

Aus dem
Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

**Entwicklung von bispezifischen Antikörpern zur tumorzell-
restringierten T- Zell Kostimulation**

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

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

vorgelegt von

Engel, Monika

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Weisel

Tag der Disputation: 20.03.2023

Widmung

Für meine Eltern.

Danke für euer Vertrauen in mich.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	KREBS	1
1.2	KONVENTIONELLE KREBSTHERAPIE	3
1.3	DAS HUMANE IMMUNSYSTEM	4
1.4	TUMORIMMUNOLOGIE	8
1.5	TUMORIMMUNOTHERAPIE	10
1.6	ANTIKÖRPERTHERAPIE	12
1.6.1	AUFBAU EINES ANTIKÖRPERS	12
1.6.2	EFFEKTORMECHANISMEN VON IGG ANTIKÖRPERN	15
1.6.3	THERAPEUTISCHE ANTIKÖRPER	16
1.6.4	BISPEZIFISCHE ANTIKÖRPER	17
1.6.5	ANTI-KÖRPER-VERMITTELTE T-ZELLREKRUTIERUNG	18
1.6.6	DER KOMBINATORISCHE THERAPIEANSATZ VON BISPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN	19
1.7	DUAL TARGETING	20
1.8	FORSCHUNGSZIEL DER DISSERTATION	23
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	24
2.1	MATERIALIEN	24
2.1.1	GERÄTE	24
2.1.2	GLAS- UND PLASTIKWAREN	25
2.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIE	27
2.1.4	ZELLKULTURMEDIUM	29
2.1.5	PUFFER	29
2.1.6	KOMMERZIELLE ASSAY-KITS	30
2.1.7	CHROMATOGRAPHIE-SÄULEN	30
2.1.8	HUMANE ZELLINIEN	30
2.1.9	ANTI-KÖRPER	31
2.1.10	SOFTWARE	33
2.2	METHODEN	34

2.2.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	34
2.2.2	ANTIKÖRPERAUFRÄUIGUNG UND ANALYTISCHE METHODEN	38
2.2.3	FUNKTIONELLE IMMUNBIOLOGISCHE ASSAYS	41
2.2.4	STATISTIK	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	BESCHREIBUNG DER ANTIKÖRPERKONSTRUKTE	46
3.1.1	BISPEZIFISCHE ANTIKÖRPER MIT CD3-SPEZIFITÄT	46
3.1.2	BISPEZIFISCHE CD28-ANTIÖRPER	47
3.2	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPERKONSTRUKTE	49
3.3	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPERKONSTRUKTE	51
3.3.1	QUANTIFIZIERUNG DER ANTIGENE AUF DEN ZIELZELLINIEN	51
3.3.2	FACS-BINDUNGSASSAY	53
3.3.3	THYMIDIN-INCORPORATIONS-ASSAY – T-ZELLPROLIFERATION	59
3.3.4	FACS KILL ASSAY	73
3.3.5	LANGZEITAKTIVIERUNGSASSAY	78
4	DISKUSSION	89
4.1	B7H3-BINDUNG	90
4.2	T-ZELLPROLIFERATION	91
4.2.1	EIN EPITOP AUF EINEM ZIELANTIGEN VS. ZWEI ZIELEPITOPE	91
4.2.2	ZWEI EPITOPE AUF ZIELANTIGEN VS. ZWEI ZIELANTIGENE	93
4.2.3	ZWEI VERSCHIEDENE ZIELANTIGENE AUF JEWEILS ZWEI VERSCHIEDENEN ZIELZELLEN	94
4.3	FACS KILL ASSAYS	94
4.3.1	ZIELZELLPROLIFERATION BEI KOMBINATION MIT DEMSELBEN ZIELEPITOP	95
4.3.2	EFFIZIENTER TUMORKILL IN DEN SZENARIEN 2 UND 3	96
4.4	NACHHALTIGE T-ZELLAKTIVIERUNG UND GEDÄCHTNISBILDUNG DURCH DIE SZENARIEN 2 UND 3	97
4.5	ZWEI VERSCHIEDENE ZIELANTIGENE AUF EINER ZIELZELLE ALS LEITKOMBINATION	98
4.6	AUSBLICK	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	102

6	LITERATURVERZEICHNIS	103
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	120
8	ANHANG	121
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	121
9	DANKSAGUNG	125

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
ADCP	antikörperabhängige zelluläre Phagozytose
AHC	Antikörper-Heterokonjugat
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BiCo	„Bispecific Costimulators“, bispezifischer CD28-Antikörper
BiRec	„Bispecific (T-cell) Receptor Stimulators“, bispezifischer CD3-Antikörper
BiTe	Bispecific T cell engager
BSA	Bovines Serumalbumin
bsAb	Bispezifischer Antikörper
BTLA	B- und T-Lymphozyten-Attenuator
CAR	chimären Antigenrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CDC	Komplementabhängige Zytotoxizität
CDR1-3	Complementarity determining region
C _H	Konstanten Domäne der schweren Kette
CHO	Chinese ovarian hamster
C _L	Konstanten Domäne der leichten Kette
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRS	Zytokin-Freisetzungssyndrom
CTLA4	Zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4
d	Tage
DC	Dendritische Zelle

Abkürzungsverzeichnis

d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
Fab	Fragments of antigen-binding
FACS	Fluoreszenzaktivierten Zellsortierung
Fc	Crystallizable fragment
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FMO	Fluorescence Minus One Controls
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HLA	Humane Leukozytenantigene
HAMA	menschlichen Anti-Maus-Antikörpern
HC	Heavy chain
hu	human
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immuno-tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Linker
LC	Light chain
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	Magnetic activated cell sorting
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mu	murin
n/a	Not available

Abkürzungsverzeichnis

ng	Nanogramm
n.k.	Nicht kalkulierbar
NK Zellen	Natural Killer Zellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NR	Non-reducing
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD-1	Rezeptor für den programmierten Zelltod 1
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PRR	Pattern recognition receptor
R	Reduced
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
ScFv	Single chain fragment variable
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunden
SEC	Größenausschlusschromatographie
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Tumorstromungsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Tumorspezifisches Antigen
tSNE	T-distributed Stochastic Neighbor Embedding
V	Volt
V _H	Variable Domäne schwere Kette
V _L	Variable Domäne leichte Kette
w/o	Without / ohne

Genderhinweis

In der vorliegenden Dissertation wird zwecks leichter Lesbarkeit und Übersichtlichkeit das generische Maskulinum bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Hierdurch ist keine Benachteiligung jeglicher anderer Geschlechter impliziert, vielmehr soll dies lediglich im Sinne der sprachlichen Vereinfachung als geschlechtsneutral verstanden werden.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Der Oberbegriff Krebs beschreibt eine breite Gruppe von neoplastischen Erkrankungen, die durch ein unkontrolliertes Wachstum und Vermehrung abnormaler Zellen definiert ist. Neben diesen Zellwucherungen können deren Tochterabsiedlungen sich im Körper verteilen und gesundes Gewebe sowohl infiltrieren, verdrängen, als auch zerstören. In allen Ländern der Welt ist Krebs eine der häufigsten Todesursachen und ein wichtiger limitierender Faktor der Lebenserwartung (Bray *et al.*, 2021) mit schätzungsweise 10 Millionen Todesfällen und etwa 19,3 Millionen neu diagnostizierten Krebserkrankungen im Jahre 2020 (Sung *et al.*, 2021). Auf internationaler Ebene nehmen die Krebssterblichkeit und -inzidenz rasch zu. So schätzt das Global Cancer Observatory, dass im Jahr 2040 die Sterblichkeitsrate auf 16,4 Millionen und die Inzidenz von Krebserkrankungen auf 28,4 Millionen steigen werde (Ferlay J *et al.*, 2020). Die Gründe für diesen drastischen Anstieg sind komplex, spiegeln aber sowohl die Alterung und das Wachstum der Weltbevölkerung als auch die damit verbundenen Veränderungen in der Prävalenz und Verteilung der wichtigsten Risikofaktoren für Krebs wieder, von denen mehrere mit der sozioökonomischen Entwicklung zusammenhängen (Omran, 1971; Gersten and Wilmoth, 2002). Steigende Lebenserwartung und Wohlstand führen zu einer wachsenden und alternden Weltbevölkerung und damit wiederum zu erheblichen Veränderungen der weltweiten Krebsbelastung (Bray *et al.*, 2012). Rückgängig wiederum, sind infektionsbedingte Krebserkrankungen, wie zum Beispiel Magen- und Gebärmutterhalskrebs, während die Prävalenz von Krebserkrankungen, die mit einem industrialisierten Lebensstil zusammenhängen, wie Brust-, Darm- und Prostatakrebs, vermehrt auftreten (Bray *et al.*, 2012; Maule and Merletti, 2012).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Krebsentstehung sind sehr komplex und leider nur teilweise verstanden. Nach derzeitigen Schätzungen sind nur maximal 10 % aller Krebsfälle explizit durch hochpenetrante Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, wie auch im DNS-Reparatursystem

verursacht (wie z. B. in BRCA1) (Vineis and Wild, 2014). Nach Brenner und Mons werden jedoch etwa 37 % der Krebserkrankungen in Deutschland durch Lebensstilentscheidungen wie Tabakkonsum, Alkoholmissbrauch, hoher Body-Mass-Index, Bewegungsmangel und ungesunde Ernährung (Behrens *et al.*, 2018; Gredner *et al.*, 2018; Mons *et al.*, 2018) verursacht. Meistens greifen diese exogenen und endogenen Faktoren ineinander, da die genetischen Veränderungen, die den Prozess der malignen Transformation bedingen, selten nur durch eine Ursache ausgelöst werden.

Hanahan und Weinberg postulierten 2000, dass es sechs zelluläre Veränderungen auf genomischer, immunologischer und Umgebungsebene gibt, die eine physiologisch funktionierende Zelle erfüllen muss, um zu entarten (Hanahan and Weinberg, 2000). Diese „hallmarks of cancer“, sogenannte Kennzeichen des Krebses, wurden Stand 2022 um acht weitere Kennzeichen ergänzt (Hanahan and Weinberg, 2011; Hanahan, 2022):

- 1) „Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung“
- 2) „Umgehung von Wachstumssuppressoren“
- 3) „Widerstand gegen den Zelltod“
- 4) „Replikative Unsterblichkeit“
- 5) „Induzierung von Angiogenese“
- 6) „Aktivierung von Invasion und Metastasierung“
- 7) „Reprogrammierung des Energiestoffwechsels“
- 8) „Genomische Instabilität und Mutation“
- 9) „Tumorfördernde Entzündung“
- 10) „Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem“
- 11) „Senescente Zellen“
- 12) „Epigenetische Reprogrammierung ohne Mutation“
- 13) „Polymorphes Mikrobiom“

14) „Entfesselte phänotypische Plastizität“

Wenn man nun beachtet, dass alle vierzehn „hallmarks“ gegeben sein müssen, damit sich eine Zelle zu einer Tumorzelle entwickelt, gibt es reichlich Angriffspunkte, um die Entstehung malignen Neuerkrankungen zu reduzieren, zu therapieren und wenn nicht sogar zu verhindern.

1.2 Konventionelle Krebstherapie

Die konventionelle Krebstherapie basiert in der Regel auf drei Säulen: Die chirurgische Resektion, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Bereits 1846, nach der Erfindung der Anästhesie, begannen die Pioniere der Chirurgie wie Billroth, Halsted und Handley mit den ersten modernen chirurgischen Eingriffen zur vollständigen Entfernung von Tumoren mit ihren angrenzenden Lymphknoten. Die chirurgische Therapie ist jedoch durch die Metastasierung der Tumore limitiert und allein stehend ungenügend (Sudhakar, 2009). Ein weiterer Hoffnungsstrahl im Streben nach der Heilung von Krebs war die Entdeckung der Röntgenstrahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahr 1896 (Röntgen, 1896); bereits drei Jahre später begann man die Strahlung zur Diagnose und Behandlung von Krebspatienten einzusetzen. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts vervollständigte die Chemotherapie die drei Säulen der Krebstherapie (Schweitzer, 1910). Der Nachteil der Radio- als auch der Chemotherapie ist ihre mangelnde Selektivität, da sie sowohl auf sich schnell teilendes Gewebe wie Tumoren abzielen, als auch damit auf gesundes Gewebe mit einer physiologisch hohen Proliferationsrate, wie Darm und andere Schleimhäute wirken. Die damit verbundene Toxizität führt zu schweren Nebenwirkungen während der Behandlung (Miller *et al.*, 2019).

Trotz schwerwiegender unerwünschter Wirkungen und Beschränkungen der klassischen Krebstherapie, gelingt es Ländern mit einem stabilen Gesundheitssystem die Überlebensraten vor allem durch eine zugängliche Früherkennung und Nachsorge von Krebserkrankten zu verbessern (World Health Organization, 2017). Dennoch fehlt der Krebstherapie kurative Behandlungsmöglichkeiten in fortgeschrittenen Stadien. In Anbetracht der

epidemiologischen Erkenntnisse und der Tatsache, dass die Krebsbehandlung auch heute noch eine große Herausforderung darstellt, sind neue therapeutische Ansätze dringend erforderlich. Einer der Ansätze, an dem seit langem gearbeitet wird, um ihn als vierte Säule der Krebstherapie zu etablieren ist die Immuntherapie.

1.3 Das humane Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk verschiedener Mechanismen zum Schutz des Körpers vor Pathogenen wie körperfremden Makromolekülen, Mikroorganismen und entarteten Zellen. Das System umfasst die angeborene und die adaptive Immunität. Die angeborene Immunität ist die erste Verteidigungslinie nach primärem Kontakt mit Krankheitserregern. Sie agiert relativ unspezifisch gegen ein breites Erregerspektrum (Medzhitov and Janeway Jr., 1997). Das adaptive Immunsystem hingegen, ist eine erworbene Langzeitreaktion, die durch antigenspezifische Rezeptoren auf Lymphozyten vermittelt wird (Pancer and Cooper, 2006). Allerdings sind diese beiden Teile des Immunsystems eng miteinander in Aktivierung und Funktion verbunden. Die adaptive Immunität wird also teilweise durch das angeborene Immunsystem reguliert, wie es auch umgekehrt der Fall ist (Medzhitov and Janeway, 1997; Iwasaki and Medzhitov, 2015).

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören natürliche Killerzellen (NK Zellen), dendritische Zellen (DCs), Monozyten und Makrophagen, sowie Granulozyten. Um Gefahren zu erkennen, exprimieren alle dieser Zellen Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte pattern recognition receptors (PRRs)(Lien *et al.*, 1999). Erkennen die Rezeptoren ihre jeweiligen pathogen-assoziierten molekularen Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), setzen die Zellen proinflammatorische Zytokine frei und vermitteln die Erregerbeseitigung durch Phagozytose und das Komplementsystem.

Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie DCs, sind ein wesentlicher Akteur des angeborenen Systems, da sie die angeborene und die adaptive Immunität miteinander verbinden. DCs präsentieren Peptide auf

Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen der Klasse II (major histocompatibility complex, MHC) auf ihrer Zelloberfläche, nachdem sie Krankheitserreger durch Phagozytose aufgenommen haben. Diese Komplexe werden von antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren erkannt, was zur Aktivierung der T-Zellen und zur Auslösung einer adaptiven Immunantwort führt (Guermouprez *et al.*, 2002).

T- und B-Zellen sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Zur Erkennung spezifischer Antigene, exprimieren diese Zellen antigenspezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, so genannte B-Zell-Rezeptoren (B cell receptor, BCR) und T-Zell-Rezeptoren (T cell receptor, TCR) (Arden *et al.*, 1995). Um eine große Vielfalt an Rezeptoren zu generieren, findet die somatische Rekombination statt, die auch als V(D)J Rekombination bezeichnet wird (V = variable; D = diversifying; J = joining), d.h. während der Reifung der Zellen findet die zufällige Rekombination zwischen diesen Gensegmenten statt, was die Kodierung einer großen Anzahl verschiedener Antikörper und T-Zell-Rezeptoren durch eine begrenzte Anzahl von Genen ermöglicht (Alt *et al.*, 1992; Gellert, 2002).

B-Zellen führen die humorale Immunantwort aus, die durch die Produktion von Antikörpern gekennzeichnet ist. Um antigenspezifische Antikörper zu produzieren und freizusetzen, ist jedoch die Aktivierung der B-Zellen entscheidend, die wiederum durch aktivierte T-Helferzellen und deren freigesetzte kostimulierende Zytokine unterstützt wird. Dadurch differenziert sich die B-Zelle zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle und Gedächtnis-B-Zelle (Noelle *et al.*, 1992). Der BCR setzt sich aus dem Antigen bindenden Transmembran-Immunglobulinmolekül und dem nicht kovalent assoziierten Ig α -Ig β -Heterodimer als Signaltransduktionsmodul zusammen. Sowohl Ig α als auch Ig β enthalten ein immuno-tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM) für Tyrosin-basierte Immunrezeptoren. ITAMs gewährleistet die Phosphorylierung von Tyrosin nach der Antigenbindung an den BCR, was zu einer nachgeschalteten Signaltransduktion führt (Hobeika, Nielsen and Medgyesi, 2015).

T-Zellen werden in zwei Gruppen eingeteilt, je nach Expression der T-Zell-Korezeptoren CD4 oder CD8, auf ihrer Zelloberfläche. CD4⁺ T-Zellen, T-Helferzellen, binden an MHC-Klasse-II-Moleküle, die insbesondere auf APCs exprimiert werden. T-Helferzellen sind unter anderem an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt. Durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen unterstützen sie zudem die adaptive Immunantwort. CD8⁺ T-Zellen, zytotoxische T-Zellen, binden an MHC-Klasse-I-Moleküle und eliminieren Zielzellen, die das betreffende Antigen präsentieren, durch Lyse oder durch die Induktion des extrinsischen Apoptose-Signalwegs (Kojima *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 1998).

Um T-Zellen vollständig zu aktivieren, sind drei Signale erforderlich (siehe Abbildung 1) (Chen and Flies, 2013): Das primäre Signal, das für die antigenspezifische T-Zell-Reaktion verantwortlich ist, ist die Interaktion eines MHC/Peptid-Komplexes mit dem TCR/CD3-Komplex (Irving and Weiss, 1991). Die meisten TCRs bestehen aus einer α - und einer β -Kette*. Für die Signaltransduktion ist CD3 zwingend erforderlich, welches aus einem $\gamma\epsilon$ - und einem $\delta\epsilon$ -Heterodimer besteht, die ITAMs im zytoplasmatischen Bereich enthalten, die wiederum nach Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes durch den MHC-Peptidkomplex phosphoryliert werden (Blumberg *et al.*, 1990; Weiss and Littman, 1994). Da dieses primäre Signal nicht ausreicht, um T-Zellen vollständig und nachhaltig zu aktivieren, sind kostimulierende und koinhibitorische Signale (Signal 2) erforderlich (June *et al.*, 1990). Kostimulatorische Rezeptoren sind zum Beispiel CD28 und Rezeptoren aus der Tumor-Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie wie OX40 und 4-1BB (Sharpe, 2009).

Obwohl CD28 der am besten charakterisierte kostimulatorische Rezeptor auf T-Zellen ist, sind seine aktivierende Wirkungen nur unvollständig verstanden. CD28 befindet sich auf der Oberfläche von naiven T-Zellen und bindet die kostimulatorischen Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die hauptsächlich

*Eine Minderheit der T-Zellen trägt einen anderen, strukturell ähnlichen Typ von TCR, der aus verschiedenen Polypeptidketten besteht, die γ und δ genannt werden. $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen teilweise MHC-unabhängig, andere Antigene als $\alpha\beta$ T-Zellen, wie intakte Peptide, als auch nicht-peptidische Moleküle. Die Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der Immunantwort werden noch erforscht, unter anderem wegen ihrer unterschiedlichen Liganden (Chien, Meyer and Bonneville, 2014). In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff TCR auf den klassischen $\alpha\beta$ TCR.

auf APCs exprimiert werden (Linsley, Clark and Ledbetter, 1990; Azuma *et al.*, 1993; Inaba *et al.*, 1994). Die von CD28 vermittelten Signale unterstützen die Proliferation von T-Zellen, die IL-2-Produktion (Interleukin-2, ein T-Zell-Wachstumsfaktor) und die Förderung des Zellüberlebens durch die Induktion einer verlängerten PI3K-abhängigen Akt-Aktivierung (June *et al.*, 1987; Linsley *et al.*, 1991; Frauwirth *et al.*, 2002).

Um überschießende T-Zell-Reaktionen zu verhindern und die Gewebemöostase aufrechtzuerhalten, werden koinhibitorische Rezeptoren, wie der Rezeptor für den programmierten Zelltod 1 (PD-1), das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA4) und B- und T-Lymphozyten-Attenuator (BTLA), ebenfalls auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert. Die Expression dieser Co-Signaling-Rezeptoren wird raum-zeitlich reguliert, um eine funktionelle Immunantwort zu gewährleisten (Chen and Flies, 2013). Schließlich benötigen T-Zellen noch ein drittes Signal, um eine adäquate Immunantwort zu geben: proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und Typ-I-Interferone (IFN α/β). Solche Signale verhindern den induzierten Zelltod und die Toleranzinduktion, indem es die Expression von etwa 350 Genen alteriert (Curtsinger *et al.*, 1999, 2005; Curtsinger and Mescher, 2010).

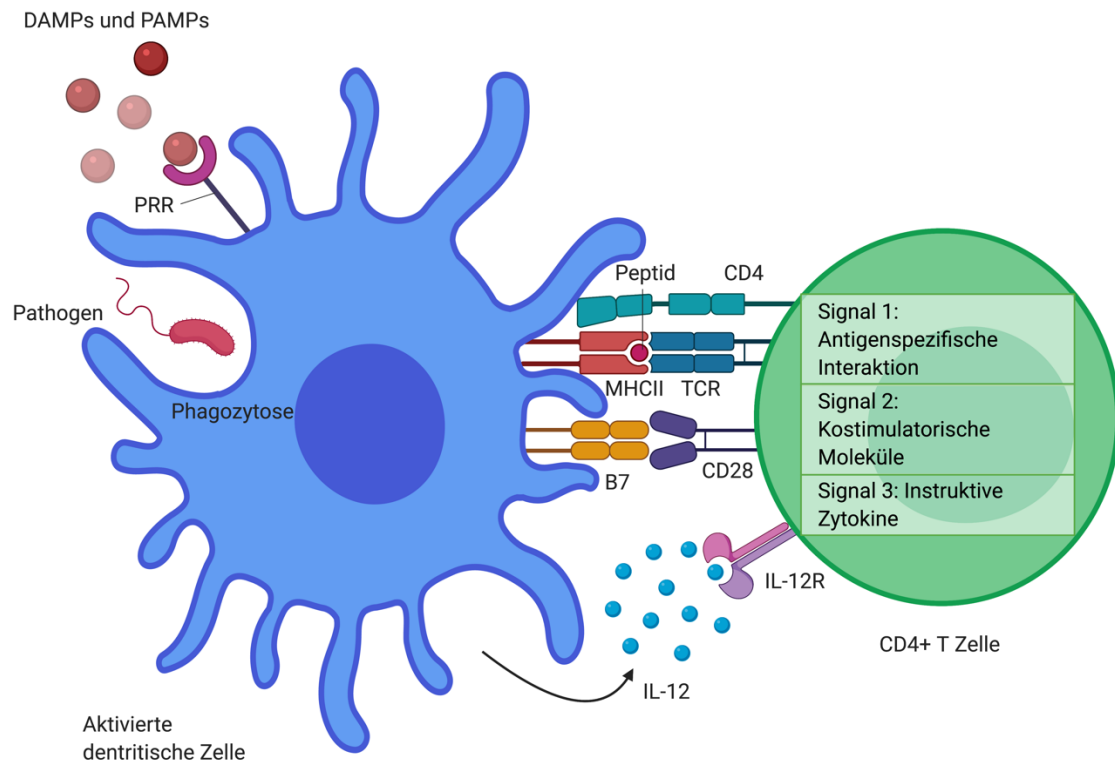


Abbildung 1: T-Zellaktivierung am Beispiel einer CD4⁺ T-Zelle. Für eine vollständige T-Zellaktivierung sind drei Signale erforderlich, die alle von APCs initiiert werden können. Das erste Signal ist eine antigenspezifische Interaktion, bei der ein Antigen auf der APC auf einem MHC I- oder II-Molekül dem TCR präsentiert wird, abhängig vom T-Zelltyp (CD4⁺/CD8⁺). Die Korezeptoren CD4 und CD8 bilden jeweils eine Brücke zwischen dem TCR und MHC der Klasse II bzw. der Klasse I. Das zweite Signal wird von kostimulierenden Rezeptoren auf T-Zellen erzeugt, die eine aktivierende oder hemmende Wirkung haben (hier sind CD28 und B7 beispielhaft für einen aktivierenden Korezeptor). Das dritte Signal wird von proinflammatorischen Zytokinen geliefert, die zuvor von der APC sezerniert wurden. Die APC selbst wird durch PAMPs und DAMPs, die an PRRs binden, aktiviert. Modifizierte Abbildung nach Kambayashi und Laufer, 2014, Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.4 Tumorimmunologie

Paul Ehrlich postulierte vor mehr als 100 Jahren, dass im Organismus ständig bösartige Zellen entstehen, die jedoch von einem Schutzmechanismus des Organismus in „vita latens“ gehalten werden (Ehrlich, 1908). Kurze Zeit später wurden von William B. Coley Experimente durchgeführt, bei denen mehrere Patienten Injektionen mit inaktivierten Bakterien in ihren Tumor erhielten, was zu einer Regression des Tumors führte. Dies deutete darauf hin, dass Immunreaktionen an der Krebsbekämpfung beteiligt sind (Coley, 1910).

Jahrzehnte später zeigten Tumortransplantationsexperimente in Ratten, dass eine erfolgreiche Immunisierung der Tiere mit syngenem Tumoren zur Abstoßung

der wiederum transplantierten Tumore führte. Dadurch wurde bestätigt, dass das Immunsystem in der Lage ist, bösartige von gutartigen Zellen zu unterscheiden (R W Baldwin, 1955; R. W. Baldwin, 1955) und damit wurde auch die Existenz von tumorassoziierten Antigenen (TAA) bewiesen.

Im Jahre 1970 stellte schließlich Frank Burnet das Konzept der Immunüberwachung auf, das besagt, dass Lymphozyten einen Kontrollmechanismus darstellen, der auf der Grundlage von TAAs bösartige Zellen erkennt und eliminiert (Burnet, 1970). Das Konzept der Lymphozyten mit antitumorale Aktivität wurde durch die Entdeckung und Charakterisierung von NK-Zellen bestärkt. NK-Zellen sind in der Lage in Mäusen (Kiessling *et al.*, 1975; Kiessling, Klein and Wigzell, 1975) und Menschen (Pross and Jondal, 1975) eine spontane Tumorlyse ohne vorherige Stimulation auszulösen.

Das Konzept der Immunüberwachung führte zur Hypothese des Immunoeditings (Dunn *et al.*, 2002). Diese Theorie besagt, dass die Tumorentwicklung ein evolutionärer Prozess ist, der phänotypische Veränderungen der Tumorzellen erfordert, um die Immunüberwachung zu überwinden. Später wurde klar, dass sich bösartige Zellen durchsetzen, weil sie auf Grund ihrer hohen genetischen Instabilität und damit verbundenen Mutationen selektiert werden. Diese Mutationen führen in der Tat zu einer Resistenz gegen die Eliminierung durch das Immunsystem und zur Unterdrückung von wirksamen Immunantworten (Fenton and Longo, 1995). Zu diesen Veränderungen gehören zum Beispiel eine reduzierte MHC Expression (Travers *et al.*, 1982) und eine veränderte Peptidverarbeitung, die zu einer verminderten Präsentation auf MHC-Komplexen führt (Marincola *et al.*, 1999). Darüber hinaus können diese Veränderungen auch eine alterierte Zell-Zell-Interaktion durch Überexpression von koinhibierenden Rezeptor-Liganden wie PD-L1 auf Tumorzellen (Iwai *et al.*, 2002) und eine erhöhte Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, wie dem Tumorwachstumsfaktor β (TGF- β) und IL-10, beinhalten (Khong and Restifo, 2002).

Das Hauptziel der Immuntherapie ist die Überwindung des Immunoeditings und die Rückkehr zu einer wirksamen Immunantwort gegen den Tumor. Erreicht

werden kann dies beispielweise durch die Markierung der bösartigen Zellen zur optimalen Erkennung durch immunologische Effektormechanismen und/oder die Beseitigung der durch den Tumor verursachten immunsuppressiven Umgebung.

1.5 Tumorimmunotherapie

In den 1980er Jahren begannen die ersten klinischen Studien zur Untersuchung der tumorhemmenden Wirkung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-2. Zuvor hatten *in vitro* Arbeiten gezeigt, dass IL-2 Leukozyten aktiviert und damit die Lyse von Tumorzellen auslöst (Grimm, Mazumder and Rosenberg, 1982). Leider zeigte die klinische Anwendung, dass der menschliche Organismus nur eine geringe Menge an IL-2 verträgt (Rosenberg *et al.*, 1985). Aufgrund dieser Dosisbegrenzung von IL-2 und anderer proinflammatorischer Zytokine konzentrierte sich die Forschung fortan auf andere Ansätze.

Heute ist die Grundlage der modernen Immuntherapie die Identifizierung von Tumorantigenen. Hierbei ist es wichtig zwischen zwei Gruppen von Tumorantigenen zu diskriminieren: tumorspezifische Antigene (TSAs) und Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) (Wang, 1997). TSAs sind Patientenspezifisch, da sie ausschließlich auf Tumorzellen eines Individuums exprimiert werden, die von mutierten Genvariationen herrühren. TAAs hingegen werden auf Tumorzellen überexprimiert, während sie auch in gesundem Gewebe in geringerer Ausprägung vorkommen. Das bedeutet, dass sie auch bei Patienten gefunden werden können, die an der gleichen Krebsart leiden. Es gibt verschiedene Ansätze, Tumorzellen mit Hilfe von TSAs und TAAs zu bekämpfen. So wird beispielsweise ein Antitumor-Impfstoff mit TSAs oder TAAs (z. B. RNS, DNS oder Peptide) verabreicht, um das Immunsystem der Patienten für die Tumorzellen zu sensibilisieren, was idealer Weise zur Eradikation der entarteten Zellen führt (Lollini *et al.*, 2006). Wie bei herkömmlichen prophylaktischen Impfstoffen führt der Anti-Tumor-Impfstoff zu einer adaptiven Immunreaktion mit Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Herausforderung besteht jedoch in der Suche nach geeigneten Antigenen. TAAs gleichen sich auf den jeweiligen Tumorentitäten bei verschiedenen Patienten, jedoch besitzen die meisten von ihnen nicht die erforderliche Immunogenität und Spezifität. TSAs,

die aus mutierten Proteinen in Krebszellen entstehen, sind wiederum einzigartig für den Krebs eines jeden Patienten. Die Anwendung von TSAs bei Patienten zur Tumorbekämpfung ist jedoch sehr aufwendig und teuer, da sie die Entwicklung einer hoch personalisierten Therapie erfordern (Hollingsworth and Jansen, 2019). Das Design einer TSA basierten Therapie beruht oft auf dem Leukozyten-Antigen-Typ (HLA) des Patienten, die individuellen Mutationen des Tumors und Analysen der Transkriptome und Immunozeptidome. Trotz erheblicher Anstrengungen bei der Entwicklung solcher Impfstoffe ist die Umsetzung von *bench to bedside* immer noch eine Herausforderung, obwohl jüngste Studien vielversprechende Ergebnisse mit neuen Adjuvantien zeigen (Rammensee *et al.*, 2019).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Tumorerkrankungen sind sogenannte CAR-T-Zellen. Die Therapie nutzt gentechnisch veränderte T-Zellen, die einen chimären Antigenrezeptor (CAR) exprimieren. Bei der CAR-T-Zelltherapie werden die eigenen T-Zellen des Patienten *ex vivo* mit Hilfe eines viralen Vektors mit CARs gegen die TSAs des Patienten ausgestattet. Diese CAR-T-Zellen werden daraufhin zurück in den Patienten infundiert, wo sie aktiviert und expandiert werden (Buchholz *et al.*, 2018). CARs bestehen aus dem Produkt einer Fusion eines einkettigen variablen Antikörperfragments (ScFv) mit dem intrazellulären Signalmotiv der CD3 ζ -Kette. Um die T-Zellaktivierung zu verbessern, wurden zusätzlich die intrazelluläre Signaldomäne von CD28 und/oder 4-1BB in CARs eingebaut (Maher *et al.*, 2002; Weinkove *et al.*, 2019). Ein Grund für die starke Wirksamkeit der CAR-T-Zelltherapie ist, dass das der chimäre Antigenrezeptor das Signal 1 über einen Teil der CD3 ζ -Zytodomäne und zusätzlich durch einen Teil der CD28-Zytodomäne das Signal 2 an die T-Zelle vermittelt wird, wenn der CAR an sein Zielantigen bindet. Die CAR-T-Zelltherapie geht jedoch mit schweren Nebenwirkungen einher, wie zum Beispiel dem Zytokin-Freisetzungssyndroms (cytokine release syndrome, CRS) (Gust *et al.*, 2017; Neelapu *et al.*, 2018). Dem ist hinzuzufügen, dass für eine CAR-T-Zelltherapie eine Vorbehandlung mit Chemotherapie erforderlich ist (Neelapu *et al.*, 2017; Schuster *et al.*, 2017; Salmikangas, Kinsella and Chamberlain, 2018), was für viele Krebspatienten nicht in Frage kommt.

Die einzige fest etablierte Immuntherapie für bösartige Tumorerkrankungen sind bisher therapeutische antitumorale Antikörper. Beginnend mit der FDA-Zulassung von Rituximab, einem chimären anti-CD20 Antikörper, der die Überlebensrate bei malignen B-Zell-Lymphomen erheblich verbesserte (Grillo-Lopez *et al.*, 2000; Plosker and Figgitt, 2003), hielt die Antikörpertherapie bei Krebs in relativ kurzer Zeit Einzug in den klinischen Alltag. Derzeit gibt es rund 150 von der FDA zugelassene monoklonale Antikörper zur Bekämpfung verschiedener Krebsarten (U.S. Food & Drug Administration, 2021).

1.6 Antikörpertherapie

Bereits im Jahre 1890 beobachteten Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato, dass Seren von Kaninchen, die mit inaktiviertem *Corynebacterium diphtheria* immunisiert worden waren, mit *Corynebacterium diphtheria* infizierte Mäuse heilten und das bakterielle Toxin sofort neutralisieren können (Behring and Kitasato, 1890). Auf diesen Beobachtungen aufbauend entwickelte Paul Ehrlich seine Seitenkettentheorie, in der der Begriff Antikörper erstmals verwendet wurde (Ehrlich, 1900). Ehrlich postulierte, dass die Bildung von löslichen Antikörpern zur Neutralisierung von Toxinen führt, die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an das Antigen binden. Für diese Theorie erhielt Paul Ehrlich im Jahr 1908 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

1.6.1 Aufbau eines Antikörpers

Die verschiedenen Antikörper-Strukturelemente wurden unabhängig voneinander entdeckt. Nach dem Verdau eines IgG wurden drei Fragmente beschrieben, die alle ein Molekulargewicht von 50 kDa hatten und von denen zwei identisch waren und Antigene binden konnten. Diese Fragmente wurden als „fragments of antigen-binding“ oder Fab-Fragment bezeichnet. Während der Lagerung kristallisierte das dritte Fragment spontan aus, was zu dem Begriff „fragment crystallizable“ oder Fc-Fragment führte (Porter, 1959, 1963). In den folgenden Jahren wurden in weiteren Experimenten Antikörper mit denaturierenden und reduzierenden Reagenzien behandelt. Es wurde beobachtet, dass sich bei der Behandlung zwei verschiedene Untereinheiten

bildeten. Diese traten im gleichen Verhältnis, aber mit unterschiedlichen Molekulargewichten auf: 25 kDa und 50 kDa. Die entdeckten Proteinketten wurden daher als leichte und schwere Ketten bezeichnet (Edelman and Poulik, 1961; Edelman and Gally, 1962). Aufgrund dieser Entdeckungen kam man zu dem Schluss, dass die Antikörperstruktur einer Y-förmigen Struktur ähneln muss, die aus zwei identischen leichten und schweren Ketten besteht, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (siehe Abbildung 2). In der anschließenden Sequenzierung verschiedener Antikörper wurden zwei verschiedene Regionen auf jeder Kette identifiziert. Auf der schweren Kette fand man eine Region am C-Terminus, die aus drei konstanten Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) besteht, die sogar zwischen verschiedenen Spezies fast nahezu identisch ist, und eine variable Domäne am dem N-Terminus (V_H). Darüber hinaus sind die C_{H1} - und C_{H2} -Domänen durch die Scharnierregion verbunden. Die leichte Kette hat nur eine konstante Domäne (C_L) und eine variable Domäne (V_L) (Wu and Kabat, 1970) (siehe Abbildung 2). In jeder variablen Domäne gibt es drei hypervariable Regionen, sogenannte komplementaritätsdeterminierenden Region ($CDR1-3$), die die Spezifität des Antikörpers bestimmen. Die Sequenzvariabilität wird durch somatische Rekombination auf chromosomaler Ebene verursacht, wie in 1.3 beschrieben. Die V_H -Domänen werden von den Genen V, D und J kodiert, während die V_L -Domänen durch V- und J-Gene kodiert werden (Brack *et al.*, 1978; Kurosawa *et al.*, 1981; Sakano *et al.*, 1981). Zusätzlich wird die Vielfalt durch spontanen Zusammenbau von schweren und leichten Ketten, Insertionen und Deletionen sowie somatische Hypermutation vergrößert (McKean *et al.*, 1984; Al-Lazikani, Lesk and Chothia, 1997; Grawunder, West and Lieber, 1998).

