

Aus dem  
Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen  
Abteilung Immunologie

**Optimierung bispezifischer Antikörper zur Kostimulation von  
T-Zellen für die Tumorimmuntherapie**

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

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

**vorgelegt von  
Bolland, David Silvio**

**2024**

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Gundram Jung

2. Berichterstatter: Professor Dr. Josef Leibold

Tag der Disputation: 21.06.2024

*Für Marla und Lowis.*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.1.1	Akute Myeloische Leukämie	1
1.1.2	Tumorassoziierte Antigene	2
1.1.3	Klassische Krebstherapien	5
1.2	Antikörper	5
1.2.1	Geschichte	5
1.2.2	Struktur	7
1.2.3	Funktion	10
1.3	Immunüberwachung	12
1.4	Immuntherapie von Krebs	13
1.4.1	Vakzinierung	13
1.4.2	Therapeutische Antikörper	13
1.4.3	T-Zell-basierte Immuntherapie	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Glas- und Plastikwaren	24
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.4	Puffer und Medien	27
2.1.5	Enzyme	31
2.1.6	Größenmarker für Gelelektrophorese	31
2.1.7	Gebrauchsfertige Lösungen und Kits	31
2.1.8	Plasmide	32
2.1.9	Oligonukleotide	32
2.1.10	Bakterienstämme	32
2.1.11	Software	32
2.1.12	Antikörper	33
2.1.13	Zelllinien	35
2.1.14	Primäre humane Zelllinien	35
2.2	Zellbiologische Methoden	36
2.2.1	Passagieren und Ernten von Zellen	36

2.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl _____	36
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen _____	36
2.2.4	Isolation von PBMCs _____	37
2.2.5	Magnetische Zellseparation mittels MACS®-Technologie _____	37
2.2.6	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen _____	38
2.2.7	Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen _____	38
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen _____	38
2.2.9	Inaktivierung von Tumorzellen _____	39
2.3	Molekularbiologische Methoden _____	39
2.3.1	Verdau von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen _____	39
2.3.2	Auftrennung von DNA in Agarosegelen _____	39
2.3.3	DNA-Präparation aus Agarosegel _____	39
2.3.4	Ligation komplementärer DNA-Fragmente _____	39
2.3.5	Transformation kompetenter E.coli Bakterien _____	40
2.3.6	Anlegen von Bakterienkulturen _____	40
2.3.7	Aufreinigung von Plasmiden _____	41
2.3.8	Sequenzierung _____	41
2.4	Analytische Methoden _____	41
2.4.1	SDS-Gelelektrophorese _____	41
2.4.2	Analytische Gelfiltration _____	42
2.4.3	<sup>3</sup> [H]-Thymidin-Proliferationstest _____	42
2.5	Durchflusszytometrie (FACS) _____	42
2.5.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindungsaffinität _____	43
2.5.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der antikörpervermittelten Lyse, Proliferation und Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen _____	44
3	Ergebnisse _____	46
3.1	Produktion und Charakterisierung bispezifischer CD28-Antikörper _____	46
3.1.1	Klonierung und Generierung des bispezifischen BV10xCD28 Antikörpers _____	47
3.1.2	Klonierung und Generierung des bispezifischen 4G8xCD28 Antikörpers 50	
3.1.3	Der bispezifische Antikörper ENGxCD28 _____	53
3.2	Durchflusszytometrische Analyse von T-Zell-Proliferation,-Aktivierung und Tumorzelllyse auf Nalm-16-Zellen _____	55

3.2.1	CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper gegen dasselbe Epitop auf dem Zielantigen _____	55
3.2.2	CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper gegen unterschiedliche Epitope auf demselben Zielantigen _____	57
3.2.3	CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper gegen unterschiedliche Antigene auf derselben Zielzelle _____	59
3.3	Durchflusszytometrische Analyse von T-Zell-Proliferation, -Aktivierung und Tumorzelllyse auf Leukämiezellen _____	62
3.3.1	CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper in Standard RPMI-Medium _____	62
3.3.2	CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper im modifizierten Alpha-MEM _____	65
4	Diskussion _____	72
4.1	Funktionsanalyse im allogenen System _____	72
4.2	Funktionsanalyse im autologen System _____	75
4.3	Ausblick _____	77
5	Zusammenfassung _____	79
6	Literaturverzeichnis _____	80
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	89
8	Danksagung _____	90

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1.2.1: Struktur des IgG-Moleküls .....</b>	<b>10</b>
<b>Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der für diese Arbeit verwendeten kostimulatorischen Antikörper .....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 3.1.1 Analytische Größenausschlusschromatographie des BV10xCD28 Antikörpers .....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 3.1.2 SDS-Gelelektrophorese des BV10xCD28 Antikörpers .....</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung 3.1.3: Bindungsanalyse des BV10xCD28 Antikörpers .....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 3.1.4: T-Zell-Proliferation.....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 3.1.5: Analytische Größenausschlusschromatografie des 4G8xCD28 Antikörpers .....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 3.1.6: SDS-Gelelektrophorese des 4G8xCD28 Antikörpers .....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 3.1.7: Bindungsanalyse des 4G8xCD28 Antikörpers .....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 3.1.8: T-Zell-Proliferation.....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 3.1.9: Bindungsanalyse des ENGxCD28 Antikörpers .....</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 3.1.10: T-Zell-Proliferation.....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 3.2.1: Antikörpervermittelte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen .....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 3.2.2: Antikörpervermittelte Zielzelllyse .....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 3.2.3: Antikörpervermittelte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen .....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 3.2.4: Antikörpervermittelte Zielzelllyse .....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 3.2.5: Antikörpervermittelte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen .....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 3.2.6: Antikörpervermittelte Zielzelllyse .....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 3.3.1: T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung .....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 3.3.2: Tumorzelllyse.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 3.3.3: T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach acht Tagen...</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 3.3.4: Tumorzelllyse nach acht Tagen .....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 3.3.5: Tumorzelllyse nach acht Tagen .....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 3.3.6: T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach zwölf Tagen .....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 3.3.7: Tumorzelllyse nach zwölf Tagen.....</b>	<b>71</b>

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 2.1.1: Unkonjugierte Antikörper.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 2.1.2: Konjugierte Antikörper.....</b>	<b>33</b>

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADC	Antibody-Drug-Conjugates
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Antigen-presenting cell
BiTE	Bispecific T-Cell-Engager
bsAb	bispecific Antibody
°C	Grad Celsius
C-terminal	Kohlenstoff-terminal
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CDCC	Complement-dependent cellular cytotoxicity
CDR	Complementary-determining region
C <sub>H</sub>	Konstante Domäne der schweren Kette
CHO	Chinese Hamster Ovary
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Kette
CR	Complete Remission
CRS	Cytokine Release Syndrome
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphat
EC	Effective Concentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENG	Endoglin
engl.	englisch
ELN	European Leukemia Network
EpCAM	Epithelial Cell-Adhesion Molecule
E:T-Ratio	Effector-Target-Ratio
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizing
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FMO	Fluorescence Minus One
FR	Framework region
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde

HV	Hypervariable Regionen
Ig	Immunglobulin
ITD	Interne Tandemduplikation
IL	Interleukin
HAMA	Human anti-mouse antibody
JM	Juxtamembrandomäne
k	Kilo
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
M	Molar
MAC	Membrane Attack Complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
$\mu\text{Ci}$	Mikrocurie
$\mu\text{l}$	Mikroliter
N-terminal	Amino-terminal
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nM	Nanomol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed Cell-Death 1
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PP	Polypropylen
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
scFv	Single chain Fragment variable
SDS	Sodium-(Natrium-)dodecylsulfat
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TCR	T-cell receptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TKD	Tyrosin-Kinase-Domäne
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSA	Tumorspezifisches Antigen
U	Unit
V	Volt

# **1 Einleitung**

## **1.1 Krebs**

Krebs gehört mit ca. 500.000 Erkrankungen pro Jahr zu den häufigsten Krankheiten in Deutschland und ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache und laut statistischem Bundesamt für ein Viertel aller Todesfälle verantwortlich. In der Altersgruppe der 45- bis 65-jährigen ist Krebs die häufigste Todesursache. Als Krebs werden dabei verschiedenste Arten von Zellwucherungen im menschlichen Körper zusammengefasst, welche aus Mutationen in für die Zellteilung kritischen Genen resultieren. Genauso unterschiedlich wie die Pathogenese und der Ort des Auftretens, sind Therapie und Prognose, welche mit der Diagnose einhergehen.

### **1.1.1 Akute Myeloische Leukämie**

#### **Pathogenese**

Der Begriff Leukämie umfasst die Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, wobei sich entartete Leukozyten unkontrolliert vermehren. Hierbei werden Reifungsstörungen der myeloischen Reihe von denen der lymphatischen Reihe unterschieden, Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht aus einer Reifungsstörung in der myeloischen Reihe der Blutbildung. Dies unterscheidet sie von der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), welche aus einer Reifungsstörung in der lymphatischen Reihe entsteht. Während die ALL vorwiegend im Kinder- und Jugendalter auftritt, stellt die AML eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters dar.

#### **Epidemiologie**

Es erkranken etwa 3,7 von 100.000 Menschen pro Jahr an AML, wobei die Inzidenz mit dem Alter stark steigt und in der Gruppe der Patienten über 70 Jahre bei über 100 Fällen von 100.000 Menschen liegt. Das 5-Jahres-Überleben ist mit 24,1% wesentlich schlechter als bei anderen Formen der Leukämie. Während sich die Prognose im jüngeren Erkrankungsalter in den letzten Dekaden zum Teil deutlich verbessern konnte, stagniert gerade bei Patienten über 60 Jahren,

welche etwa die Hälfte aller Erkrankten ausmachen, das relative 5-Jahres-Überleben bei ca. 15% (Büchner et al. 2009).

### **Klassifikation**

Nach der Diagnose einer AML in der Regel durch Nachweis leukämischer Blasten im Knochenmark, kann über den Nachweis spezifischer genetischer Aberrationen und Immunphänotypisierung eine genauere Klassifizierung erfolgen. Die Erfassung genetischer Aberrationen ist heutzutage sowohl für die Abschätzung der Prognose als auch für die Therapie unabdingbar. Anhand der Einteilung nach der WHO-Klassifikation lassen sich entsprechende Risikogruppen bilden, nach welchen die Patienten entsprechend der zytogenetischen Veränderungen in die drei ELN (European Leukemia-Network)-Risikogruppen (günstig, intermediär, ungünstig) eingeteilt werden können.

### **Therapie**

Die AML-Therapie besteht aus der Induktionstherapie, welche das Ziel der kompletten Remission (CR, engl. *complete remission*) verfolgt, und der daran anschließenden Konsolidierungstherapie. Je nach molekular-zytogenetischer Veränderung variiert die Aussicht, eine CR zu erreichen.

#### **1.1.2 Tumorassoziierte Antigene**

Als tumorassoziierte Antigene werden Antigene bezeichnet, welche von Tumorzellen produziert und exprimiert werden. Hierbei findet oftmals eine Überexpression auf den Tumorzellen statt. Im Folgenden werden einige für die vorliegende Arbeit wichtige TAAs abgehandelt.

#### **FLT3**

FLT3 (engl. *FMS-like tyrosine kinase 3*) auch CD135, STK-1 (engl. *human stem cell kinase 1*) oder FLK-2 (engl. *fetal liver kinase 2*) genannt, ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 132-155 kDa (Maroc et al. 1993). FLT3 wird zur Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase-Familie gezählt. Die Mitglieder dieser Familie weisen einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aus fünf Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne, einer

zytoplasmatischen Juxtamembrandomäne (JM) und einer geteilten intrazellulären Tyrosinkinasedomäne auf (Rosnet and Birnbaum 1993; Agnes et al. 1994). Eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch Bindung des zugehörigen Liganden, FLT3-L. Der Ligand kann biologisch aktiv sowohl in löslicher Form als auch membrangebunden vorliegen (Lyman et al. 1993). Der FLT3-Ligand bindet an zwei Moleküle des FLT3-Moleküls, wodurch Transphosphorylierungen in der intrazellulären Domäne ermöglicht werden. Dadurch findet eine Konformationsänderung statt, welche zur Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden führt (Griffith et al. 2004). Dies induziert die Proliferation, Differenzierung und das Überleben hämatopoetischer Stammzellen, was jedoch noch von weiteren Wachstumsfaktoren abhängig ist (Rusten et al. 1996). Physiologischerweise wird FLT3 auf myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert (Stirewalt and Radich 2003), findet sich teilweise aber auch auf Monozyten (Lyman and Jacobsen 1998; Hofmann et al. 2012). Auf malignen Zellen akuter Leukämien findet in über 90% der Fälle eine starke Expression von FLT3 statt (Birg et al. 1992; Carow et al. 1996). Dies konnte bei chronischen Leukämien ausschließlich während einer Blastenkrise nachgewiesen werden, was die Vermutung nahelegt, dass FLT3 bei Leukämien eine entscheidende Rolle bei der Expansion und Proliferation von Blasten spielt (Birg et al. 1992). Bei etwa jeder dritten AML findet sich eine FLT3-Mutation. Damit gehört FLT3 zu den am häufigsten mutierten Genen bei AML (Gilliland and Griffin 2002). Dabei können zwei unterschiedliche Mutationsarten unterschieden werden: Die interne Tandemduplikation (FLT3-ITD) und die Punktmutationen der Tyrosin-Kinase-Domäne (FLT3-TKD). Beide Mutationen führen durch dauerhafte Aktivierung des Rezeptors zur Aktivierung von proliferativen und anti-apoptischen Signaltransduktionskaskaden (Yamamoto et al. 2001; Hayakawa et al. 2000), wobei die FLT3-ITD im Gegensatz zur FLT3-TKD mit einer schlechten Prognose korreliert (Thiede et al. 2002; Moreno et al. 2003). Therapeutisch kann eine Blockade der Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Midostaurin (Handelsname Rydapt®) erreicht werden. Dieser ist seit 2017 in den USA und Europa in Kombination mit Chemotherapie sowohl in der Induktions-, als auch in der

Konsolidierungstherapie u.a. zur Behandlung der FLT3-positiven AML zugelassen. Die Anwendung konnte sowohl das Gesamtüberleben als auch die 4-Jahres-Überlebensrate erhöhen (Stone et al. 2017). Durch Verwendung von FLT3-Inhibitoren anstelle von Multikinaseinhibitoren soll therapeutisch eine höhere Wirksamkeit erreicht werden, indem spezifisch die FLT3-Tyrosinkinase blockiert wird. Ein Beispiel hierfür ist der Ende 2019 in der EU als Monotherapie zugelassene Wirkstoff Gilteritinib (Handelsname Xospata®).

## **Endoglin**

Endoglin, auch CD105 oder ENG, ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa (Gougos and Letarte 1988). Endoglin fungiert als Hilfsrezeptor für die TGF- $\beta$  (engl. *Transforming growth factor- $\beta$* )-Familie (Barbara et al. 1999). Als Teil dieses Signalwegs spielt Endoglin eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Überleben von exprimierenden Zellen (Gonzalez Munoz et al. 2021; Gordon and Blobel 2008), vorwiegend während der embryonalen Entwicklung, bei der Regulation der Hämatopoese (Borges et al. 2013) und der Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems (Arthur et al. 2000). In Mausmodellen führte das Fehlen von Endoglin zu frühzeitiger Letalität durch Missbildungen des Herzens und der Blutgefäße (Li et al. 1999). Das Vorkommen von Endoglin wurde zuerst auf humanen Endothelzellen beschrieben (Gougos and Letarte 1988). Später wurde dies spezifiziert, da Endoglin auf ruhenden Endothelzellen nur marginal exprimiert wird, sondern vor allem auf proliferierenden Gefäßen wie bei Wundheilungsprozessen, in der embryonalen Entwicklung, bei entzündlichen Prozessen und auf tumoralen Gefäßen (Dallas et al. 2008). Das gilt vor allem für Gefäße von Tumoren des Gehirns, der Brust, des Kolons, der Lunge und des Magens (Burrows et al. 1995; Minhajati et al. 2006), und korreliert oftmals mit einer schlechten Prognose (Saad et al. 2004; Dales et al. 2003; El-Gohary et al. 2007; Zhang et al. 2018). Weitere Zellen auf denen Endoglin physiologischerweise nachgewiesen werden konnte sind nach Muñoz et al. Syncytiotrophoblasten (Gougos et al. 1992; St-Jacques, Forte, et al. 1994; Dagdeviren et al. 1998), unreife Präerythrothrophoblasten (Buhring et al. 1991),

Makrophagen (Lastres et al. 1992), vaskuläre glatte Muskelzellen (Adam et al. 1998), Fibroblasten (St-Jacques, Cymerman, et al. 1994), Mesangiumzellen (Rodriguez-Barbero et al. 2001), mesenchymale Stammzellen (Barry et al. 1999), hämatopoetische Stammzellen (Pierelli et al. 2001), Chondrozyten (Parker et al. 2003), Keratinozyten (Quintanilla et al. 2003) und Mastzellen ((Trentin Brum et al. 2019); zusammengefasst in: (Gonzalez Munoz et al. 2021)). Außerdem wurde eine verstärkte Endoglinexpression beim myelodysplastischen Syndrom, der ALL und der AML nachgewiesen (Della Porta et al. 2006; Chakhachiro et al. 2013; Cosimato et al. 2018), was im Falle der AML ebenfalls mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Kauer et al. 2019). Wegen dieses Expressionsmusters wird Endoglin als Zielantigen verwendet, um spezifisch die Angiogenese von Tumoren zu unterbinden (Rosen et al. 2014). So konnten Seon et al. mithilfe von Immunotoxinen, welche gegen den Endoglinrezeptor gerichtet sind, Tumorregression in Mausmodellen erreichen und die Bildung von Metastasen verhindern (Seon et al. 2011). Aufgrund der häufigen Überexpression von Endoglin auf AML-Zellen und der ansonsten begrenzten physiologischen Expression, erscheint Endoglin grundsätzlich als Zielantigen auch für die Immuntherapie der AML geeignet.

### **1.1.3 Klassische Krebstherapien**

Während in den letzten Jahrzehnten in der Krebstherapie vor allen Dingen Resektion, Chemotherapie und Radiotherapie vorrangig zur Behandlung von Krebserkrankungen vorgesehen waren, entwickelten sich in den letzten Jahren durch besseres zelluläres Verständnis und Fortschritte in den Erkenntnissen über die Funktionsweise des Immunsystems neue therapeutische Ansätze, welche auf die Aktivierung des Immunsystems abzielen.

## **1.2 Antikörper**

### **1.2.1 Geschichte**

Emil von Behring und Shibasaburo KITASATO legten 1890 mit ihrem Aufsatz „Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und Tetanusimmunität bei

Tieren“ den Grundstein für die Antikörpertherapie. Sie wiesen nach, dass mithilfe des Serums von Tieren, welche mit dem Tetanus- oder Diphtherietoxin infiziert worden waren, gesunde Tiere vor der jeweiligen Infektion geschützt – bzw. erkrankte Tiere mithilfe dieses Serums geheilt werden konnten. Durch die Übertragung des Serums auf gesunde Tiere konnte bei diesen eine Immunität erzeugt werden. Die Hypothese von Behrings und Kitasatos war, dass die Infektion zur Entstehung antitoxischer Substanzen im Serum führte, die das Tetanus- bzw. das Diphtherietoxin neutralisieren können.

Ein Jahr später konnten Guido Tizzoni und Guiseppina Cattani ein Antitoxin im Serum identifizieren, welches das Tetanustoxin neutralisieren konnte. Wiederum zwei Jahre später, 1893, wurde zum ersten Mal ein Antitoxin zur Behandlung von Diphtherie bei einem Menschen eingesetzt. 1900 führte Paul Ehrlich den Begriff des Antikörpers für das Antitoxin ein, welcher sich in den folgenden Jahren durchsetzen sollte. Mit dieser Arbeit veröffentlichte Ehrlich auch seine Seitenkettentheorie, nach welcher eine Zelle mehrere verschiedene Seitenketten exprimiert. Im Falle eines Kontaktes von Toxin mit entsprechend nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip passender Seitenkette, resultiert daraus die verstärkte Expression der entsprechenden Seitenkette und der Sekretion dieser ins Blut, wodurch eine Neutralisation des Toxins im Blut ermöglicht wird (Ehrlich 1900).

Eine weitere Charakterisierung von Antikörpern fand in den folgenden Jahrzehnten statt. In den 20er-Jahren des 20. Jahrhunderts konnten Heidelberger und Avery nachweisen, dass Antikörper sowohl an Glykoproteine und als auch an Kohlenhydrate binden können und dass es sich bei Antikörpern um Proteine handelt (Heidelberger and Avery 1923; Van Epps 2006). 1934 stellte John Marrack die Hypothese auf, dass die Antigen-Antikörper-Bindung auf hydrophilen Wechselwirkungen und polaren Bindungen beruht (Marrack 1934). Durch Elektrophorese gelang es Tiselius und Kabat 1938 das Serum von Kaninchen aufzutrennen und damit zu veranschaulichen, dass sich dieses in vier Fraktionen auftrennt: Albumin,  $\alpha$ -Globulinfraktion,  $\beta$ -Globulinfraktion und  $\gamma$ -Globulinfraktion, wobei letztere durch die Immunisierung der Tiere mithilfe von Ovalbumin stark vergrößert werden konnte. Mittels Antigenbindung konnten

diese Ovalbumin-spezifischen Antikörper absorbiert werden, was zu einem Rückgang der  $\gamma$ -Globulinfraktion führte (Tiselius and Kabat 1938). 1948 wies Astrid Fagraeus die Antikörperproduktion den Plasmazellen zu, die sie in Milzzellkulturen immunisierter Tiere fand (Fagraeus 1948). 1955 konnte die Antikörperproduktion in Plasmazellen mithilfe von Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Leduc et al. 1955).

### 1.2.2 Struktur

Die Struktur von Antikörpern wurde parallel, aber unabhängig voneinander, vom Briten Rodney Porter und dem US-Amerikaner Gerald Edelman untersucht. Beide Wissenschaftler konnten das Y-förmige und 150 kDa schwere IgG-Molekül mithilfe unterschiedlicher Reagenzien in verschiedene Teile spalten. Während Edelman unter Verwendung von reduzierenden und denaturierenden Reagenzien vier verschiedene schwere Untereinheiten erhielt, zwei mit ca. 50 kDa und zwei etwa doppelt so schwere mit ca. 100 kDa, erzeugte Porter mittels Papain drei gleich schwere Fragmente mit jeweils 50 kDa. Edelman nannte die beiden entstehenden Einheiten anhand des Molekulargewichts leichte und schwere Ketten (Edelman and Poulik 1961; Edelman and Gally 1962). Porter teilte die entstehenden Fragmente nach anderen Eigenschaften ein: funktionell das antigen-bindende Fragment (Fab, engl. *fragment antigen binding*) und das kristallisierende Fragment (Fc; engl. *fragment crystallizable*), da dieses bei Lagerung bei kalten Temperaturen auskristallisierte (Porter 1959, 1963). Im Jahr 1972 erhielten Porter und Edelman gemeinsam den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie „für ihre Entdeckungen zur chemischen Struktur der Antikörper“.

Eine weitere Spaltung des IgG Moleküls gelang Rossi und Nisonoff mit Pepsin, wodurch das Molekül in ein ca. 100 kDa schweres Fragment und viele kleinere Fragmente geteilt wird. Das große Fragment ist ebenso wie das Fab-Fragment in der Lage, Antigene zu binden, woraus die Wissenschaftler schlossen, dass es sich um zwei verbundene Fab-Fragmente handeln musste, weswegen es F(ab')<sub>2</sub>-Fragment genannt wurde. Der Strich(index) zeigt an, dass es sich nicht nur um zwei Fab-Fragmente handelt, sondern das Fragment zusätzlich noch einige Aminosäuren enthält. Darunter unter anderem die Cysteine der Disulfidbrücken,

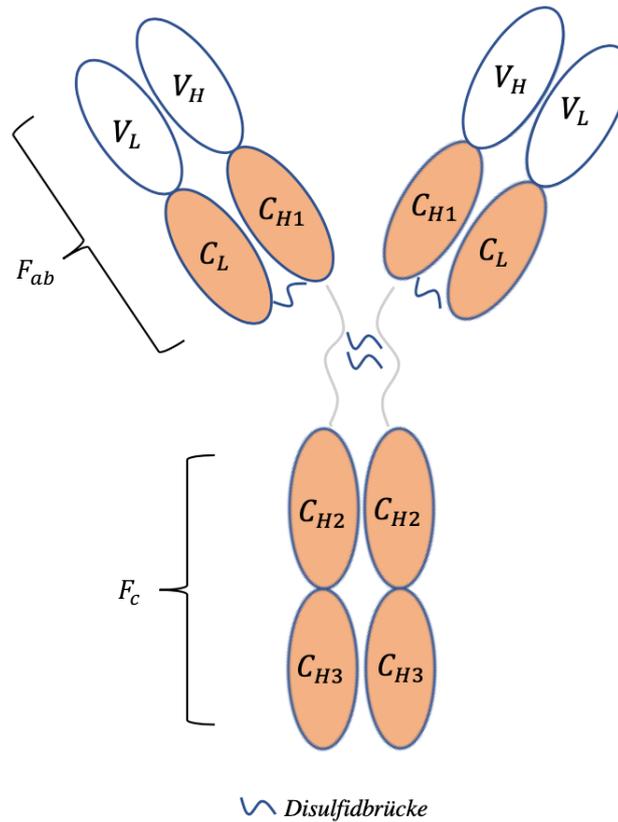
womit auch nachgewiesen wurde, dass die Fab-Fragmente untereinander verbunden sind (Rossi and Nisonoff 1968).

Das IgG-Globulin ist, wie in Abbildung 1.2.1 schematisch dargestellt, symmetrisch aus jeweils zwei leichten und schweren Ketten aufgebaut, wobei jeweils eine leichte und eine schwere Kette über Disulfidbrückenbindungen verbunden sind. Die Bindung der schweren Ketten mittels Disulfidbrücken befindet sich zwischen Fab- und Fc-Fragmenten in der sogenannten Gelenkregion (engl. *hinge region*). Diese Konstruktion ermöglicht es, dass die Fab-„Arme“ des Antikörpers in unterschiedlichen Winkeln zueinander stehen können, wodurch eine Bindung an unterschiedlich weit entfernten Stellen ermöglicht wird. Die Polypeptidketten wiederum bestehen aus zwei (leichte Kette) bzw. vier (schwere Kette) Domänen, wovon eine (leichte Kette) bzw. drei (schwere Kette) konstant und jeweils eine variabel ist. Die Domänen bestehen aus Aminosäuresequenzen, die jeweils etwa 110 Aminosäuren umfassen. Während die drei C-terminalen Domänen der schweren Kette und die C-terminale Domäne der leichten Kette immer ähnlich, also konstant, sind, variieren die N-terminalen Domänen der schweren und leichten Ketten erheblich. Die konstanten Domänen der schweren Kette werden von N-terminal bis zum Carboxylende von  $C_{H1}$  bis  $C_{H3}$  durchgezählt. Die konstante Domäne der leichten Kette wird  $C_L$  genannt. Die N-terminal gelegene variable Domäne der schweren Kette wird entsprechend als  $V_H$  und die variable Domäne der leichten Kette wird als  $V_L$  bezeichnet. Diese variablen Domänen enthalten einerseits relativ konstante Gerüstregionen, FR1 bis FR4 (engl. *framework regions*), in welche hypervariable Regionen HV1 bis HV3, welche auch als *complementarity determining regions* CDR1 bis CDR3 bezeichnet werden, eingebettet sind. Während die Gerüstregionen die Struktur der Domäne bestimmen, bilden die hypervariablen Regionen aus leichter und schwerer Kette gemeinsam das sogenannte Paratop, die Bindungsstelle des Antikörpers (Wu and Kabat 1970).

