

**Entwicklung von immunstimulatorischen und  
bispezifischen Antikörpern und deren Charakterisierung  
in Mausmodellen**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

M.Sc. Sebastian Hörner

aus Stuttgart

Tübingen

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

27.10.2021

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gundram Jung

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alexander Weber

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## ZUSAMMENFASSUNG

Bispezifische Antikörper, welche über den CD3-Rezeptor eine spezifische T Zellantwort am Tumor induzieren, haben in den letzten Jahrzehnten eine immer größere Bedeutung in der Krebstherapie erlangt. Bisher war der Einsatz solcher Antikörper vor allem auf hämatologische Erkrankungen beschränkt, während sie bei der Behandlung von soliden Tumoren häufig an Grenzen stoßen. Dies liegt zum einen an der mangelnden Infiltration von T Zellen in den Tumor, zum anderen an unzureichenden oder irreführenden Tierversuchsdaten. Bispezifische Antikörper werden im Laufe der präklinischen Evaluation häufig in immunsupprimierten Mäusen mit adoptiv transferierten Immunzellen erprobt, einem System, welches die komplexen Vorgänge des Immunsystems nur unzureichend abbildet.

Im ersten Teil der Arbeit wird deshalb die Etablierung eines syngenesischen Mausmodells beschrieben, um die Effizienz verschiedener bispezifischer Antikörper in Gegenwart eines funktionellen Immunsystems testen zu können. Dafür wurden bispezifische Surrogat-Antikörper im IgG<sub>1</sub> Format gegen den CD3 Rezeptor sowie die kostimulierenden Rezeptoren CD28 und 4-1BB generiert. Ziel dabei war es den Wirkmechanismus von bispezifischen anti-CD3 Antikörpern und deren Kombination mit kostimulierenden Antikörpern besser zu verstehen. Insbesondere sollte geprüft werden, ob durch die Kombinationstherapie eine verstärkte T Zellproliferation induziert werden kann, um die Behandlung von soliden Tumoren zu ermöglichen. Sowohl *in vitro* als auch in einem Lungenmetastasenmodell konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen bispezifischen Antikörper gut verträglich sind und im Besonderen die Kombinationstherapie einen deutlichen Rückgang der Tumorlast induziert.

Der zweite Teil der Arbeit fokussiert auf das Tumorentigen B7-H3 (CD276). Dieses wird bei vielen Entitäten auf dem Tumor selbst, aber auch auf den infiltrierenden Tumorgefäßen exprimiert. In diesem Zusammenhang wurde die Fragestellung untersucht, ob es durch die gezielte Lyse des Tumorendothels zu einem verstärkten Einstrom von Immunzellen kommt („*dual targeting*“). Dafür wurde eine Reihe von anti-B7-H3 Antikörpern gegen das humane und das murine Protein generiert und charakterisiert. Aufgrund mangelnder Spezifität der murinen Binder, welche auch schwach an das humane Protein binden, konnte zwar kein Beweis für die Theorie des „*dual targeting*“ erbracht werden, trotzdem schuf diese Arbeit die Grundlage für die Entwicklung eines neuen bispezifischen Antikörpers (B7-H3xCD3), der demnächst in einer klinischen Phase I Studie erprobt werden soll.

**ABSTRACT**

In the last few decades, bispecific antibodies, which induce a CD3 mediated anti-tumoral T cell response, have become increasingly important in cancer therapy. Up to now, the use of such antibodies has mainly been limited to malignancies of the hematopoietic system, while they are of limited efficacy for the treatment of solid tumors. This often results from inadequate T cell infiltration into the tumor and from insufficient or misleading animal test data. In the course of the preclinical evaluation, bispecific antibodies are often tested in immunosuppressed mice with adoptively transferred immune cells, a system that does not adequately mimic the complex processes of the immune system.

In the first part of the thesis, the establishment of a syngeneic mouse model is described, which allows the evaluation of various bispecific antibodies in the presence of a functional immune system. For this purpose, bispecific surrogate antibodies in the IgGsc format were generated against the CD3 receptor and the co-stimulating receptors CD28 and 4-1BB. The aim was to better understand the mechanism of action of bispecific anti-CD3 antibodies and their combination with co-stimulating antibodies. In particular, it should be evaluated whether this combination therapy can induce increased T cell proliferation in order to enable the treatment of solid tumors. Both in vitro and in a lung metastasis model it was possible to show that the bispecific antibodies are well tolerated and that the combination therapy induces a decrease in the tumor burden, which is superior to the anti-CD3 monotherapy.

The second part of the thesis focuses on the tumor antigen B7-H3 (CD276). In many entities this molecule is expressed on the tumor itself, but also on the infiltrating tumor vessels. In this context, it was examined whether the targeted lysis of the tumor endothelium leads to an increased influx of immune cells ("dual targeting"). For this purpose, a number of anti-B7-H3 antibodies targeting the human and the murine protein were generated and characterized. Due to the lack of specificity of the murine binders, which also show weak binding to the human Protein, no proof could be provided for the theory of "dual targeting". Nevertheless, this work created the basis for the development of a new bispecific antibody (B7-H3xCD3), which will soon be tested in a clinical phase I study.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ii</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>vii</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Krebs.....	1
1.1.1 Immunüberwachung .....	2
1.1.2 Immunevasion .....	3
1.2 Immuntherapie von Tumoren .....	4
1.2.1 Aktive Immunisierung .....	5
1.2.2 Adoptiver Zelltransfer .....	6
1.2.3 Passive Immunisierung .....	6
1.3 Antikörper.....	7
1.3.1 Die Geschichte der Antikörper .....	7
1.3.2 Die Struktur von Antikörpern .....	8
1.3.3 Wirkmechanismen von IgG Antikörpern .....	11
1.3.4 Therapeutische Antikörper .....	12
1.3.5 Bispezifische Antikörper .....	14
1.4 T Zellaktivierung .....	16
1.4.1 Physiologische T Zellaktivierung .....	16
1.4.2 T Zellaktivierung durch monoklonale Antikörper .....	18
1.4.3 T Zellaktivierung durch bispezifische Antikörper .....	19
1.5 Tumorassoziierte Antigene.....	20
1.6 Tumormodelle in Mäusen.....	22

1.6.1	Syngene Modelle .....	23
1.6.2	Xenograft-Modelle .....	24
1.6.3	Humanisierte Mausmodelle.....	25
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	26
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>27</b>
2.1	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	27
2.1.1	Klonierung neuer Antikörper .....	27
2.1.2	Restriktionsverdau, Ligation und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	28
2.1.3	Transformation von kompetenten Bakterien und Anlegen von Bakterienkulturen	29
2.1.4	DNA-Sequenzierung .....	29
2.2	Zellbiologische Methoden .....	30
2.2.1	Passagieren von Zellen.....	30
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen .....	30
2.2.3	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	31
2.2.4	Kultivierung von Hybridomen .....	31
2.2.5	Transiente Transfektion von CHO Zellen .....	32
2.2.6	Isolation von Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen und humanen PBMCs .....	33
2.3	Biochemische Charakterisierung von Antikörpern .....	33
2.3.1	Aufreinigung von Antikörpern über Protein A.....	33
2.3.2	Analytische Größenausschluss-Chromatographie.....	34
2.3.3	Analytische Gelelektrophorese .....	34
2.3.4	Verdau von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen und Analyse mittels Massenspektrometrie (MS) .....	35
2.3.5	Durchflusszytometrie .....	35
2.3.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
2.4	Funktionelle in vitro Charakterisierung von Antikörpern .....	37