Leichte Ketten können in zwei Unterklassen unterteilt werden: die κ - und die λ -Kette (Hilshmann and Craig, 1965). Schwere Ketten wiederum, können in fünf verschiedene Subtypen unterteilt werden: α , δ , ϵ , γ und μ , die für die verschiedenen Isotypen der Antikörper IgA, IgD, IgE, IgG und IgM charakterisierend sind. Diese Isotypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer molekularen Zusammensetzung, sondern auch in ihrer Verteilung im Körper, sowie in ihrer Funktion und Halbwertszeit. IgG und IgM sind die Haupttypen, die im menschlichen Blut vorkommen. Der IgM Antikörper ist ein Indikator für frühe

Infektionen und ist als Pentamer ein sehr großes Molekül (siehe Abbildung 2). IgG hingegen, ist in der Lage die Blutbahn zu verlassen und in benachbarte Gewebe einzudringen. Außerdem hat IgG die längste Serum-Halbwertszeit aller Antikörper-Isotypen. Darüber hinaus besitzen IgG-Antikörper Antitumoreigenschaften, da sie über ihren Fc-Teil eine Immunzellreaktion vermitteln. Diese Eigenschaften des IgG-Isotyps machen diesen Antikörper zu einer bevorzugten Vorlage für therapeutische Antikörper.

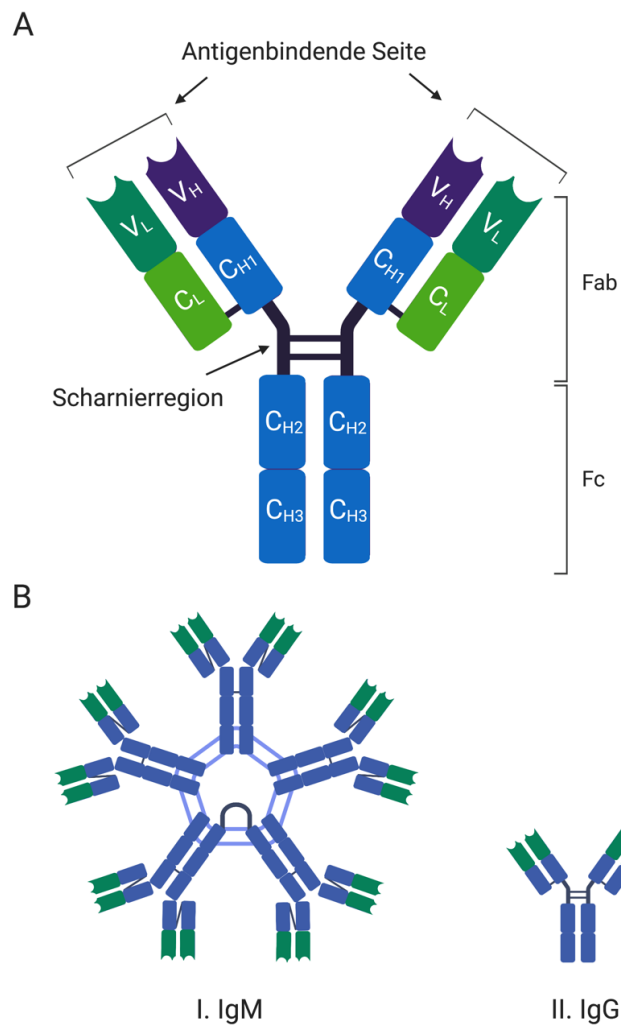


Abbildung 2: Schematische Darstellung der IgG-Struktur A. Ein IgG-Antikörper besteht aus zwei leichten Ketten (grün) und zwei schweren Ketten (blau). Die variablen Domänen bestehen aus V_H und V_L (dunkelgrün und dunkelblau) und sind für die Antigenbindung verantwortlich. Die schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken in der Scharnier-Region verbunden. Der Antikörper kann in zwei verschiedene Domänen aufgeteilt werden: Fab und Fc. B. Schematische Darstellung der am häufigsten in Blut vorkommenden Antikörpersubtypen. I. Das IgM-Molekül ist ein Pentamer mit einer J-Kette. Die J-Kette verbindet zwei μ -schwere Ketten der Antikörpermonomere über Disulfidbindungen. II. Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls zum Vergleich. Die variable Region ist in grün dargestellt, die konstante Region in blau. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.6.2 Effektormechanismen von IgG Antikörpern

Antikörper spielen eine entscheidende Rolle beim Schutz des menschlichen Organismus, indem sie Krankheitserreger wie Viren, Bakterien oder deren Toxine markieren und neutralisieren. Ihre Wirkungsweise kann in zwei Arten von Mechanismen unterteilt werden: Fc-Teil-abhängig und Fc-Teil-unabhängig.

Die vom Fc-Teil unabhängige Wirkungsweise ist die Neutralisierung. Zum Beispiel binden Antikörper an Bakterientoxine oder Membranproteine, so dass die Interaktion des Pathogens mit der Wirtszelle verhindert wird. Effektormechanismen, die Fc-Teil abhängig sind, führen zu der Aktivierung von immunologischen Effektorzellen durch die Multimerisierung von Fc γ -Rezeptoren, sowie Zellyse durch Induktion des klassischen Weg der Komplementkaskade.

Um Fc-Teil abhängige Reaktionen auszulösen, wie z. B. komplementabhängige Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity - CDC), antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) oder antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (antibodydependent cellular phagocytosis - ADCP), ist die Aktivierung von Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) und C1q-Plasmaprotein durch die multivalente Anordnung von Antikörpern und ihrer Fc-Teile an der Zielzellmembran entscheidend. Diese Bedingung verhindert die Aktivierung der Effektorzellen durch lösliche IgG-Moleküle (Thommesen *et al.*, 2000; Seidel, Schlegel and Lang, 2013; DiLillo and Ravetch, 2015).

Wie bereits erwähnt, ist die Bindung des Antikörpers an einen Fc-Rezeptor notwendig für die Aktivierung von Effektorzellen. Diese Rezeptoren sind auf fast allen hämatopoetischen Zellen zu finden (Capel *et al.*, 1994). Fc γ R lassen sich in drei aktivierende (Fc γ RI, Fc γ RIIA und Fc γ RIII) und einen hemmenden (Fc γ RIIB) Rezeptor unterscheiden. Diese vier Rezeptoren werden auf Zellen gemeinsam exprimiert, um eine angemessene zelluläre Reaktion zu erreichen. B- und NK-Zellen bilden die Ausnahme: B-Zellen exprimieren nur den hemmenden Fc γ RIIB, während NK-Zellen nur den aktivierenden Fc γ RIII exprimieren. Aus diesem Grund gelten NK-Zellen als die wichtigsten Effektorzellen der ADCC (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Seidel, Schlegel and Lang, 2013). NK-Zellen sind jedoch nicht ausschließlich für die ADCC verantwortlich. Es hat sich gezeigt,

dass auch $\gamma\delta$ -T-Zellen, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, ADCC vermitteln können, da sie ebenfalls $Fc\gamma R$ exprimieren (Chen and Freedman, 2008; Braster, O'Toole and van Egmond, 2014; Seidel *et al.*, 2014; Yeap *et al.*, 2016).

1.6.3 Therapeutische Antikörper

Im Jahre 1975 legten Köhler und Milstein den Grundstein für die Herstellung therapeutischer Antikörper, als es ihnen gelang, B-Zellen von Mäusen, die mit einem bestimmten Antigen immunisiert worden waren, mit malignen Plasmazellen zu fusionieren (KÖHLER and MILSTEIN, 1975). Die so entstandenen Hybridome besaßen eine unbegrenzte Teilungskapazität und die Fähigkeit monoklonale Maus-Antikörper zu produzieren. Die monoklonalen Maus-Antikörper hatten jedoch nur eine begrenzte therapeutische Wirksamkeit, da menschliche Fc-Rezeptoren eine geringe Affinität zu murinen Fc-Teilen haben. Außerdem erkennt das menschliche Immunsystem murine Antikörper als fremd, was zur Produktion von menschlichen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) führte, die die Wirksamkeit und Halbwertszeit drastisch verringern (Reynolds *et al.*, 1989; Tjandra, Ramadi and McKenzie, 1990).

Heutzutage gibt es verschiedene elaborierte Ansätze zur Herstellung von humanisierten Antikörpern, ohne dass ein Tier immunisiert werden muss. Es ist möglich menschliche Antikörper durch phage – und yeast display zu erzeugen oder Nagetiere mit menschlichen Immunglobulinen zu transformieren (Carter, 2006). Diese neuen Methoden, sowie weitere Entwicklungen in der Molekularbiologie führten zu verschiedenen Antikörperformaten, z.B. chimäre IgG-Moleküle, Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) (Sliwkowski and Mellman, 2013) und BiTe-Antikörper (siehe Abbildung 3) (Bargou *et al.*, 2008; Kantarjian *et al.*, 2017). ADCs sind Antikörper, die mit Medikamenten, Toxinen, radioaktiven Molekülen oder Zytokinen gekoppelt sind, um die Wirksamkeit dieser Antikörper gegen Krebs zu erhöhen und als Vehikel für den selektiven Einsatz von Medikamenten gegen Krebszellen zu fungieren (Diamantis and Banerji, 2016). Alle bisher genannten Ansätze haben zu Fortschritten in der Krebstherapie beigetragen, allerdings nur bei bestimmten Tumorarten.

Einschränkende Faktoren für die Wirksamkeit von IgG-Molekülen und ihren Konjugaten sind:

- Schlechte Infiltration von NK-Zellen in solide Tumore (Müller and Kontermann, 2007)
- Geringe Proliferationsfähigkeit von NK-Zellen
- Die mangelnde Selektivität von Immuntoxinen, -zytokinen und Radioimmunkonjugaten

Ein möglicher Ansatz zur teilweisen Umgehung dieser einschränkenden Faktoren sind bispezifische Antikörper (bsAb). Diese modifizierten Antikörper binden gleichzeitig an Tumorzellen und an Effektorzellen, wie T-Zellen. Diese können auf Grund des fehlenden Fc-Rezeptors nicht durch konventionelle Antikörper rekrutiert werden und führen nach Rekrutierung durch den bsAb zur T-Zellaktivierung und Tumorzelllyse.

1.6.4 Bispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper zeichnen sich im Allgemeinen durch die Fähigkeit aus, zwei Antigene gleichzeitig zu binden (siehe Abbildung 3). Ein bispezifischer Antikörper kann zum Beispiel gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen und ein immunstimulierendes Antigen auf immunologischen Effektorzellen gerichtet sein, was zu einer Aktivierung von zytotoxischen Zellen in unmittelbarer Tumornähe führt. Mit verschiedenen Antikörperfragmenten kann fast jede Zellpopulation als Effektorzelle rekrutiert werden (z. B. Makrophagen und Monozyten durch CD16). T-Zellen, die für ihre hohe Effizienz bekannt sind, sind als Effektorzellen besonders interessant, da sie nicht durch monoklonale Antikörper aktiviert werden können, da ihnen ein Fc-Rezeptor fehlt. Um eine T-Zellaktivierung zu erreichen, werden T-Zellen durch die Bindung des Zelloberflächenmoleküls CD3, als zentrales Aktivierungsmolekül, rekrutiert und aktiviert (Perez *et al.*, 1985; Jung *et al.*, 1986).

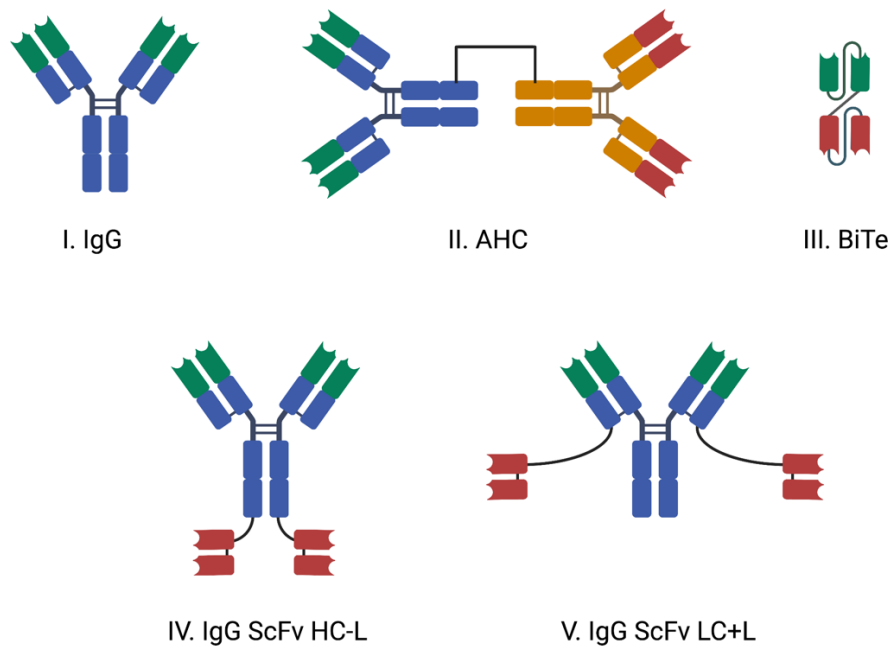


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls und verschiedener bispezifischer Antikörperkonstrukte. I. Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls zum Vergleich. Die variable Region ist in grün dargestellt, die konstante Region in blau. II. Antikörper Heterokonjugate bestehen aus zwei individuellen IgG-Molekülen mit eigener Spezifität, die chemisch miteinander gekoppelt sind. III: Bi-spezifische T-Zell-Engager (BiTE) bestehen aus zwei ScFv (single chain fragment variable) mit unterschiedlichen Antigenspezifitäten (grün und rot), verbunden durch einen Peptidlinker. IV+V: Bispezifische Antikörper im IgG-ScFv-Format. HC zeigt an, dass das ScFv (rot) an die schwere Kette gebunden ist, während LC bedeutet, dass das ScFv an die an die leichte Kette des IgG gebunden ist. +/- L gibt an, ob ein Peptidlinker zwischen den Antikörperketten und ScFv eingefügt ist oder kein Linker verwendet wird. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.6.5 Antikörper-vermittelte T-Zellrekrutierung

Wie bereits in 1.3 und Abbildung 1 beschrieben, sind für die Aktivierung von T-Zellen drei Signale erforderlich. Signal 1, die Kommunikation zwischen TCR- und CD3-Komplex kann durch einen CD3-spezifischen Antikörper nachgeahmt werden, was zur Proliferation und Aktivierung der T-Zellen führt (Perez *et al.*, 1985; Jung, Ledbetter and Muller-Eberhard, 1987). Bispezifische T-Zellrekrutierende Antikörper-Konstrukte ahmen das Signal 1 durch die Vernetzung des TCR/CD3-Komplexes mit einem anti CD3-Teil des jeweiligen Antikörpers nach. Dies wird erst durch die gleichzeitige Bindung an das TAA auf der Tumorzelle erreicht. Diese Zielzellrestriktion führt zur Reduktion von Nebenwirkungen, die durch lösliche Moleküle und ihre Aggregate verursacht werden. Folge dieser zielzellenrestringierten T-Zellaktivierung ist die

Proliferation, Sekretion von Zytokinen der T-Zellen und Rekrutierung von weiteren Effektorzellen. Dieses Konzept hat bereits seinen Weg *from bench to bedside* zurückgelegt: Blinatumomab zum Beispiel, der erste therapeutisch eingesetzte BiTe-Antikörper (siehe Abbildung 3) wird gegen die akute lymphoblastische Leukämie eingesetzt. Das Konstrukt ist ein ScFv bispezifischer CD19xCD3 Antikörper, der 2015 von der FDA und der Europäischen Arzneimittelagentur zugelassen wurde (Bargou *et al.*, 2008; Kantarjian *et al.*, 2017).

1.6.6 Der kombinatorische Therapieansatz von bispezifischen Antikörpern

Obwohl TAAxCD3-Bispezifika bereits den Weg von der Forschung zum Krankenbett gefunden haben, können diese oft nicht die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen, die funktionell sehr ähnlich sind, erreichen (Zhukovsky, Morse and Maus, 2016). Ein Grund dafür könnte sein, dass CAR-T-Zellen die Signale 1 und 2 (wie unter 1.5 beschrieben), die essenziell für eine langfristige T-Zellaktivierung sind, initiieren, während bispezifische anti-CD3-Antikörper meistens nur Signal 1 simulieren.

Die Idee, bispezifische Antikörper zu kombinieren, um die Rekrutierung von T-Zellen gegen Tumore zu verbessern, geht bis in die Mitte der achtziger Jahre zurück. Im Jahr 1987 veröffentlichten G. Jung und H.J. Müller Eberhard eine Arbeit, in der eine Kombination aus zwei verschiedenen Antikörper-Heterokonjugaten (antibody heteroconjugates, AHCs, siehe Abbildung 3) mit „Tumor x CD3“- und „Tumor x CD28“-Spezifität beschrieben wurde (Jung and Müller Eberhard, 1988). Die T-Zellaktivierung durch diese Kombination war viel effizienter als die durch als durch jeden der Antikörper allein (Manger *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1986). Außerdem wird die zytotoxische Reaktion ausschließlich ausgelöst, wenn beide AHCs sowohl auf der Zielzelle als auch auf dem T-Lymphozyten durch Bindung immobilisiert werden, wodurch die primären und sekundären Aktivierungssignale simuliert werden. Jahrzehnte später, haben Skokos *et al.* gezeigt, dass es in der Tat möglich ist, eine verstärkte T-Zellantwort

mit der Kombination von TAAxCD3 und TAAxCD28 bispezifischen Antikörpern bei Mäusen zu erzielen (Skokos *et al.*, 2020).

Die Verwendung von CD28-Antikörpern beim Menschen ist ein sehr sensibles Thema in der Antikörperforschung, da durch den so genannten TeGenero-Skandal sich die Forschung weitestgehend von CD28-Antikörpern abgewandt hat. Hierbei führte der TGN1412 Antikörper, ein superagonistischer, monoklonaler, humanisierter Maus-CD28-Antikörper, bei der ersten klinischen Studie im Menschen zu einer systemischen T-Zellaktivierung, die bei sechs gesunden Freiwilligen zu einem lebensbedrohlichen Zytokin-Freisetzungssyndrom (Cytokine Release Syndrome, CRS) führte (Stebbing *et al.*, 2007).

1.7 Dual Targeting

Obwohl CAR-T-Zellen und bsAb vielversprechende Ergebnisse vor allem bei hämatologischen Neoplasien zeigen, ist die Wirksamkeit bei soliden Tumoren begrenzt. Ein limitierender Faktor könnte die unzureichende Penetration von T-Zellen, in das Tumorgewebe sein (Salmon *et al.*, 2012; Spranger *et al.*, 2017). Ein möglicher Lösungsansatz ist das Konzept des „dual targeting“. Dies bedeutet, dass Antigene als Target dienen, die sowohl auf den Tumorzellen als auch auf den Tumorgefäßen exprimiert sind. So könnte das Tumorendothel spezifisch aufgebrochen werden und den Effektorzellen der Weg zum Tumorgewebe ermöglicht werden. Solche Antigene sind auch ein attraktives Ziel für den kombinatorischen Ansatz von CD3 und CD28 bispezifischen Antikörpern.

Die beiden TAAs, die in der hier vorgelegten Arbeit für die Kombination von CD3 und CD28 bispezifischen Antikörpern ausgewählt wurden, waren B7H3 und Endoglin.

B7H3 (CD276), ein Transmembranprotein, gehört zu den B7 und CD28 Immun-Checkpoint-Familien und weist strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Checkpoint-Modulatoren wie zum Beispiel PD-1 auf (Jung and Choi, 2013). Das Molekül wird konstitutiv auf Zellen des Immunsystems exprimiert, insbesondere auf APCs (Lee *et al.*, 2017). Es hat sich gezeigt, dass das auf APCs exprimierte

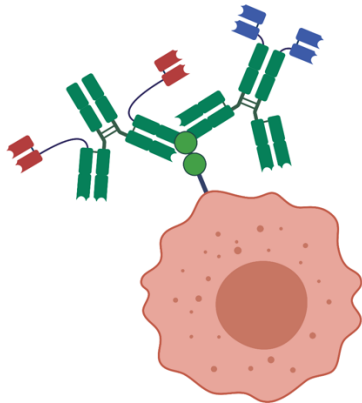
B7H3 die Tumorprogression fördert, da es die Funktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen beeinträchtigt (Lee *et al.*, 2017). Dementsprechend wird berichtet, dass die Blockierung von APC-exprimiertem B7H3 in verschiedenen Tumormausmodellen eine starke Anti-Tumor-Wirkung hervorruft, die zusammen mit einer Anti-PD-1-Therapie synergistisch wirkt (Lee *et al.*, 2017). Darüber hinaus wird dieses Antigen in einer Vielzahl von soliden Tumoren überexprimiert, bei gleichzeitiger Überexpression auf tumorassoziierten Gefäßzellen (Picarda, Ohaegbulam and Zang, 2016). Die Expression auf gesundem Gewebe ist dabei begrenzt (Modak *et al.*, 2001).

Endoglin (CD105), ein Transmembranprotein, fungiert als Hilfsrezeptor, der in den Signalkomplex des transformierenden Wachstumsfaktors (transforming growth factor, TGF) β integriert ist. Eine seiner bekannten Funktionen ist die Induktion der Proliferation und Aktivierung von Endothelzellen (Barbara, Wrana and Letarte, 1999; Lebrin *et al.*, 2004). Endoglin findet sich in hoher Expression auf vaskulären Endothelzellen, aber auch auf anderen gesunden Zellen wie Stromazellen, Melanozyten und Zellen des hämatopoetischen Systems (Gougos and Letarte, 1988; Dallas *et al.*, 2008; Trentin Brum *et al.*, 2019). CD105 eignet sich als TAA, da es besonders auf proliferierendem Endothel hochreguliert ist und auf neoangiogenen Gefäßen verschiedener Krebsentitäten identifiziert werden konnte, was häufig mit einer schlechten Prognose korrelierte (Burrows *et al.*, 1995; Wikström *et al.*, 2002; Saad *et al.*, 2003; Minhajat *et al.*, 2006; El-Gohary *et al.*, 2007).

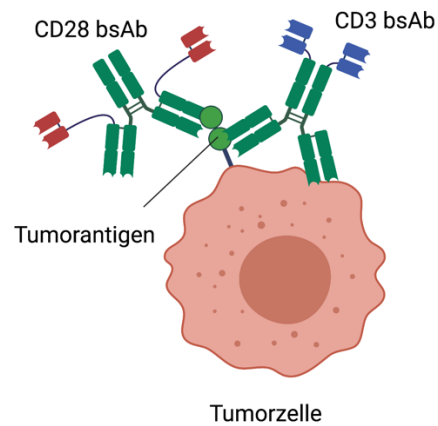
Zusätzlich hat die Kombination dieser beiden unterschiedlichen TAAs als Zielantigen für unterschiedliche bsAb bei doppelt positiven soliden Tumoren, den Vorteil, dass Off-Target-Effekte in Geweben die physiologischer Weise nur eines der Antigene exprimieren minimiert werden. Damit bietet der kombinatorische Ansatz zusätzliche Spezifität und geringere Toxizität für gesundes Gewebe.

Vor diesem Hintergrund war die Entwicklung des kombinatorischen Ansatzes in den letzten Jahren das zentrale Arbeitsgebiet der Tübinger Forschungsgruppe um G. Jung.

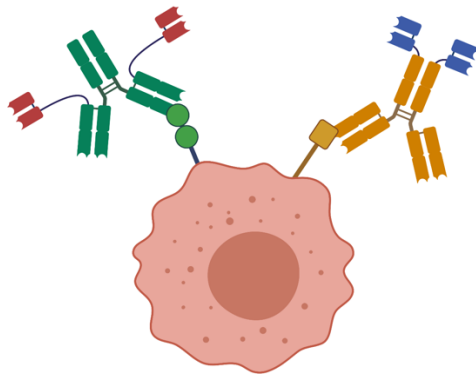
1) Ein Antigen auf einer Tumorzelle, selbes Epitop



2) Ein Antigen auf einer Tumorzelle, zwei verschiedene Epitope



3) Zwei Antigene auf einer Tumorzelle



4) Zwei Antigene auf zwei Tumorzellen

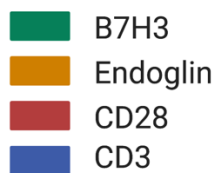
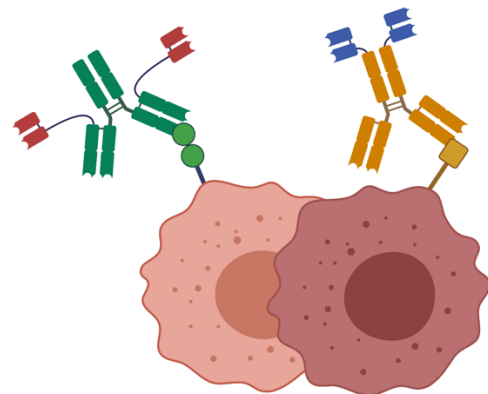


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Szenarien in der die verschiedenen Antikörperkombinationen getestet wurden. 1) Beide bsAb (CD3 und CD28) binden dasselbe Epitop auf einem Antigen, auf derselben Tumorzelle. 2) Beide bsAb binden zwei verschiedene Epitope auf einem Antigen, auf einer Tumorzelle. 3) Die bsAb sind gegen jeweils ein Antigen auf einer Tumorzelle gerichtet, die beide Antigene exprimiert. 4) Die bsAb binden auf jeweils ein Antigen auf auf zwei verschiedenen Tumorzellen, die nur jeweils ein Antigen exprimieren. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.8 Forschungsziel der Dissertation

Verschiedene humanisierte bispezifische B7H3/Endoglin x CD3-Antikörper, wurden bereits von Dr. Latifa Zekri entwickelt. Für den kombinatorischen Ansatz hat Dr. Timo Manz chimäre bispezifische Endoglin x CD28 kostimulatorische Antikörperkonstrukte im IgG ScFv-Format (siehe Abbildung 3) hergestellt. Diese Antikörper wurden dann von Yacine Maringer an dem für die CD28-Bindung verantwortlichen Fv humanisiert. Meine vorausgegangene Masterarbeit im Fach Molecular Medicine zielte darauf ab die optimalen Formate für einen abgestimmten kombinatorischen Ansatz mit B7H3xCD3 Antikörper und EndoglinxCD28 zu ermitteln.

Das Ziel der jetzt vorgelegten Dissertation war es, durch funktionelle *in vitro* Charakterisierung der verschiedenen Konstrukte die optimale Antigenwahl für einen kombinatorischen Ansatz zu evaluieren. Die Konstrukte werden in verschiedenen Kombinationen, in vier verschiedenen Szenarien (siehe Abbildung 4) getestet, um die Wahl der Zielantigene und die dazu gehörende Kombination von CD3 und CD28 bsAb zu identifizieren, die optimal für die Induktion einer effektiven, tumorzelllimitierten T-Zell Aktivierung geeignet ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Äkta pure 25 L1	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Brutschrank APT.line CB	Binder GmbH, Tuttlingen, DEU
Brutschrank Heraeus function line	Thermo Electron, Waltham, USA
DIONEX UltiMAt TM 3000 Bio RSLC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DEU
Durchflusszytometer Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Elektrophorese-Netzteil EPS 200	Pharmacia Biotech, Stockholm, SWE
Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion, Ottawa, CAN
Gefrierschrank Colora E80	Colora Messtechnik GmbH, Lorch, DEU
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, DEU
MACS [®] MultiStand	Miltenyi Biotec, B. Gladbach, DEU
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, DEU
Mehrkanalpipette	Abimed GmbH, Langenfeld, DEU
MicroBeta2 Microplate Counter	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
MidiMACS [™] Separator	Miltenyi Biotec, B. Gladbach, DEU
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Nanodrop [™] 1000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DEU
pH-Messgerät Seven Multi	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, DEU

Pipetten DV1000, DV200, DV100, DV20, DV10	Abimed GmbH, Langenfeld, DEU
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, DEU
Schüttler Multitron	Infors, Bottmingen, CHE
Sterilwerkbank 3F120-II GS	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, DEU
Sterilwerkbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Chur, CHE
Trockenschrank Heraeus ET	Thermo Electron, Waltham, USA
Vortexer Vibro-Fix VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DEU
Waagen (Fein- und Tischwaage)	Sartorius, Göttingen, DEU
Wasserbad MP 19	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, DEU
Wippe Rocky RT-1	Fröbel, Lindau, DEU
Zell-Harvester ICH-110-96	Inotech Biosystems International, Inc. Rockville, USA
Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Thermo Electron, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Electron, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 2.0 R	Thermo Electron, Waltham, USA
Zentrifuge ROTINA 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, DEU

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Name	Hersteller
Bedruckte Filtermatten A	Perkin Elmer, Rodgau, DEU
Bottletop Filter 250 ml (0.22 µm pore size)	Millipore, Schwalbach, DEU
Bottletop Filter 500 ml (0.22 µm pore size)	Millipore, Schwalbach, DEU
Cellstar® 15 ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU

Cellstar® 50 ml PP-Röhrchen konisch/skirted bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Cellstar® Zellkulturflaschen 175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Cellstar® Zellkulturflaschen 25 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Cellstar® Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Cellstar® Zellkulturplatten 6-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Cellstar® Zellkulturplatten 96-well flat/round bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Costar® 96-Well-Assay-Platte, round bottom	Corning, Kaiserslautern, DEU
Costar® Einmalplastikpipette 50 ml	Corning, Kaiserslautern, DEU
Costar® Reagenzien-Reservoirs	Corning, Kaiserslautern, DEU
Costar® Universaldeckel	Corning, Kaiserslautern, DEU
Cryo vials Cryo.S 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
CryoBox™	Merck, Darmstadt, DEU
Einmalnadel Sterican®	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Einmalplastikspritzen 3 ml Luer-Lok™ Tip	BD, Heidelberg, DEU
FACS Röhrchen 1.3 ml, pp, 8.5/44 mm, round bottom, natural	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Falcon® 15 ml Zellkulturröhrchen, konisch, PS	Corning, Kaiserslautern, DEU
Falcon® Einmalpipette plastik 25 ml, 10 ml, 5 ml	Corning, Kaiserslautern, DEU
Gefrierbehälter Mr. Frosty®	Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte, DEU
Glassflaschen 2 l, 1 l, 500 ml	Schott AG, Mainz, DEU

LD Säule	Miltenyi Biotec, B. Gladbach, DEU
Messzylinder Plastik	Vitalab, Großostheim, DEU
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Weinheim, DEU
Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DEU
Spritzenfilter Millex-GV, 0.22 µm	Millipore, Schwalbach, DEU
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, DEU
TipOne® Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl	STARLAB, Hamburg, DEU
TipOne® Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl	STARLAB, Hamburg, DEU
Zentricon Amicon Ultra 30 kDa	Millipore, Schwalbach, DEU

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Serva, Heidelberg, DEU
10x Tris/Glycin/SDS-Puffer	Bio-Rad, München, DEU
2x Laemmli Ladepuffer	Bio-Rad, München, DEU
³ [H]-methyl Thymidin (1mCi/ml)	Hartman Analytics GmbH, Braunschweig, DEU
7-Aminoactinomycin (7-AAD, Viability staining solution)	Biolegend, Fell, DEU
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, DEU
BioColl Trenn-Lösung	Biochrom GmbH, Berlin, DEU
Coomassie-Blau-Färbung	Bio-Rad, München, DEU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, DEU
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, DEU
Ethylen_Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim, DEU

FACS-Clean	BD, Heidelberg, DEU
FACS-Flow	BD, Heidelberg, DEU
FACS-Rinse	BD, Heidelberg, DEU
Fötales Kälberserum	Sigma, Steinheim, DEU
Gibco® 1x Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Life Technologies™, Carlsbad CA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DEU
L-Glutamine (200 nM)	Lonza, Basel, CHE
MEM-NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren) (100x)	Life Technologies™, Carlsbad CA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumpyruvat (100 nM)	Sigma, Steinheim, DEU
Penicillin	Sigma, Steinheim, DEU
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, DEU
Streptomycin	Sigma, Steinheim, DEU
Trypanblau 0.4%	Sigma, Steinheim, DEU
Türk'sche Lösung	Sigma, Steinheim, DEU
Tween® 20	Sigma, Steinheim, DEU

2.1.4 Zellkulturmedium

Name	Hersteller
Gibco® Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640)	Life Technologies™, Carlsbad CA, USA

Medium	Inhaltsstoffe
Einfriermedium	90% FCS (hitzeinaktiviert, 56 °C, 1 h) 10% DMSO
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 Medium 10% FCS (hitzeinaktiviert, 56 °C, 1 h) 1% Sodium Pyruvate 1% MEM non-essential amino acids 1% P/S 50 µM β-mercaptoethanol
Trypan-Blau Lösung	0.1% Trypan-Blue in DPBS

2.1.5 Puffer

Name	Inhaltsstoffe
FACS Puffer	DPBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ pH 7.2
FACS Puffer mit Flebo γ	DPBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ 50 µg/ml Flebo γ pH 7.2
MACS Puffer	0.5% BSA 2 mM EDTA in DPBS

2.1.6 Kommerzielle Assay-Kits

Name	Hersteller
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, B. Gladbach, DEU
CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, DEU
Mini-PROTEAN® TGX, Gele 10%	Bio-Rad, München, DEU
QIFIKIT®	Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA

2.1.7 Chromatographie-Säulen

Name	Hersteller
HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg Säule	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
HiTrap™ MabSelect SuRe™ Protein A Säule	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
SUPERDEX™ 200 Increase 10/300 GL Säule	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA

2.1.8 Humane Zelllinien

Name	Beschreibung	Spezies	Bezugsquelle
HL-60	Akute myeloische Leukämie	Human	DSMZ GmbH, Braunschweig, DEU
Jurkat	T-Zell-Leukämie	Human	DSMZ GmbH, Braunschweig, DEU
K562	Chronische myeloische Leukämie in der Blastenkriese	Human	DSMZ GmbH, Braunschweig, DEU
U937	Histiozytäres Lymphom	Human	DSMZ GmbH, Braunschweig, DEU

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Polyklonale konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti- Human	IgG, Fc γ - Fragment spezifisch	PE	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.1.9.2 Monoklonale konjugierte Antikörper

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller
huCD4	Maus Ig γ 2b, κ	FITC	OKT-4	BioLegend, San Diego CA, USA
huCD8a	Maus Ig γ 1, κ	APC/Cy7	HIT8a	BioLegend, San Diego CA, USA
huCD33	Maus Ig γ 1, κ	APC	P67.6	BioLegend, San Diego CA, USA
huCD33	Maus Ig γ 1, κ	PE	P67.6	BioLegend, San Diego CA, USA
huCD45RO	Maus Ig γ 2a, κ	PE/Cy7	UCHL1	BioLegend, San Diego CA, USA
huCD62L	Maus Ig γ 1, κ	APC	DREG-56	BioLegend, San Diego CA, USA
huCD69	Maus Ig γ 1, κ	PE	FN-50	BioLegend, San Diego CA, USA

2.1.9.3 Unkonjugierte Antikörper

Antigen	Name/Klon	Spezies	Format	Hersteller
Endoglin x CD3	Kro22 x M18	Human	IgG(ScFv) ₂ , HC-L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
Endoglin x CD28	Kro22 x hu9.3	Human	IgG(ScFv) ₂ , LC+L	Hergestellt von Dr. Timo Manz
B7H3 x CD3	8H8 x M18	Human	IgG(ScFv) ₂ , HC-L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
B7H3 x CD3	8D9 x M18	Human	IgG(ScFv) ₂ , HC-L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
B7H3 x CD3	7C4 x M18	Human	IgG(ScFv) ₂ , HC-L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
B7H3 x CD28	8H8 x hu9.3	Human	IgG(ScFv) ₂ , LC+L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
B7H3 x CD28	8D9 x hu9.3	Human	IgG(ScFv) ₂ , LC+L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
B7H3 x CD28	7C4 x hu9.3	Human	IgG(ScFv) ₂ , LC+L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
MOPC x CD3	MOPC-21 x M18	Human	IgG(ScFv) ₂ , HC-L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
MOPC x CD28	MOPC-21 x hu9.3	Human	IgG(ScFv) ₂ , LC+L	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri
Endoglin	Kro22	Murin	IgG2a	Hergestellt von Dr. Timo Manz
B7H3	7C4	Murin	IgG1	Hergestellt von Dr. Latifa Zekri

2.1.10 Software

Name	Hersteller
BD FACS DIVA 6.1.2	BD, Heidelberg, DE
BioRender	Biorender, Toronto ON, CA
CellQuest Pro Version 6.1	BD, Heidelberg, DE
FlowJo™ v10.8.1	TreeStar Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism Version 9	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
MicroBeta2 Version 1.0	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
MS Office 2010	Microsoft, Unterschleißheim, Germany
Nanodrop 1000 Version 3.8.1	Thermo Scientific, Waltham, USA
Unicorn 7.0	General Electric Company, Boston, Massachusetts, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellernte

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen, in einer befeuchteten Atmosphäre, bei 37 °C mit 5% CO₂ inkubiert. Nicht-adhärenente und semi-adhärenente Zellen wurden durch vorsichtiges Klopfen gegen eine flache Oberfläche von der Wand der Flasche abgelöst. Die adhärenenten Zelllinien wurden ein- bis zweimal mit 10 ml DPBS gespült und anschließend für 5 min bei 37 °C mit 2 ml Accutase® inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 8 ml frischem vorgewärmtem Medium resuspendiert, um die Accutase® zu deaktivieren. Ein bestimmter Teil der abgelösten Zellen wurde in einem angemessenen Volumen von frischem, vorgewärmtem Medium verteilt, je nach ihrer Konfluenz und Notwendigkeit für die folgenden Experimente. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Vitalität und Zählung der Zellen

Die Zellzahl und -viabilität wurde durch das Trypan-Blau-Ausschlussverfahren bestimmt. Mit Hilfe von Trypan-Blau kann dabei zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden, da der Farbstoff in Zellen ohne intakte Zellmembran gelangt und diese somit blau färbt. Dazu wurde eine Lösung der Zellen und 0,1 % Trypan-Blau-Lösung (Türkislösung beim Zählen von PBMCs) im Verhältnis von 1:10 hergestellt. 10 µl dieser Lösung wurden in eine Neubauer Zählkammer überführt. Zur Berechnung der Zellzahl pro ml wurden die viablen Zellen in vier der großen Quadrate der Zählkammer gezählt. Die Summe der lebenden Zellen wurde durch die Gesamtzahl der gezählten Quadrate geteilt und dann mit dem Verdünnungsfaktor 10⁴ multipliziert.

