

Aus der
Medizinische Klinik KKE
Translationale Immunologie

**Die Entwicklung von Immunzytokinen mit
zielzellbegrenzter IL-15-Aktivität für
die Immuntherapie der AML**

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

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

**vorgelegt von
Anton, Leonard Eugen**

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

Tag der Disputation: 05.12.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Akute Myeloische Leukämie	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3 Klassifikation	3
1.1.4 Klinische Präsentation und Diagnostik	3
1.1.5 Therapie	4
1.1.6 Prognose.....	5
1.2 Antikörperbasierte Immuntherapie	6
1.2.1 Struktureller Aufbau von Antikörper	6
1.2.2 Physiologie der Antikörper und Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC)	6
1.2.3 Tumorantigene	8
1.2.4 Onkologische Therapieansätze mit monospezifischen Antikörpern	9
1.2.5 Fc-optimierte Antikörper	10
1.2.6 Weitere Antikörperformate	11
1.2.7 Zytokine und Immunzytokine	11
1.3 Interleukin-15	14
1.3.1 Funktion IL-15	14
1.3.2 IL-15 in der onkologischen Immuntherapie.....	14
1.3.3 IL-15-Immunzytokine.....	16
1.4 IL-15 MIC - Modified Immunocytokines	17
1.5 CLEC12A	19
1.6 Developability und Produktion von IL15-Fusionsproteinen	19
1.7 Ziel/Fragestellung	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Software	23
2.1.3 Verbrauchsmaterial	23
2.1.4 Reagenzien	23

2.1.5 Kits	24
2.1.6 Fluoreszenzantikörper/-reagenzien	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.2 PBMC/Patientenproben	25
2.2.3 Durchflusszytometrie.....	26
2.2.4 Incucyte Live-Cell Imaging	31
2.2.5 ELISA	32
2.2.6 Produktion der Konstrukte.....	33
2.2.7 Visualisierung des IL-15 Moleküls und der eingebrachten Mutationen	37
2.2.8 Signifikanztestung	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Charakterisierung MIC12	38
3.1.1 Antigenbindung der CLEC12A Antikörper	38
3.1.2 IL-15R-Bindung.....	39
3.1.3 Aktivierung und Proliferation von Effektorzellen	40
3.1.4 Zytotoxizität gegen Zelllinien und primäre AML-Zellen	43
3.2 Optimierung der Produzierbarkeit von MIC12	46
3.2.1 Produzierbarkeit der MIC12-Mutanten und topografische Einordnung der Mutationen. 46	
3.2.2 Funktionelle Charakterisierung der eingeführten Mutanten	49
3.2.3 Bindung der Mutanten an den IL15-Rezeptor	51
3.2.4 Zytotoxizität der Mutanten H20E und L45E.....	52
4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung	63
6 Literaturverzeichnis.....	65
7 Erklärung zum Eigenanteil	76
8 Veröffentlichungen	78
9 Danksagung.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Schematische Darstellung eines MIC Moleküls und dessen zielzellrestringierten IL-15 Aktivität	18
Abbildung 2 - Expression von CLEC12A auf primären AML-Zellen und der Zelllinie U937	38
Abbildung 3 - Bindung der Immunzytokine an den IL-15R α	39
Abbildung 4 - Bindungsanalyse an IL-15R $\beta\gamma$	40
Abbildung 5 - NK- und T-Zellaktivierung nach Stimulation durch MIC12	41
Abbildung 6 - INF γ -Sekretion nach Stimulation durch Immunzytokine bei verschiedenen Inkubationszeiten und -konzentrationen	42
Abbildung 7 - Proliferation von Effektorzellen nach Stimulation durch Immunzytokine und IL-15	43
Abbildung 8 - MIC12 induziert eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber U937 Zellen	44
Abbildung 9 - MIC12-vermittelte Zytotoxizität gegen primäre AML-Zellen	46
Abbildung 10 - Analyse der Produktion der Konstrukte	48
Abbildung 11 – Topografische Einordnung der IL-15-Mutationen im IL15/IL15-R $\alpha\beta\gamma$	49
Abbildung 12 - NK-Zellaktivierung nach Stimulation mit verschiedenen MIC12- Mutanten	50
Abbildung 13 - Proliferation von NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen MIC12-Mutanten	51
Abbildung 14 - Bindung der Mutanten an IL-15R α	52
Abbildung 15 - Vergleich verschiedener MIC12 Mutanten hinsichtlich Langzeitwirkung gegenüber der Zelllinie U937	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Geräte	22
Tabelle 2 - Software	23
Tabelle 3 - Verbrauchsmaterial	23
Tabelle 4 - Reagenzien	23
Tabelle 5 - Kits	24
Tabelle 6 - Fluoreszenzantikörper	24
Tabelle 7 - Signifikanzniveaus	37

Abkürzungsverzeichnis

4-1BBL	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9
5-JÜR	5-Jahres Überlebensrate
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
ADCP	Antibody dependent cellular phagocytosis
AICD	Activation induced cell death
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
Ara-C	Cytarabin
ATO	Arsentrioxid
ATRA	All-trans-Retinsäure
Bcl-2	B-Cell-Lymphoma 2
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BiTE	Bispecific T-cell engager
BSA	Bovines Serum Albumin
bsAb	Bispezifischer Antikörper
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CHO	Chinese hamster ovaries
CLEC12A	C-type lectin domain family 12 member A
CLL-1	C-type lectin-like molecule-1
CR	Komplette Remission
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CTV	Cell trace violet
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF(-R)	Epithelial growth factor (receptor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELN	European LeukemiaNet

E:T	Effector:Target
FAB	French-American-British
Fab	Antigen-binding fragment
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAP	Fibroblast activation protein
Fc	Crystallizable fragment
FCS	Fetal calf serum
FICOLL	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3
fLuc	Firefly luciferase
FN-EDA	Fibronectin containing extra domain A
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GD2	Glanglioside G2
GFP	Green fluorescence protein
gLuc	Gaussia luciferase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HER	Human epithelial growth factor receptor
hIgG	Humanes Immunglobulin G
hM1CL	Human myeloid inhibitory C-type lectin
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Healthy stem cells
IC	Immunocytokine
IgA/D/E/G/M	Immunoglobulin A/D/E/G/M
IL	Interleukin
IL15-R	Interleukin-15 Receptor
INF	Interferon
ICC	International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias
ITAM	Immune tyrosine-based activating motifs
ITIM	Immune tyrosine-based inhibiting motifs
JAK	Januskinase
K _D -Wert	Dissoziationskonstante
LB	Lysogey broth/Luria-Bertani
LSC	Leukemic stem cells

mAb	Monoklonaler Antikörper
MIC	Modified immunocytokine
MIC12	Modified immunocytokine against CLEC12A
mIgG	Murines Immunglobulin G
MRD	Minimal residual disease
NKG2D	Natural killer group 2D
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PDB	Protein Data Bank
PE	Phycoerythrin
RCSB	Research Collaboration for Structural Bioinformatics
rhIL-15	Recombinant human interleukine-15
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
SCF	Stem cell factor
scFV	Single chain variable fragment
SDIE	S239D/I332E
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size exclusion chromatography
SSC	Side scatter
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPO	Thrombopoetin
Treg	Regulatorische T-Zellen
TriKE	Trispecific Killer Engager
VEGF	Vasoepithelial growth factor
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtype
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Akute Myeloische Leukämie

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Neoplasie der myeloischen Zellreihe mit Akkumulation von klonalen, nicht-funktionalen Vorläuferzellen, sogenannten Blasten. Hieraus resultiert eine Verdrängung des Knochenmarks und der gesunden Hämatopoese [1].

Diagnostisch definiert ist die AML laut deutschen Leitlinien durch einen Anteil von myeloischen Blasten in Knochenmark oder Blut von $\geq 20\%$ oder - unabhängig vom Blastenanteil - dem Vorliegen einer der folgenden rekurrenten genetischen Aberrationen: $t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1$, $t(15;17)/PML::RARA$, $inv(16)$ bzw. $t(16;16)/CBFB::MYH11$, $DEK::NUP214$ Fusion, $RBM15::MRTFA$ Fusion, $KMT2A$ Umlagerung, $MECOM$ Umlagerung, $NUP98$ Umlagerung, $NPM1$ Mutation [1, 2] (WHO-Klassifikation von 2022 [3]). Die 2022 erschienene *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias* (ICC) fordert auch für diese Subtypen einen Blastenanteil von 10% und ergänzt für die übrigen Mutationen eine MDS/AML-Status für Blastenanteile von 10-20% [4, 5].

Mit einer Inzidenz von 3,7 von 100.000 zählt die AML zu den seltenen Erkrankungen, jedoch steigt die altersspezifische Inzidenz auf bis zu 100 von 100.000 an [2]. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 72 [2, 6, 7] betrifft die AML somit vor allem ältere Menschen. Im Erwachsenenalter ist die AML mit 88% die häufigste akute Leukämie [7] und mit 25% die zweithäufigste Leukämie generell [8]. Die Geschlechterverteilung ist annähernd ausgeglichen mit einer Inzidenzverteilung von 1,3:1 (Männer:Frauen) [7].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Grundsätzlich liegt der AML die übermäßige und klonale (bzw. subklonale) Proliferation der myeloischen Zellreihe mit Bildung von meist unreifen Blasten zugrunde. Die malignen Klone entspringen entweder dem Progenitorpool ($CD34^+CD38^+$) oder seltener dem Stammzellpool ($CD34^+CD38^-$) [2]. Durch die

Akkumulation der Blasten wird das gesunde Knochenmark und damit auch die physiologische Hämatopoese verdrängt. Dies kann zu Anämie, Thrombozytopenie und funktioneller Leukozytopenie führen.

Die Auslöser dieser klonalen Proliferation sind Mutationen in den Genen, die verschiedene zelluläre Funktionen steuern: Signaltransduktion (FLT3, KIT, KRAS, NRAS), Transkription (RUNX1, CEBPA, PML-RARA, MYH11-CBFB), Tumorsuppression (TP53, WT1), ribosomale Funktion (NPM1), DNA-Methylierung (IDH, TET, DNMT), Chromatin-Modifikation (MLL-PTD, ASXL1) sowie Komponenten des Spliceosoms. FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1 oder IDH2 sind hierbei jeweils in mindestens 20% der Patienten mutiert und bei den meisten Patienten liegen mehrere Mutationen vor [2].

FLT3-Mutationen zum Beispiel, sind eine der häufigsten genetischen Veränderungen, welche in bis zu 30% der Patienten auftreten. FLT3 (*fms like tyrosine kinase*) ist eine Rezeptortyrosinkinase, welche über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden auf hämatopoetischen Progenitorzellen das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung fördert [9]. Durch Mutationen der Intrazellulärdomänen erfolgt die konstitutive und ligandenunabhängige Aktivierung der Signaltransduktion. Dies führt zu einer Stimulation der Proliferation [10, 11].

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer AML zählen vor allem ionisierende Strahlung, Benzole, Lösungsmittel, Tabak, Ethylenoxide, Herbi- und Pestizide. Auch eine vorrangegangene Radio- und Zytostatikatherapie ist ein bedeutender Faktor. Hierbei ist die AML das am häufigsten auftretende Zweitmalignom [2]. Auch genetische Prädispositionen wie z.B. GATA2-Keimbahnmutationen oder numerische Chromosomenaberrationen (Trisomie 21) gelten als Risikofaktor [1]. Die AML kann auch aus einem myelodysplastischen Syndrom als Zwischenstufe hervorgehen [2].

1.1.3 Klassifikation

Die AML ist eine heterogene Erkrankung. Historisch hat sich die Klassifikation der AML von der French-American-British-Einteilung (FAB), die 8 Subtypen (M0-M7) anhand ihrer Morphologie beschreibt, zu der aktuellen, nun bereits mehrmals überarbeiteten WHO-Klassifikation entwickelt. Diese berücksichtigt vorrangig Mutationsmuster, aber auch die Differenzierung (Morphologie, Immunphänotyp) [12, 13]. Die neue ICC berücksichtigt nur noch die zytogenetischen Veränderungen und als Diagnosezusatz die Ätiologie (z.B. therapieassoziiert, Progression aus MDS oder MDS/MPN, Keimbahnprädisposition) der AML [4, 5]. Die Relevanz solcher Klassifikationen besteht in den deutlichen Unterschieden an Überlebensraten und klinischer Präsentation zwischen den Subgruppen [14] und dadurch letztendlich in der Therapieentscheidung. Für Letzteres kann leitliniengerecht die Klassifikation nach Mutations-Risikogruppen des European LeukemiaNet (ELN) in *günstig*, *intermediär* und *ungünstig* genutzt werden [15].

1.1.4 Klinische Präsentation und Diagnostik

Die Symptomatik der AML beruht hauptsächlich auf einer Insuffizienz der Hämatopoese, da das Knochenmark durch die Blastenbildung verdrängt wird. Hierdurch kommt es zu Anämie (Leistungsknick, Blässe, Dyspnoe), funktioneller Leukozytopenie (Infektanfälligkeit - vor allem bakterielle Pneumonien, Pharyngitis und Mykosen) und Thrombozytopenie (Petechien, Blutungsneigung) [1, 2]. Bei Hyperleukozytosen über 100.000 Leukozyten pro μl (ca. 20% der Patienten) besteht die Gefahr einer Leukostase, einem hämatologischen Notfall. Durch die erhöhte Viskosität äußert sich dies mit thrombembolischen oder hämorrhagischen Läsionen in z.B. ZNS oder Retina, und vaskulärer Stauungssymptomatik wie z.B. durch Stauung in der Lunge oder durch Priapismus.

Der erhöhte Zellumsatz kann zudem zu einem Tumorlysesyndrom führen. Hierbei fallen Harnsäure, Phosphat und Kalium aus zerfallenen Zellen an. Dies kann zu einer metabolischen Entgleisung und folglich Nierenversagen,

Herzrhythmusstörungen und epileptischen Anfällen führen [1]. Neben Verläufen mit Leukozytose gibt es auch zytopenie (ca. 25-40%) und normozytäre Verläufe. Im Krankheitsverlauf kann es zu Organinfiltrationen (wie bspw. Gingiva, Cutis, Meningen), Knochenmarkfibrosen, Hepatosplenomegalie oder Lymphadenopathie kommen.

Diagnostisch erfolgt nach Leitlinien der DGHO neben der allgemeinen Anamnese, körperlichen Untersuchung, Differentialblutbild und klinischen Chemie, eine Knochenmarkspunktion zur Materialgewinnung für Zytologie und Histopathologie. Letztere werden nach zytogenetischen und molekulargenetischen Aspekten analysiert. Auch die Immunphäotypisierung mittels Durchflusszytometrie findet in der Therapieplanung und im langfristigen Monitoring einer subklinischen Resterkrankung Anwendung [2].

1.1.5 Therapie

Aufgrund der Heterogenität der AML ist vor Therapiebeginn eine umfassende Diagnostik und Bestimmung der AML-Subgruppe nötig. Auch die Erhebung des ECOG-Status, des Alters und der Komorbiditäten ist essenziell, da zwischen *fit*ten und *unfit*ten Patienten unterschieden werden muss. Ist ein unmittelbarer Therapiebeginn erforderlich, beispielsweise aufgrund von Leukostase oder eines Tumorlysesyndroms, kann notfallmäßig mit einer Zytoreduktion mit Hydroxyurea oder der Induktionstherapie begonnen werden [2].

In der Regel besteht die Standardtherapie bei als *fit* klassifizierten Patienten aus einer kurativ orientierten Induktionstherapie und aus einer Postremissionstherapie. Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR). Gewöhnlich wird im sogenannten 7+3 Schema 7 Tage mit Cytarabin (Ara-C) und 3 Tage mit einem Anthrazyklin (Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron) behandelt. Liegt eine CD33-Expression der Tumorzellen vor, empfehlen die Leitlinien die Zugabe von Gemtuzumab-Ozogamicin. Bei einer FLT3-Mutation kann der Tyrosinkinaseinhibitor Midostaurin hinzugezogen werden.

Therapie- und myelodysplasieassoziierte AMLs bei Patienten >60 Jahre, können stattdessen mit CPX-351 (liposomalem Daunorubicin und Cytarabin) behandelt werden, welches signifikante Überlebensvorteile verspricht [16].

Eine wichtige Sonderform bildet die Akute Promyelozytäre Leukämie, welche mit ATRA (All-trans-Retinsäure) und ATO (Arsentrioxid) behandelt wird.

Wird eine CR erreicht, schließt sich die Postremissionstherapie zur Erhaltung der CR an. In Abhängigkeit von dem Rezidivrisiko der AML und dem Patientenalter wird zunächst zur Konsolidierung zwischen einer Chemotherapie und einer allogenen Stammzelltransplantation abgewogen. Anschließend folgt je nach bisherigem Therapieverlauf und Molekulargenetik eine Erhaltungstherapie mit Azacitidin, FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren oder keiner weiteren medikamentösen Therapie [1, 2].

Bei *unfitten* Patienten - mit biologischem Alter über 75 oder beeinträchtigenden Komorbiditäten – wird in der Regel eine palliative Therapie angestrebt. Die Risiken und Nebenwirkungen wie zum Beispiel die Organtoxizität einer intensiven Chemotherapie übersteigen hier den Nutzen. Neben einer *Best Supportive Care* kann ein Chemotherapieregime mit hypomethylierenden Substanzen (Azacitidin oder Decitabin) oder niedrig dosiertem Cytarabin gewählt werden. In den letzten Jahren ist die zusätzliche Gabe des BCL-2-Inhibitor Venetoclax und bei IDH1 Mutationen von Ivosidenib zugelassen und in die Leitlinien aufgenommen worden. [1, 2] Trotz intensiver Forschung gibt es derzeit keine Immuntherapie für die AML - von der allogenen Stammzelltransplantation einmal abgesehen.

1.1.6 Prognose

Die AML verläuft ohne Therapie nahezu immer tödlich.

Das 5-jahres Überleben (5-JÜR, 5-Jahres-Überlebensrate) bei adäquater Therapie liegt insgesamt bei 25,4% [7]. Das Überleben ist jedoch stark abhängig vom Alter der Patienten (unter 60 Jahren bei 55%, über 60 Jahren 17% 5-JÜR) [17] und vom Subtyp (zum Beispiel inv(16) mit ca. 80% vs. Inv(3) mit ca. 10%) [14]. Die Rezidivrate liegt bei jungen Patienten bei ca. 30-40% und bei älteren bei 40-60% [18]. Das Rezidivrisiko ist jedoch stark abhängig von dem Subtyp der

AML [14]. Trotz Fortschritten bei Patienten unter 60 Jahren bleibt die Prognose insgesamt und besonders für ältere Patienten schlecht. Dies ist auch einem Mangel an gut verträglichen Therapieoptionen geschuldet.

1.2 Antikörperbasierte Immuntherapie

1.2.1 Struktureller Aufbau von Antikörper

Antikörper oder auch Immunglobuline (Ig) sind Glykoproteine, welche aus zwei identischen *leichten* (25 kDa) und zwei identischen *schweren* (50 kDa) Polypeptidketten bestehen. Diese sind über Disulfidbrücken kovalent verbunden und nehmen in ihrer Gesamtheit in etwa eine Y-Form ein. Beide Ketten bestehen aus variablen und konstanten Domänen. Durch das Enzym Papain kann der Antikörper in die Fragmente Fab und Fc gespalten werden [19]. Die beiden N-terminalen, ca. 110 Aminosäure langen Domänen (V_L und V_H) der leichten und schweren Ketten sind variabel und bilden gemeinsam den antigen-bindenden Bereiche des Fab (*antigen-binding fragment*). Das Fab beinhaltet zudem zwei konstante Domänen (C_L und C_{H1}) aus der leichten und der schweren Kette. Das Fab bestimmt die Spezifität des Antikörpers und bindet an das sogenannte Epitop des Zielmoleküls, welches auch Antigen genannt wird. Die beiden Fab des Antikörpers sind identisch [19].

Die konstanten Domänen der schweren Kette (ausschließlich C_{H1}) bilden das Fc (*crystallisable fragment*) des Antikörpers und sind für die Effektorfunktion des Antikörpers entscheidend. Es existieren 5 Klassen der schweren Ketten (α , δ , ϵ , γ , μ), woraus sich sogenannte Isotypen ergeben, welche sich in ihrer Funktion unterscheiden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Der Isotyp IgG kann wiederum in 4 Subtypen (IgG1-4) unterteilt werden [19].

1.2.2 Physiologie der Antikörper und Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC)

Antikörper werden im Rahmen der adaptiven Immunantwort von Plasmazellen sezerniert. Diese binden mit den variablen Domänen des Fab spezifisch an ihre designierten Antigene, meist Makromoleküle, und bilden einen Immunkomplex. Nach der Bindung entfalten die Antikörper ihre Wirkung direkt über Neutralisation

des Antigens, oder indirekt über Komplementaktivierung (*Complement Dependent Cytotoxicity*, CDC), Opsonierung (*Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*, ADCP) und *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (ADCC) [19, 20].

Antikörper können durch die Bindung die Funktion des Antigens blockieren. Dadurch werden zum Beispiel Toxine inaktiviert oder Rezeptor-Liganden-Interaktion blockiert [19].

Eine weitere Funktion von Antikörpern ist die Aktivierung des Komplementsystems (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*). Als Resultat bildet sich am Ende der Komplementkaskade der *Membran Attack Complex*, welcher eine Pore in der Zellmembran einer Zielzelle bildet und zu deren Lyse führt [19]. Die Aktivierung des Komplementsystems führt darüber hinaus zur Bildung von Opsoninen wie C3b und C4b. Zusätzlich zu diesen können Antikörper selbst als Opsonine fungieren. Die Opsonine binden an die Oberfläche der Zielstruktur und ermöglichen Phagozyten (zB Macrophagen) die Aufnahme und die Zersetzung dieser in den Lysosomen (ADCP) [19].

Eine für die Immuntherapie mit Antikörpern sehr bedeutende Funktion ist die Induktion von ADCC. Bei der ADCC erkennen Effektorzellen mit dem Fc-Rezeptor das Fc-Fragment eines an ein Zielantigen gebundenen Antikörpers. Dies löst eine Aktivierung der Effektorzelle aus, die zur Lyse der Zielzelle führt [21]. Hauptsächlich wird diese Funktion im Menschen durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) vermittelt.