2.4.1	<sup>3</sup> H-Tymidin Proliferationstest .....	37
2.4.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Antikörper vermittelten Tumorzelllyse .....	38
2.4.3	Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen (LEGENDplex) .....	39
2.4.4	xCELLigence (Echtzeit Impedanzmessung) .....	39
2.5	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten .....	40
2.5.1	Färbung von Tissue Micro Arrays (TMAs) .....	40
2.5.2	Färbung von syngenem und Xenograft-Tumoren.....	40
2.6	Mausversuche .....	41
2.6.1	Bestimmung der Serumhalbwertszeit .....	41
2.6.2	Toxizitätsmodell .....	42
2.6.3	Lungenmetastasenmodell.....	42
2.6.4	Flankenmodell.....	43
2.7	Statistik .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>45</b>
3.1	Immunstimulatorische Surrogat-Antikörper im syngenem Mausmodell .....	45
3.1.1	Generierung und Produktion in verschiedenen CHO Systemen.....	46
3.1.2	Biochemische Charakterisierung .....	48
3.1.3	Funktionelle in vitro Charakterisierung .....	51
3.1.4	T Zelldifferenzierung und Anergie.....	54
3.1.5	Serumhalbwertszeit und Verträglichkeit .....	59
3.1.6	Funktionelle in vivo Charakterisierung im Flankenmodell.....	61
3.1.7	Funktionelle in vivo Charakterisierung im Lungenmetastasenmodell .....	64
3.2	„Dual targeting über B7-H3“ – Gleichzeitige Lyse von Tumor und Tumorgefäßen	67
3.2.1	Biochemische Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper .....	68
3.2.2	Epitop Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper .....	71
3.2.3	Funktionelle in vitro Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper	75

3.2.4	Biochemische Charakterisierung Phage-Display-Antikörper .....	77
3.2.5	Generierung und biochemische Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper 80	
3.2.6	Funktionelle in vitro Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper .....	84
3.2.7	Immunhistochemische Analyse der muB7-H3 Expression in Mäusen .....	88
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
4.1	Immunstimulatorische Surrogat-Antikörper im syngenem Mausmodell .....	91
4.1.1	Generierung und biochemische Charakterisierung .....	92
4.1.2	Funktionelle in vitro Charakterisierung .....	94
4.1.3	T Zelldifferenzierung und Anergie .....	94
4.1.4	Serumhalbwertszeit und Verträglichkeit .....	96
4.1.5	Funktionelle in vivo Charakterisierung .....	97
4.1.6	Ausblick .....	98
4.2	„Dual targeting über B7-H3“ – Gleichzeitige Lyse von Tumor und Tumorgefäßen	99
4.2.1	Biochemische Charakterisierung der anti-B7-H3 Antikörper .....	100
4.2.2	Epitop Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper .....	101
4.2.3	Generierung und biochemische Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper 102	
4.2.4	Funktionelle Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper .....	103
4.2.5	Ausblick .....	104
<b>5</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>105</b>
5.1	Abbildungen .....	105
5.2	Tabellen .....	109
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>133</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1-1:</b> Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers.....	9
<b>Abbildung 1-2:</b> Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers und verschiedener bispezifischer Antikörper.....	15
<b>Abbildung 1-3:</b> Aktivierung einer T Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle.....	17
<b>Abbildung 3-1:</b> Produktion eines bispezifischen Antikörpers mit einem von 2C11 abgeleiteten scFv in verschiedenen CHO Systemen.....	47
<b>Abbildung 3-2:</b> Biochemische Charakterisierung verschiedener bispezifischer Surrogat-Antikörper im IgGsc Format.....	48
<b>Abbildung 3-3:</b> Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung verschiedener Surrogat-Antikörper mittels Durchflusszytometrie.....	50
<b>Abbildung 3-4:</b> Funktionelle in vitro Charakterisierung verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.....	52
<b>Abbildung 3-5:</b> Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.....	53
<b>Abbildung 3-6:</b> T Zelldifferenzierung in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.....	55
<b>Abbildung 3-7:</b> Aktivierung, Erschöpfung und Anergie von T Zellen in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.....	57
<b>Abbildung 3-8:</b> Einfluss der Inhibierung der PD-1/PD-L1 Interaktion auf die T Zellproliferation und –aktivierung.....	58
<b>Abbildung 3-9:</b> Serumhalbwertszeit und Verträglichkeit von zielzellrestringierten, bispezifischen anti-CD3 Surrogat-Antikörpern.....	60
<b>Abbildung 3-10:</b> Expression von TRP1 auf B16-F10 Flankentumoren.....	61
<b>Abbildung 3-11:</b> Wachstum von B16-F10 Flankentumoren in C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörpern.....	62
<b>Abbildung 3-12:</b> Wachstum von B16-F10 Flankentumoren mit Matrigel in C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörpern.....	64
<b>Abbildung 3-13:</b> Anzahl von B16-F10 Lungenmetastasen in C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörpern.....	65
<b>Abbildung 3-14:</b> Biochemische Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Antikörper, hergestellt durch Hybridom-Technologie.....	69

<b>Abbildung 3-15:</b> Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung und – Internalisierung verschiedener anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper mittels Durchflusszytometrie. ....	70
<b>Abbildung 3-16:</b> Kristallstruktur von B7-H3 und Bindestellen der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper. ....	72
<b>Abbildung 3-17:</b> Epitop Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper (1) .....	74
<b>Abbildung 3-18:</b> Epitop Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper (2). ....	75
<b>Abbildung 3-19:</b> Funktionelle in vitro Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper. ....	76
<b>Abbildung 3-20:</b> Biochemische Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Antikörper, hergestellt durch Phage-Display-Technologie. ....	78
<b>Abbildung 3-21:</b> Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung verschiedener anti-B7-H3 Phage-Display-Antikörper mittels Durchflusszytometrie.....	79
<b>Abbildung 3-22:</b> Biochemische Charakterisierung verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper im IgGsc Format.....	82
<b>Abbildung 3-23:</b> Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper mittels Durchflusszytometrie. ....	83
<b>Abbildung 3-24:</b> Induktion der T Zellproliferation verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper in Gegenwart von humanem oder murinem B7-H3. ....	85
<b>Abbildung 3-25:</b> Funktionelle in vitro Charakterisierung der immunstimulatorischen Antikörper TIM8D9xUCHT-1 und G11xUCHT-1.....	87
<b>Abbildung 3-26:</b> Expression von B7-H3 auf LNCaP Flankentumoren und Tumorgefäßen..	90
<b>Abbildung 5-1:</b> Konzentrationsabhängige Antigen-Bindung der Isotyp-Kontrolle MOPCx2C11.....	105
<b>Abbildung 5-2:</b> Konzentrationsabhängige Antigen-Bindung von 10B3x2C11.....	105
<b>Abbildung 5-3:</b> Konzentrationsabhängige Antigen-Bindung von T99huFcKo.....	105
<b>Abbildung 5-4:</b> SDS-PAGE verschiedener B7-H3-Fc Fusionsproteine. ....	106
<b>Abbildung 5-5:</b> Aminosäure-Sequenzvergleich von humanem und murinem B7-H3.....	106
<b>Abbildung 5-6:</b> Konzentrationsabhängige Bindungskompetition verschiedener anti-B7-H3 Antikörper an humanes B7-H3. ....	107
<b>Abbildung 5-7:</b> Vektorkarte des Plasmids pGH1.2. ....	108

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 2-1:</b> Ursprung der Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Proteine.....	27
<b>Tabelle 2-2:</b> Sequenzierungsprimer für die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.....	29
<b>Tabelle 2-3:</b> Konjugierte Antikörper, welche für die durchflusszytometrische Analyse von Zellen verwendet wurden. ....	36
<b>Tabelle 3-1:</b> Immunhistochemische Färbung von humanem B7-H3 auf normalem und Tumorgewebe.....	67
<b>Tabelle 3-2:</b> Eigenschaften der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper. ....	71
<b>Tabelle 3-3:</b> Immunhistochemische Färbung von murinem B7-H3 auf verschiedenen Geweben.....	89
<b>Tabelle 5-1:</b> Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer.....	109



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Krebs

Krebserkrankungen sind in der Bundesrepublik Deutschland, nach Herz-Kreislaufkrankungen, die zweithäufigste Todesursache. Jährlich gibt es etwa 480.000 Neuerkrankungen mit ca. 226.000 Todesopfern. Durch den demografischen Wandel ist die Tendenz weiter steigend. Bei Männern ist die häufigste Krebserkrankung Prostatakrebs, gefolgt von Lungen- und Darmkrebs. Bei Frauen ist es Brustkrebs, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs.