2.2.1.3 PBMC Isolation

Die Isolation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisierem Blut von gesunden Spendern. Zunächst wurde das Blut 1:1 mit DPBS verdünnt. Danach wurden 25 ml des verdünnten Blutes vorsichtig über 14 ml Lymphozytentrennmedium (Ficoll-Hypaque-Lösung) in einem 50-ml-Röhrchen mit konischem Boden überführt. Dieses Gemisch wurde bei 560 g für 30 min bei Raumtemperatur ungebremst zentrifugiert. Die Zellschicht zwischen Ficoll- und Serumschicht wurde vorsichtig in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von DPBS wurde das Röhrchen bis zu einem maximalen Volumen von 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurde das Zellpellet in 50 ml DPBS resuspendiert und erneut 10 min lang bei 200 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet der isolierten PBMCs wurde in einem entsprechenden Volumen RPMI-Medium resuspendiert, mit Türkslösung gezählt und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.4 Depletion von Monozyten aus PBMC

Wenn Monozyten an Plastik wie das der Zellkulturflaschen adhären, so exprimieren sie B7H3, eines der Zielantigene der zu untersuchenden bispezifischen Antikörperkonstrukte. Nach umfassender Kontrolle durch Dr. Zekri der AG Jung stellt sich dieser Effekt aber als Artefakt im experimentellen Rahmen dar, ein sogenannter „Test Tube Effect“. Um erstens, diesen Effekt zu umgehen, zweitens die Monozyten in dieser Versuchsanordnung nicht an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind und drittens, um die Hintergrundaktivität in den funktionellen Assays zu minimieren, haben wir uns dazu entschlossen die Monozyten aus den PBMCs zu depletieren. Um nun die Monozyten aus den PBMCs zu entfernen, wurden huCD14-Mikrobeads, wie im Herstellerprotokoll von Miltenyi Biotec beschrieben, verwendet. Die gewünschte Menge frischer oder frisch aufgetauter PBMCs wurde abzentrifugiert und anschließend im angegebenen Volumen an MACS-Puffer und huCD14-Beads resuspendiert.

Dann wurde die Mischung 15 min lang bei 4 °C inkubiert und mit MACS-Puffer gewaschen. Die so mit den Beads markierten Zellen wurden erneut resuspendiert und auf eine LD-MACS-Säule geladen, die zuvor in ein Magnetfeld gestellt und mit der entsprechenden Menge MACS-Puffer gespült wurde. Anschließend wurde die Säule mit dem angegebenen Volumen an MACS-Puffer gewaschen. Der gesamte Durchfluss wurde gesammelt und gezählt, da dieser die unmarkierte Zellfraktion (PBMCs ohne Monozyten) darstellt. Diese PBMCs wurden in komplettem RPMI-Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

2.2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren, müssen die Zellen, die zuvor in Suspension gebracht wurden, 5 min bei 300 g zentrifugiert werden. Anschließend wird der Überstand verworfen, und das Zellpellet wird in einem geeigneten Volumen Gefriermedium resuspendiert. Die gewünschte Zellzahl wird in einem Volumen von 1 ml in ein Kryofläschchen überführt, welches in einen vorgekühlten (4 °C) Gefrierbehälter gestellt wird. Vor der Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wird das Kryofläschchen im Gefrierbehälter für mindestens einen Tag bei -80 °C gelagert. Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, werden die Kryofläschchen mit den gefrorenen Zellen aus dem Flüssigstickstoff oder dem -80°C-Gefrierschrank entnommen und langsam mit den Händen aufgetaut. Die Zell-Gefriermedium-Suspension wird mit vorgewärmtem Zellkulturmedium verdünnt, wobei das Medium von der jeweiligen Zelllinie abhängt, und bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Anschließend wird das Zellpellet im entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert und in geeignete Kulturbedingungen überführt. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.1.6 Transfektion von ExpiCHO-S™ Zellen

Um die Transfektion der ExpiCHO-S™ Zellen durchzuführen, wurde nach dem Protokoll („ExpiCHO™ Expression System“) des Herstellers Thermo Fischer Scientific verfahren. Nachdem die ExpiCHO-S™ Zellen aufgetaut wurden, wurden diese in ExpiCHO Expressionsmedium auf einem Orbitalschüttler mit 125 RPM mit 37 °C, 8 % CO₂ und einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert, bis die Zellsuspension einen Tag vor der Transfektion eine Dichte zwischen 4×10^6 und 6×10^6 viabler Zellen pro ml betrug. Daraufhin wurden die Zellen auf eine Dichte von 3×10^6 – 4×10^6 pro ml verdünnt und über Nacht weiter kultiviert. Am folgenden Tag, der Tag der Transfektion, wurden die Zellen mit ExpiCHO Expressionsmedium auf eine Dichte von 6×10^6 Zellen pro ml eingestellt und je 100 ml dieser Zellsuspension in je einen 500 ml Zellkulturkolben überführt. Danach wurden zu 3,7 ml OptiPRO™ SFM in einem Falcon Röhrchen mit 320 µl ExpiFectamine™ CHO Reagent vermischt. Zudem wurde in einem weiteren Röhrchen mit 4 ml OptiPRO™ SFM, 100 µg der zu transfizierenden DNS hinzugegeben. Das Verhältnis der DNS von schwerer zu leichter Kette des Antikörpers betrug 6:4. Danach wurden die Gemische aus beiden Röhrchen miteinander vermischt und für 1-5 min inkubiert, bevor sie in den Kolben mit den Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden für weitere 18-22 Stunden wieder auf einem Orbitalschüttler mit 125 RPM mit 37 °C, 8 % CO₂ und einer befeuchteten Atmosphäre inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 600 µl ExpiCHO™ Enhancer und 24 ml ExpiCHO™ Feed zur Zellsuspension hinzugegeben und die transfizierten Zellen für 10 Tage auf einem Orbitalschüttler mit 90 RPM in einem Inkubator mit 32 °C, 5 % CO₂ und befeuchteter Atmosphäre kultiviert. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.1.7 Ernte des ExpiCHO-S™-Zellüberstands

Zur Isolierung der von den ExpiCHO-S™ produzierten Antikörper, wurde die Zellsuspension bei 6000 RPM für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen 0.22 µm Flaschenaufsatzfilter in eine sterile Flasche filtriert. Anschließend wurde der filtrierte Überstand mit NaN₃ im

Verhältnis 1:100 versetzt und auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt. Der Überstand wurde bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Antikörperaufreinigung und analytische Methoden

2.2.2.1 Antikörperaufreinigung

Für die Aufreinigung der Antikörper aus dem Überstand der ExpiCHO-S™ CHO-Zellen wurde die Äkta pure 25 L1 verwendet. Vor Beginn der Proteintrennung wurde die Äkta mit DPBS äquilibriert. Alle Antikörper wurden mit einem Tandem-Reinigungsprotokoll aufgereinigt. Zunächst wurde der Überstand auf die HiTrap™ MabSelect SuRe™ Protein A Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min mit Hilfe der Affinitätschromatographie beladen. In diesem Schritt binden die Antikörper mit ihrem Fc-Teil an Protein A. So werden ungebundene, nicht erwünschte Proteine von den Antikörpern getrennt. Die Elution wurde mit 0,1 M Glycin-Elutionspuffer (pH 2,5) durchgeführt. Das eluierte Protein wurde anschließend auf die HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg-Säule geladen. Die Größenausschlusschromatographie ermöglicht sowohl die Entsalzung der Probe als auch die Trennung zwischen Monomeren und Aggregaten, oder Multimeren. Dieser Schritt wird mit DPBS als Laufpuffer durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden anschließend fraktioniert, wobei nur Fraktionen, die Monomere enthalten für die weitere Analyse weiterverwendet wurden.

2.2.2.2 Messung der Antikörperkonzentration

Nach der Antikörperaufreinigung wurde die Antikörperkonzentration mit dem Nanodrop™ 1000 in der Einstellung "other Protein E&MW", mit einem Extinktionskoeffizienten von $333.02 \frac{l}{mol \times cm}$ und einem Molekulargewicht von 200,003 kD bestimmt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Wenn die Antikörperkonzentration zu niedrig für die funktionelle Analyse war (unter 0,1 mg/ml), wurde ein Konzentrationsschritt durchgeführt

(siehe 2.2.2.3). Zum Abschluss der Messung wurden die Antikörper durch einen 0,22 µm Spritzenfilter sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.2.3 Konzentrierung der Antikörper

Wenn das gemessene Ergebnis der Antikörperkonzentration (2.2.2.2) unter 0,1 mg/ml lag, wurde der Antikörper mit Amicon Ultra Zentrifugalfiltern mit einem Cut-off von 30 kDa aufkonzentriert. Die Antikörperlösung wurde in die Filter gefüllt und bei 2500 U/min für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang wurde wiederholt, bis das Volumen im Filter 1-2 ml betrug. Schließlich wurde die Konzentration wie unter 2.2.2.2. beschrieben erneut gemessen. Abschließend wurde Antikörperlösung durch einen 0,22 µm Spritzenfilter sterilfiltriert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.2.4 Analytische Größenausschlusschromatographie

Um sicherzustellen, dass die produzierten Antikörper die richtige Größe haben und die Lösung frei von unerwünschten Komponenten und Aggregaten ist, wurde eine analytische Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) durchgeführt. Hierfür wurde das DIONEX UltiMate 3000 Bio-RSLC-System mit einer SUPERDEX™ 200 Increase 10/300 GL Säule verwendet, um die Proteine nach Größe zu trennen. Hierfür werden Proben von 7,5 µg der Antikörper in 75 µl DPBS verdünnt. Dann wurden 50 µl dieser Verdünnung auf die Säule des Gerätes bei einer Flussrate von 0,05 ml/min und einem Druck von 2 bar gegeben. Der Detektion der Proteine erfolgte durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm.

2.2.2.5 SDS-Page

Eine weitere Methode, um festzustellen, ob unerwünschte Fragmente oder Konjugate während der Synthese des Antikörpers entstanden sind, ist eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (sodium dodecyl sulfate–

polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), die unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt wird. Die zu untersuchenden Proben wurden in SDS-Ladepuffer (2x) gegeben und 5 min lang bei 95 °C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Die Proben in reduzierenden Bedingungen enthielten zusätzlich β -Mercaptoethanol (1:20), um die Disulfidbindungen zu reduzieren, was zur Dissoziation der leichten und schweren Ketten der Antikörper führt. Die elektrophoretische Trennung wurde durchgeführt in 10% Mini-PROTEAN TGX Precast Gelen, in einer Mini-PROTEAN TetraCell bei 120 V für 1,5 h. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch Zugabe von Coomassie Brilliant Blue Lösung. Nach Entfärbung des Gels mit Entfärbelösung und H₂O wurden die Gele mit einem Scanner digitalisiert.

2.2.2.6 FACS-Bindungsassay

Um die Fähigkeit der Antikörper zur Bindung an ihr jeweiliges Antigen auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde ein Bindungsassay basierend auf der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting, FACS) durchgeführt. Pro Messung wurden 100.000-200.000 der Zellen (U937, Jurkat, HL-60 und K562) wie unter 2.2.1.1. beschrieben geerntet, gezählt und anschließend in FACS-Puffer in eine 96-Well-Platte ausgelegt. Danach wurden die Zellen 3 min, bei 1700 RPM in der Platte zentrifugiert, der FACS-Puffer wurde verworfen. Die Inkubation der Primärantikörpern (die bispezifischen Antikörperkonstrukte) erfolgte in 50 μ l Volumen, bei 4 °C für 45 Minuten im Dunkeln. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Zellen dreimal mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem sekundären, Fc γ -spezifischen, PE-markierten Ziegen-Anti-Human-IgG in 50 μ l, bei 4 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige sekundäre Antikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt, danach wurden die Zellen in 150 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Antikörperbindung im BD FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) dient als Maßeinheit für den an die Zellen gebundenen Antikörper. Durch die Analyse der

Bindungskurve in GraphPad Prism Version 9 wurde der EC_{50} der verschiedenen Antikörper bestimmt.

2.2.2.7 Quantitative Bestimmung der Oberflächenantigene

Um die Antigenexpression von B7H3 und Endoglin auf der Oberfläche der untersuchten Zellen zu bestimmen, wurde das QIFIKIT®, eine quantitative Analyse der Antigene durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung in der Durchflusszytometrie, durchgeführt. U937, K562 und HL-60 (200.000 Zellen/Well) wurden mit einem primären, monoklonalen Maus-Antikörper, spezifisch für B7H3 oder Endoglin, in Sättigung (20 µg Antikörper/ml) gefärbt. Unter diesen Umständen bindet der primäre, monoklonale Maus-Antikörper monovalent an das Antigen auf der Zelloberfläche. Somit stimmt die Anzahl der gebundenen Antikörpermoleküle mit der Anzahl der gebundenen Antigene auf der Zelloberfläche überein. Anschließend wurden die Zellen unter gesättigten Bedingungen gleichzeitig mit den QIFIKIT®-Beads, die ebenfalls monoklonale Maus-Antikörper tragen, mit einem sekundären polyklonalen, FITC-markierten Ziege-Anti-Maus Immunoglobulin gefärbt.

Die Kalibrierungskurve, mit der die Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Moleküle bestimmt wird, wurde nach der FACS-Analyse mit FACSCalibur, durch das Auftragen der mittleren Fluoreszenzintensität der verschiedenen Bead-Populationen gegen die Anzahl der auf den Beads sitzenden monoklonalen Antikörper erstellt. Nach der FACS-Analyse der Tumorzellen wurde dann die Anzahl der auf den zu untersuchenden Zellen exprimierten Moleküle durch Interpolation und Analyse in FlowJo Version 10 ermittelt.

2.2.3 Funktionelle immunbiologische Assays

2.2.3.1 Thymidin-Inkorporations-Assay

Zur Untersuchung der Zellproliferation von T-Zellen, die durch die bispezifischen Antikörperkonstrukte auf Tumorzellen aktiviert wurden, wurde das Thymidin-

Inkorporations-Assay gewählt. Diese Methode verwendet radioaktives Thymidin, das während der DNS-Synthese bei der Zellteilung der T-Zellen in die DNS eingebaut wird. Die Menge des eingebauten Thymidins ist direkt proportional zur Proliferation von T-Zellen. PBMCs wurden isoliert und gezählt, wie unter 2.2.1.3 beschrieben. Danach wurden die Monozyten wie unter 2.2.1.4. beschrieben aus den PBMCs depletiert. Wie bereits beschrieben, exprimieren Monozyten B7H3, wenn sie an Kunststoff adhären und somit einen unerwünschten Hintergrund bilden. Die Tumorzellen wurden durch γ -Strahlung für 30 min inaktiviert, was einer Strahlendosis von etwa 120 Gy entspricht. Die Strahlung stammte aus einer $^{137}\text{Cäsium}$ -Quelle, die die DNS der Tumorzellen schädigt und eine weitere Proliferation der Zellen verhindert. Die Hemmung der Tumorzellproliferation ist notwendig, um die Antikörper-vermittelte T-Zellproliferation zu bestimmen, ohne die störende Proliferation der Zielzellen (Tumorzellen) zu ermitteln. PBMCs ohne Monozyten und inaktivierte Tumorzellen wurden in einem Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen von 4:1 verwendet (200.000 PBMCs ohne Monozyten und 50.000 U937/HL-60/K562), falls nicht anders beschrieben. Schließlich wurden die Antikörper in ihrer jeweiligen Konzentration zu der Zellsuspension zugegeben. Alle Tests wurden in einem Volumen von 200 μl (RPMI Komplett-Medium) mit drei Proben pro Konzentrationspunkt durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde jeder Probe 0,5 μCi $^3\text{[H]}$ -Thymidin zugesetzt und für weitere 17-18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Cell Harvester auf eine Filtermatte übertragen. Nachdem die Filtermatten eine Stunde lang bei 50 °C getrocknet wurden, wurde das inkorporierte Thymidin in der DNS der Zellen mit dem MicroBeta2 Mikroplatten-Szintillationszähler, nach Zugabe des Szintillationscocktails Ultima Gold quantifiziert. Die Menge der Radioaktivität wurde als Zählimpulse pro Minute (counts per minute) gemessen.

2.2.3.2 CellTrace™ Violet Färbung

Die CellTrace™ Violet (CTV) Färbung erlaubt es, die Proliferation von Zellen zu messen. Zellen werden zunächst mit einem stabilen Farbstoff gefärbt. Bei der Proliferation dieser Zellen verdünnt sich dieser Farbstoff über die Tochtergenerationen, was sich mittels FACS Analyse ermitteln lässt. Zudem lässt sich die markierte Zellpopulation exakt von den nichtmarkierten Zielzellen

abgrenzen, was bei den in den folgenden Absätzen beschreibenden Assays unbedingt von Nöten ist.

Für die Färbung wurden PBMCs aus denen die Monozyten depletiert wurden, auf eine Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml in DPBS eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden maximal 5 ml in jeweils ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden zum Lichtschutz mit Aluminiumfolie umhüllt. Zu je einem ml der Zellsuspension im Röhrchen wurden 0,6 µl einer 5 mM CTV-Lösung in DMSO hinzugegeben und sofort invertiert. Das Röhrchen wurde für 3 min in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert und jede Minute invertiert. Um die CTV-Reaktion zu stoppen, wurde das Röhrchen mit eiskaltem RPMI-Komplettmedium auf das zehnfache Volumen aufgefüllt. Danach erfolgte eine weitere fünfminütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Zellen bei 1500 RPM und 4 °C zentrifugiert, wonach der Überstand abgenommen wurde. Dieser Waschschrift wurde zwei weitere Male wiederholt, indem mit eiskaltem RPMI-Medium das Volumen auf 50 ml aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand dekantiert wurde. Schließlich wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen resuspendiert, gezählt und auf die gewünschte Dichte eingestellt. Damit waren die Zellen präpariert, um sie in den folgenden FACS basierten Assays einzusetzen.

2.2.3.3 FACS-Kill-Assay

Eine Methode, mit der die T-Zell-Aktivierung und Zielzellyse durch Antikörper überprüft werden kann, ist das FACS-Depletions-Assay. Die Messung erfolgt dabei mittels FACS. Dies ist möglich, da die Effektorzellen durch die Antikörper aktiviert werden und infolgedessen spezifische Aktivierungsmarker, wie CD69, exprimieren.

Zunächst wurde die gewünschte Anzahl von PBMCs monozytendepletiert und danach mit CellTrace™ Violet markiert. Die markierten PBMCs ohne Monozyten wurden in RPMI-Komplettmedium aufgenommen und in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden übertragen. Dann wurden die zu untersuchenden Antikörperkonstrukte, die in RPMI-Komplettmedium verdünnt wurden, in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Unterschiedliche Zielzellen wurden im Versuchsansatz hinzugefügt, um eine Antikörper-vermittelte

Zytotoxizität der Effektorzellen zu testen. Das Endvolumen mit Ziel-, Effektorzellen und Antikörpern betrug 200 µl pro Well. Die Platten wurden 72 h lang bei 37 °C, 5 % CO₂ und befeuchteter Atmosphäre kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und in eine 96-Well-Platte mit rundem Boden übertragen. Danach wurden die Platten für 3 min bei 1700 RPM zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in 200 µl FACS-Puffer mit Flebo γ gelöst und für mindestens 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde ein Antikörpermix für die Färbung der Zellen hergestellt. In diesem Mix wurden konjugierte Antikörper, die an einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind und an ein bestimmtes Oberflächenmolekül binden, miteinander kombiniert und in FACS-Puffer mit Flebo γ suspendiert. Zur optimalen Bestimmung der jeweiligen Zellpopulation wurden zusätzlich 100 µl an Kontrollen für jeden zur Färbung eingesetzten Antikörper erstellt. Diese sogenannten FMOs (Fluorescence Minus One Controls) enthielten alle Antikörper bis auf jeweils einen. In der Messung dieser Proben, erschienen die Zellpopulation ungefärbt, für die der jeweilige Antikörper fehlte. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass andere Zellen mit dieser Population im Dot-Plot überlappten.

Nach Inkubation mit FACS-Puffer und Flebo γ , wurden die Platten erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 50 µl der Färbemischung oder FMOs zu den Zellen hinzugegeben. Die Platte wurde dann eine Stunde lang bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die gefärbten Zellen zweimal mit 150 µl FACS-Puffer mit Flebo γ gewaschen. Dann wurden 200 µl eines Mixes aus FACS Puffer mit Flebo γ , 7AAD im Verhältnis 1:100 und Eichpartikeln (2 Tropfen pro ml) hinzugegeben. Diese Eichpartikel gewährleisten, dass in jeder Probe ein vergleichbares Volumen gemessen wird und somit die Proben und insbesondere die Zellzahlen verglichen werden kann. Die Messung wurde auf einem BD FACS Canto™ II Durchflusszytometer durchgeführt. Dieses wurde mit der Software BD FACS DIVA Version 6.1.2 betrieben. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo Version 10.8.1 und die Graphische Darstellung mit GraphPad Prism 9.

2.2.3.4 Langzeitaktivierungsassay

Zur Untersuchung der Auswirkungen unserer Antikörper auf die Bildung von T-Gedächtniszellen, wurde ein Langzeitaktivierungsassay auf der Grundlage des FACS-Kill-Assay (in 2.2.3.3 beschrieben) durchgeführt. Zunächst wurden Ziel- und Effektorzellen (PBMCs mit CellTrace™ Violet markiert, siehe 2.2.3.2) mit Antikörpern und ihren jeweiligen Kontrollen zusammengebracht und wie zuvor beschrieben inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte mit U-Boden überführt und bei 1700 RPMI für 3 min zentrifugiert, danach wurde das Medium verworfen. Nach dem Resuspendieren der verbleibenden Zellen in 50 µl RPMI Kompletmedium, wurden diese in eine neue 96-Well-Platte mit flachem Boden überführt. Anschließend wurden die verbleibenden Zellen, erneut mit Zielzellen und Antikörper konfrontiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 72 h, wurde das Experiment wie unter 2.2.3.3. beschrieben gefärbt und mit dem Durchflusszytometer FACS Canto™ II analysiert.

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm GraphPad Prism Version 9. Der statistische Test, welcher der Analyse zugrunde liegt, ist unter den jeweiligen Abbildungen angegeben. Ein p-Wert < 0.05 wird als statistisch signifikant angesehen. In den jeweiligen Abbildungen geben Sternchen folgende P-Werte an:

*	p-Wert = 0,01-0,05
**	p-Wert = 0,001-0,009
***	p-Wert = 0,0009-0,0001
****	p-Wert < 0,0001

3 Ergebnisse

Zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, werden diese im Folgenden näher beschrieben.

3.1 Beschreibung der Antikörperkonstrukte

3.1.1 Bispezifische Antikörper mit CD3-Spezifität

In diesem Projekt wurden vier verschiedene bispezifische Antikörper, die gegen B7H3 oder Endoglin und CD3/TCR gerichtet sind, verwendet. Es handelt sich dabei um so genannte „T cell engaging“ bispezifische Antikörper. Sie bringen die T-Zellen in die Nähe der Tumorzellen, was zur Proliferation der T-Zellen, Sekretion von Zytokinen, Rekrutierung weiterer Effektorzellen und die Induktion von Apoptose der Tumorzellen führt. Diese T-Zellrekrutierenden Antikörper mit CD3-Spezifität werden im Folgenden auch als BiRec, kurz für „Bispecific Receptor Stimulators“, bezeichnet. Alle bispezifischen CD3-Antikörper sind im IgG-ScFv-Format konstruiert (siehe Abbildung 6). Die Spezifität für B7H3 befindet sich auf dem IgG-Molekül, während der anti CD3-Teil auf der single chain lokalisiert ist, welche an die schwere Kette des IgG gekoppelt ist. Der CD3-Teil aller hier benutzten BiRecs basiert auf einem UCHT1 Derivat, von dem bekannt ist, dass es eine geringere Affinität zu CD3/TCR hat als der parenterale UCHT1 Antikörper (Zekri, Daten nicht publiziert). Weiterhin unterscheiden sich die drei B7H3 x CD3 bsAb in ihrem Epitop, dass sie auf dem B7H3-Molekül binden. Die Klone 8H8 und 8D9 binden in der Peripherie des Moleküls, während 7C4 in der Nähe der Zellmembran bindet (siehe Abbildung 5).

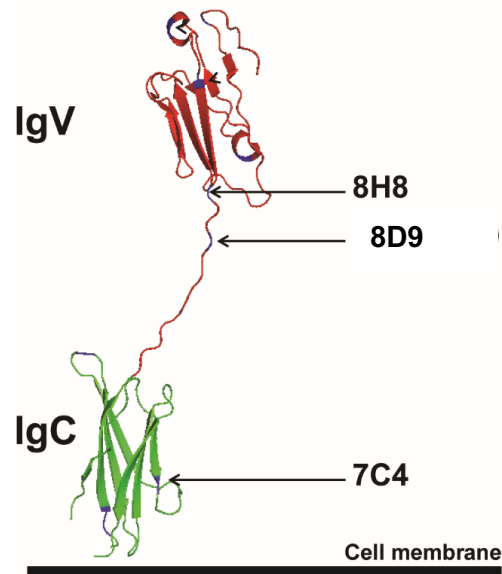


Abbildung 5: Epitopkartierung der anti-B7H3 monoklonalen Antikörper auf dem B7H3-Molekül. Die Klone 8H8 und 8D9 binden in der Peripherie des B7H3-Moleküls, während der Klon 7C4 in der Nähe der Zellmembran bindet (Zekri, Daten nicht publiziert, Modifizierte Abbildung nach Vigdorovich *et al.*, 2013)

3.1.2 Bispezifische CD28-Antikörper

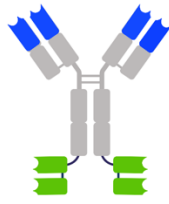
Neben den BiRecs wurden für den kombinatorischen Ansatz vier weitere verschiedene bsAb verwendet, die gegen B7H3 oder Endoglin als Zielantigene und CD28 als kostimulatorisches Effektorantigen auf der T-Zelle gerichtet sind. Im Folgenden werden diese Antikörper BiCos, kurz für „Bispecific Costimulators“, genannt. Wie in der Einleitung beschrieben, imitieren BiCos das zweite Signal bei der T-Zellaktivierung, indem sie an ein kostimulatorisches Molekül, in diesem Fall CD28, binden. Die hier verwendeten Antikörper binden jeweils an die gleichen Epitope auf dem B7H3 bzw. Endoglin-Molekül wie die BiRecs, jedoch sind sie in einem leicht abgeänderten Format aufgebaut. Die single chain mit dem variablen Fragment, welches spezifisch für CD28 ist, wird an die leichte Kette des IgGs mit einem Peptid-Linker gekoppelt (Abbildung 6). Der Linker setzt sich aus der Wiederholung der Aminosäuren Glycin (3-mal) und einem darauffolgenden Serin zusammen, sodass der Linker insgesamt aus 12 Aminosäuren besteht.

Ergebnisse

BiRecs



I. 7C4-M18
B7H3 x CD3
IgG (ScFv)₂ HC-L



II. 8D9-M18
B7H3 x CD3
IgG (ScFv)₂ HC-L

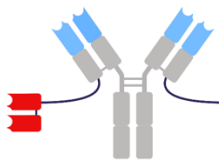


III. 8H8-M18
B7H3 x CD3
IgG (ScFv)₂ HC-L

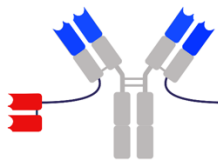


IV. Kro22-M18
B7H3 x CD3
IgG (ScFv)₂ HC-L

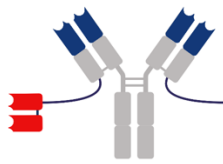
BiCos



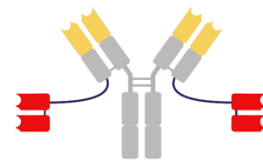
V. 7C4-9.3
B7H3 x CD28
IgG (ScFv)₂ LC+L



VI. 8D9-9.3
B7H3 x CD28
IgG (ScFv)₂ LC+L



VII. 8H8-9.3
B7H3 x CD28
IgG (ScFv)₂ LC+L



VIII. Kro22-9.3
B7H3 x CD28
IgG (ScFv)₂ LC+L







-  B7H3 - Klon 7C4
-  B7H3 - Klon 8D9
-  B7H3 - Klon 8H8
-  Endoglin - Klon Kro22
-  CD3 - UCHT1 Derivat
-  CD28 - Klon 9.3

Abbildung 6: Übersicht über die verschiedenen bispezifischen Antikörper, die in diesem Projekt verwendet wurden. Abbildung erstellt mit BioRender.com

3.2 Biochemische Charakterisierung der Antikörperkonstrukte

Die biochemische Charakterisierung aller bispezifischen Antikörper erfolgte mittels SDS-PAGE und analytischer Größenausschlusschromatographie. Mit diesen Methoden wurde untersucht, ob sie die erwartete Größe aufweisen und keine Aggregate bilden.

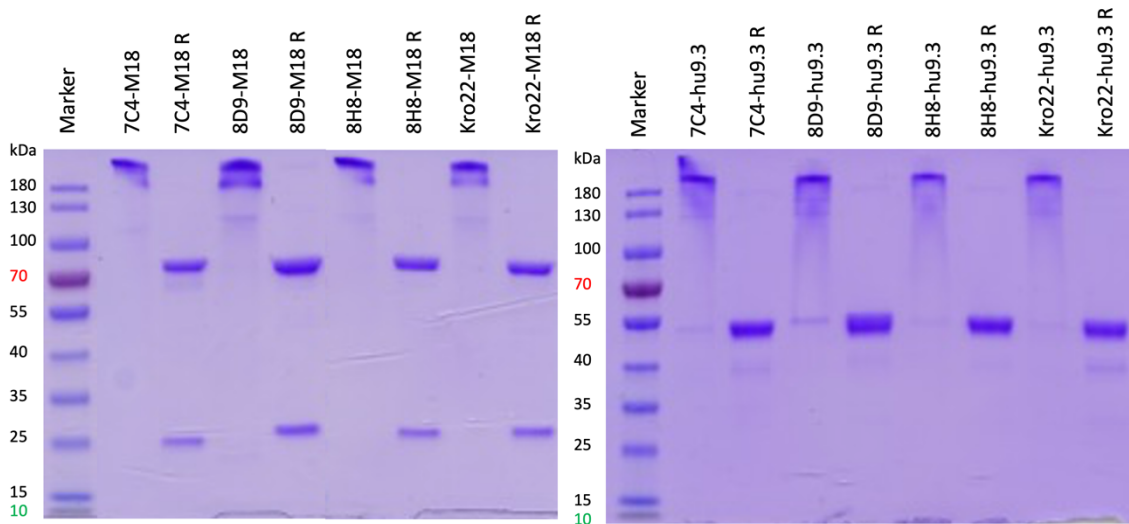


Abbildung 7: SDS-Page der bispezifischen Antikörperkonstrukte unter reduzierenden Bedingungen (R) und nicht-reduzierenden Bedingungen.

Alle Konstrukte migrieren entsprechend ihrem erwarteten berechneten Molekulargewicht (Abbildung 7). Daraus lässt sich schließen, dass sich keine Fragmente oder Aggregate gebildet haben, die die Funktionalität der Moleküle beeinträchtigen könnten. Die Reinheit der Antikörper wird durch die Daten aus der analytischen Größenausschlusschromatographie validiert (siehe Abbildung 8).

Ergebnisse

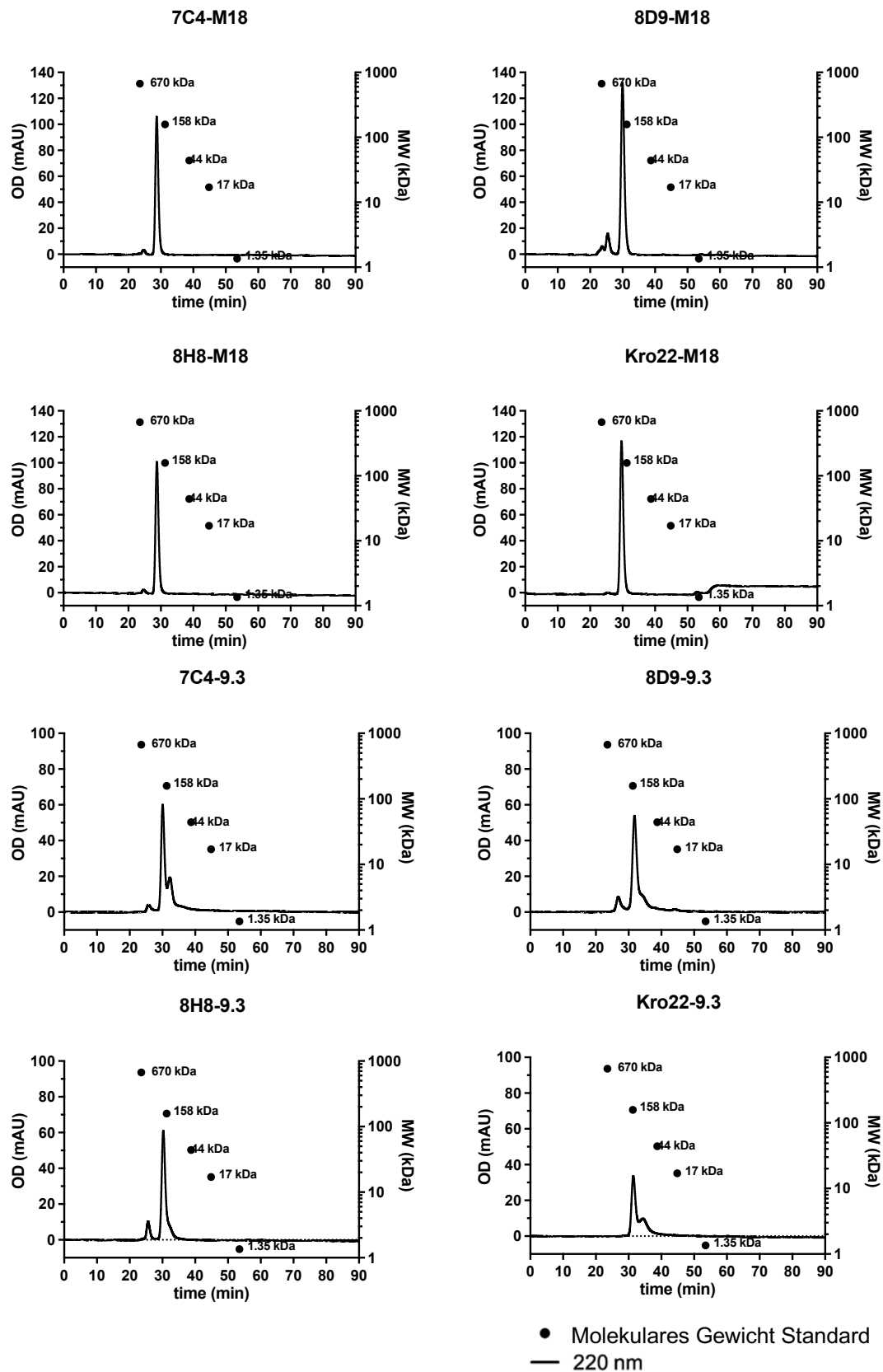


Abbildung 8: Analytische Größenausschlusschromatographie der Antikörperkonstrukte, um die Integrität des Moleküls unter nativen Bedingungen zu überprüfen.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Antikörperkonstrukte

3.3.1 Quantifizierung der Antigene auf den Zielzelllinien

Um die funktionelle Charakterisierung der Antikörperkonstrukte durchzuführen, ist es von entscheidender Bedeutung geeignete Zielzellen zu identifizieren, die die gesuchten tumorassoziierten Antigene exprimieren; in diesem Falle B7H3 und Endoglin. Zunächst begann die Recherche zu Zielzelllinien mit dem „human protein atlas“ (<https://www.proteinatlas.org/>). Durch die Suchfunktion des „cell atlas“ wurden drei Zielzelllinien bestimmt:

Tabelle 1: Übersicht der Zielzellen, die in dieser Doktorarbeit genutzt wurden.

Zelllinie	Abstammung	B7H3 Expression	Endoglin Expression
U937 (ATCC® No. CRL-1593.2™)	Histiozytäres Lymphom	+	+
HL-60 (ATCC® No. CCL-240™)	Akute myeloische Leukämie	-	+
K562 (ATCC® No. CCL-243™)	Chronische myeloische Leukämie in Blastenkriese	+	-

Laut der Literatur und wie in der Tabelle 1 zusammengefasst, exprimieren U937 sowohl B7H3, als auch Endoglin, während HL-60 nur für Endoglin positiv sind und K562 nur B7H3 exprimieren (Mathias *et al.*, 2015; Proteinatlas.org, 2021b, 2021a).

Um nun die Literatur zu validieren und die exakte Anzahl der auf der Oberfläche der Zielzellen exprimierten Zielantigene B7H3 und Endoglin zu bestimmen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung in der Durchflusszytometrie unter Verwendung von des QIFIKIT®s durchgeführt.