Die Variabilität von Antikörpern wird auf genetischer Ebene durch somatische Rekombination erreicht. Darunter versteht man den Prozess der zufälligen Aneinanderreihung der Gensegmente V und J bei der leichten Kette, sowie zusätzlich D bei der schweren Kette. Bei der leichten Kette wird die  $\lambda$ -Leichtkette

von der  $\kappa$ -Leichtkette unterschieden, wobei funktionell bisher kein Unterschied zwischen diesen beiden erkannt werden konnte. Bei der  $\lambda$ -Leichtkette besteht die Möglichkeit der Kombination von 29-33 V-Gensegmenten mit 4-5 verschiedenen J-Segmenten, während es bei der  $\kappa$ -Leichtkette 34-38 V-Segmente und 5 J-Gensegmente sind. Bei der schweren Kette stehen 38-46 V-, 23 D- und 6 J-Segmente zur Verfügung. Durch die somatische Rekombination unterschiedlicher Segmente, sowie die Kombination verschiedener leichter und schwerer Ketten ergeben sich bereits mehrere Millionen verschiedene Antikörper. Hierzu kommt die junktionale Diversität. Diese beschreibt die Möglichkeit des Hinzufügens oder Entfernens einer zufälligen Zahl an Nukleotiden beim Verknüpfen der Gensegmente. Ein dritter Mechanismus, welcher in B-Zellen auftritt, die Antigenkontakt hatten, und welcher die Variabilität weiter erhöht, ist die somatische Hypermuation. Dies sind zusätzliche Punktmutationen in der variablen Domäne, welche eine größere Diversität, Spezifität und Affinität der Antikörper ermöglicht (McKean et al. 1984).

Während bei leichten Ketten zwei Isotypen unterschieden werden, gibt es bei den schweren Ketten fünf Isotypen ( $Ig\alpha$ ,  $Ig\delta$ ,  $Ig\epsilon$ ,  $Ig\gamma$  und  $Ig\mu$ ), welche die Unterklassen der Immunglobuline festlegen:  $IgA$ ,  $IgD$ ,  $IgE$ ,  $IgG$  und  $IgM$ . Die Isotypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, unter anderem in Bezug auf die Lokalisation und Anzahl der Disulfidbrücken zwischen schweren Ketten, der Zahl der konstanten Domänen, hiermit auch ihrem Molekulargewicht, sowie ihren Aufgaben im menschlichen Körper. Im Blut sind vor allem  $IgM$  und  $IgG$  Isotypen zu finden, wobei es  $IgG$ -Molekülen im Gegensatz zu  $IgM$ -Molekülen möglich ist, die Gefäße zu verlassen und Gewebe zu penetrieren. Das  $IgG$ -Molekül weist auch die längste Halbwertszeit aller Immunglobuline auf. Dies alles, in Kombination mit den anti-tumoralen Wirkmechanismen, die in der Folge dargestellt werden sollen, macht Antikörper im  $IgG$ -Format besonders interessant für die Therapie von malignen Erkrankungen.



### Abbildung 1.2.1: Struktur des IgG-Moleküls

Das IgG-Molekül besteht aus zwei leichten Ketten, jeweils mit den Domänen V<sub>L</sub> und C<sub>L</sub>, und zwei schweren Ketten, die jeweils aus den Domänen V<sub>H</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub> aufgebaut sind. Das Fab-Fragment besteht aus den beiden leichten Ketten, sowie den Domänen V<sub>H</sub> und C<sub>H1</sub> der schweren Kette. Das Fc-Fragment aus den Domänen C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub> der beiden schweren Ketten. Die leichten Ketten sind jeweils über eine Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verbunden und die beiden schweren Ketten untereinander mit zwei Disulfidbrücken. Die variablen Regionen (weiß) enthalten die hypervariablen Regionen, welche die Bindungsstelle des Antikörpers, das Paratop, bilden.

### 1.2.3 Funktion

Lösliche Antikörper stellen die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors dar. Die Aufgabe dieser sezernierten Antikörper besteht im Schutz des Körpers vor pathogenen Mikroorganismen und Viren, was durch verschiedene Mechanismen ermöglicht wird.

Bei der Neutralisation binden Antikörper direkt an Viren oder bakterielle Toxine und verhindern somit das Eindringen der Viren in Zellen bzw. das Binden des Toxins an entsprechende Oberflächenrezeptoren der Zelle. Somit wird eine direkte Schädigung von Zellen durch Toxine verhindert. Die Neutralisation gehört

somit zu den direkten Mechanismen der Antikörper, die unabhängig vom Fc-Teil ablaufen.

Fc-Teil-abhängige Funktionen von Antikörpern werden entsprechend indirekte Mechanismen genannt. Diesbezüglich gibt es zum einen den Mechanismus der Opsonierung. Dies beschreibt die Bindung von Antikörpern an Antigene auf der Oberfläche von Pathogenen. Wenn die Oberfläche des Pathogens mit Antikörpern bedeckt ist, können Phagozyten mithilfe ihrer Fc-Rezeptoren, die Pathogene als körperfremd erkennen und diese in der Folge inkorporieren und abbauen. Ein anderer indirekter Mechanismus von Antikörpern ist die Komplementaktivierung, auch Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC, engl. *complement-dependent cytotoxicity*). Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Proteinen im Plasma, die durch proteolytische Spaltung sequenziell aktiviert werden. Das Ziel dieser Kaskade stellt der membranangreifende Komplex (MAC, engl. *membrane-attack-complex*) dar, welcher die Zielzellyse induziert. Allerdings können bereits Spaltprodukte, die dem MAC vorausgehen, die Phagozytose von Zielzellen auslösen, indem sie von Phagozyten auf der Zielzelloberfläche erkannt werden. Dies bezeichnet man als Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (CDCC, engl. *complement-dependent cellular cytotoxicity*). Ein weiterer indirekter Antikörpermechanismus ist die Immunzellaktivierung durch Multimerisierung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immunzellen, die sog. Antikörper-vermittelte Lyse (ADCC, engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Wie Nimmerjahn und Ravetch in ihrem Übersichtsartikel zusammenfassen, finden sich Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf beinahe allen hämatopoetischen Zellen. Hierbei werden aktivierende von inhibierenden Rezeptoren unterschieden, wobei auf den meisten Zellen beide Arten von Rezeptoren exprimiert werden. Dadurch wird ein Gleichgewicht aus Aktivierung und Hemmung erreicht. Eine Ausnahme stellen B-Zellen und NK-Zellen dar. B-Zellen exprimieren nur inhibierende und NK-Zellen ausschließlich aktivierende Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Daher gelten NK-Zellen als die effektivsten Zellen der ADCC (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

### 1.3 Immunüberwachung

Schon Paul Ehrlich postulierte Anfang des vergangenen Jahrhunderts, dass es fortlaufend zur Entstehung abnormer Zellen im Körper kommt, welche durch das Immunsystem erfolgreich zerstört werden können. Macfarlane Burnet griff dies in den 1970er Jahren auf, stellte die Hypothese auf, dass das Immunsystem die Entstehung von Tumoren verhindern kann und nannte dies die Immunüberwachung (engl. *Immune Surveillance*) (Burnet 1970). Jedoch konnte diese Hypothese lange Zeit nicht bewiesen und sogar scheinbar widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass Mäuse, welche ohne Thymus gezüchtet wurden, im Vergleich zu immunkompetenten Mäusen, genauso häufig Tumore entwickelten, wenn sie nach der Geburt mit einem Giftstoff beimpft wurden. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht bekannt, dass bei den Mäusen auch ohne Thymus eine Restimmunkompetenz erhalten war, was zur Entdeckung der NK-Zellen führte (Ikehara et al. 1984). Erst durch vollständig immundefiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Tumorwahrscheinlichkeit bei diesen deutlich erhöht ist.

In der Entwicklung von Tumoren können drei unterschiedliche Stufen der Interaktion von Tumor- und Immunzellen voneinander abgegrenzt werden (Finn 2018). Grundsätzlich kann das Immunsystem Tumorzellen erkennen und zerstören, indem Oberflächenproteine erkannt und dadurch Immunzellen aktiviert werden. Hierfür wird der von MacFarlane Burnet geprägte Begriff der Immunüberwachung (engl. *Immunosurveillance*) verwendet. Können Krebszellen nicht zerstört werden, entsteht zwischen Tumor- und Immunzellen ein Gleichgewicht (Gleichgewichtsphase, engl. *balanced phase*). In einem weiteren Schritt kann es nun zum Entkommen des Tumors vor der Immunantwort (engl. *Immune Escape*) kommen. Ab diesem Punkt findet eine Regulation des Immunsystems durch den Tumor statt, indem durch Zytokine die Migration immunsuppressiver Zellen aus dem Blut in die Tumorumgebung gefördert wird (Böldicke 2021).

Mithilfe von Immunhistologie und genauer Analyse des Milieus im Bereich von Tumoren konnte untersucht werden, wie die Interaktion zwischen Immunsystem

und Tumorzellen in den unterschiedlichen Phasen abläuft und wie es den Tumorzellen gelingt, die Immunantwort zu modellieren und unterdrücken. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden verschiedenste Ansatzpunkte entwickelt, um die Immunantwort wieder zu verstärken, welche im Folgenden beschrieben werden.

## **1.4 Immuntherapie von Krebs**

Der Immuntherapie liegt die Erkenntnis zugrunde, dass tumor-assoziierte Antigene (TAAs) existieren, die vom Immunsystem erkannt werden können. Dies wird als Grundlage für unterschiedliche Ansatzpunkte zur Tumormimmuntherapie verwendet. Im Folgenden sollen drei Arten der Immuntherapie vorgestellt werden: antikörperbasierte Immuntherapie, T-Zell-basierte Immuntherapie und Vakzinierung.

### **1.4.1 Vakzinierung**

Bei der aktiven Vakzinierung soll mit Verabreichung von Tumorantigenen eine Immunantwort erzeugt werden. Die zumeist rekombinant hergestellten Proteine werden intra-dermal injiziert und führen nach Aufnahme durch dendritische Zellen zur Generierung von T-Zellen, welche anhand des Tumorantigens die Tumorzellen spezifisch erkennen und lysieren können. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Proteinpräsentation vom MHC-Haplotyp des Patienten abhängt, was eine universelle Anwendung unmöglich macht. Weitere Möglichkeiten der Induktion einer adaptiven Immunantwort werden durch Anwendung von Nukleinsäure-Vakzinen geschaffen. Hierbei wird DNA mittels eines viralen Vektors oder mRNA direkt in die Zellen aufgenommen und induzieren die Expression des Tumorantigens auf der Zelloberfläche, was zur T-Zell-Aktivierung führt.

### **1.4.2 Therapeutische Antikörper**

Den Grundstein für die Verwendung von Antikörpern zu therapeutischen Zwecken legten Köhler und Milstein in den 1970er Jahren mit dem Einsatz der Hybridom-Technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Die beiden Wissenschaftler veröffentlichten 1975 ihre Arbeit zur Fusion von Myelomzellen

mit Milzzellen immunisierter Mäuse. Hierdurch konnten sie die Immortalität der Myelomzellen und die Antikörpersekretion der Plasmazellen kombinieren, was die Produktion von monoklonalen Antikörpern in größeren Mengen ermöglichte und damit die Anwendungs- und Forschungsmöglichkeiten revolutionierte (Kohler and Milstein 1975). Im Jahr 1984 erhielten Georges Köhler und César Milstein den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie „für die Entdeckung des Prinzips der Produktion von monoklonalen Antikörpern“. Bereits 1986 wurde die Marktzulassung des ersten monoklonalen Antikörpers erteilt. Muromonab-CD3 (Handelsname: Orthoclone OKT3®) wurde verwendet, um Organabstoßung nach Transplantationen zu verhindern. Ein grundsätzliches Problem der Therapie bestand anfänglich darin, dass die murinen Antikörper vom humanen Immunsystem als Fremdproteine erkannt wurden und mittels spezifischer Anti-Maus-Antikörper (HAMA, engl. *human anti-mouse-antibodies*) neutralisiert wurden (Tjandra et al. 1990). Ein weiterer Nachteil von murinen Antikörpern stellt die vergleichsweise schlechte Bindung des murinen Fc-Teils verglichen mit humanen Fc-Teilen an humane Fc-Rezeptoren dar.

Durch Fortschritte der rekombinanten Antikörpertechnologie konnten Maus Antikörper mit einem humanen Fc Teil versehen werden. Die Herstellung solcher chimärer Antikörper gelang unter anderem Morrison et. al. Dadurch wurde zum einen die Bindung an humane Fc-Rezeptoren verbessert und zum anderen die Immunogenität vermindert. (Morrison et al. 1984). Ein Beispiel für einen solchen Antikörper ist der CD20-Antikörper Rituximab (Handelsname MabThera®), der 1997 als erster Antikörper zur Krebstherapie zugelassen wurde. Der Mechanismus besteht in der Apoptoseinduktion durch Bindung an CD20 auf Tumorzellen, komplementabhängige B-Zell-Lyse (CDC) und Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC).

Um die Immunogenität weiter zu vermindern, wurde eine weitergehende Humanisierung erreicht indem innerhalb der murinen variablen Regionen die Gerüstregionen durch humane ersetzt wurden, wobei die hypervariablen murinen Bereiche erhalten blieben (Jones et al. 1986).

Inzwischen können auch voll-humane Antikörper erzeugt werden. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist die Verwendung großer genetischer Bibliotheken mit humanen Sequenzen der variablen Regionen von leichten und schweren Ketten, aus denen DNA-Sequenzen entnommen und mithilfe des Phagen-Displays identifiziert und isoliert werden können (Marks et al. 1991). Hierdurch kann die Immunisierung von Mäusen umgangen werden, jedoch führt dies auch zur fehlenden Immunitätsreifung der Antikörper. Die andere Möglichkeit der Erzeugung vollständig humaner Antikörper stellen humanisierte Mäuse dar. In diesen werden die Gen-Loci für Immunglobuline der Maus gegen Gen-Loci vom Menschen ausgetauscht. Nach Antigenkontakt produzieren diese transgenen Mäuse humane Antikörper. Aus den antikörperproduzierenden Zellen können dann mithilfe der Hybridomtechnik immortalisierte Zelllinien zur Antikörperproduktion gewonnen werden (Lonberg 2008).

Neben der fortschreitenden Humanisierung der Antikörper gibt es weitere Veränderungen, die auf eine Verbesserung der Effektivität abzielen. Beispiel sind die bereits in Kapitel 1.2 genannten Immunzytokine und Antikörperkonjugate. Eine andere Strategie ist die Optimierung des Fc-Teils mittels gentechnischer Methoden.

#### 1.4.2.1 Immunzytokine

Immunzytokine sind Fusionsproteine aus Antikörpern und Zytokinen, welche im Umfeld eines Tumors die antitumorale Immunabwehr stärken sollen. Zytokine sind Proteine, die das Immunsystem modellieren können. Je nach den jeweiligen Eigenschaften und der Konzentration können Zytokine hierbei stimulierend oder inhibierend wirken. In Studien hat sich aber gezeigt, dass die meisten Zytokine bei der systemischen Applikation erhebliche Nebenwirkungen haben und deshalb nur relativ kleine Dosen verabreicht werden können. Die Kopplung an Antikörper soll diese systemischen Effekte eindämmen, indem die Zytokine ihre Wirkung zielgerichtet im Tumorumfeld entfalten sollen. Hierfür werden in verschiedenen Antikörperformaten (z.B. IgG-Molekülen oder Antikörperfragmenten) TAAs als Zielantigene ausgewählt. Hierbei können durch Immunzytokine, welche spezifisch an TAAs an der Zellmembran binden (im

Gegensatz zu Angriffspunkten auf der Extrazellulärmatrix), Bindungen zwischen Tumor- und Immunzellen (bspw. T-Zellen oder NK-Zellen) erreicht werden, ähnlichen denen, die bispezifische Antikörper bilden können. Ein Vorteil von TAAs der Extrazellulärmatrix besteht darin, dass diese Immunzytokine weniger anfällig für den Verlust von exprimierten Antigenen der Zielzellen sind und weiterhin T-Zellen und NK-Zellen im Umfeld des Tumors aktivieren können. Es wird angenommen, dass die Veränderung der Zytokinkonzentration im Tumorgewebe eine Stärkung des Immunsystems bewirkt und Immunzytokine in Kombination mit weiteren therapeutischen Ansätzen eine wichtige Rolle in der Behandlung von Tumorerkrankungen darstellen (Neri and Sondel 2016; Strohl 2018).

#### 1.4.2.2 Antikörperkonjugate

Antikörperkonjugate (ADC, engl. *Antibody-Drug-Conjugates*), auch Immuntoxine genannt, bestehen aus humanen oder humanisierten monoklonalen Antikörpern, welche über einen Linker mit zytotoxischen Molekülen verbunden sind. Dies soll den zielgerichteten Transport des Toxins in Tumorzellen ermöglichen und dadurch unerwünschte systemische Schädigungen minimieren. Wie bei den meisten in dieser Arbeit vorgestellten Immuntherapien ist auch hier die Wahl des TAAs oder TSAs von höchster Bedeutung, um Schäden außerhalb des Tumorgewebes möglichst gering zu halten. Zusätzlich muss der Antikörper über den gebundenen Zielrezeptor schnellstmöglich internalisiert werden. Des Weiteren beeinflusst die Konstitution des Linkers maßgeblich die Wirksamkeit und Toxizität des Immuntoxins, da er stabil genug sein muss, um das Toxin bis zum Transport in die Zelle zu binden. Anschließend muss allerdings im Zellinneren die Möglichkeit der Abspaltung des Toxins gegeben sein, um schwerwiegende Off-target-Toxizität zu verhindern. Letztlich tragen auch nicht zwangsläufig alle Zellen eines Tumors das Zielantigen, was möglicherweise eine Zerstörung dieser Zellen verhindert und ein Tumorüberleben ermöglicht (Singh et al. 2016). Obwohl bereits zwei ADCs in den USA und Europa zugelassen sind, handelt es sich bei ADCs um eine Technologie, welche noch einige Herausforderungen bietet (Tsuchikama and An 2018; Beck et al. 2017; Strohl 2018).

### 1.4.3 T-Zell-basierte Immuntherapie

T-Zellen sind die potentesten immunologischen Effektorzellen des Körpers und stellen daher in der Antikörpertherapie eine wichtige Zielpopulation dar. Da T-Zellen jedoch über keine Fc-Rezeptoren verfügen, muss die Aktivierung dieser Zellen anderweitig erfolgen.

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Aktivierung von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor (TCR, engl. *T-Cell Receptor*), der solche Protein-Antigene erkennen kann, welche als Peptide über den Hauptkompatibilitätskomplex (MHC, engl. *major-histocompatibility complex*) präsentiert werden. Die meisten T-Zellen tragen einen T-Zell-Rezeptor bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Diese bilden ein extrazelluläres Heterodimer, verbunden durch eine Disulfidbrücke. Jede Kette ist aus jeweils einer konstanten und einer variablen Domäne aufgebaut, welche denen des Immunglobulins ähneln. Der TCR ist mit CD3 assoziiert, einer Rezeptordomäne, die für die Weiterleitung der Signalkaskade in T-Zellen führt, wodurch Proliferation und Differenzierung stimuliert werden (Kuhns et al. 2006).

Neben dem TCR/CD3 Stimulus ist für die Aktivierung von T-Zellen ein kostimulatorisches Zweit-Signal notwendig. Ohne diesen Zweitstimulus gehen naive T-Zellen nach initialer Stimulation in einen inaktiven Zustand über, der Anergie genannt wird. In diesem verlieren T-Zellen die Sensitivität gegenüber dem CD3-Signal. Bekannte Kostimuli der T-Zell-Aktivierung werden über CD28, CD278 (ICOS, engl. *inducible T-cell costimulator*), CD134 (OX40), oder CD137 (4-1BB) vermittelt, einige Zweitsignale können auch zur Inhibition der T-Zell-Funktion führen, z.B. über die von aktivierten T-Zellen exprimierten Moleküle CD152 (CTLA-4, engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) und CD279 (PD-1, engl. *programmed cell-death protein 1*). Die Expression von stimulierenden und inhibierenden Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche nach Aktivierung des TCR ermöglicht die Regulation der Aktivierung. So binden die Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) sowohl an CD28 als auch an CTLA-4, was ein Gleichgewicht aus Aktivierung und Hemmung ermöglicht (Greenwald et al. 2005). Lösliche Faktoren spielen bei der Aktivierung ebenso eine Rolle, so kommt es bspw. durch autokrine IL-2 Signale zur Stimulation der T-Zellen, was durch Aktivierung der

exprimierten IL-2-Rezeptoren zu Wachstum und Differenzierung führt (Acuto and Michel 2003; Seder and Ahmed 2003).

Es können zwei verschiedene Populationen von T-Zellen unterschieden werden, die anhand von Korezeptoren eingeteilt werden, die diese exprimieren. CD8<sup>+</sup>-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-Zellen als T-Helferzellen bezeichnet. Die CD4<sup>+</sup>-Population kann noch weiter in die entzündungsregulierenden TH1- und die TH2-Zellen unterteilt werden. Letztere aktivieren B-Zellen und führen durch Zytokinausschüttung auch zum Klassenwechsel (Romagnani 1999).

#### 1.4.3.1 Checkpoint-Modulatoren

Mit dem in den letzten Jahrzehnten rasant gewachsenen Verständnis der Rolle des Immunsystems bei der Tumorentwicklung wurde ersichtlich, dass eine Inhibierung der Immunzellen durch den Tumor einen grundsätzlichen Mechanismus des *Immune Escapes* darstellt (vgl. Kapitel 1.2). Dies geschieht unter anderem durch inhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen, wie PD-1 oder CTLA-4, welche aktiviert werden. Eine Blockade dieser hemmenden Rezeptoren mittels anti-PD-1- oder anti-CTLA-4-Inhibitoren findet inzwischen mit den Antikörpern Ipilimumab (anti-CTLA-4), Pembrolizumab und Nivolumab (beide anti-PD-1) klinische Anwendung (Hargadon et al. 2018). Zwar sind die Ansprechraten dieser Therapien begrenzt, jedoch wurde in bei ansprechenden Patienten oft eine langfristige CR erreicht. Eine beschriebene Nebenwirkung der Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren ist Lebertoxizität, die in bis zu 16% der Patienten zu beobachten ist (Peeraphatdit et al. 2020). Weitere schwerwiegende Nebenwirkungen bestehen in der Induktion von Autoimmunkrankheiten, welche durch die Unterdrückung der inhibitorischen Wirkung auf autoreaktive T-Zellen zu erklären ist (Ramos-Casals et al. 2020).

#### 1.4.3.2 CAR-T-Zellen

Bei der CAR-T-Zell-Therapie werden T-Zellen mit sog. Chimären Antigen-Rezeptoren (CAR – engl. *chimeric antigen receptor*) fusioniert. CARs bestehen aus Antikörper(-fragmenten), meist scFv-Fragmenten (engl. *single-chain fragment variables*), welche Tumoroberflächenproteine erkennen können. Diese

Antikörperfragmente sind durch einen Linker und eine Transmembrandomäne mit einer intrazellulären T-Zell-Aktivierungsdomäne verbunden (Strohl, 2017). Durch die T-Zell-Aktivierung wird die Lyse der Tumorzellen induziert. Die verwendeten T-Zellen können -im Prinzip- autolog, d.h. vom Patienten durch Apherese gewonnen, oder allogene sein. Der Vorteil der allogenen CAR-T-Zellen liegen in der schnelleren Verfügbarkeit der Therapie, einer Standardisierung der CAR-T-Zell-Produkte, der Möglichkeit der Kombination verschiedener Zielantigene und niedrigerer Kosten durch industrialisierte Prozesse. Dem gegenüber steht die Gefahr einer lebensbedrohlichen Graft-vs.-Host-Reaktion oder einer Host-vs.-Graft-Reaktion, wobei die transfundierten T-Zellen vom Immunsystem rapide eliminiert werden (Depil et al. 2020). Aus diesen Gründen werden aktuell in der Regel autologe Zellen verwendet.

Während die erste Generation von CAR-T-Zellen das AK-Fragment über eine Transmembrandomäne an CD3 $\zeta$  koppelte, was zu hoher Zytotoxizität, aber einem Mangel an proliferativen Signalen führte, wurde mit der zweiten Generation durch zusätzliche Fusion der intrazellulären Domänen von kostimulatorischen Rezeptoren (CD28, 4-1BB oder Ox-40) eine verbesserte Proliferation der Zellen erreicht. Die beiden zugelassenen CAR-T-Zell-Therapien Tisagenlecleucel (Handelsname: Kymriah®, Novartis) und Axicabtagen-Ciloleucel (Handelsname: Yescarta®, Gilead Sciences) sind beide gegen das Zielantigen CD19 gerichtet. Grund dafür ist, dass CD19 oft und in hoher Zahl auf abnormen B-Zellen exprimiert wird (Li et al. 2017). Zwar ist CD19 auch in der normalen B-Zell-Entwicklung beteiligt (van Zelm et al. 2006), weswegen es durch die Therapie auch zu einer Minderung gesunder B-Zellen kommen kann, jedoch kann diesem on-target-off-tumor-Effekt symptomatisch mithilfe von intravenösen Immunglobulinen entgegengewirkt werden (Lim and June 2017). Ein weiteres Problem stellt die Therapieresistenz dar, welche entsteht, wenn wie in 10-20% der Fälle ein CD19-freies Rezidiv auftritt (Yu et al. 2017). Die häufigste unerwünschte Nebenwirkung, gerade bei Patienten mit hoher Tumorlast, stellt das bereits genannte Cytokine-Release-Syndrom (CRS) dar. Trotz allem ist die CAR-T-Zell-Therapie ein vielversprechender Ansatz, mit dem bereits heute bei

>80% der ALL- und ca. 50% der CLL-Patienten eine Remission erreicht werden kann (Lim and June 2017).

#### 1.4.3.3 Bispezifische Antikörper

Monospezifische Antikörper sind nicht in der Lage T-Zellen zu aktivieren, da diese Zellen über keine Fc-Rezeptoren verfügen. Daher wurden die Erkenntnisse der Möglichkeit der Aktivierung von T-Zellen mithilfe monoklonaler Antikörper gegen CD3 (Van Wauwe et al. 1980) genutzt, um bispezifische Antikörper mit CD3-Spezifität zu entwickeln. Die zweite Spezifität soll die Aktivität von CD3 Antikörpern auf Tumorzellen fokussieren, d.h. die aktivierende Aktivität des CD3 Antikörpers sollte von der Bindung des Zielantikörpers an Tumorzellen abhängig sein, um autoimmune Schädigungen des gesamten Organismus zu verhindern. Die erste Generation bispezifischer Antikörper bestand aus zwei monoklonalen Antikörpern, einer mit Spezifität gegen CD3 und einer mit Spezifität gegen ein TSA/TAA, welche als chemisch-produzierte Heterokonjugate vorlagen. Die so hergestellten Antikörper waren in der Lage, T-Zellen von Mäusen (Staerz et al. 1985) und auch des Menschen (Perez et al. 1985; Jung et al. 1986) zielzellgerichtet zu aktivieren und eine MHC-unabhängige Tumorzelllyse zu induzieren. Eine andere Möglichkeit zur Produktion bispezifischer Antikörper stellt die Fusion zweier Hybridomzelllinien dar, sog. Hybrid-Hybridome oder Quadrome. Diese Zellen produzieren weiterhin die ursprünglichen Antikörper, zusätzlich dazu jedoch auch hybride Antikörper durch zufällige Kombination von schweren und leichten Ketten (Suresh et al. 1986; Wang et al. 2019). Der erste in der EU zugelassene bispezifische Antikörper Catumaxomab (Handelsname Removab®), zur Behandlung des malignen Aszites bei EpCAM (*epithelial cell-adhesion molecule*) -positiven Karzinomen, stellt einen Vertreter der durch Quadromtechnologie hergestellten bispezifischen Antikörper dar (European Medicines Agency 2009). Dieser chimäre Antikörper besteht aus einer schweren und leichten Kette eines murinen IgG-Moleküls mit EpCAM-Spezifität, sowie einer schweren und leichten Kette aus einem Ratten-IgG-Moleküls mit CD3-Spezifität (Eskander and Tewari 2013). Die effiziente Immunaktivierung wird ermöglicht durch die Bindung des Antikörpers über den einen Arm an epitheliale Tumorzellen über EpCAM und die Bindung des anderen Armes an T-Zellen über

CD3, sowie die Aktivierung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren über den funktionellen Fc-Teil, weswegen der Antikörper als trifunktional bezeichnet wird (Ruf and Lindhofer 2001). Aus kommerziellen Gründen wurde die Zulassung für Catumaxomab allerdings im Jahr 2017 auf Antrag des Herstellers zurückgezogen (Europäische Kommission 2017).