Verschiedene Effektorzellen exprimieren unterschiedliche Fc-Rezeptoren, die jeweils spezifische Affinitäten zu Antikörper-Subklassen aufweisen. Ihre Funktionen reichen von Aktivierung bis zu Inhibierung der Effektorzelle. Die Signale werden intrazellulär von ITAMs (*immunereceptor tyrosine-based activation motifs*) oder ITIMs (*immunereceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) vermittelt. Für die ADCC am relevantesten sind die Fc-Rezeptoren FcγRIIIa (CD16a) und FcγRII (CD32). Der FcγRIIIa ist ein heterodimerer Komplex und kann das Fc von IgG1 und IgG3 mit niedriger Affinität binden. Bei der Bindung

mehrerer FcγRIIIa an Immunkomplexe aus Antikörper und Antigen, erfolgt eine Quervernetzung der Rezeptoren, welche über ITAMs die Effektorzellen aktivieren [19, 21]. Dies führt zur Ausschüttung von Granula welche Perforine und Granzyme enthalten. Perforine bilden transmembrane Poren in der Zellmembran der Zielzelle. Dies kann zum einen bereits zur Lyse der Zielzelle führen, zum anderen ermöglicht es das Eindringen von Granzymen. Granzymen sind Serinproteasen, die über Caspase 3 oder BID (*BH3 interacting domain death agonist*) eine proteolytische Kaskade und die Apoptose der Zielzelle induzieren [21-23]. Das Ergebnis ist schlussendlich die Lyse oder Apoptose der Zielzelle [19, 24, 25].

Für die Funktion eines Antikörpers ist die Bindung mit dem Antigen essenziell. Für die Effektivität eines therapeutischen Antikörpers ist folglich die sorgsame Wahl dieser Zielstruktur entscheidend.

1.2.3 Tumorantigene

Durch die Entwicklung der Hybridom-Technik [26] wurde die gezielte Herstellung monoklonaler Antikörper gegen definierte Antigene möglich. Dadurch können bewusst ausgewählte, tumorassoziierte Antigene auf Krebszellen spezifisch erkannt und eine gezielte Immunreaktion gegen die Tumorzelle ausgelöst werden. Die Wahl des Tumorantigens ist entscheidend für die Wirksamkeit eines Antikörpers, aber auch dessen Nebenwirkungen. Das Antigen sollte auf der Oberfläche der Tumorzellen überexprimiert, auf gesundem Gewebe jedoch eingeschränkt oder gar nicht vorhanden sein. Letzteres minimiert die Gefahr der sogenannten On-Target-Off-Tumor-Toxizität. Hierbei werden zum einen gesunde Zellen, die das vermeintlich tumorspezifische Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, durch den Antikörper geschädigt und es kommt zur Organtoxizität. Zum andern führt eine breite oder systemische Verfügbarkeit des Tumorantigens zu einer systemweiten Aktivierung von Effektorzellen und es kann zu einer übermäßigen Zytokinausschüttung bis hin zur lebensbedrohlichen Maximalausprägung eines Zytokinsturms kommen.

Die Expression des Antigens sollte stabil sein, um einen *Immunescape* der Zielzellen zu verhindern. Es soll also möglichst nicht *gshedded*, internalisiert

oder herunterreguliert werden können. Zudem sollte es auf allen Tumorzellen, wie auch Tumorstammzellen exprimiert werden und in möglichst vielen Patienten prävalent sein [27].

Klinisch bewährt als Tumorantigene haben sich zum Beispiel CD20 für B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome [28], HER2/neu für die Behandlung von Brustkrebs und Magenkarzinomen [29] und als neueres Beispiel CD38 für multiple Myelome [30]. Hier ist die antikörperbasierte Immuntherapie in der klinischen Anwendung bereits fest etabliert.

1.2.4 Onkologische Therapieansätze mit monospezifischen Antikörpern

Zum Zeitpunkt dieser Dissertation sind bereits zahlreiche monoklonale Antikörper (mAb) für die onkologische Therapie zugelassen – in der Regel in Kombination mit einer chemotherapeutischen Behandlung. Die Wirkweise der Präparate stützt sich auf die ADCC, ADCP, Rezeptorblockierung oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugation.

Neutralisierende Antikörper blockieren bei Tumoren vermehrt exprimierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Als EGF-R-Antikörper wurden bereits Cetuximab und Panitumumab zugelassen, welche die Bindung von EGF (*Epithelial Growth Factor*) an seinen Rezeptor verhindern. Diese Präparate sind für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen zugelassen. Antikörper, wie Trastuzumab und Pertuzumab, gegen HER (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*), welches auf einigen Mammakarzinomen und einigen wenigen Magenkarzinomen exprimiert sein kann, verhindern hingegen die Dimerisierung dieses Rezeptors, für den bis heute kein Ligand nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz hierzu neutralisieren VEGF-Antikörper wie Bevacizumab den Liganden VEGF (*Vasoepithelial Growth Factor*) und hemmen so die Neovaskularisierung von Tumoren [20].

Blockierende Antikörper können jedoch auch genutzt werden, um das Immunsystem zu modulieren. Immuncheckpointinhibitoren blockieren inhibitorische Interaktionen zwischen Effektor und Tumorzellen und wirken somit

immunstimulierend (Desinhibition). Als Zielstrukturen werden CTLA-4, PD-1 und dessen Ligand PD-L1 genutzt [20].

Von zentraler Bedeutung für die Therapie von Tumoren mit mAbs sind die zytotoxischen Eigenschaften der Antikörper. Dies lässt sich anhand Rituximab, des ersten zur Krebstherapie zugelassenen Antikörpers, veranschaulichen [31-33]. Wie wichtig der Fc-vermittelte Effekt der ADCC ist, beweist Obinutuzumab (GA101), ein Nachfolger Rituximabs. Neben verbesserten direkten Effekten durch die Wahl eines anderen Epitops auf CD20, konnte die ADCC durch eine Optimierung des Fc-Teils deutlich gesteigert werden [34].

1.2.5 Fc-optimierte Antikörper

Die Fähigkeit, ADCC auszulösen, kann durch Fc-Optimierung gesteigert werden. Dies kann durch Modifikation der Glykosylierung [35, 36] oder durch Mutagenese [37] erreicht werden.

Durch Afucosylierung an Asn297 im Fc-Fragment kann beispielsweise die Fc γ RIIIa-Affinität verbessert werden. Da dieser Rezeptor hauptverantwortlich für die ADCC ist, kann diese und somit die Effektivität eines Antikörpers gesteigert werden [35, 36]. Diese Form der Fc-Glykomodifikation wurde beispielsweise bei in Obinutuzumab angewendet. Anzumerken ist hierbei, dass die Afucosylierung zu einer Abnahme der Fähigkeit führt, CDC auszulösen [38].

Alternativ könne auch Mutationen im Fc die Affinität an den Fc γ RIIIa steigern und es wurden bereits einige solche beschrieben [39]. Hierbei müssen jedoch neben einer verbesserten ADCC Aspekte wie Stabilität, Halbwertszeit und die Erhaltung anderer Effektorfunktionen wie CDC und ADCP mit einbezogen werden [40]. Die Kombination aus den beiden Mutationen S239D und I332E (SDIE) [41] hat sich in diesem Kontext bewährt. Sie verbessert die Affinität (K_D -Wert) und Effektive-Konzentration-50 (EC_{50}) um bis zu zwei Zehnerpotenzen [37] und ist im zur Zeit einzigen zugelassenen, durch Mutagenese Fc-optimierten Antikörper Tafasitamab zu finden [40, 42]. Auch für die Therapie der AML – als Gegenstand dieser Arbeit – laufen klinische Studien mit SDIE-modifizierten Antikörpern [43].

1.2.6 Weitere Antikörperformate

Über die monospezifischen Antikörper hinaus wurden verschiedene andere Antikörperformate entwickelt. In Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten sind meist zytotoxische Wirkstoffe über einen Linker mit einem Antikörper gekoppelt. Diese binden spezifisch an Tumorantigene und werden meist durch die Zielzelle internalisiert. Intrazellulär wird der Wirkstoff abgespalten und kann seine zytotoxische Wirkung entfalten [44]. Mit Getuzumab-Ozogamizin ist bereits ein solches Therapeutikum gegen AML zugelassen [45, 46]. Das Konjugat besteht aus einem CD33-Antikörper und dem Toxin Ozogamicin.

Auch Radioimmunkonjugate wie Ibritumomab, Tositumomab und Arcitumomab wurden bereits für verschiedene Neoplasien zugelassen [47, 48]. Hier sind mAbs mit Radioisotopen beladen, welche um die Zielzelle angereichert oder internalisiert werden und diese mit energiereicher Strahlung schädigen.

Ein vielversprechender Therapieansatz und Gegenstand intensiver Forschung sind T-Zell-aktivierende bispezifische Antikörper (bsAb) mit zwei unterschiedlichen variablen Domänen. Eine ist hierbei gegen ein Tumorantigen gerichtet, die andere gegen CD3, einer Untereinheit des T-Zellrezeptors. Wird der bsAb gleichzeitig an das Tumorantigen und CD3 gebunden, führt dies zur räumlichen Annäherung von Tumor- und T-Zelle, zur Ausbildung einer Immunsynapse, zum Clustering mehrerer T-Zell-Rezeptoren und schließlich zur Aktivierung der TCR-Signalkaskade. Dies führt zur Aktivierung der T-Zellen und Lyse der Tumorzellen [49-51]. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist Blinatumomab, ein CD20xCD3-bsAb aus zwei einzelkettigen, variablen Fragmenten (scFv). Ein weiterer, erst kürzlich zugelassener bsAb ist Glofitamab, ein CD20xCD3-bispezifischer Antikörper [52].

1.2.7 Zytokine und Immunzytokine

MAbs haben also mittlerweile einen festen Platz in der Krebstherapie eingenommen und sich gerade für lymphatische Entitäten als wirksam erwiesen. Durch Fortschritte wie die Fc-Optimierung konnten die Effektivität weiter

verbessert werden. Für die AML hingegen konnte bislang kein monoklonaler Antikörper die für eine Zulassung erforderliche Wirksamkeit erzielen [51, 53, 54]. Neben der Fc-Optimierung stellt die Kombination mit immunstimulierenden Zytokinen eine weitere Möglichkeit dar, die Effektivität therapeutischer Antikörper zu erhöhen.

Zytokine sind kleine, von Zellen freigesetzte Proteine, die als Botenstoffe des Immunsystems wirken. Sie regulieren und koordinieren Entzündungsreaktionen, Zellwachstum, Zellreifung und die Kommunikation zwischen Immunzellen [19]. Eine additive Therapie mit immunstimulierenden Zytokinen verspricht eine verbesserte klinische Wirksamkeit vor allem von Antikörpertherapien, da die Effektorfunktion und Proliferation der Immunzellen verstärkt werden. Zytokine wie GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 und IL-21 wurden bereits in klinischen Studien getestet [55]. Obwohl Tiermodelle vielversprechende Therapieergebnisse aufwiesen, blieben diese in klinischen Studien weitgehend aus. Die Applikationen war meist mit schweren dosislimitierenden Toxizitäten verbunden, mit schlechten Halbwertszeiten, sowie mit der Induktion von immunologischen Checkpoints [55].

Für die Immuntherapie sind vor allem die beiden engen Verwandten IL-2 und IL-15 vielversprechende Kandidaten, da sie T- und NK-Zellen aktivieren und deren Proliferation auslösen [56, 57]. Auf die Funktion von IL-15 wird im nächsten Kapitel detailliert eingegangen werden.

Ähnlich wie bei anderen Zytokinen ist auch bei diesen beiden Interleukinen die systemische Verabreichung als Monotherapie mit dosislimitierenden Nebenwirkungen und einer ungünstigen Pharmakokinetik verbunden [55, 58], wie zunächst am Beispiel von IL-2 verdeutlicht werden soll: Die systemische Gabe von rekombinantem IL-2 (Aldesleukin/Proleukin) ist für die Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit muss es als Dauerinfusion über 5 Tage gegeben werden [59]. Zahlreiche Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, arterielle Hypotension, Tachykardie, Nausea, Diarrhoe, Nieren- oder Leberfunktionsverschlechterung,

die Exacerbation von Autoimmunerkrankungen und vor allem das Kapillarlecksyndrom, sowie das Zytokin-Freisetzungssyndrom [59, 60] verhindern eine wirklich effiziente Dosierung und beschränken die Nutzung auf körperlich fitte Patienten [58]. Ein Therapieansprechen im Sinne einer Tumorregression zeigte sich in nur 15-17% der Fälle [60, 61]. Ein weiteres wirkungsbegrenzendes Problem von IL-2 ist die Induktion von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) [62, 63] und von *Activation Induced Cell Death* (AICD) [64]. Beide Mechanismen sind zwar in der physiologischen Immunhomöostase wichtig, haben jedoch das Potential eine effektive Immunstimulation gegen Zielzellen zu verhindern. In diesen beiden Punkten ist IL-15 gegenüber IL-2 im Vorteil, wie im folgenden Kapitel erläutert werden wird.

Die Fusion von Zytokinen mit Antikörperkonstrukten zu sogenannten Immunzytokinen dient nicht nur der Verlängerung der Halbwertszeit, sondern vor allem der gezielten Anreicherung der Zytokinaktivität im Tumorumfeld. Durch diese Lokalisierung soll die Aktivierung von Effektorzellen auf den Tumor begrenzt und dadurch das Risiko systemischer Nebenwirkungen deutlich reduziert werden, um eine wirksame Dosierung zu ermöglichen.

Obwohl Immunzytokine teilweise vielversprechende klinische Effekte zeigen [65], konnten sie Off-Target-Effekte und dosislimitierende Toxizitäten bislang nicht vollständig vermeiden [58, 66-70], da nur ein kleiner Teil des verabreichten Immunzytokins tatsächlich zielgerichtet gebunden wird, während der Großteil unspezifisch im Körper verteilt ist [71]. Zudem kann die Zytokin-Komponente die antikörpervermittelte Zielsteuerung beeinträchtigen und die Lokalisierung des Wirkstoffs unabhängig von der Antikörperspezifität zu zytokinrezeptor-exprimierenden Zellen lenken [72].

Die Bandbreite von Immunzytokinen reicht von kleinen Molekülen, in denen das Zytokin mit einem Fab-Fragment kombiniert wird, bis hin zu vollständigen Antikörpern mit erhaltenen ADCC- und CDC-Funktionen [58]. Aktuelle Forschungen konzentrieren sich auf Immunzytokine basierend auf IL-12, IL-21, TNF, IFN $\alpha/\beta/\gamma$ und gerade IL-2 und IL-15 [55, 58, 65].

1.3 Interleukin-15

1.3.1 Funktion IL-15

Interleukin-15 (IL-15) ist ein immunstimulierendes Zytokin der 4- α -Helix-Bündel Familie und gilt als vielversprechender Kandidat in der Krebsimmuntherapie [73]. Ähnlich wie sein enger Verwandter IL-2 induziert es die Proliferation und Aktivierung von T-, B- und NK-Zellen [73] und besitzt zudem antiapoptotische Eigenschaften [74]. Es wirkt somit also auf die beiden essenziellen zytotoxischen Populationen der NK- und CD8⁺-T-Zellen [75]. Für IL-2 ist sowohl die Stimulation inhibitorischer Treg-Zellen als auch die Induktion von AICD bei Effektorzellen beschrieben worden [62, 63]. Im Gegensatz dazu zeigt IL-15 diese unerwünschten Effekte nicht, was einen wesentlichen Vorteil für den Einsatz in der Immuntherapie darstellt, da keine negative Rückkopplung ausgelöst wird [73, 76].

Die Gemeinsamkeiten von IL-2 und IL-15 erklären sich über den gemeinsamen Rezeptor, der aus einer IL-2R/IL-15R β - (CD122) und einer *common* γ -Kette (CD132) besteht. Bemerkenswert ist jedoch der einzigartige Wirkungsmechanismus von IL-15, der trans-Präsentation genannt wird [77]: IL-15 bindet mit hoher Affinität an die sogenannte Sushi-Domäne des IL-15R α . Dieser wird an der Oberfläche von Monozyten [78], dendritischen Zellen [77] und vielen anderen Zelltypen [74] exprimiert. Hierdurch wird ein stabiler Komplex gebildet, sodass IL-15 größtenteils gebunden vorliegt und nicht in seiner löslichen Form [79]. IL-15 wird dann auf dem IL-15R α gegenüber dem IL-15R $\beta\gamma$ trans-präsentiert (Abbildung 1B, trans-Präsentation). Dieser ist auf NK- und T-Zellen exprimiert. Über JAK1/JAK3 und STAT3/STAT5 entfaltet der IL-15R $\beta\gamma$ zuletzt seine pro-proliferative und aktivierende Wirkung [73].

Aufgrund des vielversprechenden Wirkungsprofils ist IL-15 bereits Gegenstand intensiver präklinischer und klinischer Forschung.

1.3.2 IL-15 in der onkologischen Immuntherapie

In mehreren Tiermodellen konnte eine Monotherapie mit IL-15 bereits ihren Anti-Tumor-Effektivität unter Beweis stellen, wobei sich der Effekt hauptsächlich auf die Verbesserung der Zytotoxizität von NK-Zell und deren NKG2D-vermittelte

Aktivierung stützte [55]. Toxizitätsuntersuchungen in Rhesusaffen zeigten ebenso versprechende Ergebnisse und es konnte bei moderaten Nebenwirkungen (transiente Neutropenien) ein Anstieg der NK-Zellzahlen auf das 10-fache und der Effektor-CD8-Gedächtniszellen auf das bis zu 100-fache gezeigt werden [55].

Eine erste Phase I Studien mit intravenösem, rekombinanten IL-15 an Tumorpatienten mit metastasierten Krebsleiden zeigten jedoch dosislimitierende Nebenwirkungen. Bei einer Fallzahl von 27 Patienten traten 8 schwerwiegende unerwünschte Ereignisse auf. Dazu gehörten zwei Blutungsereignisse, ein Papillenödem, Uveitis, Pneumonitis, duodenale Erosionen sowie zwei Todesfälle, von denen einer am ehesten auf eine medikamentenbedingte gastrointestinale Ischämie zurückzuführen war. Als toxizitätsvermittelnde Zytokine einer IL-15-Behandlung wurden vor allem INF γ und IL-6 identifiziert. Bei der maximal tolerablen Dosis konnte keine Therapieantwort im Sinne einer Regression festgestellt werden, mit einer stabilen Erkrankung als bestes Therapieansprechen. In einigen Patienten zeigte sich eine Regredienz des Primärtumors oder die Reduktion von Lungenmetastasen [80, 81]. Obwohl in der Studie ein deutlicher Anstieg an Effektorzellen festgestellt werden konnte, hielt sich das Therapieansprechen somit in Grenzen und war mit schweren Nebenwirkungen verbunden.

Ein weiteres Problem in der klinischen Anwendung ist die kurze Halbwertszeit von IL-15, so dass meist Dauerinfusionen oder viele Einzelgaben erfolgen müssen und eine große Menge an IL-15 benötigt wird. Um dem zu begegnen und die Anti-Tumor-Aktivität zu verbessern, wurden Fusionsproteine wie ALT-803 entwickelt. ALT-803 setzt sich aus einem mutierten IL-15-Molekül (N72D) zusammen, das über eine IL-15R α -Sushi-Domäne an einen IgG1-Fc-Teil gebunden ist. Die als aktivitätssteigernd beschriebene Mutation N72D, sowie die Imitation der trans-Präsentation durch die Sushi-Domäne sollen zu einer erhöhten Wirksamkeit führen. Die Kopplung an ein Fc-Fragment ermöglicht eine verlängerte Halbwertszeit, eine verbesserte Bioverfügbarkeit und mutmaßlich

auch eine gesteigerte Produktionsausbeute. In der ersten Phase-I-Studie mit ALT-803 als Monotherapie wurden jedoch entweder dosislimitierende Toxizität [55] oder nur begrenztes klinisches Ansprechen beobachtet [82, 83].

Das Grundproblem einer systemischen Aktivierung von Effektorzellen liegt weiterhin vor und wird potenziell durch die superagonistische Wirkung von ALT-803 sogar verstärkt.

Da eine IL-15 Monotherapie mechanistisch die zelluläre Anti-Tumor-Aktivität verstärkt, jedoch allein zu keinen klinischen Erfolgen führen konnte, liegt eine Kombinationstherapie nahe. Es laufen bereits Studien mit Tumorzellvaksinierung, Immuncheckpointinhibition [84] (NCT03905135, NCT04150562) [85] oder Antikörpertherapie (NCT02689453, NCT03759184) [85]. Allerdings löst auch eine solche Kombinationstherapie das Problem der dosislimitierenden systemischen Toxizität nicht.

1.3.3 IL-15-Immunzytokine

Die Fusion von Zytokinen mit Antikörperkonstrukten zu Immunzytokinen soll theoretisch die Zytokinwirkung auf die Tumorzellen konzentrieren. Dies soll systemische Nebenwirkungen reduzieren. In präklinischen Studien wurden bereits einige IL-15-Immunzytokine beschrieben.

Beispielsweise wurden scFv-IL-15-Konstrukte charakterisiert, bei denen ein kleines Antikörperfragment gegen FAP mit IL-15 bzw. einer IL-15-Sushi-Domäne fusioniert wurde [86]. Ein ähnliches Prinzip liegt dem monospezifischen anti-FN-EDA-IL-15 im Diabody-Format zugrunde [87]. In diesen Zytokinen wird das Antikörperkonstrukt lediglich als Targeting-Domäne verwendet. Im Gegensatz dazu bieten Formate, die auf vollständigen Immunglobulinen basieren, den zusätzlichen Vorteil einer Fc-vermittelten Effektorfunktion – wie etwa im Fall des anti-GD2-RL1-Konstrukts [88]. Darüber hinaus wurden auch Immunzytokine beschrieben, die Immuncheckpointinhibitoren als Zielstrukturträger nutzen, beispielsweise anti-PD-L1/IL-15-Fusionsproteine [89].

Als ein Vertreter der Gruppe trifunktionaler Fusionproteine wurden die anti-CD33- [90, 91], anti-CLEC12A- [92] und anti-CD19-IL-15-CD16 TriKEs [93]

charakterisiert, welche IL-15 mit einem Tumorantigen/CD16-bsAb kombinieren, der über den FcγRIIIa NK-Zellen aktiviert.

Darüber hinaus wurden noch komplexere Konstrukte entwickelt, welche neben einem IL-15/IL-15Rα Komplex und dem tumorspezifischen Antikörperfragment die extrazelluläre Domäne von 4-1-BBL als Kostimulator der TNF-Superfamilie enthalten [94, 95].

Wie bereits erläutert, konnten bislang verfügbare Immunzytokine Off-Target-Effekte und dosislimitierenden Toxizitäten bislang nicht vermeiden [58, 66-70]. Dies ist begründet in der Gewebsverteilung abseits der Tumorzellen [71] und die durch den Zytokinteil beeinträchtigten Pharmakodynamik, welche das Immunzytokin zu zytokinrezeptor-exprimierenden Effektorzellen abseits der Zielzellen lenken kann [72]. Gerade bei IL-15-basierten Immunzytokinen ist dies problematisch, da IL-15Rα eine hohe Affinität zu seinem Liganden aufweist.