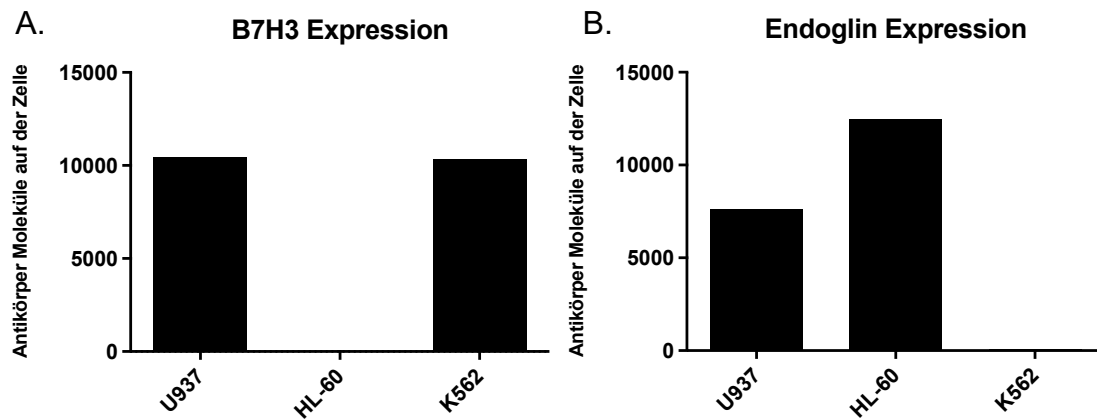


Abbildung 9: QIFIKIT®-Analyse der Antigenexpression auf den Zielzelllinien. A. Quantitative Bestimmung der B7H3-Expression auf der Zelloberfläche von U937, HL-60 und K562 Zellen. B. Quantitative Bestimmung der Endoglin-Expression auf der Zelloberfläche von U937, HL-60 und K562. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei experimentellen Duplikaten.

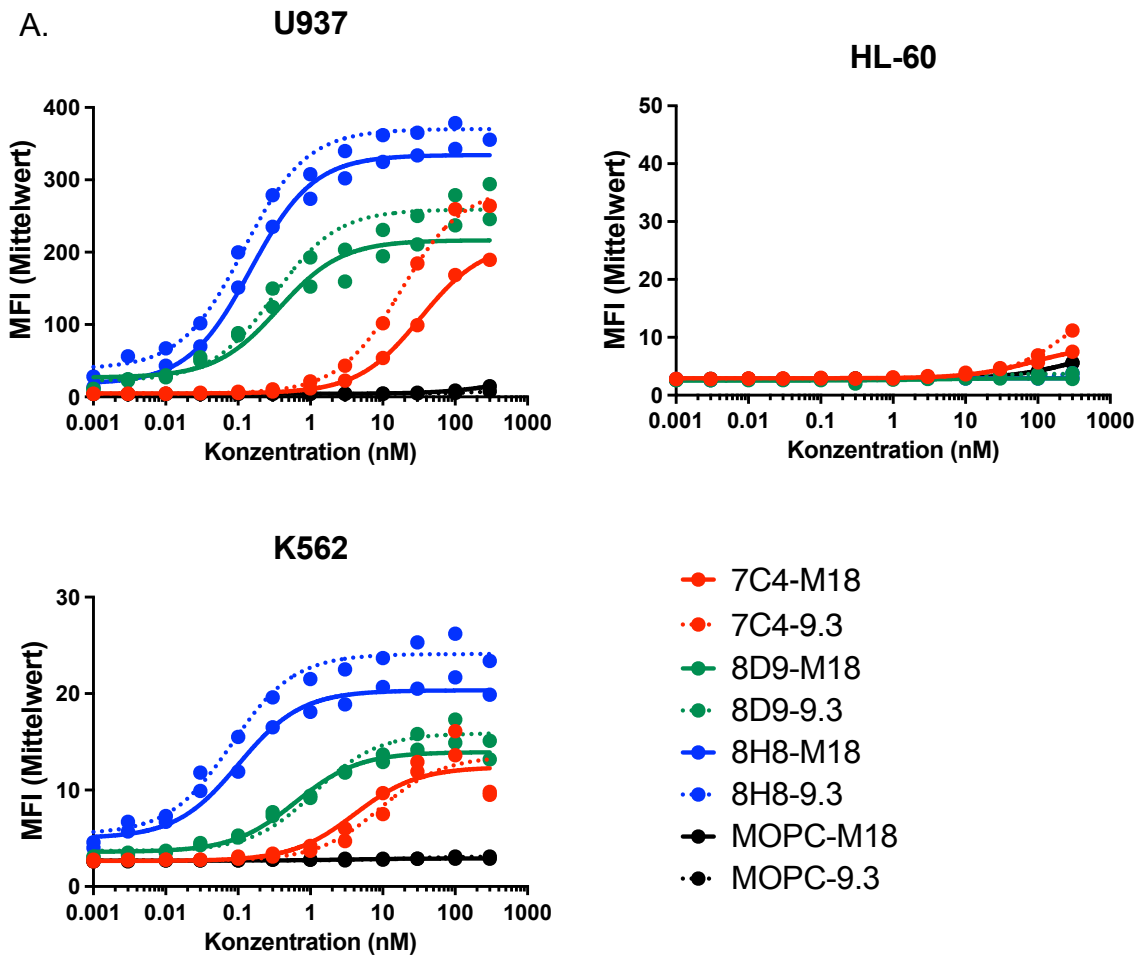
U937 (ATCC® CRL-1593.2™) ist eine lymphoide, myeloische Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit histiozytärem Lymphom (Sundström and Nilsson, 1976) gewonnen wurde. Diese Zelllinie wurde als Zielzelllinie für die folgenden funktionellen Assays ausgewählt, da U937 sowohl B7H3 als auch Endoglin in vergleichbarer Menge exprimiert (etwa 10.000 Moleküle pro Antigen, siehe Abbildung 9). HL-60 (ATCC® No. CCL-240™) ist eine Zelllinie, die aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau mit akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M2) generiert wurde (Collins, Gallo and Gallagher, 1977). Da HL-60 auch in diesem Experiment keine Expression von B7H3 gezeigt hat, aber jedoch für Endoglin (ca. 12500 Moleküle auf der Zelloberfläche, siehe Abbildung 9), wurde HL-60 ausgewählt um als Kontrolle in der funktionellen Charakterisierung für das Szenario 4 (zwei Antigene auf jeweils zwei verschiedenen Zielzellen, siehe Abbildung 4) zu fungieren. Dies gilt auch für K562, eine Zelllinie die aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) in Blastenkrise hergestellt wurde (Lozzio and Lozzio, 1975). Wie in Abbildung 9 dargestellt, exprimiert K562 eine mit U937 vergleichbare Anzahl von B7H3 auf der Zelloberfläche (ca. 10.000 Moleküle, siehe Abbildung 9) und ist damit eine geeignete Kontrollzelllinie für die funktionelle Charakterisierung der bispezifischen Antikörperkonstrukte. Zusammenfassend validieren die Ergebnisse der QIFIKIT®-Analyse die in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster.

3.3.2 FACS-Bindungsassay

Die FACS-basierten Bindungsassays wurden durchgeführt, um die Fähigkeit der Antikörperkonstrukte zu untersuchen, an ihre jeweiligen Antigene auf der Zelloberfläche der Ziel- und Effektorzellen zu binden: B7H3 und Endoglin als Tumorantigene und CD3 und CD28 als Aktivierungsmoleküle. Zusätzlich wurde durch die Analyse der Bindungskurven der verschiedenen Antikörper der EC_{50} -Wert mit Hilfe von GraphPad Prism Version 9 bestimmt.

3.3.2.1 B7H3 Bindung

Wie bereits in der Einleitung der Ergebnisse beschrieben, binden die verschiedenen Klone der B7H3 bispezifischen Antikörper an verschiedene Epitope innerhalb des B7H3-Moleküls. Der Klon 8H8, als auch der Klon 8D9 binden in der Peripherie, während 7C4 ein Epitop besetzt das nahe an der Zellmembran liegt (siehe Abbildung 5). In der Bindungskinetik zeigt 7C4 eine langsame Assoziations- und Dissoziationszeit. 8H8 und 8D9 hingegen zeigen eine Bindungskinetik mit schneller Assoziation. Zudem zeigt 8H8 eine langsame Dissoziationszeit, während 8D9 schneller von seiner Bindungsstelle dissoziiert (Zekri, Daten nicht publiziert). Außerdem unterscheiden sich die BiRecs in ihrem Format von den BiCos. Wie in Abbildung 6 aufgeführt, sind die CD3-spezifischen BiRecs im sogenannten HC-L gebaut, während die CD28-spezifischen BiCos im LC+L Format vorliegen. Dies sollte jedoch nicht die Bindungsfähigkeit der Antikörper zum Zielantigen B7H3 beeinflussen. Der Klon MOPC wird als nicht-reaktive Isotypkontrolle hinzugezogen. Eine durchflusszytometrische Analyse der B7H3-Bindungsaffinität wurde an den Zielzellen U937, HL-60 und K562 durchgeführt (siehe Abbildung 10). Diese Zelllinien wurden entsprechend ihrem B7H3-Expressionsniveau ausgewählt (siehe Abbildung 9).



B.

EC ₅₀ [nM]	U937	HL-60	K562
7C4-M18	33,31	N.k.	4,12
7C4-9.3	17,94	N.k.	9,16
8D9-M18	0,36	N.k.	0,63
8D9-9.3	0,32	N.k.	1,15
8H8-M18	0,15	N.k.	0,1
8H8-9.3	0,12	N.k.	0,08
MOPC-M18	N.k.	N.k.	N.k.
MOPC-9.3	N.k.	N.k.	N.k.

Abbildung 10: FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC₅₀ für alle B7H3-spezifischen Konstrukte auf verschiedenen Zielzelllinien mit verschiedener B7H3-Expression. A. Antikörperbindungskurven mit verschiedenen Zelllinien, die unterschiedliche Mengen von B7H3 exprimieren. B. EC₅₀ in nM der B7H3-spezifischen bispezifischen Antikörper. Die gezeigten Ergebnisse entstammen einem exemplarischen Experiment.

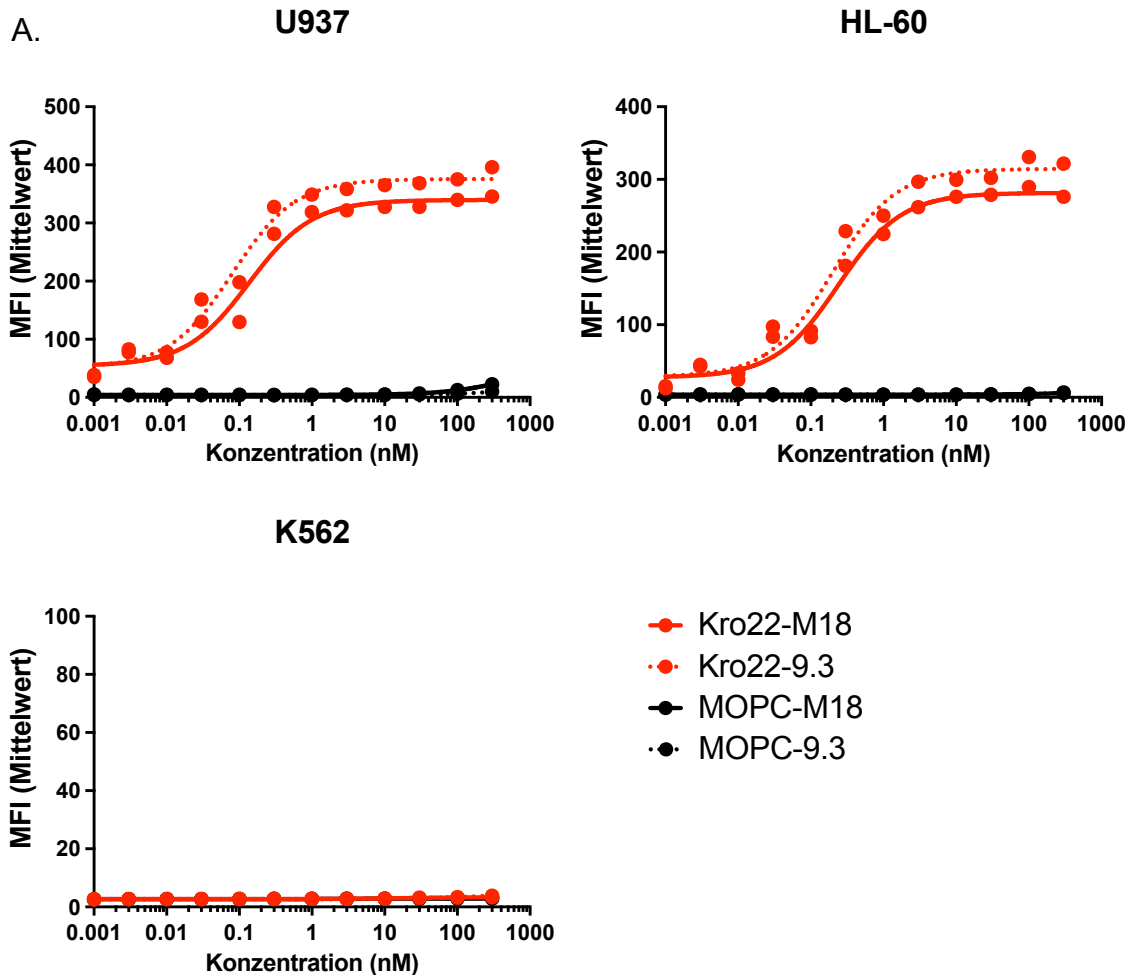
Die FACS-Analyse der Titrationskurve zeigt den niedrigsten EC_{50} -Wert für die B7H3-Bindung beim 8H8-CD28-Konstrukt an (0,08 nM auf K562, siehe Abbildung 10). Ein ähnlicher EC_{50} -Wert kann ebenfalls auf den U937 Zellen gemessen werden. Obwohl der Unterschied in den EC_{50} -Werten zwischen dem 8H8-BiCo und 8H8-BiRec sehr klein ist, ist zu beobachten, dass der BiRec stets einen höheren EC_{50} -Wert aufweist. Die 8D9-Konstrukte zeigen eine ähnliche Affinität für B7H3 in ihren EC_{50} -Werten. Betrachtet man aber die Titrationskurven in Abbildung 10, aus denen die EC_{50} -Werte hervorgehen, so besteht hier aber kein nennenswerter Unterschied in der Affinität bei den CD3- und CD28 Konstrukten mit dem Klon 8D9. Die Konstrukte mit dem Klon 7C4 zeigen eine deutlich niedrigere Affinität zu B7H3 mit einem EC_{50} -Höchstwert von 7C4-M18 auf U937 von 33,31 nM (siehe Abbildung 10). Interessanter Weise zeigt das gleiche Konstrukt auf den K562 Zellen eine deutlich höhere Affinität zu B7H3 mit einem EC_{50} -Wert von 4,12 nM. Die Nulllinie, die sich bei der Titration auf den HL-60 Zellen zeigt, korreliert mit der fehlenden B7H3-Expression (siehe Abbildung 9). Der hier anscheinende Anstieg in den hohen Konzentrationen ist als unspezifisch zu werten.

3.3.2.2 Endoglin Bindung

Die Endoglin BiCos und BiRecs basieren auf demselben IgG-Molekül, dem Klon Kro22. Wie bereits erklärt, befinden sich die BiRecs im HL-L Format und während die BiCos im LC+L Format konstruiert sind, was jedoch die Affinität zu Endoglin nicht beeinflussen sollte. Der Klon MOPC wird als nicht-reaktive Isotypkontrolle hinzugezogen. Die Titration wurde auf U937, HL-60 und K562 Zellen durchgeführt, da sie Endoglin in unterschiedlichen Mengen exprimieren (siehe Abbildung 9).

Die EC_{50} -Werte der Kro22-Konstrukte unterscheiden sich gering zwischen den Zielzellen U937 und HL-60, was sich auf die ähnliche Expression von Endoglin zurückführen lässt (siehe Abbildung 9). Wie bereits bei der B7H3-Bindung beobachtet (3.2.2.1), zeigen die BiCos im LC+L Format leicht niedrigere EC_{50} -Werte im Vergleich zu den BiRecs im HC-L Format. Die Nulllinie, die sich bei der

Titration auf den K562 Zellen zeigt, korreliert mit der fehlenden Endoglin-Expression der Zelllinie (siehe Abbildung 9).



B.

EC ₅₀ [nM]	U937	HL-60	K562
Kro22-M18	0,14	0,23	N.k.
Kro22-9.3	0,08	0,2	N.k.
MOPC-M18	N.k.	N.k.	N.k.
MOPC-9.3	N.k.	N.k.	N.k.

Abbildung 11: FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC₅₀ für alle Endoglin-spezifischen Konstrukte auf verschiedenen Zielzelllinien mit verschiedener Endoglin-Expression. A. Antikörperbindungskurven mit verschiedenen Zelllinien, die unterschiedliche Mengen von Endoglin exprimieren. B. EC₅₀ in nM der Endoglin-spezifischen bispezifischen Antikörper. Die gezeigten Ergebnisse entstammen einem exemplarischen Experiment.

3.3.2.3 CD3-Bindung

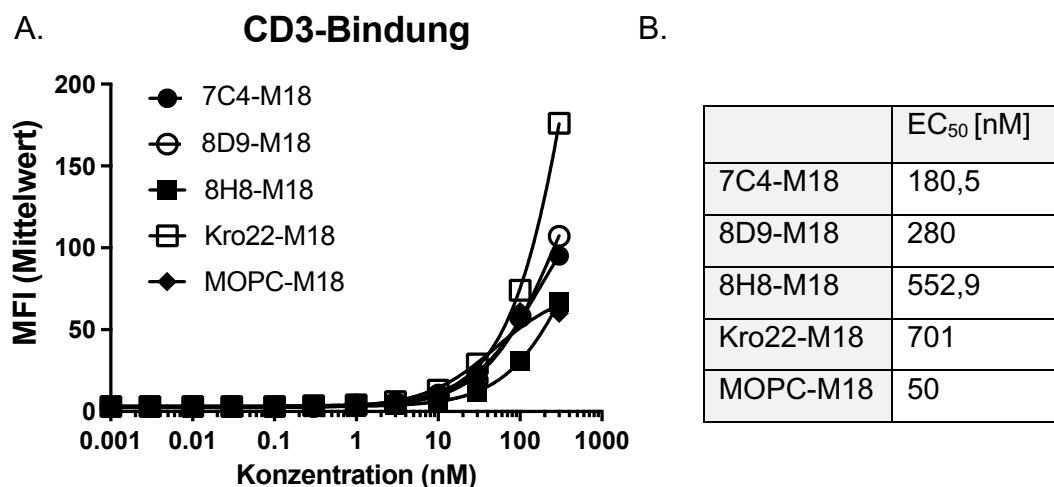


Abbildung 12: FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC₅₀ für alle CD3-spezifischen Konstrukte auf Jurkat-Zellen. A. Antikörperbindungskurven aller BiRecs auf Jurkat-Zellen. B. EC₅₀ in nM der BiRecs. Die gezeigten Ergebnisse entstammen einem exemplarischen Experiment.

Die Antikörpertitration wurde auf Jurkat Zellen durchgeführt. Jurkat-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie menschlicher T-Lymphozyten, die ursprünglich aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie stammt (Schneider, Schwenk and Bornkamm, 1977). Als T-Zelllinie exprimieren sie typische T-Zellmarker, sowie CD3 und CD28 und eignen sich somit zur Untersuchung der CD3 und CD28 Affinität der hier genutzten Antikörperkonstrukte.

Wie bereits in 3.1.1 und Abbildung 6 beschrieben, besitzen alle BiRecs das gleiche IgG-ScFv-Format, sowie die gleiche anti-CD3 single chain die von einem UCHT1 Derivat stammt. Somit ist keine auffallende Diskrepanz in der CD3-Affinität der Antikörperkonstrukte zu erwarten. Dies wird auch durch die durchflusszytometrische Analyse der CD3-Bindungsaffinitäten auf der Jurkat Zelllinie bestätigt (Abbildung 12). Auf Grund der geringen Affinität des UCHT1 Derivats zu CD3 im Vergleich zum parenteralen UCHT1 Antikörper (Zekri, Daten unveröffentlicht), wird kein Plateau in den Bindungskurven erreicht. Der hier berechnete EC₅₀-Wert ist numerisch nicht korrekt, sondern ist als ein fiktiver Wert

anzusehen, der aussagt, dass die Bindungsaffinitäten der hier titrierten BiRecs zu CD3 sehr gering sind.

3.3.2.4 CD28-Bindung

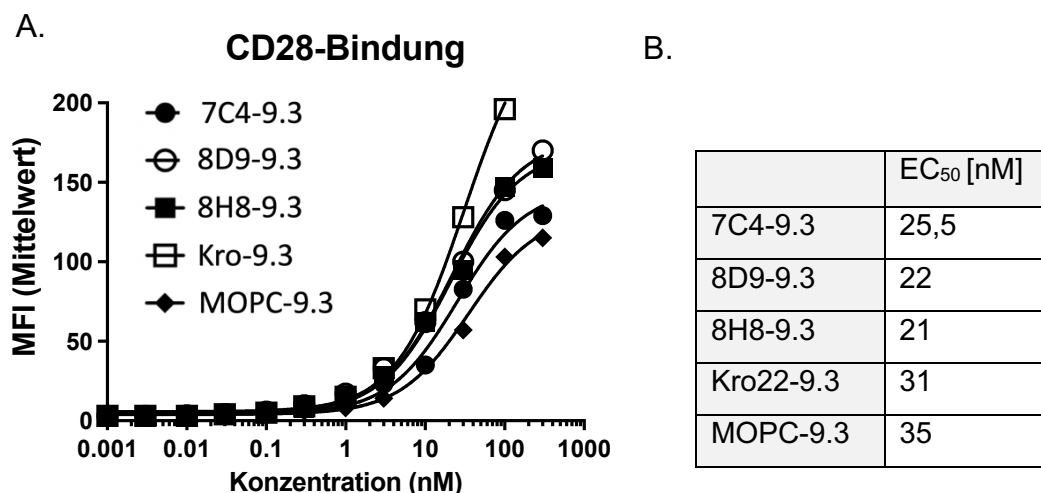


Abbildung 13: FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC₅₀ für alle CD28-spezifischen Konstrukte auf Jurkat-Zellen. A. Antikörperbindungskurven aller BiCos auf Jurkat-Zellen. B. EC₅₀ in nM der CD28-spezifischen bispezifischen Antikörper. Die gezeigten Ergebnisse entstammen einem exemplarischen Experiment.

Alle BiCos sind im gleichen Format, dem IgG-ScFv-Format, konstruiert. Zudem beinhalten sie die gleiche anti-CD28 single chain die vom parenteralen anti-CD28 Antikörperklon 9.3 stammt. Somit sind auch keine auffallenden Unterschiede in der CD28-Affinität der Antikörperkonstrukte zu erwarten. Dies wird auch durch die Analyse der CD28-Bindungskurven auf der Jurkat Zelllinie bestätigt. MOPC-9.3 zeigt mit 35 nM den höchsten EC₅₀-Wert, während 8H8-9.3 den niedrigsten EC₅₀-Wert mit 21 nM zeigt.

3.3.3 Thymidin-Incorporations-Assay – T-Zellproliferation

Um die Proliferation von T-Zellen, die mit den bispezifischen Antikörperkonstrukten in Gegenwart von Tumorzellen stimuliert werden zu untersuchen, wurden Thymidin-Inkorporations-Assays durchgeführt. Um nun die Antikörperkonzentrationen zu bestimmen, die zum höchsten Anstieg von der Grundstimulation durch die BiRecs zur Zielstimulation mit zusätzlichem BiCos führt, wurden Titrations vom BiRec 7C4-M18 mit verschiedenen BiCos durchgeführt (siehe Abbildung 13 und 14). Anschließend wurden die in Abbildung 4 beschriebenen Kombinationsszenarios der Zielantigene für die bsAb im Thymidin-Inkorporations-Assay untersucht, d.h.:

1. Sowohl BiRec als auch BiCo sind gegen ein und dasselbe Antigen und Epitop gerichtet.
2. BiRec und Bico sind gegen dasselbe Antigen gerichtet, jedoch binden sie an zwei unterschiedlichen Epitope des Moleküls.
3. BiRec und BiCo sind gegen zwei verschiedene Antigene gerichtet, die auf derselben Zelle exprimiert werden.
4. BiRec und BiCo richten sich gegen zwei verschiedene Antigene, die auf jeweils einer von zwei verschiedenen Zellen exprimiert sind.

Es wurden monozytendepletierte PBMCs als Effektorzellen genutzt, da Monozyten nach Adhäsion an Kunststoff B7H3 exprimieren. Dies führt zu unerwünschten Off-Target-Effekten in diesem experimentellen Aufbau. Im peripheren Blut, als auch nach kürzlicher Isolation der PBMCs, weisen Monozyten keine Expression von B7H3 auf. Da in diesem experimentellen Setup Monozyten keine Rolle in der Aktivierung und Zytotoxizität von T-Zellen spielen, können diese ohne einen Nachteil in der Funktion der T-Zellen depletiert werden. Als Positivkontrolle wird Phytohämagglutinin (PHA) genutzt, was ein selektives T-Zell-Mitogen ist. Als Isotypkontrolle werden auf MOPC basierte BiRecs und BiCos eingesetzt. Diese Experimente wurden mit durch Strahlung inaktivierte U937, HL-60 und K562 Zellen durchgeführt, die unterschiedliche Mengen von

B7H3 und Endoglin exprimieren, wie in Abbildung 9 dargestellt. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T Ratio) betrug 4:1, wenn nicht anders beschrieben.

3.3.3.1 Titration zur Konzentrationsfindung der Antikörperkonstrukte

Die hier gezeigte exemplarische Titration validiert Ergebnisse der Vorarbeiten (Engel, 2020) und bestätigt, dass die proliferative Wirkung von 7C4-M18 auf T-Zellen stark von der synergistischen Wirkung der BiCos profitiert. Die Kombination von 7C4-M18 mit BiCos, die sich gegen andere Epitope auf dem B7H3-Molekül richten (siehe Abbildung 4 und 5), zeigt eine gesteigerte T-Zellproliferation, während bei der Kombination von 7C4-M18 mit dem BiCo 7C4-9.3, welcher gegen das gleiche Epitop gerichtet ist, der CD28-Effekt in hohen Antikörperkonzentrationen sich zwar auch beobachten lässt, dieser jedoch beachtlich geringer ausfällt. In diesem Experiment zeigt sich bereits ein maximaler CD28-Effekt auf die T-Zellproliferation bei einer Konzentration von 100 ng/ml der anti-B7H3-BiCos. In den folgenden Experimenten wurde eine BiCo-Konzentration von 400 ng/ml gewählt, um sicher bei einem maximalen CD28-Effekt zu bleiben.

Die Zusammenfassung von drei gesunden PBMC-Spendern in Abbildung 15 zeigt, dass eine 7C4-M18 Konzentration von bereits 10 ng/ml in Kombination mit 400ng/ml B7H3-BiCos eine ausreichende Abhebung des CD28-Effektes von der Grundaktivität des BiRecs 7C4-M18 erreicht. Das Verhältnis vom zusätzlichen CD28-Effekt zur BiRec-Grundaktivität $\left(\frac{\text{Counts CD28-Effekt } (400 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \text{ BiCo} + \text{BiRec})}{\text{Counts Grundaktivität } (400 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \text{ BiCo})} \right)$ liegt bei der Kombination von 7C4-M18 und 8D9- und 8H8-9.3 bei 10 ng/ml CD3-Konstrukt bei über 4, während die Kombination von 7C4-M18 und 7C4-9.3 nur einen maximales Verhältnis von 2,8 erreicht. Demnach werden für Experimente mit Einzelkonzentrationen, die Konzentrationen für BiRecs mit 10 ng/ml und BiCos mit 400 ng/ml festgesetzt, um die Aktivität der verschiedenen BiCos in Kombination mit den BiRecs zu veranschaulichen.

Ergebnisse

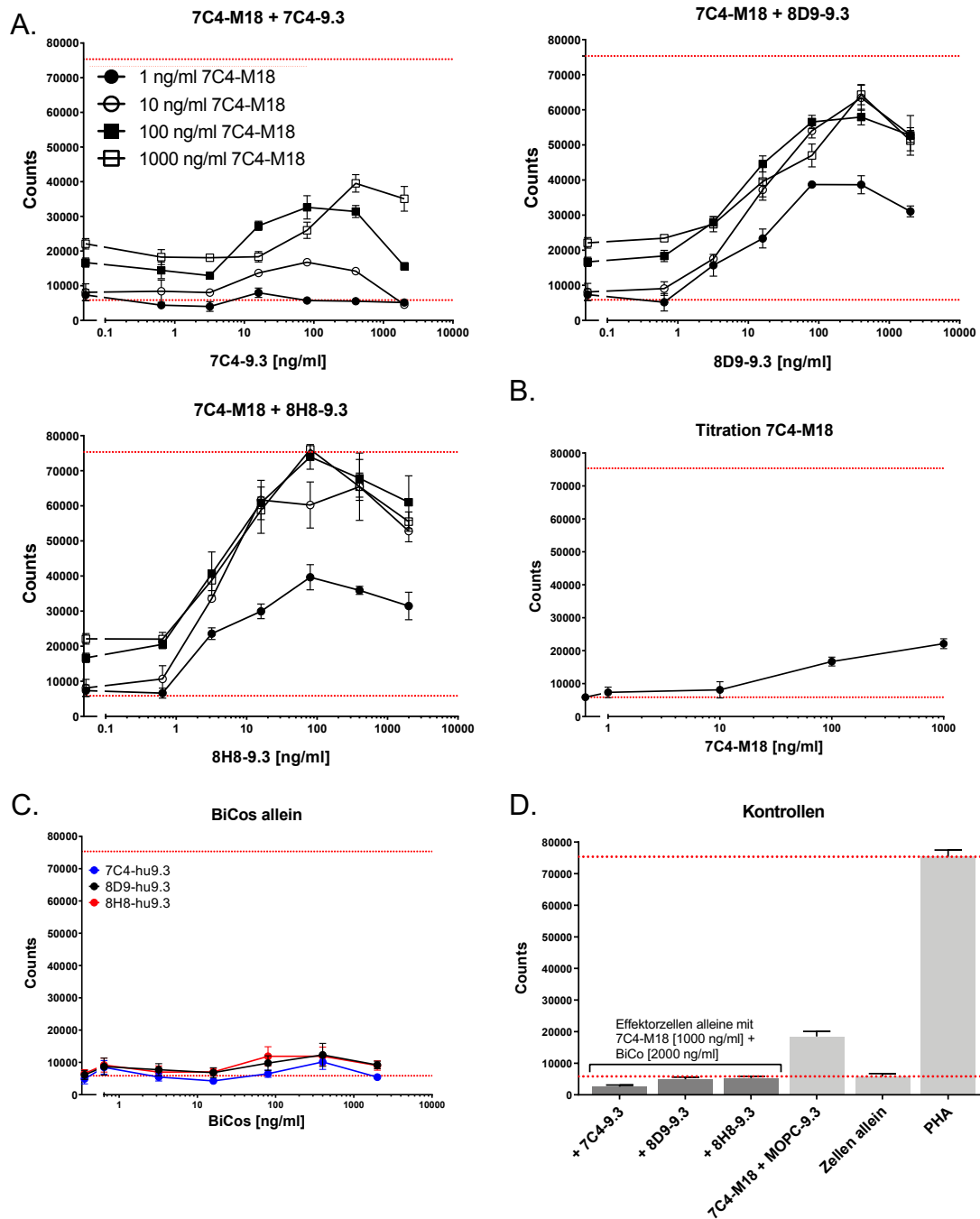
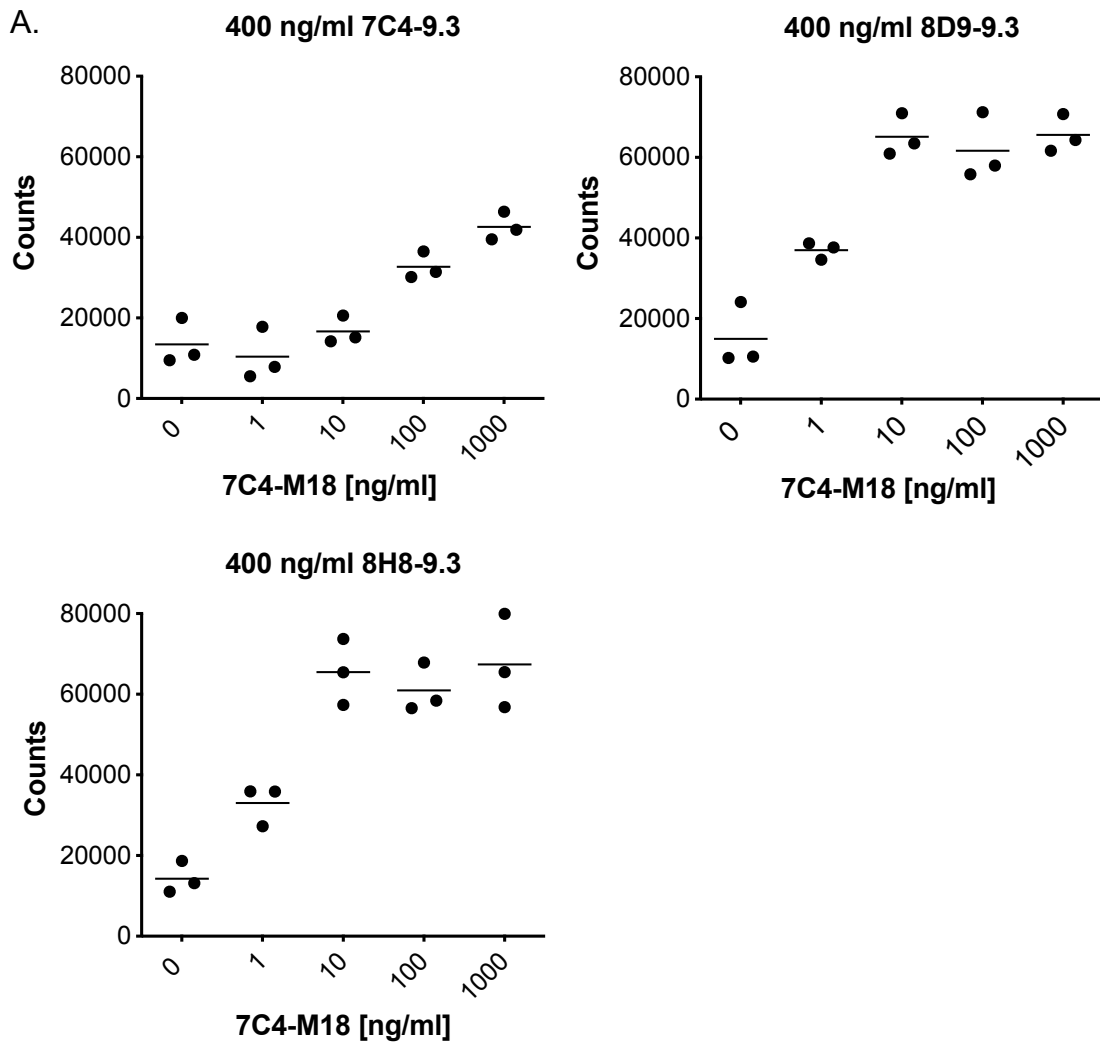


Abbildung 14: Exemplarischer Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der B7H3-BiRecs mit Titration der B7H3-BiCos auf inaktivierten U937, um die Antikörperkonzentrationen für die folgenden Assays zu ermitteln. A. Titration der B7H3-BiRecs und -BiCos. Die untere rote Linie zeigt den Signalhintergrund an, der nur durch Effektor- und Zielzellen verursacht wird. Die obere rote Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. B. Titration des BiRecs 7C4-M18 allein. C. Titration der B7H3-BiCos allein. D. Kontrollen des Thymidin-Inkorporations-Assays. Positivkontrolle (PHA) und Negativkontrolle (nur Ziel- und Effektorzellen) im Vergleich zu nur Effektorzellen behandelt mit der höchsten Konzentration der beiden Antikörper in Kombination. Die abgebildeten Daten sind als Mittelwerte \pm SD von experimentellen Triplets dargestellt.



B.

Verhältnis von CD28-Effekt zur Grundstimulation durch das CD3-Konstrukt

7C4-M18	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
+ 7C4-9.3	0,7	1,1	2,2	2,8
+ 8D9-9.3	2,5	4,4	4,1	4,4
+ 8H8-9.3	2,2	4,4	4,1	4,5

Abbildung 15: Übersicht der BiRec Titrations (3 verschiedene PBMC-Spender) in Kombination mit den BiCos auf inaktivierten U937 und das zugehörige Verhältnis von CD28-Effekt zur Grundstimulation durch das CD3-Konstrukt. A. Direkter Vergleich der BiCos in fixer Konzentration (400 ng/ml) mit den 7C4-M18 Titrations. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten, jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus einem experimentellen Triplet an. B. Verhältnis von CD28-Effekt zur Grundstimulation durch die verschiedenen 7C4-M18 Konzentrationen. Grau hinterlegt sind die Kombinationen, die einen Verhältnis von über 4 erreichen.