Im Gegensatz zu den beiden bereits vorgestellten Konzepten der Quadrom-Technologie und der chemischen Heterokonjugation zweier Antikörper, verzichten die meisten neueren Formate von CD3-Antikörpern auf funktionelle Fc-Teile, um eine Aktivierung von T-Zellen *off-target*, also in Abwesenheit von Zielzellen, zu minimieren. Dies gelang unter anderem durch bispezifische F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente, die Zielzellrestriktion bei der Aktivierung von T-Zellen ermöglichen (Jung et al. 1991).

Etwas später ermöglichten molekularbiologische Fortschritte die Produktion bispezifischer Antikörperkonstrukte mittels rekombinanter DNA-Technologie, was zu einer Fülle an verschiedenen Formaten führte. So zählen etwa Spiess et al. in einem Review-Artikel über 60 alternative Formate für bispezifische Antikörper auf, welche sie in fünf Übergruppen einsortieren: (i) Bispezifische IgG-Antikörper, (ii) IgG mit einer zusätzlichen Antigen-bindenden Einheit, (iii) bispezifische Antikörper-Fragmente, (iv) bispezifische Fusionsproteine und (v) bispezifische Antikörper-Konjugate (Spiess et al. 2015).

Aktuell ist nur ein bispezifischer Antikörper zur Tumorummuntherapie in Europa zugelassen. Blinatumomab (Handelsname *Blinicyto*®) wird seit 2014 bei der Therapie der CD19<sup>+</sup> Akuten Lymphatischen Leukämie verwendet. Dieser Antikörper bindet die Antigene CD19 und CD3 und gehört zu den sogenannten BiTE®-Antikörpern (engl. *bispecific T-Cell engager*). BiTE®-Antikörper bestehen aus genetisch verbundenen scFvs (engl. *single-chain fragment variables*), also jeweils einer V<sub>L</sub>- und einer V<sub>H</sub>-Domäne, verbunden über einen Peptidlinker (Stieglmaier et al. 2015). Diese kleinen Antikörperfragmente haben eine geringe Halbwertszeit im Serum, welche durch den fehlenden Fc-Teil und die dadurch fehlende Bindung an den FcRn-Rezeptor zusätzlich verkürzt wird (Liu et al. 2017). Im Fall von Blinatumomab führt dies zu einer vierwöchigen Dauerinfusion

(Kantarjian et al. 2017), was wiederum eine hohe Belastung der Patienten zur Folge hat.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Optimierung der antitumoralen Therapie durch Kombination bispezifischer FLT3xCD3 Antikörper mit kostimulatorischen CD28-Antikörpern. Hierfür wurde wie folgt vorgegangen:

1. Generierung und Optimierung neuer bispezifischer kostimulatorischer Antikörper mit FLT3xCD28-Spezifität.
2. Verwendung dieser bispezifischen Kostimulatoren in Kombination mit einem bereits etablierten FLT3xCD3 Antikörper<sup>1</sup> und zwar dergestalt, dass die beiden Zielantikörper:
  - a. gegen ein identisches Epitop auf dem FLT3 Molekül oder
  - b. gegen ein verschiedenes Epitop auf dem FLT3 Molekül oder
  - c. Gegen unterschiedliche Antigene (FLT3 und Endoglin) gerichtet waren.
3. Die effektivste Kombination wurde u.a. in einem aufwändigen Testsystem untersucht, bei dem mononukleäre Zellen von AML-Patienten mit den Antikörpern behandelt wurden und anschließend die Aktivierung von T-Zellen und die Reduktion leukämischer Blasten durchflusszytometrisch bestimmt wurde.

---

<sup>1</sup> Die beiden bispezifischen Antikörper mit FLT3xCD3- und ENGxCD28-Spezifität wurden ursprünglich von Michael Durben, Martin Pflügler und Timo Manz in der Arbeitsgruppe Jung entwickelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Applied Biosystems 7500 <sup>®</sup> Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Äkta pure	GE Healthcare, München
Brutschrank Heraeus function line	Thermo Electron, Waltham, USA
Brutschrank APT.line <sup>®</sup> CB	Brutschrank APT.line <sup>®</sup> CB
Dispensor Multipette	Eppendorf, Hamburg
DryEasy Mini-Gel Drying System	Novex, San Diego, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1	GE Healthcare, München
Einkanalschreiber Rec101	GE Healthcare, München
Heizrührer MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach
MicroBeta Counter 1450 Plus	PerkinElmer, Rodgau
MicroBeta2 2450 Microplate Counter	PerkinElmer, Rodgau
NanoDrop <sup>™</sup> 1000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Peristaltikpumpe P-1	GE Healthcare, München
pH-Messgerät Seven Multi	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer Ultraspec 3000	GE Healthcare, München
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, CH
Schüttler Multitron	Infors, Bottmingen, CH
SMART SYSTEM	GE Healthcare, München
Sterilbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Chur, CH
Thermocycler PTC-100	BioRad, Waltham, USA

Trockenschrank Heraeus ET	Thermo Electron, Waltham, USA
UV-Tisch FLX-20M und TFX-20M	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer Vibro-Fix VF2	Ika Labortechnik, Staufen
Waagen (Fein- und Tischwaage)	Satorius, Göttingen
Wippe Rocky RT-1	Fröbel, Lindau
xCELLigence RTCA SP	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zell-Harvester ICH-110-96	Inotech, Dottikon, CH
Zentrifugen	
Heraeus Biofuge A und Biofuge fresco	Thermo Electron, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0 und 2.0R	Thermo Electron, Waltham, USA
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC 50 Plus	Thermo Electron, Waltham, USA

### 2.1.2 Glas- und Plastikwaren

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

Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Weinheim
Pasteurpipetten, Long size	WU, Mainz
PCR-Softtubes 0,5 ml	Biozym, Oldenburg
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen, gefiltert 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Oldendorf
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Röhrchen 15 ml	BD, Heidelberg
Präzisions-Küvetten Suprasil® halbmikro	Hellma, Basel, CH
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten 96-well flat/round bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 6-well flat bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenbecher 500 ml	Nalgene, Hereford, UK
Zentrifugenröhrchen SS34	Nalgene, Hereford, UK
Zentrikon Amicon Ultra 10 kDa und 30 kDa	Millipore, Schwalbach

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<sup>3</sup> [H]-methyl-Thymidin (1 mCi/ml)	Hartmann Analytic, Braunschweig
7-Aminoactinomycin (7-AAD Viability staining solution)	Biolegend, Fell
8-Azaguanin Hybri-Max™	Sigma, Steinheim
Agarose	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD, Heidelberg
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Lonza, Basel, CH
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethanol, vergällt (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol, zur Analyse (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr) 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse	BD, Heidelberg
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HiLoad <sup>®</sup> 16/600 Superdex <sup>®</sup> 200 pg	GE Healthcare, München
HiTrap – 1ml-Kappa-Select	GE Healthcare, München
HiTrap – 1ml-Protein A	GE Healthcare, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lymphocyte Separation Media LSM1077	Lonza, Basel, CH
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Phytohemagglutinin (PHA-L)	Sigma, Steinheim

Propidiumiodid (PI)	Sigma, Steinheim
Rekombinantes Protein A, Agarose-immobilisiert	GE Healthcare, München
Superdex <sup>®</sup> 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, München
Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer, Rodgau
Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma, Steinheim
Trizma Base (Tris-Base)	Sigma, Steinheim
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, Steinheim
Türk'sche Lösung	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim

#### 2.1.4 Puffer und Medien

##### Zellkulturlösungen und Reagenzien

Fötale Kälberserum (FCS)	Lonza, Basel, CH
IMDM	Lonza, Basel, CH
L-Glutamin (200 mM)	Lonza, Basel, CH
MEM-NEAA (100x)	PAA, Pasching, A
Natrium-Pyruvat (100mM)	Merck, Darmstadt
RPMI 1640	Lonza, Basel, CH
Alpha MEM Eagle	PAN Biotech, Aidenbach

##### Zellkulturmedien

Einfriermedium	90% FCS (hitzeinaktiviert) 10% DMSO
RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA

Alpha MEM Komplettmedium	1x 50 µM β-Mercaptoethanol Alpha MEM Eagle 12,5% FCS (hitzeinaktiviert) 12,5% Pferdeserum 1% Penicillin 1% Streptomycin 1% Glutamin 20 ng/ml rhu G-CSF 20 ng/ml rhu IL-3 20 ng/ml rhu Thrombopoietin 57,4 µM beta-Mercaptoethanol
Serumfreies RPMI	RPMI 1640 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Trypan-Blau	DPBS 0,1% Trypan-Blau

### **Puffer und Medien für die Molekularbiologie**

Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml)	Ampicillin in H <sub>2</sub> O (bidest.)
dNTP-Stocklösung	dATP, dCTP, dGTP, dTTP [je 10 mM] in H <sub>2</sub> O (bidest.)
DNA-Ladepuffer (6x)	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer Orange G (6x)	in H <sub>2</sub> O(bidest., pH 7,6) 0,6 ml Orange G (10x) 1,8 ml Glycerin 3,6 ml TAE-Puffer (1x)
EtBr-Stocklösung [10 mg/ml]	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (flüssig)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l
LB-Medium (Platten)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l 1 ml Ampicillin-Stocklösung
Orange G (10x)	200 mg Orange G in 5 ml H <sub>2</sub> O (bidest.)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 8,5
Tfbl	30 mM Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> COOK) 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (w/v) Glycerin mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt sterilfiltriert
TfblI	10 mM MOPS pH 7 75 mM CaCl <sub>2</sub>

10 mM KCl  
15 % (w/v) Glycerin sterilfiltriert

### **Puffer für SDS-Page**

10x Tris/Glycin/SDS Puffer	Bio-Rad, München
2x Laemmli Sample Puffer	Bio-Rad, München
Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	0,1% Brilliant Blue
	10% Essigsäure
	40% Methanol
	50% H <sub>2</sub> O

### **Chromatographische Verfahren**

0,1 M Glycin-Puffer pH 2,3	0,1 M Glycin in H <sub>2</sub> O (bidest.) mit HCl auf pH 2,3 justiert
0,1 M Phosphatpuffer pH 8	10% (v/v) 1 M Kaliumphosphat- Puffer in H <sub>2</sub> O (bidest.) mit NaOH auf pH 8 justiert

### **Durchflusszytometrie**

FACS-Puffer	1 % FCS (hitzeinaktiviert) 0,02 % NaN <sub>3</sub> in DPBS
FACS-Puffer II	1 % FCS (hitzeinaktiviert) 0,02 % NaN <sub>3</sub> 50 µg/ml humIgG (Flebogamma) in DPBS

### 2.1.5 Enzyme

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

### 2.1.6 Größenmarker für Gelelektrophorese

1kB Marker und 100 bp Marker	New England Biolabs, Frankfurt
1kB <sup>+</sup> Gene Ruler	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

### 2.1.7 Gebrauchsfertige Lösungen und Kits

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

### 2.1.8 Plasmide

Für die Expression der beiden FLT3xCD28 Antikörper in ExpiCHO-S Zellen wurden jeweils ein Vektor für die schwere und für die leichte Kette benötigt. Als Backbone wurde hier der intern etablierte pGH1.2 Vektor verwendet. Als Schnittstellen für die Insertion sowohl der leichten als auch der schweren Kette fungierten dabei BamHI und XbaI. Als Grundlage für die leichte Kette des CD28 Antikörpers diente hierbei der von Timo Manz erstellte Vektor TM\_B68\_pGH1.2\_huKro22-6\_hu9.3-8\_LC+L bei dem der variable Teil durch den variablen Teil der leichten Kette der FLT3 Antikörper über die Schnittstellen BamHI und PspOMI ausgetauscht wurden. Als Grundlage der schweren Kette diente ebenfalls der von Timo Manz etablierte Vektor TM B59 pGH1.2-HC-TTV-huK-ro22-2 FcKO. Hier wurde der variable Teil der schweren Kette mit den variablen Teilen der schweren Kette der FLT3 Antikörper über die Schnittstellen BamHI und PspOMI ausgetauscht.

### 2.1.9 Oligonukleotide

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

### 2.1.10 Bakterienstämme

E.coli DH5α	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
-------------	-----------------------------

### 2.1.11 Software

CellQuest Pro	BD, Heidelberg
FlowJo	TreeStar Inc., Ashland, USA
GATC Viewer	GATC Biotech, Konstanz
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
MS Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim
MS Powerpoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim
MS Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Sigma Plot 12.0	SPSS, München

**2.1.12 Antikörper**

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

**Tabelle 2.1.1: Unkonjugierte Antikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Format</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>
4G8xCD3 (CC-2)	FLT3 und CD3	IgGsc	Humanisiert	Dr. Martin Pflügler
MOPCxCD3	Unbekannt und humanes CD3	IgGsc/Fabsc	Humanisiert	Dr. Martin Pflügler
kro22xCD28	Endoglin und CD28	IgGsc	Humanisiert	Dr. Martin Pflügler
BV10xCD28	Humanes FLT3 und humanes CD28	IgGsc	chimärer Maus/Mensch Antikörper	selbst hergestellt
4G8xCD28	FLT3 und humanes CD28	IgGsc	Humanisiert	selbst hergestellt
BV10xCD3	Murines BV10, humanes CD3	IgGsc	chimärer Maus/Mensch Antikörper	Dr. Martin Pflügler

**Tabelle 2.1.2: Konjugierte Antikörper**

<b>Spezifität</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Bezugsquelle</b>
-------------------	-----------------	-------------	---------------	---------------------

huCD4	PacificBlue	OKT4	Maus Igγ2b, κ	Biolegend, Fell
huCD4	FITC	HP2/6	Maus Igγ2a, κ	Biolegend, Fell
huCD8	FITC	OKT8	Maus Igγ2a, κ	Abteilung für Immunologie
huCD8a	APC	HIT8a	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD8a	APC/Cy7	HIT8a	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD10	PE/Cy7	HI10a	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD13	FITC	WM15	Maus Igγ1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
huCD14	APC/Cy7	HCD14	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD14	PE/Cy7	HCD14	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD15	PE/Cy7	HI98	Maus Igμ, κ	Biolegend, Fell
huCD19	PE/Cy7	SJ25C1	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD25	PE	BC96	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD33	APC	WM53	Maus Igγ1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
huCD34	APC/Cy7	581	Maus Igγ2a, κ	Biolegend, Fell
huCD45	PacificBlue	HI30	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD45	AmCyan	2D1	Maus Igγ1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
huCD45	APC/Cy7	2D1	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD45RA	PE/Cy5	HI100	Maus Igγ2b, κ	Biolegend, Fell
huCD45RA	APC	HI100	Maus Igγ2b, κ	Biolegend, Fell
huCD45RO	PE/Cy7	UCHL1	Maus Igγ2a, κ	Biolegend, Fell
huCD45RO	APC/Cy7	UCHL1	Maus Igγ2a, κ	Biolegend, Fell
huCD62L	PacificBlue	DREG-56	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD62L	FITC	DREG-56	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell

huCD69	APC/Cy7	FN50	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD69	PE	FN50	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD117	PE/Cy7	104D2	Maus Igγ1, κ	Biolegend, Fell
huCD135	PE	4G8	Maus, BALB/c Igγ1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
huCD326	PE	9C4	Maus Igγ2b, κ	Biolegend, Fell
huHLA-DR	FITC	L243	Maus Igγ2a, κ	Biolegend, Fell
hulgG, Fcγ spez.	R-PE		Ziege F8ab')2 Fragment	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

### 2.1.13 Zelllinien

Nalm-16	Humane B-Vorläuferzell- Leukämie	DSMZ, Braunschweig
LN-18	Humane Glioblastomzellen	ATCC, Manassas, USA
MV4-11	Humane akute monozytische Leukämie	ATCC, Manassas, USA
MS-5	Murine Stromazellen	DSMZ, Braunschweig
ExpiCHO-S cells	Subklon aus Ovarialzellen eines chinesischen Hamsters	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

### 2.1.14 Primäre humane Zelllinien

Blutproben gesunder Spender wurden mit deren Einverständnis bearbeitet. Blutproben von AML-Patienten wurden von Prof. H. Salih (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

Alle verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### **2.2.1 Passagieren und Ernten von Zellen**

Es wurden sowohl Suspensionszellen, semi-adhärenente Zellen, sowie adhärenente Zellen für diese Arbeit verwendet. Die Suspensionszellen und semi-adhärenenten Zellen konnten durch seitliches Anklopfen der Zellkulturflasche vom Boden der Flasche gelöst werden. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, je nach Zelldichte ein Teil des Zellvolumens verworfen und der Rest mit frischem Medium aufgefüllt. Bei adhärenenten Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellkulturflasche zwei Mal mit PBS-Puffer vorsichtig gespült, Accutase®-Lösung auf die Zellverbände gegeben, im Brutschrank für 5-10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche die noch anheftenden Zellen vom Flaschenboden gelöst, in Medium aufgenommen und je nach Zelldichte wie Suspensionszellen verdünnt.

### **2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Lebendzellzahl wurde bestimmt, indem die Zellen abhängig von der Zelldichte im Verhältnis 1:2 oder 1:10 mit Trypanblaulösung versetzt und anschließend mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurden. Hierbei konnten tote Zellen anhand der blauen Färbung identifiziert werden, da der Farbstoff bei nicht intakter Zellmembran ins Zytoplasma gelangen kann. Durch das Auszählen von vier Großquadraten konnte die Lebendzellzahl pro Milliliter berechnet werden, indem das arithmetische Mittel der vier Großquadrate mit dem Verdünnungsfaktor, dem Kammerfaktor und dem Suspensionsvolumen multipliziert wurde.

### **2.2.3 Kryokonservierung von Zellen**

Um Zellen kurzzeitig (-80°C) oder für einen längeren Zeitraum (in Flüssigstickstoff bei -196°C) lagern zu können, wurden diese, wie oben beschrieben geerntet, abzentrifugiert und in Einfriermedium (1ml, 4°C)

aufgenommen. Das Kryoröhrchen mit den Zellen wurde anschließend im Isopropanolkühler in den Ultratiefkühlschrank (-80°C) überführt, wodurch ein schonendes Einfrieren bei gleichmäßiger Abkühlung (1°C/min) sichergestellt wurde. Am nächsten Tag konnten die Zellen mithilfe von Trockeneis in flüssigen Stickstoff überführt werden, um diese länger lagern zu können. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Eiskern im Medium schwamm, woraufhin die Zellen in 30-40ml Medium (37°C) überführt und bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert wurde. Abschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### **2.2.4 Isolation von PBMCs**

Um humane PBMCs (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) zu gewinnen, wurde heparinisieretes Vollblut gesunder Spender aus der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Tübingen verwendet.

Zur Isolation dieser Zellen wurden 25ml heparinisieretes Vollblut mit 25ml DPBS verdünnt. Anschließend wurden jeweils 25ml des verdünnten Vollblutes auf 14ml einer vorgelegten Ficoll-Lösung gegeben. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 600 x g für 30 Minuten ohne Bremse. Nach dieser Dichtegradientenzentrifugation befanden sich die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Lösung. Diese Interphase wurde mithilfe einer 10ml Stabpipette abgenommen und im Anschluss zwei Mal mit 50ml DPBS durch Zentrifugation bei 300 x g gewaschen, um Ficoll-Reste, sowie eventuell verbliebene Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen. Nach Überführung in das Vollkulturmedium RPMI wurde ein Teil der Zellen 1:10 mit Türkscher Lösung verdünnt und wie bereits beschrieben in der Neubauerzählkammer ausgezählt.

#### **2.2.5 Magnetische Zellseparation mittels MACS®-Technologie**

Zur Aufreinigung humaner T-Zellen wurden frische PBMCs mit dem MACS-Kit „Pan T cell Isolation Kit, human“ bearbeitet. Hierbei wurden die nicht benötigten Zellen der PBMCs mit Antikörpern gegen CD14, CD15, CD16, CD19, CD34,

CD36, CD56, CD123 und CD235a (Glykophorin A) magnetisch markiert und dann mithilfe einer magnetisierten Säule von den unmarkierten T-Zellen negativ selektioniert. Zuletzt wurden die Zellen in das RPMI-Vollkulturmedium überführt und mittels Trypanblaufärbung, wie oben beschrieben, gezählt.

### **2.2.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

Bei der transienten Transfektion verbleibt die DNA im Zytoplasma und wird nicht in den Zellkern eingeschleust. Für diese Arbeit wurde die ExpiCHO™ CHO-Zelllinie (engl. *Chinese Hamster Ovary*) verwendet. Die Kultivierung wie auch die Transfektion der CHO-Zellen erfolgte nach Herstellerprotokoll mit dem ExpiCHO™ Expression System Kit.

### **2.2.7 Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen**

Die Antikörperaufreinigung wurde durch Affinitätschromatografie an Protein A mit dem ÄKTA pure (GE Healthcare) System durchgeführt. Zellkulturüberstände der transfizierten CHO-Zellen wurden auf eine Säule (MabSelect Sure) aufgetragen und bei einer Flussrate von 1mL/min aufgereinigt. Anschließend wurde mit dem zehnfachen Säulenvolumen DPBS gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Gebundenes Protein wurde mittels 0.1 M Glycin bei pH 2,5 eluiert. Die weitere Aufreinigung des Eluats erfolgte durch Größenausschlusschromatographie auf einer HiLoad 16/600 Säule. Die entstandenen Fraktionen, welche Antikörper enthielten, wurden gemischt und steril filtriert bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen**

Unter Verwendung eines NanoDrop™ 1000-Spektrophotometers (Extinktionskoeffizient IgG) kann die Konzentration einer Antikörperlösung bestimmt werden. Hierbei wird die optische Dichte eines Antikörpers bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Daraus lässt sich die Proteinkonzentration berechnen. Dabei wurde die Probe dreimal gemessen und aus den Ergebnissen der Mittelwert errechnet.

### **2.2.9 Inaktivierung von Tumorzellen**

Um mithilfe eines Proliferationsassays die Auswirkungen eines Antikörpers auf die Proliferation von T-Zellen erfassen zu können, muss die Proliferation der Tumorzellen inhibiert werden. Dies erfolgte durch Bestrahlung der Tumorzellen mithilfe einer <sup>137</sup>Cäsium-Strahlenquelle mit einer Dosis von 120 Gy. Auf dieselbe Art und Weise wurden die MS5-Zellen bestrahlt, um eine Proliferation in den Assays zu verhindern.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Verdau von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen**

Die DNA wurde je nach verwendetem Restriktionsenzym für eine Stunde bei einer vom Hersteller empfohlenen, geeigneten Temperatur verdaut (Birnboim and Doly 1979).

### **2.3.2 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1% Agarosegel in 1x TAE-Puffer mit 1µg/ml Ethidiumbromid. Zuvor wurde die DNA-Lösung mit einem 6-fach Ladepuffer (Gel Loading Dye, Purple, New England Biolabs) versetzt. Zur Größenunterscheidung wurde eine 1kB DNA-Leiter verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100V über 40 Minuten.

### **2.3.3 DNA-Präparation aus Agarosegel**

Unter UV-Licht konnte die DNA mithilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden und unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert werden. Die DNA-Menge wurde mit Hilfe des Nanodrop1000 spektrophotometrisch bestimmt. Im Anschluss konnte die DNA weiterverwendet oder im Tiefkühler bei -20°C für längere Zeit aufbewahrt werden.

### **2.3.4 Ligation komplementärer DNA-Fragmente**

Die Ligation wurde zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren verwendet. Hierfür wurden Insert und Vektor mit Restriktionsenzymen so

geschnitten, sodass gleiche Enden, entweder überhängend (engl. *sticky ends*) oder glatt (engl. *blunt ends*), entstanden. Diese wurden anschließend in folgendem Ansatz angesetzt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

50 ng	Vektor
1:5	Vektor:Insert-Ratio
2 µl	10x T4 DNA Ligasepuffer
1 µl	T4 NDA Ligase (5U/µl)
auf 20 µl Volumen aufgefüllt	H <sub>2</sub> O (bidest.)

### 2.3.5 Transformation kompetenter E.coli Bakterien

Die kompetenten E.coli Bakterien (Stamm DH5α) wurden aus dem -80°C-Tiefkühler auf Eis aufgetaut. Im Folgenden wurden die aufgetauten Bakterien mit 10µl des Ligationsansatzes versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 Minute. Nach der Zugabe von 1ml LB-Medium (Raumtemperatur) wurden die Bakterien bei 37°C im Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurden verschiedene Verdünnungen des Transformationsansatzes auf LB-Amp-Platten aufgetragen und mithilfe von Glasperlen über die Platten verteilt, um Einzelklone der Bakterien zu erhalten. Die LB-Amp-Platten wurden über Nacht für etwa 16h bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation konnten die Bakterien aufgrund der Ampicillinresistenz, welche durch die Aufnahme des Plasmids erfolgen sollte, auf den ampicillinversetzten LB-Platten wachsen.

### 2.3.6 Anlegen von Bakterienkulturen

Mithilfe einer sterilen Impföse konnten identifizierbare Einzelklone von der LB-Platte gepickt und auf eine neue, sog. Masterplatte überführt werden, welche wiederum über Nacht für etwa 16h bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert wurde. Des Weiteren wurde für die Mini-Plasmid-Präparation die Impföse im Anschluss in 5ml LB-Amp-Medium überführt, mehrfach gedreht und anschließend verworfen. Das angeimpfte Medium wurde anschließend für 16h bei 37°C und 180 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Da für die Maxi-

Plasmid-Präparation eine größere Menge an Bakterien benötigt wird, wurde dafür entsprechend der oben beschriebenen Anleitung vorgegangen, jedoch wurden hierfür 300ml LB-Amp-Medium angeimpft.

### **2.3.7 Aufreinigung von Plasmiden**

Um Plasmid-DNA aufzureinigen, wurden die kommerziellen Kits der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Für geringere Mengen an Plasmid-DNA wurde das QIAprep® Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit (Qiagen, Hilden), für größere Mengen entsprechend das QIAGEN® Plasmid-DNA Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

### **2.3.8 Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzanalyse wurde von der Firma Microsynth (Balgach, CH) basierend auf der von Sanger et. al. beschriebenen Kettenabbruchmethode durchgeführt. Allerdings wurden die radioaktiv markierten Didesoxynukleotide durch fluoreszenzmarkierte ausgetauscht. Für die Analyse wurde ein Ansatz aus 1µg DNA und jeweils 3µl Primer (forward, reverse oder beide) mit H<sub>2</sub>O (bidest.) auf ein Gesamtvolumen von 15µl aufgefüllt und auf postalischem Wege versandt.

## **2.4 Analytische Methoden**

### **2.4.1 SDS-Gelelektrophorese**

Zur Bestimmung der Reinheit und des Molekulargewichts aufgereinigter Antikörper wurden diese mittels SDS PAGE (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgelelektrophorese) untersucht. Hierbei können die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine in reduzierter und nicht-reduzierter Form betrachtet. Die Reduktion erfolgt unter Einwirkung von β-Mercaptoethanol, welches zur Auftrennung in leichte und schwere Ketten des Antikörpers durch Reduktion der Disulfidbrücken führt. Die Proteine werden nach Zugabe eines 2-fach Ladepuffers bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend in 10% Mini-PROTEAN® TGX-Gelen unter Verwendung einer Mini-PROTEAN® TetraCell bei 120V für ca. anderthalb

Stunden aufgetrennt. Die Proteinbanden konnten im Anschluss mithilfe einer Comassie Brilliant Blue Färbung visualisiert werden.