Wie Krebs entsteht, ist noch nicht bis in alle Einzelheiten geklärt. Bei einigen Krebsarten spielen genetische Veranlagungen eine besondere Rolle, bei anderen sind es vor allem Umwelteinflüsse. Dazu gehören unter anderem: Tabakkonsum, Alkoholmissbrauch, ionisierende Strahlung oder Virusinfektionen, wie durch die humanen Papillomviren <sup>1</sup>. Auch die Rolle des Immunsystems bei der Krebsentstehung ist noch nicht abschließend geklärt.

In den 1950er-Jahren versuchten Frank MacFarlane Burnet und Lewis Thomas, mit ihrer Hypothese der Immunüberwachung (*immune surveillance*), einen ersten Erklärungsansatz zu liefern <sup>2</sup>. Diese besagt, dass Immunzellen gesundes Gewebe tolerieren, während sie Tumorzellen erkennen und zerstören können. Entartete Zellen können sich dieser Kontrolle aber entziehen und unkontrolliert proliferieren <sup>3</sup>. Durch genetische Veränderungen werden sie unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren und reagieren nicht mehr auf inhibitorische Signale. Besonders gefährlich wird es immer dann, wenn Tumorzellen über die Blutgefäße andere Gewebe infiltrieren und dort Metastasen bilden. In den letzten Jahrzehnten wurden die Bemühungen intensiviert, Krebserkrankungen in ihrer ganzen Komplexität verstehen zu können. Hanahan und Weinberg postulieren, dass eine Zelle verschiedene Stadien durchlaufen muss, um zu einer Tumorzelle werden zu können <sup>4,5</sup>.

Heutzutage gibt es viele Möglichkeiten Krebs zu behandeln. Zu den Therapiemöglichkeiten gehören unter anderem operative Eingriffe, Strahlen- und Chemotherapie, Hormontherapien oder die Stammzelltherapie. Eine neue Möglichkeit bietet die sogenannte Immuntherapie, bei der das körpereigene Immunsystem im Kampf gegen den Krebs unterstützt werden soll. Welche Therapie sich schlussendlich am besten eignet, hängt von der Tumorart und dem Stadium der Krankheit ab und muss daher individuell auf jeden Patienten abgestimmt werden.

### 1.1.1 Immunüberwachung

Ein Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und Immunsystem wurde schon im 19. Jahrhundert hergestellt. Busch beschrieb 1868 die signifikante Verkleinerung eines Sarkoms nach einer lokalen Erysipel-Infektion <sup>6</sup>.

Auch andere Wissenschaftler wie Paul von Bruns und William Coley, der als „Vater der Krebsimmuntherapie“ gilt, beschrieben ähnliche Phänomene <sup>7,8</sup>. Coley verwendete später eine Mischung abgetöteter Bakterien (*Coley's Toxin*) zur Behandlung von Tumoren <sup>9</sup>. Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute ungeklärt, beruht aber wahrscheinlich auf einer Toxin-abhängigen Aktivierung des Immunsystems, was zu einer unspezifischen Lyse der Tumorzellen führt.

Etwa zur selben Zeit äußerte Paul Ehrlich die Vermutung, dass das Immunsystem das Wachstum von Tumoren verhindert, da Krebs sonst in einer viel höheren Frequenz vorkommen müsse. Es sprach dabei von einer „Schutzvorrichtung des Organismus“ <sup>10</sup>. Endgültige Gewissheit konnten hier erst viele Jahrzehnte später Experimente mit Mäusen bringen.

Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit zuvor bestrahlten und damit inaktivierten Tumorzellen immunisiert werden können. Dies hat zur Folge, dass die Mäuse bei einer weiteren, normalerweise letalen Dosis von lebenden Zellen desselben Tumors häufig geschützt sind. Diese Schutzmechanismen treten bei Mäusen ohne T Zellen nicht auf. Sie lassen sich aber durch adaptiven Transfer aus immunen Mäusen erzeugen, was beweist, dass T Zellen eine wesentliche Rolle bei der immunologischen Überwachung spielen <sup>11-13</sup>. Aus diesen Experimenten konnte geschlossen werden, dass das Immunsystem maligne von benignen Zellen unterscheiden und Tumore an speziellen tumorassoziierten Antigenen (TAA) erkennen und abstoßen kann.

Trotzdem war die von MacFarlane Burnet und Thomas aufgestellte Hypothese der Immunüberwachung lange Zeit, vor allem durch Experimente mit Nacktmäusen in den 1970er Jahren, sehr umstritten <sup>14</sup>. Nacktmäuse besitzen keinen Thymus und haben ein stark eingeschränktes Immunsystem. Trotzdem zeigen sie keine signifikant erhöhte Tumorraten, im Vergleich zu normalen Mäusen, wenn man sie mit karzinogenen Substanzen behandelt <sup>15</sup>. Einige Jahre später, wurde jedoch festgestellt, dass Nacktmäuse nicht völlig frei von T Zellen sind <sup>16,17</sup>. Außerdem verfügen sie über eine normale Anzahl von NK Zellen (natürliche Killerzellen), welche besonders effizient gegen Tumorzellen vorgehen können <sup>18-20</sup>.



Der endgültige Beweis für die Theorie der Immunüberwachung wurde erst nach der Jahrtausendwende durch Versuche mit knock-out Mäusen erbracht. Mäuse, die eine Deletion der Proteine RAG und STAT1 haben, besitzen keine adaptive Immunität mehr und auch bestimmte Mechanismen der angeborenen Immunität sind nicht mehr funktionsfähig. Dies führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, dass die Mäuse spontan oder an einem chemisch induzierten Tumor erkranken <sup>21</sup>.

### 1.1.2 Immunevasion

Heute weiß man, dass das Zusammenspiel zwischen Immunsystem und Krebs sehr kompliziert ist und auch die Vorstellungen der Immunüberwachung haben sich verändert. Die Entstehung von Krebs ist ein evolutionärer und dynamischer Prozess, an dessen Anfang die Krankheit noch vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden kann. Erfolgt die Eliminierung nicht vollständig, verändert sich der Tumor und es entstehen Mutationen, bedingt durch den vom Immunsystem ausgehenden Selektionsdruck. Diesen Vorgang bezeichnet man als „*immunoediting*“, an dessen Ende die Immunantwort verhindert wird und es zur Immunevasion kommt („*immune escape*“) <sup>3,22</sup>.

Verschiedene Tumore zeigen so zum Beispiel eine verminderte Expression von tumorassoziierten Antigenen. Bei Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass ihre Überlebensrate deutlich höher ist, wenn sie eine humorale Immunantwort gegen den Tumorzellmarker Mucin-1 (MUC-1) ausbilden <sup>23</sup>. Doch selbst wenn T Zellen mit einem Tumorantigen in Kontakt kommen, führt dies nicht zwangsläufig zur Aktivierung, weil kostimulatorische Signale fehlen, sodass die T Zellen in einen toleranten Zustand übergehen, welcher auch als Anergie bezeichnet wird <sup>24,25</sup>. Mittlerweile konnte auch eine direkte Korrelation zwischen klinischer Prognose und der Anzahl und Art der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) hergestellt werden <sup>26</sup>.

Auch die Expression von MHC („*major histocompatibility complex*“) Molekülen ist auf Tumorzellen häufig verringert, dadurch können sie nicht mehr von zytotoxischen T Zellen erkannt werden <sup>27,28</sup>. Durch eine veränderte Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Produktion kann es außerdem zu einer veränderten Expression von Untereinheiten des Proteasoms (LMP2, LMP7, LMP10 und PA28) kommen und damit zu einer veränderten Generierung von Peptiden, mit welchen die MHC Moleküle beladen werden <sup>29</sup>.