3.3.3.2 Vergleich selbes Epitop vs. zwei Epitope auf Zielantigen

Wie bereits in der Abbildung 14 und 15 zu sehen, zeigt die Titration von 7C4-M18 mit 7C4-9.3 in hohen Konzentrationen (100-1000 ng/ml BiRec) eine Steigerung der T-Zellproliferation im Vergleich zu der Titration von 7C4-M18 allein. Ist das BiCo gegen ein anderes Epitop auf dem B7H3-Molekül gerichtet (siehe Übersicht in Abbildung 4), so ist ein CD28-Nutzen bereits bei niedrigeren Konzentrationen von BiRec (10 ng/ml) in der T-Zellproliferation beobachtbar. Ähnliches ist in der Titration von 8D9-M18 in Abbildung 16 zu sehen: Kombiniert man 8D9-M18 mit BiCos, die gegen dasselbe Epitop bzw. ein Epitop in der Nähe der Bindungsstelle des 8D9-Klons gerichtet sind, so ist der Zugewinn in der Proliferation der T-Zellen durch die Zugabe der BiCos bei BiRec-Konzentrationen von 10 ng/ml vergleichsweise klein, während 7C4-9.3 (bindet in der Peripherie des B7H3-Moleküls, siehe Abbildung 5) zu einem beachtlichen Anstieg führt. Betrachtet man nun Abbildung 17, die die Proliferation von vier verschiedenen PBMC-Spendern zusammengefasst, zeigt die statistische Analyse, dass die Kombination von 8D9-M18 (10 ng/ml) und 7C4-9.3 (400 ng/ml) zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation gegenüber dem BiRec allein führt, während dies in den restlichen Kombinationen nicht der Fall ist.

Interessanter Weise zeigt sich in Abbildung 16 als auch 17, dass 8H8-M18 kombiniert mit allen B7H3-BiCos einen signifikanten Proliferationsanstieg, im Vergleich zum 8H8-M18 allein provoziert. Das Muster, dass Antikörperkombinationen mit niedrigen BiRec Konzentrationen, die dasselbe oder ein Epitop in unmittelbarer Nähe binden, zu keinen signifikanten Anstieg der T-Zellproliferation im Vergleich zum CD3-Konstrukt allein führen, scheint auf das Konstrukt 8H8-M18 nicht zuzutreffen.

Ergebnisse

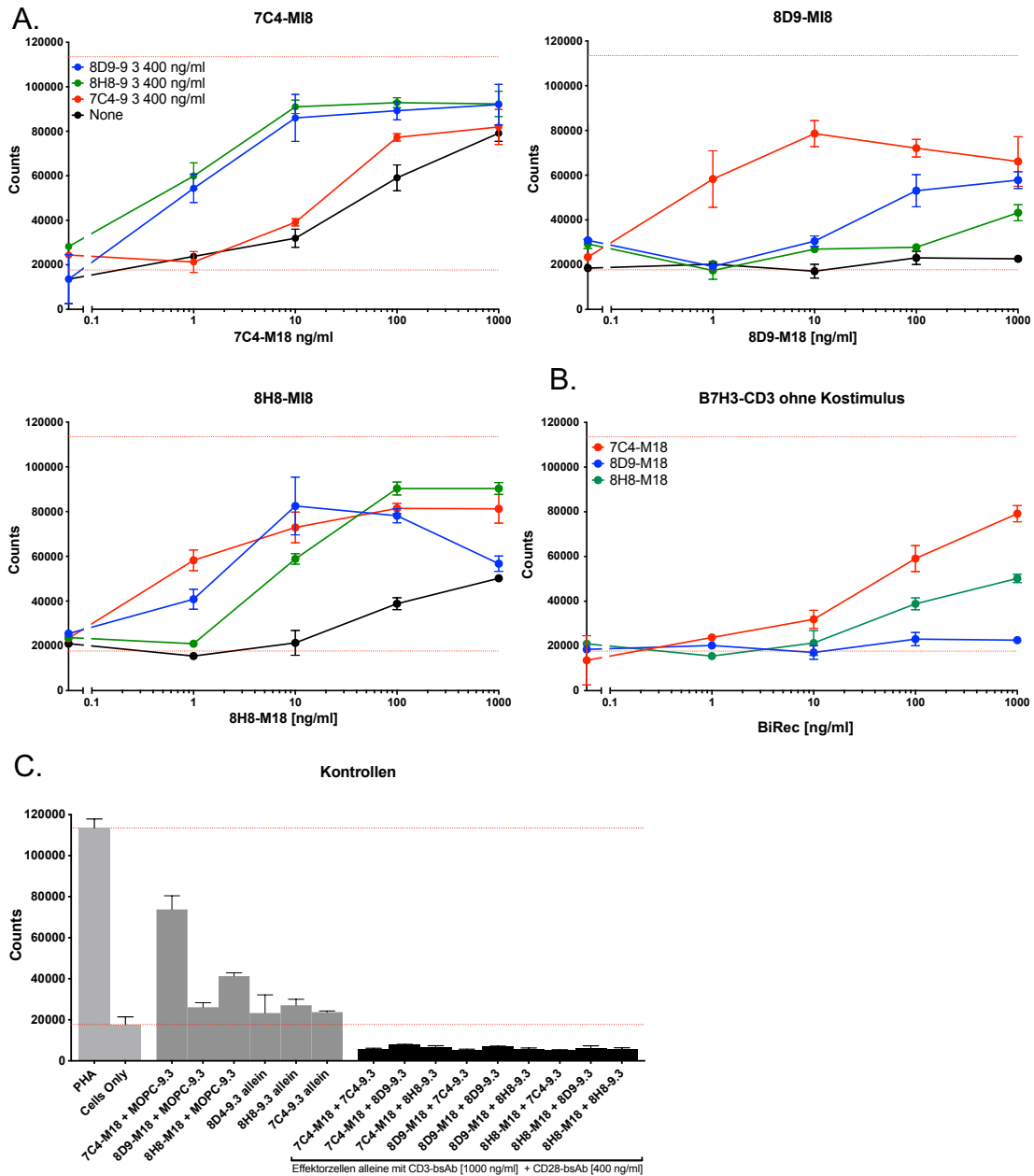


Abbildung 16: Exemplarischer Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der B7H3-BiRecs mit B7H3-BiCos auf inaktivierten U937, um antikörpervermittelte proliferative Effekte auf T-Zellen zu untersuchen. A. Titration der BiRecs, die sich gegen verschiedene Epitope auf dem B7H3 Molekül richten in Kombination mit BiCos, die auf denselben B7H3-Klonen basieren. Die untere rote Linie zeigt den Signalhintergrund an, der nur durch Effektor- und Zielzellen verursacht wird. Die obere rote Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. B. Titration der BiRecs allein. C. Kontrollen des Thymidin-Inkorporations-Assays. Positivkontrolle (PHA) und Negativkontrolle (nur Ziel- und Effektorzellen) im Vergleich zu Effektorzellen behandelt mit der höchsten Konzentration der beiden Antikörper in Kombination, um nicht zielgerichtete proliferative Effekte auszuschließen. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus einem exemplarischen Experiment, die abgebildeten Daten sind als Mittelwerte \pm SD von experimentellen Triplets dargestellt.

Ergebnisse

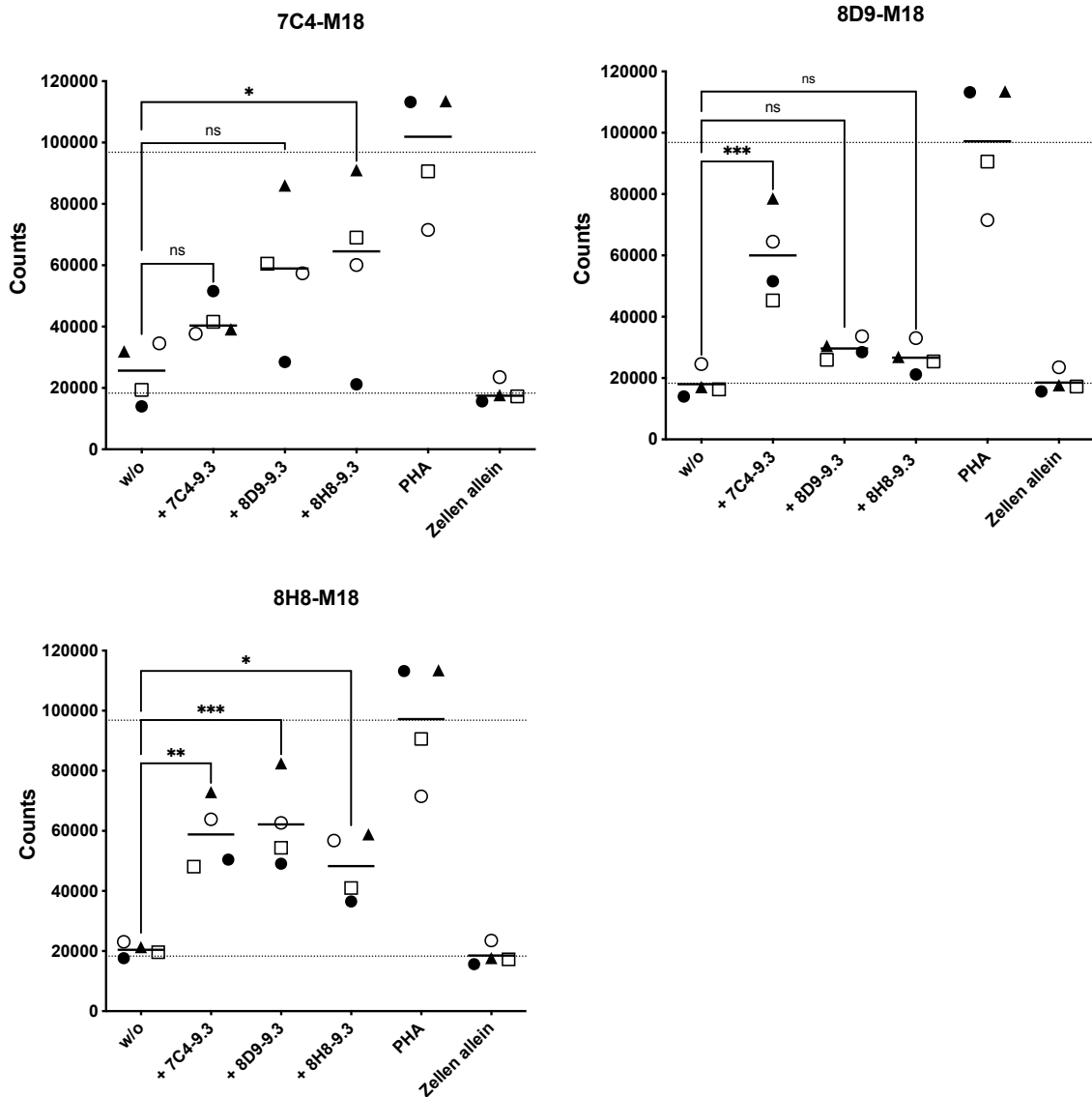


Abbildung 17: Übersicht aller Thymidin-Inkorporations-Assays (4 verschiedene PBMC-Spender) im direkten Vergleich der B7H3-BiRecs (10 ng/ml) in Kombination mit den B7H3-BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Experimenten, jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert eines experimentellen Triplets. Um die Daten den Spendenden zuordnen zu können, symbolisiert jede Form jeweils einen Spender. Die untere gestrichelte Linie zeigt den Signalhintergrund an, der nur durch Effektor- und Zielzellen verursacht wird. Die obere gestrichelte Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. Die statistische Analyse wurde mittels „ordinary one-way ANOVA“ in GraphPad Prism Version 9 durchgeführt.

3.3.3.3 Vergleich zwei Zielantigene vs. ein Zielantigen auf einer Zielzelle

Nachdem die Szenarien 1 und 2 (siehe Abbildung 4) in 3.3.3.2 im Thymidin-Inkorporations-Assay untersucht und miteinander verglichen wurden, wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss der Zielantigenwahl im Szenario 3 (siehe Abbildung 4) auf die T-Zellproliferation analysiert. Hier binden BiRecs und BiCos an jeweils ein unterschiedliches Zielantigen auf einer Zielzelle. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.7), ist das zweite Antigen, das neben B7H3 in dieser Arbeit ausgewählt wurde, das Endoglin-Molekül, welches durch den Antikörperklon Kro22 gebunden wird. Die Zielzelle U937 exprimiert sowohl Endoglin als auch B7H3 (siehe Abbildung 9) und ist somit geeignet den Effekt der Kombination der Antikörperkonstrukte, die B7H3 und Endoglin binden, zu testen.

In der Abbildung 18 und 19 ist zunächst zu sehen, was bereits in den vorherigen Experimenten beobachtet werden konnte: BiCos, die dasselbe Epitop des Zielantigens des BiRecs binden, führen sowohl zu einem vergleichsweise kleineren proliferativen Zusatzeffekt in der Kombination als dass sie auch diesen Zusatzeffekt erst in höheren BiRec Konzentrationen zeigen (100-1000 ng/ml). BiCos, die aber ein weiter entferntes Epitop binden, führen zu einer signifikant gesteigerten Proliferation (siehe Abbildung 18) im Vergleich zum BiRec allein bei einer BiRec Konzentration von bereits 10 ng/ml.

Kombiniert man nun den B7H3-CD3 bispezifischen Antikörper 7C4-M18 mit dem Endoglin-BiCo Kro22-9.3, so beobachtet man eine gesteigerte Proliferation der Effektorzellen im Vergleich zum alleinigen Einsatz des BiRecs. Vertauscht man nun die Zielantigene auf dem CD3-Konstrukt mit dem CD28-Konstrukt (Endoglin-BiRec + B7H3-BiCo), so bestätigt man die vorherigen Beobachtungen: Der BiRec profitiert signifikant in der Effektorzellproliferation von der Kombination mit einem BiCo, das sich gegen ein anderes Zielantigen auf der Zelloberfläche derselben Zielzelle richtet. Jedoch gilt hier festzuhalten, dass der Endoglin-BiRec Kro22-M18 allein in der proliferativen Wirkung dem B7H3-BiRec 7C4-M18 unterlegen

ist (siehe Abbildung 18), obwohl man auf Grund der Antigenexpression (siehe Abbildung 9) annehmen müsste, dass es keinen Unterschied geben sollte. Dies kann damit erklärt werden, dass das Epitop des Klons 7C4 näher an der Zellmembran liegt als das des Klons Kro22 und damit zu einer engeren Quervernetzung von Tumor- und T-Zelle führt.

Ergebnisse

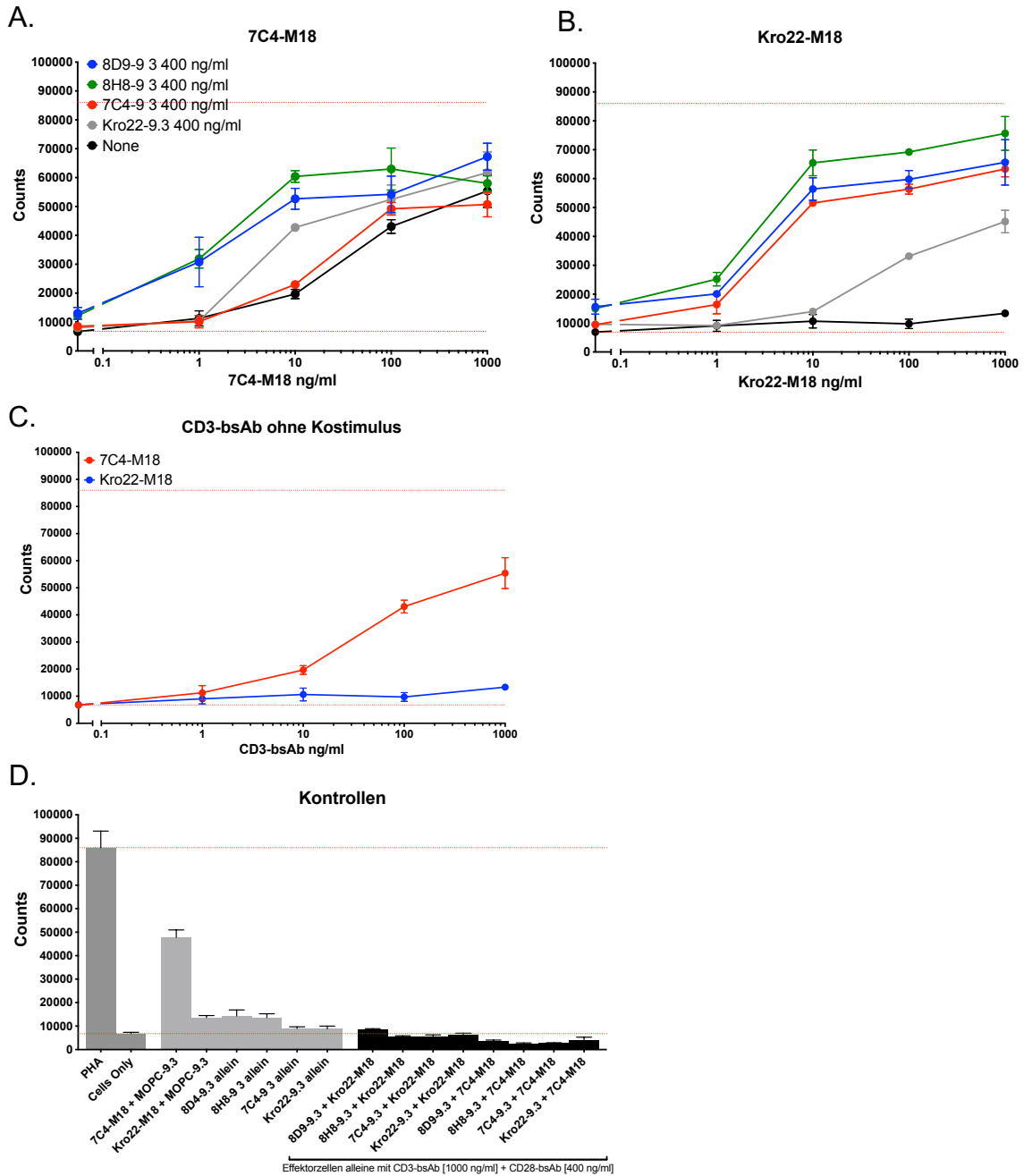


Abbildung 18: Exemplarischer Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der BiRecs mit BiCos die gegen zwei Zielantigene oder ein Zielantigen auf inaktivierten U937 gerichtet sind. A. Titration des BiRecs 7C4-M18, in Kombination mit den BiCos, die gegen verschiedene Epitope auf B7H3 oder Endoglin gerichtet sind. Die untere rote Linie zeigt den Signalhintergrund, der nur durch Effektor- und Zielzellen verursacht wird. Die obere rote Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. B. Titration des BiRecs Kro22-M18, in Kombination mit den BiCos, die gegen verschiedene Epitope auf B7H3 oder Endoglin gerichtet sind. C. Titration der BiRecs allein. D. Kontrollen des Thymidin-Inkorporations-Assay. Positivkontrolle (PHA) und Negativkontrolle (nur Ziel- und Effektorzellen) im Vergleich zu Effektorzellen allein, behandelt mit der höchsten Konzentration der beiden Antikörper, um nicht zielgerichtete Effekte auszuschließen. Die abgebildeten Daten sind als Mittelwerte \pm SD von experimentellen Triplets dargestellt.

Ergebnisse

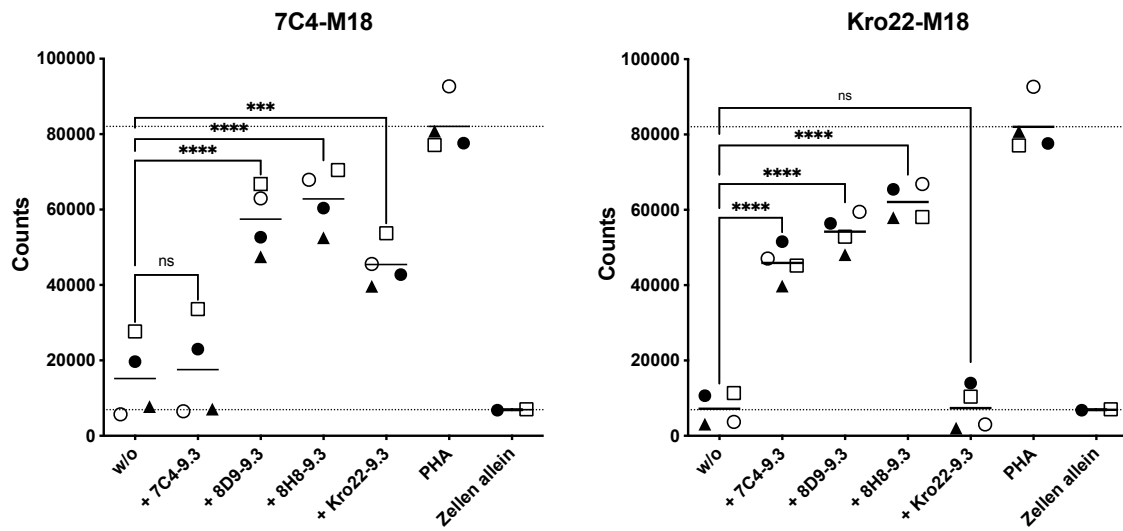


Abbildung 19: Übersicht aller Thymidin-Inkorporations-Assays (4 verschiedene PBMC-Spender) im direkten Vergleich der BiRecs (10 ng/ml) in Kombination mit den BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Experimenten, jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus einem experimentellen Triplet an. Um die Daten den Spendenden zuordnen können, symbolisiert jede Form jeweils einen Spender. Die untere gestrichelte Linie zeigt den Signalhintergrund an, die obere gestrichelte Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. Die statistische Analyse wurde mittels „ordinary one-way ANOVA“ in GraphPad Prism Version 9 durchgeführt.

3.3.3.4 Zwei verschiedene Zielantigene auf jeweils zwei verschiedenen Zielzellen

Nachdem sich die Antikörperkombinationen, die sich gegen zwei entfernten Epitope auf einem Zielantigen und/oder zwei gänzlich verschiedenen Zielmolekülen auf einer Zielzelle, am erfolgreichsten erwiesen haben (siehe Szenario 2 und 3 in Abbildung 4), wurde schließlich untersucht, ob sich ein proliferativer Vorteil herausstellt, wenn nun die beiden unterschiedlichen Zielantigene auf jeweils unterschiedlichen Zellen in der Nachbarschaft exprimiert werden (Szenario 4, siehe Abbildung 4). Da Tumore mit ihrer Umgebung mit zum Beispiel Tumorneovaskularisation und extrazellulärer Matrix eine außerordentlich heterogene Anhäufung von Zellen darstellen, postulieren wir, dass dieses Szenario 4 den Tumor und seine Umgebung im Patienten am meisten ähnelt.

In den Thymidin-Inkorporations-Assays, die die T-Zellproliferation im Szenario 4 untersuchen, wurden als Zielzellen eine 1:1 Mischung der Leukämiezellen HL-60 (Endoglin positiv, siehe Abbildung 9) und K562 (B7H3 positiv, Abbildung 9) eingesetzt. Die monozytendepletierten PBMCs wurden mit der Kombination vom B7H3-BiRec 7C4-M18 mit dem Endoglin-BiCo Kro22-9.3, als auch der Kombination Endoglin-BiRec Kro22-M18 mit dem B7H3-BiCo 7C4-9.3 stimuliert. Als Positivkontrolle wurde eine Titration auf der für B7H3 und Endoglin positiven Zielzelle U937 (siehe Abbildung 9) durchgeführt. Titrations auf den einfach positiven Zelllinien wurden als Negativkontrolle durchgeführt.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, hat sich auf dem Zellmix unerwarteterweise kein proliferativer Vorteil der Kombination im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem CD3-Konstrukt gezeigt. In Abbildung 21, in der die Wiederholungen des Experimentes mit vier verschiedenen PBMC-Spendern zusammengefasst wurden, zeigt sich auch kein signifikanter Effekt der Kombination in der Proliferation der T-Zellen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird das Szenario 4 in den FACS-basierten Assays, die die Efficacy der Antikörperkonstrukte testen, nicht weiter verfolgt.

Ergebnisse

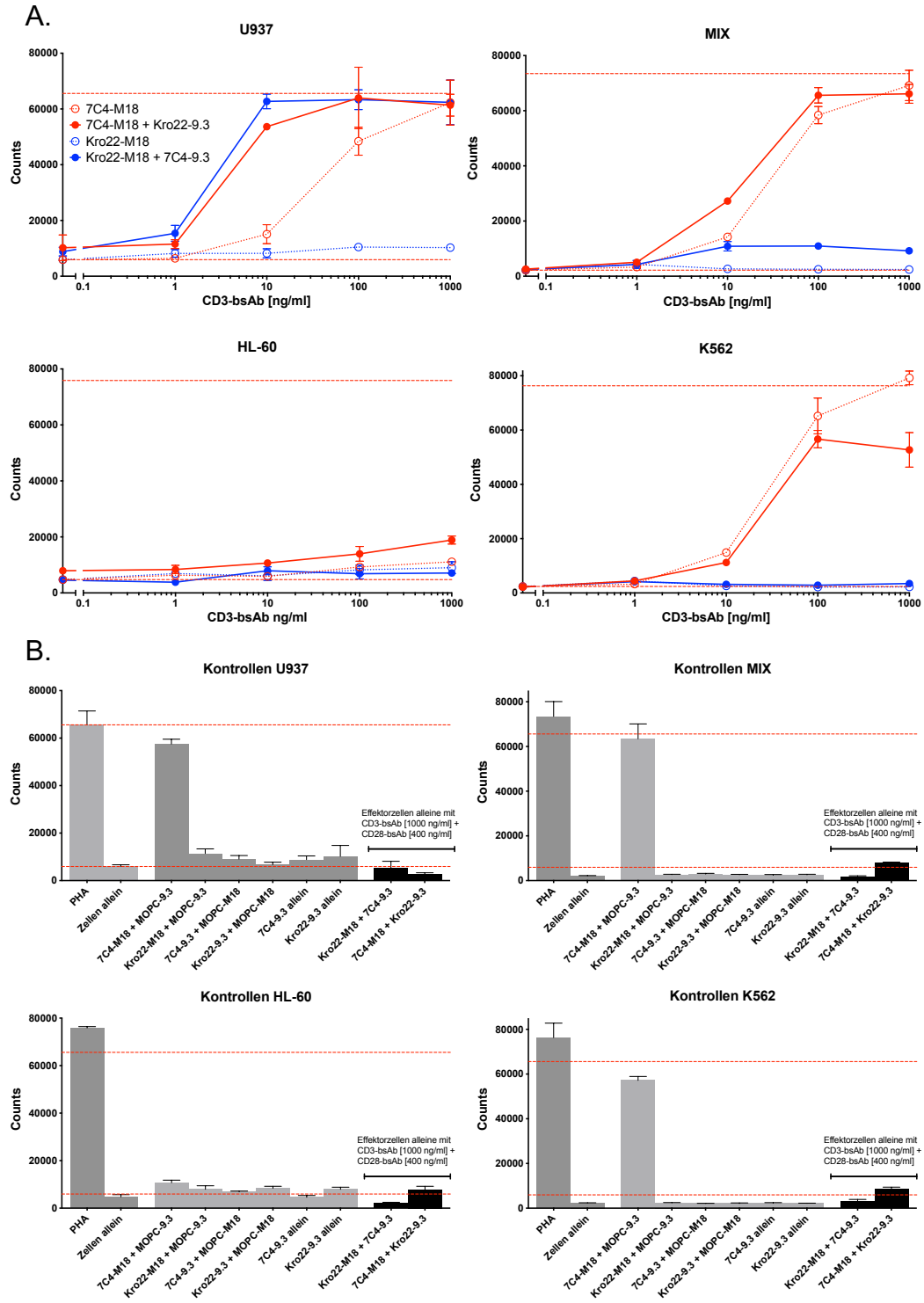


Abbildung 20: Exemplarischer Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der BiRecs mit und ohne BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937, HL-60, K562 und einem 1:1 Mix von HL-60 und K562 Zellen mit monozytendepletierten PBMC (E:T 2:1/ E:T 4:1 in den Kontrolltitrationen auf HL-60 und K562). Die untere rote Linie zeigt den Signalhintergrund an, die obere rote Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. C. Kontrollen des Thymidin-Inkorporations-Assays. Positivkontrolle (PHA) und Negativkontrolle (nur Ziel- und Effektorzellen) im Vergleich zu Effektorzellen alleine behandelt mit der höchsten Konzentration der beiden Antikörper in Kombination, um nicht zielgerichtete Effekte auszuschließen. Die abgebildeten Daten sind als Mittelwerte \pm SD von experimentellen Triplets dargestellt.

Ergebnisse

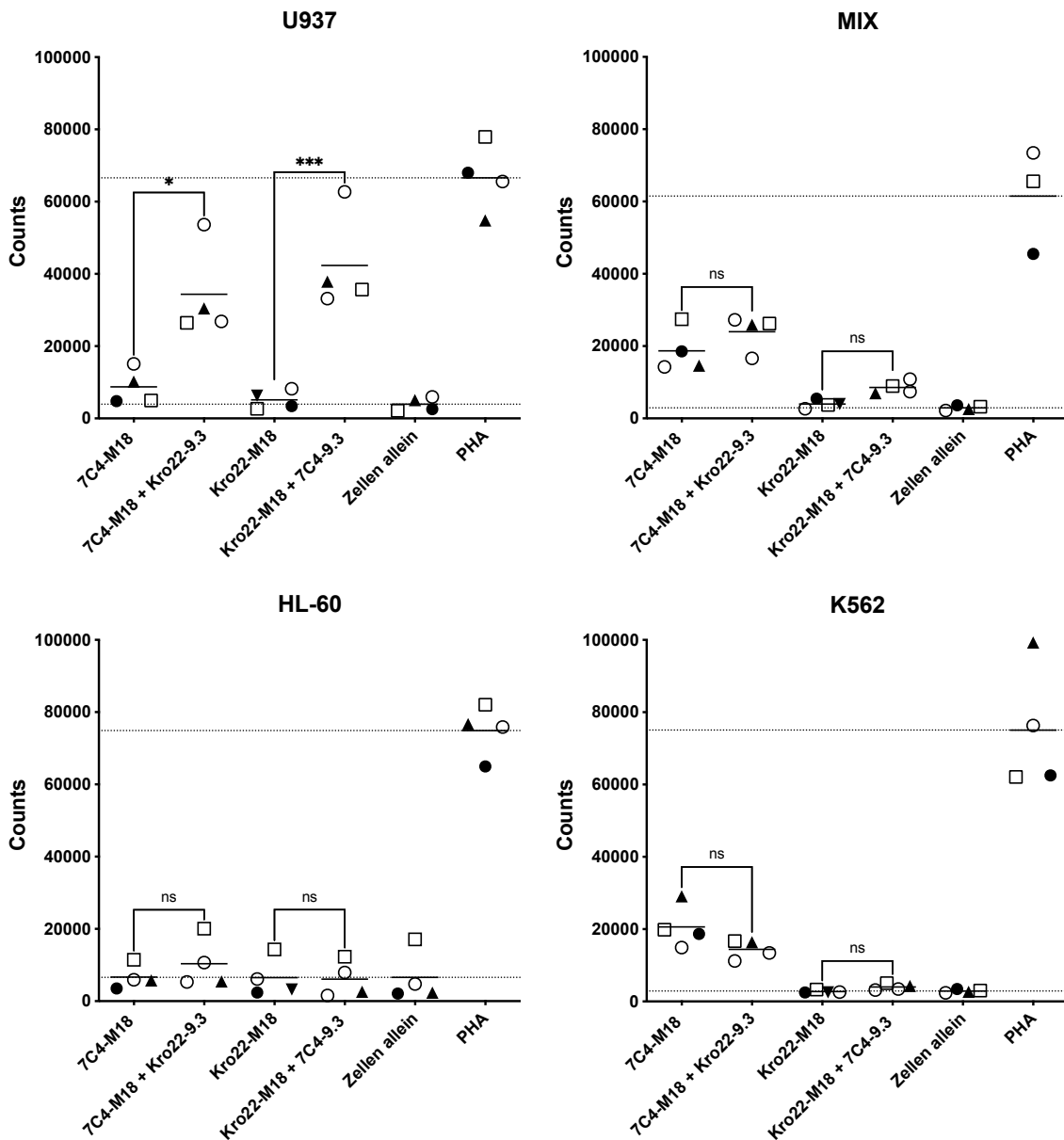


Abbildung 21: Übersicht aller Thymidin-Inkorporations-Assays (4 verschiedene PBMC-Spender) im direkten Vergleich der BiRecs (10 ng/ml) in Kombination mit den BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937, HL-60, K562 und einem 1:1 Mix von HL-60 und K562 Zellen mit monozytendepolierten PBMC (E:T 2:1/ E:T 4:1 in den Kontrolltitrationen auf HL-60 und K562). Die untere gestrichelte Linie zeigt den Signalhintergrund an, der nur durch Effektor- und Zielzellen verursacht wird. Die obere gestrichelte Linie zeigt die maximale T-Zellproliferation, die durch PHA hervorgerufen wird. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Experimenten, jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus einem experimentellen Triplet an. Um die Daten den Spendern zuordnen zu können, symbolisiert jede Form jeweils einen Spender. Die statistische Analyse wurde mittels „ordinary one-way ANOVA“ in GraphPad Prism Version 9 durchgeführt.

3.3.4 FACS Kill Assay

Die FACS-basierten Kill-Assays wurden durchgeführt, um die Antikörpervermittelten zytotoxischen Effekte des kombinatorischen Ansatzes sowie die Aktivierung der T-Zellen zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden monozytendepletierte PBMCs 72 Stunden lang mit B7H3- und Endoglin-positiven U937 (siehe Abbildung 9) und verschiedenen Behandlungen der BiRecs mit und ohne BiCos inkubiert. Auf Grund der Titration von 3.3.3.1 wurden fixe Konzentrationen für BiRecs (10 ng/ml) und BiCos (400 ng/ml) gewählt. Da sich das Szenario 4 (siehe Abbildung 4 und 3.3.3.4) im Thymidin-Inkorporations-Assay als unwirksam erwies, wurden die folgenden Experimente allein auf der doppelt positiven Zielzelle U937 durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die behandelten Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und anschließend mittels FACS analysiert. Die Zellzahl wurde mit zugesetzten Beads standardisiert, um die Proben untereinander vergleichbar zu gestalten. Als Isotypkontrolle wurden bispezifische Antikörperkonstrukte mit dem Klon MOPC eingesetzt.

Auf der Grundlage der vorhergegangenen Ergebnisse der Thymidin-Inkorporations-Assays war bei den gewählten Konzentrationen der Antikörperkombinationen zu erwarten, dass eine verstärkte Tumordepletion, T-Zellproliferation und -Aktivierung in den Kombinationen von BiRecs und BiCos im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem BiRec zu sehen ist, die sich gegen zwei weit entfernte Epitope auf einem Zielantigen und/oder zwei gänzlich unterschiedlichen Zielmolekülen richten.

In Abbildung 22 zeigt sich, dass die PBMC-Spender in der U937 Depletion eine große Schwankung zeigen, weswegen hier auch normalisierte Daten (die Zellzahl, die in der Behandlung mit BiRecs allein erzielt wird, ist hier als 100% dargestellt) ohne statistische Analyse gezeigt wird.

In den Kombinationen, die die BiRecs 7C4-M18, 8D9-M18 und Kro22-M18 beinhalten, fällt auf, dass wenn diese mit BiCos zusammengebracht wurden, die gegen das gleiche Epitop gerichtet sind, die Zellzahl der Zielzellen um ein

Vielfaches (200%-7500%) erhöht ist im Vergleich zu BiRec allein und der MOPC-Kontrolle. Die Kombinationen der BiRecs mit Kostimuli, die ein weit entferntes Epitop oder ein gänzlich anderes Zielmolekül binden, führen zur kompletten Zielzelledepletion, was sich mit den Proliferationsdaten aus den Thymidin-Inkorporation-Assays deckt.

Nur der BiRec 8H8-M18 scheint von dieser beobachteten Regel ausgenommen zu sein: hier führen alle Kombinationen, egal ob gegen das gleiche Epitop, oder ein komplett anderes Molekül gerichtet, zu einer totalen Eradikation der Tumorzellen. Dies validiert auch die Proliferationsdaten aus den Titrationsen von 3.3.3.2.

Blickt man nun auf die Aktivierungsdaten der Abbildung 23, so fällt auf, dass sich die Regel aus den Proliferations- und Depletionsexperimenten, der möglichst weit voneinander entfernten Epitopen auf einer Zelle, auch weitestgehend auf die Aktivierung der CD4⁺ positiven T-Zellen (Abbildung 23 A) anwenden lässt. Die side-to-side ANOVA Analyse aus Graphpad zeigt beispielweise in der Kombination von 7C4-M18 und 7C4-9.3 keinen signifikanten Anstieg der T-Zellaktivierung, die hier durch die Expression von CD69 dargestellt wird. Kombiniert man 7C4-M18 jedoch mit den BiCos 8D9-9.3 oder 8H8-9.3, so findet eine signifikante Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen statt. Dies lässt sich jedoch nicht in der Kombination mit dem BiCo Kro22-9.3 beobachten. Hier mag die statistische Power mit drei gesunden PBMC-Spendern zu niedrig zu sein oder auch die Inkubationszeit der Effektorzellen mit Antikörpern und Tumorzellen zu lang gewesen sein. 8H8-M18 ist hier wieder die Ausnahme, indem dieser BiRec in Kombination aller B7H3-CD28-Konstrukten einen signifikanten Anstieg in der Aktivierung zeigt, während auch hier ein additiver Effekt von Kro22-9.3 ausbleibt.

In der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 23 B) lässt sich nur eine signifikante Erhöhung der T-Zellaktivierung mit der Kombination von 8D9-M18 und 7C4-9.3 beobachten. Dies ist wahrscheinlich der kleinen Anzahl von PBMC-Spendenden mit hohen Diskrepanzen in ihrer Aktivierung und der langen Inkubationszeit von 72h geschuldet.