Aufgrund der biologischen Aktivität des Zytokins innerhalb der Konstrukte auch ohne Bindung des Antikörperteils kann es zu einer unerwünschten Signalübertragung - unabhängig der Antikörperbindung - kommen, was weiterhin systemische Nebenwirkungen und Toxizitäten zur Folge hat. Daher wäre es entscheidend, die Zytokinaktivität strikt an die Bindung des Zielantigens zu koppeln, um wirklich sichere und wirksame Immunzytokine zu entwickeln.

1.4 IL-15 MIC - Modified Immunocytokines

Als zentrale Herausforderungen bei Immunzytokinen gelten ihre begrenzte therapeutische Wirksamkeit sowie eine unzureichende Verträglichkeit. Um diesen Problemen zu begegnen, wurde in der Arbeitsgruppe Salih die MIC-Plattform (*Modified Immunocytokines*) entwickelt (Abbildung 1A) [96]. In diesen wird die Fähigkeit eines parentalen Antikörpers, Effektorzellen zu aktivieren, sowie Proliferation und ADCC zu induzieren, durch Fc-Optimierung mittels S239D/I332E-Mutation (SDIE) [41] und durch Fusion mit IL-15 gesteigert. Um eine zielunabhängige Aktivität des Zytokinanteils zu verhindern, wurde zudem die Mutation E46K in IL-15 eingebracht. Diese hebt die Bindung an den IL-15Rα auf [97]. Hierdurch können Zellen wie Monozyten und dendritische Zellen das

Molekül nicht mehr an ihren IL-15R α binden und an Effektorzellen trans-präsentieren. Bindet der tumorspezifische Antikörper an sein Antigen, wird eine trans-Präsentation an den IL-15R $\beta\gamma$ imitiert und erst dann die IL-15-Wirkung ausgelöst (Abbildung 1B). Dadurch wird eine unspezifische, systemische Wirkung vermieden.

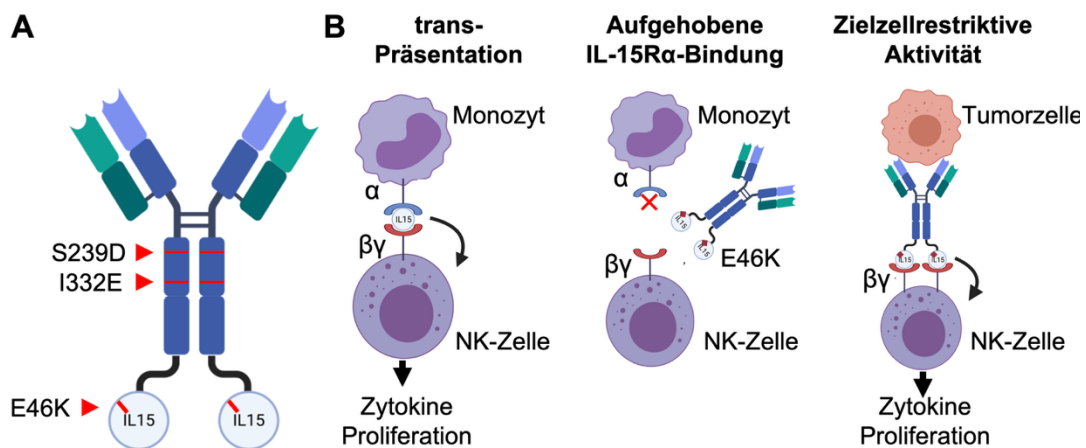


Abbildung 1 - Schematische Darstellung eines MIC Moleküls und dessen zielzellrestringierten IL-15 Aktivität (A) Schematische Darstellung eines MIC Moleküls mit den eingebrachten Mutationen (rot). **(B)** Die physiologische trans-Präsentation von IL-15 an Effektorzellen wird über den IL-15R α vermittelt. Die E46K Mutation verhindert die physiologische trans-Präsentation. Nur bei Bindung des MIC an eine Zielzelle wird eine trans-Präsentation imitiert.

In der Arbeitsgruppe Salih wurden bereits MIC-Konstrukte gegen CD19 und CD20 charakterisiert [96]: Es konnte *in vitro* und in Mausmodellen nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von NK-Zellen durch MIC-Konstrukte zielzellabhängig stattfindet. Die zielzellunabhängige Toxizität war im Vergleich zu rekombinantem IL-15 und IL-15-Zytokinen ohne die E46K-Mutation deutlich reduziert. Gleichzeitig zeigten die MIC-Konstrukte eine überlegene Zytotoxizität gegenüber parentalen Fc-optimierten Antikörpern.

MIC19 (α CD19) und MIC20 (α CD20) stellen somit vielversprechende Kandidaten für die antikörperbasierte Therapie lymphatischer B-Zell-Malignome dar [96]. Die AML – Gegenstand der vorliegenden Arbeit – erweist sich bislang als deutlich therapieresistenter als Lymphome. Vor diesem Hintergrund ist es von besonderem Interesse, ob sich das MIC-Konzept gegen AML-assoziierte

Tumorantigene richten lässt und damit ein potenziell wirksames Behandlungsprinzip für myeloische Neoplasien geschaffen werden kann.

1.5 CLEC12A

C-type Lectin Domain Family 12 Member A (CLEC12A) ist ein AML-assoziiertes Tumorantigen und Gegenstand aktiver Forschung. Dieses Molekül, das auch unter den Namen *C-type Lectin-like Molecule-1* (CLL-1) oder hM1CL bekannt ist, ist ein Rezeptor mit inhibitorischer Wirkung auf Granulozyten und Monozyten [98]. Die genaue physiologische Funktion des Rezeptors ist zwar nicht bekannt, jedoch scheint er als Rezeptor für zellschaden-assoziierte Uratkristalle zu fungieren, der über *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) die Immunhomöostase beeinflusst [99].

CLEC12A wird auf 92% der primären AML und 67% der CD33⁺ AMLs exprimiert. Als therapeutisches Antigen eignet es sich vor allem, da sowohl Blasten als auch leukämische Stammzellen (LSC) CLEC12A exprimieren, während es auf nur 2,5% der gesunden Stammzellen (HSC) zu finden ist [100-102]. Als wichtige Eigenschaft für ein Tumorantigen, ist die CLEC12A-Expression über den Krankheitsverlauf und bei Rezidiven stabil [103, 104].

Es wurden mit CLEC12A als Zielantigen bereits präklinische Studien mit Antikörpern [105], Antikörper-Medikamenten-Konjugaten [106], bsAbs [107, 108] und CAR-T-Zellen [109] durchgeführt und eine klinische Studie mit einem bsAb ist am Laufen (NCT03038230). Auch CLEC12A-Immunzytokine wurden bereits beschrieben [91].

1.6 Developability und Produktion von IL15-Fusionsproteinen

Die *Developability* (frei übersetzt „Entwicklungseignung“) beschreibt die Gesamtheit der Eigenschaften eines Wirkstoffes, welche die Entwicklung, Herstellbarkeit und Translation zu einem Medikament betreffen [110]. Hierunter fallen zum Beispiel Aggregationsverhalten, Stabilität und Produktionsausbeute. Die Produktion von rekombinantem IL-15 ist geprägt von niedrigen Expressionsleveln und Aggregation bei höheren Konzentrationen. So konnten nur etwa 12 µg/l Ausbeute in humanen Nierenzelllinien erreicht werden [111]. Bei

der Herstellung von rekombinantem IL-15 (rhIL-15) in größeren Mengen in einem optimierten E. coli-System bilden sich Aggregate in Einschlusskörperchen. Die Tertiärstruktur muss bei der Purifikation aufgehoben und danach wieder gefaltet werden [112]. Dies wäre jedoch für die Produktion eines Antikörperfusionsproteins unpraktikabel und unwirtschaftlich - gerade unter *Good Manufacturing Practice*-Bedingungen. Die Datenlage zur Ausbeute bei IL-15-Fusionsproteinen ist sehr dünn. In Vorarbeiten zeigte die MIC-Plattform deutliche Aggregatbildung in der Produktion und eine im Vergleich zu herkömmlichen IgG schlechte Ausbeute, welche die Wirtschaftlichkeit einer Therapie verschlechtern würde. Darüber hinaus kann eine Aggregationsneigung nach der Aufreinigung zu unerwünschten Folgen wie zum Beispiel zu einer gesteigerten Immunogenität gegen das Antikörperkonstrukt (Anti-Drug-Antikörper) [113], zu einer Toxizität durch unspezifisches Rezeptor-Clustering [114] oder zu einer gestörten Pharmakokinetik führen.

1.7 Ziel/Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung eines Fc-optimierten, modifizierten IL-15-Immunzytokines gegen CLEC12A für die Therapie der AML. In erster Linie soll die Anti-Tumor-Aktivität eines solchen Konstruktes mit der eines Fc-optimierten Antikörpers verglichen werden. Gleichzeitig soll die IL-15-Aktivität des Konstruktes auf ihre Zielzellrestriktion untersucht werden. Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollen Mutanten identifiziert werden, die die Produzierbarkeit erhöhen, ohne die Funktionalität zu beeinträchtigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Ätka pure 25	Cytiva, Marlborough, MA, USA
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, DE
Bolt Mini Gel-Laufkammer	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Durchflusszytometer BD FACS LSR Fortessa	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, DE
ELISA-Reader, Sunrise	Tecan Trading AG, CH
Feinwaage, Mettler AT 261 Delta	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschränke (-80°C)	Binder, Tuttlingen, DE Sanyo, Somatco, Riad, K.S.A.
HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System	Essen BioScience, Sartorius, Göttingen, DE
Mabselect	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, DE
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, DE
Vortexer	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, DE Heraeus, Hanau, DE

2.1.2 Software

BioRender	BioRender, Toronto, CAN
FlowJo Version 10.7.2	FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism Version 8.4.0	GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA
Incucyte S3 v2019A	Sartorius, Göttingen, DE
PyMOL v3.1.0 (Open-Source)	Schrödinger, LLC, New York, NY

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE Nunc, Roskilde, DK
Einmalpipetten	Corning Inc., Corning, NY, USA
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, DE
Platten für ELISA (96 well), <i>Maxisorp</i>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Platten für FACS (96 well, V- und UBoden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Platten für Incucyte (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, DK
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.4 Reagenzien

Ampicillin	n.a.
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe, DE
CountBright absolute counting beads	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FACS-Clean/Flow/Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, DE

Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, DE
Medium RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, DE
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Verviers, Belgien
Phosphatgepufferte Salzlösung	PAA, Pasching, Österreich
RPMI Medium 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Trypan Blau Lösung, 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.5 Kits

Endotrap HD	Hyglos, Bernried, DE
Endozyme II	biomerieux, Nürtingen, DE
Maxiprep	Quiagen, Venlo, NL
Miniprep	Quiagen, Venlo, NL

2.1.6 Fluoreszenzantikörper/-reagenzien

CD3	APC-Fire	Biolegend	344840
CD8	BV605	Biolegend	301040
CD8	FITC	BD	555634
CD33	APC	Biolegend	303408
CD56	PE/Cy-7	Biolegend	318318
CD69	PE	Biolegend	310905
CD122 IgG1	PE	Biolegend	339005
CD132 IgG2b	PE	Biolegend	338606
CellTrace Violet	CellTrace Violet	ThermoFisher	C34571
Donkey-anti- human IgG	PE	Jackson	709116149
isolgG1	PE	BD	555749
isolgG2b	PE	RD	IC0041P

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien U937, TF-1 und M07e wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen erworben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in RPMI 1640 kultiviert, dem 20% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin beigemischt wurde (= Zellkulturmedium). Für die zytokinabhängig wachsenden Zelllinien TF-1 und M07e wurde das Nährmedium zusätzlich mit jeweils 2 und 10 ng/ml GM-CSF supplementiert.

2.2.2 PBMC/Patientenproben

Die Blut- und Knochenmarkproben von gesunden Spendern und AML-Patienten wurden nach den Richtlinien der Ethikkommission (13/2007V) und mit freiwilligem, informiertem Einverständnis der Spender entnommen. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden mittels FICOLL Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Bei diesem Verfahren werden heparinisierte Blutproben von Patienten oder Aphaeseüberreste von gesunden Thrombozytenspendern auf eine Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (FICOLL) Lösung aufgeschichtet und zentrifugiert (2000 rpm, 18 min, ungebremster Stopp).

Erythrozyten aggregieren durch Kontakt mit den Polymeren und sedimentieren zusammen mit den polymorphkernigen Bestandteilen des Blutes (Granulozyten). Mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Plättchen) hingegen können aufgrund ihrer Dichte die FICOLL-Blutplasma Grenzschicht nicht passieren und bilden eine Interphase, die geerntet wird.

Anschließend werden die isolierten PBMC mehrmals durch Zentrifugation und anschließender Resuspension in PBS gewaschen. Ein Zentrifugationsschritt bei reduzierter Geschwindigkeit (800 rpm, 10 min) sorgt für die Trennung von Thrombozyten (vgl. Stokessches Gesetz), die in Suspension zurückbleiben.

Zur Konservierung der gewonnenen PBMC, wurden die Proben nach Bestimmung der Zellzahl in Einfriermedium (70% RPMI, 20%FCS, 10% DMSO) resuspendiert und auf mehrere sterile Cryoröhrchen aufgeteilt. Die Proben

wurden anschließend wenige Tage bei -80 °C und langfristig in Flüssigstickstoff gelagert.

2.2.3 Durchflusszytometrie

2.2.3.1 Durchflusszytometrie im Allgemeinen

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen einer Probe durch hydrodynamische Fokussierung der Trägerflüssigkeit einzeln an einem Analysepunkt vorbeigeführt. Dort passieren die Zellen einen Laserstrahl, welcher durch die passierende Zelle gestreut wird. Diese Streuung lässt sich als Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) mit einer Photodiode messen.

Der FSC ist hierbei proportional zur Zellgröße/-oberfläche, der SSC abhängig von der Zellgranularität.

Über die Lichtstreuung hinaus lassen sich auch Fluoreszenzmessungen durchführen. Hierbei werden Elektronen in fluoreszierenden Molekülen, sogenannten Fluorochromen, durch den Laserstrahl auf ein energiereicheres Niveau gehoben. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Niveau wird die Energiedifferenz als Photon emittiert, welches mit einer Photodiode gemessen werden kann. Da unterschiedliche Fluorochrome unterschiedliche Absorptionsspektren haben, werden Laser mehrerer Wellenlängen zur Anregung benötigt. Je nach Gerät sind diese violett (402/405nm), blau (488 nm), rot (640 nm) und gelb/grün (561 nm). Da die Fluorochrome wiederum in unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren, werden Filter benötigt, damit die verschiedenen emittierten Bandbreiten („Farben“) gleichzeitig, aber getrennt voneinander, gemessen werden können. Die Signalstärke im emittierten Bereich ist dann proportional zur Menge des Fluorochroms.

2.2.3.2 Färbung von Zellen im Allgemeinen

Ist ein Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, lassen sich dadurch Oberflächenantigene spezifisch markieren. Die Signalstärke ist dann proportional zur Oberflächenexpression des Antigens.

Anhand der gemessenen Expression von immunphänotypischen Oberflächenmarkern, wie den *Cluster of Differentiation* (CD), lassen sich die

analysierten Zellen verschiedenen Zellpopulationen zuordnen. Zwischen den Populationen der Lymphozyten wurde durch die Anfärbung von CD3, CD56 und CD8 unterschieden. Als Beispiel werden NK-Zellen als CD3⁻CD56⁺ definiert.

Um zwischen viablen und toten Zellen unterscheiden zu können, wird der Farbstoff 7-AAD genutzt, welcher in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann und dort die DNA interkaliert.

Zu Beginn der Färbung für die FACS-Analyse eines Experimentes wurde das zellhaltigen Analysat in eine 96-Well-V-Boden-Platte überführt. Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und die Überstände durch Inversion der Platten verworfen, die Zellen verbleiben hierbei am Boden der Platte. Um eine unspezifische Bindung der Antikörperkonjugate zu vermeiden, folgte die Resuspension und 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in FACS-Puffer mit 10µg/ml hlgG oder mlgG. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 30 µl einer Lösung aus Färbeantikörpern in FACS-Puffer resuspendiert und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Als Konzentration der eingesetzten Antikörper wurde hierbei der jeweilige Laborstandard verwendet. Um ungebundene Fluorochrome, die die FACS-Messung beeinflussen können zu entfernen, erfolgte die zweimalige Suspension in 150 µl FACS-Puffer und Abzentrifugation mit Verwerfung des Überstandes. Zuletzt wurden die Zellen in 75 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. 15 min vor FACS-Messung wurde 75 µl 1:100 7-AAD in FACS-Puffer hinzugegeben und die Proben auf Eis gelagert.

2.2.3.3 Antigenexpression CLEC12A

Da nicht alle Antikörper (wie z.B. der α CLEC12A 33C2 bzw. MIC12) als Fluorochromkonjugate erhältlich sind oder es unwirtschaftlich wäre, diese zu konjugieren, können gegen Antikörper gerichtete Antikörperkonjugate genutzt werden. Somit wird das Oberflächenantigen zuerst durch einen unkonjugierten Antikörper gebunden, welcher wiederum durch das Antikörperkonjugat (oder auch Sekundärantikörper) „farblich“ markiert und damit messbar wird.

Zu beachten ist hierbei, dass zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen zu Beginn der Färbung keine hlgG benutzt werden dürfen, da sonst die Sekundärantikörper an diese binden könnten.

Konkret wurde das in 2.2.3.2 beschriebene Protokoll angewandt, mit dem Unterschied, dass ein Inkubationsschritt mit dem MIC12-Konstrukt bzw. dem isoMIC (50 µl, 1 µg/ml Antikörper, 30 min, RT) mit anschließender 2-fachen Waschung mit FACS-Puffer dem eigentlichen Färbeschritt vorangestellt wurde. Als Sekundärantikörper wurde ein PE konjugierter asininer anti-human-Antikörper verwendet.

2.2.3.4 FACS Zytotoxizitätsassay

Eine Möglichkeit die Anti-Tumor-Aktivität von Antikörpern zu messen, ist die Zählung von lebendigen Krebszellen in einer Effektorzell-Kokultur nach erfolgter *in vitro*-Behandlung.

Zunächst wurden die Zielzellen (Zelllinie U937 oder AML-Patientenproben) markiert. Hierzu wurden die Zellen in einer Lösung aus 1,5 µl (für Zelllinien) oder 1,2 µl (für AML-Proben) *CellTrace Violet* in 3 ml PBS in einem 15 ml Falcon inkubiert (30 min, RT, im Dunkeln). *CellTrace Violet* bindet in diesem Schritt kovalent an zelluläre Proteine. Der Falcon wurde anschließend mit Zellkulturmedium aufgefüllt und 5 min inkubiert (5 min, RT, im Dunkeln). Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und die Zellkonzentration ermittelt.

Wurden AML-Patientenproben genutzt, wurden dem verwendeten Medium Supplemente (10% FCS, 100 ng/ml SCF, 50 ng/ml G-CSF, 50 ng/ml IL-3, 50 ng/ml IL-6, 50 ng/ml TPO, 50 ng/ml FLT3L) zugegeben, um die Viabilität der AML-Zellen zu gewährleisten.

Anschließend wurde in 96-Well-Flachboden Platten eine Kokultur aus Effektorzellen (PBMC gesunder Spender) und Zielzellen in versuchsspezifischen Verhältnissen (E:T Ratio) und Zellzahlen angesetzt. Den Kokulturen wurden äquimolar Antikörper und Kontrollen in den versuchsspezifisch angegebenen Konzentrationen beigefügt. Nach einer versuchsabhängigen Inkubationszeit

(37 °C und 5% CO₂) wurden die Zellen in 96-Well-V-Bodenplatten überführt und in FACS-Puffer resuspendiert. 15 min vor FACS-Messung wurde 7-AAD (Zielverdünnung 1:200) und Latex-Beads (Zielverdünnung 1:2000) hinzugefügt.

Die FACS-Analyse erfolgte mit dem BD Canto-II oder BD Fortessa. Um gleiche Analysevolumen zu gewährleisten, wurde ein Stopping-Gate eingerichtet, das die Messung nach einer festgesetzten Anzahl an gemessenen Latex-Beads (deren Konzentration in jedem Well konstant war) beendete.

Die Zielzellen wurden in der folgenden Analyse als *CellTrace Violet*⁺ Zellen identifiziert und gezählt. Die Viabilität wurde über die Negativität an 7-AAD ermittelt.

2.2.3.5 CD69-Expression

Eine Möglichkeit, die Aktivierung von Effektorzellen zu messen, besteht in der Messung der CD69-Expression auf der Zellmembran. Die Funktion von CD69 ist Gegenstand aktueller Forschung, jedoch wird angenommen, dass CD69 die Migration von Lymphozyten reguliert [115].

Um die Expression an CD69 zu quantifizieren, wurden die Zellen einer Kokultur (vgl. 2.2.3.4) mit α CD69-PE nach dem in 2.2.3.2 beschriebenen Verfahren angefärbt. Zwischen den Populationen der Lymphozyten wurde durch die Anfärbung von CD3, CD56 und CD8 unterschieden.

Die CD69-Expression von Lymphozyten ohne Behandlung wurden als Referenz bestimmt und Zellen mit einer höheren CD69-Expression als CD69⁺ gewertet. Als Messgröße wurde der Prozentsatz an CD69⁺-Zellen in der angegebenen Population bestimmt.

2.2.3.6 Proliferation

Die Proliferation von Effektorzellen (als Teil der PBMC) wurde anhand eines Dye-Dilution-Assays dargestellt. Hierbei wird *CellTrace Violet* kovalent an die Membran von Effektorzellen gebunden. Teilt sich die markierte Zelle, teilt sich die Membran der Mutterzelle auf die beiden Tochterzellen und diese weisen folglich die Hälfte der Signalstärke an *CellTrace Violet* auf. Mit jeder Generation nimmt

die Signalstärke weiter ab, sodass jede Generation eine für sie in etwa einheitliche Signalstärke aufweist und als Peak im Histogramm erkenntlich wird. Je ausgeprägter die Effektorzellen proliferieren, desto mehr Peaks sind in Richtung schwächerer Signalstärke abgrenzbar.

Im Unterschied zu einem Zytotoxizitätsassay (vgl. 2.2.3.4) wurden vor dem Ansetzen der Kokultur die Effektorzellen statt der Zielzellen markiert. Die Färbeschritte mit *CellTrace Violet* blieben identisch. Wie bei AML-Proben, wurde 1,2 μ l *CellTrace Violet* in 3 ml PBS verwendet.