#### **2.4.2 Analytische Gelfiltration**

Die aufgereinigte Antikörperlösung wurde mithilfe der analytischen Gelfiltration untersucht. Dabei lässt sich das Molekulargewicht des Antikörpers ermitteln. Außerdem können etwaige Aggregationen und Fragmente detektiert werden. Hierfür wurde das UHPLC-System Dionex Ulti-Mate 3000 BioRS mit der Säule Superdex 200 Increase 10/300 GL benutzt. Es wurden ca. 10µg Antikörper in höchstens 50µl DPBS aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde durchflussphotometrisch bei einer Wellenlänge von 220 nm ermittelt. Um die Größe zu ermitteln, wurden Eichproteine definierter Größe (Standard Bio-Rad) verwendet.

#### **2.4.3 <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Proliferationstest**

Die T-Zell-Proliferation konnte mithilfe des <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Proliferationstests gemessen werden. Dieser beruht darauf, dass proliferierende Zellen tritiiertes Thymidin aufnehmen, was die Quantifizierung der Proliferation ermöglicht. Hierfür werden in einer 96-well-Flachbodenplatte in Triplikaten Effektorzellen und Zielzellen im Verhältnis 1:1 mit entsprechenden Antikörperkonzentrationen ausplattiert. Nach Inkubation für 48 Stunden bei 37°C im Begasungsbrutschrank wurden diese mit jeweils 0,5 µCi <sup>3</sup>[H]-Thymidin versetzt und für weitere 12-16 Stunden wie bereits beschrieben inkubiert. Anschließend wurde die Flachbodenplatte mithilfe des Inotech ICH-110-96 Zell Harvesters auf eine *Printed Filtermat A* Matte geerntet, daraufhin für 1 Stunde bei 60°C getrocknet, mit dem Szintillationscocktail Ultima Gold versetzt und schlussendlich quantitativ ausgewertet.

### **2.5 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das es ermöglicht, die Zusammensetzung einer Zellsuspension zu ermitteln. Hierfür werden die Zellen

mit fluoreszierenden Antikörpern direkt oder indirekt markiert und anschließend mithilfe eines Durchflusszytometers detektiert werden. Hierfür werden  $0,1-0,5 \times 10^6$  Zellen pro well in einer 96-well-Rundbodenplatte ausgesät, bei 600 x g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend werden die Zellen mit 50µl/well der nach Herstellerangaben verdünnten Antikörperlösung versetzt und bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Werden unkonjugierte Antikörper verwendet werden erst diese verdünnt auf die Zellen gegeben, wie beschrieben inkubiert, mit je 200µl FACS-Puffer gewaschen und anschließend nochmals für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper markiert. Hiernach wird nicht gebundener Sekundärantikörper durch erneutes dreimaliges Waschen ebenfalls entfernt. Um unspezifische Interaktion am Fc-Rezeptor zu minimieren, wurde eine Absättigung der Fc-Rezeptoren durch humanes Ig $\gamma$  (FleboGamma), in einer Konzentration von 50µg/ml, hinzugegeben. Zur Unterscheidung toter und lebendiger Zellen wurden die Proben vor dem Messvorgang in FACS-Puffer mit Zugabe von 7AAD in einer Konzentration von 0,5µg/ml aufgenommen. Um eine Vergleichbarkeit der Zellzahlen herzustellen, wurden außerdem BD™ CompBead negative Beads hinzugegeben. Durch Messung der gleichen Anzahl an Beads pro well, konnte die gleich hohe aufgenommene Flüssigkeitsmenge für alle Proben gewährleistet werden. Als Kontrolle unspezifischer Bindung wurden sogenannte FMOs (engl. *Fluorescence Minus One*) gefärbt. Bei diesen handelt es sich um Proben, bei denen jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff der Gesamtfärbung fehlt. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie in zwei verschiedenen Ansätzen verwendet. Zum einen zur Bestimmung der Bindungsaffinität und zum anderen zur Bestimmung der antikörpervermittelten Lyse, Proliferation und Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.

### **2.5.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindungsaffinität**

Um die Bindungsaffinität eines Antikörpers zu ermitteln, wurde dieser in verschiedenen Konzentrationen mit  $0,1-0,2 \times 10^6$  zielantigen-positiven Zellen auf einer 96-well-Rundbodenplatte für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200µl FACS-Puffer wurde jede Probe mit jeweils 50µl in

FACS-Puffer verdünntem Ziege  $F(ab')_2$ -Fragment anti-human IgG Phycoerythrin-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die ungebundenen Reste desselben wurden durch erneutes dreimaliges Waschen entfernt. Daraufhin wurden die Zellen in jeweils 200µl FACS-Puffer aufgenommen und mithilfe des FACSCalibur Durchflusszytometers gemessen.

## **2.5.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der antikörpervermittelten Lyse, Proliferation und Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen**

### **Allogenes System**

Zur Messung der antikörpervermittelten T Zellaktivierung und Tumorzelllyse im allogenen System wurden auf 96-well-Flachbodenplatten jeweils  $0,1 \times 10^6$  Zielzellen mit  $0,1 \times 10^6$  Effektorzellen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen in Duplikaten inkubiert. Als Kontrollen wurden unstimulierte Proben, sowie FMOs, mitgeführt. Die unstimulierten Proben enthielten jeweils die genannte Anzahl an Ziel- und Effektorzellen ohne Zugabe von Antikörpern. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 72 Stunden im Begasungsbrutschrank. Nachfolgend wurden die Proben wie beschrieben mit verschiedenen direkt-markierten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD10, CD45, CD69 gefärbt und mithilfe des FACS Canto II gemessen und mit der Software FlowJo ausgewertet.

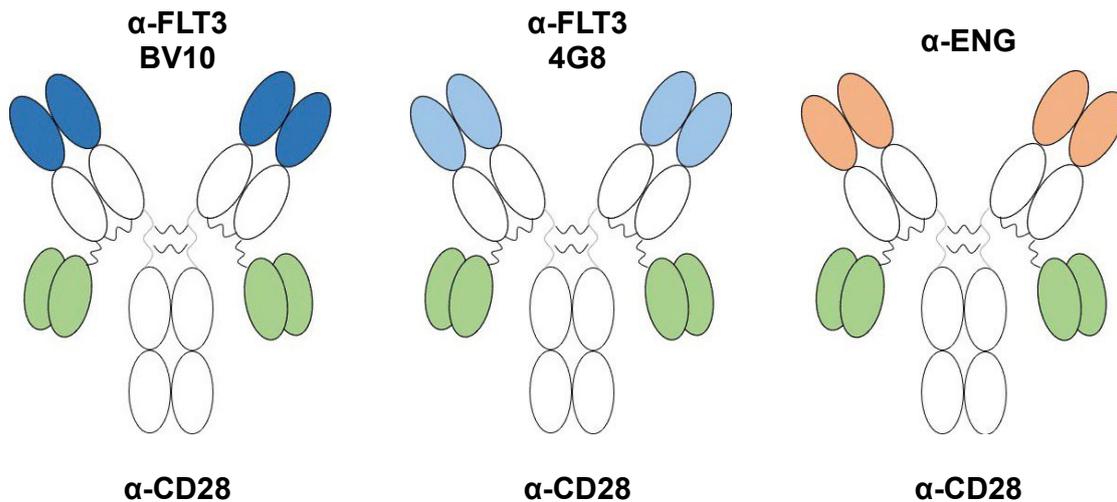
### **Autologes System**

Im Vergleich zum allogenen System lagen im autologen System in den Zellproben der AML-Patienten bereits Ziel- und Effektorzellen in einem physiologischen Verhältnis vor. Dies konnte je nach Spender variieren. Von den Zellen aus dem Blut von AML-Patienten wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro well einer 96-well-Flachbodenplatte auf einen Monolayer aus  $0,05 \times 10^6$  bestrahlten MS-5 Feeder-Zellen ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen von Antikörpern inkubiert. Die Inkubation erfolgte für acht Tage bei 37°C im

Begasungsbrutschrank, wobei nach vier Tagen Medium und Antikörper ausgewechselt wurden. Der Mediumwechsel erfolgte durch Überführung des Überstandes in eine 96-well-V-Boden-Platte. Diese wurde bei 600 x g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet jeweils in frischem Medium und Antikörper aufgenommen und auf die Flachbodenplatte zurücküberführt. Anschließend wurden die Proben wie bereits beschrieben gefärbt. Als Antikörper wurden CD4, CD8, CD45 und CD69 für die Identifikation der T-Zell-Proliferation und -aktivierung gewählt. Zur Identifikation der Blasten wurde je nach Spender noch CD33, CD34 und/oder CD117 mitgefärbt. Die Messung und Auswertung erfolgten wie bereits beschrieben.

### 3 Ergebnisse

Um die antitumorale Therapie bispezifischer Antikörper zu verbessern, wurden für diese Arbeit verschiedene bispezifische CD28-Antikörper produziert und charakterisiert. Anschließend wurden die CD28-Antikörper jeweils in Kombination mit einem bispezifischen FLT3xCD3 Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur T-Zellaktivierung und Zielzellyse untersucht.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der für diese Arbeit verwendeten kostimulatorischen Antikörper**

Links ist der BV10xCD28 Antikörper dargestellt, welcher mittels BV10 gegen das Antigen FLT3 gerichtet ist. In der Mitte ist der 4G8xCD28 Antikörper zu sehen, welcher über 4G8 gegen ein anderes, nicht kreuzreaktives Epitop des Antigens FLT3 gerichtet ist. Rechts wird der ENGxCD28 Antikörper gezeigt. Die variablen Domänen dieser Zielantikörper sind gegen das Zielantigen (FLT3 oder Endoglin) gerichtet. Das single-chain Fragment (scFv) bindet als Effektorantikörper an CD28 (grün) und dient zur kostimulatorischen Aktivierung von T-Zellen.

#### 3.1 Produktion und Charakterisierung bispezifischer CD28-Antikörper

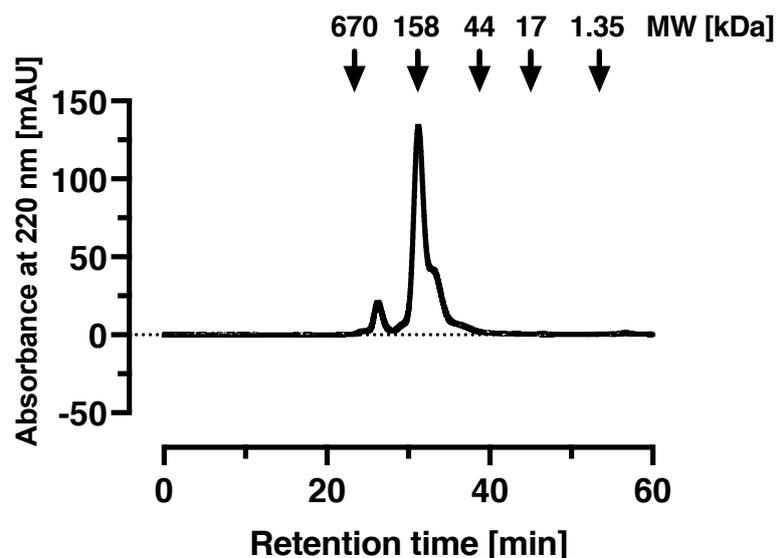
Für diese Arbeit wurden zwei neue bispezifische kostimulatorische Antikörper mit FLT3xCD28-Spezifikation produziert. Diese unterscheiden sich in Hinblick auf die FLT3-Epitope, die sie erkennen: Für den FLT3-Teil wurden die beiden bereits existierenden Antikörper 4G8 und BV10 verwendet. Um die Qualität der produzierten Konstrukte zu überprüfen, wurden diese proteinbiochemisch analysiert und anschließend funktionell auf ihre Bindungsfähigkeit überprüft.

### 3.1.1 Klonierung und Generierung des bispezifischen BV10xCD28 Antikörpers

Die Produktion des bispezifischen BV10xCD28 Antikörpers erfolgte in CHO-Zellen mittels transienter Transfektion der bereits existierenden Plasmide für die schwere und leichte Kette des Antikörpers.

#### Proteinbiochemische Analyse

Der aufgereinigte Antikörper wurde mittels analytischer Gelfiltration hinsichtlich Homogenität und Molekulargewicht auf mögliche Aggregation und Fragmentierung untersucht. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 3.1.1 dargestellt. Es zeigt sich ein klarer Hauptpeak. Einige wenige Aggregate und Zerfallsprodukte sind zu erkennen.

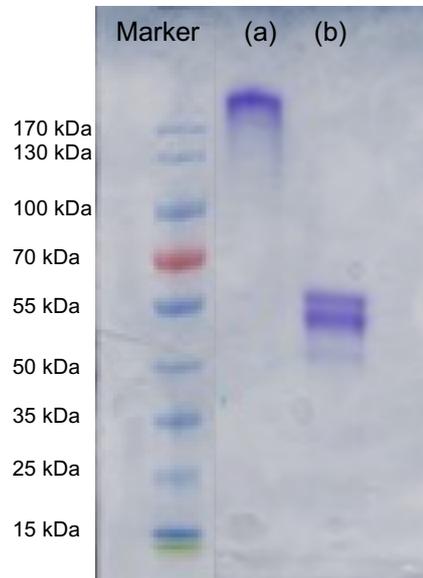


**Abbildung 3.1.1 Analytische Größenausschlusschromatographie des BV10xCD28 Antikörpers**

Elutionsprofil des gereinigten bispezifischen kostimulatorischen BV10xCD28 Antikörpers. Zur Analyse wurden 15µg des Proteins im UHPLC-System Dionex Ulti-Mate 3000 BioRS auf eine Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule aufgetragen.

Mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese konnte das Molekulargewicht des Antikörpers bestätigt werden, wie Abbildung 3.1.2 zeigt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist ein Molekulargewicht von ca. 200 kDa zu erkennen, was ungefähr dem errechneten Molekulargewicht entspricht.

Unter reduzierenden Bedingungen sind zwei Banden auszumachen, die die leichte und schwere Kette darstellen, für die ein Molekulargewicht von jeweils ca. 50 kDa errechnet wurde.

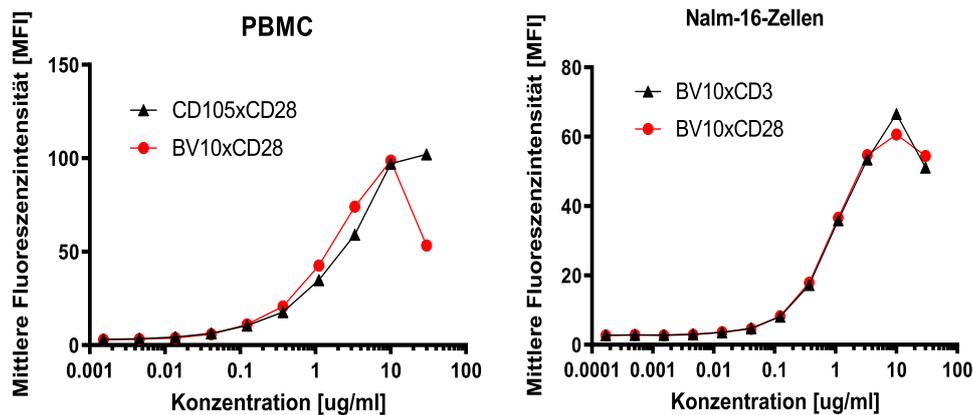


**Abbildung 3.1.2 SDS-Gelelektrophorese des BV10xCD28 Antikörpers**

Die Abbildung zeigt das Profil der gelelektrischen Auftrennung des BV10xCD28 Antikörpers unter nicht-reduzierenden (a) und reduzierenden (b) Bedingungen.

### Bindungsanalyse

Die Analyse der Bindung des bispezifischen Antikörpers BV10xCD28 an Zielzellen und Effektorzellen erfolgte durchflusszytometrisch. Für die Analyse der Bindung an das Zielantigen FLT3 wurden FLT3-positive Nalm-16-Zellen verwendet. Der EC<sub>50</sub>-Wert, welcher die Konzentration (engl. *effective concentration*) angibt, bei der 50% der Maximalaktivität erreicht werden, liegt für den FLT3 Antikörper bei 4,05 nM. Die Bindungsanalyse an Effektorzellen erfolgte mittels CD28-positiver PBMCs. Der EC<sub>50</sub> liegt für diese Bindung bei 4,07 nM.

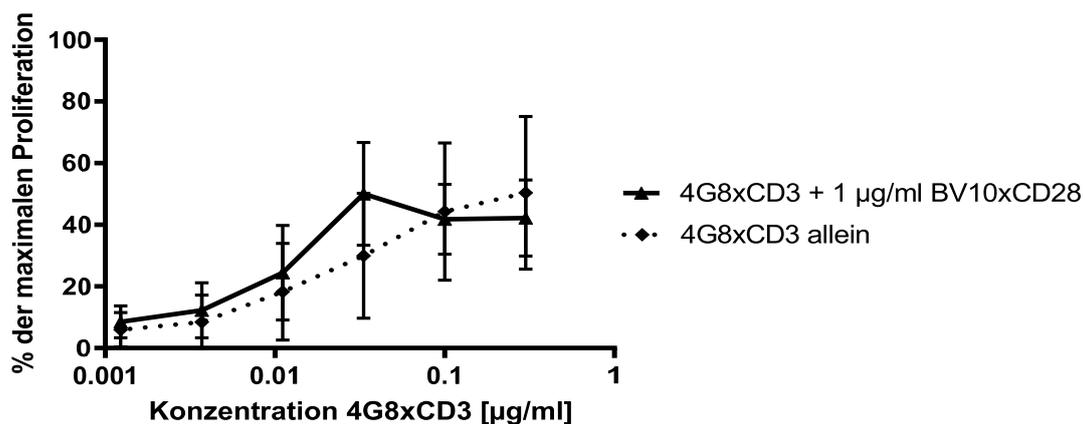


**Abbildung 3.1.3: Bindungsanalyse des BV10xCD28 Antikörpers**

Detektion der gebundenen BV10xCD28 Antikörper auf Nalm-16-Zellen (rechts) und humanen PBMCs (links). Die Markierung der Antikörper auf der Zelloberfläche erfolgte mit einem PE-konjugierten Ziege-anti-human Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie.

### Induktion der T-Zell-Proliferation

Um die durch den Antikörper induzierte T-Zell-Proliferation des kostimulierenden bsAb in Kombination mit dem 4G8xCD3 bsAb zu messen, wurde ein <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay verwendet. Dafür wurden Nalm-16-Zellen bestrahlt, um deren Proliferation zu unterbinden. Daraufhin wurden die Zielzellen im Verhältnis 1:1 mit PBMCs und Zugabe entsprechender Antikörper inkubiert. Anschließend wurde, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, vorgegangen. Abbildung 3.1.4 zeigt die gemittelte T-Zell-Proliferation von vier verschiedenen PBMC-Spendern im Verhältnis zur maximalen Proliferation an T-Zellen, welche durch PHA ausgelöst wurde.



**Abbildung 3.1.4: T-Zell-Proliferation**

Nalm-16-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit PBMCs gesunder Spender und dem Antikörper 4G8xCD3 allein (gestrichelte Linie) oder in Kombination mit dem Antikörper BV10xCD28 (durchgängige Linie) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung vierer Spender, die jeweils in Triplikaten angesetzt wurden. Diese wurden zur durch PHA ausgelösten maximalen Proliferation ins Verhältnis gesetzt.

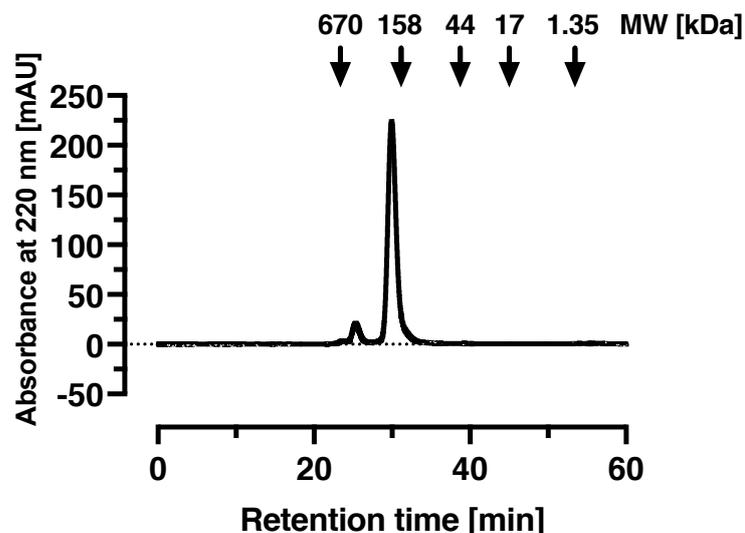
Die durch den zusätzlich zugegebenen BV10xCD28 Antikörper vermittelte Proliferation unterscheidet sich hierbei kaum von der allein durch den 4G8xCD3 Antikörper ausgelösten T-Zell-Proliferation.

### 3.1.2 Klonierung und Generierung des bispezifischen 4G8xCD28 Antikörpers

Die Produktion des bispezifischen 4G8xCD28 Antikörpers erfolgte in CHO-Zellen mittels transienter Transfektion mit Hilfe der bereits existierenden Plasmide für die schwere und leichte Kette des Antikörpers.

#### Proteinbiochemische Analyse

Um die Homogenität und das Molekulargewicht des aufgereinigten Antikörpers zu bestimmen, wurde dieser mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 3.1.5 dargestellt. Es zeigt sich ein klarer Hauptpeak. Aggregate waren in Spuren vorhanden.

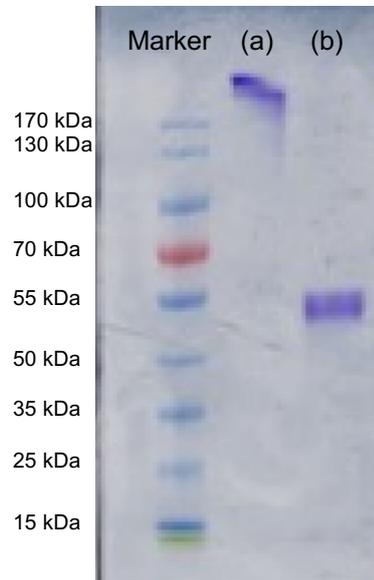


**Abbildung 3.1.5: Analytische Größenausschlusschromatografie des 4G8xCD28 Antikörpers**

Elutionsprofil des gereinigten bispezifischen kostimulatorischen 4G8xCD28 Antikörpers. Zur Analyse wurden 15µg des Proteins aufgetragen.

Um das Molekulargewicht des Antikörpers zu bestätigen, wurde die SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist ein Molekulargewicht von ca. 200 kDa zu erkennen, was dem ungefähr errechneten Molekulargewicht entspricht. Unter reduzierenden Bedingungen sind zwei

Banden auszumachen, die die leichte und schwere Kette darstellen, die bei etwa 50kDa liegen.

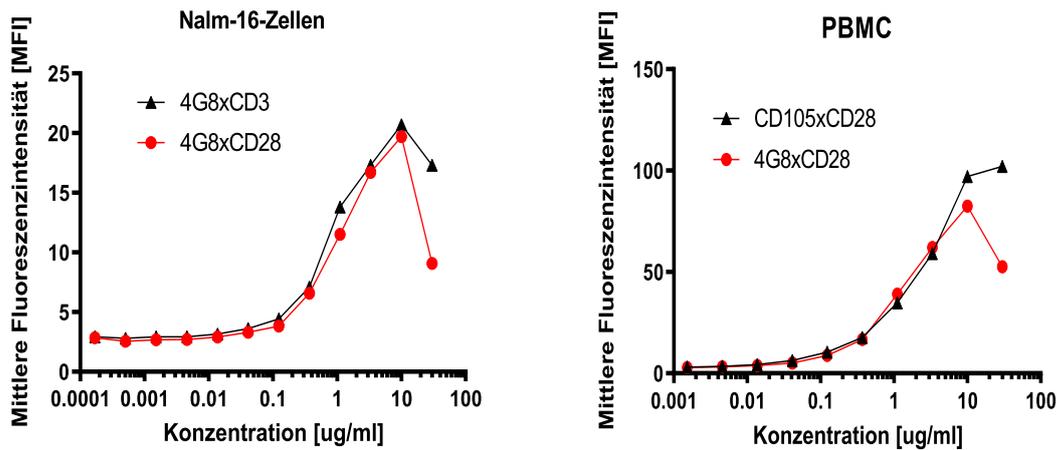


**Abbildung 3.1.6: SDS-Gelelektrophorese des 4G8xCD28 Antikörpers**

Die Abbildung zeigt das Profil der gelelektrischen Auftrennung des 4G8xCD28 Antikörpers unter nicht-reduzierenden (a) und reduzierenden (b) Bedingungen.

### Bindungsanalyse

Mittels Durchflusszytometrie konnte die Bindung des produzierten 4G8xCD28 Antikörpers hinsichtlich der Bindung an Ziel- und Effektorzellen analysiert werden. Die FLT3-Bindung wurde auf der FLT3-positiven Nalm-16-Zelllinie bestimmt. Hier zeigte sich im Vergleich mit dem etablierten 4G8xCD3 Antikörper eine ähnliche Bindungskurve, bei der der EC50 bei 2,65 nM liegt. Die Bindungsanalyse hinsichtlich CD28 erfolgte auf PBMCs gesunder Spender. Der EC50 beträgt hierbei 4,45 nM.

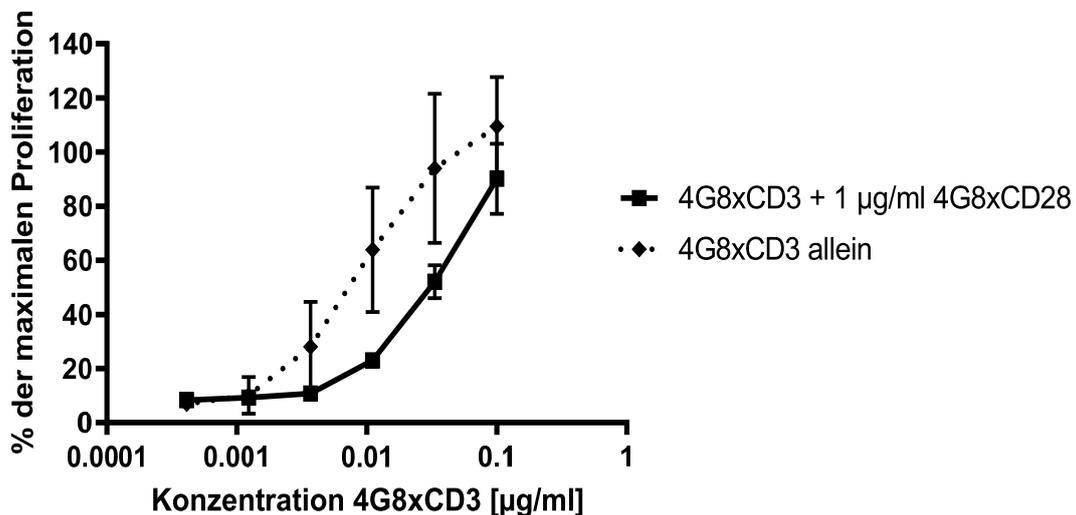


**Abbildung 3.1.7: Bindungsanalyse des 4G8xCD28 Antikörpers**

Detektion der gebundenen 4G8xCD28 Antikörper auf Nalm-16-Zellen (links) und humanen PBMCs (rechts). Die Markierung der Antikörper auf der Zelloberfläche erfolgte mit einem PE-konjugierten Ziege-anti-human Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie.

### Induktion der T-Zell-Proliferation

Die Messung der induzierten T-Zell-Proliferation erfolgte mittels <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay wie bereits beschrieben. In Abbildung 3.1.8 ist die gemittelte prozentuale T-Zell-Proliferation von vier verschiedenen PBMC-Spendern im Verhältnis zur maximalen Proliferation an T-Zellen dargestellt. Die maximale Proliferation wurde mittels PHA induziert.