Ergebnisse

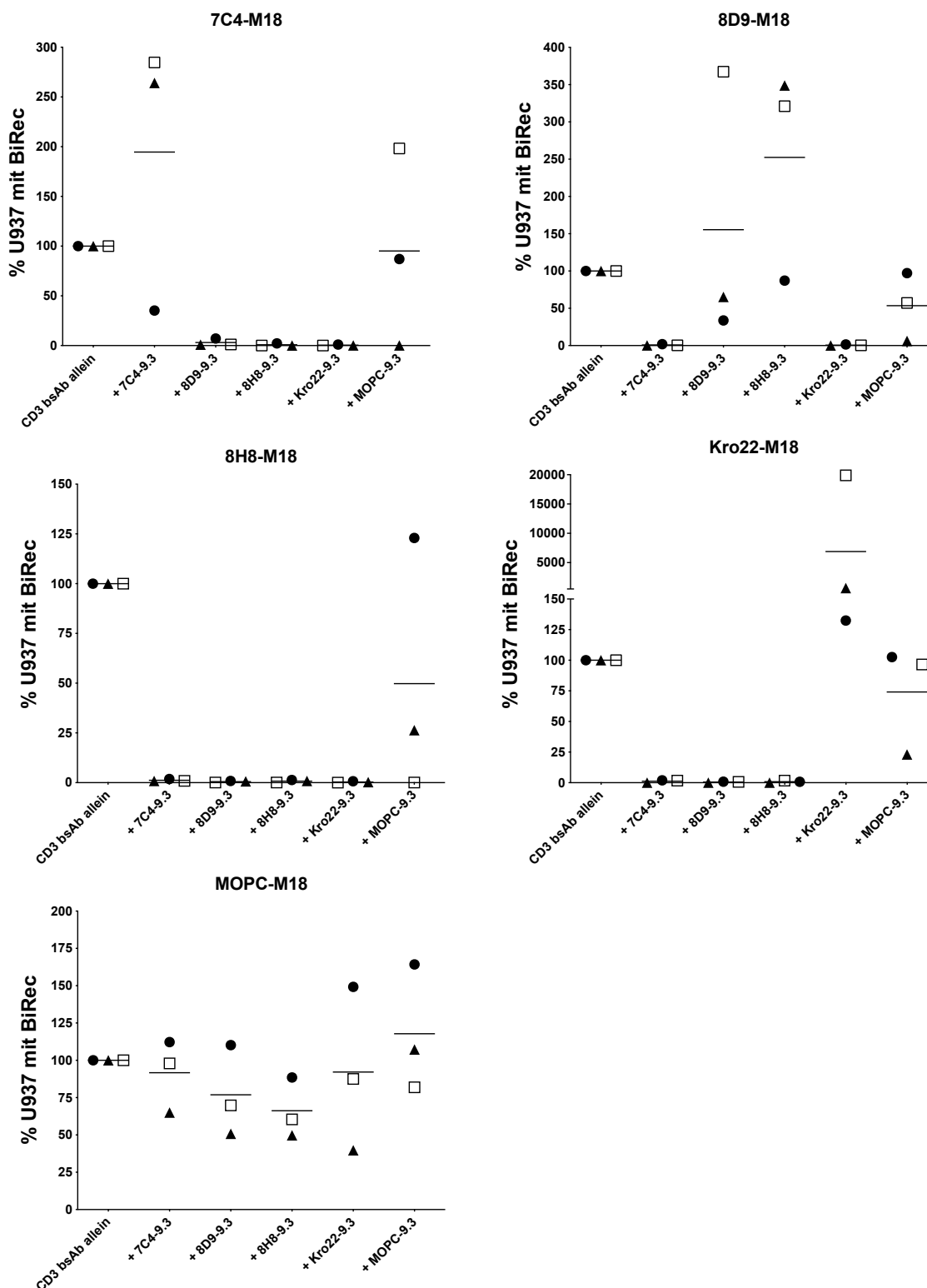
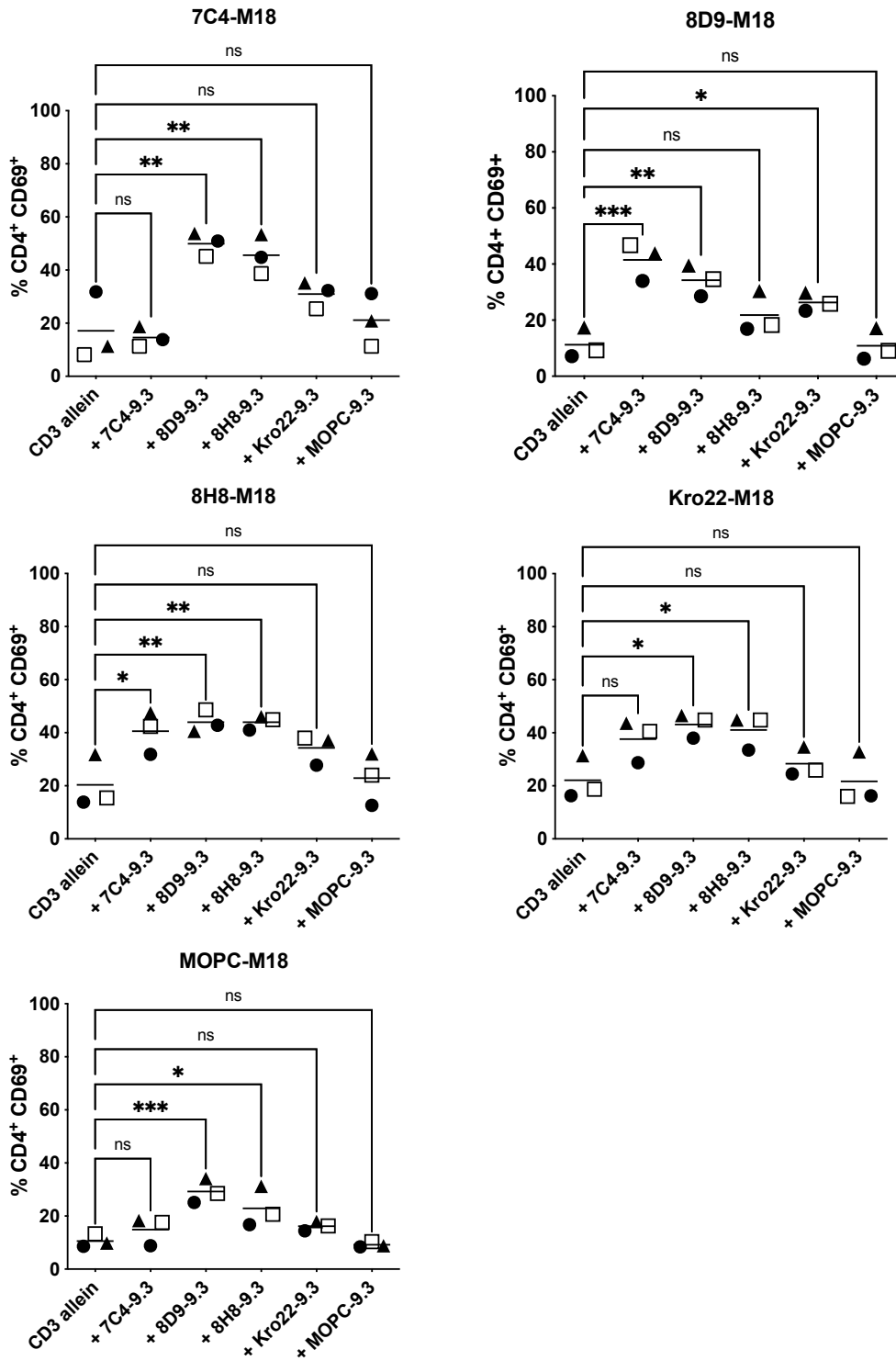


Abbildung 22: Übersicht der FACS basierten Depletionsassays (3 verschiedene PBMC-Spender) mit BiRec (10 ng/ml) in Kombination mit BiCos (400 ng/ml) auf U937 mit monozytendepletierten PBMC (E:T 4:1) nach drei Tagen. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten, jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus einem experimentellen Doppel an. Um die Daten den Spendenden zuzuordnen zu können, symbolisiert jede Form jeweils einen Spender.

A. CD4⁺ T-Zellaktivierung



B. CD8⁺ T-Zellaktivierung

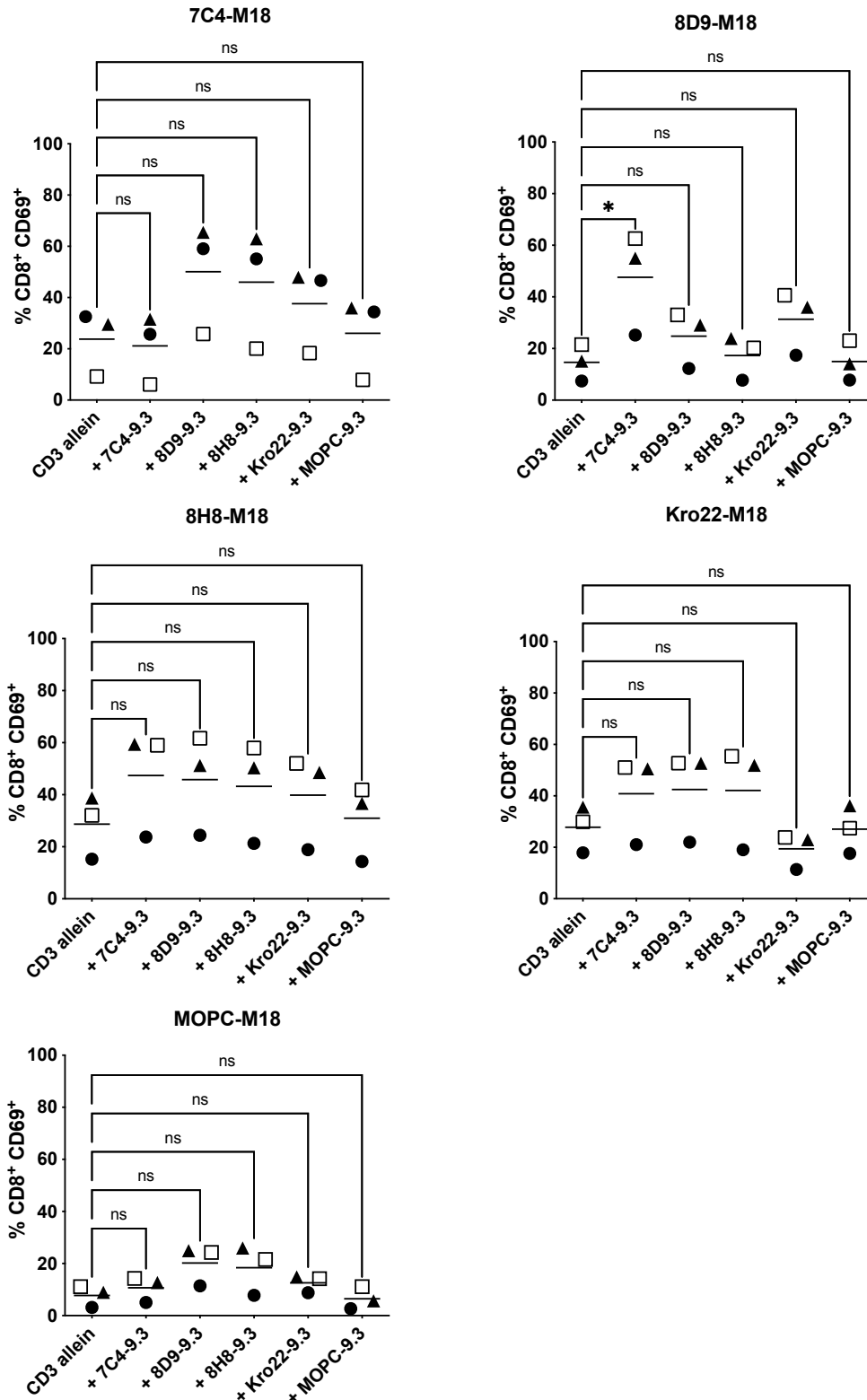


Abbildung 23: Übersicht der T-Zellaktivierung innerhalb der FACS basierten Depletionsassays (3 verschiedene PBMC-Spender, nach drei Tagen). A. CD4⁺ T-Zellaktivierung. B. CD8⁺ T-Zellaktivierung. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten, jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus einem experimentellen Triplet an. Um die Daten den PBMC-Spendenden zuordnen zu können, symbolisiert jede Form jeweils einen Spender.

3.3.5 Langzeitaktivierungsassay

Um die Auswirkungen der Antikörperkonstrukte auf die Bildung von T-Gedächtniszellen über längere Zeit zu untersuchen, wurden im Rahmen eines Langzeitaktivierungsassays die verschiedenen T-Zell Subpopulationen in ihrer Zusammensetzung und Proliferation untersucht. Dieses Langzeitaktivierungsassay basiert auf dem FACS-basierten Depletionsassay und stimuliert monozytendepletierte PBMCs insgesamt zweimal mit Tumorzellen und bsAb über eine gesamte Testdauer von sechs Tagen. Zunächst wurden U937 als Zielzellen und monozytendepletierte PBMCs mit BiRec und BiCo Kombinationen für 72 h inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, um das verbrauchte Medium zu verwerfen und in eine neue 96-Well-Platte übertragen. Anschließend wurden die verbliebenen Zellen, hauptsächlich PBMCs, restimuliert, indem Zielzellen und erneut Antikörper hinzugegeben wurden. Nach der darauffolgenden Inkubation von weiteren 72 h, wurden die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten FACS-Antikörpern markiert und mittels FACS analysiert. Die Zellzahl wurde mit zugesetzten Beads standardisiert, um die Proben untereinander vergleichbar zu gestalten.

Das T-Zellgedächtnis ist nicht homogen, sondern besteht aus verschiedenen Populationen. Die zwei größten Populationen der Gedächtniszellen sind die Effector memory und Central memory T-Zellen, die sich in ihrem Expressionsmuster, als auch Funktionen unterscheiden (Sallusto *et al.*, 1999). Im hier beschriebenen Langzeitaktivierungsassay ist die Expansion dieser beiden Subpopulationen ein Hinweis auf T-Zellgedächtnisbildung. Ausgehend von den vorherigen Proliferations-, Aktivierungs- und Depletionsdaten ist zu erwarten, dass eine verstärkte Proliferation der memory T-Zellen in den Kombinationen von BiRecs und BiCos erfolgt, die ein weit entferntes Epitop auf dem Zielantigen und/oder ein komplett unterschiedliches Zielmolekül auf derselben Zielzelle binden.

Da parallel zum Langzeitaktivierungsassay ein korrespondierendes FACS Kill Assay mit den gleichen PBMC-Spendenden angesetzt wurde, war es möglich die

Proliferation der T-Zellen nach drei Tagen mit einmaliger Stimulation mit der Proliferation nach sechs Tagen und Restimulation zu vergleichen. Die monozytendepletierten PBMCs wurden mit CellTrace Violet® markiert, welches sich nach jeder Zellteilung der Tochtergenerationen verdünnt und somit sich die Proliferation evaluieren lässt. Aus der Verdünnung von CellTrace Violet® wurde mit Hilfe von FlowJo™ Version 10.8.1 eine Proliferationsanalyse durchgeführt und damit der Division Index berechnet (Abbildung 24). Der Division Index beschreibt die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen, die eine Zelle durchlaufen hat. Dabei handelt es sich um einen Durchschnittswert und schließt auch Zellen ein, die sich nicht geteilt haben. Somit beschreibt der Division Index die Dynamik des gesamten Systems.

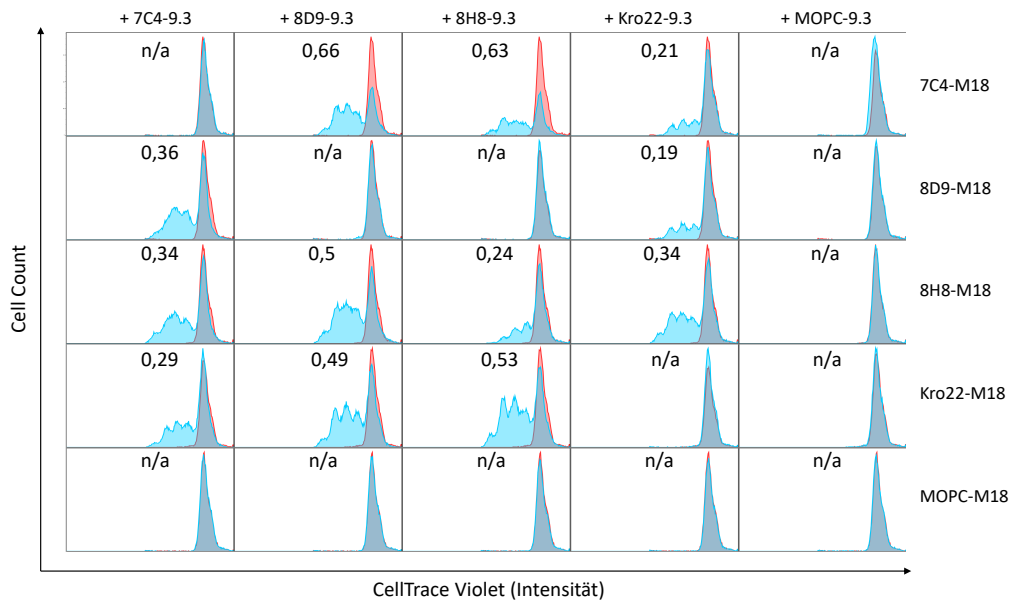
Abbildung 24 vergleicht die Proliferation der T-Zellen nach drei Tagen Stimulation mit der T-Zellproliferation nach sechs Tagen mit Restimulation. Zunächst ist festzustellen, dass an beiden Zeitpunkten nur die Kombination der Antikörper, die sich gegen zwei entfernte Epitope auf dem Zielantigen richten und/oder zwei unterschiedliche Zielmoleküle binden zur Proliferation führt. Vergleicht man nun beide Zeitpunkte miteinander, so fällt auf, dass die Proliferation nach drei Tagen niedriger ist als nach sechs Tagen: Die Anzahl der Peaks, also Tochtergenerationen der T-Zellen nach drei Tagen und alleiniger Stimulation (bis zu vier Peaks) ist niedriger als nach sechs Tagen mit Restimulation (bis zu 7 Peaks). Die höchste Proliferation der CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen wurde mit der Kombination Kro22-M18 und 7C4-9.3 (Division Index CD4⁺ 1,36 und CD8⁺ 1,29) nach sechs Tagen mit Restimulation erzielt.

Somit ist festzustellen, dass die erneute Stimulation der bereits sensibilisierten T-Zellen mit BiRecs und BiCos, die sich gegen zwei entfernte Epitope oder zwei Antigene richten, zu einer nachhaltigen und gesteigerten T-Zellproliferation führen.

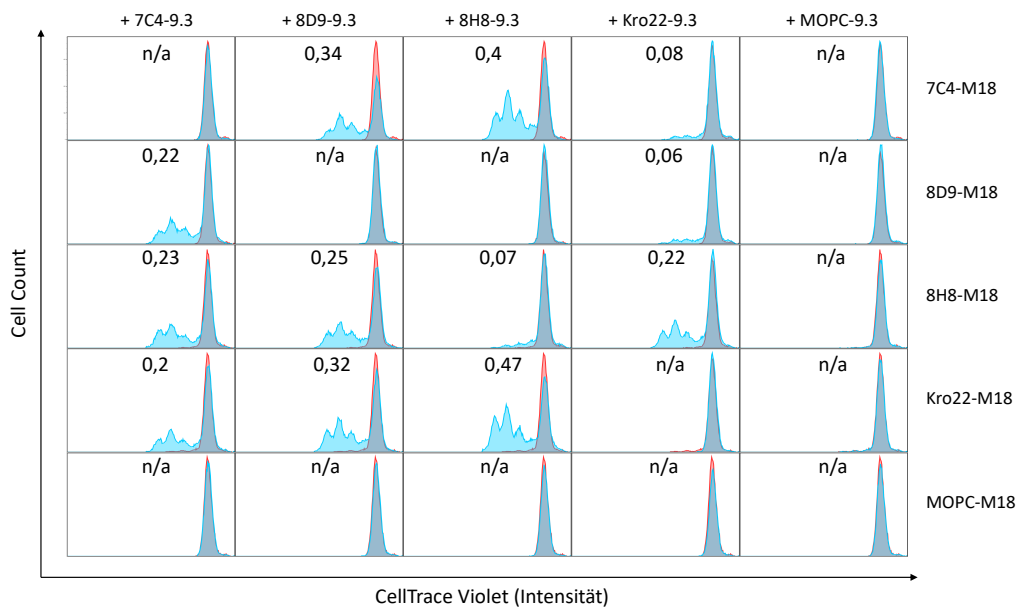
A. T-Zellproliferation 3 Tage

CD4⁺ T-Zellen

BiRec + BiCo █
BiRec █



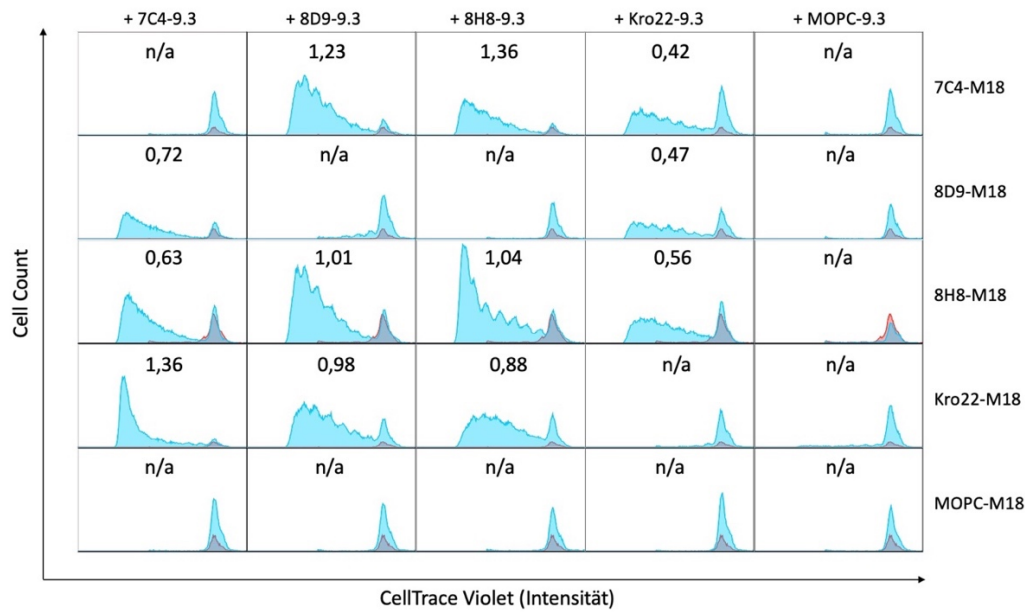
CD8⁺ T-Zellen



B. T-Zellproliferation 6 Tage nach Restimulation

CD4⁺ T-Zellen

BiRec + BiCo ■
BiRec ■



CD8⁺ T-Zellen

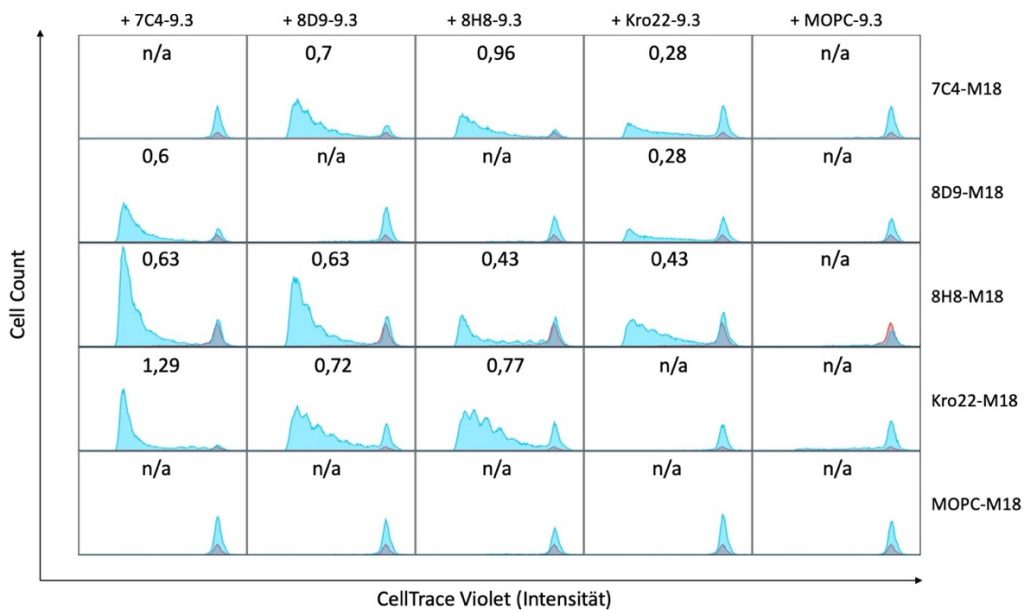


Abbildung 24: Vergleich der T-Zellproliferation nach Behandlung mit Antikörperkombinationen nach drei Tagen und 6 Tagen nach Restimulation. A. Histogramme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellproliferation mit Division Indizes nach 3 Tagen, nach alleiniger Stimulation mit Targetzellen U937 und Antikörperkombinationen. B. Histogramme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellproliferation mit Division Indizes nach 6 Tagen, nach Restimulation im Langzeitaktivierungsassay. Auf der Y-Achse ist die absolute Anzahl der T-Zellen aufgetragen, auf der X-Achse die Intensität des CellTrace Violets. Die Antikörperkombination beinhaltet BiRecs in 10 ng/ml und BiCos in 400 ng/ml (hellblau). Die Histogramme, die BiRecs allein sind rot dargestellt, die Konzentration beträgt 10 ng/ml. Die dargestellten Daten sind einem exemplarischen Experiment mit einem Spender entnommen. Die Proliferationsanalyse und die Berechnung der Division Indizes wurde mit Hilfe von FlowJo™ Version 10.8.1 durchgeführt.

Ergebnisse

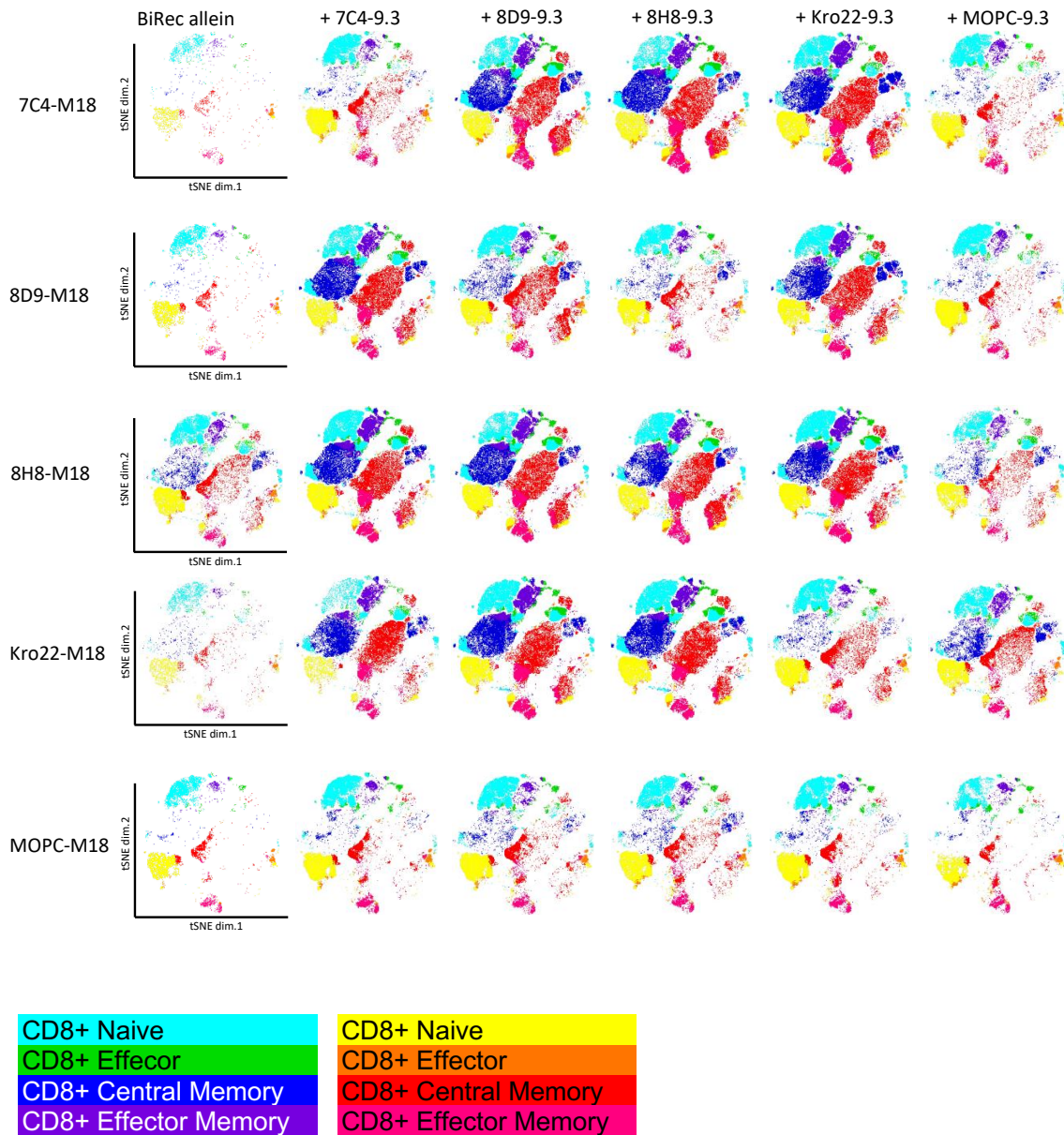


Abbildung 25: Die tSNE-Diagramme visualisieren die Gesamtheit der T-Zellpopulationen nach verschiedenen Behandlungen im Langzeitaktivierungsassay. Die verschiedenen T-Zellsubpopulationen sind in verschiedenen Farben dargestellt, während die Intensität der Farben die Anzahl der T-Zellen innerhalb der Subpopulationen anzeigt. BiRecs sind in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, BiCos in einer Konzentration von 400 ng/ml. Die Daten sind einem exemplarischen Experiment entnommen. Das tSNE-Diagramm wurde mit Hilfe von FlowJo™ Version 10.8.1 erstellt.

Um Aussagen über die antikörpervermittelte Bildung von T-Gedächtniszellen treffen zu können, wurden die T-Zell Subpopulationen nach sechs Tagen mit Restimulation analysiert. Abbildung 25 zeigt tSNE-Diagramme, in dem die Zusammensetzung der T-Zellsubpopulationen der verschiedenen Behandlungen

des Langzeitaktivierungsassays dargestellt sind. T-distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE) ist ein Algorithmus zur Dimensionalitätsreduktion, der aus hochdimensionalen Daten zwei- oder dreidimensionale Diagramme erstellt (van der Maaten and Hinton, 2008). Sich ähnliche Objekte werden durch sich nahe Punkte dargestellt, während unähnliche Objekte durch entfernte Punkte im Diagramm gezeigt werden. So entstehen Cluster, in denen sich, wie zum Beispiel in Abbildung 25, die verschiedenen T-Zellsubpopulationen gruppieren und zweidimensional visualisiert werden können. In den Diagrammen symbolisiert eine Farbe eine T-Zellsubpopulation. Die Intensität der Farben repräsentiert die Anzahl der T-Zellen. Somit lässt sich aus Abbildung 25 ableiten, dass eine ausgeprägte Proliferation der CD4⁺ als auch CD8⁺ Central Memory und Effector Memory T-Zellen in den Kombinationen zu sehen ist, in der möglichst weit voneinander entfernte Epitope und zwei komplett unterschiedliche Moleküle als Ziel gewählt wurden.

Abbildung 26 zeigt die Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen aus demselben Experiment. Hier ist vor allem sichtbar, dass die Behandlung mit BiRecs und BiCos, die sich gegen zwei entfernte Epitope oder zwei Antigene richten, zu einem Shift von Naiven und Effector T-Zellen zu Central Memory und Effector Memory T-Zellen führt, als auch zu einer Proliferation der gesamten T-Zellpopulation. Die Behandlung mit BiRecs allein weist eine sehr viel geringere Anzahl der totalen T-Zellen auf. Folglich führt die Kombination nicht nur zu einer gesteigerten und nachhaltigen T-Zellproliferation, sondern auch zur vermehrten Proliferation von Gedächtniszellen.

In der Zusammenschau von Abbildung 24-26 fällt, wie in den vorherigen Experimenten auf, dass 8H8-M18 wieder die Ausnahme zur Regel darstellt. Alle BiCos in Kombination mit dem 8H8-BiRec führten zu einer erhöhten Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ Central Memory und Effector Memory T-Zellen, wobei die B7H3-BiCos einen größeren CD28-Effekt als der Endoglin BiCo-Kro22-9.3 zu haben scheinen.

Ergebnisse

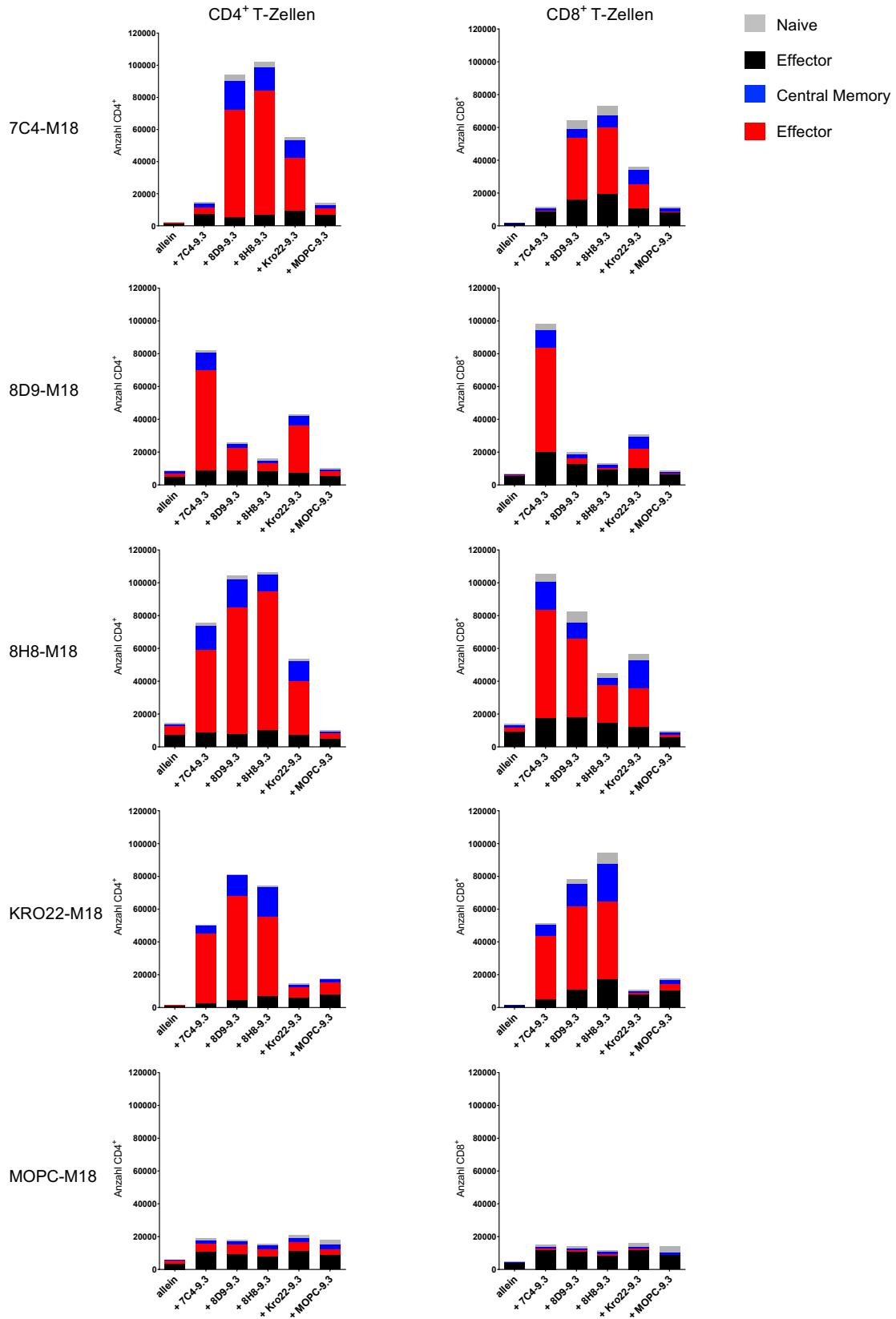
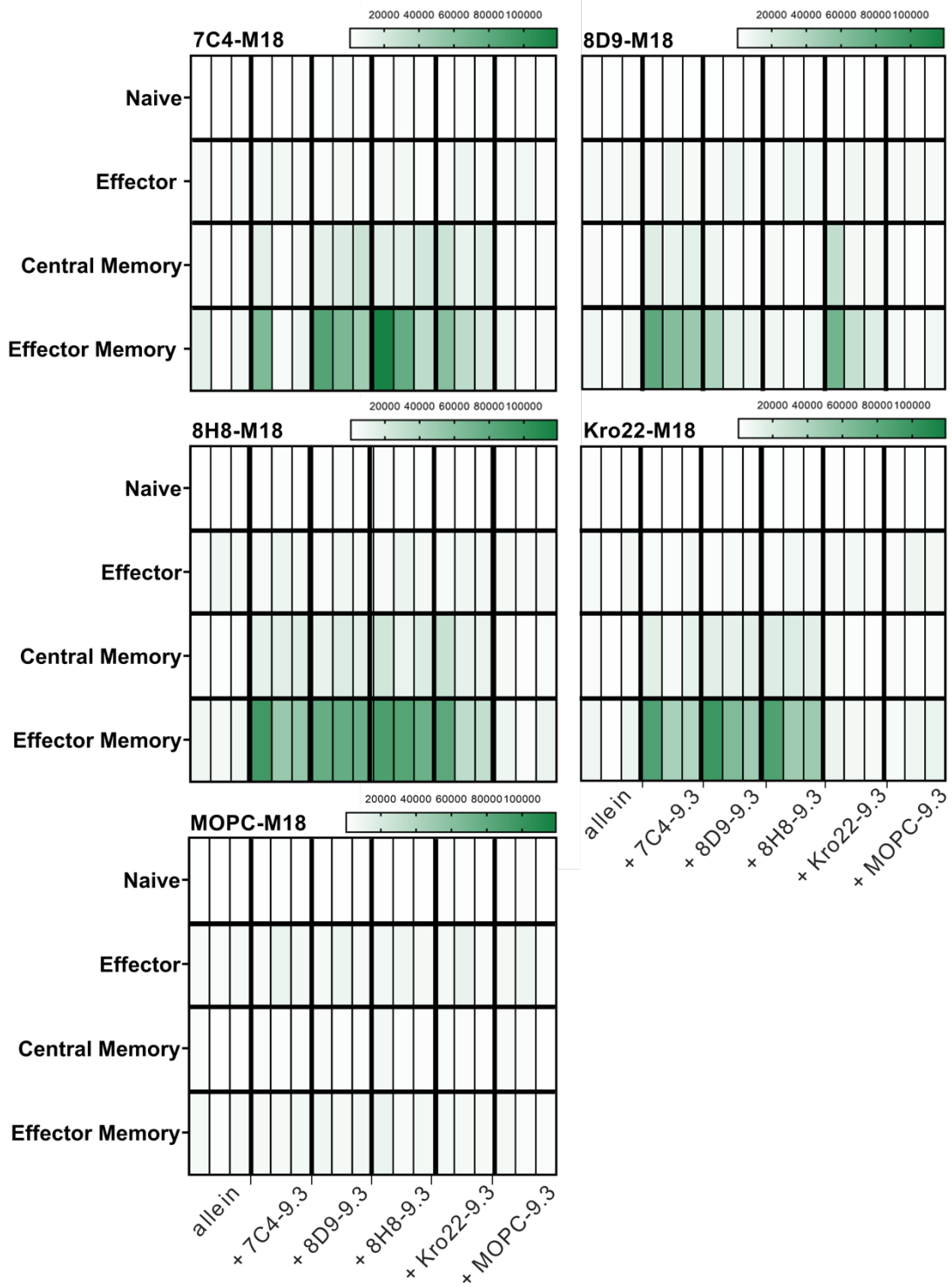


Abbildung 26: Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen im Langzeitaktivierungsassay. BiRecs sind in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, BiCos in einer Konzentration von 400 ng/ml. Die abgebildeten Daten sind als Mittelwerte von experimentellen Duplikaten dargestellt. Die Daten sind einem exemplarischen Experiment entnommen.