Tumore können die Immunantwort auch direkt unterdrücken. Häufig produzieren sie lösliche Faktoren wie den transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Interleukin-10 (IL-10) oder

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welche die Immunantworten direkt unterdrücken oder regulatorische T Zellen ( $T_{reg}$ ) anlocken, die ihrerseits immunsuppressiv wirken <sup>30,31</sup>.

Zusätzlich kommt es auf Tumoren häufig zu einer veränderten Expression von membranständigen Proteinen. Besonders hervorzuheben ist das Protein PD-L1, Ligand des inhibitorischen Rezeptors PD-1 („*programmed cell death protein 1*“), der von aktivierten T Zellen exprimiert wird <sup>32</sup>. Ebenso wie die Expression des Fas Liganden, welcher in der Lage ist, den programmierten Zelltod (Apoptose) in aktivierten T Zellen auszulösen <sup>33</sup>.

Auch die Mikroumgebung eines Tumors leistet häufig einen wichtigen Beitrag zur Immunevasion. Verschiedene Population von myeloischen Zellen, die man insgesamt als MDSCs („*myeloid-derived suppressor cells*“) bezeichnet, und welche noch unzureichend charakterisiert sind, produzieren zum Beispiel IL-10, welches auf dendritische Zellen und T Zellen inhibitorisch wirkt <sup>34</sup>.

Einerseits gibt es also eine ganze Reihe von Mechanismen die sicherstellen, dass das Immunsystem maligne Zellen erkennen und eliminieren kann, sie sind unter dem Begriff der Immunüberwachung zusammengefasst <sup>2</sup>. Andererseits finden im Tumor ständig genetische Veränderungen statt („*immunoediting*“), die weniger immunogene Zellen hervorbringen und ein immunsuppressives Milieu schaffen <sup>3,22</sup>. Dadurch kommt es schlussendlich zur Immunevasion und zu einem Fortschreiten der Krankheit.

Ziel einer Krebstherapie ist es, das ursprüngliche Gleichgewicht im Körper wiederherzustellen. Die Immuntherapie, welche in dieser Arbeit behandelt wird, zielt darauf ab, das körpereigene Immunsystem im Kampf gegen den Krebs zu unterstützen und soll daher im Folgenden näher behandelt werden.

## **1.2 Immuntherapie von Tumoren**

Die klassischen Behandlungsmöglichkeiten bei Krebs umfassen eine operative Entfernung des Tumors, Chemo- und Strahlentherapie. Vor allem die beiden letztgenannten Methoden sind oft mit erheblichen zytotoxischen Nebenwirkungen verbunden. Seit Jahren wird deshalb an neuen Therapiemöglichkeiten geforscht, welche eine verbesserte Spezifität und Effektivität haben, während man gleichzeitig versucht die Verträglichkeit der Medikamente zu verbessern und Nebenwirkungen zu verringern <sup>35</sup>.

In den letzten Jahren ist die Immuntherapie zu einer immer wichtiger werdenden Behandlungsmöglichkeit bei Krebs geworden. Ziel dabei ist es, das körpereigene Immunsystem im Kampf gegen den Krebs zu unterstützen. Man unterscheidet drei

Therapieansätze: die aktive Immunisierung, den adoptiven Zelltransfer und die passive Immunisierung, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen.

### **1.2.1 Aktive Immunisierung**

Die aktive Vakzinierung hat zum Ziel im Patienten eine starke und langanhaltende Immunantwort gegen die Krebszellen zu induzieren. Dies erfolgt häufig durch Peptid- oder Nukleinsäure-Vakzinierungen.

Bei der Peptidvakzinierung werden synthetische hergestellte Klasse-I- und Klasse-II-Peptide, welche von Tumorantigenen abgeleitet werden, den Patienten subkutan verabreicht <sup>36,37</sup>. Dabei werden die für die Immuntherapie geeigneten Antigene in drei Kategorien unterteilt. Tumorspezifische Antigene kommen nur auf dem Tumor selbst vor, während tumorassoziierte Antigene auf dem Tumor lediglich in höherer Anzahl vorhanden sind als auf normalen Geweben. Die dritte Kategorie sind die sogenannten Differenzierungsantigene, welche nur für die Behandlung von Tumoren aus nicht überlebenswichtigen Geweben relevant sind <sup>38</sup>. Um die Immunantwort zu verstärken, erfolgt die Gabe der Peptide häufig in einem Cocktail aus verschiedenen Peptiden, abseits der eigentlichen Tumorerkrankung und in Kombination mit einem Adjuvans <sup>39</sup>. Zu beachten ist dabei, dass die Peptide immer zu den HLA-Molekülen des Patienten passen müssen. Im Körper werden die Peptide dann von dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und den T Zellen präsentiert.

Alternativ kann auch antigencodierende DNA und RNA verwendet werden. RNA gilt als besonders vielversprechend, weil es zu keinen Insertionen ins Genom kommen kann und es durch die Aktivierung des Toll-like Rezeptors 7 (TLR7) zudem selbst als Adjuvans wirkt <sup>40,41</sup>. Die Nukleinsäuren werden von den Zellen des Patienten aufgenommen und die codierten Proteine exprimiert. Anschließend werden Peptidfragmente auf den MHC Molekülen exprimiert und eine T Zellantwort induziert.

Die erste durch die FDA zugelassene aktive Krebsimpfung ist Sipuleucel-T (Provenge®), welche zur Behandlung von Prostatakarzinomen eingesetzt wird <sup>42</sup>. Dabei handelt es sich um ein rekombinantes Protein bestehend aus der Phosphatase PAP, einem prostataspezifischen Tumorantigen, und dem Adjuvans GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor). Bei der Behandlung werden dem Patienten PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) entnommen und für 48 Stunden mit dem Fusionsprotein inkubiert. Anschließend werden die Zellen dem Patienten wieder infundiert. Allerdings ist der Einsatz dieser Behandlung umstritten, weil sich die mittlere Überlebenszeit, trotz immenser Kosten, nur um 4 Monate verlängert.

### 1.2.2 Adoptiver Zelltransfer

Beim adoptiven Zelltransfer werden dem Patienten Immunzellen verabreicht, welche direkt gegen den Tumor vorgehen<sup>43</sup>. Der Vorteil ist, dass diese Zellen *in vitro* expandiert und auf ihre Effektorfunktion selektioniert werden können. Bereits 1976 wurde eine Methode entwickelt um T Zellen *ex vivo* mit Interleukin-2 (IL-2) zu expandieren<sup>44</sup>. Später konnten in Mausmodellen auch erfolgreich Lymphome mit IL-2 aktivierten Lymphozyten behandelt werden<sup>45</sup>. Nach sehr vielversprechenden klinischen Ergebnissen mit IL-2 in den 1980er Jahren, folgte auch wenig später die klinische Zulassung durch die FDA für die Behandlung von metastasierendem Nierenzellkarzinomen sowie malignen Melanomen<sup>46</sup>. Allerdings ist die Behandlung mit IL-2 mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, was einen breiten klinischen Einsatz erschwert.

Eine besonders vielversprechenden Methode des adoptiven Zelltransfers sind die sogenannten CAR („*chimeric antigen receptor*“) T Zellen<sup>47,48</sup>. Diese Zellen besitzen genetisch veränderte T Zellrezeptoren mit einer durch einen Antikörper definierten Spezifität. Erkennt eine CAR T Zelle ihr spezifisches Tumorantigen, wird sie aktiviert und lysiert die Tumorzelle. Bei der Therapie werden dem Patienten zuerst T Zellen entnommen und diese mit IL-2 und anti-CD3 Antikörpern expandiert<sup>49</sup>. Anschließend werden die CAR-Gene mit einem retro- oder lentiviralen Vektor in die T Zellen transduziert und dem Patienten verabreicht. Die ersten beiden von der FDA zugelassenen CAR T Zelltherapien (Kymriah® und Yescarta®) binden das B Zellantigen CD19 und werden bei bestimmten B Zell-Leukämien/Lymphomen eingesetzt. Trotz bemerkenswerter klinischer Erfolge kommt es häufig zu erheblichen Nebenwirkungen durch die massive Freisetzung von Zytokinen.