**Abbildung 3.1.8: T-Zell-Proliferation**

Nalm-16-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit PBMCs gesunder Spender und dem Antikörper 4G8xCD3 allein (gestrichelte Linie) oder in Kombination mit dem Antikörper 4G8xCD28 (durchgezogene Linie) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung vierer Spender, die jeweils in Triplikaten angesetzt wurden. Diese wurden zur durch PHA ausgelösten maximalen Proliferation ins Verhältnis gesetzt.

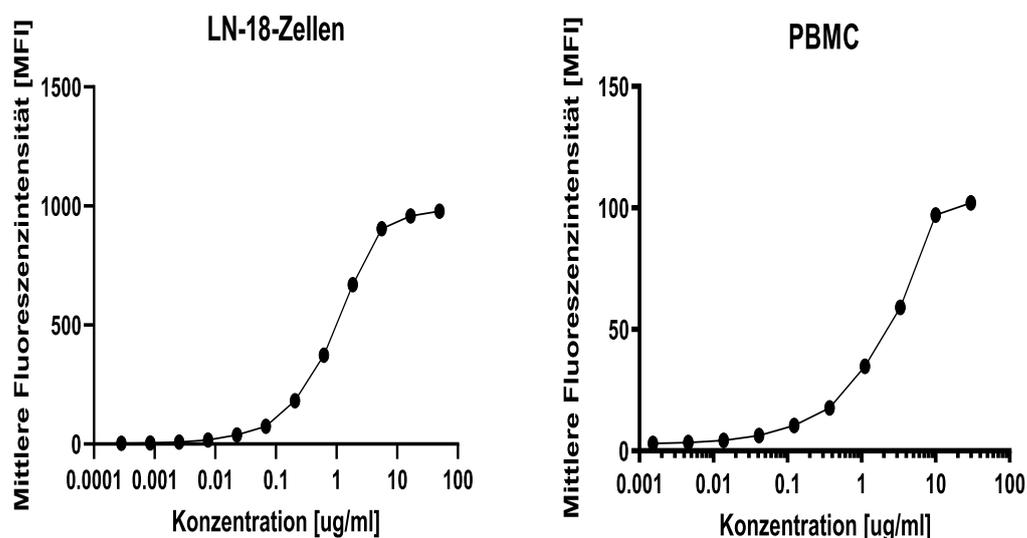
Der Vergleich der Messungen des 4G8xCD3 Antikörpers allein mit der Kombination des 4G8xCD3 Antikörpers mit dem 4G8xCD28 Antikörper zeigt, dass die Proliferation im kombinierten Ansatz deutlich unter der Proliferation von 4G8xCD3 allein liegt, was am ehesten durch die Konkurrenz um die gemeinsame Bindungsstelle auf dem FLT3 Molekül zu erklären ist.

### 3.1.3 Der bispezifische Antikörper ENGxCD28

Der bispezifische kostimulatorische Antikörper ENGxCD28 wurde von Dr. Timo Manz entwickelt und von Dr. Martin Pflügler produziert.

#### Bindungsanalyse

Mittels Durchflusszytometrie konnte die Bindung des kostimulatorischen ENGxCD28 Antikörpers hinsichtlich der Bindung an Ziel- und Effektorzellen analysiert werden. Die ENG-Bindung wurde auf der ENG-positiven LN-18-Zelllinie bestimmt. Der EC<sub>50</sub>-Wert beträgt 4,95 nM. Die Bindungsanalyse an CD28 erfolgte auf PBMCs. Hier liegt der EC<sub>50</sub> bei 14,60 nM. Dieser Unterschied in der Bindung gegenüber den anderen CD28 Antikörpern könnte durch die Bindung des Antikörpers an Monozyten, welche Teil der humanen PBMCs sind, erklärt werden, die die Messung verfälscht.

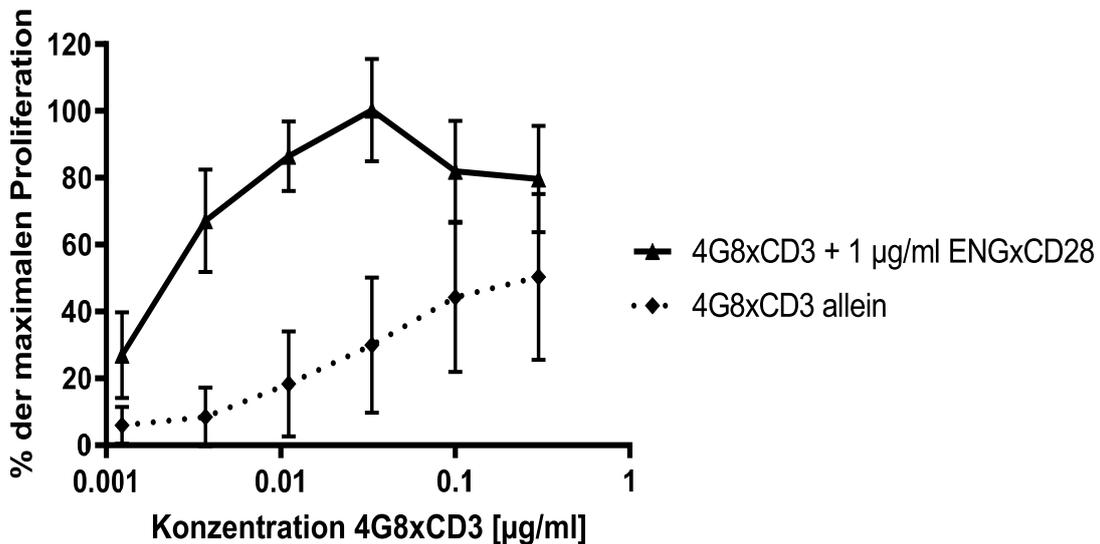


**Abbildung 3.1.9: Bindungsanalyse des ENGxCD28 Antikörpers**

Detektion der gebundenen ENGxCD28 Antikörper auf LN-18 (a) und humanen PBMCs (b). Die Markierung der Antikörper auf der Zelloberfläche erfolgte mit einem PE-konjugierten Ziegen-anti-human Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie.

### Induktion der T-Zell-Proliferation

Die Analyse der Effizienz wurde mit einem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay durchgeführt, anhand dessen die induzierte T-Zell-Proliferation gemessen werden konnte. Die Zielzellen, Nalm-16-Zellen, wurden hierfür bestrahlt, um ihre Proliferation zu unterbinden. Anschließend wurden PBMCs im Verhältnis 1:1 zu den Zielzellen gegeben und es erfolgte eine Inkubation nach entsprechender Antikörperzugabe. Der weitere Ablauf ist in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Die ausgelöste Proliferation wurde ins Verhältnis zur maximalen Proliferation, welche durch PHA induziert werden konnte, gesetzt. Abbildung 3.1.10 zeigt die gemittelte T-Zell-Proliferation von vier Spendern vergleichend für 4G8xCD3 allein und in Kombination mit ENGxCD28.



**Abbildung 3.1.10: T-Zell-Proliferation**

Nalm-16-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit PBMCs gesunder Spender und dem Antikörper 4G8xCD3 allein oder in Kombination mit dem Antikörper ENGxCD28 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung vierer Spender, die jeweils in Triplikaten angesetzt wurden. Diese wurden zur durch PHA ausgelösten maximalen Proliferation ins Verhältnis gesetzt.

Die durch die Antikörperkombination ausgelöste Proliferation mit ENGxCD28 übertrifft die Proliferation von 4G8xCD3 allein in allen Konzentrationen deutlich.

## **3.2 Durchflusszytometrische Analyse von T-Zell-Proliferation,- Aktivierung und Tumorzellyse auf Nalm-16-Zellen**

Für diese Experimente wurden Nalm-16 Zellen im Verhältnis 1:1 mit PBMCs gesunder Spender und verschiedenen Antikörperkombinationen und -konzentrationen inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern im FACS Canto.

Es wurde die Proliferation der T-Zellen betrachtet, sowie deren Aktivierung und die Stärke der induzierten Zielzellyse. Es wurde eine Unterscheidung zwischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen anhand der Korezeptoren CD8 für zytotoxische T-Zellen und CD4 für T-Helferzellen getroffen. Die Aktivierung wurde mit der Expression des Oberflächenproteins CD69 erfasst. Die Detektion der Nalm-16-Zellen erfolgte mit CD19.

Verglichen wurden wiederum Kombinationen des bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpers mit den drei verschiedenen kostimulatorischen bispezifischen CD28-Antikörpern. Als Referenz diente jeweils der Effekt des FLT3xCD3 Antikörpers allein.

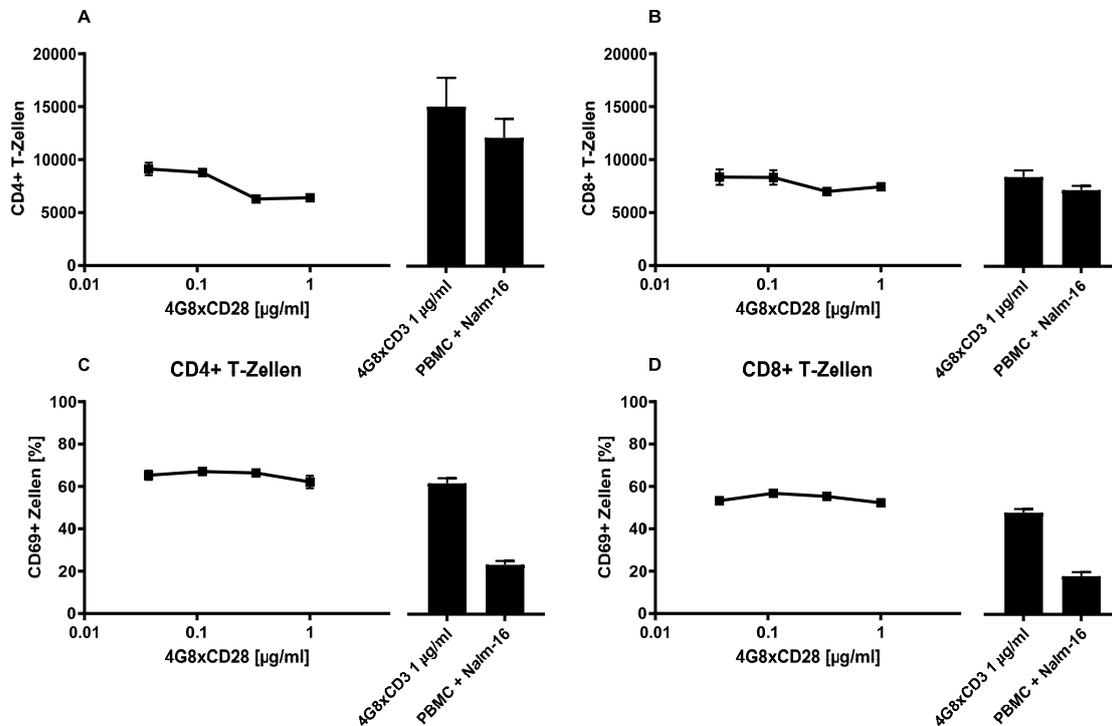
### **3.2.1 CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper gegen dasselbe Epitop auf dem Zielantigen**

Die Kombination von bispezifischen Antikörpern, deren Zielantigen an das identische Epitop des Antigens FLT3 bindet, soll in der Folge betrachtet werden. Hierzu wurde die Kombination der Antikörper 4G8xCD3 und 4G8xCD28 mit dem Antikörper 4G8xCD3 allein verglichen.

#### **T-Zell-Proliferation und -Aktivierung**

Eine verstärkte Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population konnte nicht beobachtet werden. Die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen war in den Proben mit der Kombination der Antikörper leicht niedriger als in der 4G8xCD3-Kontrolle. Die CD8<sup>+</sup>-Population war ebenfalls mit und ohne kostimulatorischem 4G8xCD28 Antikörper ähnlich groß wie in den unbehandelten Kontrollproben. Eine Aktivierung konnte bei den CD4<sup>+</sup>- und bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen festgestellt werden. Der Effekt der Kombination mit dem kostimulatorischen 4G8xCD28 Antikörper war bei der Aktivierung der

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen leicht über der der 4G8xCD3 Kontrollproben. In Abbildung 3.2.1 sind die Ergebnisse eines Experimentes repräsentativ für drei Experimente dargestellt.

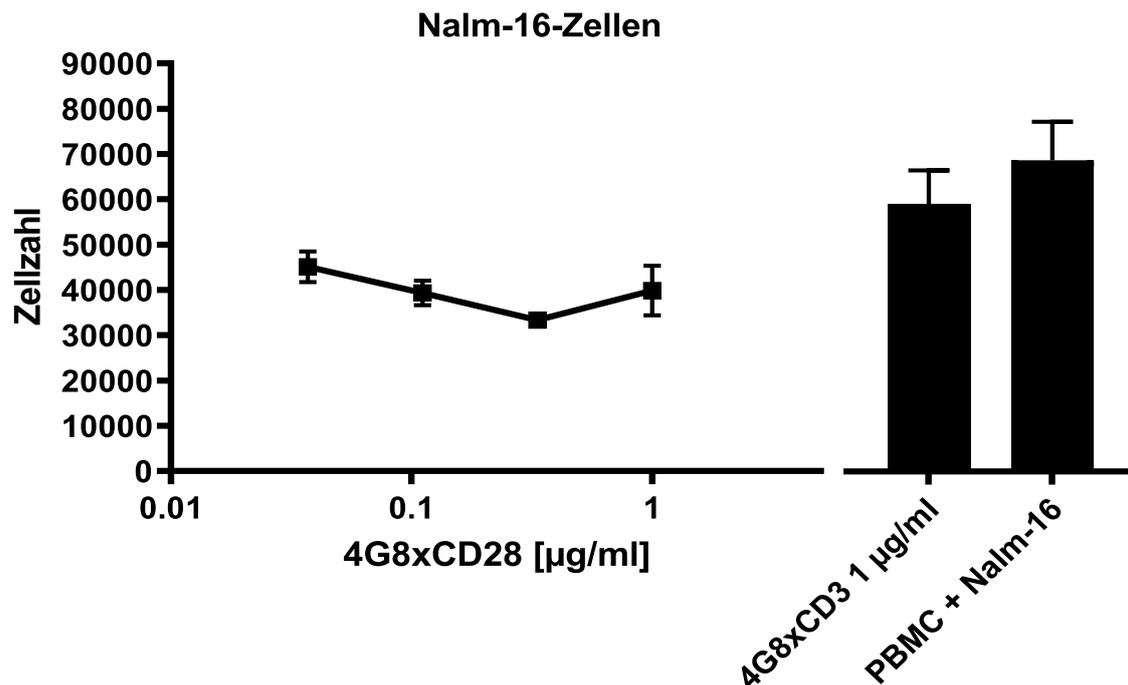


### Abbildung 3.2.1: Antikörpervermittelte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen

PBMCs und Nalm-16-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit 1 µg/ml 4G8xCD3 und verschiedenen Konzentrationen des kostimulatorischen 4G8xCD28 Antikörpers inkubiert. Die Graphen zeigen den Effekt der Kombination aus 4G8xCD3 und 4G8xCD28. Zum Vergleich sind als Balken jeweils der Effekt von 1 µg/ml 4G8xCD3 allein und eine unstimulierte Kontrollprobe gezeigt. Links oben ist die Population der CD4<sup>+</sup>-Zellen gezeigt. Rechts oben die CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation. Links unten ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen anteilig an der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation abgebildet. Rechts unten stellt die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation dar. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

### Tumorzellyse

Unter den angegebenen experimentellen Bedingungen hat die Zugabe des kostimulatorischen bispezifischen Antikörpers eine moderat-, aber nicht eindeutig signifikant erhöhte Lyse erreicht als die Vergleichsprobe mit dem 4G8xCD3 Antikörper allein. Dieser Effekt war jedoch im verwendeten Setting nicht titrierbar. In Abbildung 3.2.2 sind die Ergebnisse eines Experimentes repräsentativ für drei Experimente dargestellt.



**Abbildung 3.2.2: Antikörpervermittelte Zielzellyse**

Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen mit PBMCs und Nalm-16-Zellen im Verhältnis 1:1 inkubiert. Der Graph links zeigt verschiedene Kombinationen aus 1 µg/ml 4G8xCD3 mit verschiedenen Konzentrationen des kostimulatorischen Antikörpers 4G8xCD28. Als Balkendiagramme dargestellt sind zum Vergleich der Effekt von 1 µg/ml 4G8xCD3 allein und die Zahl an Zielzellen in einer unstimulierten Kontrollprobe. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

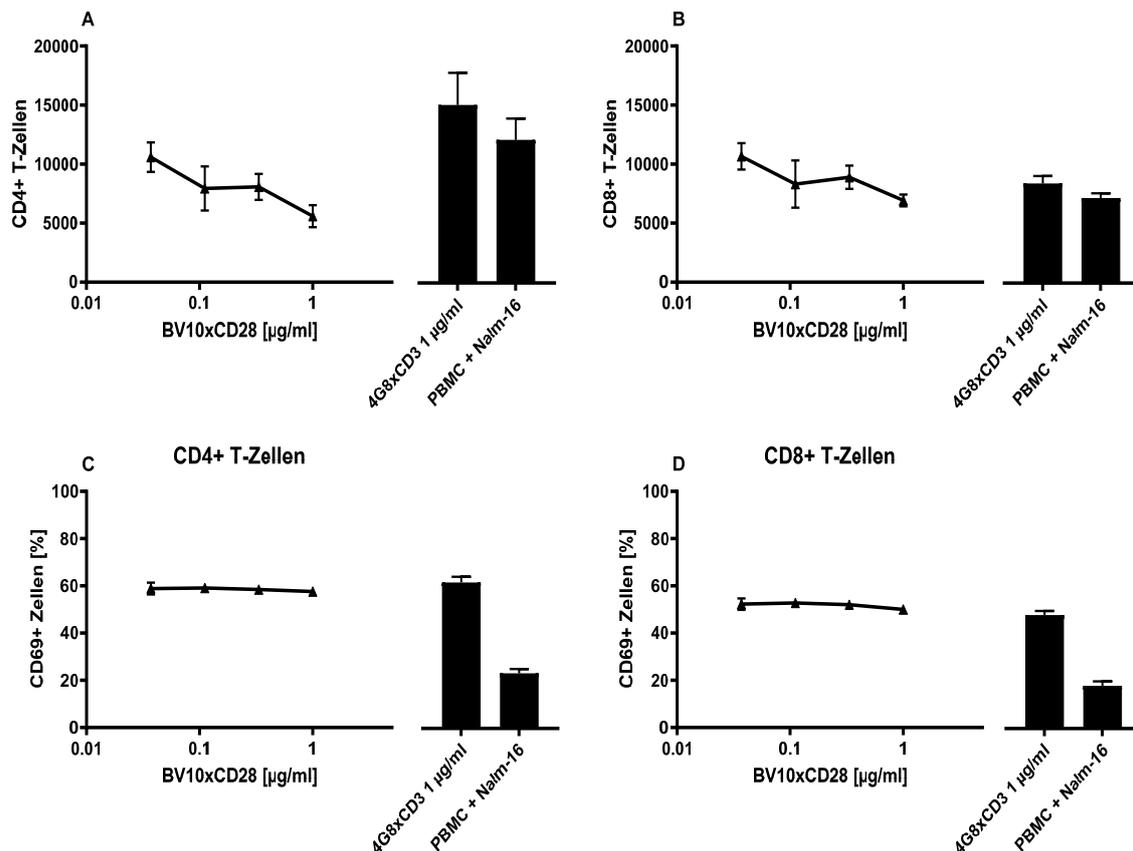
### 3.2.2 CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper gegen unterschiedliche Epitope auf demselben Zielantigen

Um herauszufinden, ob und inwiefern sich das Ergebnis unterscheidet, wenn bispezifische Antikörper verwendet werden, die gegen gleiche oder unterschiedliche Epitope eines Antigens gerichtet sind, wurde nun die Kombination der Antikörper 4G8xCD3 und BV10xCD28 mit dem Antikörper 4G8xCD3 allein hinsichtlich der Effektivität bezüglich T-Zell-Aktivierung und Zielzellyse verglichen.

#### T-Zell-Proliferation und -Aktivierung

Eine verstärkte Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population konnte nicht beobachtet werden. Die Zahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen war in der Proben mit der Kombination der Antikörper leicht niedriger als in der 4G8xCD3-Kontrolle und fiel mit zunehmender 4G8xCD28-Konzentration weiter ab. Die CD8<sup>+</sup>-Population war ebenfalls mit und ohne kostimulatorischem BV10xCD28 Antikörper ähnlich groß

wie in den unbehandelten Kontrollproben. Eine verstärkte Aktivierung konnte bei beiden T-Zell-Populationen festgestellt werden. Die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen war ähnlich der Aktivierung durch den FLT3xCD3 Antikörper allein. In Abbildung 3.2.3 sind die Ergebnisse eines Experimentes repräsentativ für drei Experimente dargestellt.



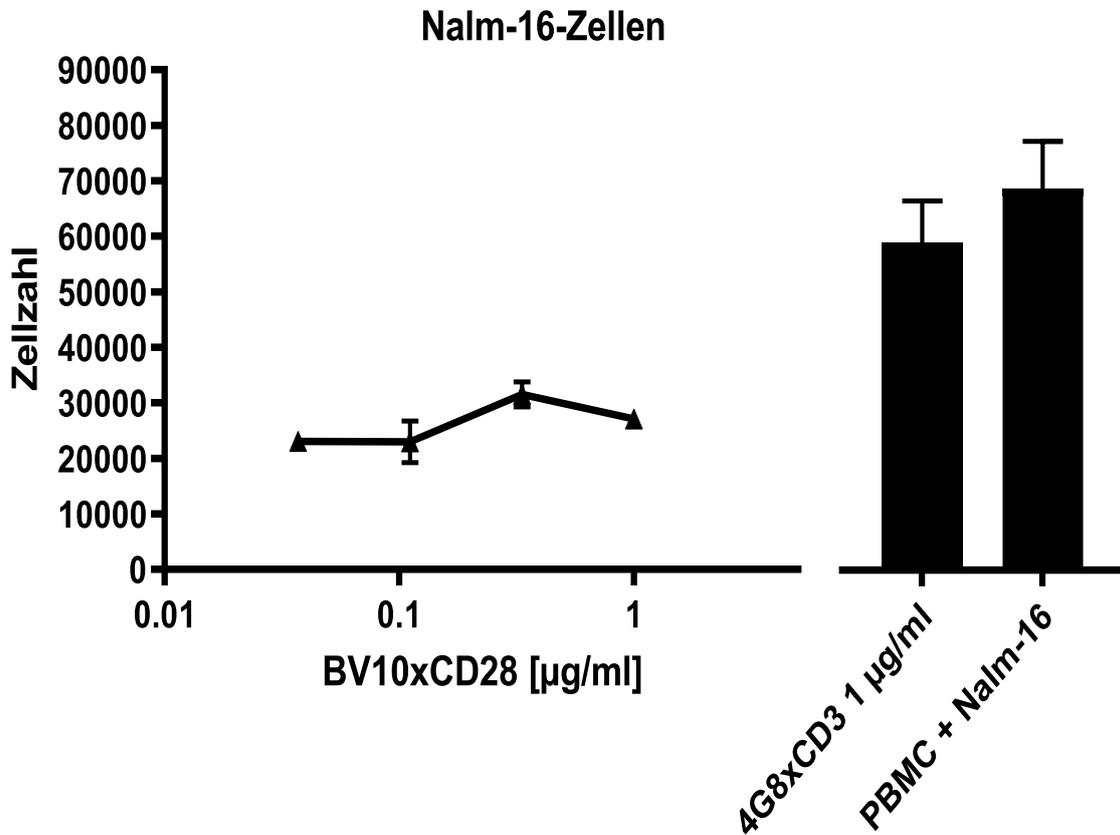
### Abbildung 3.2.3: Antikörpervermittelte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen

PBMCs und Nalm-16-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit 1 µg/ml 4G8xCD3 und verschiedenen Konzentrationen des kostimulatorischen BV10xCD28 Antikörpers inkubiert. Die Graphen zeigen den Effekt der Kombination aus 4G8xCD3 und BV10xCD28. Zum Vergleich sind als Balken jeweils der Effekt von 1 µg/ml 4G8xCD3 allein und eine unstimulierte Kontrollprobe gezeigt. Links oben ist die Population der CD4<sup>+</sup>-Zellen gezeigt. Rechts oben die CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation. Links unten ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen anteilig an der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation abgebildet. Rechts unten stellt die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation dar. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

### Tumorzelllyse

Die Zielzelllyse der Kombination aus 4G8xCD3 Antikörper und BV10xCD28 Antikörper war ausgeprägter als die Lyse der Monotherapie des 4G8xCD3 Antikörpers allein. Die Zielzelllyse war auch effektiver als die Kombination von 4G8xCD3 mit 4G8xCD28, wobei dieser Effekt auch in diesem Fall nicht titrierbar

war. In Abbildung 3.2.4 werden die Ergebnisse eines Experimentes repräsentativ für drei Experimente gezeigt.



**Abbildung 3.2.4: Antikörpervermittelte Zielzellyse**

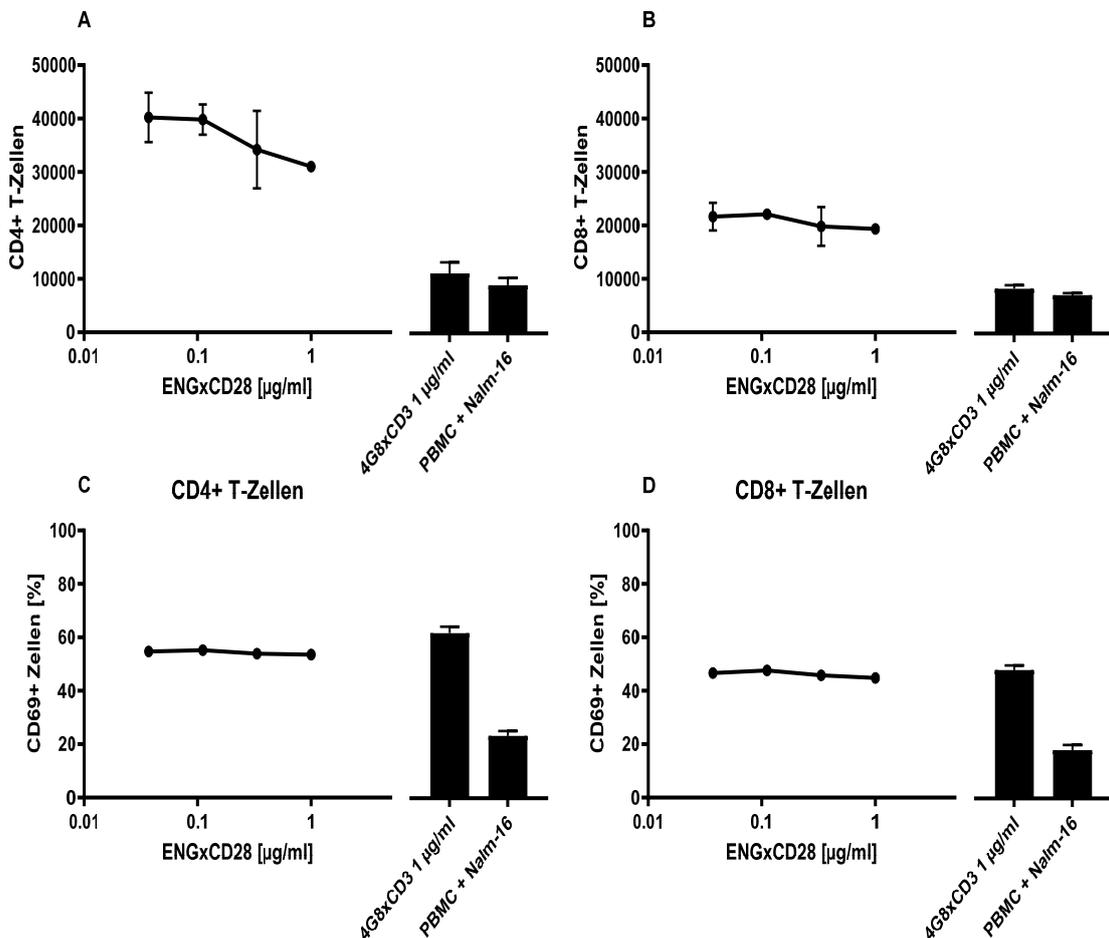
Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen mit PBMCs und Nalm-16-Zellen im Verhältnis 1:1 inkubiert. Der Graph links zeigt verschiedene Kombinationen aus 1 µg/ml 4G8xCD3 mit verschiedenen Konzentrationen des kostimulatorischen Antikörpers BV10xCD28. Als Balkendiagramme dargestellt sind zum Vergleich der Effekt von 1 µg/ml 4G8xCD3 allein und die Zahl an Zielzellen in einer unstimulierten Kontrollprobe. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

### 3.2.3 CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper gegen unterschiedliche Antigene auf derselben Zielzelle

Nachdem bereits Antikörper gegen gleiche und unterschiedliche Epitope desselben Antigens kombiniert wurden, soll nun auf die Kombination von Antikörpern, welche gegen zwei verschiedene Antigene gerichtet sind, eingegangen werden. Hierfür wird der bereits mehrfach verwendete FLT3xCD3 Antikörper mit einem kostimulatorischen ENGxCD28 Antikörper eingesetzt.

