, Brasel, K, Gliniak, B, Hollingsworth, L T, Picha, K S, Mckenna, H J, Splett, R R & Et Al. 1993. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*, 75(6): 1157-67.
- Mack, M, Riethmuller, G & Kufer, P 1995. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(15): 7021-5.
- Mallender, W D & Voss, E W, Jr. 1994. Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1): 199-206.
- Mallery, D L, Mcewan, W A, Bidgood, S R, Towers, G J, Johnson, C M & James, L C 2010. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46): 19985-90.
- Matsuda, F & Honjo, T 1996. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Advances in Immunology*, 62: 1-29.
- Mccafferty, J, Griffiths, A D, Winter, G & Chiswell, D J 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301): 552-4.

- Milstein, C & Cuello, A C 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*, 305(5934): 537-40.
- Moore, G L, Lee, S-H, Schubbert, S, Miranda, Y, Rashid, R, Pong, E, Phung, S, Chan, E W, Chen, H & Endo, N 2015. Tuning T cell affinity improves efficacy and safety of anti-CD38× anti-CD3 bispecific antibodies in monkeys-a potential therapy for multiple myeloma. *Blood*, 126: 1798.
- 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(21): 6851-5.
- Mössner, E, Brünker, P, Moser, S, Püntener, U, Schmidt, C, Herter, S, Grau, R, Gerdes, C, Nopora, A, Van Puijenbroek, E, Ferrara, C, Sondermann, P, Jäger, C, Strein, P, Fertig, G, Friess, T, Schüll, C, Bauer, S, Dal Porto, J, Del Nagro, C, Dabbagh, K, Dyer, M J S, Poppema, S, Klein, C & Umaña, P 2010. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*, 115(22): 4393-402.
- Nakao, M, Yokota, S, Iwai, T, Kaneko, H, Horiike, S, Kashima, K, Sonoda, Y, Fujimoto, T & Misawa, S 1996. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10(12): 1911-8.
- 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 Research*, 68(10): 3863-72.
- Nennecke, A, Wienecke, A & Kraywinkel, K 2014. [Leukemia incidence and survival in Germany according to current standardized categories]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 57(1): 93-102.
- Nimmerjahn, F & Ravetch, J V 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1): 34-47.
- Ober, R J, Radu, C G, Ghetie, V & Ward, E S 2001. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol*, 13(12): 1551-9.
- Okeley, N M, Miyamoto, J B, Zhang, X, Sanderson, R J, Benjamin, D R, Sievers, E L, Senter, P D & Alley, S C 2010. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clinical Cancer Research*, 16(3): 888-97.
- Osborn, M J, Ma, B, Avis, S, Binnie, A, Dille, J, Yang, X, Lindquist, K, Menoret, S, Iscache, A L, Ouisse, L H, Rajpal, A, Anegón, I, Neuberger, M S, Buelow, R & Bruggemann, M 2013. High-affinity IgG antibodies develop naturally in Ig-knockout rats carrying germline human IgH/Igkappa/Iglambda loci bearing the rat CH region. *Journal of immunology*, 190(4): 1481-90.
- Pappenheimer, A M, Jr., Uchida, T & Harper, A A 1972. An immunological study of the diphtheria toxin molecule. *Immunochemistry*, 9(9): 891-906.
- Perez, P, Hoffman, R W, Shaw, S, Bluestone, J A & Segal, D M 1985. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature*, 316(6026): 354-6.
- Porter, R R 1959. The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochemical Journal*, 73: 119-26.
- Queen, C, Schneider, W P, Selick, H E, Payne, P W, Landolfi, N F, Duncan, J F, Avdalovic, N M, Levitt, M, Junghans, R P & Waldmann, T A 1989. A humanized

- antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24): 10029-33.
- Raphael, I, Nalawade, S, Eagar, T N & Forsthuber, T G 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1): 5-17.
- Rappold, I, Ziegler, B L, Kohler, I, Marchetto, S, Rosnet, O, Birnbaum, D, Simmons, P J, Zannettino, A C, Hill, B, Neu, S, Knapp, W, Alitalo, R, Alitalo, K, Ullrich, A, Kanz, L & Buhning, H J 1997. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*, 90(1): 111-25.
- Reck, M, Rodriguez-Abreu, D, Robinson, A G, Hui, R, Csomos, T, Fulop, A, Gottfried, M, Peled, N, Tafreshi, A, Cuffe, S, O'Brien, M, Rao, S, Hotta, K, Leiby, M A, Lubiniecki, G M, Shentu, Y, Rangwala, R & Brahmer, J R 2016. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(19): 1823-1833.
- Reff, M E, Carner, K, Chambers, K S, Chinn, P C, Leonard, J E, Raab, R, Newman, R A, Hanna, N & Anderson, D R 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 83(2): 435-45.
- Ridgway, J B, Presta, L G & Carter, P 1996. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Engineering*, 9(7): 617-21.
- Robert, C, Schachter, J, Long, G V, Arance, A, Grob, J J, Mortier, L, Daud, A, Carlino, M S, Mcneil, C, Lotem, M, Larkin, J, Lorigan, P, Neyns, B, Blank, C U, Hamid, O, Mateus, C, Shapira-Frommer, R, Kosh, M, Zhou, H, Ibrahim, N, Ebbinghaus, S & Ribas, A 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 372(26): 2521-32.
- Rodrigues, M L, Shalaby, M R, Werther, W, Presta, L & Carter, P 1992. Engineering a humanized bispecific F(ab')₂ fragment for improved binding to T cells. *International Journal of Cancer Supplements*, 7: 45-50.
- Röllig, C, Beelen, D W, Braess, J, Greil, R, Niederwieser, D, Passweg, J, Reinhardt, D & Schlenk, R F. 2018. *Akute Myeloische Leukämie (AML). Leitlinie ICD-10 C92.-, ICD-10 C93.- Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen* [Online]. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@view/html/index.html>: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. [Zugriff 04.06.2019 2019].
- Roopenian, D C & Akilesh, S 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 7(9): 715-25.
- Root, A, Cao, W, Li, B, Lapan, P, Meade, C, Sanford, J, Jin, M, O'sullivan, C, Cummins, E & Lambert, M 2016. Development of PF-06671008, a highly potent anti-P-cadherin/anti-CD3 bispecific DART molecule with extended half-life for the treatment of cancer. *Antibodies*, 5(1): 6.
- Rosnet, O, Schiff, C, Pebusque, M J, Marchetto, S, Tonnelle, C, Toiron, Y, Birg, F & Birnbaum, D 1993. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*, 82(4): 1110-9.
- Russell, J H & Ley, T J 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, 20(1): 323-370.

- Sadelain, M, Brentjens, R & Riviere, I 2013. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 3(4): 388-98.
- Sanger, F, Nicklen, S & Coulson, A R 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463-7.
- Saresella, M, Rainone, V, Al-Daghri, N M, Clerici, M & Trabattoni, D 2012. The PD-1/PD-L1 pathway in human pathology. *Curr Mol Med*, 12(3): 259-67.
- Sarma, J V & Ward, P A 2011. The complement system. *Cell and tissue research*, 343(1): 227-235.
- Schadendorf, D, Hodi, F S, Robert, C, Weber, J S, Margolin, K, Hamid, O, Patt, D, Chen, T T, Berman, D M & Wolchok, J D 2015. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17): 1889-94.
- Schaefer, W, Regula, J T, Bahner, M, Schanzer, J, Croasdale, R, Durr, H, Gassner, C, Georges, G, Kettenberger, H, Imhof-Jung, S, Schwaiger, M, Stubenrauch, K G, Sustmann, C, Thomas, M, Scheuer, W & Klein, C 2011. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(27): 11187-92.
- Schäffner, G & Kabelitz, D 2001. Monoklonale Antikörper zur Therapie. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 126(30): 851-856.
- Schroff, R W, Foon, K A, Beatty, S M, Oldham, R K & Morgan, A C, Jr. 1985. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Research*, 45(2): 879-85.
- Seder, R A & Ahmed, R 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature Immunology*, 4(9): 835-42.
- Seimetz, D 2011. Novel Monoclonal Antibodies for Cancer Treatment: The Trifunctional Antibody Catumaxomab (Removab®). *Journal of Cancer*, 2: 309-16.
- Senkus, E, Kyriakides, S, Ohno, S, Penault-Llorca, F, Poortmans, P, Rutgers, E, Zackrisson, S & Cardoso, F 2015. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26 (Suppl. 5): v8-v30.
- Shalaby, M R, Shepard, H M, Presta, L, Rodrigues, M L, Beverley, P C, Feldmann, M & Carter, P 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *Journal of Experimental Medicine*, 175(1): 217-25.
- Shawler, D L, Bartholomew, R M, Smith, L M & Dillman, R O 1985. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *Journal of Immunology*, 135(2): 1530-5.
- Shields, R L, Lai, J, Keck, R, O'connell, L Y, Hong, K, Meng, Y G, Weikert, S H & Presta, L G 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30): 26733-40.
- Short, N J, Kantarjian, H, Ravandi, F & Daver, N 2019. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 10: 2040620719827310.
- Smith, G P 1988. Filamentous phage assembly: morphogenetically defective mutants that do not kill the host. *Virology*, 167(1): 156-65.