Die Heatmap in Abbildung 27, die drei PBMC-Spender zusammenfasst, bestätigt die bereits formulierte Regel der Antikörperkombinationen, mit der Ausnahme von 8H8-M18: Während 8H8-M18 mit allen BiCos zur gesteigerten Gesamtproliferation und einem Shift der T-Zell-Population zu Effector und Central Memory T-Zellen führt, führen die anderen BiRecs dies nur in Kombination mit BiCos, die sich gegen weit entfernte Epitope auf dem Zielantigen richten oder gänzlich unterschiedlichen Zielmolekülen richten, dazu. Der Shift in der T-Zellpopulation hin zu den Effector und Central memory T-Zellen weist auf eine nachhaltige und langanhaltende T-Zellaktivierung, als auch die Bildung eines T-Zellgedächtnisses hin.

A. CD4⁺ T-Zell Subpopulationen



B. CD8⁺ T-Zell Subpopulationen

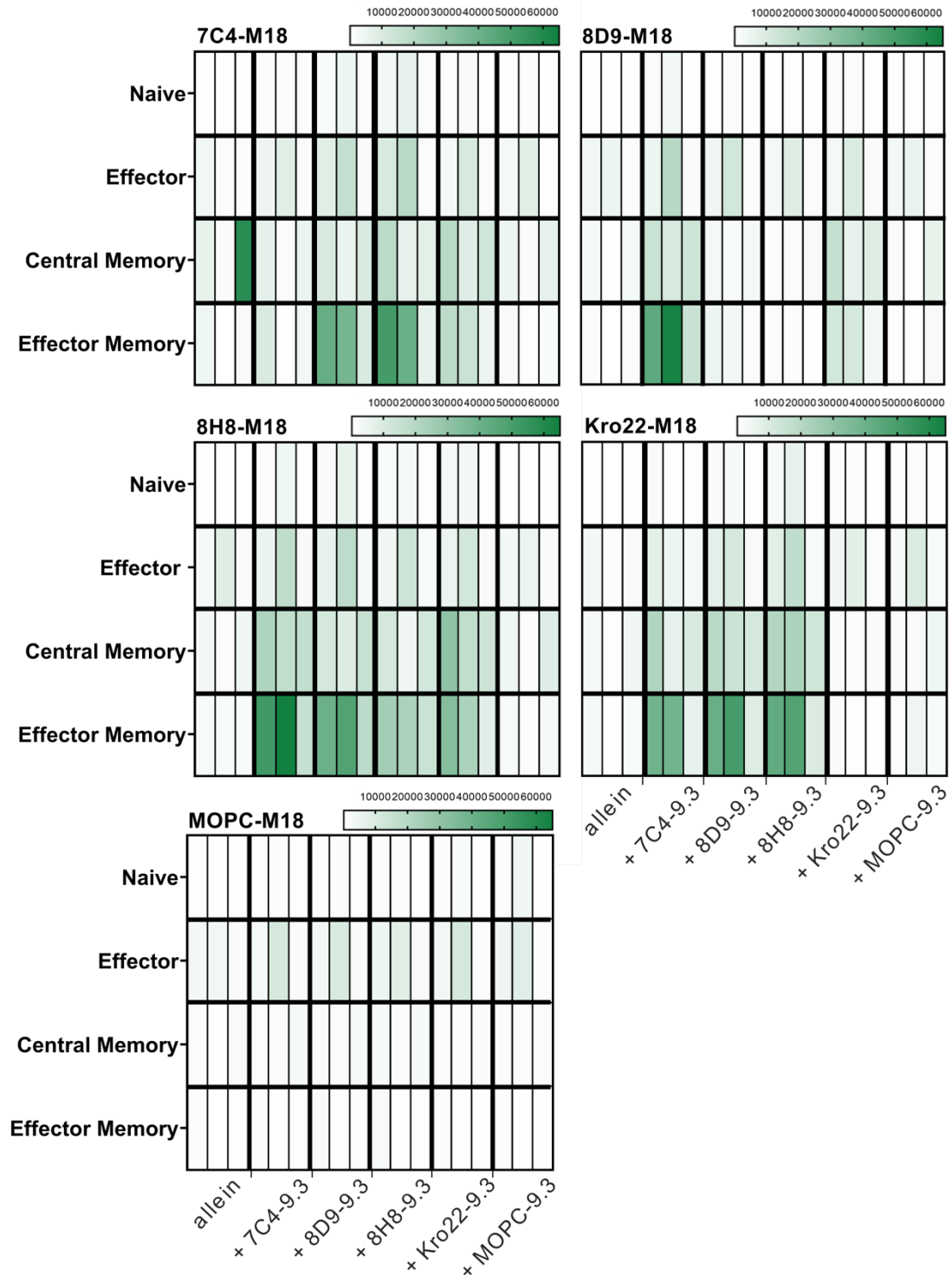


Abbildung 27: Heatmap zur Übersicht der T-Zell Subpopulationen im Langzeitaktivierungsassay mit 3 gesunden PBMC-Spendern. A. CD4⁺ T- Zell Subpopulationen nach Langzeitaktivierung. B. CD8⁺ T- Zell Subpopulationen nach Langzeitaktivierung. Die eingesetzte Konzentration für BiRecs beträgt 10 ng/ml und BiCos 400 ng/ml. Die Intensität der Farbe Grün steht für die absolute Anzahl der T-Zellen der Subpopulationen. Ein Rechteck innerhalb der dicken Linien stellt den Datenpunkt eines Spenders dar, welcher sich aus den Mittelwerten von zwei experimentellen Duplikaten ergibt.

In Übereinstimmung mit den FACS Kill Assays und dem Thymidin-Inkorporations-Assays zeigte das FACS-basierte Langzeitaktivierungsassay vergleichbare Ergebnisse. Mit der Ausnahme von 8H8-M18, führen die hier untersuchten BiRecs in Kombination mit BiCos, die sich gegen weit entfernte Epitope auf B7H3 richten oder ein gänzlich unterschiedliches Molekül wie Endoglin binden, zu einer erhöhten T-Zellproliferation, T-Zellaktivierung, Tumordepletion und T-Zellgedächtnisbildung, im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit BiRecs.

4 Diskussion

Das Konzept der Kombination von bispezifischen Antikörpern zur verbesserten Rekrutierung von T-Zellen gegen Tumore geht auf die Mitte der achtziger Jahre zurück. 1988 veröffentlichten G. Jung und H. J. Müller Eberhard eine Arbeit, in der eine Kombination von zwei verschiedenen AHCs (siehe Abbildung 3) mit einer Spezifität für jeweils „Tumor x CD3“ und „Tumor x CD28“ beschrieben wurde (Jung and Müller Eberhard, 1988). Die gemessene T-Zellaktivierung war durch die Kombination der AHCs effizienter als die, die durch jeden der Antikörper allein erreicht werden konnte. Diese und andere vielversprechende Ergebnisse, die mit CD28-Antikörpern *in vitro* und im Tiermodell erzielt werden konnten, ermutigte die Wissenschaft, die CD28-Stimulation durch Antikörper in Studien am Menschen zu untersuchen. Im Jahr 2006 kam es zu einem tragischen Zwischenfall, dem so genannten TeGenero- oder TGN1412 -Vorfall, bei dem ein superagonistischer CD28-Antikörper eine systemische CD28-T-Zellaktivierung auslöste, die zu einem lebensbedrohlichen Zytokinsturm bei sechs gesunden, freiwilligen Testpersonen führte. Dieser tragische Vorfall hatte die fast vollständige Einstellung der weiteren Erforschung von CD28-aktivierenden Antikörpern zur Folge.

Bispezifische CD28-Kostimulatoren mit strikter Zielzellenbeschränkung, wie sie in der ursprünglichen Arbeit von Jung et al. vorgesehen waren, versprachen jedoch eine gezielte Kostimulation von T-Zellen. Dadurch ließen sich eine systemische Aktivierung und möglicherweise fatale Nebenwirkungen auf Grund eines CRS vermeiden. Bei diesen frühen Versuchen wurden jedoch chemisch vernetzte AHCs verwendet (Jung and Müller Eberhard, 1988; Renner *et al.*, 1994; Brandl *et al.*, 1999). Diese Moleküle sind im Hinblick auf die Produktion im industriellen Maßstab in pharmazeutischer Qualität suboptimal. Neben dem TGN1412-Vorfall standen also auch technische Hindernisse der Erforschung bispezifischer CD28-Antikörper im Weg.

Auf Grund der Geschichte der Erforschung von CD28-Stimulanzen, wurde in vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Jung sichergestellt, dass die hier verwendeten CD28-Konstrukte (wie auch CD3-Konstrukte) zu keiner

unspezifischen Aktivierung von T-Zellen führen (Zekri, unveröffentlicht; Engel, 2020). Hier präsentieren wir einen modifizierten und verbesserten kombinatorischen Ansatz der AG Jung mit zwei rekombinanten bispezifischen Antikörpern:

A) Ein bispezifisches Konstrukt, den hier genannten BiRec mit antiCD3-Spezifität, dass die T-Zellaktivierung initiiert (Signal 1) und B) ein kostimulatorisches bispezifisches CD28-Antikörperkonstrukt, den BiCo, dass die T-Zellaktivierung durch das Signal 2 verstärkt und aufrechterhält (siehe Abbildung 1). Es wurde gezeigt, dass die BiCos allein keine T-Zellaktivierenden Eigenschaften besitzen, in Kombination mit dem geeigneten BiRec, der die grundlegende Aktivierung initiiert, jedoch *in vitro* die auf die Zielzelle beschränkte T-Zellproliferation, -aktivierung und Tumorabtötung steigern. Darüber hinaus fördert die Kombination aus CD28-Konstrukt und CD3-Antikörper die Expansion von zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, wenn sie mit Zielzellen konfrontiert werden, was auf die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses hinweist.

Während sich meine Masterarbeit im Fach Molecular Medicine (Engel, 2020) auf die ideale Kombination von Antikörperformaten fokussierte, war das Ziel dieser medizinischen Dissertation durch funktionelle *in vitro* Charakterisierung der verschiedenen Konstrukte die optimale Antigenwahl für einen kombinatorischen Ansatz zu ermitteln.

Die Konstrukte wurden in verschiedenen Kombinationen hinsichtlich der in Abbildung 4 beschriebenen vier Szenarien getestet. Diese Arbeit soll zur Identifizierung einer optimalen Kombination von CD3- und CD28-stimulierenden bispezifischen Antikörpern beitragen.

4.1 B7H3-Bindung

Die verschiedenen Klone der B7H3 bispezifischen Antikörper binden an verschiedene Epitope innerhalb des B7H3-Moleküls (siehe Abbildung 5). Der Klon 8H8, als auch der Klon 8D9 binden in der Peripherie des Moleküls, während 7C4 ein Epitop besetzt das nahe an der Zellmembran liegt. Die BiRecs und BiCos

unterscheiden sich außerdem in ihren Formaten. Wie in Abbildung 6 dargestellt, sind die CD3-spezifischen BiRecs im sogenannten HC-L aufgebaut, während die CD28-spezifischen BiCos im LC+L Format vorliegen. Dies sollte jedoch nicht die Bindungsfähigkeit der Antikörper zum Zielantigen B7H3 beeinflussen, da der Zielteil der für die Tumorantigenbindung verantwortlich ist in beiden Formaten identisch ist. Im Bindungsassay (Abbildung 10) zeigt sich jedoch, dass der BiRec meist einen höheren EC_{50} -Wert als das BiCo Konstrukt des Klons aufweist. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da es zu erwarten ist, dass zusätzliche Single Chains, die C-terminal am IgG-Molekül gekoppelt sind, den N-terminalen Bereich nicht beeinflussen sollten. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Formate die Affinität, wenn auch nicht dramatisch, beeinflussen können. Dieser Befund weist darauf hin, dass komplexe Proteine als dynamische Einheiten aufzufassen sind, bei denen sich entfernte Domänen wechselseitig beeinflussen können.

Ein zweites unerwartetes Ergebnis ist, dass die Affinität zum gleichen Zielantigen auf unterschiedlichen Zielzellen unterschiedliche Werte aufzeigt, obwohl die Gesamtzahl der exprimierten B7H3-Moleküle vergleichbar ist. Das könnte damit zusammenhängen, dass die Architektur der Membranantigene der verschiedenen Zielzellen unterschiedlich sein kann oder Spleißvarianten des Antigens mit unterschiedlicher Struktur auf den unterschiedlichen Zielzellen exprimiert werden.

4.2 T-Zellproliferation

4.2.1 Ein Epitop auf einem Zielantigen vs. zwei Zielepitope

Wie in 3.3.3.2 beschrieben und in Abbildung 16 und 17 dargestellt, zeigt die Titration von 7C4-M18 mit 7C4-9.3, ein Beispiel für Szenario 1 (Abbildung 4) mit einer fixen Konzentration von 10 ng/mo BiRec und 400 ng/ml BiCo keinen signifikanten Unterschied zu der Titration von 7C4-M18 allein. Ist der BiCo gegen ein anderes Epitop auf dem B7H3-Molekül gerichtet (siehe Übersicht in Abbildung 4; Szenario 2 siehe Abbildung 3), so ist ein zusätzlicher CD28-Nutzen in der T-Zellproliferation zu beobachten. Wendet man diese Anordnung auf ein

anderes Epitop auf dem B7H3-Molekül bei gleichen Konzentrationen an, wie in der Titration von 8D9-M18, ist das gleiche Prinzip zu erkennen (Abbildung 16): Kombiniert man 8D9-M18 mit CD28-Konstrukten, die gegen dasselbe Epitop bzw. ein Epitop in der Nähe der Bindungsstelle des 8D9-Klons (8H8-9.3) gerichtet sind, so ist kein signifikanter Zugewinn hinsichtlich der Proliferation der T-Zellen durch die Zugabe der CD28-Konstrukte sichtbar, während 7C4-9.3 (bindet in der Peripherie des B7H3-Moleküls, siehe Abbildung 4) zu einem beachtlichen Anstieg führt. Dies kann durch die sterische und kompetitive Hemmung der Antikörperkonstrukte an der Bindungsstelle auf dem Zielmolekül erklärt werden. Während zum Beispiel 7C4-M18 und 7C4-9.3 an das gleiche Epitop binden und um die Bindungsstelle mit ähnlicher Affinität konkurrieren (siehe Bindungskurve in Abbildung 10), findet bei geringen Konzentrationen die Immobilisation der BiRecs und BiCos in nicht ausreichendem Maß statt, um die T-Zellproliferation durch das Signal 2 zu verstärken. Abbildung 18, in der eine Titration von Kro22-BiRec und – Bico gezeigt wird, zeigt, dass dieses Prinzip nicht nur auf B7H3 zutrifft, sondern auch auf Endoglin als Zielantigen.

Der BiRec 8H8-M18 stellt eine Ausnahme von diesem Prinzip dar. Bei allen PBMC-Spendenden zeigt sich, dass 8H8-M18 kombiniert mit allen BiCos einen signifikanten Proliferationsanstieg, im Vergleich zum 8H8-M18 allein, bei bereits niedrigen Konzentrationen (10 ng/ml) erzielt. Betrachtet man die Epitopkartierung in Abbildung 5, so fällt auf, dass der Klon 8H8 am weitesten in der Peripherie des B7H3-Moleküls bindet. Es ist jedoch bekannt, dass bsAb, die an ein Epitop binden, das sich näher an der Zellmembran befindet, einen effektiveren Antitumor-Effekt haben (Bluemel *et al.*, 2010), weswegen diese Ausnahme überraschend ist. Unpublizierte Kinetikdaten von Biacore Interaktions-Analysen, die durch Dr. Zekri generiert wurden, zeigen, dass 8H8 eine sehr hohe On-Rate und eine sehr niedrige Off-Rate hat. Dies bedeutet, dass der Klon 8H8 sehr schnell an sein Epitop bindet und auch sehr langsam dissoziiert, wenn der Antikörper erst einmal gebunden ist. Zudem, wie in Abbildung 10 dargestellt, hat 8H8 die höchste Affinität zu B7H3 der antiB7H3-Klone. Diese besonders hohe Affinität und günstige Bindungskinetik des antiB7H3-Klon 8H8 könnten dazu

führen, dass das bispezifische 8H8-Konstrukt besonders gut immobilisiert wird und die BiCos nicht in Konkurrenz mit dem 8H8-BiRec stehen.

Auf Grund der Beobachtung, dass die Kombination zweier Konstrukte mit demselben Zielepitop auf demselben Zielantigen bei niedriger BiRec-Konzentration in der Regel keinen Vorteil gegenüber dem BiRec allein hat, scheidet das Szenario 1 auf der Suche nach der optimalen Zielantigenwahl aus. Im Patientensetting werden möglichst geringe Konzentrationen von bispezifischen Antikörpern angestrebt, um die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

4.2.2 Zwei Epitope auf Zielantigen vs. zwei Zielantigene

Betrachtet man den Vergleich der Szenarien 2 und 3 (Abbildung 18), so wird deutlich, dass hinsichtlich des Nutzens der Kombination kein wesentlicher Unterschied zwischen BiRecs und BiCos gegen zwei verschiedene Epitope auf einem Zielantigen verglichen mit BiRecs und BiCos gegen zwei komplett verschiedene Zielmoleküle auf einer Zielzelle besteht. Das Szenario 2 funktioniert, wenn sich die Epitope auf dem Zielmolekül nicht in unmittelbarer Nähe befinden und die Antikörper sich nicht in ihrer Bindung stören. Um nun sicherzustellen, dass Zielepitope nicht in zu enger Proximität zueinander liegen, wird eine Epitopkartierung des Zielmoleküls benötigt. Wählt man aber zwei verschiedene Zielantigene auf einer Zielzelle, so lässt sich das Problem der sterischen Hinderung umgehen (Szenario 3). Ein Nachteil kann die Identifizierung eines zweiten TAAs darstellen: Die Wahl des ersten TAA ist komplex, da diese Antigene nicht spezifisch für den Tumor sind, sondern auch in geringen Mengen physiologisch in Geweben exprimiert werden. Das kann die Suche für ein zusätzliches Zielantigen schwieriger gestalten. Dennoch bietet dieser Ansatz zusätzliche Spezifität und geringere Toxizität für gesundes Gewebe, während die on-target Effekte im gesunden Gewebe minimiert werden.

4.2.3 Zwei verschiedene Zielantigene auf jeweils zwei verschiedenen Zielzellen

Das wohl überraschendste Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass das Szenario 4 (Abbildung 4), die Wahl von zwei verschiedenen Zielantigenen (B7H3 und Endoglin) auf jeweils zwei verschiedenen Zielzellen (Mix aus HL-60 und K563), zumindest in diesem Setting des Thymidin-Inkorporations-Assay (3.3.3.4) keinen CD28-Effekt der BiCos in Kombination zeigt.

Arbeiten, die analog zu unserem kombinatorischen Ansatz ein CD3-Antitumor-Konstrukt zusammen mit einem kostimulatorischen Konstrukt, welches das Molekül 4-1BB auf T-Zellen, sowie das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP) auf Tumorstromazellen bindet, nutzen, erzielen einen verbesserten Tumorkill, erhöhte Zytokinsekretion und T-Zellaktivierung in Kombination, als mit dem CD3-Konstrukt alleine (Claus *et al.*, 2019; Trüb *et al.*, 2020). Zudem sprechen Daten, die von Dr. Hörner in der AG Jung generiert wurden, dafür, dass der Ansatz von zwei Zielzellen mit jeweils einem Zielantigen im Thymidin-Inkorporations-Assay mit einer Kombination von BiRecs und 4-1BB-kostimulatorischen Konstrukten zu einer erhöhten T-Zellproliferation führt (Hörner, unpubliziert).

Umso erstaunlicher ist es, dass sich das Szenario 4 mit den BiCos und BiRecs nicht anwenden lässt (siehe Abbildung 20 und 21). Da das Szenario 4 auch nicht zur vermehrten T-Zellproliferation führt, wenn man die Zielantigene der BiCos und BiRecs tauscht, postulieren wir, dass die Antigenwahl von B7H3 und Endoglin für diesen Ansatz nicht geeignet ist. Jedoch sind genauere Nachforschungen nötig, um den exakten Grund hierfür zu ermitteln. Aus diesem Grund wurde das Szenario 4 in der weiteren funktionellen Charakterisierung der Kombinationen nicht untersucht.

4.3 FACS Kill Assays

Die FACS-basierten Kill-Assays wurden durchgeführt, um die Antikörpervermittelten zytotoxischen Effekte des kombinatorischen Ansatzes, sowie die Aktivierung der T-Zellen zu evaluieren. Das Szenario 4, welches keinen Nutzen der Kombination im Thymidin-Inkorporations-Assay aufgezeigt hat, wurde nicht

mehr weiter untersucht. Die Proliferationsdaten von Szenario 1-3 wurden mittels FACS-basiertem Zytotoxizitäts-Assay validiert.

4.3.1 Zielzellproliferation bei Kombination mit demselben Zielepitop

Der FACS-Kill Assay lieferte überraschende Ergebnisse in der Kombination von BiCos und BiRecs, die gegen dasselbe Epitop oder zwei unmittelbar benachbarte Epitope gerichtet sind. Anstatt, dass wie zu erwarten eine ähnliche Zielzellzahl wie bei der Negativkontrolle MOPC oder BiRec allein zu detektieren ist, ist die Tumorzellzahl um ein Vielfaches der eingesetzten Zellen gestiegen (im Falle von 7C4-M18 und 7C4-9.3 um durchschnittlich 200%, Abbildung 22).

Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen ist, dass die Leukämiezellen U937, die als Zielzellen im FACS-Kill Assay eingesetzt wurden, durch die Immobilisation von B7H3 proliferieren. U937 (ATCC® CRL-1593.2™) ist eine lymphoide, myeloische Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit histiozytärem Lymphom gewonnen wurde (Sundström and Nilsson, 1976). Diese Zelllinie gilt als eine der wenigen menschlichen Linien, die noch viele der monozytären Merkmale von Zellen histiozytärem Ursprungs aufweisen (Koren, Anderson and Larrick, 1979; Olsson *et al.*, 1983). Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass das Molekül B7H3 und Zellen aus dem Monozyten-Makrophagen-System gemeinsam einen positiven Einfluss auf Tumorprogression haben könnten: Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass B7H3 und CD14 in Geweben von Nierenzellkarzinomen gemeinsam überexprimiert werden, was mit einem Fortschreiten des Tumors assoziiert ist. Diese Studie postuliert, dass B7H3 eine wichtige Rolle bei der Angiogenese von Nierenzellkarzinomen spielt, die zudem durch CD14⁺ Monozyten beeinflusst werden könnte (Li *et al.*, 2014). Zudem zeigen Mao *et al.*, dass bei kolorektalen Karzinomen ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von B7H3 und der Dichte der infiltrierenden Makrophagen besteht, während beide negativ mit dem Überleben der Krebspatienten korreliert waren. Da darüber hinaus der mutmaßliche B7H3-Rezeptor auf aktivierten Monozyten und Makrophagen vermutet wird, weisen diese Ergebnisse auf eine mögliche Rolle von

Makrophagen und eines B7H3-Signals bei der Progression von Tumoren hin (Mao *et al.*, 2017). Somit wäre es erdenkbar, dass B7H3 einen proliferativen Einfluss auf die U937 Zelllinie hätte.

Weiterführende Experimente im Thymidin-Inkorporations-Assay, in denen die B7H3- und Endoglin-BiRecs immobilisiert wurden, um die Proliferation von U937 zu beobachten (Daten nicht gezeigt) ermöglichten es leider nicht, eine klare Aussage darüber zu treffen, ob durch die Immobilisation von B7H3 zur Proliferation von U937-Zellen führt. Zudem würde der hier aufgeführte Erklärungsansatz nicht die massiv erhöhte Tumorzellzahl in den mit Endoglin-BiRecs und BiCos behandelten Proben erklären (Kro22-M18 + Kro22-9.3 in Abbildung 22). Zusätzlich dazu, fällt in Abbildung 22 auf, dass die verschiedenen PBMC-Spendenden teilweise eine hohe Diskrepanz im Tumorkill aufweisen, sodass hier zusätzliche Wiederholungen des Experimentes mit weiteren PBMC-Spendenden vonnöten sind, um diesen beobachteten Effekt der Proliferation von Tumorzellen zu bestätigen.

4.3.2 Effizienter Tumorkill in den Szenarien 2 und 3

Ogleich die Ergebnisse, in der Kombination von BiCos und BiRecs, die gegen dasselbe Epitop oder zwei Epitope in unmittelbarer Nähe zueinander gerichtet sind überraschen, stellen sich die Daten mit den Kombinationen von Szenario 2 und 3 wie erwartet dar: Im Einklang mit den Proliferationsdaten führen die Kombinationen, die sich gegen weit entfernte Epitope auf B7H3 richten oder ein gänzlich unterschiedliches Antigen, Endoglin, richten, zu einem deutlichen Tumorkill im Vergleich zu den BiRecs allein oder der Negativkontrolle. Wie jedoch bereits in anderen Experimenten beobachtet, stellt 8H8-M18 wieder die Ausnahme dar, da dieser BiRec mit allen kombinierten BiCos zu einer kompletten Tumordepletion im Assay führt. Wie bereits in 4.1.1 ausgeführt, erklären wir diesen Effekt mit der besonderen Kinetik und Affinität des Klons 8H8 zu B7H3.

Zusätzlich zur Tumordepletion muss die Aktivierung der T-Zellen diskutiert werden. Die Aktivierungsdaten der CD4⁺ T-Zellen korrelieren nicht vollständig mit dem Tumorkill. So ist zum Beispiel der Anstieg der Aktivierung durch die Kombination von 7C4-M18 und Kro22-9.3 nicht signifikant, während die

Negativkontrolle MOPC-M18 mit dem BiCo 8D9-9.3 einen signifikanten Anstieg der CD69-Expression aufweist. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wiederum, ist in keiner Probe signifikant dem BiRec allein gegenüber erhöht. CD69 einer der frühesten nachweisbaren Aktivierungsmarker von T-, B- und NK-Zellen (Hara *et al.*, 1986; Lanier *et al.*, 1988; Testi, Phillips and Lanier, 1989). Die Expression von CD69 auf T-Zellen erreicht nach 16-24 Stunden ihren Höhepunkt und nimmt nach Wegfall der Stimulation stetig ab (Craston *et al.*, 1997). Somit sollte in weiteren Experimenten ein früherer Zeitpunkt zur Messung gewählt werden. Zusätzlich sollten diese Experimente mit weiteren PBMC-Spendenden wiederholt werden, da sie eine hohe Diskrepanz aufweisen.

4.4 Nachhaltige T-Zellaktivierung und Gedächtnisbildung durch die Szenarien 2 und 3

Neben dem Tumorkill, Proliferation und Aktivierung von T-Zellen, wurde die Bildung immunologischer Gedächtniszellen mittels eines Langzeitaktivierungsassays untersucht. Dabei wurde der Stimulus durch Antigen und Antikörper aufrechterhalten, indem monozytendepletierte Spender-PBMCs zweimal mit U937 als Zielzellen und Antikörpern stimuliert wurden. Somit wurden die Auswirkungen unserer Antikörperkonstrukte auf die Bildung des immunologischen Gedächtnisses durch die Zusammensetzung der verschiedenen T-Zell Subpopulationen evaluiert.

Wie in den Abbildungen 25-27 graphisch dargestellt, führt die Kombination der BiCos und BiRecs, die gegen zwei weit voneinander entfernte Epitope oder gegen zwei verschiedene Zielantigene auf einer Zielzelle zu einer ausgeprägten Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ Effektor- und zentralen Gedächtniszellen. Die Kombinationen, die dasselbe Epitop oder Epitope, die nah aneinander liegen (z.B.: 8D9-M19 + 8H8-9.3) binden, sind in der Zusammensetzung der Subpopulationen vergleichbar mit der Negativkontrolle MOPC. Wie bereits in den Proliferations- und Tumorkillassays beobachtet, stellt der BiRec 8H8-M18 eine Ausnahme dar. Dieser zeigt in Kombination mit allen BiCos, insbesondere mit 7C4-9.3 und 8D9-9.3 (siehe Abbildung 25 und 26), nach der Restimulation einen

Shift der T-Zellsubpopulationen zu Effector Memory T-Zellen. Wie bereits unter 4.1.1 postuliert, kann dies anhand der besonders hohen Affinität von 8H8 an B7H3 und der sehr stabilen Bindungskinetik erklärt werden.

Die *in vitro* Daten weisen darauf hin, dass analog zum Kill und den Proliferationsdaten, die Zugabe von einem BiCo mit richtiger Zielantigenwahl (Szenario 2 und 3) einen massiven kostimulatorischen Nutzen hat und zur verbesserten Formation von T-Gedächtniszellen führt. Die nachhaltige Proliferation und Aktivierung der T-Zellen, sowie die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses, sind unerlässlich für die Überwindung der immunsuppressiven Mikroumgebung, die häufig durch solide Tumore hervorgerufen wird. Zur endgültigen Beurteilung des Einflusses der Kombination aus BiRec und BiCo auf die Bildung des immunologischen Gedächtnisses gegen Tumorzellen sind jedoch weitere Untersuchungen -insbesondere *in vivo* - erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, auf das vielversprechende Potenzial von bispezifischen CD28-Kostimulatoren für die Kombination mit T-Zellrekrutierenden CD3-Antikörperkonstrukten hinweisen. Die hier untersuchten BiRecs (mit Ausnahme von 8H8-M18) in Kombination mit BiCos, die sich gegen weit entfernte Epitope auf B7H3 richten oder ein gänzlich unterschiedliches Molekül wie Endoglin binden, führen im Vergleich zu der alleinigen BiRec-Behandlung, zu einer verbesserten T-Zellproliferation, T-Zellaktivierung, Tumordepletion und T-Zellgedächtnisbildung.

4.5 Zwei verschiedene Zielantigene auf einer Zielzelle als Leitkombination

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, zur optimalen Antigenwahl für den kombinatorischen Ansatz von CD3 T-Zellrekrutierenden Antikörpern und kostimulatorischen bispezifischen CD28 Antikörper durch funktionelle *in vitro* Charakterisierung beizutragen.

Die hier beschriebenen Antigene B7H3 und Endoglin wurden im Hinblick auf das Prinzip des „Dual Targeting“ ausgewählt. Im Gegensatz zu hämatologischen Krebserkrankungen, bei denen die entarteten Zellen und Effektorzellen im Blut unmittelbar miteinander in Kontakt treten können, ist die Bekämpfung von soliden Tumoren eine komplexere Herausforderung. Die therapeutischen Antikörper müssen sowohl das umliegende Gewebe als auch den Tumor selbst penetrieren und Effektorzellen müssen erst einmal zum Tumor gelangen. Das „Dual Targeting“, stellt eine Alternative zur direkten antikörpervermittelten Tumorzelllyse dar, da nicht nur der Tumor durch die Bindung an TAAs angegriffen wird, sondern auch die tumorversorgenden Blutgefäße durch die bispezifischen Konstrukte erkannt werden. Wir nehmen an, dass durch das gleichzeitige Abzielen auf Tumor und assoziierte Blutgefäße, der Zugang von T-Zellen zum Tumor erleichtert wird. Wie in 1.7 beschrieben, sind B7H3 und Endoglin Antigene, die nicht nur auf Tumorgewebe überexprimiert sind, sondern auch auf den zugehörigen Tumorgefäßen. Somit sind diese Moleküle attraktive Zielantigene und wurden deswegen für dieses Projekt ausgewählt.

In der Zusammenschau der Daten, lässt sich schlussfolgern, dass die beste und zuverlässigste Steigerung der T-Zellproliferation, -aktivierung, -gedächtnisbildung und Tumordepletion durch die Kombination der bispezifischen Konstrukte, die sich gegen weit entfernte Epitope auf einem Molekül richten oder ein gänzlich unterschiedliches Molekül binden, erreichen lässt. Jedoch hat das Szenario 3 einen erheblichen Vorteil gegenüber dem Szenario 2:

Eine zusätzliche Spezifität und geringere Toxizität für gesundes Gewebe. Da tumorassoziierte Antigene in ihrer Expression nicht streng auf Tumorgewebe limitiert sind, können bispezifische T-Zellrekrutierende Antikörper eine gewisse Toxizität gegen Gewebe besitzen, die diese Antigene physiologischer Weise exprimieren. Das Einbeziehen eines Kostimulators, der sich gegen ein weiteres tumorassoziiertes Antigen auf derselben Krebszelle richtet, verringert die Wahrscheinlichkeit der Toxizität gegenüber gesundem Gewebe erheblich und erhöht maßgeblich die Spezifität der Therapie gegen den Tumor.

Mit Hinblick auf die beachtliche Steigerung der T-Zellproliferation, -aktivierung, -gedächtnisbildung und Tumordepletion durch das Szenario 3 und dem zusätzlichen Aspekt der verbesserten Spezifität und geringerer Toxizität der Antikörperkombination, wurde die Kombination von BiCos und BiRecs als Leitkombination gewählt, die sich gegen zwei verschiedene Antigene auf einer Tumorzelle richten. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass diese Kombination einen immuntherapeutischen Ansatz bieten könnte, der die Wirksamkeit der bereits klinisch eingesetzten bispezifischen T-Zellrekrutierenden Antikörper wesentlich verbessert könnte.

4.6 Ausblick

Bispezifische CD3-Antikörper, die sowohl zur T-Zellrekrutierung führen als auch das Signal 1 zur T-Zellaktivierung liefern (Abbildung 1), stellen einen aufstrebenden Ansatz der Immuntherapie gegen Krebs dar. Obwohl solche Moleküle bereits ihren Weg in die Klinik gefunden haben, erreichen sie meist nicht die Wirksamkeit der CAR-T-Zelltherapie (Zhukovsky, Morse and Maus, 2016). Der Ansatz der CAR-T-Zellen ist den T-Zellrekrutierenden bispezifischen Antikörpern funktionell sehr ähnlich, stellt aber zusätzlich zu Signal 1, das Signal 2 für die T-Zellaktivierung für sich selbst bereit (Maher *et al.*, 2002; Weinkove *et al.*, 2019). In dieser Dissertation evaluierten wir einen kombinatorischen Ansatz mit einem bispezifischen CD3-Antikörper, der Signal 1 liefert, gepaart mit einem bispezifischen CD28-Kostimulator, der Signal 2 beisteuert. Ziel war es die optimale Zielantigenwahl der Kombination zu ermitteln, um diesen therapeutischen Ansatz auf andere Antikörperkonstrukte mit anderen Zielmolekülen anwenden zu können. Die ermittelte Leitkombination besteht aus Antikörpern, die gegen zwei verschiedene Zielmoleküle auf einer Tumorzelle gerichtet sind (Szenario 3, Abbildung 4). Diese Kombination führt zu einer massiven zielzellrestringierten T-Zellproliferation, -aktivierung und Tumorzelldepletion *in vitro*, im Vergleich zum CD3-Antikörper allein. Darüber hinaus bietet dieser Ansatz zusätzliche Spezifität und geringere Toxizität für gesundes Gewebe und hat das Potential sich zu einer gut verträgliche Standardtherapie mit verstärkter Antitumorwirkung zu entwickeln.