Die Kokulturen wurden für eine versuchsspezifische Zeit inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Wenn angegeben, wurde zu den genannten Zeitpunkten die Zellen in den 96-Well-Platten abzentrifugiert, 50 μ l aus dem oberen Anteil jedes Wells entfernt und 50 μ l neues Zellkulturmedium und neue Antikörper zu dem Versuchsaufbau hinzugegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen nach dem in 2.2.3.2 Beschriebenen Verfahren gefärbt und gemessen.

2.2.3.7 Bindung an IL15-Rezeptoren

Um die Affinität der MIC-Konstrukte an den IL15-Rezeptor zu messen, wurden Zellen, die den IL-15R α (TF-1) bzw. den IL-15-R $\beta\gamma$ (M07e) exprimieren, mit verschiedenen Konstrukten inkubiert und die gebundenen Konstrukte mit anti-Human IgG-Antikörper-PE messbar gemacht.

Zu Beginn wurden die Zellen (100.000/Probe) in mIgG resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, 5min) und in 50 μ l Antikörperlösung in den angegebenen Konzentrationen resuspendiert und inkubiert (25 min, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen (in 150 μ l FACS-Puffer resuspendiert und abzentrifugiert) und in 25 μ l asininen anti-human-Antikörper-PE resuspendiert. Nach 20 min Inkubation wurden die Zellen erneut zweimalig gewaschen, in 75 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit dem FACS gemessen.

2.2.4 Incucyte Live-Cell Imaging

2.2.4.1 Incucyte allgemein

Der Incucyte ist ein automatisiertes Mikroskop, mithilfe dessen innerhalb eines Inkubators (37 °C, 5% CO₂) Bild- und Fluoreszenzaufnahmen von Zellkulturen angefertigt werden können. Mithilfe der Analysesoftware Incucyte 2019A können die Aufnahmen dann anhand einer einstellbaren Maske, die Größe, Form und Fluoreszenz berücksichtigt, analysiert werden. Zellen, die bestimmten Kriterien entsprechen, könne so identifiziert und gezählt werden.

Da riboflavinhaltige Medien eine Eigenfluoreszenz aufweisen, welche sich auf den Aufnahmen randbetont darstellt, müssen die Bilder mit einer automatisierten Top-Hat-Analyse nachbearbeitet werden, die die inhomogene Hintergrundfluoreszenz herausrechnet. So werden nur Zellen, die selbst fluoreszieren, als solche gezählt und nicht auch Zellen, die durch die Hintergrundfluoreszenz über der festgesetzten Fluoreszenzschwelle liegen.

2.2.4.2 gLuc-fLuc-GFP Zelllinien

Um die Zielzellen der Linie U937 mit dem Incucyte zählbar zu machen, wurden die Zellen mit einem Plasmid transduziert, welches zur Expression von gLuc, fLuc und GFP, aber auch zur Expression eines Puromycin-Resistenzgens (Puromycin-Acetyltransferase) führt. Die Gestaltung der Plasmide und die Transduktion wurde durch Dr. B. Klimovich durchgeführt. Nach einer Selektion der Plasmid-exprimierenden U937-Zellen mit 1 µg/ml Puromycin wurden die Zellen mit einem FACS gesortet. Hierbei ist einer Durchflusszytometrie ein Sortiergerät nachgeschaltet, mithilfe dessen die analysierten Zellen nach ihrer GFP-Expression sortiert wurden. Zur Erhaltung der GFP-Expression wurden die Zelllinie anschließend in Puromycin-haltigem (0,5 µg/ml) Zellkulturmedium expandiert.

GFP ist getreu seines Namens ein grün-fluoreszierendes Protein, welches erstmals in der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben wurde. Mit der Fluoreszenzmessung des Incucytes können so die GFP-exprimierenden U937 Zellen identifiziert und gezählt werden.

2.2.4.3 Incucyte – Zytotoxizität

Im Gegensatz zu einem FACS-Zytotoxizitäts-Versuch, bei dem nur ein Endpunkt gemessen werden kann, können im Incucyte in festsetzbaren Abständen Aufnahmen angefertigt werden und diese nach Zielzellen analysiert werden. Der Ansatz der Versuche erfolgte hierbei analog zu 2.2.3.4, jedoch wurden die Zellen nicht mit *CellTrace Violet* gelabelt und GFP-exprimierende U937-Zellen verwendet.

2.2.5 ELISA

Mit dem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) lassen sich gelöste Antigene über einen enzymatisch vermittelten Farbumschlag quantifizieren.

Das Antigen wird an einen im Reagenzgefäß adsorbierten Primärantikörper gebunden. Ein nicht-kompetitiver Sekundärantikörper bindet an das Antigen und eine Peroxidase wird an den Antikörper über eine Streptavidin-Biotin-Bindung angehängt. Bei Zugabe eines Substrates, wird dieses durch die Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt, dessen Konzentration fotometrisch ermittelt werden kann. Die Messwerte der Farbstoffkonzentration werden dann auf eine Kalibrierkurve interpoliert und somit die Konzentration des Antigens ermittelt.

Für die Messung wurden Costar 96-Well-Platten verwendet. Die Wells wurden über Nacht mit 50 µl/ml einer 1 µg/ml INF γ -Antikörper (Endogen M700A) in Carbonat-Bikarbonat-Puffer bedeckt und bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimalig mit Waschpuffer (500 µl Tween in 1 L PBS) gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl pro Well 1% BSA-PBS (1h, RT) blockiert. Die Lösung wurde abgesaugt und 50 µl der zu messenden Proben, sowie ein Kalibrierungsstandard, wurden in die Wells gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurde 50 µl einer 1 µg/ml INF γ -Sekundärantikörper-Lösung (Endogen M701B, biotinyliert) zu den Proben gegeben und erneut 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde fünfmalig mit Waschpuffer gewaschen und es wurde 100 µl/Well poly-HRP-Streptavidin (1:7500 in 1%-BSA-PBS) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde sechsmalig

mit Waschpuffer gewaschen. Es wurde 50 µl einer TMB-Substrat-Lösung hinzugegeben und die Platte in Dunkelheit bei RT für ca. 15 min inkubiert. Sobald sich die Negativkontrolle des Kalibrierungsstandards leicht blau verfärbte, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µl/Well 1 M H₃PO₄ gestoppt. Die Proben wurden innerhalb von 30 min auf ihre Absorption bei 450 nm gemessen. Hierzu wurde der ELISA-Reader Sunrise genutzt.

2.2.6 Produktion der Konstrukte

2.2.6.1 Mutagenese

Um den IL-15 Bestandteil der Konstrukte zu mutieren wurde die *Site-Directed Mutagenesis* mittels PCR verwendet. Hierzu wurden zunächst *forward (sense)* und *reverse (anti-sense)* Primer von 63 Nukleotiden Länge, welche bis auf die Mutation komplementär zum ursprünglichen Antikörperplasmid waren, *in silico* erstellt und kommerziell synthetisiert. Die überwiegende Mehrheit der Mutagenesen wurde von AG Jung durchgeführt. Die Mutagenese von weiteren L45E Mutanten wurde im Verlauf unter Anleitung von Dr. B Klimovich durchgeführt. Der Primer hierfür lautete wie folgt:

F: tgcaaagtaacagcaatgaagtgcttctcgagaagttacaagttattcacttgagtctgga

R: tccagactcaagtgaaataacttgtaacttctcgagaaagcacttcattgctgttactttgca

Anschließend wurden die nötigen Reagenzien wie folgend dargestellt gemischt:

Reagenz	µl
Pfu Turbo buffer	5
<i>Template</i> -Plasmide	X (= 200 ng)
2 µM Primer forward	1
2 µM Primer reverse	1
2,5 mM dNTP	4
Pfu Turbo Polymerase	1
H ₂ O	→ auf 50 µl auffüllen

Hiernach erfolgt eine PCR nach folgendem Cycling:

5 min 94°C

20 Wiederholungen von:

1 min	94°C
1 min	56°C
16 min (2 min/kb)	68°C
10 min	68°C
Hold	4°C

Zuletzt wurden die parentalen Plasmide durch DpnI verdaut. Dies ist gezielt möglich, da DpnI seine Schnittstelle nur an methylierter DNA erkennen kann und die neu synthetisierten Plasmide nicht methyliert sind. Im Gegensatz dazu sind die in *E. coli*-Kulturen amplifizierten *Templates* methyliert durch ihren Ursprungswirt.

2.2.6.2 Amplifizierung der Plasmide

Die aus der Mutagenese gewonnene Plasmidmenge reicht verfahrensbedingt für eine Produktion von für die Versuchsreihen benötigten Antikörpermengen nicht aus. Deshalb müssen die Plasmide in mehreren Schritten amplifiziert werden.

Zunächst wurden kompetente *E. coli* mit dem Plasmid transformiert. Hierzu wurden 10 µl des aus 2.2.6.1 stammenden Plasmidmix zu den Bakterien gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock auf 42 °C für 1,5 min im Thermoblock. Hierbei wird die Zellmembran kurzzeitig durchlässig und Plasmide können in das bakterielle Zytoplasma gelangen. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium vermischt. Nach 40 min auf dem Schüttler bei 37 °C erfolgte eine Zentrifugation und Resuspension nach Verwerfen von 800 µl Überstand. Die übrigen 200 µl wurden auf LB-Amp-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der Ampicillin-haltigen Agarose konnten nur solche Bakterien überleben und Kolonien bilden, die mit dem Plasmid transformiert wurden, welches zusätzlich ein Gen für Ampicillinresistenz enthält.

Die Kolonien wurden steril in 5 ml LB-Amp-Medium (100µg/ml) transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wurde eine molekulargenetische Analyse benötigt, wurde bereits nach diesem Schritt eine Isolation der Plasmide (Miniprep Kit analog zu Maxiprep Kit, s.u.) vorgenommen.

Für die spätere Transfektion von eukaryotischen Zellen (s. 2.2.4.3) wurden größere Mengen Plasmid benötigt, weshalb zunächst 200 ml LB-Amp-Medium mit den Vorkulturen angeimpft wurden. Nach Inkubation über Nacht erfolgte die Isolation der Plasmide mittels dem Maxiprep Kit von Qiagen gemäß des Herstellerprotokolls, welches auf alkalischer Lyse der Bakterien basiert.

Vor der weiteren Nutzung wurden die isolierten Plasmide mittels Sequenzierung kontrolliert. Dies geschah kommerziell über die Firma Microsynth.

2.2.6.3 Produktion der Antikörperkonstrukte

Die Produktion der Konstrukte wurde mit Hilfe des FreestyleCHO-Kits und des ExpiCHO-Systems durchgeführt. Hierbei werden CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovaries*) chemisch transfiziert und produzieren die Antikörperkonstrukte. Bis auf wenige Schritte wurde dies durch Dr. B. Klimovich durchgeführt, da für die Räumlichkeiten aufgrund der Kontaminationsgefahr bei antibiotikafreien Kulturen eine Zutrittsbeschränkung galt.

2.2.6.4 Aufreinigung der Produkte mittels Affinitätschromatographie mit Ätka Pure 25 System

Die Aufreinigung der Antikörperkonstrukte erfolgte unter Anleitung von Dr. M. Pflügler mit dem Ätka pure-System, einer Kombination aus Affinitäts- und Größenausschlusschromatografie. Die Überstände der CHO-Kulturen wurden zunächst auf eine Säule mit Protein A (Mabselect) aufgetragen. Protein A, welches ursprünglich aus der Zellwand von *S. aureus* stammt, bindet spezifisch an die Fc-Region verschiedener Immunglobuline. Anschließend wurden die Konstrukte mit einem Glycinpuffer eluiert und über eine Größenausschlusschromatografiesäule (HiLoad 16/60 Superdex 200) fraktioniert. Die Monomer-haltigen Fraktionen wurden anschließend zusammengeführt und über einen Amicon-Filter (30 kDa) bei 2300 rpm

aufkonzentriert und anschließend sterilfiltriert. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte anschließend mit dem Nanodrop2000 und dem entsprechenden Messprogramm für IgG-Proteine. Dieses basiert auf der Absorption bei 280 nm.

2.2.6.5 SDS-PAGE

Eine SDS-PAGE wird durchgeführt, um die molekulare Masse der Konstrukte und der einzelnen Antikörperketten zu analysieren. Hierbei wurden die Konstrukte zunächst mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat denaturiert. Für die gesonderte Analyse der leichten und schweren Kette wurden die Disulfidbindungen zwischen den Antikörperketten mit β -Mercaptoethanol für 5 min bei 95 °C reduziert und damit voneinander getrennt. Die Proben (jeweils reduziert und nicht-reduziert) wurden auf kommerzielles 4-12% Bolt-Gradientengel aufgetragen und die Elektrophorese wurde gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard (*Ladder*) zum Ablesen des molekularen Gewichts diente hierbei der Precision Plus-Standard von BioRad. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proteine mit Comassie-Brilliantblau-Lösung gefärbt und anschließend gescannt.

2.2.6.6 SEC (Analytische Größenausschlusschromatografie)

Die Analytische Größenausschlusschromatografie wurde unter Anleitung von Dr. M. Pflügler durchgeführt und dient der Analyse der produzierten Antikörperkonstrukte auf deren Größe und hierüber auch auf deren Aggregationsverhalten. Hierzu wurde das *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC)-System Dionex UltiMate 3000 BioRS mit der Chromatographiesäule Superdex 200 Increase 10/300 GL verwendet. Diese beinhaltet eine poröse Trennsäule. In den Poren könne kleinere Proteine länger verweilen und gelangen somit langsamer mit dem Fluss der Trägersubstanz (500 μ l/min, DPBS) zum Messpunkt (Absorption bei 220 nm). Die entstandene Kurve kann, unter Berücksichtigung einer Eichprobe, anhand der Laufzeit Rückschlüsse auf die molekulare Masse geben und anhand der Form zudem auf die Aggregation der Produkte.

2.2.6.7 Bestimmung und Reinigung von bakteriellen Endotoxinen

Die Verunreinigung mit bakteriellen Endotoxinen kann das Ergebnis von Funktionscharakterisierungen maßgeblich beeinträchtigen, da Effektorzellen unspezifisch aktiviert werden. Aufgrund dessen wurden alle produzierten Chargen auf Endotoxine getestet. Dies wurde mittels dem Endozyme-II Kit (Biomérieux) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit benutzt einen rekombinant synthetisierten Gerinnungsfaktor des Pfeilschwanzkrebses. Als Cut-off-Wert wurde 0,05 EU/ml festgelegt. Wurde dieser Wert überschritten, erfolgte die Abreinigung mit dem Endotrap HD kit (Lionex) nach den Herstellerangaben. Hier wird eine Säule eingesetzt, die Lipopolysaccharide (Endotoxine) bindet. Anschließend erfolgte die erneute Endotoxintestung.

2.2.7 Visualisierung des IL-15 Moleküls und der eingebrachten Mutationen

Die Strukturvisualisierungen wurden mit PyMOL 3.1.0 (Open-Source) erstellt. Die zugrunde liegenden Koordinaten wurden aus der Research Collaboration for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB; wwPDB) geladen.

2.2.8 Signifikanztestung

Die Signifikanztestung wurde mit GraphPad durchgeführt. Die angewendeten Tests werden jeweils unter der entsprechenden Grafik angegeben. Die Ergebnisse werden wie in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 7 - Signifikanzniveaus

Symbol	Bedeutung
ns	$P > 0.05$
*	$P \leq 0.05$
**	$P \leq 0.01$
***	$P \leq 0.001$
****	$P \leq 0.0001$

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung MIC12

3.1.1 Antigenbindung der CLEC12A Antikörper

In Vorarbeiten wurden drei CLEC12A-Antikörper von ABL-Bio untersucht. 33C2 wies hierbei die höchste Affinität zu CLEC12A auf, weshalb auf dessen Basis unser Wirkstoffkandidat MIC12 (*Modified Immunocytokine against CLEC12A*) generiert wurde [116]. Zunächst wurde die Bindung von MIC12 an primäre AML-Patientenproben untersucht. Abbildung 2A zeigt exemplarische Färbungsprofile, Abbildung 2B zeigt gepoolte Daten von 24 Spendern. Insgesamt konnte eine substanziale Bindung von MIC12 nachgewiesen werden. Im Durchschnitt lag der Anteil an positiven Zellen in den Patienten bei 88%. Von den 24 untersuchten Patientenproben wies nur einer eine geringe CLEC12A-Bindung (21%) auf. Auch die in nachfolgenden Versuchen verwendete Zelllinie U937 wurde auf die Bindung von MIC12 an CLEC12A (Abbildung 2C) untersucht. Die FACS-Analyse zeigte hierbei eine starke Positivität der Zelllinie.

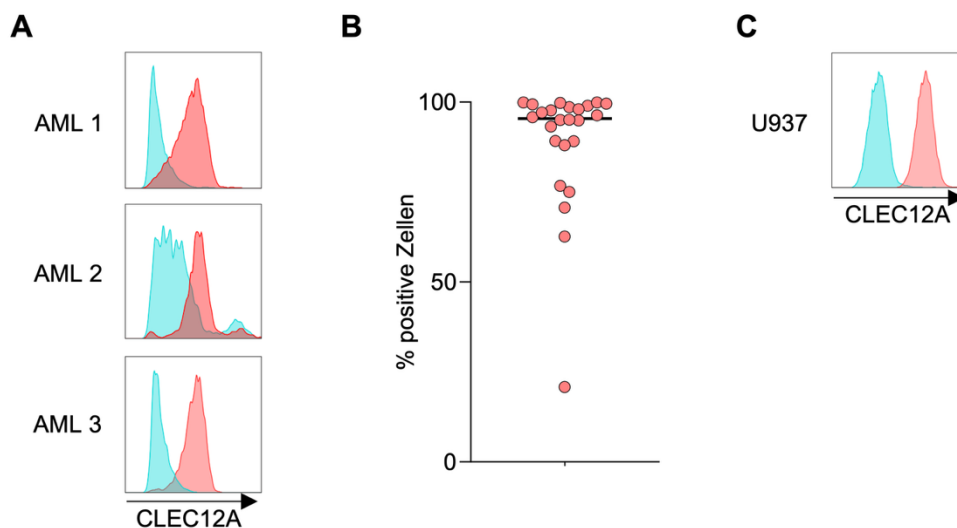


Abbildung 2 - Expression von CLEC12A auf primären AML-Zellen und der Zelllinie U937. (A/B/C) Bestimmung der CLEC12A-Expression mittels Durchflusszytometrie durch eine Färbung mit MIC12 und der Isotypenkontrolle (isoMIC). **(A)** Exemplarische Färbung von Blasten aus AML-Spendern (n=3) als Histogramm (MIC12 in Rot vs isoMIC in Türkis). **(B)** Expression von CLEC12A in primären AML-Proben (n = 24), dargestellt als Prozentsatz CLEC12A-positiver Zellen. Die Gating-Strategie basiert auf der Färbung mit dem isoMIC. **(C)** Die CLEC12A Expression auf der Zelllinie U937 (MIC12 in Rot vs isoMIC in Türkis).

3.1.2 IL-15R-Bindung

Wie einleitend erläutert, hebt die E46K Mutation innerhalb des IL-15 die Bindung an den IL-15R α auf. Dies konnte in Bindungsanalysen mit IL-15R α -exprimierenden TF-1 Zellen bestätigt werden (Abbildung 3). Das Immunzytokin mit IL-15^{E46K} zeigte hierbei eine deutlich verringerte Bindung an den IL-15R α als das Konstrukt mit Wildtyp-IL-15 (isoIC). Der parentale Antikörper 33C2^{SDIE} wies keine Bindung an TF-1 auf.

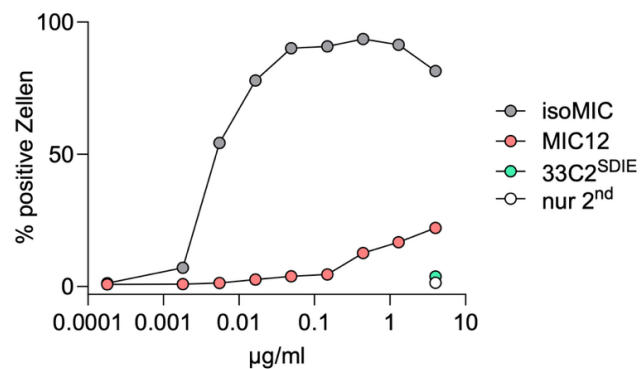


Abbildung 3 - Bindung der Immunzytokine an den IL-15R α . Die IL-15R α -exprimierende Zelllinie TF-1 wurde mit steigenden Konzentrationen der angegebenen Konstrukte inkubiert. Die Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines PE-konjugierten anti-human-IgG-Antikörpers gemessen. Als Positivkontrolle diente ein Immunzytokin mit Wildtyp-IL-15 und irrelevanter Zielspezifität (isoIC). Der parentale 33C2-Antikörper wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Y-Achse zeigt die positiven Zellen in Prozent, gegatet anhand von Kontrollen ohne primären Antikörper („nur 2nd“).

Die IL-15-Effektorfunktion wird durch den IL-15R $\beta\gamma$ vermittelt. Die Affinität zu diesem ist somit ein Hinweis auf die Potenz einer IL-15 Mutante. Um auszuschließen, dass die Einführung der E46K-Mutation die Interaktion mit IL-15R $\beta\gamma$ nachhaltig beeinflusst, wurden Bindungsanalysen mit der M07e-Zelllinie durchgeführt, die diesen Rezeptorkomplex exprimiert. Abbildung 4 zeigt, dass die Interaktion mit IL-15R $\beta\gamma$ im Wesentlichen erhalten bleibt, obwohl das IL-15^{E46K}-Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Bindung aufweist. Der parentale Antikörper zeigte als Negativkontrolle keine Bindung an M07e.

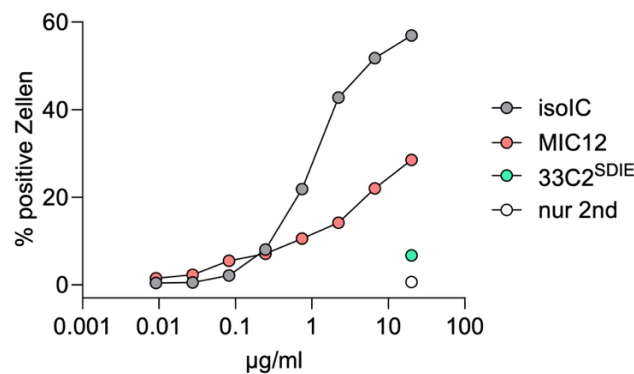


Abbildung 4 – Bindungsanalysen an IL-15R β . Die IL-15R β -exprimierende Zelllinie Mo7e wurde mit steigenden Konzentrationen der angegebenen Konstrukte inkubiert. Die Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines PE-konjugierten anti-human-IgG-Antikörpers gemessen. Als Positivkontrolle diente ein Immunzytokin mit Wildtyp-IL-15 und irrelevanter Zielspezifität (isoIC). Der parentale 33C2-Antikörper wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Y-Achse zeigt die positiven Zellen in Prozent, getaget anhand von Kontrollen ohne primären Antikörper („nur 2nd“).