## T-Zell-Proliferation und -Aktivierung

Die T-Zell-Populationen der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferierten stark und lagen weit über der Proliferation des 4G8xCD3 Antikörpers allein und entsprechend auch weit über den vorher betrachteten Kombinationen von Antikörpern, die jeweils gegen FLT3 gerichtet waren. Eine eindeutige Erhöhung der Aktivierung unter Verwendung des CD69 Markers konnte überraschenderweise nicht beobachtet werden. In Abbildung 3.2.5 sind die Ergebnisse eines Experimentes repräsentativ für drei Experimente dargestellt.

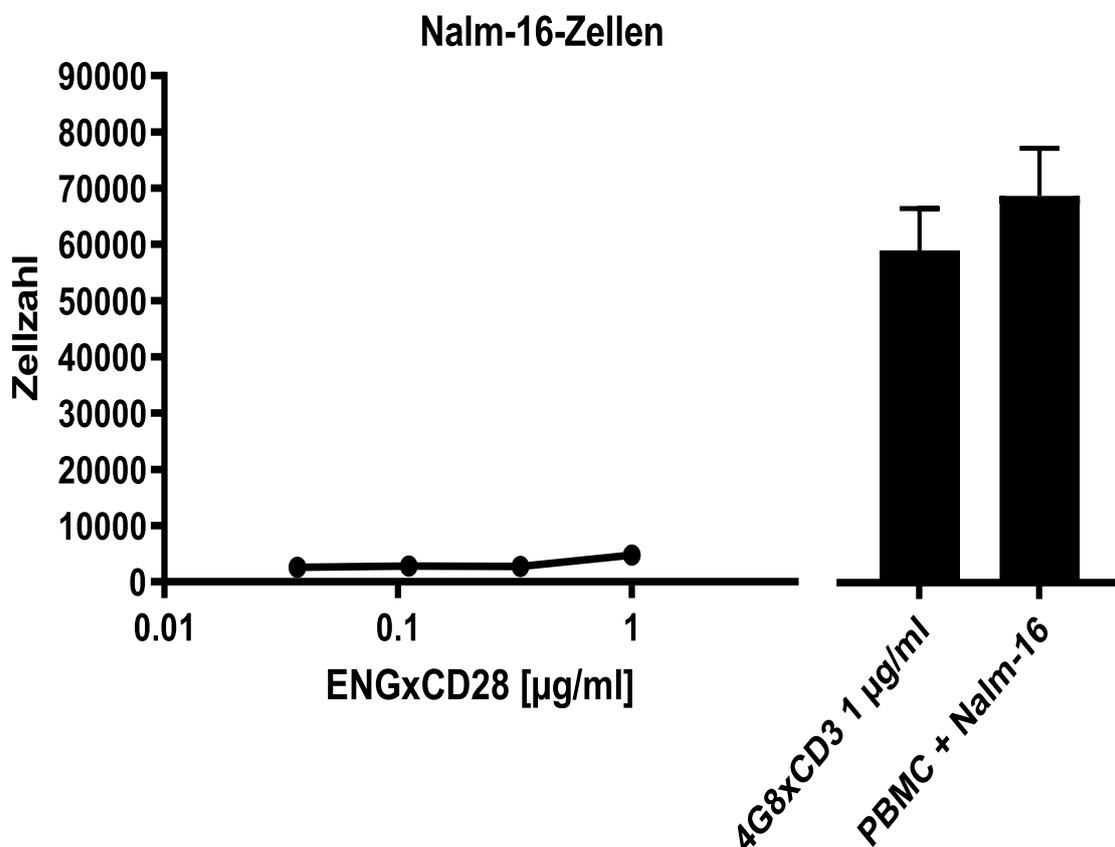


**Abbildung 3.2.5: Antikörpervermittelte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen**

PBMCs und Nalm-16-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit 1 µg/ml 4G8xCD3 und verschiedenen Konzentrationen des kostimulatorischen ENGxCD28 Antikörpers inkubiert. Die Graphen zeigen den Effekt der Kombination aus 4G8xCD3 und ENGxCD28. Zum Vergleich sind als Balken jeweils der Effekt von 1 µg/ml 4G8xCD3 allein und eine unstimulierte Kontrollprobe gezeigt. Links oben ist die Population der CD4<sup>+</sup>-Zellen gezeigt. Rechts oben die CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulation. Links unten ist die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen anteilig an der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation abgebildet. Rechts unten stellt die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen in Prozent der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation dar. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

## Tumorzelllyse

Die Lyse der Nalm-16-Zellen war sehr effektiv. Es verblieben nur wenige Tumorzellen in den Proben der Kombination aus FLT3xCD3 Antikörper und ENGxCD28 Antikörper. Auch in diesem Fall war der Effekt unter den angegebenen experimentellen Bedingungen nicht titrierbar, was bedeutet, dass auch in den vorausgegangenen Fällen die gewählte untere Konzentration von 0,03 µg/ml immer noch zu hoch war. In Abbildung 3.2.6 sind die Ergebnisse eines Experimentes repräsentativ für drei Experimente dargestellt.



**Abbildung 3.2.6: Antikörpervermittelte Zielzellyse**

Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen mit PBMCs und Nalm-16-Zellen im Verhältnis 1:1 inkubiert. Der Graph links zeigt verschiedene Kombinationen aus 1 µg/ml 4G8xCD3 mit verschiedenen Konzentrationen des kostimulatorischen Antikörpers ENGxCD28. Als Balkendiagramme dargestellt sind zum Vergleich der Effekt von 1 µg/ml 4G8xCD3 allein und die Zahl an Zielzellen in einer unstimulierten Kontrollprobe. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

### **3.3 Durchflusszytometrische Analyse von T-Zell-Proliferation, -Aktivierung und Tumorzelllyse auf Leukämiezellen**

Das vorbeschriebene experimentelle System mit Nalm-16 als Zielzellen und allogenen PBMC als Effektorzellen entspricht hinsichtlich der exprimierten Oberflächenantigene und dem Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T-Ratio, engl. *effector-target-ratio*) nicht den Bedingungen, wie sie in AML-Patienten vorzufinden sind. Um diese pathophysiologischen Bedingungen genauer abbilden zu können, wurden in den folgenden Experimenten Blutproben von AML-Patienten des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. In den Patientenproben ist die E:T-Ratio wesentlich in Richtung der leukämischen Zielzellen verschoben. Aufgrund der Ergebnisse der Experimente auf der Tumorzelllinie Nalm-16, die den deutlichsten Erfolg der Zielzelllyse bei der Kombination von Antikörpern mit unterschiedlichen Zielantigenen zeigte, wurde bei den folgenden Experimenten mit Leukämiezellen nur noch die Kombination mit dem ENGxCD28 Antikörper weitergeführt und jeweils im Vergleich zum Effekt des FLT3xCD3 Antikörper allein betrachtet.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Markierung der Zellen mit konjugierten Antikörpern ermöglichte die Erfassung der verschiedenen Populationen. Die T-Zellen wurden wie bereits beschrieben anhand CD4- bzw. CD8-Expression erkannt. Die Messung der Aktivierung erfolgte durch Messung der CD25-Expression, da CD25 im Vergleich zum bisher verwendeten CD69 einen späteren Aktivierungsmarker darstellt, was sich für Messungen über acht bzw. zwölf Tage als geeigneter herausstellte. Die Identifizierung der Blasten war abhängig von der Patientenprobe über die Expression der Oberflächenproteine CD33, CD34 oder CD117 bzw. eine Kombination daraus möglich.

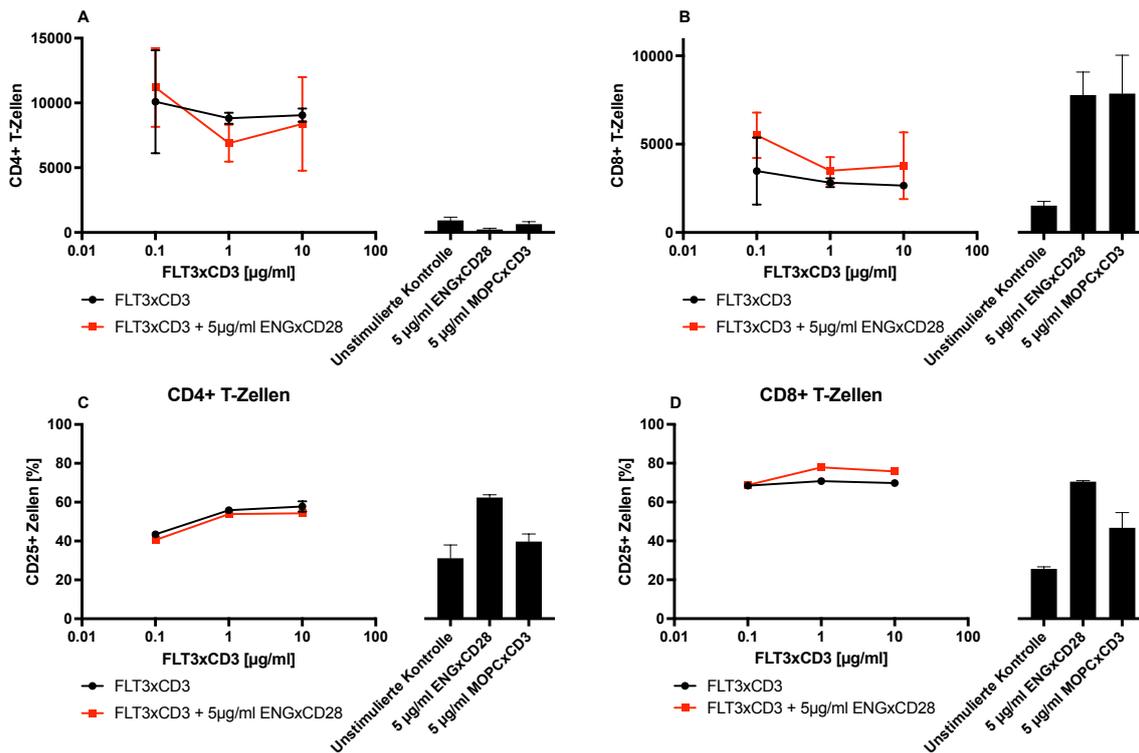
#### **3.3.1 CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper in Standard RPMI-Medium**

Analog zu den mit der Zelllinie Nalm-16 durchgeführten Experimenten, erfolgten die anfänglichen Versuche mit Leukämiezellen ebenfalls im etablierten RPMI Komplett-Medium. Unter der Annahme, dass die Effekte der Therapie in den Patientenproben aufgrund der stark in Richtung Zielzellen verschobenen E:T-

Ratio nicht bereits nach 72h zu sehen sein würden, wie dies in den vorherigen Experimenten der Fall war, sollte die Inkubationsdauer ausgedehnt werden. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse wurden bei einer Inkubationszeit von 120h, also fünf Tagen, erhoben. Repräsentativ für die durchgeführten Versuche werden die Ergebnisse für die Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen (Abbildung 3.3.1) und die Zielzellyse (Abbildung 3.3.2) eines Patienten gezeigt.

### **T-Zell-Proliferation und -Aktivierung**

Eine Proliferation der T-Zellen war in der CD4<sup>+</sup> und auch in der CD8<sup>+</sup>-Population zu beobachten, wobei in letzterer auch in den Kontrollproben mit ENGxCD28 allein, sowie MOPCxCD3 ebenfalls eine Proliferation gegenüber den unbehandelten Proben zu beobachten war. Unterschiede zwischen FLT3xCD3 allein und der Kombinationstherapie waren nicht auszumachen. Ebenso war in der Aktivierung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen keine Verbesserung der Kombinationstherapie verglichen mit der Monotherapie zu erkennen. Da auch hier kein Titrationseffekt zu beobachten war, muss davon ausgegangen werden, dass Proliferation und Aktivierung bei der gewählten Minimalkonzentration des FLT3xCD3 Antikörpers (0,1µg/ml) bereits maximal war. Der Effekt von ENGxCD28 in Kombination mit limitierenden FLT3xCD3-Konzentrationen bleibt deshalb ungeklärt.

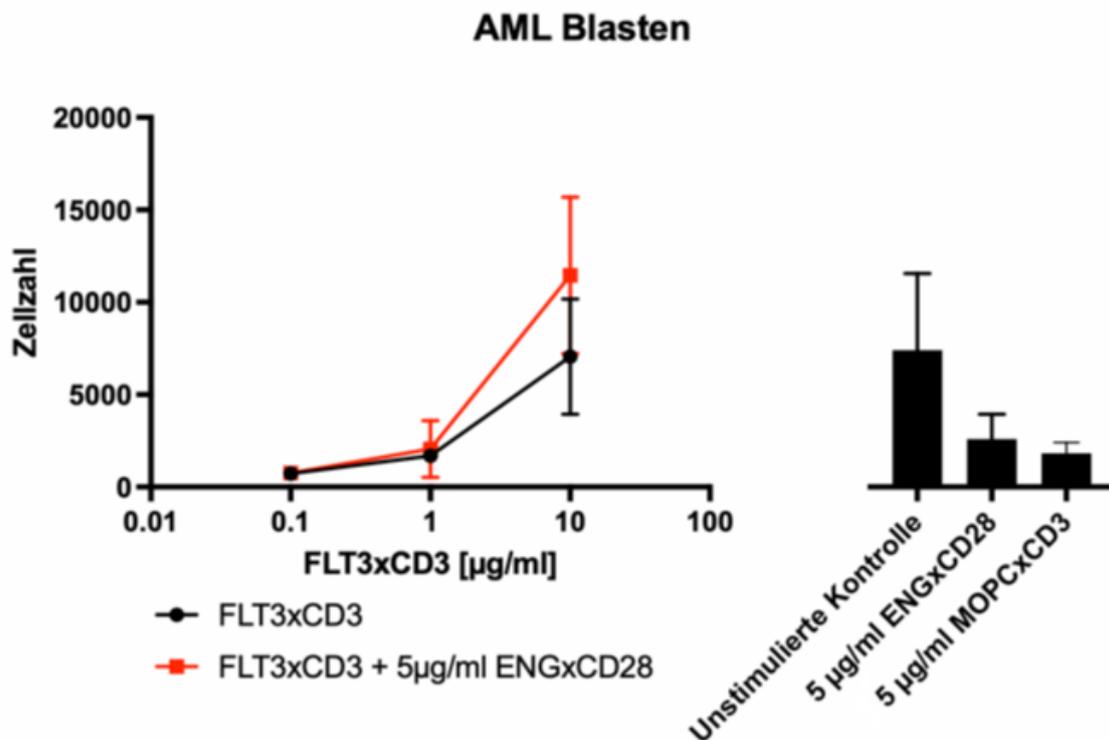


### Abbildung 3.3.1: T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung

Die Abbildung zeigt die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (A) und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (B), sowie die jeweilige Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (C) und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (D) des AML-Patienten #13 nach Zugabe von FLT3xCD3 in verschiedenen Konzentrationen allein (schwarze Graphen) oder in Kombination mit 5µg/ml ENGxCD28 (rote Graphen) mit jeweils zugehörigen Kontrollen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus experimentell identisch angesetzten Duplikaten.

### Tumorzelllyse

Die Analyse der Zielzelllyse ergab, dass nur noch wenige Blasten nach der Inkubationszeit vorhanden waren. Von den anfänglich 500.000 Zellen war in jeder Probe, auch in den unstimulierten Kontrollen, nur noch ein Bruchteil viabel. Das legt die Vermutung nahe, dass in den Proben ein hoher spontaner Zelltod stattfand. Unter diesen Voraussetzungen waren die Messungen nach 5 Tagen artifizierlicher Natur, da nicht die Induktion des Zelltodes gemessen wurde, sondern das Überleben der Zellen unter limitierenden Kulturbedingungen. Dies erklärt auch die fehlende Titrierbarkeit der Ergebnisse in den Lyse-Experimenten.



**Abbildung 3.3.2: Tumorzelllyse**

Dargestellt ist die Lyse der AML-Blasten des Patienten #13 nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des FLT3xCD3 Antikörpers allein (schwarzer Graph) und in Kombination mit ENGxCD28 (roter Graph) mit zugehörigen Kontrollen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

### 3.3.2 CD3- und CD28-Stimulation mittels bispezifischer Antikörper im modifizierten Alpha-MEM

Aufgrund der Annahme, dass der Versuchsaufbau mit RPMI Komplett-Medium für die AML-Zellen ungeeignet war, wurde der von Krupka et. al beschriebene Ansatz zur Langzeitkultivierung von AML-Blasten in Kokultur mit *MS-5 feeder cells* etabliert (Krupka et al. 2014). Dies ermöglichte eine längere Inkubation der Zellen mit den Antikörpern für bis zu zwölf Tagen. Nach jeweils vier Tagen wurde das Medium ausgetauscht und frisches Medium und Antikörper zu den Zellen hinzugegeben. Nach acht bzw. zwölf Tagen der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Antikörpern folgte die Analyse der Proben mittels Durchflusszytometrie.

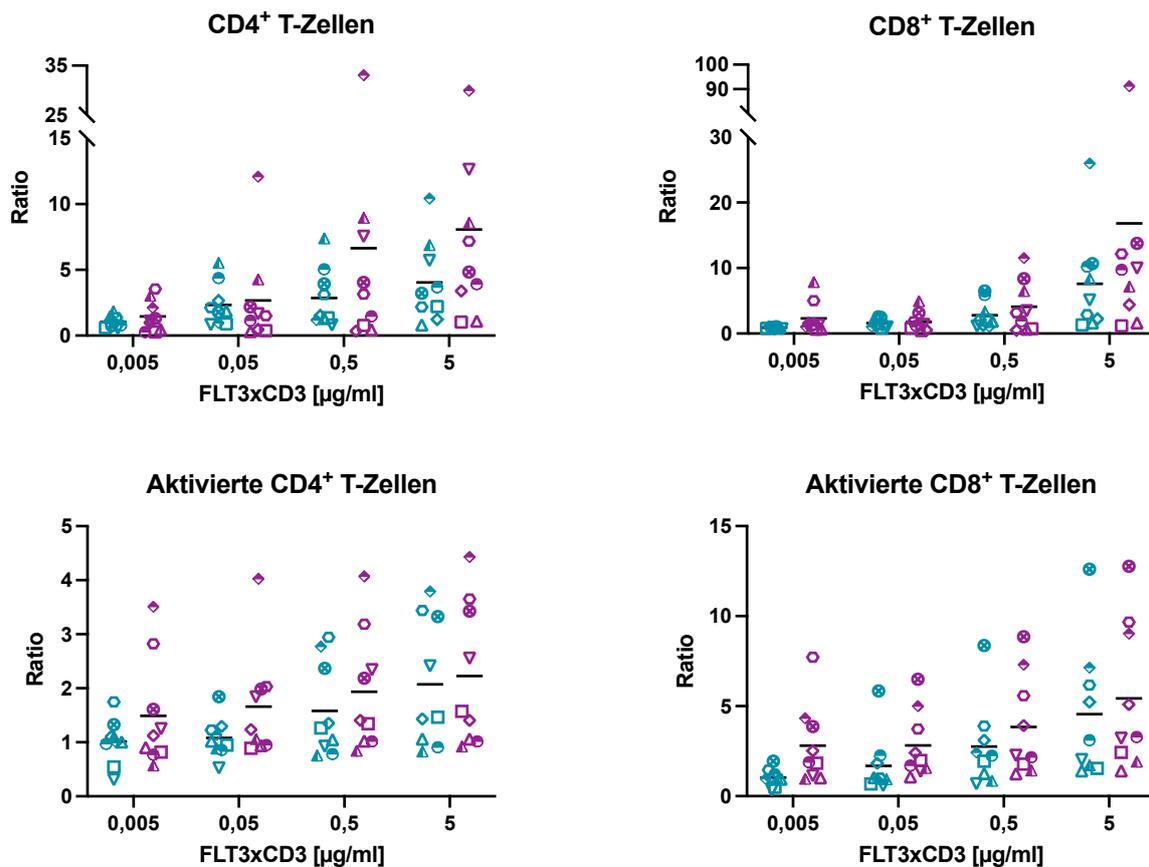
Für die Versuche wurden 500.000 Leukämiezellen mit verschiedenen Konzentrationen an Antikörpern inkubiert. Verglichen wurden vier

Konzentrationen des FLT3xCD3 Antikörpers allein und in Kombination mit dem kostimulatorischen bispezifischen ENGxCD28 Antikörper mit einer Konzentration von 1 µg/ml. Kontrollproben mit unbehandelten Leukämiezellen und Kontrollproben, welchen 5 µg/ml MOPCxCD3 Antikörper zugegeben wurden, wurden mitgeführt. Für diese Experimente wurden insgesamt neun Proben von AML-Patienten verwendet, auf deren Blasten sowohl FLT3 als auch Endoglin nachgewiesen werden konnte. Um herauszufinden, inwieweit die Ergebnisse zwischen acht und zwölf Tagen in diesem Ansatz voneinander abweichen, wurden zusätzlich drei der neun Spender in Ansätzen über zwölf Tage inkubiert, wobei jeweils nach vier und acht Tagen das Medium mit den Antikörpern ausgetauscht wurde.

### **T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach acht Tagen**

Eine Proliferation der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen konnte in den beiden höchsten Konzentrationen in Mono- und Kombinationstherapie erzielt werden. Der vermeintliche Unterschied zwischen diesen beiden Therapien kam durch das starke Ansprechen einzelner Patienten zustande, während die meisten Versuche keinen großen Unterschied zeigten.

Bei der Aktivierung zeigte sich ein gleichförmiges Bild bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wobei sich sowohl mit Erhöhung der Antikörperkonzentrationen kaum Unterschiede zeigten, als auch im Vergleich von Mono- zu Kombinationstherapie. Ein ähnliches Bild bzgl. der unterschiedlichen Therapien zeigte sich bei der Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wobei hier einzelne Patienten auf die Erhöhung der Antikörperkonzentration mit einem höheren Anteil an aktivierten Zellen reagierten.



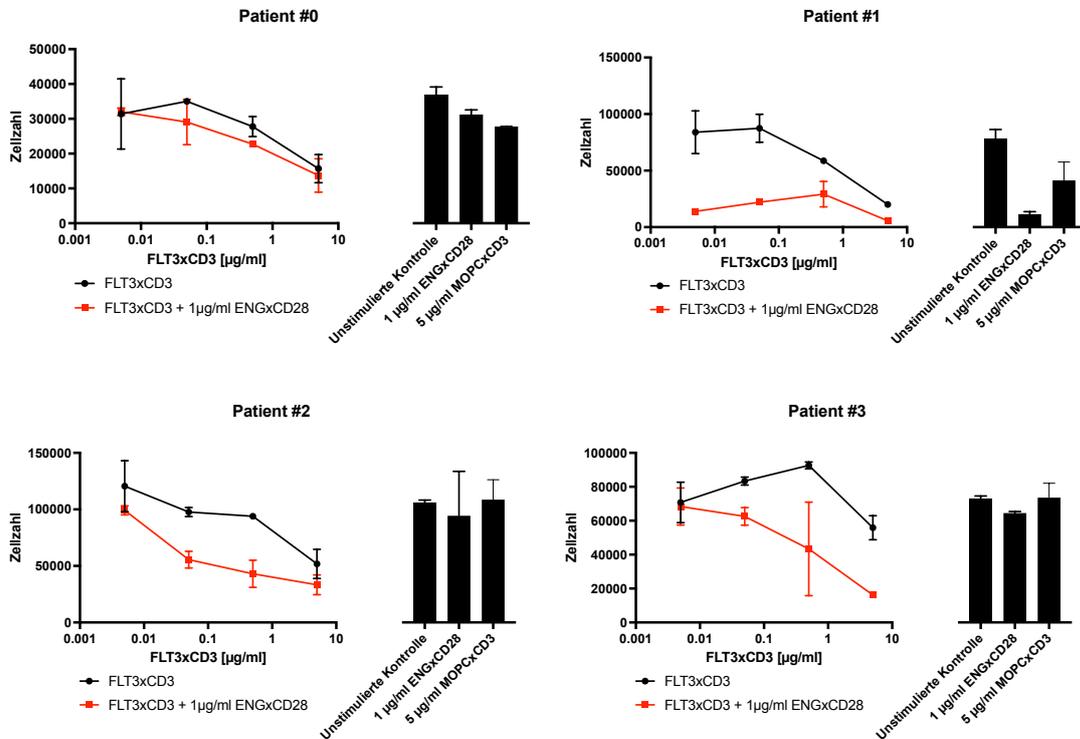
**Abbildung 3.3.3: T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach acht Tagen**

Die Abbildung zeigt die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (links oben) und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (rechts oben), sowie die jeweilige Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (links unten) und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (rechts unten) von neun AML Patienten nach Zugabe von FLT3xCD3 in verschiedenen Konzentrationen allein (türkis) oder in Kombination mit 1 µg/ml ENGxCD28 (lila) als Ratio aus jeweiliger Probe zur unstimulierten Kontrolle nach acht Tagen.