Der nächste Schritt in der Entwicklung des kombinatorischen Ansatzes sind Tierversuche, in denen die Charakterisierung der Antikörper *in vivo* erfolgt. Ein xenogenes Metastasenmausmodell, bei dem B7H3- und Endoglin-positive Tumorzellen intravenös injiziert werden und Metastasen in der Lunge bilden, wurde bereits von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Professor Salih an der Universitätsklinik Tübingen etabliert und erprobt. Hier erzielt die Kombination von 7C4-M18 und Kro22-9.3 eine signifikante und effektive Tumorzelldepletion im Vergleich zu den Kontrollen (Salih, unveröffentlicht). Weitere Mausversuche, wie Präventions- und etablierte Tumormodelle, sind bereits in Planung, um eine ausreichende Beurteilung des Szenarios 3 im Tiermodell zu ermöglichen.

Derzeit wird mit Unterstützung durch den Validierungsfond der Helmholtz-Gemeinschaft eine GMP-konforme Produktion von von einer BiRec/BiCo Kombination durchgeführt. Eine Klinische Studie, die eine ausgewählte BiRec/BiCo Kombination testen soll, ist für das Jahr 2023 beabsichtigt.

5 Zusammenfassung

Die Aktivierung von T-Zellen wird durch die Interaktion zwischen dem TCR/CD3-Komplex und dem Peptid-Haupthistokompatibilitätskomplex (Signal 1) reguliert. Dieses erste Signal kann durch ein zweites Signal verstärkt werden, das von einem kostimulatorischen Rezeptor wie z.B. CD28 bereitgestellt wird. Klassische T-Zellaktivierende bispezifische Antikörper (bsAb) ahmen das Signal 1 nach, indem sie tumorassoziierte Antigene mit dem TCR/CD3 auf T-Zellen quervernetzen und so die Lyse von Tumorzellen durch aktivierte T Zellen ermöglichen. Bereits drei T-Zellaktivierende bsAb haben eine Marktzulassung erhalten und zahlreiche solcher bispezifischen Antikörperkonstrukte befinden sich in klinischer Erprobung. Obwohl einige dieser Antikörper bei Leukämiepatienten einen beträchtlichen therapeutischen Erfolg gezeigt haben, ist die Wirksamkeit gegen solide Tumore begrenzt.

In dieser Arbeit wird ein Ansatz weiterverfolgt, bei dem Signal 1 induzierende bispezifische Antikörper mit einem zweiten bispezifischen Antikörperkonstrukt, welches Signal 2 über CD28 induziert kombiniert werden, um den Antitumoreffekt von T-Zellen zu steigern.

Die bispezifischen Konstrukte werden in vier verschiedenen Szenarien getestet (1. Ein Antigen auf einer Tumorzelle, selbes Epitop, 2. Ein Antigen auf einer Tumorzelle, zwei verschiedene Epitope, 3. Zwei verschiedene Antigene auf einer Tumorzelle, 4. Zwei verschiedene Antigene auf zwei Tumorzellen). Insbesondere wird in dieser Arbeit festgestellt, dass die zuverlässigste Steigerung der T-Zellaktivierung und Tumorzelldepletion durch eine Kombination von bsAb erreicht wird, die sich gegen zwei unterschiedliche Moleküle auf einer Tumorzelle richtet. Dieser Ansatz bietet zusätzliche Spezifität und geringere Toxizität für gesundes Gewebe. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination von bereits klinisch eingesetzten CD3 stimulierenden bsAb mit CD28-kostimulierenden bispezifischen Antikörperkonstrukten die Antitumoraktivität von T-Zellen wesentlich verbessert könnte.

.

6 Literaturverzeichnis

Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. and Chothia, C. (1997) 'Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins' Edited by I. A. Wilson', *Journal of Molecular Biology*, 273(4), pp. 927–948. doi: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1354>.

Alt, F. W. *et al.* (1992) 'VDJ recombination', *Immunology Today*, 13(8), pp. 306–314. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90043-7).

Arden, B. *et al.* (1995) 'Human T-cell receptor variable gene segment families', *Immunogenetics*, 42(6), pp. 455–500. doi: 10.1007/BF00172176.

Azuma, M. *et al.* (1993) 'B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28', *Nature*, 366(6450), pp. 76–79. doi: 10.1038/366076a0.

Baldwin, R. W. (1955) 'Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours', *British journal of cancer*, 9(4), pp. 652–657. doi: 10.1038/bjc.1955.70.

Baldwin, R W (1955) 'Immunity to transplanted tumour: the effect of tumour extracts on the growth of homologous tumours in rats', *British journal of cancer*, 9(4), pp. 646–651. doi: 10.1038/bjc.1955.69.

Barbara, N. P., Wrana, J. L. and Letarte, M. (1999) 'Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily', *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), pp. 584–594. doi: 10.1074/jbc.274.2.584.

Bargou, R. *et al.* (2008) 'Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell–Engaging Antibody', *Science*, 321(5891), pp. 974 LP – 977. doi: 10.1126/science.1158545.

Behrens, G. *et al.* (2018) 'Krebs durch Übergewicht, geringe körperliche Aktivität und ungesunde Ernährung', *Deutsches Arzteblatt International*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 115(35–36), pp. 578–585. doi: 10.3238/arztebl.2018.0578.

Behring and Kitasato (1890) 'Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren', *Dtsch med Wochenschr*, 16(49), pp. 1113–1114. doi: 10.1055/s-0029-1207589.

Bennett, S. R. M. *et al.* (1998) 'Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling', *Nature*, 393(6684), pp. 478–480. doi: 10.1038/30996.

Bluemel, C. *et al.* (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), pp. 1197–1209. doi: 10.1007/s00262-010-0844-y.

Blumberg, R. S. *et al.* (1990) 'Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), pp. 7220–7224. doi: 10.1073/pnas.87.18.7220.

Brack, C. *et al.* (1978) 'A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination', *Cell*. Elsevier, 15(1), pp. 1–14. doi: 10.1016/0092-8674(78)90078-8.

Brandl, M. *et al.* (1999) 'Bispecific antibody fragments with CD20 × CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma', *Experimental Hematology*, 27(8), pp. 1264–1270. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(99\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(99)00072-7).

Braster, R., O'Toole, T. and van Egmond, M. (2014) 'Myeloid cells as effector cells for monoclonal antibody therapy of cancer', *Methods*, 65(1), pp. 28–37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.020>.

Bray, F. *et al.* (2012) 'Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study', *The Lancet Oncology*, 13(8), pp. 790–801. doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70211-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70211-5).

Bray, F. *et al.* (2021) 'The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide', *Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 127(16), pp. 3029–3030. doi: <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>.

Buchholz, C. J. *et al.* (2018) 'CAR-T-Zell-Therapie: Aussichten und Risiken', *Dtsch Arztebl International*, 115(7), p. [38]. Available at: <https://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=196295>.

Burnet, F. M. (1970) 'The Concept of Immunological Surveillance', in *Progress in Tumor Research*, pp. 1–27. doi: 10.1159/000386035.

- Burrows, F. J. *et al.* (1995) 'Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy.', *Clinical Cancer Research*, 1(12), pp. 1623 LP – 1634. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/1/12/1623.abstract>.
- Capel, P. J. A. *et al.* (1994) 'Heterogeneity of Human IgG Fc Receptors', *ImmunoMethods*, 4(1), pp. 25–34. doi: <https://doi.org/10.1006/immu.1994.1004>.
- Carter, P. J. (2006) 'Potent antibody therapeutics by design', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 6, p. 343. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1837>.
- Chen, L. and Flies, D. B. (2013) 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *Nature reviews. Immunology*. 2013/03/08, 13(4), pp. 227–242. doi: 10.1038/nri3405.
- Chen, Z. and Freedman, M. (2008) 'CD16+ $\gamma\delta$ T cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: Potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis', *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 128, pp. 219–227. doi: 10.1016/j.clim.2008.03.513.
- Chien, Y., Meyer, C. and Bonneville, M. (2014) ' $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 32(1), pp. 121–155. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120216.
- Claus, C. *et al.* (2019) 'Tumor-targeted 4-1BB agonists for combination with T cell bispecific antibodies as off-the-shelf therapy', *Science translational medicine*, 11(496), p. eaav5989. doi: 10.1126/scitranslmed.aav5989.
- Coley, W. B. (1910) 'The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)', *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3(Surg Sect), pp. 1–48. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19974799>.
- Collins, S. J., Gallo, R. C. and Gallagher, R. E. (1977) 'Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture', *Nature*, 270(5635), pp. 347–349. doi: 10.1038/270347a0.
- Craston, R. *et al.* (1997) 'Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells', *Journal of Immunological Methods*, 209(1), pp. 37–45. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00143-9).

- Curtsinger, J. M. *et al.* (1999) 'Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells', *The Journal of Immunology*, 162(6), pp. 3256 LP – 3262. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/162/6/3256.abstract>.
- Curtsinger, J. M. *et al.* (2005) 'Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation', *The Journal of Immunology*, 174(8), pp. 4465 LP – 4469. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4465.
- Curtsinger, J. M. and Mescher, M. F. (2010) 'Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation', *Current Opinion in Immunology*, 22(3), pp. 333–340. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013>.
- Dallas, N. A. *et al.* (2008) 'Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy', *Clinical Cancer Research*, 14(7), pp. 1931 LP – 1937. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4478.
- Diamantis, N. and Banerji, U. (2016) 'Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment', *British Journal Of Cancer*. The Author(s), 114, p. 362. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.435>.
- DiLillo, D. J. and Ravetch, J. V (2015) 'Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions', *Cancer Immunology Research*, 3(7), pp. 704 LP – 713. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0120.
- Dunn, G. P. *et al.* (2002) 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape', *Nature Immunology*, 3(11), pp. 991–998. doi: 10.1038/ni1102-991.
- Edelman, G. M. and Gally, J. A. (1962) 'The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 116(2), pp. 207–227. doi: 10.1084/jem.116.2.207.
- Edelman, G. M. and Poulik, M. D. (1961) 'Studies on structural units of the gamma-globulins', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 113(5), pp. 861–884. doi: 10.1084/jem.113.5.861.
- Ehrlich, P. (1900) 'Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life', *Proceedings of the Royal Society of London*. Royal Society, 66(424–433), pp. 424–448. doi: 10.1098/rspl.1899.0121.

Ehrlich, P. (1908) *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Available at: <https://books.google.de/books?id=PRNqHAAACAAJ>.

El-Gohary, Y. M. *et al.* (2007) 'Endoglin (CD105) and Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Markers in Prostatic Adenocarcinoma', *American Journal of Clinical Pathology*, 127(4), pp. 572–579. doi: 10.1309/X6NXYE57DLUE2NQ8.

Engel, M. (2020) 'In vitro characterization of bispecific CD28 antibodies: contributions to a combinatorial approach for cancer antibody therapy', Masterarbeit Molecular Medicine, Universität Tübingen

Fenton, R. G. and Longo, D. L. (1995) 'Genetic Instability and Tumor Cell Variation: Implications for Immunotherapy', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(4), pp. 241–243. doi: 10.1093/jnci/87.4.241.

Ferlay J *et al.* (2020) *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available at: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/about> (Accessed: 8 August 2021).

Frauwirth, K. A. *et al.* (2002) 'The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism', *Immunity*. Elsevier, 16(6), pp. 769–777. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00323-0.

Gellert, M. (2002) 'V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews, 71(1), pp. 101–132. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203.

Gersten, O. and Wilmoth, J. R. (2002) 'The cancer transition in Japan since 1951', *Demographic Research*. JSTOR, 7, pp. 271–306.

Gougos, A. and Letarte, M. (1988) 'Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(6), pp. 1925–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262644>.

Grawunder, U., West, R. B. and Lieber, M. R. (1998) 'Antigen receptor gene rearrangement', *Current opinion in immunology*. Department of Pathology, University of Southern California School of Medicine, Los Angeles 90033, USA., 10(2), pp. 172–180. doi: 10.1016/s0952-7915(98)80246-x.

- Gredner, T. *et al.* (2018) 'Krebs durch Infektionen und ausgewählte Umweltfaktoren', *Deutsches Arzteblatt International*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 115(35–36), pp. 586–593. doi: 10.3238/arztebl.2018.0586.
- Grillo-Lopez, A. J. *et al.* (2000) 'Rituximab The First Monoclonal Antibody Approved for the Treatment of Lymphoma', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, pp. 1–9. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1389201003379059>.
- Grimm, E. A., Mazumder, A. and Rosenberg, S. A. (1982) 'In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes: V. Generation of allospecific cytotoxic lymphocytes to nonimmunogenic antigen by supplementation of in vitro sensitization with partially purified T-cell growth factor', *Cellular Immunology*, 70(2), pp. 248–259. doi: [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(82\)90326-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(82)90326-4).
- Guermonprez, P. *et al.* (2002) 'Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 20(1), pp. 621–667. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.
- Gust, J. *et al.* (2017) 'Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells', *Cancer discovery*. 2017/10/12, 7(12), pp. 1404–1419. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0698.
- Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discovery*, 12(1), pp. 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer', *cell*. Elsevier, 100(1), pp. 57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hara, T. *et al.* (1986) 'Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens.', *Journal of Experimental Medicine*, 164(6), pp. 1988–2005. doi: 10.1084/jem.164.6.1988.
- Hilschmann, N. and Craig, L. C. (1965) 'Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53(6), pp. 1403–1409. doi: 10.1073/pnas.53.6.1403.

- Hobeika, E., Nielsen, P. J. and Medgyesi, D. (2015) 'Signaling mechanisms regulating B-lymphocyte activation and tolerance', *Journal of Molecular Medicine*, 93(2), pp. 143–158. doi: 10.1007/s00109-015-1252-8.
- Hollingsworth, R. E. and Jansen, K. (2019) 'Turning the corner on therapeutic cancer vaccines', *npj Vaccines*, 4(1), p. 7. doi: 10.1038/s41541-019-0103-y.
- Inaba, K. *et al.* (1994) 'The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 180(5), pp. 1849–1860. doi: 10.1084/jem.180.5.1849.
- Irving, B. A. and Weiss, A. (1991) 'The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways', *Cell*, 64(5), pp. 891–901. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90314-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90314-O).
- Iwai, Y. *et al.* (2002) 'Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002/09/06. National Academy of Sciences, 99(19), pp. 12293–12297. doi: 10.1073/pnas.192461099.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2015) 'Control of adaptive immunity by the innate immune system', *Nature immunology*, 16(4), pp. 343–353. doi: 10.1038/ni.3123.
- June, C. H. *et al.* (1987) 'T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression', *Molecular and cellular biology*, 7(12), pp. 4472–4481. doi: 10.1128/mcb.7.12.4472.
- June, C. H. *et al.* (1990) 'Role of the CD28 receptor in T-cell activation', *Immunology Today*, 11, pp. 211–216. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90085-N](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90085-N).
- Jung, G. *et al.* (1986) 'Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 83(12), pp. 4479–4483. doi: 10.1073/pnas.83.12.4479.

- Jung, G., Ledbetter, J. A. and Muller-Eberhard, H. K. (1987) 'Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(13), pp. 4611–4615. doi: 10.1073/pnas.84.13.4611.
- Jung, G. and Müller Eberhard, H. J. (1988) 'An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates', *Immunology Today*, 9(9), pp. 257–260. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(88\)91304-7](https://doi.org/10.1016/0167-5699(88)91304-7).
- Jung, K. and Choi, I. (2013) 'Emerging Co-signaling Networks in T Cell Immune Regulation', *Immune Netw.* The Korean Association of Immunobiologists, 13(5), pp. 184–193. Available at: <https://doi.org/10.4110/in.2013.13.5.184>.
- Kambayashi, T. and Laufer, T. M. (2014) 'Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?', *Nature Reviews Immunology*, 14(11), pp. 719–730. doi: 10.1038/nri3754.
- Kantarjian, H. *et al.* (2017) 'Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia', *New England Journal of Medicine*, 376(9), pp. 836–847. doi: 10.1056/NEJMoa1609783.
- Khong, H. T. and Restifo, N. P. (2002) 'Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes', *Nature immunology*, 3(11), pp. 999–1005. doi: 10.1038/ni1102-999.
- Kiessling, R. *et al.* (1975) '„Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 5(2), pp. 117–121. doi: 10.1002/eji.1830050209.
- Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H. (1975) '„Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 5(2), pp. 112–117. doi: 10.1002/eji.1830050208.
- KÖHLER, G. and MILSTEIN, C. (1975) 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity', *Nature*, 256(5517), pp. 495–497. doi: 10.1038/256495a0.

- Kojima, H. *et al.* (1994) 'Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes', *Immunity*, 1(5), pp. 357–364. doi: [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90066-3).
- Koren, H. S., Anderson, S. J. and Larrick, J. W. (1979) 'In vitro activation of a human macrophage-like cell line', *Nature*, 279(5711), pp. 328–331. doi: 10.1038/279328a0.
- Kurosawa, Y. *et al.* (1981) 'Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes', *Nature*, 290(5807), pp. 565–570. doi: 10.1038/290565a0.
- Lanier, L. L. *et al.* (1988) 'Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen.', *Journal of Experimental Medicine*, 167(5), pp. 1572–1585. doi: 10.1084/jem.167.5.1572.
- Lebrin, F. *et al.* (2004) 'Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 23(20), pp. 4018–4028. doi: 10.1038/sj.emboj.7600386.
- Lee, Y. *et al.* (2017) 'Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function', *Cell Research*, 27(8), pp. 1034–1045. doi: 10.1038/cr.2017.90.
- Li, M. *et al.* (2014) 'Overexpression of B7-H3 in CD14+ monocytes is associated with renal cell carcinoma progression.', *Medical oncology (Northwood, London, England)*. United States, 31(12), p. 349. doi: 10.1007/s12032-014-0349-1.
- Lien, E. *et al.* (1999) 'Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(47), pp. 33419–33425. doi: 10.1074/jbc.274.47.33419.
- Linsley, P. S. *et al.* (1991) 'Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 173(3), pp. 721–730. doi: 10.1084/jem.173.3.721.

- Linsley, P. S., Clark, E. A. and Ledbetter, J. A. (1990) 'T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), pp. 5031–5035. doi: 10.1073/pnas.87.13.5031.
- Lollini, P.-L. *et al.* (2006) 'Vaccines for tumour prevention', *Nature Reviews Cancer*, 6(3), pp. 204–216. doi: 10.1038/nrc1815.
- Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B. (1975) 'Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome', *Blood*, 45(3), pp. 321–334. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V45.3.321.321>.
- van der Maaten, L. and Hinton, G. (2008) 'Visualizing data using t-SNE', *Journal of Machine Learning Research*, 9, pp. 2579–2605.
- Maher, J. *et al.* (2002) 'Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor', *Nature Biotechnology*, 20(1), pp. 70–75. doi: 10.1038/nbt0102-70.
- Manger, B. *et al.* (1985) 'T cell activation: differences in the signals required for IL 2 production by nonactivated and activated T cells.', *The Journal of Immunology*, 135(6), pp. 3669 LP – 3673. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/135/6/3669.abstract>.
- Mao, Y. *et al.* (2017) 'Cancer cell-expressed B7-H3 regulates the differentiation of tumor-associated macrophages in human colorectal carcinoma', *Oncology letters*. 2017/09/14. D.A. Spandidos, 14(5), pp. 6177–6183. doi: 10.3892/ol.2017.6935.
- Marincola, F. M. *et al.* (1999) 'Escape of Human Solid Tumors from T-Cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance', *Advances in Immunology*. Academic Press, 74, pp. 181–273. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60911-6.
- Martin, P. J. *et al.* (1986) 'A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes.', *The Journal of Immunology*, 136(9), pp. 3282 LP – 3287. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/136/9/3282.abstract>.
- Mathias, U. *et al.* (2015) 'Tissue-based map of the human proteome', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 347(6220), p. 1260419. doi: 10.1126/science.1260419.

- Maule, M. and Merletti, F. (2012) 'Cancer transition and priorities for cancer control', *The Lancet Oncology*. Elsevier, 13(8), pp. 745–746. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70268-1.
- McKean, D. *et al.* (1984) 'Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(10), pp. 3180–3184. doi: 10.1073/pnas.81.10.3180.
- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C. A. (1997) 'Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition', *Cell*. Elsevier, 91(3), pp. 295–298. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A. (1997) 'Innate immunity: impact on the adaptive immune response', *Current Opinion in Immunology*, 9(1), pp. 4–9. doi: [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(97\)80152-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80152-5).
- Miller, K. D. *et al.* (2019) 'Cancer treatment and survivorship statistics, 2019', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 69(5), pp. 363–385. doi: 10.3322/caac.21565.
- Minhajati, R. *et al.* (2006) 'Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers', *Pathology International*. John Wiley & Sons, Ltd, 56(12), pp. 717–723. doi: 10.1111/j.1440-1827.2006.02037.x.
- Modak, S. *et al.* (2001) 'Monoclonal Antibody 8H9 Targets a Novel Cell Surface Antigen Expressed by a Wide Spectrum of Human Solid Tumors', *Cancer Research*, 61(10), pp. 4048 LP – 4054. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/10/4048.abstract>.
- Mons, U. *et al.* (2018) 'Krebs durch Rauchen und hohen Alkoholkonsum', *Deutsches Arzteblatt International*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 115(35–36), pp. 571–577. doi: 10.3238/arztebl.2018.0571.
- Müller, D. and Kontermann, R. E. (2007) 'Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy', *Current opinion in molecular therapeutics*, 9(4), p. 319–326. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/17694444>.
- Neelapu, S. S. *et al.* (2017) 'Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma', *The New England journal of medicine*. 2017/12/10, 377(26), pp. 2531–2544. doi: 10.1056/NEJMoa1707447.

- Neelapu, S. S. *et al.* (2018) 'Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(1), pp. 47–62. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.148.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V (2008) 'Fcγ receptors as regulators of immune responses', *Nature Reviews Immunology*, 8(1), pp. 34–47. doi: 10.1038/nri2206.
- Noelle, R. J. *et al.* (1992) 'A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), pp. 6550–6554. doi: 10.1073/pnas.89.14.6550.
- Olsson, I. *et al.* (1983) 'Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 α,25-dihydroxycholecalciferol.', *Cancer research*. United States, 43(12 Pt 1), pp. 5862–5867.
- Omran, A. R. (1971) 'The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change', *The Milbank Memorial Fund Quarterly*. [Milbank Memorial Fund, Wiley], 49(4), pp. 509–538. doi: 10.2307/3349375.
- Pancer, Z. and Cooper, M. D. (2006) 'THE EVOLUTION OF ADAPTIVE IMMUNITY', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 24(1), pp. 497–518. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090542.
- Perez, P. *et al.* (1985) 'Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody', *Nature*. Nature Publishing Group, 316, p. 354. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/316354a0>.
- Picarda, E., Ohaegbulam, K. C. and Zang, X. (2016) 'Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy', *Clinical Cancer Research*, 22(14), pp. 3425 LP – 3431. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2428.
- Plosker, G. L. and Figgitt, D. P. (2003) 'Rituximab - A Review of its Use in Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia', *Drugs*, 63(8), pp. 803–843. doi: 10.2165/00003495-200363080-00005.
- Porter, R. R. (1959) 'The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain', *The Biochemical journal*, 73(1), pp. 119–126. doi: 10.1042/bj0730119.

- Porter, R. R. (1963) 'CHEMICAL STRUCTURE OF γ -GLOBULIN AND ANTIBODIES', *British Medical Bulletin*, 19(3), pp. 197–201. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070056.
- Pross, H. F. and Jondal, M. (1975) 'Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes', *Clinical and experimental immunology*, 21(2), pp. 226–235. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/810282>.
- Proteinatlas.org (2021a) *The Human Protein Atlas, Cell Atlas, CD276*. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000103855-CD276/cell> (Accessed: 6 November 2021).
- Proteinatlas.org (2021b) *The Human Protein Atlas, Cell Atlas, Endoglin*. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106991-ENG/cell> (Accessed: 6 November 2021).
- Rammensee, H.-G. *et al.* (2019) 'A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), p. 307. doi: 10.1186/s40425-019-0796-5.
- Renner, C. *et al.* (1994) 'Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells', *Science*, 264(5160), pp. 833 LP – 835. doi: 10.1126/science.8171337.
- Reynolds, J. C. *et al.* (1989) 'Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: Clinical findings and implications', *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, 16(2), pp. 121–125. doi: [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(89\)90182-7](https://doi.org/10.1016/0883-2897(89)90182-7).
- Röntgen, W. C. (1896) 'ON A NEW KIND OF RAYS', *Science*, 3(59), pp. 227 LP – 231. doi: 10.1126/science.3.59.227.
- Rosenberg, S. A. *et al.* (1985) 'Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 313(23), pp. 1485–1492. doi: 10.1056/NEJM198512053132327.

- Saad, R. S. *et al.* (2003) 'Endoglin (CD105) Expression in Endometrial Carcinoma', *International Journal of Gynecological Pathology*, 22(3). Available at:
https://journals.lww.com/intjgynpathology/Fulltext/2003/07000/Endoglin__CD105_Expression_in_Endometrial.8.aspx.
- Sakano, H. *et al.* (1981) 'Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes', *Nature*, 290(5807), pp. 562–565. doi: 10.1038/290562a0.
- Sallusto, F. *et al.* (1999) 'Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions', *Nature*. Nature Publishing Group, 401(6754), pp. 708–712.
- Salmikangas, P., Kinsella, N. and Chamberlain, P. (2018) 'Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CAR T-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for Industry?', *Pharmaceutical research*. Springer US, 35(8), p. 152. doi: 10.1007/s11095-018-2436-z.
- Salmon, H. *et al.* (2012) 'Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors', *The Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 122(3), pp. 899–910. doi: 10.1172/JCI45817.
- Schneider, U., Schwenk, H.-U. and Bornkamm, G. (1977) 'Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 19(5), pp. 621–626. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>.
- Schuster, S. J. *et al.* (2017) 'Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 377(26), pp. 2545–2554. doi: 10.1056/NEJMoa1708566.
- Schweitzer, H. (1910) 'EHRlich'S CHEMOTHERAPY—A NEW SCIENCE', *Science*, 32(832), pp. 809 LP – 823. doi: 10.1126/science.32.832.809.
- Seidel, U. J. E. *et al.* (2014) 'γδ T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media S.A., 5, p. 618. doi: 10.3389/fimmu.2014.00618.

Seidel, U. J. E., Schlegel, P. and Lang, P. (2013) 'Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media S.A., 4, p. 76. doi: 10.3389/fimmu.2013.00076.

Sharpe, A. H. (2009) 'Mechanisms of costimulation', *Immunological reviews*, 229(1), pp. 5–11. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00784.x.

Skokos, D. *et al.* (2020) 'A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies', *Science Translational Medicine*, 12(525), p. eaaw7888. doi: 10.1126/scitranslmed.aaw7888.

Sliwkowski, M. X. and Mellman, I. (2013) 'Antibody Therapeutics in Cancer', *Science*, 341(6151), pp. 1192 LP – 1198. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/341/6151/1192.abstract>.

Spranger, S. *et al.* (2017) 'Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy', *Cancer Cell*, 31(5), pp. 711-723.e4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.003>.

Stebbins, R. *et al.* (2007) "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics', *The Journal of Immunology*, 179(5), pp. 3325 LP – 3331. doi: 10.4049/jimmunol.179.5.3325.

Sudhakar, A. (2009) 'History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods', *Journal of cancer science & therapy*, 1, pp. 1–4. doi: 10.4172/1948-5956.100000e2.

Sundström, C. and Nilsson, K. (1976) 'Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 17(5), pp. 565–577. doi: 10.1002/ijc.2910170504.

Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 71(3), pp. 209–249. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Testi, R., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1989) 'T cell activation via Leu-23 (CD69).', *The Journal of Immunology*, 143(4), pp. 1123 LP – 1128. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/143/4/1123.abstract>.

Thommesen, J. E. *et al.* (2000) 'Lysine 322 in the human IgG3 CH2 domain is crucial for antibody dependent complement activation', *Molecular Immunology*, 37(16), pp. 995–1004. doi: [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00010-4).

Tjandra, J. J., Ramadi, L. and McKenzie, I. F. C. (1990) 'Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients', *Immunology & Cell Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 68(6), pp. 367–376. doi: 10.1038/icb.1990.50.

Travers, P. J. *et al.* (1982) 'Lack of expression of HLA-ABC antigens in choriocarcinoma and other human tumor cell lines.', *National Cancer Institute monograph*, 60, pp. 175–80. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6181407> (Accessed: 2 April 2020).

Trentin Brum, S. *et al.* (2019) 'Endoglin is Highly Expressed in Human Mast Cells', *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 27(8). Available at:

https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Fulltext/2019/09000/Endoglin_is_Highly_Expressed_in_Human_Mast_Cells.8.aspx.

Trüb, M. *et al.* (2020) 'Fibroblast activation protein-targeted-4-1BB ligand agonist amplifies effector functions of intratumoral T cells in human cancer', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(2), p. e000238. doi: 10.1136/jitc-2019-000238.

U.S. Food & Drug Administration (2021) *Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs*. Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm> (Accessed: 30 August 2021).

Vigdorovich, V. *et al.* (2013) 'Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3', *Structure (London, England : 1993)*. 2013/04/11, 21(5), pp. 707–717. doi: 10.1016/j.str.2013.03.003.

Vineis, P. and Wild, C. P. (2014) 'Global cancer patterns: causes and prevention', *The Lancet*. Elsevier, 383(9916), pp. 549–557. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62224-2.

Wang, R. F. (1997) 'Tumor antigens discovery: perspectives for cancer therapy', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. The Feinstein Institute for Medical Research, 3(11), pp. 716–731. Available at:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9407548>.

Weinkove, R. *et al.* (2019) 'Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations', *Clinical & translational immunology*. John Wiley and Sons Inc., 8(5), pp. e1049–e1049. doi: 10.1002/cti2.1049.

Weiss, A. and Littman, D. R. (1994) 'Signal transduction by lymphocyte antigen receptors', *Cell*, 76(2), pp. 263–274. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90334-4).

Wikström, P. *et al.* (2002) 'Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer', *The Prostate*. John Wiley & Sons, Ltd, 51(4), pp. 268–275. doi: 10.1002/pros.10083.

World Health Organization (2017) *GUIDE TO CANCER - Guide to cancer early diagnosis*, World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254500/9789241511940-eng.pdf;jsessionid=2646A3E30075DB0FCA4A703A481A5494?sequence=1>.

Wu, T. T. and 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', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 132(2), pp. 211–250. doi: 10.1084/jem.132.2.211.

Yeap, W. H. *et al.* (2016) 'CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes', *Scientific Reports*, 6(1), p. 34310. doi: 10.1038/srep34310.

Zhukovsky, E. A., Morse, R. J. and Maus, M. V (2016) 'Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection', *Current opinion in immunology*. 2016/03/08, 40, pp. 24–35. doi: 10.1016/j.coi.2016.02.006.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung für Immunologie, Sektion für Experimentelle Antikörpertherapie, in der AG Jung unter Betreuung von Prof. Dr. med. Gundram Jung durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Gundram Jung, Betreuer dieser Arbeit und Dr. Latifa Zekri, Betreuerin im Labor.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch Dr. Latifa Zekri, durch mich.

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

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1:	T-Zellaktivierung am Beispiel einer CD4+ T-Zelle	8
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der IgG-Struktur	14
Abbildung 3:	Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls und verschiedener bispezifischer Antikörperkonstrukte	18
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Szenarien in der die verschiedenen Antikörperkombinationen getestet werden	22
Abbildung 5:	Epitopkartierung der anti-B7H3 monoklonalen Antikörper	47
Abbildung 6:	Übersicht über die verschiedenen bispezifischen Antikörper, die in diesem Projekt verwendet wurden	48
Abbildung 7:	SDS-Page der bispezifischen Antikörperkonstrukte unter reduzierenden Bedingungen (R) und nicht-reduzierenden Bedingungen	49
Abbildung 8:	Analytische Größenausschlusschromatographie der Antikörperkonstrukte, um die Integrität des Moleküls unter nativen Bedingungen zu überprüfen	50
Abbildung 9:	QIFIKIT®-Analyse der Antigenexpression auf den Zielzelllinien	52
Abbildung 10:	FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC ₅₀ für alle B7H3-spezifischen Konstrukte auf verschiedenen Zielzelllinien mit verschiedener B7H3-Expression	54
Abbildung 11:	FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC ₅₀ für alle Endoglin-spezifischen Konstrukte auf verschiedenen Zielzelllinien mit verschiedener Endoglin-Expression	56

Abbildung 12:	FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC ₅₀ für alle CD3-spezifischen Konstrukte auf Jurkat-Zellen	57
Abbildung 13:	FACS-Bindungsassay zur Bestimmung der EC ₅₀ für alle CD28-spezifischen Konstrukte auf Jurkat-Zellen	58
Abbildung 14:	Exemplarisches Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der B7H3-BiRecs mit Titration der B7H3-BiCos auf inaktivierten U937, um die Antikörperkonzentrationen für die folgenden Assays zu ermitteln	61
Abbildung 15:	Übersicht der BiRec Titrations (3 verschiedene PBMC-Spender) in Kombination mit den BiCos auf inaktivierten U937 und das zugehörige Verhältnis von CD28-Effekt zur Grundstimulation durch das CD3-Konstrukt	62
Abbildung 16:	Exemplarisches Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der B7H3-BiRecs mit B7H3-BiCos auf inaktivierten U937, um antikörpervermittelte proliferative Effekte auf T-Zellen zu untersuchen	64
Abbildung 17:	Übersicht aller Thymidin-Inkorporations-Assays (4 verschiedene PBMC-Spender) im direkten Vergleich der B7H3-BiRecs (10 ng/ml) in Kombination mit den B7H3-BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937	65
Abbildung 18:	Exemplarisches Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der BiRecs mit BiCos die gegen zwei Zielantigene oder ein Zielantigen auf inaktivierten U937 gerichtet sind	68
Abbildung 19:	Übersicht aller Thymidin-Inkorporations-Assays (4 verschiedene PBMC-Spender) im direkten Vergleich der BiRecs (10 ng/ml) in Kombination mit den BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937	69

Abbildung 20:	Exemplarisches Thymidin-Inkorporations-Assay, Titration der BiRecs mit BiCos auf inaktivierten U937, HL-60, K562 und einem 1:1 Mix von HL-60 und K562 Zellen mit monozytendepletierten PBMC (E:T 2:1/ E:T 4:1 in den Kontrolltitrationen auf HL-60 und K562)	71
Abbildung 21:	Übersicht aller Thymidin-Inkorporations-Assays (4 verschiedene PBMC-Spender) im direkten Vergleich der BiRecs (10 ng/ml) in Kombination mit den BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937, HL-60, K562 und einem 1:1 Mix von HL-60 und K562 Zellen mit monozytendepletierten PBMC (E:T 2:1/ E:T 4:1 in den Kontrolltitrationen auf HL-60 und K562)	72
Abbildung 22:	Übersicht der FACS basierten Depletionsassays (3 verschiedene PBMC-Spender) mit BiRec (10 ng/ml) in Kombination mit BiCos (400 ng/ml) auf inaktivierten U937 mit monozytendepletierten PBMC (E:T 4:1)	75
Abbildung 23:	Übersicht der T-Zellaktivierung innerhalb der FACS basierten Depletionsassays (3 verschiedene PBMC-Spender)	77
Abbildung 24:	Gegenüberstellung der Histogramme und Division Indizes der Antikörperkombinationen nach drei Tagen und 6 Tagen nach zusätzlicher Restimulation. zur Beurteilung der T-Zellproliferation	81
Abbildung 25:	Die tSNE-Diagramme visualisieren die Gesamtheit der T-Zellen der verschiedenen Behandlungen im Langzeitaktivierungsassay	82
Abbildung 26:	Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen im Langzeitaktivierungsassay	84

Abbildung 27: Heatmap zur Übersicht der T-Zell
Subpopulationen im Langzeitaktivierungsassay
mit 3 gesunden PBMC-Spendern

87

9 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Gundram Jung für die Betreuung meiner Dissertation, die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die stetige Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn. Danke, dass Sie mich von Laborpraktika über meiner Masterarbeit bis hin zum akademischen Grad des Doctor medicinae be- und geleitet haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Dr. rer. nat. Latifa Zekri für ihre Betreuung dieser Dissertation im Labor. Ich bin dankbar für ihre Hilfe, konstruktive Kritik und ihren Ideen, von denen ich jeden Tag profitiert habe. Danke für die lehrreiche Zeit und auf das, dass wir in Zukunft erfolgreich miteinander weiterarbeiten.

Außerdem möchte ich mich bei Ilona Hagelstein bedanken, die nicht müde wurde meine Fragen zum FACS, Flojow und jeglichen anderen Dingen, die im Labor anfallen zu beantworten. Danke für deine Hilfe und die aufmunternden Gespräche zwischendurch.

Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Jung bedanken: Dr. Sebastian Hörner, Dr. Mariia Klimovich, Dr. Martin Pflüger, Carolin Walker, Nisha Prakash, Andrea Dobler und Beate Pömmerl. Vielen Dank für eine großartige Zeit, auch abseits des Laboralltags.

Vielen Dank an das Interdisziplinäres Promotionskolleg Medizin der Universität Tübingen für die finanzielle, als auch fachliche Unterstützung. Ich möchte mich außerdem herzlich bei Herrn Prof. Salih für die Vorstellung dieses Projektes vor dem Auswahlkomitee bedanken.

Genauso möchte ich mich bei allen Elchen für die schöne Zeit in der Abteilung Immunologie bedanken. Vielen Dank an Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, dass Sie nicht nur Wert auf exzellente Forschung legen, sondern auch auf ein freundliches Miteinander und eine angenehme Atmosphäre im Institut.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Herzlichen Dank an Mama, Papa, Annemarie, Adeline, Johanna und Bruno für euere Unterstützung, Motivationsschübe und offene Ohren.