### 1.2.3 Passive Immunisierung

Die wichtigste Säule der Immuntherapie sind gegenwärtig monoklonale Antikörper. Im Jahre 1997 wurde mit Rituximab der erste therapeutische Antikörper zur Behandlung von B Zell Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen<sup>50</sup>. Ein Jahr später folgte Trastuzumab zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs<sup>51</sup>. Mittlerweile sind weit über 50 monoklonale Antikörper zugelassen oder in der klinischen Erprobung<sup>52</sup>. Sie werden nicht nur in der Hämatologie und Onkologie eingesetzt, sondern auch bei Autoimmunkrankheiten und um Transplantatabstoßungen zu verhindern.

Da sich diese Arbeit mit der Charakterisierung von immunstimulatorischen Antikörpern in Mausmodellen befasst, soll im Folgenden genauer auf ihre Geschichte und Generierung,

sowie ihre Wirkmechanismen und den derzeitigen Stand der Wissenschaft eingegangen werden.

## 1.3 Antikörper

### 1.3.1 Die Geschichte der Antikörper

Ende des 19. Jahrhunderts konnten verschiedene Wissenschaftler zeigen, dass das Blut von Tieren nach einer Infektion zerstörende Wirkung auf Bakterien in Kulturen zeigt<sup>53</sup>. Im Jahre 1890 gelang es Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato an Diphtherie erkrankte Mäuse durch Übertragung von Serum aus Diphtherie-immunen Kaninchen zu heilen. Sie erkannten dabei, dass das Serum Aktivität gegen das von Bakterien produzierte Toxin besitzen muss. Diese Experimente gelten heute als Geburtsstunde und Entdeckung der Antikörper<sup>54</sup>. Behring erhielt 1901 folgerichtig den ersten Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

In den folgenden Jahren gelang es Behring und seinen Mitarbeitern, durch die Verwendung von Ziegen und Pferden, große Mengen an Seren zu produzieren und deren antitoxische Aktivität gegen das Diphtherie-Toxin zu quantifizieren<sup>55</sup>. Mit diesen nun genormten Seren behandelten Paul Ehrlich und Emil von Behring an der Charité in Berlin 220 an Diphtherie erkrankte Kinder. Der Erfolg war überwältigend. Während die Hälfte der unbehandelten Kinder an der Krankheit verstarben, konnten 64 von 66 der behandelten Kinder geheilt werden<sup>56</sup>.

Paul Ehrlich war auch der Erste, der versuchte die Struktur von Antikörpern zu erklären. In der von ihm postulierten Seitenkettentheorie ging er davon aus, dass es zur Bildung freier und spezifischer Antikörper kommt, welche das Toxin neutralisieren<sup>57</sup>. Er nahm an, dass die Antikörper dabei nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ an die Toxine binden. Für diesen Beitrag erhielt auch er 1908 den Nobelpreis für Medizin.

Durch die Arbeiten von Michael Heidelberger konnten Antikörper schlussendlich als Proteine identifiziert werden<sup>58</sup>. Einige Jahre später konnten Elvin Kabat und Arne Tiselius zeigen, dass Antikörper in der  $\gamma$ -Globulin-Fraktion von gelelektrophoretisch aufgetrennten Seren enthalten sind<sup>59</sup>. Mittels Ultrazentrifugation konnte das Molekulargewicht von Antikörpern auf ca. 150 kDa beziffert werden<sup>60</sup>. In den Jahren 1959 bis 1962 lösten die Wissenschaftler Rodney Porter, Gerald Edelman und Alfred Nisonoff schlussendlich die Quartärstruktur von Antikörpern<sup>61-63</sup>. Porter und Edelman erhielten hierfür 1972 den Nobelpreis für Medizin.

Im Jahr 1948 identifizierte Astrid Fagraeus Plasmazellen als die Antikörper-produzierenden Zellen. In den 1960er Jahren konnte gezeigt werden, dass für die Antikörperbildung Zellen

aus zwei verschiedenen Organen benötigt werden. Miller konnte nachweisen, dass die Antikörper-produzierenden Plasmazellen ihren Ursprung im Knochenmark haben, sie wurden später von Ivan Roitt als B-Lymphozyten (für „*bone marrow-derived*“) bezeichnet. Des Weiteren werden Zellen aus dem Thymus benötigt, sie wurden später als T Lymphozyten (für „*thymus-derived*“) bezeichnet <sup>64</sup>.

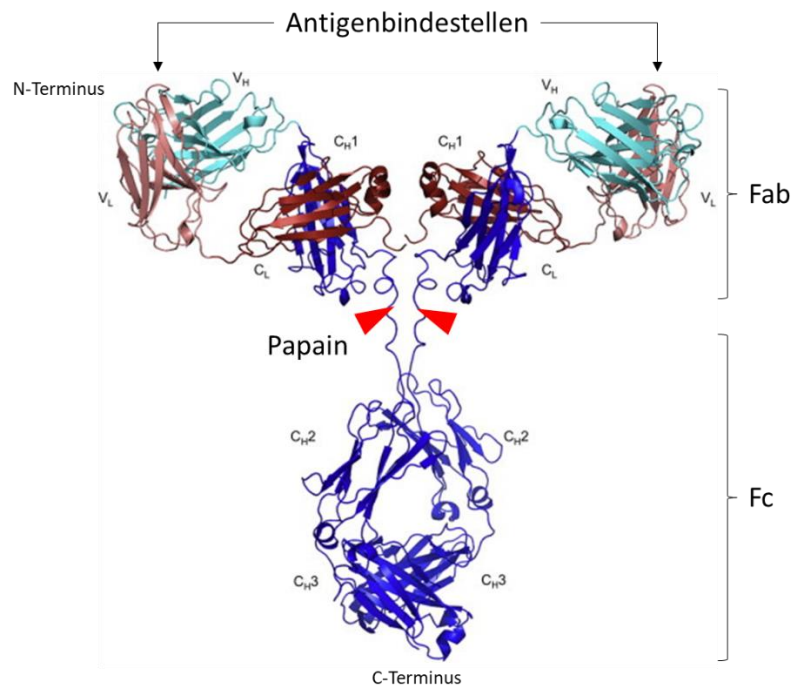
### 1.3.2 Die Struktur von Antikörpern

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern, auch Isotypen genannt, welche anhand ihrer Strukturen und Eigenschaften unterschieden werden können: IgM, IgD <sup>65</sup>, IgA <sup>66</sup>, IgE <sup>67</sup> und IgG. Von besonderer Bedeutung für die Immuntherapie ist aufgrund seiner Eigenschaften, welche nun im Folgenden erläutert werden sollen, das Immunglobulin G (IgG) (Abbildung 1-1) <sup>68</sup>. Alle Antikörper haben gemeinsam, dass sie aus paarigen schweren und leichten Ketten bestehen.