3.1.3 Aktivierung und Proliferation von Effektorzellen

Um die Funktionalität des MIC-Konstrukts zu evaluieren und den durch IL-15 vermittelten Effizienzgewinn zu beurteilen, wurde die NK-Zellaktivierung, Zytokinsekretion und NK-Zellproliferation nach Behandlung mit MIC12 und dem entsprechenden Fc-optimierten Antikörper verglichen. In den folgenden Versuchen wurde MIC12 im direkten Vergleich zur Isotypenkontrolle isoMIC getestet. Dabei handelt es sich bei isoMIC um ein MIC-Konstrukt mit einer Bindungsdomäne irrelevanter Spezifität, das zur Bewertung der Zielzellrestriktion dient. Zudem wurden der Fc-optimierten Antikörper (33C2^{SDIE}) ohne IL-15 und das Immunzytokin ohne Fc-Optimierung (MIC12^{Fc^{WT}}) getestet, um zu evaluieren, ob die Aktivität von MIC12 auf eine der beiden Modifikationen zurückzuführen ist oder erst deren Kombination den vollen funktionellen Effekt vermittelt.

MIC12 induzierte eine deutliche Aktivierung von NK-Zellen, erkennbar an der erhöhten Oberflächenexpression von CD69 (Abbildung 5A). Im Vergleich dazu zeigte die Behandlung mit dem parentalen Antikörper 33C2^{SDIE} eine signifikant geringere Aktivierung. Die zielantigenunabhängige Aktivierung durch die MIC-Isotypkontrolle entsprach in etwa der Aktivität des Fc-optimierten Antikörpers und des Immunzytokins ohne Fc-Optimierung. Um den Unterschied zwischen zielantigenabhängiger und -unabhängiger Aktivierung differenzierter

beurteilen zu können, wurde eine Titration durchgeführt (Abbildung 5B). Bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration zeigte MIC12 eine starke Induktion der CD69-Expression auf NK-Zellen, wobei bei 0,33 µg/ml ein Maximum erreicht wurde. Im Gegensatz dazu induzierte isoMIC nur eine deutlich geringere Aktivierung, die zwar konzentrationsabhängig zunahm, jedoch im dargestellten Bereich ein breites Aktivitätsfenster ohne Erreichen der Aktivierung durch MIC12 aufwies. T-Zellen wurden nur bei der Behandlung mit dem rekombinanten IL-15 aktiviert, nicht jedoch bei der Behandlung mit einem der Antikörperkonstrukte (Abbildung 5C).

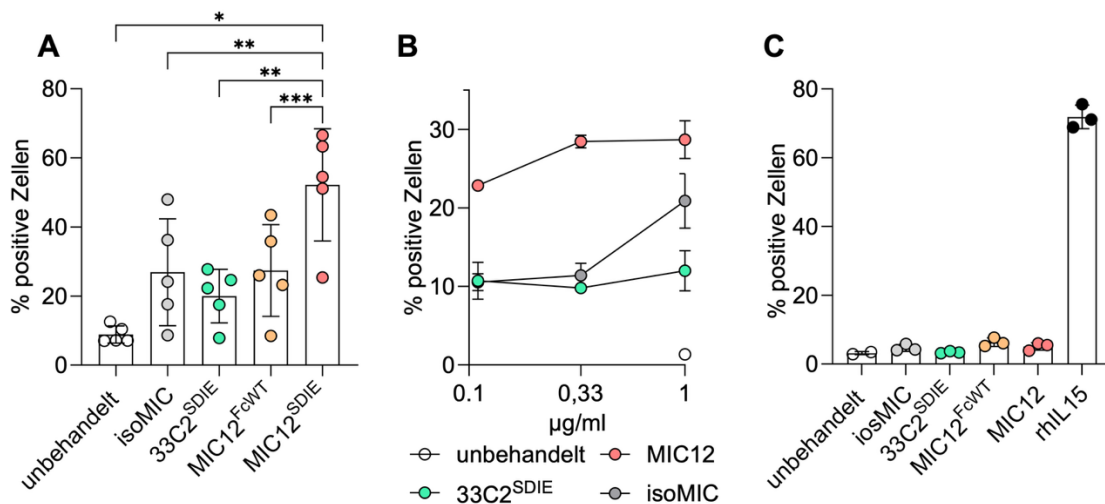


Abbildung 5 - NK- und T-Zellaktivierung nach Stimulation durch MIC12. (A/B/C) PBMC wurden mit Zielzellen und den angegebenen Antikörperkonstrukten koinkubiert und die CD69 Expression auf NK-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz der CD69⁺ Zellen. (A) CD69 Expression auf NK-Zellen von 5 PBMC-Spendern nach Behandlung mit 1 µg/ml. Statistische Analyse mit one-way ANOVA. (B) Dosisabhängige CD69 Expression auf NK-Zellen eines PBMC-Spenders. (C) CD69 Expression auf T-Zellen eines PBMC-Spenders.

Die Aktivierung von NK-Zellen führt zur Sekretion von IFN γ , einem Zytokin mit immunstimulierenden und antitumoralen Eigenschaften [117]. Da IFN γ jedoch in Kombination mit IL-6 auch systemische Nebenwirkungen während einer IL-15-Therapie vermitteln kann, dient seine Ausschüttung sowohl als Aktivierungsmarker als auch als wichtiger Sicherheitsparameter zur Einschätzung der Verträglichkeit von Immuntherapeutika. Es wurde eine vergleichende Analyse von MIC12 hinsichtlich der Fähigkeit zur Stimulation der IFN γ -Sekretion in Kokulturen von PBMC gesunder Spender durchgeführt, wobei

U937 als Zielzellen verwendet wurden. Abbildung 6A zeigt jeweils eine stabile Konzentration zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h. Zu allen Messzeitpunkten lagen die durch MIC12 ausgelösten IFN γ -Sekretion signifikant über den Werten, die nach Behandlung mit 33C2^{SDIE}, MIC12-Fc^{WT} oder der isoMIC gemessen wurden. Auch in der Titration (Abbildung 6B) ergab sich im Vergleich zu der Isotypkontrolle und den anderen Konstrukten eine höhere IFN γ -Konzentration im Überstand.

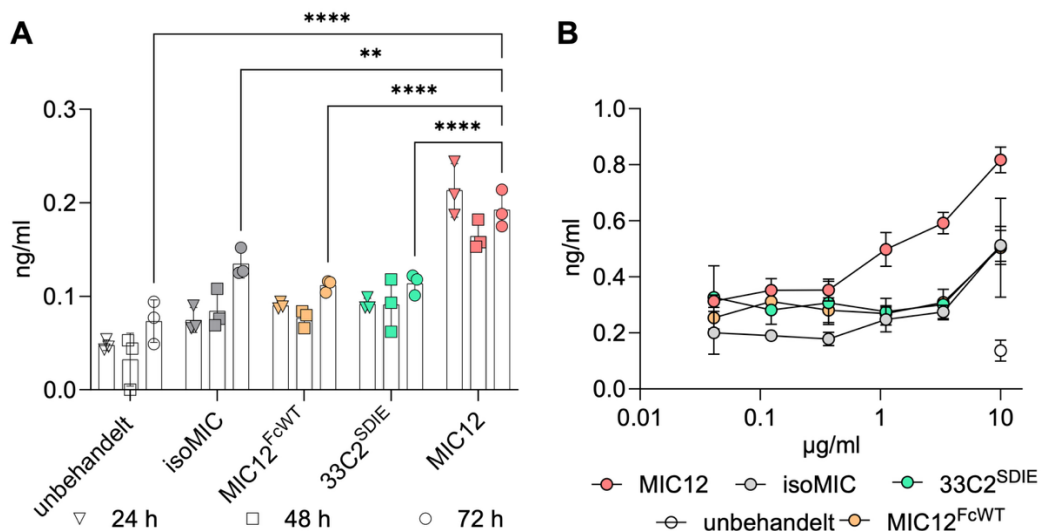


Abbildung 6 - IFN γ -Sekretion nach Stimulation durch Immunzytokine bei verschiedenen Inkubationszeiten und -konzentrationen. PBMC wurden mit den Zielzellen U937 und den angegebenen Konstrukten **(A)** für unterschiedliche Dauer (bei 0,3 μ g/ml, Signifikanztestung mit two-way ANOVA) und **(B)** unterschiedlichen Konzentrationen (Dauer 24h) koinkubiert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf die Konzentration von IFN γ untersucht.

Eine bedeutende Funktion von IL-15 ist die Induktion der Proliferation von Effektorzellen. In einem Dye-Dilution-Assay wurden die Proliferation von NK- und T-Zellen in Kokulturen mit U937 getestet. Jeder zusätzliche Peak mit schwächerer *CellTrace Violet* Intensität als der Referenzpeak der unbehandelten Probe stellt eine zusätzliche Generation der Mitose dar. Eine MIC12 Behandlung löste hierbei im Vergleich zu der unbehandelten Probe eine deutlich ausgeprägte Proliferation der NK-Zellen aus (Abbildung 7A). Bei dem Konstrukt ohne Fc-Optimierung, sowie bei dem parentalen Antikörper ohne IL-15 blieb dieser Effekt aus. Beide konnten keine Proliferation über den Referenzpeak hinaus auslösen. Die Isotypkontrolle des MIC löste eine Proliferation der NK-Zellen aus. Diese war

jedoch weniger ausgeprägt als die mit MIC12. Eine Behandlung mit rhIL15 verursachte die stärkste Proliferation. Keines der getesteten Antikörperkonstrukte induzierte eine Proliferation von T-Zellen – selbst nicht bei einer zehnfach erhöhten Konzentration. Lediglich die Behandlung mit rekombinantem IL-15 (rhIL-15) führte zu einer nachweisbaren Wirkung (Abbildung 7B).

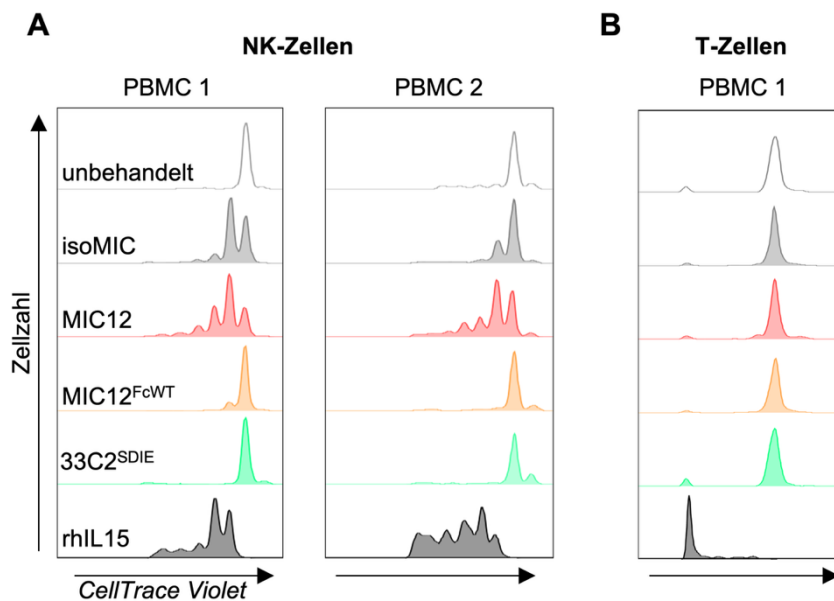


Abbildung 7 - Proliferation von Effektorzellen nach Stimulation durch Immunzytokine und IL-15. (A) Mit *CellTrace Violet* gefärbte PBMC zweier Spender wurden mit U937 Zellen und 0,1 µg/ml verschiedener Antikörperkonstrukte koinkubiert (12 Tage, neues Medium und Antikörper wurden an Tag 5 und 9 hinzugefügt). Das Histogramm zeigt die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenzintensität von *CellTrace Violet* auf CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen. Nach links verschobene Peaks weisen auf eine Verdünnung des Farbstoffs hin und sind somit ein Indikator für Zellproliferation. (B) Proliferation der CD3⁺ T-Zellen eines PBMC-Spenders mit 1 µg/ml.

3.1.4 Zytotoxizität gegen Zelllinien und primäre AML-Zellen

Nachdem MIC12 eine überlegene Effektorzellaktivierung zeigen konnte, wurde getestet, ob sich diese Vorteile auch in eine gesteigerte Zytotoxizität übertragen. In einem Kurzzeitversuch zeigte sich eine signifikant gesteigerte Zytotoxizität des MIC-Konstruktes gegenüber allen anderen Konstrukten (Abbildung 8A). Da MIC12 zudem eine ausgeprägte Proliferation von NK-Zellen induziert, war es von Interesse, gerade die Langzeiteffektivität des Konstrukts näher zu untersuchen. Unter *Live-Cell Imaging* im Incucyte zeigte eine Behandlung mit MIC12 eine

signifikant bessere Langzeitsuppression von GFP-U937 in Kokulturen über 8 Tage als durch den parentalen Antikörper 33C2^{SDIE} oder die Isotypenkontrolle isoMIC erreicht werden konnte (Abbildungen 8B, C, D). Lediglich gegenüber MIC12-Fcwt wurde keine Signifikanz erreicht.

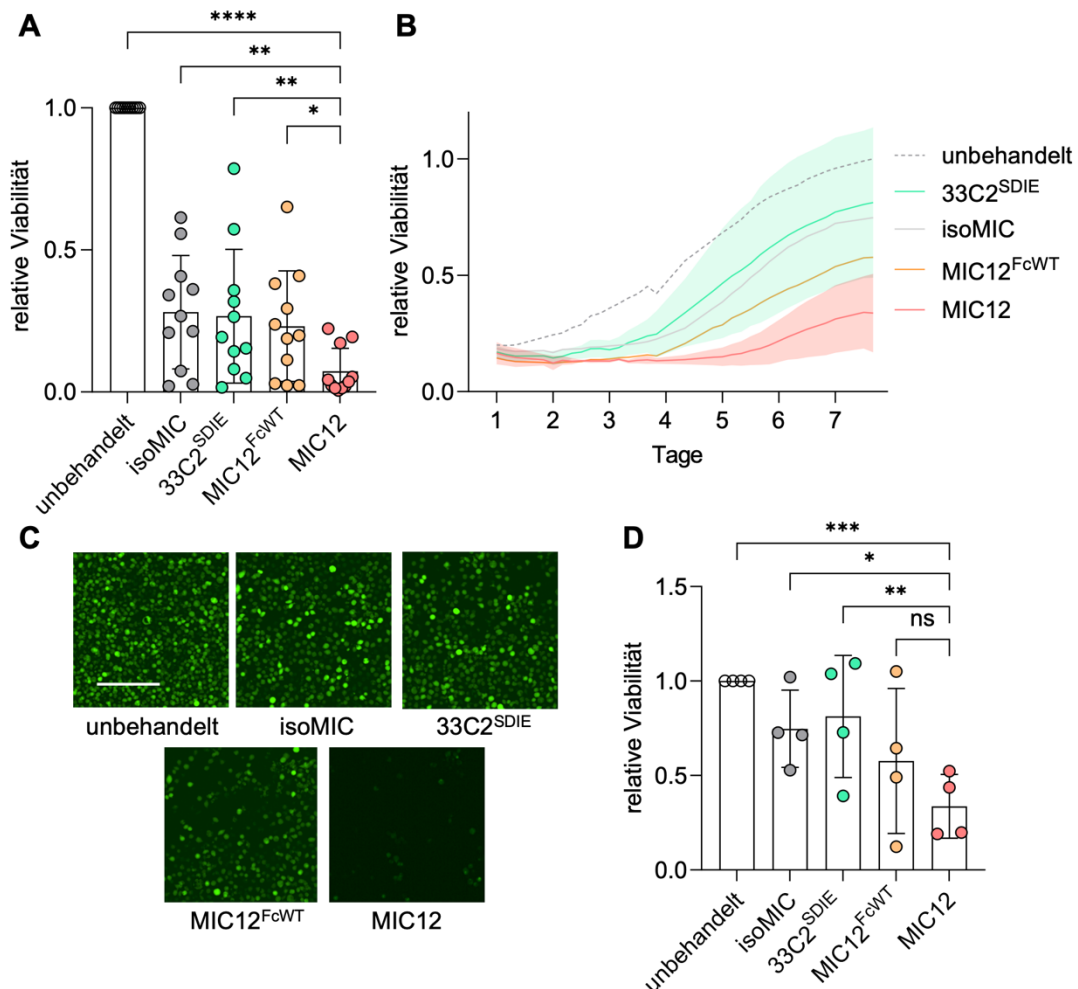


Abbildung 8 - MIC12 induziert eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber U937 Zellen. (A) PBMC (n = 11) wurden mit U937 Zellen (E:T = 2,5:1) und den angegebenen Immunitokinen (1 µg/ml) für 72h inkubiert. Die überlebenden Zielzellen wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und spenderspezifisch auf die ungetriggerten Proben normalisiert. Signifikanztestung mittels Friedman Test. (B) PBMC (n = 4) wurden mit GFP-exprimierenden U937 Zellen (E:T = 2,5:1) und den angegebenen Konstrukten (0,3 µg/ml) kokultiviert und die Anzahl der lebenden Zielzellen mittels *Live-Cell Imaging* im Incucyte S3 alle 4 Stunden bestimmt (Beispielbilder in C, die Skala entspricht 200 µm). Die Datenpunkte der einzelnen PBMC-Spender wurden auf den Endwert der ungetriggerten Proben normalisiert („relative Viabilität“). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nur die Standardabweichungen von MIC12 und 33C2^{SDIE} in der Grafik aufgeführt (Schattierung). (D) Die Endpunkte wurden zusätzlich als Balkendiagramm dargestellt. Signifikanztestung mittels one-way ANOVA.

In den Zytotoxizitätsversuchen gegenüber der Zelllinie U937 konnte somit eine Überlegenheit des MIC12-Konstrukts nachgewiesen werden. Von größerer Relevanz ist jedoch die Frage, ob sich dieser Effekt auch bei primären AML-Zellen reproduzieren lässt. In einem FACS-basierten Zytotoxizitätsassay wurden hierzu primäre AML-Patientenproben mit PBMC, sowie mit MIC12, isoMIC und 33C2^{SDIE} koinkubiert. Die Abbildung 9A zeigt die Spender in absteigender Reihenfolge ihrer CLEC12A-Expression. Die Wirkung zeigte sich umso schwächer, je geringer ausgeprägt die Zielantigen-Expression war. Darüber hinaus war ein stärkerer Effekt bei höheren E:T Verhältnissen feststellbar. Für eine statistische Auswertung wurden die Daten der 4 stark CLEC12A-exprimierenden Spender gepoolt. Eine Behandlung mit MIC12 zeigte hierbei eine signifikant bessere Zytotoxizität als die Isotypenkontrolle oder der Fc-optimierte Antikörper (Abbildung 9B). Bei schwach CLEC12A-exprimierenden AML-Proben war der zytotoxische Effekt nicht signifikant gegenüber der Isotypenkontrolle (Abbildung 9C).

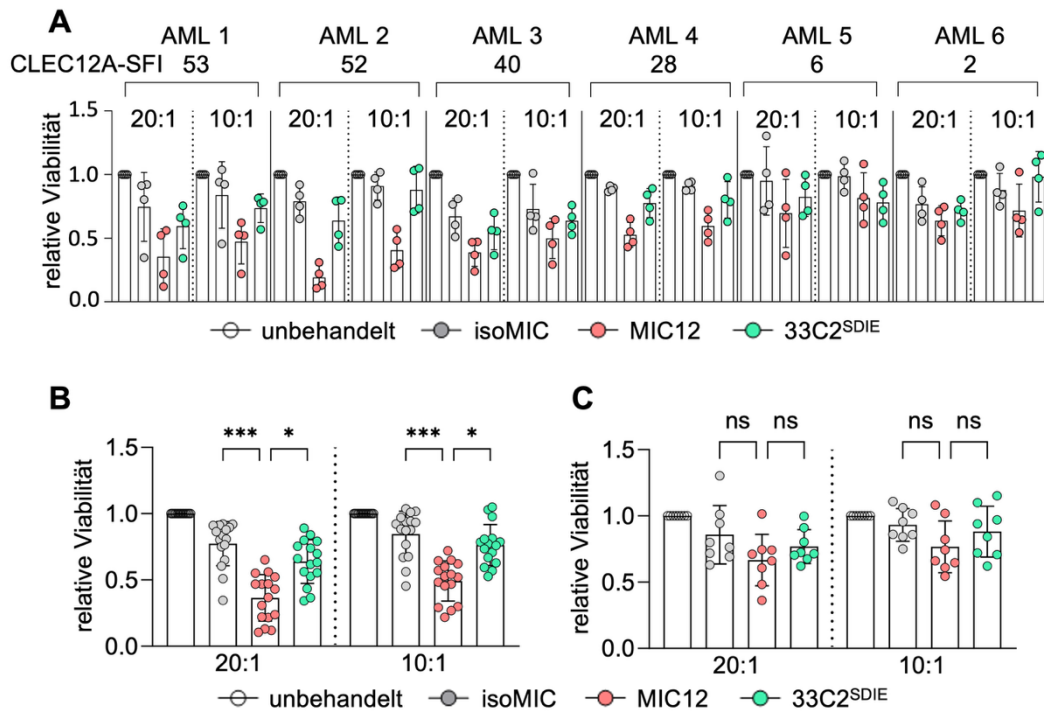


Abbildung 9 - MIC12-vermittelte Zytotoxizität gegen primäre AML-Zellen. (A) PBMCs ($n = 4$) wurden mit primären AML-Zellen ($n = 6$) koinkubiert, die unterschiedliche CLEC12A-Oberflächenexpressionen aufwiesen. Die Expression wurde als spezifische Fluoreszenzintensität (SFI) angegeben, berechnet als Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Färbung mit dem spezifischen Antikörper zur MFI der Isotyp-Kontrolle. Die Koinkubation erfolgte in den angegebenen E:T-Verhältnissen und in Anwesenheit der angegebenen Antikörperkonstrukte ($1 \mu\text{g/ml}$) über 6 Tage; an Tag 3 wurde frisches Medium ergänzt. Die Ergebnisse der stark (B, SFI 53-28) und schwach (C, SFI 6 und 2) CLEC12A-positiven AML-Proben wurden jeweils gepoolt für die statistische Analyse (Friedman-Test).