- Spiekermann, K, Hiddemann, W & Schnittger, S 2005. Mutationen im Gen für die Rezeptortyrosinkinase FLT3 bei akuter myeloischer Leukämie. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 130(16): 1020-1025.
- Spiekermann, K & Shen, A-S 2019. Akute myeloische Leukämie bei Erwachsenen—Ein Update zu Diagnostik, Risikoklassifikation und Therapie. *TumorDiagnostik & Therapie*, 40(01): 37-42.
- Staerz, U D, Kanagawa, O & Bevan, M J 1985. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature*, 314(6012): 628-31.
- Stavnezer, J 1996. Immunoglobulin class switching. *Current opinion in immunology*, 8(2): 199-205.
- Stockmeyer, B, Dechant, M, Van Egmond, M, Tutt, A L, Sundarapandiyam, K, Graziano, R F, Repp, R, Kalden, J R, Gramatzki, M, Glennie, M J, Van De Winkel, J G & Valerius, T 2000. Triggering Fc alpha-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy. *Journal of Immunology*, 165(10): 5954-61.
- Stone, R M, Mandrekar, S J, Sanford, B L, Laumann, K, Geyer, S, Bloomfield, C D, Thiede, C, Prior, T W, Döhner, K & Marcucci, G 2017. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(5): 454-464.
- Storz, U 2014. Rituximab: How approval history is reflected by a corresponding patent filing strategy. *Monoclonal antibodies*, 6(4): 820-37.
- Tabrizi, M A, Tseng, C M & Roskos, L K 2006. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discovery Today*, 11(1-2): 81-8.
- Thiede, C, Steudel, C, Mohr, B, Schaich, M, Schakel, U, Platzbecker, U, Wermke, M, Bornhauser, M, Ritter, M, Neubauer, A, Ehninger, G & Illmer, T 2002. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99(12): 4326-35.
- Tiselius, A 1937. Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochemical Journal*, 31(9): 1464-77.
- Tonegawa, S 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909): 575-81.
- Topp, M S, Gokbuget, N, Stein, A S, Zugmaier, G, O'Brien, S, Bargou, R C, Dombret, H, Fielding, A K, Heffner, L, Larson, R A, Neumann, S, Foa, R, Litzow, M, Ribera, J M, Rambaldi, A, Schiller, G, Bruggemann, M, Horst, H A, Holland, C, Jia, C, Maniar, T, Huber, B, Nagorsen, D, Forman, S J & Kantarjian, H M 2015. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncology*, 16(1): 57-66.
- Turner, A M, Lin, N L, Issarachai, S, Lyman, S D & Broudy, V C 1996. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*, 88(9): 3383-90.
- Underhill, D M, Bassetti, M, Rudensky, A & Aderem, A 1999. Dynamic Interactions of Macrophages with T Cells during Antigen Presentation. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12): 1909-14.
- Uy, G L, Godwin, J, Rettig, M P, Vey, N, Foster, M, Arellano, M L, Rizzieri, D A, Topp, M S, Huls, G & Lowenberg, B 2017. Preliminary results of a phase 1 study of flotetuzumab, a CD123 x CD3 bispecific Dart® protein, in patients with

- relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 130(Suppl. 1): 1365.
- Valent, P 1994. The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94(6 Pt 2): 1177-83.
- Valone, F H, Kaufman, P A, Guyre, P M, Lewis, L D, Memoli, V, Ernstoff, M S, Wells, W, Barth, R, Deo, Y, Fisher, J & Et Al. 1995. Clinical trials of bispecific antibody MDX-210 in women with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses HER-2/neu. *J Hematother*, 4(5): 471-5.
- Van Wauwe, J P, De Mey, J R & Goossens, J G 1980. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *Journal of immunology*, 124(6): 2708-13.
- Varchetta, S, Gibelli, N, Oliviero, B, Nardini, E, Gennari, R, Gatti, G, Silva, L S, Villani, L, Tagliabue, E, Menard, S, Costa, A & Fagnoni, F F 2007. Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Research*, 67(24): 11991-9.
- Wardemann, H & Busse, C E 2017. Novel Approaches to Analyze Immunoglobulin Repertoires. *Trends in Immunology*, 38(7): 471-482.
- Weiner, G J, Kostelny, S A, Hillstrom, J R, Cole, M S, Link, B K, Wang, S L & Tso, J Y 1994. The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy. *Journal of Immunology*, 152(5): 2385-92.
- Weiner, L M, Clark, J I, Davey, M, Li, W S, De Palazzo, I G, Ring, D B & Alpaugh, R K 1995. Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and FcγRIII. *Cancer Research*, 55(20): 4586-4593.
- Whitman, S P, Archer, K J, Feng, L, Baldus, C, Becknell, B, Carlson, B D, Carroll, A J, Mrozek, K, Vardiman, J W, George, S L, Koltz, J E, Larson, R A, Bloomfield, C D & Caligiuri, M A 2001. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Research*, 61(19): 7233-9.
- Wu, T T & Kabat, E A 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Experimental Medicine*, 132(2): 211-50.
- Yamamoto, Y, Kiyoi, H, Nakano, Y, Suzuki, R, Kodera, Y, Miyawaki, S, Asou, N, Kuriyama, K, Yagasaki, F, Shimazaki, C, Akiyama, H, Saito, K, Nishimura, M, Motoji, T, Shinagawa, K, Takeshita, A, Saito, H, Ueda, R, Ohno, R & Naoe, T 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97(8): 2434-9.
- Younes, A, Gopal, A K, Smith, S E, Ansell, S M, Rosenblatt, J D, Savage, K J, Ramchandren, R, Bartlett, N L, Cheson, B D, De Vos, S, Forero-Torres, A, Moskowitz, C H, Connors, J M, Engert, A, Larsen, E K, Kennedy, D A, Sievers, E L & Chen, R 2012. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 30(18): 2183-9.
- Zalevsky, J, Chamberlain, A K, Horton, H M, Karki, S, Leung, I W, Sproule, T J, Lazar, G A, Roopenian, D C & Desjarlais, J R 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nature Biotechnology*, 28(2): 157-9.