Die leichten Ketten wurden in den frühen 1960er Jahren von Gerald Edelman und Joseph Gally entdeckt <sup>69</sup>. Zur gleichen Zeit konnte Norbert Hilschmann über Peptidsequenzierung die Primärstruktur dieser Ketten auflösen <sup>70</sup>. Die leichten, aber auch die schweren Ketten, bestehen aus einer Reihe von Immunglobulindomänen mit ähnlicher Länge (ca. 110 Aminosäuren) und Struktur. Jede dieser Domänen besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, welche von einer Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Hilschmann isolierte die leichten Ketten, welche damals als Bence-Jones-Proteine bekannt waren, aus dem Urin dreier an einem Multiplen Myelom erkrankten Patienten. Er stellte fest, dass die C-terminalen Hälften der leichten Ketten alle die gleiche Peptidsequenz hatten, während die N-terminalen Ketten sich unterschieden. Die N-terminalen Domänen werden daher auch als variable Domänen ( $V_L$ ) bezeichnet und legen zusammen mit der variablen Domäne der schweren Kette ( $V_H$ ) die Antigenpezifität des Antikörpers fest. Heute kennt man zwei Typen von leichten Ketten, welche man als Lambda-( $\lambda$ -) und Kappa-( $\kappa$ -)Kette bezeichnet. Sie bestehen aus der variablen Domäne ( $V_L$ ) und einer weiteren konstanten Domäne ( $C_L$ ).

Edelman stellte außerdem fest, dass die leichte Kette (25 kDa) durch eine Disulfidbrücke mit einer schweren Kette (50 kDa) verbunden ist. Sie besteht ebenfalls aus einer variablen Domäne ( $V_H$ ) sowie drei weiteren konstanten Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ). Jedes IgG Molekül besteht dabei aus zwei identischen schweren und leichten Ketten. Rodney Porter benutzte das Enzym Papain, in Kombination mit dem reduzierenden Reagenz Cystein, um Antikörper weiter zu untersuchen <sup>71,72</sup>. Papain schneidet den Antikörper dabei in drei Teile, mit einem Molekulargewicht von je 50 kDa. Zwei davon enthalten eine Antigenbindestelle,

Porter bezeichnete sie als Fab-Fragmente („*fragment antigen binding*“). Das dritte enthält keine Antigenbindestelle, da es aber leicht zu kristallisieren war, bezeichnete er es als Fc-Fragment („*fragment crystallizable*“). Jede der fünf Antikörperklassen besitzt dabei ein anderes Fc-Fragment, welches den Effektor-Mechanismus der jeweiligen Klasse definiert. Fab- und Fc-Fragmente sind über die sogenannte Gelenkregion („*hinge region*“) miteinander verbunden. Diese verleiht den Antigenbindestellen die notwendige Flexibilität.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers.** Das Molekül besteht aus zwei schweren (V<sub>H</sub>, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3) und zwei leichten Ketten (V<sub>L</sub> und C<sub>L</sub>). Durch die Protease Pepsin entstehen zwei Fab- sowie ein Fc-Fragment, ihre Schnittstellen sind mit roten Pfeilen markiert. Modifiziert von Rouet et al. <sup>73</sup>.

Alfred Nisonoff benutzte eine andere Protease, Pepsin, wodurch ein ca. 100 kDa großes Fragment sowie viele kleine Fragmente entstanden <sup>74</sup>. Das große Fragment war ebenfalls in der Lage Antigene zu binden. Nisonoff erkannte, dass es aus zwei Fab-Fragmenten bestand und nannte es F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass auch die beiden schweren Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sein müssen. Die Wechselwirkung eines F(ab')<sub>2</sub>-Fragments (Avidität) mit seinem Antigen ist dabei häufig stärker als die eines einzelnen Fab-Fragments (Affinität).

Die variablen Domänen eines Antikörpers bestimmen, wie bereits erwähnt, dessen Spezifität. Dafür sind besondere Strukturen innerhalb der variablen Domänen verantwortlich, man bezeichnet sie als hypervariable Regionen oder komplementaritäts-bestimmende Regionen („*complementarity determining regions*“, CDRs). Wu und Kabat beschrieben 1970, dass jede

variable Domäne drei solcher CDRs besitzt, welche von sogenannten Gerüststrukturen („*framework regions*“) flankiert werden <sup>75</sup>.

Der menschliche Körper kann auf nahezu jede Substanz eine Antikörperantwort hervorrufen. Dies bedeutet, dass das Antikörperrepertoire eines Menschen riesig sein muss, es umfasst mindestens  $10^{11}$  verschiedene Antikörpermoleküle.

Die hohe Vielfalt kommt durch einen Prozess zustande, den man somatische Rekombination nennt <sup>76,77</sup>. Die leichte Kette besteht aus zwei Gensegmenten, dem V-Gensegment („*variable*“) und dem J-Gensegment („*joining*“). Insgesamt gibt es für die leichte Kette 34-38 bzw. 29-33 funktionelle V-Gensegmente für die  $\kappa$ - bzw. die  $\lambda$ -Kette, sowie 5 bzw. 4-5 J-Gensegmente für die  $\kappa$ - bzw. die  $\lambda$ -Kette. Bei der Reifung von B Zellen im Knochenmark können diese Gensegmente beliebig kombiniert werden. So kann aus einer begrenzten Anzahl von Genen eine große Anzahl von Antikörpern generiert werden <sup>78</sup>. Das V-Gensegment codiert dabei für die ersten 95-101 Aminosäuren und beinhaltet damit auch CDR1, CDR2 sowie Teile von CDR3. Der Rest von CDR3 wird durch das J-Gensegment codiert. Die variable Domäne der schweren Kette wird zusätzlich von einem dritten Genabschnitt codiert, dem D-Gensegment („*diversity*“, 23 Genabschnitte) <sup>79</sup>. Dieses liegt zwischen dem V-Gensegment (38-46 Genabschnitte) und dem J-Gensegment (6 Genabschnitte) der schweren Kette.

Während dem Zusammenfügen der oben genannten Gensegmente werden auch häufig Nukleotide eingefügt oder entfernt. Dies bezeichnet man als junktionale Diversität und erhöht die Antikörpervielfalt weiter <sup>80,81</sup>. In aktivierten B-Zellen, welche also Antigenkontakt hatten, kommt es zusätzlich zu einem Vorgang den man somatische Hypermutation nennt <sup>82</sup>. Dabei kommt es zu Punktmutationen in den umgelagerten Genen der V-Regionen. Dadurch werden B Zellklone mit einer stärkeren Antigenbindung selektiert.

Wie bereits oben beschrieben, gibt es zwei verschiedene Arten von leichten Ketten, die man als die  $\kappa$ - bzw. die  $\lambda$ -Kette bezeichnet. Ein Antikörper hat immer entweder die eine oder die andere Kette, niemals beide. Bisher konnte kein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Typen festgestellt werden und sie kommen auch in allen fünf Antikörperklassen vor. Zusätzlich gibt es fünf Arten von schweren Ketten, welche die Effektorfunktion des Antikörpers sowie dessen Isotyp definieren:  $\gamma$ 1-4 (IgG1-4),  $\mu$  (IgM),  $\alpha$  (IgGA1-2),  $\epsilon$  (IgE) und  $\delta$  (IgD). Die Antikörperklassen unterscheiden sich dabei in Struktur, Molekulargewicht, Serumkonzentration und biologischer Funktion. Für die Immuntherapie eignen sich im Besonderen die Moleküle des IgG Isotyps. Dies liegt unter anderem an ihrer hohen



Halbwertszeit von bis zu drei Wochen und ihrer guten Penetration in extravaskuläre Bereiche. Ihre weiteren Eigenschaften sollen nun im nächsten Kapitel erläutert werden.

### 1.3.3 Wirkmechanismen von IgG Antikörpern

Krankheitserreger wie Viren oder Bakterien dringen gewöhnlich über die Epithelien in den Körper ein. Antikörper haben die Aufgabe Schleimhäute, Gewebe und Blut vor solchen Infektionen zu schützen.

Viele Bakterien verursachen Krankheiten, indem sie Toxine (z.B. Diphtherie und Tetanus) produzieren, welche die Funktion der Wirtszellen einschränken oder unmöglich machen. IgG Antikörper können das Andocken von Toxinen, pathogenen Viren oder Bakterien an die Wirtszelle verhindern. Sie binden dabei Strukturen, welche essenziell für die Interaktion mit der Wirtszelle sind. IgG Antikörper sind hierbei, begünstigt durch ihre hohe Affinität und gute Penetration in den extrazellulären Raum, besonders effektiv <sup>83</sup>.