3.2 Optimierung der Produzierbarkeit von MIC12

3.2.1 Produzierbarkeit der MIC12-Mutanten und topografische Einordnung der Mutationen im IL-15 Molekül

Für die Translation in die Klinik spielt die *Developability* eine wesentliche Rolle. *Developability* ist die Gesamtheit der Eigenschaften wie Produzierbarkeit, Aggregationsverhalten und Stabilität, die die Eignung eines Konstruktes für die pharmazeutische Entwicklung und Herstellung bestimmen. Bei der Produktion von MIC12 konnte festgestellt werden, dass das Protein stark zu Aggregation tendiert (Abbildung 10A). Dies führt zu einer geringeren Ausbeute des Endprodukts, erschwert die Aufreinigung im großem Maßstab und birgt das Risiko, dass das gereinigte Protein instabil ist. Um diesem Problem zu begegnen,

wurden von unseren Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Jung und Universität Sydney Mutationen des IL-15-Anteils vorhergesagt, die potenziell die Aggregationsneigung vermindern können [96]. Entsprechende Proteinvarianten wurden parallel mit dem parentalen Konstrukt in gleichen Volumina in CHO-Zellen produziert und durch Protein-A-Chromatographie und präparative Größenausschlusschromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) aufgereinigt. Das SEC-Profil ermöglicht die Beurteilung des Aggregationsverhaltens sowie die Abschätzung des Molekulargewichts (Abbildung 10A). Der rechte, schmalere Peak enthält das Antikörperkonstrukt, während der linke, breitere Peak Aggregate enthält. Das Einbringen der Mutation E93R verringerte die Aggregationsbildung nicht. Die Doppelmutante I67N-I68L verstärkte sogar die Aggregation. H20E-D22R hatte ein verringertes Molekulargewicht, welches anhand des früheren Durchlaufs (X-Achse) ersichtlich ist. Die beiden Mutationen L45E und H20E reduzierten dagegen die Aggregation deutlich und erhöhten die Ausbeute, wobei L45E gegenüber H20E in dieser repräsentativen Produktion eine überlegene Ausbeute aufwies (Abbildung 10B). Die Ausbeute entsprach in diesem Falle annähernd der des Fc-optimierten, parentalen Antikörpers. Die Integrität der Antikörperkonstrukte wurde mithilfe einer SDS-PAGE überprüft. Die Abbildung 10C zeigt dies exemplarisch für MIC12 und die beiden Mutanten H20E und L45E. Die leichten Ketten lagen hierbei mit 25 kDa bei dem Normalwert für IgG. Die schweren Ketten der Mutanten waren mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa identisch zu denen von MIC12. Eine analytische SEC (Abbildung 10D) bestätigte nach der Purifikation der Konstrukte, dass im Endprodukt keine Aggregate vorlagen, sowie das korrekte Molekulargewicht der Konstrukte. Es werden exemplarisch MIC12 und die Mutanten L45E und H20E abgebildet.

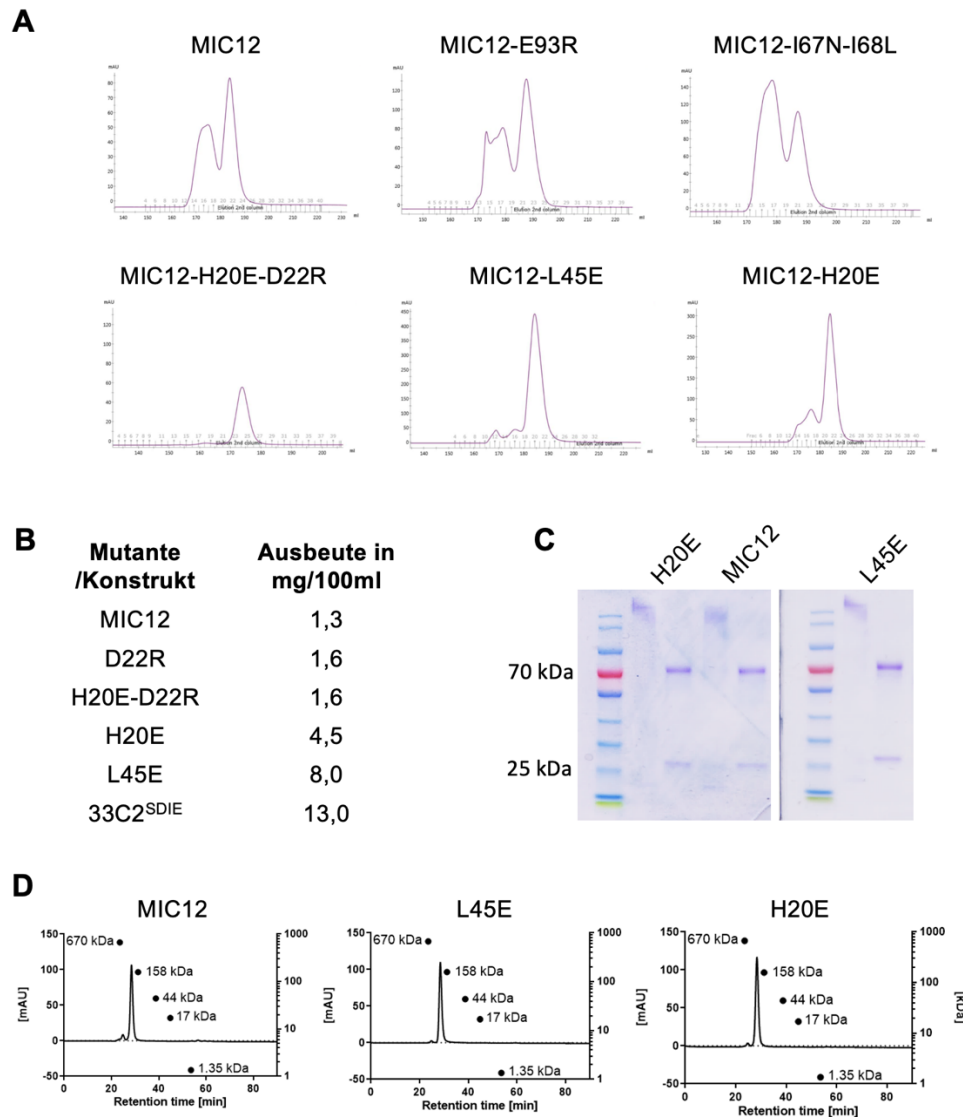


Abbildung 10 - Analyse der Produktion der Konstrukte
(A) Größenausschlusschromatografie (SEC) der angegebenen Konstrukte nach Aufreinigung über eine Protein-A-Säule. Die Chromatogramme zeigen die optische Dichte bei 280 nm in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen, das der jeweiligen Molekülgröße entspricht. Unterschiede in Peakprofilen deuten auf Variationen im Aggregationsverhalten oder in der Homogenität der Antikörperpräparationen hin. In **B** ist exemplarisch die Ausbeute einer Charge der entsprechenden Mutanten und Konstrukte aufgelistet. Als Qualitätskontrolle erfolgte eine SDS-PAGE zur Analyse der molekularen Masse der Einzelketten **(C)** und eine analytische Größenausschlusschromatografie zur Größenbestimmung und Ausschluss einer post-Produktions-Aggregation **(D)**.

Die Mutationsstellen wurden auf Basis der quartären IL-15/IL-15R $\alpha\beta\gamma$ -Struktur (PDB 4GS7 [118]) in PyMOL visualisiert. Dies veranschaulicht die räumliche Lage der eingeführten IL-15 Mutationen und erlaubt eine qualitativ-räumliche Einschätzung möglicher Liganden-Rezeptor-Interaktionen. Abbildung 11A zeigt eine auf IL-15/IL-15R α reduzierte Ansicht zur fokussierten Betrachtung der

Kontaktfläche und Abbildung 11B den vollständigen quartären Komplex zur Einordnung der Mutationen im Gesamtkontext. Die Mutation E46K, welche im parentalen MIC12 die Bindung an den für die trans-Präsentation zuständigen IL-15R α aufhebt, ist diesem direkt zugewandt. Bis auf die Doppelmutante I67N-I68L liegen alle zusätzlichen Mutationen auf derselben Seite des IL-15 Moleküls. I67N-I68L befindet sich topografisch an der dem IL-15R β -zugewandten Seite, welcher für die IL15-Effektorfunktion wichtig ist.

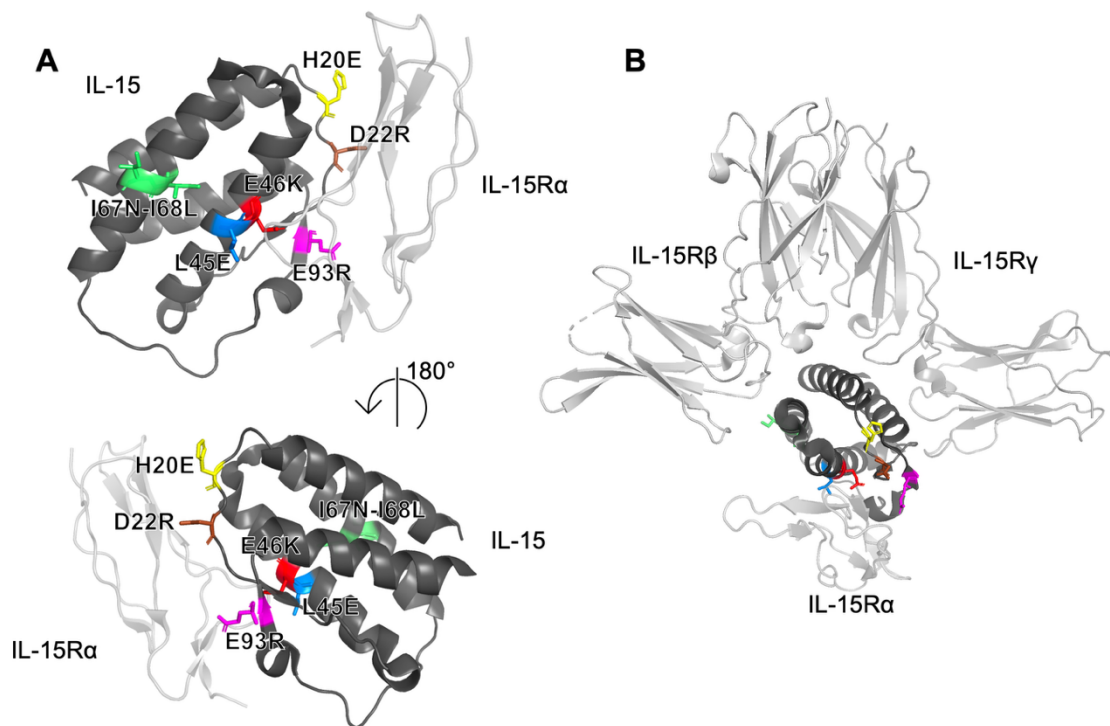


Abbildung 11 – Topografische Einordnung der IL-15-Mutationen im IL-15/IL-15-R α β γ . (A/B) Rendering des IL-15 Moleküls (schwarz), der IL-15R α β γ (grau) und der Mutationen H20E (gelb), D22R (braun), L45E (dunkelblau), E46K (rot), I67N-I68L (hellgrün) und E93R (magenta) in PyMOL auf Basis von PDB 4GS7. (A) Der IL-15/IL-15R α -Komplex mit den eingeführten Mutationen aus zwei um 180° verschobenen Perspektiven. (B) Darstellungen des IL-15/IL-15R α β γ mit den eingeführten Mutationen.

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung der eingeführten Mutanten

Der Zweck der eingeführten Mutationen bestand in der Verbesserung der Ausbeute. Jedoch musste nachgewiesen werden, dass die IL-15-Funktion durch die jeweiligen Mutationen nicht kompromittiert wurde. Hierfür wurde die Aktivierung von NK-Zellen durch die verschiedenen Konstrukte über die CD69-Oberflächenexpression analysiert. Die Mutanten L45E, H20E und E93R

induzierten hierbei eine vergleichbar hohe Aktivierung wie das parentale MIC Molekül (Abbildung 12). Durch die Doppelmutante I67N-I68L zeigte sich die Aktivierung geringfügig verringert, die mit der Mutante H20E-D22R entsprach lediglich der des 33C2^{SDIE} Antikörpers.

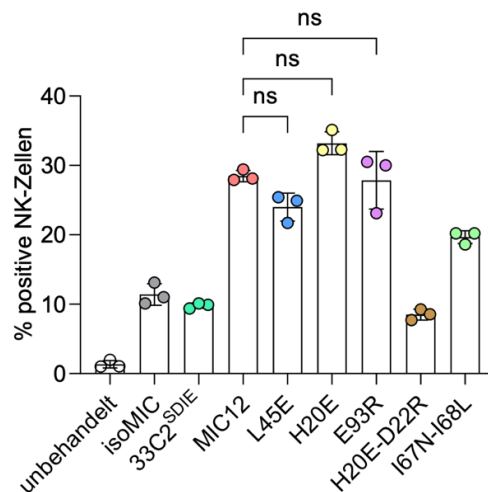


Abbildung 12 - NK-Zellaktivierung nach Stimulation mit verschiedenen MIC12-Mutanten. Die CD69 Expression auf NK-Zellen nach Inkubation (7 Tage) mit Zielzellen und verschiedenen MIC12-Mutanten (1 µg/ml) wurde durchflusszytometrisch ermittelt (Signifikanztestung mittels Brown-Forsythe and Welch ANOVA). Die Y-Achse zeigt die CD69⁺ Zellen in Prozent, gegatet anhand von Kontrollen ohne Koinkubation und Behandlung.

Auch die Fähigkeit, Proliferation von NK-Zellen zu induzieren, wurde für die verschiedenen Mutanten getestet (Abbildung 13). H20E und E93R induzierten hierbei die Proliferation vergleichbar wie MIC12. L45E konnte MIC12 sogar übertreffen. H20E-D22R und I67N-I68L lösten dahingegen keine Proliferation aus (Abbildung 13), was sich mit den Ergebnissen aus dem CD69-Assay deckt und ein Hinweis auf ein funktionell eingeschränktes IL-15 ist.

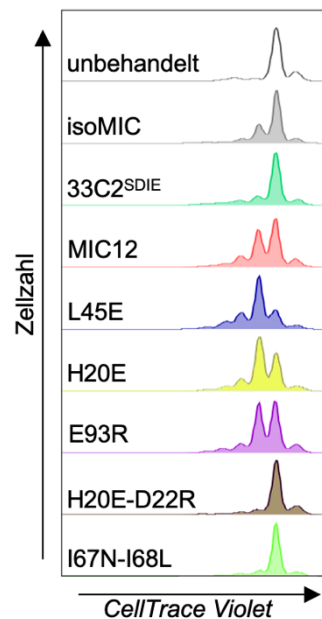


Abbildung 13 - Proliferation von NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen MIC12-Mutanten. Mit *CellTrace Violet* gefärbte PBMC wurden mit primären AML-Zellen und 1 µg/ml verschiedener MIC12-Mutanten koinkubiert (7 Tage). Das Histogramm zeigt die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenzintensität von *CellTrace Violet* auf CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen. Nach links verschobene Peaks weisen auf eine Verdünnung des Farbstoffs hin und sind somit ein Indikator für Zellproliferation.

3.2.3 Bindung der Mutanten an den IL15-Rezeptor

Die Mutanten L45E und H20E konnten, im Gegensatz zu E93R, H20E-D22R und I67N-I68L, eine Verminderung der Aggregation bei erhaltener oder sogar gesteigerter IL-15-Funktion aufzeigen. Deshalb wurden im Weiteren nur diese beiden Mutanten charakterisiert. Um zu gewährleisten, dass die Mutationen die Zielzellrestriktion der Moleküle nicht gefährden, wurden die Mutanten in Bezug auf die IL-15R α -Affinität getestet. L45E und H20E zeigten hierbei sogar eine geringere Bindung an den IL-15R α als das parentale Konstrukt (Abbildung 14).

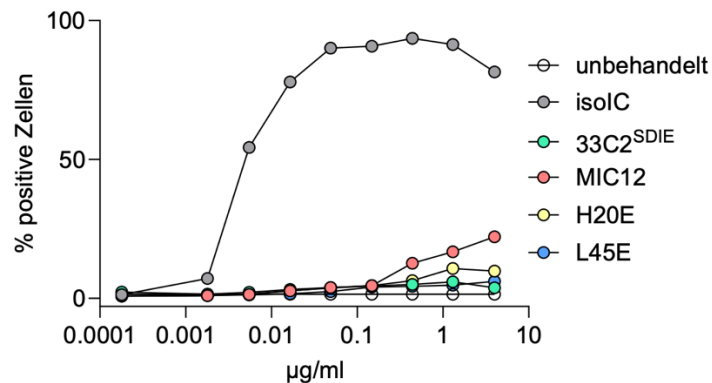


Abbildung 14 - Bindung der Mutanten an IL-15R α . Die IL-15R α exprimierende Zelllinie TF-1 wurde mit steigenden Konzentrationen von IC, MIC und dem parentalen Antikörper inkubiert. Die Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines PE-konjugierten anti-human-IgG-Antikörpers gemessen. Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz positiver Zellen, bestimmt durch Gating anhand von Kontrollen ohne primären Antikörper.

3.2.4 Zytotoxizität der Mutanten H20E und L45E

Nachdem die Mutanten H20E und L45E eine sogar gesteigerte IL-15-Funktion aufweisen konnten, wurde getestet, ob sich die Ergebnisse auf die Zytotoxizität übertragen ließen. In Langzeitzytotoxizitätsassays wies H20E eine geringfügig bessere Langzeitsuppression von U937-Zelllinien in Kokulturen auf wie der parentale MIC12 (Abbildung 15A). L45E wies die beste Langzeitsuppression auf. Es wurden darüber hinaus mehrere Chargen von MIC12 und der L45E-Mutante verglichen, um die Reproduzierbarkeit zu bestätigen und auszuschließen, dass chargenspezifische Variationen oder Produktionsfehler die Ergebnisse verfälschen (Abbildung 15B). Die Graphen/Ergebnisse der einzelnen Chargen waren deckungsgleich. Zudem zeigte sich auch hier die überlegene Langzeitsuppression der L45E Mutante gegenüber dem parentalen MIC12.

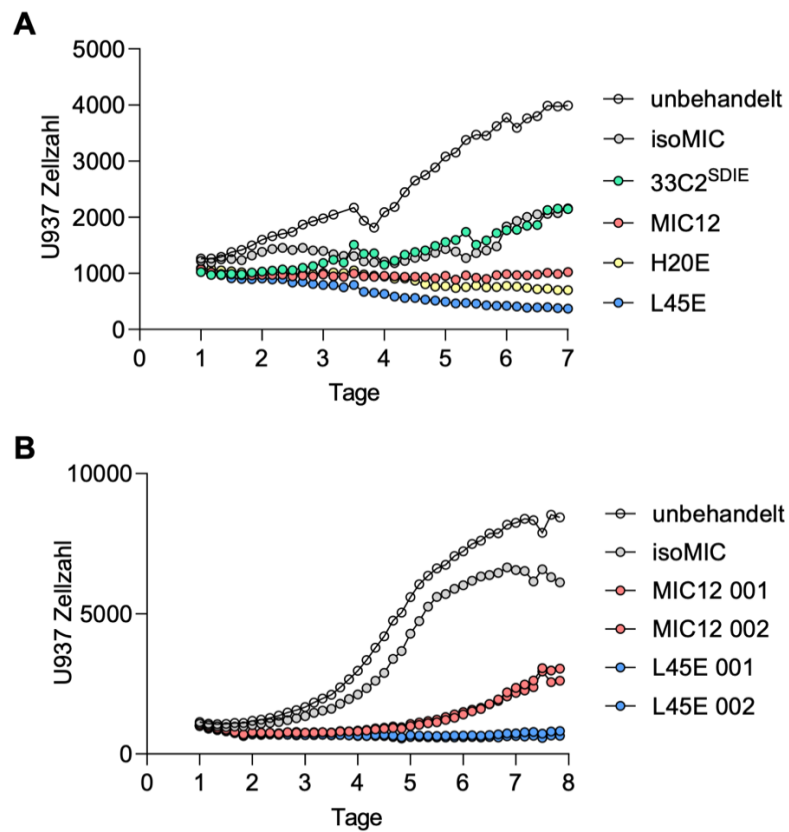


Abbildung 15 - Vergleich verschiedener MIC12 Mutanten hinsichtlich Langzeitwirkung gegenüber der Zelllinie U937. (A/B) PBMC wurden mit GFP-exprimierenden U937 Zellen koinkubiert und die Anzahl der lebenden Zielzellen alle 4 Stunden mittels *Live-Cell Imaging* im Incucyte bestimmt. Dies erfolgte unter Behandlung mit unterschiedlichen Mutanten (0,1 µg/ml) **(A)** und zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit mit verschiedenen Chargen von MIC12 und MIC12-L45E **(B)**.

4 Diskussion

Trotz intensiver Forschung und therapeutischen Fortschritten, insbesondere bei jüngeren Patienten [119], ist die Prognose der AML für den Großteil der Betroffenen weiterhin ungünstig. Während sich die 5-JÜR bei Patienten unter 60 Jahren seit den 1970er-Jahren von 13 % auf 55 % verbessern ließ, liegt sie bei Patienten über 60 Jahren bei nur 17% [17]. Gerade diese Gruppe ist es jedoch, die einen hohen Anteil der Erkrankten ausmacht [2, 6, 7]. Diese schlechte Prognose ist vor allem einem Mangel an verträglichen und wirkungsvollen Therapeutika geschuldet. Die reduzierten hämatopoetischen und organspezifischen Reserven alter Patienten verhindern eine intensive Chemotherapie, da die Organtoxizität den Nutzen der Therapie überwiegt [120]. Die Entwicklung einer allgemein verträglichen und dennoch effektiven Therapie ist folglich gerade für diese Patientengruppe prognosebestimmend.

Bei einer systemischen Chemotherapie sind zwangsläufig fast alle sich teilenden Zellen betroffen. Im Gegensatz hierzu ist die Toxizität von antikörperbasierten Immuntherapien von dem Vorliegen eines Antigens auf den Oberflächen der Zielzellen abhängig. Hierdurch haben sie sich klinisch als verträgliche und dennoch effektive Therapie für eine Vielzahl an Malignomen erwiesen. Für die Therapie der AML konnte jedoch bislang kein therapeutischer Antikörper die für eine Zulassung nötige Effektivität erreichen.