### Tumorzelllyse nach acht Tagen

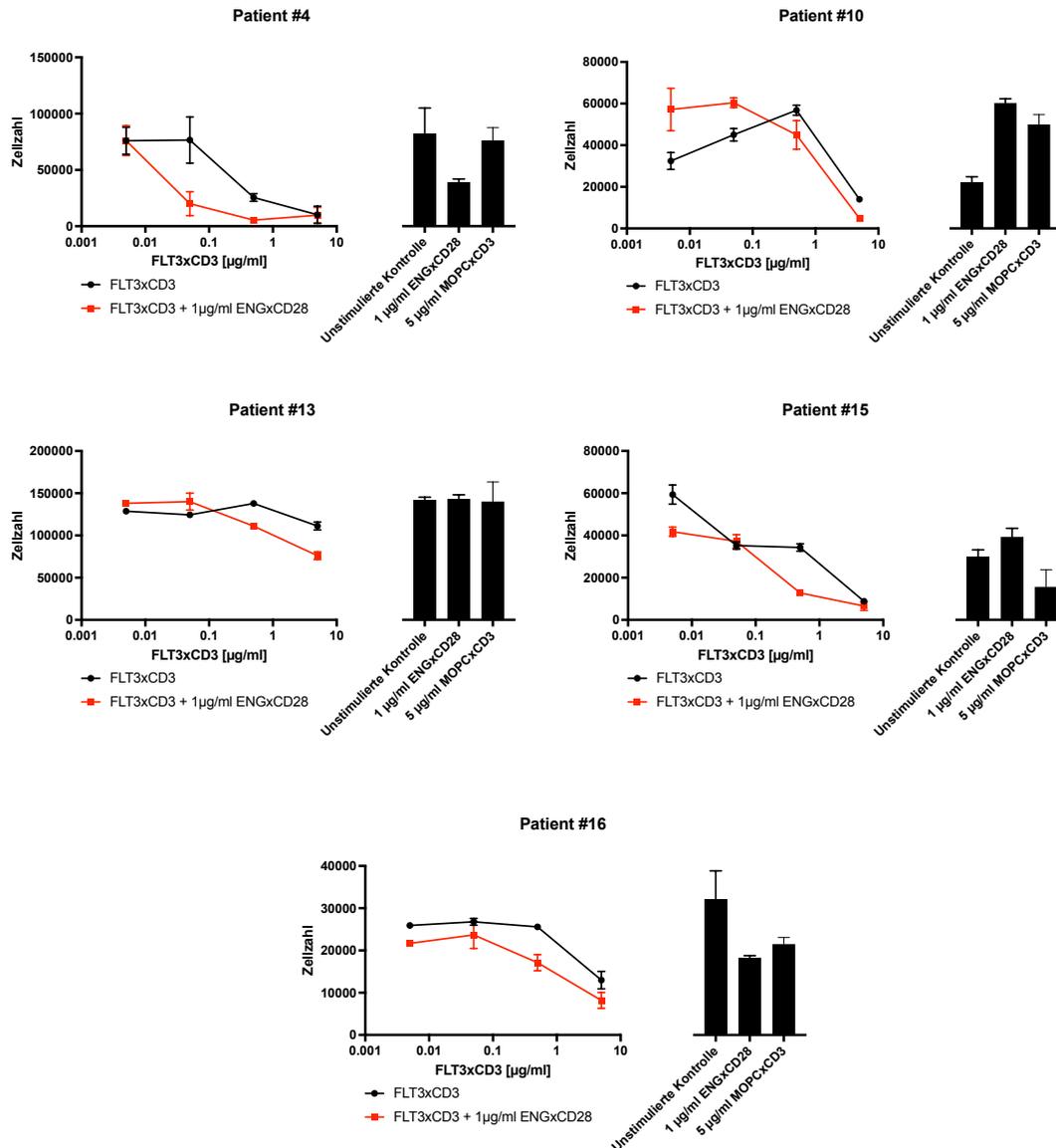
Mithilfe der Verwendung des neuen Kulturansatzes gelang es, eine deutlich höhere Zahl an viablen Zellen in den Kontrollen bei Messung nach acht bzw. zwölf Tagen zu erreichen, als dies im Standardansatz nach fünf Tagen der Fall war. Auch eine deutliche Titrierbarkeit war im Vergleich zu vorhergehenden Experimenten zu beobachten. Eine effektive Tumorzelllyse zeigte sich in allen Patientenproben in der höchsten Konzentration (5 µg/ml) von FLT3xCD3 in Mono- und Kombinationstherapie, wobei letztere in allen Patienten gleichwertig oder überlegen war. In 6 von 9 Patienten (#1, #2, #3, #4, #15, #16) zeigte sich eine erfolgreichere Lyse der Zielzellen in Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ebenso in den mittleren Konzentrationen von FLT3xCD3. Bei drei

dieser Patienten (#1, #4 und #16) war jedoch bereits in der Kontrollprobe von ENGxCD28 allein ein Lyseeffekt zu beobachten.



**Abbildung 3.3.4: Tumorzellyse nach acht Tagen**

Dargestellt ist die Lyse der AML-Blasten der Patienten #0, #1, #2, #3 nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des FLT3xCD3 Antikörpers allein (schwarze Graphen) und in Kombination mit ENGxCD28 (rote Graphen) für acht Tage mit zugehörigen Kontrollen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

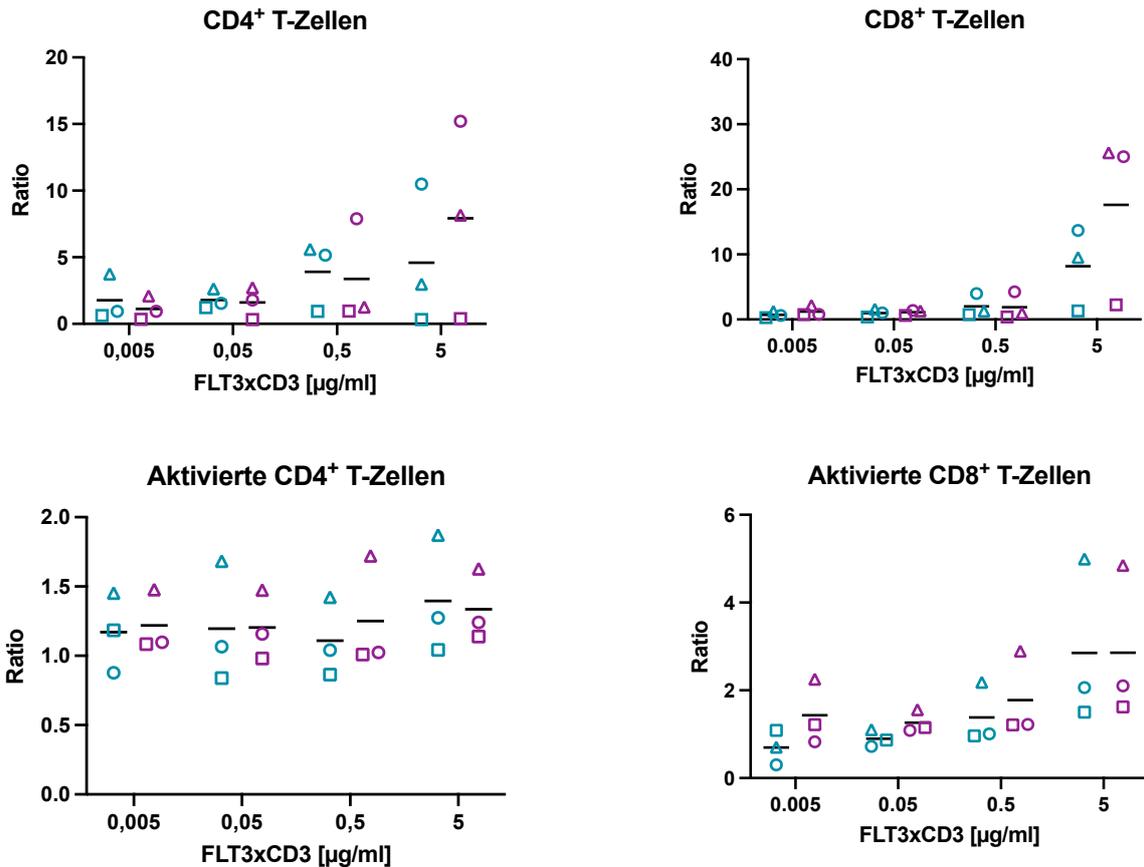


### Abbildung 3.3.5: Tumorzelllyse nach acht Tagen

Dargestellt ist die Lyse der AML-Blasten der #4, #10, #13, #15 und #16 nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des FLT3xCD3 Antikörpers allein (schwarze Graphen) und in Kombination mit ENGxCD28 (rote Graphen) für acht Tage mit zugehörigen Kontrollen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

### T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach zwölf Tagen

Die Auswertung der T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach zwölf Tagen zeigte im Vergleich zu den Daten derselben Spender nach acht Tagen keine ersichtlichen Unterschiede. Proliferation und Aktivierung zeigten sowohl in den Therapien als auch in den Kontrollen ähnliche Ergebnisse für beide T-Zell-Populationen.

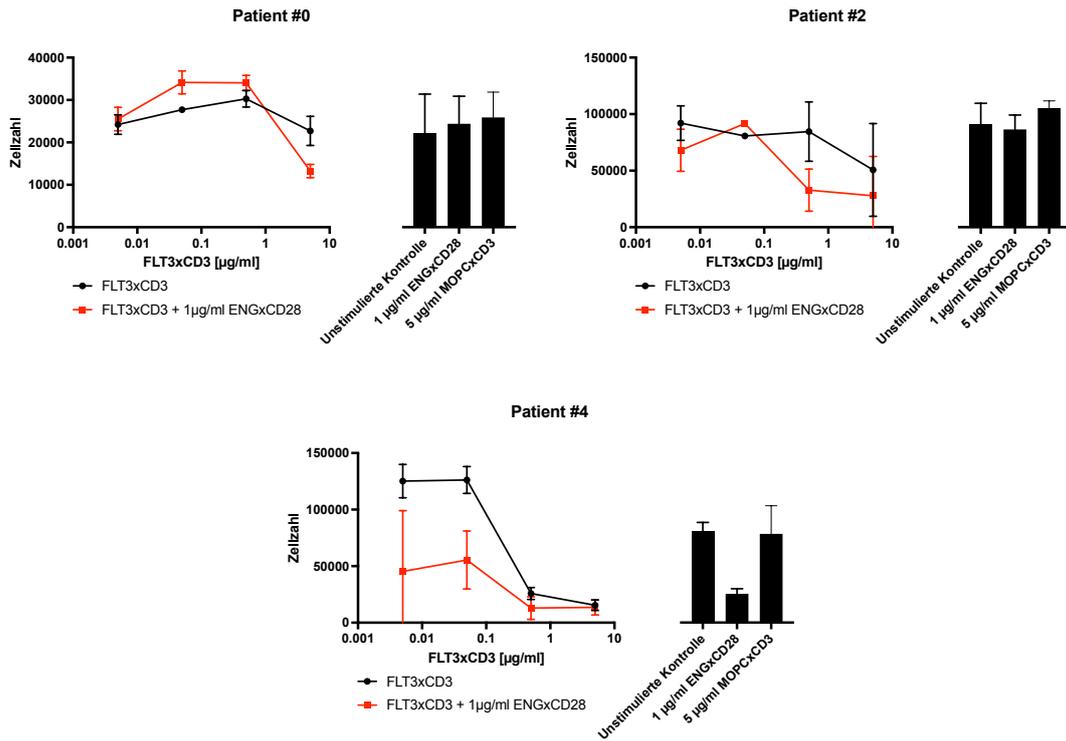


**Abbildung 3.3.6: T-Zell-Proliferation und -Aktivierung nach zwölf Tagen**

Die Abbildung zeigt die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (links oben) und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (rechts oben), sowie die jeweilige Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (links unten) und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (rechts unten) dreier AML-Patienten nach Zugabe von FLT3xCD3 in verschiedenen Konzentrationen allein (türkis) oder in Kombination mit 1µg/ml ENGxCD28 (lila) als Ratio aus jeweiliger Probe zur unstimulierten Kontrolle nach zwölf Tagen.

### Tumorzelllyse nach zwölf Tagen

Der Trend der Ergebnisse der Zielzelllyse nach zwölf Tagen entspricht weitgehend dem der Ergebnisse derselben Spender nach acht Tagen. Patient #0 zeigt in der niedrigsten und den beiden mittleren Konzentrationen keine Lyse in beiden Therapien verglichen mit den Kontrollproben. Erst in der höchsten Konzentration der Kombinationstherapie ist eine deutliche Lyse erkennbar. Patient #2 zeigt eine effektivere Lyse der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie in höchster und zweithöchster Konzentration. Patient #4 zeigt eine effektive Lyse der Monotherapie in den zwei höchsten Konzentrationen und eine starke Lyse in allen Konzentrationen der Kombinationstherapie, wobei analog zu den Ergebnissen nach acht Tagen auch hier eine starke Lyse in der Kontrollprobe von ENGxCD28 allein auszumachen ist.



**Abbildung 3.3.7: Tumorzellyse nach zwölf Tagen**

Dargestellt ist die Lyse der AML-Blasten der Patienten #0, #2 und #4 nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des FLT3xCD3 Antikörpers allein (schwarze Graphen) und in Kombination mit ENGxCD28 (rote Graphen) nach zwölf Tagen mit zugehörigen Kontrollen. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus Duplikaten.

## **4 Diskussion**

Ziel der Arbeit war der Vergleich verschiedener Kombinationen aus einem bispezifischen FLT3xCD3 Antikörper mit unterschiedlichen bispezifischen Antikörpern, welche ein kostimulatorisches CD28-Signal vermittelten. Die entsprechenden Experimente zur Antikörper-vermittelten T-Zell-Aktivierung und Tumorzelllyse wurden zunächst unter Verwendung von FLT3- und ENG-positiven leukämischen Zielzellen (Zelllinie Nalm-16) mit PBMCs gesunder Spender durchgeführt. Die effektivste Kombination aus diesem allogenen System (FLT3xCD3 und ENGxCD28) wurde in der Folge in mehreren Experimenten im autologen Setting mit PBMCs und Leukämiezellen von AML-Patienten angewandt.

### **4.1 Funktionsanalyse im allogenen System**

Im allogenen System wurden verschiedene Kombinationen aus bispezifischen Antikörpern miteinander verglichen. Damit sollte der Einfluss der Wahl gleicher oder unterschiedlicher Epitope und Antigene auf die Funktionalität der Kombinationstherapie aus zwei bispezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Funktionalität von bispezifischen FLT3xCD3 Antikörpern bezüglich T-Zell-Proliferation und -Aktivierung, sowie Tumorzelllyse im allogenen System mit Nalm-16-Zellen ist gut belegt (Hofmann et al. 2012; Pfluegler et al. 2022). Die Idee der Aktivierung eines kostimulierenden Signals wie CD28 in einem bispezifischen Antikörper wird ebenfalls seit vielen Jahren verfolgt (Brandl et al. 1999). Auch die Kombination zweier bispezifischer Antikörper TAAxCD3 und TAAxCD28 wurde in der Vergangenheit bereits betrachtet (Skokos et al. 2020). In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Unterschiede in der Wahl der Antigene und Epitope dieser Antigene gelegt. Dabei kamen folgende bispezifischen Antikörper zum Einsatz, die mit ihrem Zielteil zwei unterschiedliche Epitope auf dem FLT3 Protein erkennen: BV10xCD28, 4G8xCD28 und 4G8xCD3. Für die Bindung an Endoglin wurde der bispezifische ENGxCD28 Antikörper verwendet. Die Funktionalität der Antikörper wird durch die Wahl der Epitope und Antigene stark beeinflusst (Brinkmann and Kontermann 2021).

So führt die Bindungsstelle möglicherweise zu einer veränderten sterischen Anordnung der Antikörper und zu einer vergrößerten oder verringerten räumlichen Nähe der Effektor- und Zielzellen zueinander.

Es ist bekannt, dass der Antikörper 4G8 an ein membran-proximales Epitop des FLT3-Moleküls bindet und einen leichten agonistischen Effekt auf den FLT3-Rezeptor ausübt, während der BV10 Antikörper weiter distal bindet. Beide Antikörper sind nicht kreuz-kompetierend und eignen sich deshalb zur Klärung der Frage, inwieweit eine Kompetition um das Zielantigen die kombinatorische Anwendung bispezifischer Antikörper beeinträchtigt.

Neben der Verwendung zweier gleicher Antigene sollte auch die Kombination von Antikörpern mit zwei unterschiedlichen TAAs als Zielantigen betrachtet werden. Hierfür wurde der FLT3xCD3 Antikörper mit einem ENGxCD28 Antikörper kombiniert. Endoglin befindet sich, wie FLT3, auf der Oberfläche der Nalm-16-Zellen und kann ebenso auf AML-Blasten überexprimiert sein, wobei es auf gesunden Zellen, mit Ausnahme proliferierender Endothelzellen, kaum exprimiert wird (Gonzalez Munoz et al. 2021). Die Kombination zweier unterschiedlicher TAAs soll zum einen die Sicherheit und zum anderen die Effektivität erhöhen.

In den hier beschriebenen Versuchen zeigte sich, dass die Kombination von bispezifischen CD3- und CD28 Antikörpern, die dasselbe Zielantigen (FLT3) erkennen, keinen additiven oder gar synergistischen Effekt hatte, d.h. der alleinigen Gabe von bispezifischen CD3 Antikörpern nicht überlegen war. Das galt auch dann, wenn die beiden Antikörper nicht um dasselbe Epitop auf dem FLT3-Molekül konkurrierten.

Im Gegensatz dazu führte die Zugabe des ENGxCD28 Antikörpers bereits bei geringen Konzentrationen von FLT3xCD3 zu einer erheblich größeren Zielzelllyse. Auch die Proliferation aller T-Zell-Populationen war deutlich erhöht, während die relative Aktivierung der T-Zellen nicht erhöht wurde.

Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt, dass der Effekt in der Lyse der Zielzellen unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht titrierbar war.

Dies zeigt, dass die in den Experimenten gewählte kleinste Konzentration bereits zu hoch war, um den Effekt zweifelsfrei nachzuweisen

Die Expression der FLT3-Rezeptoren verglichen mit den ENG-Rezeptoren stellt bei der Wahl des Antigens einen wichtigen Unterschied dar. Sowohl die Expression von FLT3-Rezeptoren als auch von ENG-Rezeptoren ist auf Zellen der Nalm-16-Zelllinie ausgeprägter als auf den Spenderzellen der AML-Patienten. Dies im Zusammenspiel mit der Allogenität der PBMCs und dem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 1:1 in den Versuchen stellt keine realistischen Versuchsbedingungen dar. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte es vielmehr, einen Eindruck davon zu bekommen, inwiefern die Wahl des TAA die Effektivität der Therapie beeinflusst. Es zeigte sich, dass die effektivste Kombination aus zwei Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene besteht. Diese beiden Antikörper FLT3xCD3 und ENGxCD28 wurden daher für weitere Versuche auf Patientenmaterial verwendet.

Die Verwendung zweier Zielantigene auf einer Zelle erscheint aber auch hinsichtlich eines anderen Gesichtspunktes als sinnvoll. Wenn man sich noch einmal die Wichtigkeit der Wahl des Antigens bezüglich der Spezifität für Tumorzellen vor Augen führt, wird deutlich, dass die Verwendung zweier unterschiedlicher TAAs zu einer höheren Sicherheit der Therapie führt, da beide Antigene vorliegen müssen, um die maximale Aktivierung von T-Zellen zu ermöglichen, womit unerwünschte Nebenwirkungen in Abwesenheit von Tumorzellen verringert werden sollten. Ein Aspekt der Kostimulation, neben der Steigerung des Therapieerfolges, ist auch eine Reduktion des Erstsinal-Antikörpers zu erreichen, um Nebenwirkungen zu minimieren. Die Zielzellrestriktion führt dazu, dass die bispezifischen Antikörper nur in Anwesenheit beider Signale, im Falle des Antikörpers FLT3xCD3 also in Anwesenheit von FLT3 und CD3, die Aktivierung von T-Zellen erreichen (Durben et al. 2015). Zusätzlich soll eine Verstärkung dieser Aktivierung durch ENGxCD28 nur im Beisein von ENG und CD28 erfolgen, was für die maximale Aktivierung der Effektorzellen die Anwesenheit von FLT3 und ENG voraussetzt. Da das Zweitsignal CD28 bei nicht-supraagonistischen Antikörpern allein keinen oder einen äußerst geringen Effekt auf T-Zellen hat (Esensten et al. 2016), ist die

Wahl des TAA für das Erstsinal von größter Bedeutung. Schließlich kann dies bereits eine Aktivierung auslösen, wenn das TAA dieses Antikörpers außerhalb des Tumors auf gesunden Zellen stark exprimiert wird. Insofern ist die Kombination von FLT3 mit CD3 und ENG mit CD28 ideal, da ein Erstsinal mit ENG in einem theoretischen ENGxCD3 Antikörper auch eine Aktivierung von T-Zellen in der Anwesenheit proliferierender Endothelzellen, z.B. im Rahmen der Wundheilung, ermöglicht, was nicht wünschenswert ist.

## **4.2 Funktionsanalyse im autologen System**

Während die Expression von Zielantigenrezeptoren auf Zelllinien im Wesentlichen konstant sind, unterscheiden sich die leukämischen Zellen unterschiedlicher Spender hinsichtlich der FLT3- und der Endoglinexpression erheblich. Die verwendeten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression von FLT3 und Endoglin mittels FACS-Zytometrie kontrolliert. Die Höhe der Proliferation und der Tumorzelllyse korrelierte dabei jedoch nicht signifikant mit der Antigenexpression. Hier könnte möglicherweise das unterschiedliche ebenfalls spenderabhängige E:T-Ratio eine Rolle gespielt haben.

Auch die Spender, welche ohne Erstsinal bereits in der Kontrollprobe eine deutliche Lyse der Zielzellen durch ENGxCD28 zeigten, wiesen nicht mehr Endoglinrezeptoren auf als solche, die diese Reaktionen nicht zeigten. Eine andere Erklärung für diesen Effekt bietet eine mögliche Grundaktivierung von Immunzellen durch die FLT3-positiven Blasten, welche bereits im Blut vorhanden sind. Das Vorliegen dieser Zielzellen könnte bereits zu einer Aktivierung der T-Zellen führen, welche durch den CD28-Stimulus weiter verstärkt wird.

Insgesamt zeigte sich über alle Spender hinweg, dass eine effektive Lyse der Zielzellen in der Mono- und in der Kombinationstherapie erst bei relativ hohen Konzentrationen von FLT3xCD3 ermöglicht wurde. Das verwendete Medium, in dem die Versuche durchgeführt wurden, wies verglichen mit den Versuchen mit der Nalm-16-Zelllinie eine höhere Konzentration an Serum auf. Statt der 10% FCS wurden 12,5% FCS und zusätzlich 12,5% Pferdeserum verwendet. Die abschwächende Wirkung des Serums könnte mit einer erhöhten Kortisolkonzentration zusammenhängen, da Steroide durch ihre

immunsupprimierenden Effekte eine hemmende Wirkung auf die antikörperinduzierte Lyse haben (Kauer 2018).

Die geringen Unterschiede der Therapie zwischen acht und zwölf Tagen lassen zwei mögliche Schlüsse zu. Einerseits könnte bereits eine maximale Aktivierung der Effektorzellen erreicht worden sein oder die Dauer der Versuche ist noch nicht ausreichend, um einen abschließenden Effekt beobachten zu können. Das System, das von Krupka et al. für die zeitliche Ausdehnung der Versuche übernommen wurde, bietet zwar generell die Möglichkeit, die Versuche noch länger, auf bis zu mehrere Wochen auszudehnen (Krupka et al. 2014), dies bietet jedoch auch Raum für Störfaktoren, die im Ablauf der Versuche angelegt sind. Hier sind zum einen die Kokultur mit Stromazellen zu nennen, zum anderen die viertägigen Intervalle, nach denen das Medium und die zugegebenen Antikörper auf den Zellen ausgetauscht werden müssen. Um zu klären, inwieweit die T-Zellen bereits maximal aktiviert sind, sollten in weiteren Versuchen die Subpopulationen der T-Zellen genauer betrachtet werden.

Neben diesen durch den Versuchsaufbau implizierten Schwächen gibt es noch weitere zu nennen. Zum einen fehlen Zellen, die im Körper durchaus eine Rolle spielen könnten, wie Stromazellen oder Endothelzellen. Um ein realistischeres Bild vom Einfluss dieser Zellen auf die Wirkung der Antikörpertherapie zu erhalten, könnten Mausversuche hilfreich sein.

Demgegenüber stehen die vielfältigen Stärken des etablierten Systems. Zum einen sind im autologen System die Effekte durch allogene Aktivierung und Lyse weitestgehend eliminiert. Dadurch sind die Ergebnisse besser auf die Wirkung *in-vivo* zu übertragen als im allogenen *in-vitro*-System.

Eine weitere Qualität ist der verwendete FLT3CD3 Antikörper, welcher auf dem neuesten Stand der Wissenschaft ist und ein etabliertes und funktionierendes Format darstellt (Pfluegler et al. 2022).

Das neben dem FLT3 als Zielantigen verwendete Endoglin stellt ebenfalls ein interessantes Zielantigen dar (Kauer et al. 2019). Endoglin wird auf AML-Zellen exprimiert, ist jedoch genauso für solide Tumoren relevant, da die in der

Tumorentwicklung proliferierenden Gefäße reichlich Endoglin exprimieren (Dallas et al. 2008).

### **4.3 Ausblick**

Bisher konnte leider noch kein langfristiges Ansprechen von bispezifischen Antikörpern in soliden Tumoren erzielt werden. Wie bereits ausgeführt, könnte hierbei die Anergie der Immunzellen eine wichtige Rolle spielen (Schwartz 2003), weshalb das Durchbrechen dieser Anergie ein lohnender Ansatz zur antitumorösen Therapie darstellt. Dies kann durch Kostimulation mittels CD28 erreicht werden (Wolf et al. 1994). Auch die Betrachtung weiterer Kostimuli sollte weitergeführt werden. Hieraus sollten neue und bessere Antikörper hergestellt und charakterisiert werden. Die Notwendigkeit einer Kostimulation hat sich in der bereits etablierten CAR-T-Zell-Therapie gezeigt (Harrison et al. 2021).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung und Proliferation von T-Zellen sowie eine effektive Tumorzelllyse möglich sind. Allerdings wurden hierfür relativ hohe Antikörperkonzentrationen benötigt. Neben weiteren Faktoren wie dem E:T-Ratio kann dies mit der höheren Serumkonzentration im autologen Versuchsaufbau von 25% gegenüber 10% zusammenhängen. Hier wäre interessant herauszufinden, wie sich die Wirksamkeit der Antikörper in noch höheren Serumkonzentrationen verhält.

Falls höhere Konzentrationen des FLT3xCD3 Antikörpers notwendig wären, sollten auch weitere Untersuchungen zur Toxizität erfolgen. Auch die interessante Frage, inwieweit die Konzentration des Erstsinalantikörpers durch Zugabe höherer Konzentrationen an kostimulatorischen Antikörpern gesenkt werden kann, um damit etwaige Nebenwirkungen zu minimieren, wäre zu klären. Hierfür scheint der Ansatz, zwei verschiedene bispezifische Antikörper zu verwenden, in jedem Fall vielversprechend.

Da die Struktur eines Antikörpers Einfluss auf die Bindung und die Anordnung an den jeweiligen Rezeptoren hat, ist auch die Produktion und Austestung unterschiedlicher Formate weiterer bispezifischer Antikörper ein spannender Ansatz. Ebenso wie die Verwendung weiterer kostimulatorischer Rezeptoren wie

bspw. 4-1BB oder OX40 (Buchan et al. 2018; Claus et al. 2019; Drent et al. 2019). Auch Antikörper, die über die Blockade inhibitorischer Rezeptoren auf Immunzellen wirken, wie dies in anderen Formaten über CTLA-4 und PD-1 geschieht, ist vorstellbar.

Es sollten Experimente mit kostimulatorischen Antikörpern in Mäusen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob andere Zellen, wie z.B. Stroma-Zellen oder Endothelzellen einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Antikörper haben, welche in den bisher durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden konnten.

## 5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der vielversprechenden Therapieform der bispezifischen Antikörper zur Behandlung von Tumoren. Insbesondere wird darauf eingegangen, wie die Kombination zweier Antikörper, die den TCR/CD3-Komplex und zusätzlich das kostimulierende CD28-Molekül auf der T-Zell-Oberfläche aktivieren, eine verbesserte, zielgerichtete Rekrutierung von T-Zellen ermöglicht.

Als Zielantigen wurden FLT3 und Endoglin ausgewählt. FLT3 ist auf zahlreichen Leukämieformen, Endoglin auf neugebildeten Kapillaren und einigen Leukämien, exprimiert. Dabei zeigte sich, dass eine Kombination von bispezifischen Antikörpern (bsAb) mit FLT3xCD3- und EndoglinxCD28-Spezifität besonders effizient war, FLT3xCD28 Antikörper waren als Kombinationspartner für FLT3xCD3 bsAb weniger effektiv, auch wenn die beiden verwendeten FLT3 Zielantikörper gegen nicht überlappende Epitope des FLT3 Moleküls gerichtet waren. Deshalb wurde die effektivste Kombination aus FLT3xCD3 und EndoglinxCD28 Antikörpern in einem aufwändigen Testsystem untersucht, bei dem mononukleäre Zellen von AML-Patienten mit den Antikörpern behandelt wurden und anschließend die Aktivierung von T-Zellen und die Reduktion leukämischer Blasten durchflusszytometrisch bestimmt wurde.