- Zeidler, R, Reisbach, G, Wollenberg, B, Lang, S, Chaubal, S, Schmitt, B & Lindhofer, H 1999. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *Journal of Immunology*, 163(3): 1246-52.
- Zekri, L, Vogt, F, Osburg, L, Müller, S, Kauer, J, Manz, T, Pflügler, M, Maurer, A, Heitmann, J S, Hagelstein, I, Märklin, M, Hörner, S, Todenhöfer, T, Calaminus, C, Stenzl, A, Pichler, B, La Fougère, C, Schneider, M A, Rammensee, H G, Zender, L, Sipos, B, Salih, H R & Jung, G 2021. An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol Med*, 13(2): e11902.
- Zhu, Z & Carter, P 1995. Identification of heavy chain residues in a humanized anti-CD3 antibody important for efficient antigen binding and T cell activation. *Journal of Immunology*, 155(4): 1903-10.
- Zuch De Zafra, C L, Fajardo, F, Zhong, W, Bernett, M J, Muchhal, U S, Moore, G L, Stevens, J, Case, R, Pearson, J T, Liu, S, Mcelroy, P, Canon, J, Desjarlais, J, Coxon, A, Balazs, M & Nolan-Stevaux, O 2019. Targeting Multiple Myeloma with AMG 424, a Novel Anti-CD38/CD3 Bispecific T Cell-Recruiting Antibody Optimized for Cytotoxicity and Cytokine Release. *Clinical Cancer Research*, 25(13): 3921-3933.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie unter Betreuung von Prof. Dr. Gundram Jung durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Gundram Jung

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch das Labormitglied Dr. Fabian Vogt und Lukas Osburg von mir eigenständig durchgeführt.

Die in Kapitel 3.2, 3.3, und 3.4 analysierten Antikörpervarianten wurden durch Dr. Martin Pflügler kloniert, transfiziert und aufgereinigt

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 02.10.2019

Isabelle Sindel

8 Eigene Publikationen

Jung G, Salih H, Pflügler M, Vogt F, Zekri-Metref L, **Ehnes, I.**

„Improved bispecific FLT3xCD3 antigen binding proteins“

Patent Publication Number: EP 18193889

Einreichungsdatum: 11.09.2018

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Hans Georg Rammensee für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Immunologie sowie die konstruktiven Anregungen und Diskussionen.

Besonderer Dank gebührt außerdem Herrn Prof. Dr. Gundram Jung für die hervorragende Betreuung der Arbeit und die Bereitstellung des Themas. Außerdem möchte ich mich besonders für die Gespräche und Diskussionen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben sowie das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde.

Prof. Dr. Helmut Salih und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung der AML-Proben.

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Fabian Vogt für seine Geduld, Umsicht und Motivation bedanken, die es bei der Einarbeitung einer medizinischen Doktorandin braucht.

Ebenso danke ich Dr. Martin Pflügler, der als Projektmanager bei allen Fragen und Problemen immer ein offenes Ohr hatte, und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem gilt der gesamten AG Jung mit Latifa, Caro, Alex, Sebastian, Joseph, Lukas und Timo ein großes Dankeschön für die hohe Hilfsbereitschaft und die tolle Zeit im und außerhalb des Labors.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Immunologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Abseits vom Labor danke ich Nina, für die geisteswissenschaftlichen Denkanstöße, und natürlich meiner Familie, die mich während allen Höhen und Tiefen begleitet hat.

Zuletzt danke ich Basti für sein Verständnis sowie seine Geduld und Unterstützung, die er mir immer bedingungslos entgegenbringt.