Ein Ansatz, die Effektivität einer Antikörpertherapie zu verbessern, ist die Gabe von immunstimulierenden Zytokinen. Hierbei ist IL-15 ein vielversprechender Kandidat [121-123]. Es induziert die Aktivierung und Proliferation von T- und NK-Zellen. Ein großer Vorteil gegenüber dem engen Verwandten IL-2 ist, dass IL-15 keine inhibitorischen Treg-Zellen stimuliert und keinen AICD der Effektorzellen auslöst [73, 76]. Im Gegensatz zu vielversprechenden Tierversuchen verhindern jedoch dosislimitierende Nebenwirkungen eine effektive systemische Applikation für Krebspatienten [81]. Gegenstand aktueller Forschung ist der Versuch, die IL-15 Aktivität durch die Konjugation an einen Antikörper (Immunzytokin), um die Wirkung auf die Tumorzellen zu konzentrieren. Bisher konnten dosisbeschränkende Nebenwirkungen aufgrund der antigenunabhängigen

Aktivität des Zytokinanteils in den Konstrukten nicht verhindert werden [58, 66-70].

Um diesem Problem zu begegnen, wurde in der Arbeitsgruppe Salih die MIC Plattform entwickelt [96]. Diese *Modifizierten Immunozytokine* machen sich den besonderen Wirkungsmechanismus der trans-Präsentation von IL-15 zunutze, um die Zytokinaktivität von der Antigenbindung des MIC abhängig zu machen.

Die Einführung der IL-15-Mutation E46K hebt die Bindung an den IL-15R α auf. Dies soll eine antigenunabhängige trans-Präsentation des IL-15-Bestandteils verhindern und so eine unspezifische Aktivierung von Effektorzellen und systemische Nebenwirkungen vermeiden. Erst wenn das Antigen gebunden wird, soll eine trans-Präsentation imitiert werden und nur dann die Wirkung des IL-15 erfolgen (Abbildung 1B). Zekri *et al.* konnten für anti-CD19- und anti-CD20 MICs nachweisen, dass die Aktivierung von NK-Zellen zielzellabhängig stattfindet. Die zielzellunabhängige Toxizität war *in vitro* und in Mausmodellen im Vergleich zu rekombinantem IL-15 und IL-15-Zytokinen ohne die E46K-Mutation deutlich reduziert.

Eine weitere Modifikation in der MIC-Plattform ist die Fc-Optimierung durch die S239D/I332E-Mutation (SDIE). Die SDIE-Mutation erhöht die Affinität an den Fc γ RIIIa. Dies verstärkt gemeinsam mit dem IL-15 die Fähigkeit der MICs, NK-Zellen zu aktivieren, ihre Proliferation zu induzieren und ADCC auszulösen. Die vorliegenden Daten belegen diese überlegene Wirkung für MIC19 und MIC20 im direkten Vergleich mit parentalen SDIE-modifizierten Antikörpern. Für die Behandlung lymphatischer Malignome haben sich diese beiden MICs als vielversprechende Kandidaten erwiesen.

Die Therapie von myeloischen Malignomen mittels Antikörper hat sich bisher als schwieriger erwiesen als die der lymphatischen. Deshalb war es von großem Interesse, ob sich die MIC-Plattform auch gegen Erkrankungen wie die AML nutzbar machen lässt. Hierzu musste ein MIC-Konstrukt mit Spezifität gegen ein AML-assoziiertes Antigen entwickelt werden.

Ein im Sinne der Verträglichkeit ideales therapeutisches Antigen liegt ausschließlich auf Tumorzellen vor, nicht aber auf gesundem Gewebe. Dies soll

on-target-off-tumor-Toxizität verhindern. Die Auswahl eines therapeutischen Antigens ist somit die Grundlage einer effektiven und verträglichen Antikörpertherapie. Das in dieser Arbeit charakterisierte MIC12 basiert auf einem CLEC12A-Antikörper. Die Vorteile dieses Antigens sind, dass es auf den Tumorzellen einer hohen Zahl aller AML-Erkrankungen zu finden ist und sowohl auf leukämischen Stammzellen, aber auch Blasten stabil exprimiert wird [103, 104]. Tatsächlich wiesen im hier untersuchten Patientenkollektiv (n=24) bis auf eine Patientenprobe alle AML-Zellen eine hohe Oberflächenexpression auf (Abbildung 2B). Ein weiterer Vorteil von CLEC12A ist die Abwesenheit auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen. Dies spricht gegen eine relevante Knochenmarkstoxizität. Jedoch ist anzumerken, dass Monozyten und Granulozyten, sowie einige ihrer intermediären Vorläuferzellen, CLEC12A exprimieren [100-102]. Dies birgt im Sinne einer *on-target-off-tumor*-Toxizität die Gefahr einer Agranulozytose (die bei vielen AML-Patienten sowieso bereits vorliegt) und - wichtiger noch - einer systemweiten Aktivierung von Effektorzellen abseits der Leukämiezellen bis hin zu einem möglichen Zytokinsturm. Wie groß diese Gefahr ist, kann jedoch letztendlich nur in klinischen Studien beurteilt werden.

Zunächst war es von vorrangiger Bedeutung, ob sich die vielversprechende Effektivität von MIC19 und MIC20 auf MIC12 übertragen lässt.

Die Aktivierung der Effektorzellen durch MIC12 wurde mittels Analyse der CD69-Oberflächenexpression bestimmt, nachdem diese mit Zielzellen und den jeweiligen Antikörperkonstrukten inkubiert wurden. MIC12 zeigte eine dem parentalen 33C2^{SDIE}-Antikörper und einem Immunzytokin ohne SDIE-Modifikation (MIC12^{Fc^{WT}}) signifikant überlegene Aktivierung von NK-Zellen (Abbildung 5A). T-Zellen konnten durch keines der Antikörperkonstrukte und nur durch rhIL-15 als Positivkontrolle aktiviert werden. Dies lässt sich darin begründen, dass die Wirkungsweise des MIC12 und der verwandten Konstrukte auf ADCC basieren. T-Zellen exprimieren keine FcγRIIIa, sodass ein entscheidendes Element der Aktivierung durch MIC12 fehlt. Ein weiterer wichtiger Aktivitätsmarker und Teil der antitumoralen

Effektorfunktion von NK-Zellen ist die Sekretion von INF γ . Auch hier induzierte MIC12 eine dem 33C2^{SDIE} und MIC12^{FcWT} signifikant überlegene Sekretion zu jedem der gemessenen Zeitpunkte (Abbildung 6A). Zudem zeigte sich eine überlegene INF γ -Sekretion gerade im *in vitro*-effektiven Bereich von 0,3 – 1 μ g/ml (Abbildung 6B; vgl. Zytotoxizitätsdaten).

Des Weiteren wurden die Fähigkeit von MIC12, Proliferation der Effektorzellen zu induzieren, charakterisiert. Abbildung 7A zeigt die Proliferation von NK-Zellen, die durch eine Behandlung mit MIC12 in einer Kokultur mit Zielzellen induziert wurde. MIC12 löste hierbei eine ausgeprägte Proliferation der NK-Zellen aus. 33C2^{SDIE} und MIC12^{FcWT} konnten hingegen keine Proliferation induzieren. Dies weist darauf hin, dass für eine pro-proliferative Wirkung sowohl die Fc-Optimierung, als auch die IL-15-Aktivität notwendige Bestandteile des MIC12 sind.

Verglichen mit einer Behandlung mit rhIL-15 zeigte MIC12 eine reduzierte Proliferationsinduktion. Dies kann jedoch als Vorteil ausgelegt werden, da das Ziel der MIC-Plattform nicht die Entwicklung eines besonders aktiven Superagonisten ist, sondern die eines potenten, aber verträglichen Therapeutikums ohne unspezifische Überaktivierung.

Passend zu der Aktivierung blieb die Proliferation zytotoxischer T-Zellen bei den Behandlungen mit allen Konstrukten, selbst unter erhöhten Konzentrationen, aus. Nur die Positivkontrolle mit rhIL-15 zeigte eine Wirkung. MIC12 scheint ohne die Aktivierung des Fc γ RIIIa – welcher auf T-Zellen eben nicht exprimiert wird – keine Proliferation zu induzieren. Bedeutender ist, dass die wesentlichen ADCC-Effektorzellen, die NK-Zellen, aktiviert werden und deren Proliferation erreicht wird, um das E:T-Verhältnis in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellen zugunsten der NK-Zellen zu verschieben. Mutmaßlich kann dieser Effekt speziell für AML-Patienten und gerade Ältere eine große Rolle spielen, da die ohnehin schon kleine Population an NK-Zellen durch Verdrängung des gesunden Knochenmarks und eine immunsuppressive Tumorumgebung weiterhin reduziert wird [124, 125].

Im nächsten Schritt musste überprüft werden, ob sich die vielversprechenden Aktivierungsdaten in eine verbesserte Zytotoxizität übertragen.

Hier zeigte sich sowohl im Kurzzeit- (3d, Abbildung 8A), als auch im Langzeitassay (8d, Abbildung 8B-D) eine überlegende Zytotoxizität des MIC12 gegen AML Zelllinien im Vergleich zu 33C2^{SDIE} und MIC12^{Fc^{WT}}. Gerade im Langzeitassay ist dies neben einer gesteigerten ADCC durch Proliferation der NK-Zellen zu begründen, welche nur durch MIC12 ausgelöst wird. Das erhöhte E:T Verhältnis führt zu einer überlegenen Langzeitsuppression von Tumorzellen. Tumorzelllinien eignen sich aufgrund ihrer Verfügbarkeit gut für initiale Charakterisierungen von Antikörpern, unterscheiden sich in ihrer Physiologie jedoch von primären Tumorzellen. Die *in vitro*-Effektivität von MIC12 konnte jedoch auch mit primären Leukämiezellen von nicht vorbehandelten AML-Patienten bestätigt werden. MIC12 zeigte hierbei eine signifikant verbesserte Zytotoxizität im Langzeitassay im Vergleich zu 33C2^{SDIE}.

Insgesamt zeigte MIC12 im Vergleich zum Fc-optimierten parentalen Antikörper somit eine überlegene Wirkung in Bezug auf die Aktivierung und Proliferation von Effektorzellen sowie hinsichtlich der zytotoxischen Effekte gegenüber AML-Zellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor veröffentlichten Daten zur MIC-Plattform von Zekri *et al.* [96] und unterstreichen das Potenzial von MIC12 als vielversprechender Ansatz für die Immuntherapie der AML. Es ist jedoch anzumerken, dass die vorliegenden Ergebnisse auf *in vitro*-Experimenten basieren. Zur Validierung der beobachteten Effekte sind weiterführende *in vivo*-Studien sowie klinische Prüfungen erforderlich.

Das zentrale Konzept der MIC-Plattform besteht nicht darin, ein möglichst stark wirksames Konstrukt zu erzeugen, da eine übermäßige Aktivität mit einem ungünstigen Nebenwirkungsprofil einhergeht. Vielmehr zielt der Ansatz darauf ab, die immunstimulierende Wirkung auf das direkte Tumorumfeld zu begrenzen. Zekri *et al.* zeigten, dass durch Einführung der IL-15-Mutation E46K die Aktivität von IL-15 an die Antigenbindung des MIC gekoppelt werden kann [96]. Diese Punktmutation verhindert die trans-Präsentation des IL-15-Anteils, indem sie die Bindung an den IL-15R α aufhebt. Stattdessen soll eine antigenabhängige

Aktivierung erfolgen, indem bei Antigenbindung eine trans-Präsentation imitiert wird.

Auch für MIC12 ließ sich dieser Mechanismus reproduzieren. Im Vergleich zu einem nativen IL-15-Immunozytokin war die Bindung an IL-15R α deutlich reduziert (Abbildung 3). Ob dies tatsächlich zu einer antigenbasierten Zielzellrestriktion führt, konnte durch den Vergleich mit einer Isotypenkontrolle (isoMIC) untersucht werden – einem MIC mit irrelevanter Spezifität. Funktionelle Analysen zeigten, dass MIC12 in Kokulturen mit Zielzellen eine zielzell-restringierte Aktivierung von NK-Zellen bewirkte. Dies äußerte sich in einer erhöhten CD69-Oberflächenexpression (Abbildung 5A) sowie einer gesteigerten IFN γ -Sekretion (Abbildung 6A). Letztere ist von besonderer Relevanz, da IFN γ in klinischen Studien mit systemisch verabreichtem IL-15 als ein zentraler Mediator dosislimitierender Nebenwirkungen identifiziert wurde [80]. Eine antigenunabhängige Induktion dieser Zytokinfreisetzung wäre daher im Hinblick auf die Verträglichkeit potenziell nachteilig.

Die in den Aktivierungsassays beobachtete Stimulation der NK-Zellen spiegelte sich auch in den Proliferationsanalysen wider. MIC12 induzierte bei Antigenbindung eine deutlich ausgeprägtere NK-Zellproliferation als die ungebundene Isotypenkontrolle (Abbildung 7A), was die zielzellspezifische Aktivierung weiter unterstreicht.

Zuletzt zeigten auch die Versuche zur Zytotoxizität, dass die Effektivität des MIC12 an die Bindung von Antigen gebunden ist (Abbildung 8 und 9).

Auch wenn die durch die Isotypenkontrolle vermittelte Aktivität deutlich unter der spezifischen Wirkung von MIC12 lag, wies die MIC-Plattform eine gewisse bindungsunabhängige Grundaktivität auf, die in ihrer Größenordnung etwa der von 33C2^{SDIE} entsprach. Aufgrund der signifikanten Differenz zur MIC12-vermittelten Aktivierung kann jedoch insgesamt von einer überwiegend zielzellrestringierten Wirkung des MIC12-Konstrukts ausgegangen werden.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse ist erneut als Limitation dieser Arbeit zu erwähnen, dass *in vitro*-Daten nicht zwangsläufig auf die *in vivo*-Aktivität übertragbar sind. Für eine abschließende präklinische Beurteilung der Zielzellrestriktivität und der daraus folgenden Sicherheit wären Toxizitätsassays

im Tiermodell und auch mit weiteren Zytokinen (z.B. IL-6), nötig. Letztendlich kann die therapeutische Verträglichkeit aber nur in klinischen Studien evaluiert werden [126].

Für eine erfolgreiche Translation in die klinische Anwendung muss MIC12 nicht nur durch Wirksamkeit überzeugen, sondern auch durch seine *Developability*. Hierunter fallen zum Beispiel Aggregationsverhalten, Stabilität und Produzierbarkeit. Gerade die Produzierbarkeit und Produktionsausbeute stellen angesichts des zunehmenden Kosten- und Ressourcendrucks im Gesundheitswesen entscheidende Faktoren dar, um eine therapeutische Anwendung im klinischen Alltag zu etablieren. Darüber hinaus kann eine Aggregationsneigung unerwünschte Folgen haben, wie eine erhöhte Immunogenität mit der Bildung von Anti-Drug-Antikörpern gegen das Antikörperkonstrukt [113], eine Toxizität infolge unspezifischen Rezeptor-Clustering [114] oder eine beeinträchtigte Pharmakokinetik.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, war die Produktionsausbeute von MIC12 initial durch eine ausgeprägte Aggregatbildung limitiert. Diese wurde vermutlich überwiegend durch den IL-15-Anteil des Konstrukts verursacht [111]. Die Einführung der Mutationen L45E oder H20E in den IL-15-Anteil konnte die Aggregation deutlich reduzieren (Abbildung 10A) und steigerte die Ausbeute erheblich (Abbildung 10B). Im direkten Vergleich zeigte die L45E-Variante eine höhere Ausbeute als H20E. Die molekulare Integrität der Mutanten konnte durch SDS-PAGE und Größenausschlusschromatographie (SEC) bestätigt werden. Beide Verfahren zeigten eine hohe Reinheit und das erwartete Molekulargewicht, was auf ein intaktes MIC12-Protein hinweist.

In funktionellen *in vitro* Analysen zeigten beide Mutanten eine vergleichbare NK-Zellaktivierung im Vergleich zum parentalen MIC12 und eine sogar überlegene Wirkung auf die Proliferation von Effektorzellen. Gleichzeitig konnte durch Bindungsanalysen ausgeschlossen werden, dass die eingeführten Mutationen zu einer erhöhten Affinität gegenüber IL-15R α führen (Abbildung 14). Dies hätte eine unerwünschte, antigenunabhängige trans-Präsentation des IL-15-Anteils zur Folge. Zwar wurde in der Literatur eine erhöhte IL-15R α -

Bindung infolge der L45E-Mutation beschrieben [97], unsere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass dies auf die Doppelmutante L45E/E46K nicht zutrifft – möglicherweise aufgrund der unmittelbaren Nachbarschaft beider Mutationen. In Zytotoxizitätsassays erwiesen sich beide Varianten als mindestens gleichwertig zum ursprünglichen MIC12 (Abbildung 15A), wobei die L45E-Mutante in ergänzenden Langzeitversuchen zur Suppression von Zelllinien überlegen war (Abbildung 15B). Dies deutet darauf hin, dass die L45E-Mutation nicht nur die Produktionsausbeute verbessert, sondern auch die funktionelle Effektivität *in vitro* steigern kann. Neben einer verstärkten IL-15-Aktivität spielt hier womöglich auch eine verbesserte Stabilität der Mutante eine Rolle. Das Einführen der L45E Mutation ist somit ein vielversprechender Ansatz, die Produktionsausbeute zu verbessern bei gleichzeitig erhaltener bzw. sogar verbesserter *in vitro*-Effektivität. An dieser Stelle sind weitere Versuche, gerade mit einem isoMIC^{L45E} nötig, um zu gewährleisten, dass die Zielzellrestriktivität dieser Mutante erhalten bleibt.

Unabhängig von der MIC-Plattform könnten auch eine Vielzahl weiterer therapeutischer Konzepte von der Einführung der Doppelmutation L45E/E46K profitieren. So wäre beispielsweise der Einsatz kostimulatorischer Antikörper denkbar – etwa in Form eines MIC-Fc^{k.o.}-Konstrukts – in Kombination mit bereits zugelassenen Antikörpern, insbesondere Fc-optimierten Varianten. Die kombinierte Wirkung aus Fc-vermittelter Aktivierung und zielzellrestriktiver Stimulation durch ein IL-15-Immunozytokin, welches sich in dieser Arbeit als vorteilhaft erwiesen hat, ließe sich somit gezielt nutzen, ohne neue MICs entwickeln zu müssen.

Darüber hinaus erscheint auch die Integration der modifizierten IL-15-Domäne in andere Antikörperformate, wie beispielsweise bispezifische Antikörper, vielversprechend. Auf diesem Wege ließe sich eine gezielte T-Zell-Aktivierung realisieren, bei gleichzeitiger Minimierung unerwünschter AICD oder T-Zell-*Exhaustion*.

Die MIC-Plattform ließe sich zudem auch in Kombination mit adoptivem NK-Zell-Transfer oder nach Stammzelltransplantation nutzen, da sich in diesem Setting

die NK-Zellfunktion beeinträchtigt zeigt. Gerade hier konnte gezeigt werden, dass IL-15 die Effektorfunktion von NK-Zellen wiederherstellen kann [127]. Es liegt nahe, dass MIC12 in diesem Setting anderen Antikörpern überlegen sein könnte.

Zusammenfassend sind MIC12 und die MIC-Plattform ein vielversprechender Ansatz, das Potential von IL-15 nutzbar zu machen und die Effektivität in Vergleich zu den parentalen Antikörpern zu steigern. Insbesondere die Kombination aus Fc-Optimierung und IL-15 scheint hierbei für Effektorzellen günstig zu sein. Gleichzeitig reduziert die E46K-Mutation die unspezifische und potenziell toxische Aktivität des Immunzytokins. Die Mutationen H20E, aber vor allem L45E verbessern bei erhaltener Aktivität die Produktion. Die dadurch verbesserte *Developability* ermöglicht eine Translation in die Klinik und hält das Konzept für weitere Forschung attraktiv. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit sind wir einer nebenwirkungsarmen, IL-15-gestützten Therapie einen Schritt nähergekommen.

5 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die häufigste Form akuter Leukämien im Erwachsenenalter, doch trotz therapeutischer Fortschritte bleibt die Prognose insbesondere für ältere Patienten ungünstig. Für diese Patientengruppe, für die eine intensive Chemotherapie oft nicht infrage kommt, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei lediglich ca. 17 %. Daraus ergibt sich ein dringender Bedarf an gut verträglichen, aber gleichzeitig potenten Wirkstoffen.

Als in vielen Malignomen erfolgreiche Immuntherapie haben sich in den letzten Jahrzehnten Antikörper hervor getan - unter anderem aufgrund ihrer Verträglichkeit trotz hoher Potenz. Für AML ist jedoch bisher noch keine wirksame Antikörpertherapie zugelassen. Ein Ansatz, die Effektivität von Antikörpern zu erhöhen, ist die Immunstimulation mit Interleukinen. Hierbei ist IL-15 ein vielversprechender Kandidat. Es induziert die Proliferation und Aktivierung von T- und NK-Zellen. Ein großer Vorteil gegenüber dem engen Verwandten IL-2 ist, dass IL-15 keine inhibitorischen Treg-Zellen stimuliert und keinen AICD der Effektorzellen auslöst. Im Gegensatz zu Tiermodellen verhindern in Krebspatienten jedoch dosislimitierende Nebenwirkungen eine effektive systemische Gabe. Eine Lösung für dieses Problem kann in der einzigartigen Physiologie des IL-15 gefunden werden. Es entfaltet seine Wirkungen auf IL-15R $\beta\gamma$ -exprimierende Effektorzellen zum größten Teil über die trans-Präsentation auf dem IL-15R α , welcher auf Monozyten und anderen Zelltypen exprimiert wird. Das Einbringen der Mutation E46K in das IL-15 Molekül hebt die Bindung an den IL-15R α auf, wodurch eine trans-Präsentation durch Zellen nicht mehr möglich ist. Koppelt man die IL-15 Mutante nun mit einem Antikörper zu einem sogenannten Immunzytokin, kann die trans-Präsentation durch Bindung des Antikörperteils an das Antigen imitiert werden und IL-15 entfaltet seine Wirkung. Somit soll die IL-15 Aktivität auf die Zielzellen restringiert werden. Um die ADCC-Aktivität des Antikörpers weiterhin zu fördern, wurde zudem eine Fc-Optimierung mittels SDIE-Mutationen eingeführt. Das Ergebnis ist ein *Modified Immunocytokine*, kurz MIC. Die Effektivität und Zielzellrestriktion von MICs nach Bindung an die lymphomassoziierten Antigene CD19 und CD20 konnte in der Arbeitsgruppe Salih bereits dokumentiert werden. Ziel der

vorliegenden Arbeit war, die MIC-Plattform für die Therapie der AML anwendbar zu machen.