Dabei zeigte sich, dass das kostimulierende Konstrukt in den meisten Fällen die Lyse der Leukämiezellen durch autologe T-Zellen deutlich verbesserte, allerdings sind dazu relativ hohe Konzentrationen ( $> 1\mu\text{g/ml}$ ) erforderlich. Zusammengefasst bietet die Kombination zweier zielzellrestringierter bispezifischer Antikörper eine vielversprechende Option zur Behandlung von bestimmten Leukämien, die in zukünftigen *in-vivo*-Versuchen auch mit anderen Zielantigenen weiter charakterisiert werden sollte. Hier gibt es die Möglichkeit, andere aktivierende Rezeptoren, wie OX-40 oder 4-1BB zur Kostimulation zu verwenden. Eine weitere Option wäre die Blockade von inhibitorischen Rezeptoren wie CTLA-4 oder PD-1.

## 6 Literaturverzeichnis

- Acuto, O., and F. Michel. 2003. 'CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling', *Nat Rev Immunol*, 3: 939-51.
- Adam, P. J., G. J. Clesham, and P. L. Weissberg. 1998. 'Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 33-7.
- Agnes, F., B. Shamoon, C. Dina, O. Rosnet, D. Birnbaum, and F. Galibert. 1994. 'Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III', *Gene*, 145: 283-8.
- Arthur, H. M., J. Ure, A. J. Smith, G. Renforth, D. I. Wilson, E. Torsney, R. Charlton, D. V. Parums, T. Jowett, D. A. Marchuk, J. Burn, and A. G. Diamond. 2000. 'Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development', *Dev Biol*, 217: 42-53.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana, and M. Letarte. 1999. 'Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily', *J Biol Chem*, 274: 584-94.
- Barry, F. P., R. E. Boynton, S. Haynesworth, J. M. Murphy, and J. Zaia. 1999. 'The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)', *Biochem Biophys Res Commun*, 265: 134-9.
- Beck, A., L. Goetsch, C. Dumontet, and N. Corvaia. 2017. 'Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates', *Nat Rev Drug Discov*, 16: 315-37.
- Birg, F., M. Courcoul, O. Rosnet, F. Bardin, M. J. Pebusque, S. Marchetto, A. Tabilio, P. Mannoni, and D. Birnbaum. 1992. 'Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages', *Blood*, 80: 2584-93.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-23.
- Böldicke, Thomas. 2021. 'Immuntherapie mit Antikörpern', *Der Onkologe*, 27: 367-75.
- Borges, L., M. Iacovino, N. Koyano-Nakagawa, J. Baik, D. J. Garry, M. Kyba, and R. C. Perlingeiro. 2013. 'Expression levels of endoglin distinctively identify hematopoietic and endothelial progeny at different stages of yolk sac hematopoiesis', *Stem Cells*, 31: 1893-901.
- Brandl, M., L. Grosse-Hovest, E. Holler, H. J. Kolb, and G. Jung. 1999. 'Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma', *Exp Hematol*, 27: 1264-70.
- Brinkmann, U., and R. E. Kontermann. 2021. 'Bispecific antibodies', *Science*, 372: 916-17.

- Buchan, S. L., A. Rogel, and A. Al-Shamkhani. 2018. 'The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy', *Blood*, 131: 39-48.
- Büchner, T., W. E. Berdel, C. Haferlach, T. Haferlach, S. Schnittger, C. Müller-Tidow, J. Braess, K. Spiekermann, J. Kienast, P. Staib, A. Grüneisen, W. Kern, A. Reichle, G. Maschmeyer, C. Aul, E. Lengfelder, M. C. Sauerland, A. Heinecke, B. Wörmann, and W. Hiddemann. 2009. 'Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group', *J Clin Oncol*, 27: 61-9.
- Buhring, H. J., C. A. Muller, M. Letarte, A. Gougos, A. Saalmuller, A. J. van Agthoven, and F. W. Busch. 1991. 'Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow', *Leukemia*, 5: 841-7.
- Burnet, F. M. 1970. 'The concept of immunological surveillance', *Prog Exp Tumor Res*, 13: 1-27.
- Burrows, F. J., E. J. Derbyshire, P. L. Tazzari, P. Amlot, A. F. Gazdar, S. W. King, M. Letarte, E. S. Vitetta, and P. E. Thorpe. 1995. 'Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy', *Clin Cancer Res*, 1: 1623-34.
- Carow, C. E., M. Levenstein, S. H. Kaufmann, J. Chen, S. Amin, P. Rockwell, L. Witte, M. J. Borowitz, C. I. Civin, and D. Small. 1996. 'Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/FIk2) in human leukemias', *Blood*, 87: 1089-96.
- Chakhachiro, Z. I., Z. Zuo, T. N. Aladily, H. M. Kantarjian, J. E. Cortes, K. Alayed, M. H. Nguyen, L. J. Medeiros, and C. Bueso-Ramos. 2013. 'CD105 (endoglin) is highly overexpressed in a subset of cases of acute myeloid leukemias', *Am J Clin Pathol*, 140: 370-8.
- Claus, C., C. Ferrara, W. Xu, J. Sam, S. Lang, F. Uhlenbrock, R. Albrecht, S. Herter, R. Schlenker, T. Hüsser, S. Diggelmann, J. Challier, E. Mössner, R. J. Hosse, T. Hofer, P. Brünker, C. Joseph, J. Benz, P. Ringler, H. Stahlberg, M. Lauer, M. Perro, S. Chen, C. Küttel, P. L. Bhavani Mohan, V. Nicolini, M. C. Birk, A. Ongaro, C. Prince, R. Gianotti, G. Dugan, C. T. Whitlow, K. K. Solingapuram Sai, D. L. Caudell, A. G. Burgos-Rodriguez, J. M. Cline, M. Hettich, M. Ceppi, A. M. Giusti, F. Cramer, W. Driessen, P. N. Morcos, A. Freimoser-Grundschober, V. Levitsky, M. Amann, S. Grau-Richards, T. von Hirschheydt, S. Tournaviti, M. Mølhøj, T. Fauti, V. Heinzelmann-Schwarz, V. Teichgräber, S. Colombetti, M. Bacac, A. Zippelius, C. Klein, and P. Umaña. 2019. 'Tumor-targeted 4-1BB agonists for combination with T cell bispecific antibodies as off-the-shelf therapy', *Sci Transl Med*, 11.
- Cosimato, V., G. Scalia, M. Raia, L. Gentile, V. Cerbone, F. Visconte, T. Statuto, L. Valvano, F. D'Auria, G. Calice, D. Graziano, P. Musto, and L. Del Vecchio. 2018. 'Surface endoglin (CD105) expression on acute leukemia blast cells: an extensive flow cytometry study of 1002 patients', *Leuk Lymphoma*, 59: 2242-45.

- Dagdeviren, A., S. F. Muftuoglu, A. N. Cakar, and U. Ors. 1998. 'Endoglin (CD 105) expression in human lymphoid organs and placenta', *Ann Anat*, 180: 461-9.
- Dales, J. P., S. Garcia, P. Bonnier, F. Duffaud, L. Andrac-Meyer, O. Ramuz, M. N. Lavaut, C. Allasia, and C. Charpin. 2003. 'CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients', *Am J Clin Pathol*, 119: 374-80.
- Dallas, N. A., S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, S. J. Lim, and L. M. Ellis. 2008. 'Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy', *Clin Cancer Res*, 14: 1931-7.
- Della Porta, M. G., L. Malcovati, R. Invernizzi, E. Travaglino, C. Pascutto, M. Maffioli, A. Galli, S. Boggi, D. Pietra, L. Vanelli, C. Marseglia, S. Levi, P. Arosio, M. Lazzarino, and M. Cazzola. 2006. 'Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome', *Leukemia*, 20: 549-55.
- Depil, S., P. Duchateau, S. A. Grupp, G. Mufti, and L. Poirot. 2020. "Off-the-shelf" allogeneic CAR T cells: development and challenges', *Nat Rev Drug Discov*, 19: 185-99.
- Drent, E., R. Poels, R. Ruiters, Nwcj van de Donk, S. Zweegman, H. Yuan, J. de Bruijn, M. Sadelain, H. M. Lokhorst, R. W. J. Groen, T. Mutis, and M. Themeli. 2019. 'Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells', *Clin Cancer Res*, 25: 4014-25.
- Durben, M., D. Schmiedel, M. Hofmann, F. Vogt, T. Nubling, E. Pyz, H. J. Buhning, H. G. Rammensee, H. R. Salih, L. Grosse-Hovest, and G. Jung. 2015. 'Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia', *Mol Ther*, 23: 648-55.
- Edelman, G. M., and J. A. Gally. 1962. 'The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins', *J Exp Med*, 116: 207-27.
- Edelman, G. M., and M. D. Poulik. 1961. 'Studies on structural units of the gamma-globulins', *J Exp Med*, 113: 861-84.
- Ehrlich, Paul R. 1900. 'Croonian lecture. On immunity with special reference to cell life', *Proceedings of the Royal Society of London*, 66: 424 - 48.
- El-Gohary, Y. M., J. F. Silverman, P. R. Olson, Y. L. Liu, J. K. Cohen, R. Miller, and R. S. Saad. 2007. 'Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma', *Am J Clin Pathol*, 127: 572-9.
- Esensten, J. H., Y. A. Helou, G. Chopra, A. Weiss, and J. A. Bluestone. 2016. 'CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy', *Immunity*, 44: 973-88.
- Eskander, R. N., and K. S. Tewari. 2013. 'Epithelial cell-adhesion molecule-directed trifunctional antibody immunotherapy for symptom management of advanced ovarian cancer', *Clin Pharmacol*, 5: 55-61.
- Europäische Kommission. 2017. 'Widerruf der durch die Entscheidung K(2009)3071 erteilten Zulassung des Humanarzneimittels "Removab -

- Catumaxomab" auf Antrag des Zulassungsinhabers [Online]', Accessed 09.11.2021. [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170602138036/dec\\_138036\\_de.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170602138036/dec_138036_de.pdf).
- European Medicines Agency. 2009. 'Removab: EPAR - Public assessment report [Online]', Accessed 09.11.2021. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/removab-epar-summary-public\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/removab-epar-summary-public_de.pdf).
- Fagraeus, A. 1948. 'The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro', *J Immunol*, 58: 1-13.
- Finn, O. J. 2018. 'A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy', *J Immunol*, 200: 385-91.
- Gilliland, D. G., and J. D. Griffin. 2002. 'The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia', *Blood*, 100: 1532-42.
- Gonzalez Munoz, T., A. T. Amaral, P. Puerto-Camacho, H. Peinado, and E. de Alava. 2021. 'Endoglin in the Spotlight to Treat Cancer', *Int J Mol Sci*, 22.
- Gordon, K. J., and G. C. Blobel. 2008. 'Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease', *Biochim Biophys Acta*, 1782: 197-228.
- Gougos, A., and M. Letarte. 1988. 'Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line', *J Immunol*, 141: 1925-33.
- Gougos, A., S. St Jacques, A. Greaves, P. J. O'Connell, A. J. d'Apice, H. J. Buhning, C. Bernabeu, J. A. van Mourik, and M. Letarte. 1992. 'Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts', *Int Immunol*, 4: 83-92.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. 'The B7 family revisited', *Annu Rev Immunol*, 23: 515-48.
- Griffith, J., J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke, and K. Saxena. 2004. 'The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain', *Mol Cell*, 13: 169-78.
- Hargadon, K. M., C. E. Johnson, and C. J. Williams. 2018. 'Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors', *Int Immunopharmacol*, 62: 29-39.
- Harrison, A. J., X. Du, B. von Scheidt, M. H. Kershaw, and C. Y. Slaney. 2021. 'Enhancing co-stimulation of CAR T cells to improve treatment outcomes in solid cancers', *Immunother Adv*, 1: Itab016.
- Hayakawa, F., M. Towatari, H. Kiyoi, M. Tanimoto, T. Kitamura, H. Saito, and T. Naoe. 2000. 'Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines', *Oncogene*, 19: 624-31.
- Heidelberger, M., and O. T. Avery. 1923. 'The Soluble Specific Substance of Pneumococcus', *J Exp Med*, 38: 73-9.
- Hofmann, M., L. Grosse-Hovest, T. Nubling, E. Pyz, M. L. Bamberg, S. Aulwurm, H. J. Buhning, K. Schwartz, S. P. Haen, K. Schilbach, H. G. Rammensee, H. R. Salih, and G. Jung. 2012. 'Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia', *Leukemia*, 26: 1228-37.

- Ikehara, S., R. N. Pahwa, G. Fernandes, C. T. Hansen, and R. A. Good. 1984. 'Functional T cells in athymic nude mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 886-8.
- Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, and G. Winter. 1986. 'Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse', *Nature*, 321: 522-5.
- Jung, G., U. Freimann, Z. Von Marschall, R. A. Reisfeld, and W. Wilmanns. 1991. 'Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments', *Eur J Immunol*, 21: 2431-5.
- Jung, G., C. J. Honsik, R. A. Reisfeld, and H. J. Muller-Eberhard. 1986. 'Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 4479-83.
- Kantarjian, H., A. Stein, N. Gokbuget, A. K. Fielding, A. C. Schuh, J. M. Ribera, A. Wei, H. Dombret, R. Foa, R. Bassan, O. Arslan, M. A. Sanz, J. Bergeron, F. Demirkan, E. Lech-Maranda, A. Rambaldi, X. Thomas, H. A. Horst, M. Bruggemann, W. Klapper, B. L. Wood, A. Fleishman, D. Nagorsen, C. Holland, Z. Zimmerman, and M. S. Topp. 2017. 'Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia', *N Engl J Med*, 376: 836-47.
- Kauer, J. 2018. 'The role of stimulating bystander cells in bispecific antibody - mediated T cell activation', Dissertation. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Kauer, J., K. Schwartz, C. Tandler, C. Hinterleitner, M. Roerden, G. Jung, H. R. Salih, J. S. Heitmann, and M. Marklin. 2019. 'CD105 (Endoglin) as negative prognostic factor in AML', *Sci Rep*, 9: 18337.
- Kohler, G., and C. Milstein. 1975. 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity', *Nature*, 256: 495-7.
- Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, J. Bogeholz, T. Kohnke, F. S. Lichtenegger, S. Schneider, K. H. Metzeler, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. A. Baeuerle, W. Hiddemann, G. Riethmuller, and M. Subklewe. 2014. 'CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330', *Blood*, 123: 356-65.
- Kuhns, M. S., M. M. Davis, and K. C. Garcia. 2006. 'Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex', *Immunity*, 24: 133-9.
- Lastres, P., T. Bellon, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, A. Acevedo, A. Gougos, M. Letarte, and C. Bernabeu. 1992. 'Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen', *Eur J Immunol*, 22: 393-7.
- Leduc, E. H., A. H. Coons, and J. M. Connolly. 1955. 'Studies on antibody production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit', *J Exp Med*, 102: 61-72.
- Li, D. Y., L. K. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness, E. C. Davis, D. G. Taylor, B. B. Boak, and D. P. Wendel. 1999. 'Defective angiogenesis in mice lacking endoglin', *Science*, 284: 1534-7.
- Li, X., Y. Ding, M. Zi, L. Sun, W. Zhang, S. Chen, and Y. Xu. 2017. 'CD19, from bench to bedside', *Immunol Lett*, 183: 86-95.

- Lim, W. A., and C. H. June. 2017. 'The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer', *Cell*, 168: 724-40.
- Liu, H., A. Saxena, S. S. Sidhu, and D. Wu. 2017. 'Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds', *Front Immunol*, 8: 38.
- Lonberg, N. 2008. 'Human monoclonal antibodies from transgenic mice', *Handb Exp Pharmacol*: 69-97.
- Lyman, S. D., and S. E. Jacobsen. 1998. 'c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities', *Blood*, 91: 1101-34.
- Lyman, S. D., L. James, T. Vanden Bos, P. de Vries, K. Brasel, B. Gliniak, L. T. Hollingsworth, K. S. Picha, H. J. McKenna, R. R. Splett, and et al. 1993. 'Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells', *Cell*, 75: 1157-67.
- Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths, and G. Winter. 1991. 'By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage', *J Mol Biol*, 222: 581-97.
- Maroc, N., R. Rottapel, O. Rosnet, S. Marchetto, C. Lavezzi, P. Mannoni, D. Birnbaum, and P. Dubreuil. 1993. 'Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase', *Oncogene*, 8: 909-18.
- Marrack, John. 1934. 'Nature of Antibodies', *Nature*, 133: 292-93.
- McKean, D., K. Huppi, M. Bell, L. Staudt, W. Gerhard, and M. Weigert. 1984. 'Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 3180-4.
- Minhajati, R., D. Mori, F. Yamasaki, Y. Sugita, T. Satoh, and O. Tokunaga. 2006. 'Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers', *Pathol Int*, 56: 717-23.
- Moreno, I., G. Martin, P. Bolufer, E. Barragan, E. Rueda, J. Roman, P. Fernandez, P. Leon, A. Mena, J. Cervera, A. Torres, and M. A. Sanz. 2003. 'Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia', *Haematologica*, 88: 19-24.
- Morrison, S. L., M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, and V. T. Oi. 1984. 'Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 6851-5.
- Neri, D., and P. M. Sondel. 2016. 'Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future', *Curr Opin Immunol*, 40: 96-102.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2008. 'Fcγ receptors as regulators of immune responses', *Nat Rev Immunol*, 8: 34-47.
- Parker, W. L., M. B. Goldring, and A. Philip. 2003. 'Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFβ receptor independent manner', *J Bone Miner Res*, 18: 289-302.
- Peeraphatdit, T. B., J. Wang, M. A. Odenwald, S. Hu, J. Hart, and M. R. Charlton. 2020. 'Hepatotoxicity From Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Management Recommendation', *Hepatology*, 72: 315-29.

- Perez, P., R. W. Hoffman, S. Shaw, J. A. Bluestone, and D. M. Segal. 1985. 'Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody', *Nature*, 316: 354-6.
- Pfluegler, M., N. K. Mehta, K. Meetze, B. Li, I. Sindel, F. Vogt, M. Marklin, J. S. Heitmann, J. Kauer, L. Osburg, L. Zekri, H. J. Bühring, S. Mueller, S. Hörner, P. A. Baeuerle, J. S. Michaelson, G. Jung, and H. R. Salih. 2022. 'A novel IgG-based FLT3xCD3 bispecific antibody for the treatment of AML and B-ALL', *J Immunother Cancer*, 10.
- Pierelli, L., G. Bonanno, S. Rutella, M. Marone, G. Scambia, and G. Leone. 2001. 'CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells', *Leuk Lymphoma*, 42: 1195-206.
- Porter, R. R. 1959. 'The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain', *Biochem J*, 73: 119-26.
- . 1963. 'Chemical Structure of Gamma-Globulin and Antibodies', *Br Med Bull*, 19: 197-201.
- Quintanilla, M., J. R. Ramirez, E. Perez-Gomez, D. Romero, B. Velasco, M. Letarte, J. M. Lopez-Novoa, and C. Bernabeu. 2003. 'Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis', *Oncogene*, 22: 5976-85.
- Ramos-Casals, M., J. R. Brahmer, M. K. Callahan, A. Flores-Chavez, N. Keegan, M. A. Khamashta, O. Lambotte, X. Mariette, A. Prat, and M. E. Suarez-Almazor. 2020. 'Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors', *Nat Rev Dis Primers*, 6: 38.
- Rodriguez-Barbero, A., J. Obreo, N. Eleno, A. Rodriguez-Pena, A. Duwel, M. Jerkic, A. Sanchez-Rodriguez, C. Bernabeu, and J. M. Lopez-Novoa. 2001. 'Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1', *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 142-7.
- Romagnani, S. 1999. 'Th1/Th2 cells', *Inflamm Bowel Dis*, 5: 285-94.
- Rosen, L. S., M. S. Gordon, F. Robert, and D. E. Matei. 2014. 'Endoglin for targeted cancer treatment', *Curr Oncol Rep*, 16: 365.
- Rosnet, O., and D. Birnbaum. 1993. 'Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases', *Crit Rev Oncog*, 4: 595-613.
- Rossi, G., and A. Nisonoff. 1968. 'Crystallization of fragment Fab of human IgG myeloma proteins', *Biochem Biophys Res Commun*, 31: 914-8.
- Ruf, P., and H. Lindhofer. 2001. 'Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody', *Blood*, 98: 2526-34.
- Rusten, L. S., S. D. Lyman, O. P. Veiby, and S. E. Jacobsen. 1996. 'The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro', *Blood*, 87: 1317-25.
- Saad, R. S., Y. L. Liu, G. Nathan, J. Celebrezze, D. Medich, and J. F. Silverman. 2004. 'Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer', *Mod Pathol*, 17: 197-203.
- Schwartz, Ronald H. 2003. 'T Cell Anergy', *Annual Review of Immunology*, 21: 305-34.
- Seder, R. A., and R. Ahmed. 2003. 'Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation', *Nat Immunol*, 4: 835-42.

- Seon, B. K., A. Haba, F. Matsuno, N. Takahashi, M. Tsujie, X. She, N. Harada, S. Uneda, T. Tsujie, H. Toi, H. Tsai, and Y. Haruta. 2011. 'Endoglin-targeted cancer therapy', *Curr Drug Deliv*, 8: 135-43.
- Singh, R., Y. Y. Setiady, J. Ponte, Y. V. Kovtun, K. C. Lai, E. E. Hong, N. Fishkin, L. Dong, G. E. Jones, J. A. Coccia, L. Lanieri, K. Veale, J. A. Costoplus, A. Skaletskaya, R. Gabriel, P. Salomon, R. Wu, Q. Qiu, H. K. Erickson, J. M. Lambert, R. V. Chari, and W. C. Widdison. 2016. 'A New Triglycyl Peptide Linker for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) with Improved Targeted Killing of Cancer Cells', *Mol Cancer Ther*, 15: 1311-20.
- Skokos, D., J. C. Waite, L. Haber, A. Crawford, A. Hermann, E. Ullman, R. Slim, S. Godin, D. Ajithdoss, X. Ye, B. Wang, Q. Wu, I. Ramos, A. Pawashe, L. Canova, K. Vazzana, P. Ram, E. Herlihy, H. Ahmed, E. Oswald, J. Golubov, P. Poon, L. Havel, D. Chiu, M. Lazo, K. Provoncha, K. Yu, J. Kim, J. J. Warsaw, N. Stokes Oristian, C. J. Siao, D. Dudgeon, T. Huang, T. Potocky, J. Martin, D. MacDonald, A. Oyejide, A. Rafique, W. Poueymirou, J. R. Kirshner, E. Smith, W. Olson, J. Lin, G. Thurston, M. A. Sleeman, A. J. Murphy, and G. D. Yancopoulos. 2020. 'A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies', *Sci Transl Med*, 12.
- Spiess, C., Q. Zhai, and P. J. Carter. 2015. 'Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies', *Mol Immunol*, 67: 95-106.
- St-Jacques, S., U. Cymerman, N. Pece, and M. Letarte. 1994. 'Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells', *Endocrinology*, 134: 2645-57.
- St-Jacques, S., M. Forte, S. J. Lye, and M. Letarte. 1994. 'Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy', *Biol Reprod*, 51: 405-13.
- Staerz, U. D., O. Kanagawa, and M. J. Bevan. 1985. 'Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells', *Nature*, 314: 628-31.
- Stieglmaier, J., J. Benjamin, and D. Nagorsen. 2015. 'Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer', *Expert Opin Biol Ther*, 15: 1093-9.
- Stirewalt, D. L., and J. P. Radich. 2003. 'The role of FLT3 in haematopoietic malignancies', *Nat Rev Cancer*, 3: 650-65.
- Stone, R. M., S. J. Mandrekar, B. L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C. D. Bloomfield, C. Thiede, T. W. Prior, K. Dohner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R. B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, J. Krauter, R. F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R. A. Larson, and H. Dohner. 2017. 'Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation', *N Engl J Med*, 377: 454-64.
- Strohl, W. R. 2018. 'Current progress in innovative engineered antibodies', *Protein Cell*, 9: 86-120.

- Suresh, M. R., A. C. Cuello, and C. Milstein. 1986. 'Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas', *Methods Enzymol*, 121: 210-28.
- Thiede, C., C. Steudel, B. Mohr, M. Schaich, U. Schakel, U. Platzbecker, M. Wermke, M. Bornhauser, M. Ritter, A. Neubauer, G. Ehninger, and T. Illmer. 2002. 'Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis', *Blood*, 99: 4326-35.
- Tiselius, A., and E. A. Kabat. 1938. 'Electrophoresis of Immune Serum', *Science*, 87: 416-7.
- Tjandra, J. J., L. Ramadi, and I. F. McKenzie. 1990. 'Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients', *Immunol Cell Biol*, 68 ( Pt 6): 367-76.
- Trentin Brum, S., A. P. Demasi, R. Fantelli Stelini, M. L. Cintra, V. Cavalcanti de Araujo, and A. Borges Soares. 2019. 'Endoglin is Highly Expressed in Human Mast Cells', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 27: 613-17.
- Tsuchikama, K., and Z. An. 2018. 'Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries', *Protein Cell*, 9: 33-46.
- Van Epps, H. L. 2006. 'Michael Heidelberger and the demystification of antibodies', *J Exp Med*, 203: 5.
- Van Wauwe, J. P., J. R. De Mey, and J. G. Goossens. 1980. 'OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties', *J Immunol*, 124: 2708-13.
- van Zelm, M. C., I. Reisli, M. van der Burg, D. Castano, C. J. van Noesel, M. J. van Tol, C. Woellner, B. Grimbacher, P. J. Patino, J. J. van Dongen, and J. L. Franco. 2006. 'An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene', *N Engl J Med*, 354: 1901-12.
- Wang, Q., Y. Chen, J. Park, X. Liu, Y. Hu, T. Wang, K. McFarland, and M. J. Betenbaugh. 2019. 'Design and Production of Bispecific Antibodies', *Antibodies (Basel)*, 8.
- Wolf, H., Y. Müller, S. Salmen, W. Wilmanns, and G. Jung. 1994. 'Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies', *Eur J Immunol*, 24: 1410-7.
- Wu, T. T., and E. A. Kabat. 1970. 'An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity', *J Exp Med*, 132: 211-50.
- Yamamoto, Y., H. Kiyoi, Y. Nakano, R. Suzuki, Y. Kodera, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, F. Yagasaki, C. Shimazaki, H. Akiyama, K. Saito, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, A. Takeshita, H. Saito, R. Ueda, R. Ohno, and T. Naoe. 2001. 'Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies', *Blood*, 97: 2434-9.
- Yu, H., E. Sotillo, C. Harrington, G. Wertheim, M. Paessler, S. L. Maude, S. R. Rheingold, S. A. Grupp, A. Thomas-Tikhonenko, and V. Pillai. 2017. 'Repeated loss of target surface antigen after immunotherapy in primary mediastinal large B cell lymphoma', *Am J Hematol*, 92: E11-E13.
- Zhang, J., L. Zhang, Q. Lin, W. Ren, and G. Xu. 2018. 'Prognostic value of endoglin-assessed microvessel density in cancer patients: a systematic review and meta-analysis', *Oncotarget*, 9: 7660-71.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

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

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

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Lukas Osburg, Dr. Joseph Kauer und Dr. Martin Pflügler von mir eigenständig durchgeführt.

Die in Kapitel 3.1.3 analysierten Antikörper wurden durch Dr. Martin Pflügler kloniert, transfiziert und aufgereinigt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 21.06.2024

David Bolland

## 8 Danksagung

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

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

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

Für die Einarbeitung in die Labortätigkeiten und Hilfsbereitschaft bei allen Fragen möchte ich mich bei Lukas Osburg und besonders Dr. Joseph Kauer bedanken.

Ebenso danke ich Dr. Martin Pflügler, der mir als Projektmanager, Betreuer und Freund bei allen Fragen und Problemstellungen tatkräftig zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön der gesamten AG Jung mit Latifa, Caro, Martin, Joseph, Sebastian, Lukas, Moustafa und Monika für die hohe Hilfsbereitschaft und die spaßige Zeit im und außerhalb des Labors.

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

Danke an meine Familie und meine Freunde, die mich unterstützt und motiviert haben.

Zuletzt möchte ich mich von Herzen bei Raika bedanken: Ohne dein Verständnis, deine Geduld, deine Unterstützung und besonders deine Motivation und deine aufopferungsvolle Art, mit der Du mir den Rücken freigehalten und gestärkt hast, wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.