Antikörper können auch den klassischen Weg des Komplementsystems aktivieren <sup>84</sup>. Dabei bindet das Protein C1q an die C<sub>H2</sub> Domänen von mindestens zwei IgG Molekülen, welche ein einziges Pathogen gebunden haben. Durch die Signalkaskade des Komplementsystems wird die Oberfläche schlussendlich kovalent mit dem Komplementfragment C3b bedeckt. Dieses Protein markiert die Pathogene und fördert die Opsonierung durch Phagozyten. Diesen Vorgang bezeichnet man als Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität („*complement-dependent cellular cytotoxicity*“, CDCC). Zusätzlich kann über das Komplementprotein C5b auch ein membranangreifender Komplex („*complement membrane attack complex*“, MAC) gebildet werden. Dadurch entsteht in der Zellmembran eine Pore, die zur Lyse der Zelle führt.

Viele Erreger können aber nicht direkt von Antikörpern neutralisiert werden. Ein anderer wichtiger Abwehrmechanismus ist daher die Aktivierung verschiedener Effektorzellen mittels sogenannter Fc-Rezeptoren, welche das Fc-Fragment von Antikörpern erkennen <sup>85</sup>. Man kennt vier verschiedene Fc $\gamma$ -spezifische Rezeptoren: drei aktivierende Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32) und Fc $\gamma$ RIII (CD16), sowie einen inhibierenden Fc $\gamma$ RIIB (CD32). Verschiedene Zelltypen des Immunsystems besitzen unterschiedliche Kombinationen dieser Rezeptoren und werden dadurch unterschiedlich gesteuert. Nur  $\alpha\beta$ -T Zellen exprimieren keine Fc-Rezeptoren.

Makrophagen, Dendritische Zellen und Neutrophile können über Fc-Rezeptoren Antikörper-Antigen-Komplexe erkennen und aufnehmen. Diesen Prozess bezeichnet man als Antikörper-vermittelte zelluläre Phagozytose („*antibody-dependent cellular phagocytosis*“, ADCP).

Entscheidend ist bei der Phagozytose, dass Fc-Rezeptoren nur Antikörper welche an Pathogene gebunden haben mit ausreichender Affinität erkennen. Durch diesen Prozess kann auch die adaptive Immunantwort stimuliert werden, indem das aufgenommene Antigen prozessiert wird und die Peptide auf HLA Klasse I Molekülen T Zellen präsentiert werden.

Eine Ausnahme bilden die NK Zellen, welche nur den aktivierenden Fc-Rezeptor FcγRIII exprimieren. Erkennen sie an die Oberfläche einer Zelle gebundene Antikörper über ihre Fc-Rezeptoren, zerstören sie diese über einen Vorgang, den man als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität („*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*“, ADCC) bezeichnet <sup>86</sup>. Dabei werden von den NK Zellen große Menge von Perforin und von Granzymen freigesetzt. Diese Mechanismen werden vom Körper normalerweise genutzt, um sich virusinfizierter Zellen zu entledigen. Heute bilden sie aber auch oft die Grundlage für den Einsatz von Antikörper-basierten Immuntherapien wie Rituximab oder Trastuzumab <sup>87</sup>.

#### **1.3.4 Therapeutische Antikörper**

Schon Paul Ehrlich hatte postuliert, dass Antikörper die perfekten „Zauberkekeln“ für die zielgerichtete Behandlung von Krankheiten wären. Im Jahre 1975 gelang es Georges Köhler und Cesar Milstein B Zellen mit Myelomzellen zu fusionieren und zu immortalisieren <sup>88</sup>. Dadurch konnten B Zellen mit bekannter Antikörperspezifität kultiviert und die Antikörper aus dem Medium gewonnen werden. Dies war der Grundstein für die Generierung von monoklonalen Antikörpern, welche heute vielfältig in Forschung, klinischer Diagnostik und Medizin eingesetzt werden. Für ihre Arbeit wurden Köhler und Milstein 1984 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt.

Der erste monoklonale therapeutische Antikörper, der gegen T Zellen gerichtete Muromonab-CD3, wurde 1986 zur Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen zugelassen <sup>89-91</sup>. Allerdings musste man schnell feststellen, dass murine Antikörper eine Immunreaktion bei den Patienten auslöst <sup>92</sup>. Diese bilden mit der Zeit humane anti-Maus-Antikörper (HAMA), welche den therapeutischen Antikörper neutralisieren.

Um die Immunogenität von murinen Antikörper zu senken, wurde bei therapeutischen Antikörpern der nächsten Generation das murine Fc-Fragment durch ein humanes ersetzt. Dadurch wird die Spezifität des murinen Antikörpers beibehalten und die Interaktion mit humanen Fcγ-Rezeptoren kann verbessert werden <sup>93</sup>. Ein prominentes Beispiel für einen solchen chimären Antikörper ist Rituximab, welcher erfolgreich bei der Behandlung maligner B Zelllymphome eingesetzt wird <sup>94</sup>.

In der Folge wurden murine Antikörper immer weiter humanisiert. Heutzutage werden häufig nur noch die CDRs des murinen Antikörpers, mittels molekularbiologischer Methoden, in ein humanes Antikörpergerüst eingebettet („*CDR-grafting*“) <sup>95</sup>. 1985 entwickelt George P. Smith eine Möglichkeit komplett humane Antikörper zu generieren <sup>96</sup>. Bei der sogenannten „*Phage Display*“ Technologie werden große Bibliotheken aus humanen V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> Genen erstellt und auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Für seine Entdeckung erhielt Smith zusammen mit Greg Winter 2018 den Nobelpreis für Chemie. Mittlerweile gibt es auch transgene Mäuse, bei denen die Gensegmente für die variablen Regionen durch die entsprechenden humanen Sequenzen ausgetauscht wurden. Nach der Immunisierung produzieren sie komplett humane Antikörper <sup>97</sup>.

Während die variablen Domänen die Spezifität des Antikörpers festlegen, ist das Fc-Fragment entscheidend für dessen Effektor-Eigenschaften. Viele therapeutische Antikörper besitzen deshalb optimierte Fc-Fragmente. Häufig werden dabei gezielt Mutationen in die C<sub>H2</sub>-Domäne der Antikörper eingebaut, um die Wechselwirkung mit Fc-Rezeptoren zu optimieren <sup>98</sup>.

Oft soll die Affinität für den Rezeptor FcγRIIIa, welcher auf NK Zellen exprimiert wird und ADCC vermittelt, verbessert werden. Ändert man zum Beispiel nur drei Aminosäuren im Fc-Fragment von Trastuzumab (S239D/I332E/A330L, DLE), führt dies zu einer 100-fach verbesserten Zelllyse <sup>99,100</sup>. Umgekehrt kann man durch die Kombination unterschiedlicher Mutationen die Fc-Rezeptorbindung auch minimieren, um ungewünschte Nebenwirkungen zu verhindern. Die Mutationen L234A/L235A (LALA) reduzieren die Fc-Rezeptorbindung um mehr als das 100-fache <sup>101</sup>.

Das Fc-Fragment von IgG1 Antikörpern weist an Position N297 eine N-Glykosylierung auf, welche ebenfalls von enormer Bedeutung für die Interaktion mit Fc-Rezeptoren ist. Diese Glykosylierung kann aus verschiedenen Zuckerresten zusammengesetzt sein. Entfernt man zum Beispiel die Fucosereste der Glykosylierung, führt dies zu einer 50-fach verbesserten Bindung an den FcγRIIIa und zu einer verstärkten ADCC <sup>102</sup>.