Hierfür wurde ein CLEC12A-spezifisches MIC (MIC12) geschaffen. CLEC12A, dessen exakte Funktion bisher unklar ist, ist nicht zuletzt aufgrund seiner hohen Prävalenz und relativ tumorrestriktierten Expression in AML-Erkrankungen eine vielversprechende Zielstruktur für die Immuntherapie. Dies konnte in unserer Patientenkohorte bestätigt werden.

In der funktionellen Charakterisierung zeigte sich MIC12 im Vergleich zu seinem parentalen Fc-optimierten Antikörper und einem Kontrollmolekül ohne Fc-Optimierung überlegen bezüglich NK-Zellaktivierung, Proliferationsinduktion und Zytotoxizität gegen Zelllinien und primäre AML-Zellen.

Durch isoMIC als Isotypenkontrolle konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des MIC12-Konstruktes von der Bindung an die Zielzellen abhängt, sodass das Konzept der Zielzellrestriktion bestätigt werden konnte.

Die Herstellung von IL-15-haltigen Fusionsmolekülen wie MIC12 ist geprägt von schlechter Ausbeute und Aggregation. Die Einführung von weiteren Mutationen konnte die Aggregation reduzieren und die Ausbeute steigern. H20E und vor allem L45E konnten dies bei zudem verbesserter Funktion (Aktivierung, Zytotoxizität) leisten. Dies verbessert die *Developability* und ermöglicht die Translation von IL-15-Fusionsproteinen - auch über MIC12 hinaus.

MIC12 und gerade MIC12^{L45E} sind somit vielversprechende Kandidaten für eine antikörperbasierte AML-Immuntherapie.

6 Literaturverzeichnis

1. Jameson, J.L., et al., *Harrisons Innere Medizin*. 20. Auflage ed. Vol. 1. 2020: Thieme.
2. Christoph Röllig, F.A.A., Jan Braess, Michael Heuser, Markus G. Manz, Jakob Passweg, Dirk Reinhardt, Richard F. Schlenk, Armin Zebisch *Leitlinien Akute Myeloische Leukämie (AML)*. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2023.
3. Khoury, J.D., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms*. *Leukemia*, 2022. **36**(7): p. 1703-1719.
4. Arber, D.A., et al., *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data*. *Blood*, 2022. **140**(11): p. 1200-1228.
5. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN*. *Blood*, 2022. **140**(12): p. 1345-1377.
6. Juliusson, G., et al., *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. *Blood*, 2012. **119**(17): p. 3890-3899.
7. Kim-Wanner, S.-Z. and K. Kraywinkel, *Faktenblatt: Epidemiologie der akuten Leukämien in Deutschland 2016 bis 2018*. *Die Onkologie*, 2022. **28**(6): p. 459-462.
8. Krebsregisterdaten, Z.f., *Leukämien*. 2022, Robert Koch-Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten.
9. Kazi, J.U. and L. Rönstrand, *FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications*. *Physiological Reviews*, 2019. **99**(3): p. 1433-1466.
10. Zhao, J.C., et al., *A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia*. *Blood Rev*, 2022. **52**: p. 100905.
11. Janke, H., et al., *Activating FLT3 mutants show distinct gain-of-function phenotypes in vitro and a characteristic signaling pathway profile associated with prognosis in acute myeloid leukemia*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e89560.
12. De Kouchkovsky, I. and M. Abdul-Hay, *'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'*. *Blood Cancer J*, 2016. **6**(7): p. e441.

13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. *Blood*, 2016. **128**(3): p. 462-463.
14. Papaemmanuil, E., et al., *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(23): p. 2209-2221.
15. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. *Blood*, 2017. **129**(4): p. 424-447.
16. Lancet, J.E., et al., *CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia*. *Journal of Clinical Oncology*, 2018. **36**(26): p. 2684-2692.
17. Kantarjian, H., et al., *Acute myeloid leukemia: current progress and future directions*. *Blood Cancer J*, 2021. **11**(2): p. 41.
18. Thol, F. and A. Ganser, *Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia*. *Curr Treat Options Oncol*, 2020. **21**(8): p. 66.
19. Kenneth Murphy, C.W., *Janeway Immunologie*. 9 ed. 2018: Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
20. Weiner, L.M., R. Surana, and S. Wang, *Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(5): p. 317-27.
21. Zahavi, D., et al., *Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a strategy for improving antibody-based immunotherapy*. *Antib Ther*, 2018. **1**(1): p. 7-12.
22. Ackerman, M. and F. Nimmerjahn, *Antibody Fc: linking adaptive and innate immunity*. 2013: Academic Press.
23. Prager, I. and C. Watzl, *Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2019. **105**(6): p. 1319-1329.
24. Yeap, W.H., et al., *CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 34310.
25. Chen, S., H. Zhu, and Y. Jounaidi, *Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024. **9**(1): p. 302.

26. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
27. Christoph Huber, H.-G.R., Thomas Wölfel, Cedric Britten,, *Krebsimmuntherapien: Standards und Innovationen*. 2006: Deutscher Ärzte-Verlag.
28. Smith, M.R., *Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7359-7368.
29. Alrhoun, S. and S. Sennikov, *The Role of Tumor-Associated Antigen HER2/neu in Tumor Development and the Different Approaches for Using It in Treatment: Many Choices and Future Directions*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(24).
30. Sonneveld, P., et al., *Daratumumab, Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma*. *N Engl J Med*, 2024. **390**(4): p. 301-313.
31. Weiner, G.J., *Rituximab: mechanism of action*. *Semin Hematol*, 2010. **47**(2): p. 115-23.
32. Cerny, T., et al., *Mechanism of action of rituximab*. *Anti-Cancer Drugs*, 2002. **13**: p. S3-S10.
33. Maloney, D.G., B. Smith, and A. Rose, *Rituximab: mechanism of action and resistance*. *Semin Oncol*, 2002. **29**(1 Suppl 2): p. 2-9.
34. Herter, S., et al., *Preclinical Activity of the Type II CD20 Antibody GA101 (Obinutuzumab) Compared with Rituximab and Ofatumumab In Vitro and in Xenograft Models*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2013. **12**(10): p. 2031-2042.
35. Shields, R.L., et al., *Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 26733-40.
36. Shinkawa, T., et al., *The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(5): p. 3466-73.
37. Lazar, G.A., et al., *Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(11): p. 4005-10.

38. Freeman, C.L. and L.H. Sehn, *A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab*. *Br J Haematol*, 2018. **182**(1): p. 29-45.
39. Shields, R.L., et al., *High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9): p. 6591-604.
40. Liu, R., et al., *Fc-Engineering for Modulated Effector Functions-Improving Antibodies for Cancer Treatment*. *Antibodies (Basel)*, 2020. **9**(4).
41. Lazar, G.A., et al., *Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(11): p. 4005-4010.
42. Hoy, S.M., *Tafasitamab: First Approval*. *Drugs*, 2020. **80**(16): p. 1731-1737.
43. Heitmann, J.S., et al., *Phase I study evaluating the Fc-optimized FLT3 antibody FLYSYN in AML patients with measurable residual disease*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2023. **16**(1): p. 96.
44. Khongorzul, P., et al., *Antibody–Drug Conjugates: A Comprehensive Review*. *Molecular Cancer Research*, 2020. **18**(1): p. 3-19.
45. Castaigne, S., et al., *Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study*. *Lancet*, 2012. **379**(9825): p. 1508-16.
46. Hills, R.K., et al., *Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(9): p. 986-96.
47. Sharkey, R.M. and D.M. Goldenberg, *Perspectives on Cancer Therapy with Radiolabeled Monoclonal Antibodies*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2005. **46**(1 suppl): p. 115S-127S.
48. Cheng, K.T., *(99m)Tc-Arcitumomab*, in *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. 2004, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
49. Tian, Z., et al., *Bispecific T cell engagers: an emerging therapy for management of hematologic malignancies*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2021. **14**(1): p. 75.

50. Offner, S., et al., *Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells*. Mol Immunol, 2006. **43**(6): p. 763-71.
51. Trabolsi, A., A. Arumov, and J.H. Schatz, *T Cell-Activating Bispecific Antibodies in Cancer Therapy*. J Immunol, 2019. **203**(3): p. 585-592.
52. Shirley, M., *Glofitamab: First Approval*. Drugs, 2023. **83**(10): p. 935-941.
53. Ebinama, U. and B. George, *Revolutionizing acute myeloid leukemia treatment: a systematic review of immune-based therapies*. Discover Oncology, 2025. **16**(1): p. 89.
54. Williams, B.A., et al., *Antibody Therapies for Acute Myeloid Leukemia: Unconjugated, Toxin-Conjugated, Radio-Conjugated and Multivalent Formats*. J Clin Med, 2019. **8**(8).
55. Conlon, K.C., M.D. Miljkovic, and T.A. Waldmann, *Cytokines in the Treatment of Cancer*. J Interferon Cytokine Res, 2019. **39**(1): p. 6-21.
56. Sun, Z., et al., *A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8(+) T-cell response and effective tumor control*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3874.
57. Raeber, M.E., D. Sahin, and O. Boyman, *Interleukin-2-based therapies in cancer*. Science Translational Medicine, 2022. **14**(670): p. eabo5409.
58. List, T. and D. Neri, *Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy*. Clin Pharmacol, 2013. **5**(Suppl 1): p. 29-45.
59. B.V., C.H., *Fachinformation Proleukin S*, C.H. B.V., Editor. 2020: Rote Liste.
60. Schwartzentruber, D.J., *Guidelines for the Safe Administration of High-Dose Interleukin-2*. Journal of Immunotherapy, 2001. **24**(4): p. 287-293.
61. Rosenberg, S.A., et al., *Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2*. Jama, 1994. **271**(12): p. 907-13.
62. Malek, T.R., et al., *CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 167-78.

63. Lykhopiy, V., et al., *IL-2 immunotherapy for targeting regulatory T cells in autoimmunity*. *Genes & Immunity*, 2023. **24**(5): p. 248-262.
64. Refaeli, Y., et al., *Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis*. *Immunity*, 1998. **8**(5): p. 615-23.
65. Runbeck, E., et al., *Utilizing Immunocytokines for Cancer Therapy*. *Antibodies (Basel)*, 2021. **10**(1).
66. King, D.M., et al., *Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(22): p. 4463-73.
67. Osenga, K.L., et al., *A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(6): p. 1750-9.
68. Shusterman, S., et al., *Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(33): p. 4969-75.
69. Rudman, S.M., et al., *A phase 1 study of AS1409, a novel antibody-cytokine fusion protein, in patients with malignant melanoma or renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(7): p. 1998-2005.
70. Albertini, M.R., et al., *Phase II trial of hu14.18-IL2 for patients with metastatic melanoma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(12): p. 2261-71.
71. Liu, Y., et al., *Recombinant single-chain antibody fusion construct targeting human melanoma cells and containing tumor necrosis factor*. *International Journal of Cancer*, 2004. **108**(4): p. 549-557.
72. Tzeng, A., et al., *Antigen specificity can be irrelevant to immunocytokine efficacy and biodistribution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(11): p. 3320-5.
73. Steel, J.C., T.A. Waldmann, and J.C. Morris, *Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer*. *Trends Pharmacol Sci*, 2012. **33**(1): p. 35-41.
74. Patidar, M., N. Yadav, and S.K. Dalai, *Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016. **31**: p. 49-59.

75. Gonzalez, H., C. Hagerling, and Z. Werb, *Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression*. *Genes Dev*, 2018. **32**(19-20): p. 1267-1284.
76. Marks-Konczalik, J., et al., *IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(21): p. 11445-11450.
77. Stonier, S.W. and K.S. Schluns, *Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses*. *Immunol Lett*, 2010. **127**(2): p. 85-92.
78. Musso, T., et al., *Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15*. *Blood*, 1999. **93**(10): p. 3531-9.
79. Kobayashi, H., et al., *Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 721-7.
80. Conlon, K.C., et al., *Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(1): p. 74-82.
81. Conlon, K.C., et al., *IL15 by Continuous Intravenous Infusion to Adult Patients with Solid Tumors in a Phase I Trial Induced Dramatic NK-Cell Subset Expansion*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(16): p. 4945-4954.
82. Margolin, K., et al., *Phase I Trial of ALT-803, A Novel Recombinant IL15 Complex, in Patients with Advanced Solid Tumors*. *Clin Cancer Res*, 2018. **24**(22): p. 5552-5561.
83. Romee, R., et al., *First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation*. *Blood*, 2018. **131**(23): p. 2515-2527.
84. Wrangle, J.M., et al., *ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial*. *Lancet Oncol*, 2018. **19**(5): p. 694-704.
85. Waldmann, T.A., et al., *IL-15 in the Combination Immunotherapy of Cancer*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 868.
86. Kermer, V., et al., *An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(6): p. 1279-88.

87. Corbellari, R., et al., *A Novel Antibody-IL15 Fusion Protein Selectively Localizes to Tumors, Synergizes with TNF-based Immunocytokine, and Inhibits Metastasis*. *Mol Cancer Ther*, 2021. **20**(5): p. 859-871.
88. Vincent, M., et al., *Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(3): p. 757-65.
89. Shi, W., et al., *A novel anti-PD-L1/IL-15 immunocytokine overcomes resistance to PD-L1 blockade and elicits potent antitumor immunity*. *Mol Ther*, 2023. **31**(1): p. 66-77.
90. Vallera, D.A., et al., *IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(14): p. 3440-50.
91. Miller, J.S., et al., *Trispecific Killer Engagers (TriKEs) that contain IL-15 to make NK cells antigen specific and to sustain their persistence and expansion*. *Blood*, 2015. **126**(23).
92. Arvindam, U.S., et al., *A trispecific killer engager molecule against CLEC12A effectively induces NK-cell mediated killing of AML cells*. *Leukemia*, 2021. **35**(6): p. 1586-1596.
93. Cheng, Y., et al., *Trispecific killer engager 161519 enhances natural killer cell function and provides anti-tumor activity against CD19-positive cancers*. *Cancer Biol Med*, 2020. **17**(4): p. 1026-1038.
94. Beha, N., et al., *IL15-Based Trifunctional Antibody-Fusion Proteins with Costimulatory TNF-Superfamily Ligands in the Single-Chain Format for Cancer Immunotherapy*. *Mol Cancer Ther*, 2019. **18**(7): p. 1278-1288.
95. Kermer, V., et al., *Combining antibody-directed presentation of IL-15 and 4-1BBL in a trifunctional fusion protein for cancer immunotherapy*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(1): p. 112-21.
96. Zekri, L., et al., *Immunocytokines with target cell-restricted IL-15 activity for treatment of B cell malignancies*. *Science Translational Medicine*, 2024. **16**(737): p. eadh1988.
97. Bernard, J., et al., *Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24313-22.
98. Marshall, A.S., et al., *Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 14792-802.

99. Neumann, K., et al., *Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death*. Immunity, 2014. **40**(3): p. 389-99.
100. Bakker, A.B., et al., *C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8443-50.
101. Morsink, L.M., R.B. Walter, and G.J. Ossenkoppele, *Prognostic and therapeutic role of CLEC12A in acute myeloid leukemia*. Blood Rev, 2019. **34**: p. 26-33.
102. Ma, H., et al., *Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy*. J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 41.
103. van Rhenen, A., et al., *The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2659-66.
104. Larsen, H., et al., *Expression of the hMICL in acute myeloid leukemia-a highly reliable disease marker at diagnosis and during follow-up*. Cytometry B Clin Cytom, 2012. **82**(1): p. 3-8.
105. Zhao, X., et al., *Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2010. **95**(1): p. 71-8.
106. Zheng, B., et al., *An Anti-CLL-1 Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(4): p. 1358-1368.
107. Lu, H., et al., *Targeting human C-type lectin-like molecule-1 (CLL1) with a bispecific antibody for immunotherapy of acute myeloid leukemia*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(37): p. 9841-5.
108. van Loo, P.F., et al., *MCLA-117, a CLEC12AxCD3 bispecific antibody targeting a leukaemic stem cell antigen, induces T cell-mediated AML blast lysis*. Expert Opin Biol Ther, 2019. **19**(7): p. 721-733.
109. Kenderian, S.S., et al., *Leukemia stem cells are characterized by CLEC12A expression and chemotherapy refractoriness that can be overcome by targeting with chimeric antigen receptor T cells*. 2016, American Society of Hematology Washington, DC.
110. Zhang, W., et al., *Developability assessment at early-stage discovery to enable development of antibody-derived therapeutics*. Antib Ther, 2023. **6**(1): p. 13-29.
111. Béhar, G., et al., *Evolution of interleukin-15 for higher E. coli expression and solubility*. Protein Eng Des Sel, 2011. **24**(3): p. 283-90.

112. Vyas, V.V., et al., *Clinical manufacturing of recombinant human interleukin 15. I. Production cell line development and protein expression in E. coli with stop codon optimization*. Biotechnol Prog, 2012. **28**(2): p. 497-507.
113. Lundahl, M.L.E., et al., *Aggregation of protein therapeutics enhances their immunogenicity: causes and mitigation strategies*. RSC Chem Biol, 2021. **2**(4): p. 1004-1020.
114. Tada, M., M. Aoyama, and A. Ishii-Watabe, *Fcy Receptor Activation by Human Monoclonal Antibody Aggregates*. J Pharm Sci, 2020. **109**(1): p. 576-583.
115. Koyama-Nasu, R., et al., *The cellular and molecular basis of CD69 function in anti-tumor immunity*. Int Immunol, 2022. **34**(11): p. 555-561.
116. Klimovich, B., et al., *CLEC12A-directed immunocytokine with target cell-restricted IL-15 activity for treatment of acute myeloid leukemia*. Front Immunol, 2025. **16**: p. 1561823.
117. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
118. Ring, A.M., et al., *Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15*. Nature Immunology, 2012. **13**(12): p. 1187-1195.
119. Shah, A., et al., *Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study*. British Journal of Haematology, 2013. **162**(4): p. 509-516.
120. Erba, H.P., *Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 420-8.
121. Moga, E., et al., *Interleukin-15 enhances rituximab-dependent cytotoxicity against chronic lymphocytic leukemia cells and overcomes transforming growth factor beta-mediated immunosuppression*. Exp Hematol, 2011. **39**(11): p. 1064-71.
122. Zhang, M., et al., *IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(46): p. E10915-e10924.
123. Roberti, M.P., et al., *IL-2- or IL-15-activated NK cells enhance Cetuximab-mediated activity against triple-negative breast cancer in xenografts and in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **136**(3): p. 659-71.
124. Carlsten, M. and M. Järås, *Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and*

- Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 2357.
125. Stringaris, K., et al., *Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia.* Haematologica, 2014. **99**(5): p. 836-47.
126. Eastwood, D., et al., *Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells.* Br J Pharmacol, 2010. **161**(3): p. 512-26.
127. Foley, B., et al., *NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions.* Blood, 2011. **118**(10): p. 2784-92.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der KKE Translationale Immunologie des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) am Partnerstandort Medizinische Klinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Helmut R. Salih durchgeführt.

Sämtliche Versuche außer der nachfolgend aufgeführten wurden von mir nach Einarbeitung durch Dr. B. Klimovich eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgt nach Einarbeitung durch Dr. B. Klimovich eigenständig von mir. Die Aufreinigung der Antikörperkonstrukte mittels Ätka Pure 25 System und SEC erfolgte unter Anleitung und Aufsicht von Dr. M. Pflügler.

Die Daten der nachfolgend aufgelisteten Abbildungen und Tabellen wurden nicht ausschließlich von mir selbst erhoben:

Für Abbildung 2B erfolgte die Färbung und die durchflusszytometrische Messung durch Dr. A. Chashchina, während die Auswertung der Rohdaten von mir vorgenommen wurde.

Die Versuche von Abbildung 5A und 8A wurden von Dr. B. Klimovich und C. Derrix durchgeführt und ausgewertet.

Der Versuch für Abbildung 7A wurde in Zusammenarbeit mit Dr. B. Klimovich angesetzt. Die Färbung, Messung und Auswertung erfolgten durch mich.

Einige der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sind in eine bereits veröffentlichte Publikation eingeflossen. Der Beitrag von weiteren Co-Autoren an der Publikation ist im Folgenden im Sinne der *CRedit contribution taxonomy guidelines* dargestellt:

Boris Klimovich*, **Leonard Anton***, Jinwon Jung, Yangmi Lim, Bora Lee, Jonghwa Won, Latifa Zekri, Anna Chashchina, Martin Pflügler, Jonas S. Heitmann, Gundram Jung & Helmut R. Salih, *CLEC12A-directed immunocytokine with target cell-restricted IL-15 activity for treatment of acute myeloid leukemia*. Front Immunol, 2025. **16**: p. 1561823.

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

BK: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing– original draft, Writing– review & editing.

LA: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing– original draft, Writing– review & editing.

JJ: Resources, Writing– review & editing.

YL: Resources, Writing– review & editing.

BL: Resources, Writing– review & editing.

JW: Resources, Writing– review & editing.

LZ: Conceptualization, Resources, Writing– review & editing.

AC: Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing– review & editing.

MP: Investigation, Resources, Writing– review & editing.

JH: Data curation, Formal analysis, Writing– review & editing.

GJ: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing– review & editing.

HS: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing– review & editing.

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

Tübingen, den 23.05.2025

8 Veröffentlichungen

Boris Klimovich*, **Leonard Anton***, Jinwon Jung, Yangmi Lim, Bora Lee, Jonghwa Won, Latifa Zekri, Anna Chashchina, Martin Pflügler, Jonas S. Heitmann, Gundram Jung & Helmut R. Salih, *CLEC12A-directed immunocytokine with target cell-restricted IL-15 activity for treatment of acute myeloid leukemia*. Front Immunol, 2025. **16**: p. 1561823.

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Helmut Salih für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen. Die außergewöhnliche fachliche und organisatorische Betreuung, sowie die aktive Vermittlung von Eindrücken aus der klinischen Forschung haben mir über diese Arbeit hinaus gezeigt, wie spannend und vielseitig Forschung ist und hat meine Arbeitsweise zudem langfristig geprägt.

Ein weiterer Dank gilt meinem Mentor Boris für die sorgfältige Einarbeitung sowie die kontinuierliche Unterstützung in allen Phasen meiner Arbeit. Seine ansteckende Leidenschaft für die Wissenschaft, der stets konstruktiver Umgang mit Fehlern und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft haben meinen Horizont fachlich und persönlich erweitert.

Ebenso danke ich den Mitgliedern der AG Salih sowie der KKE Translationale Immunologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit. Die offene Kommunikation und Hilfsbereitschaft innerhalb der Arbeitsgruppe haben diese intensive Zeit im Labor bereichert.

Abschließend möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und besonders meiner Ehefrau Lena danken. Ihre langjährige Unterstützung, Geduld und Rückendeckung haben mir die nötige Stabilität gegeben, dieses Projekt verfolgen zu können.

Allen, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein aufrichtiger Dank.