Des Weiteren wurde viele Versuche unternommen die Halbwertszeit von Antikörpern zu verlängern. In vivo wird diese durch die Interaktion mit dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) reguliert. Dieser Rezeptor wird im Darm, in der Leber und auf Endothelzellen exprimiert und hat die Aufgabe den IgG-Spiegel im Serum stabil zu halten. Versuche in Affen konnten zeigen, dass die Mutationen M252Y/S254T/T256E (YTE) die Serumhalbwertszeit von IgG Antikörpern um das bis zu vierfache steigern können <sup>103</sup>. In einer späteren Phase I Studie

konnte eine Serumhalbwertszeit von bis zu 100 Tagen im Menschen ermittelt werden; normalerweise liegt sie bei 21 Tagen <sup>104</sup>.

Eine weitere Möglichkeit das Potential therapeutischer Antikörper zu steigern, ist sie über einen Linker mit zytotoxischen Substanzen zu koppeln („*antibody-drug conjugate*“, ADC). Das erste zugelassene ADC war Gemtuzumab-Ozogamicin im Jahr 2001 <sup>105</sup>. Es besteht aus einem humanisierten Antikörper gegen das auf akuter myeloischer Leukämie exprimierte Antigen CD33. Bindet der Antikörper an das Antigen, wird er samt gekoppeltem Toxin in die Zellen aufgenommen, wo das Toxin freigesetzt wird. Im Fall von Gemtuzumab-Ozogamicin handelt sich um das Toxin Calicheamicin, welches Doppelstrangbrüche in die DNA induziert.

Beeindruckte Ergebnisse wurden auch mit sogenannten Immunzytokinen („*immunocytokines*“) erzielt. Dabei werden immunstimulierende Zytokine wie IL-2, IL-15, IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  („*tumor necrosis factor-alpha*“) kovalent mit Antikörpern verknüpft, wodurch ihre Konzentration um Tumor erhöht werden soll <sup>106-108</sup>.

Antikörper mit optimiertem Fc-Teil konnten bereits erste klinische Erfolge für sich verbuchen, finden aber bisher kaum Anwendung bei der Behandlung von soliden Tumoren. Die Ursache dafür ist häufig eine geringe Verfügbarkeit von Effektorzellen und eine mangelhafte Interaktion dieser Zellen mit den Antikörpern <sup>109,110</sup>. Ein potenziell effizienterer Ansatz ist daher die Generierung von sogenannten bispezifischen Antikörpern, welche zytotoxische T Zellen am Tumor aktivieren können. Auf Grund ihrer Bedeutung für diese Arbeit, sollen sie im nächsten Abschnitt näher behandelt werden.

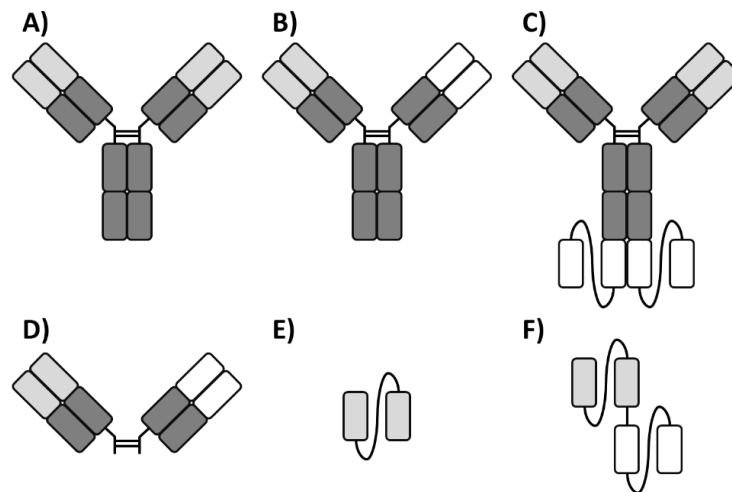
### **1.3.5 Bispezifische Antikörper**

Bispezifische Antikörper kombinieren die Spezifität von zwei unterschiedlichen Antikörpern und sind dadurch in der Lage zwei unterschiedliche Antigene zur selben Zeit zu binden (Abbildung 1-2). In der Immuntherapie werden bispezifische Antikörper eingesetzt, um verschiedene Effektorzellen zum Tumor zu führen. Dort sollen sie dann gezielt aktiviert werden und gegen die malignen Tumorzellen vorgehen. Dieser Effekt wird durch eine simultane Bindung eines Antigens auf der Tumorzelle und eines aktivierenden Moleküls auf der Effektorzelle erreicht.

Die ersten bispezifischen Antikörper wurden in den 1960er Jahren durch Alfred Nisonoff beschrieben, als Fab-Fragmente aus zwei unterschiedlichen polyklonalen Seren zu F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten miteinander verknüpft wurden <sup>111</sup>. Der große Durchbruch folgte 1975 durch die Etablierung der Hybridom-Technologie, welche es möglich machte Antikörper mit

definierter Spezifität zu entwickeln<sup>88</sup>. Durch die chemische Konjugation zweier monoklonaler Antikörper konnten bispezifische Antikörper ebenso hergestellt werden, wie durch die Fusion zweier Hybridomlinien zu einem sogenannten Quadrom<sup>112,113</sup>.

Mit bispezifischen Antikörpern kann so gut wie jede Zellpopulation als Effektorzelle rekrutiert werden. NK Zellen, Makrophagen und Monozyten können durch CD16 aktiviert werden und neutrophile Granulozyten über CD64. Von besonderer Bedeutung ist, dass mit bispezifischen Antikörpern auch T Zellen aktiviert werden können<sup>114</sup>. Bei ihnen handelt es sich um die potenteste Gruppe immunologischer Zellen, weil sie stark proliferieren können und ein hohes zytotoxisches Potenzial besitzen. Allerdings exprimieren sie keine Fc-Rezeptoren, weshalb eine Aktivierung durch monospezifische Antikörper nicht möglich ist.



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers und verschiedener bispezifischer Antikörper. A) Monospezifischer IgG Antikörper. B) Bispezifisches Quadroma. C) Tetravalenter und bispezifischer IgGsc. D) Chemisch konjugiertes und bispezifisches F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. E) scFv. F) Bispezifisches BiTE.**

2009 wurde mit Catumaxomab der erste bispezifische Antikörper zugelassen, welcher T Zellen aktivieren kann. Er wurde mittels Quadrom-Technologie hergestellt und wird bei der Behandlung von Peritonealkarzinomen eingesetzt<sup>115</sup>. Catumaxomab bindet einerseits das Tumorantigen EpCAM („*epithelial cell adhesion molecule*“) und andererseits das Antigen CD3, welches auf T Zellen exprimiert wird und zu deren Aktivierung führt. Zusätzlich hat Catumaxomab aber auch ein intaktes Fc-Fragment, welches über die Bindung an FcγRI und FcγRIIIa dendritische Zellen, NK-Zellen und Makrophagen aktivieren kann.

Von besonderer klinischer Relevanz ist das sogenannte BiTE-Format („*bispecific T cell engager*“), mit seinem prominenten Vertreter Blinatumomab<sup>116</sup>. Blinatumomab bindet

ebenfalls das T Zellantigen CD3, sowie das Oberflächenprotein CD19 auf B Zellen und wurde 2014 für die Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zugelassen. Ein BiTE besteht aus zwei sogenannten scFv-Fragmenten („*single chain fragment variable*“). Dabei handelt es sich um die kleinste antigenbindende Einheit, wobei die  $V_H$  und die  $V_L$  Domäne eines Antikörpers über einen kurzen Peptidlinker verbunden sind.

Heutzutage kennt man über 100 verschiedene Formate bispezifischer Antikörper <sup>117</sup>. Die Wahl des richtigen Formats ist dabei entscheidend für den Therapieerfolg. Antikörper mit einem Fc-Fragment und einem hohen Molekulargewicht haben eine hohe Serumhalbwertszeit, während bei kleinen Molekülen, wie BiTEs, häufig einer Dauerinfusion notwendig ist. Diese haben dafür häufig eine verbesserte Gewebspenetration und einen besseren Zugang zu Antigenen <sup>118</sup>.

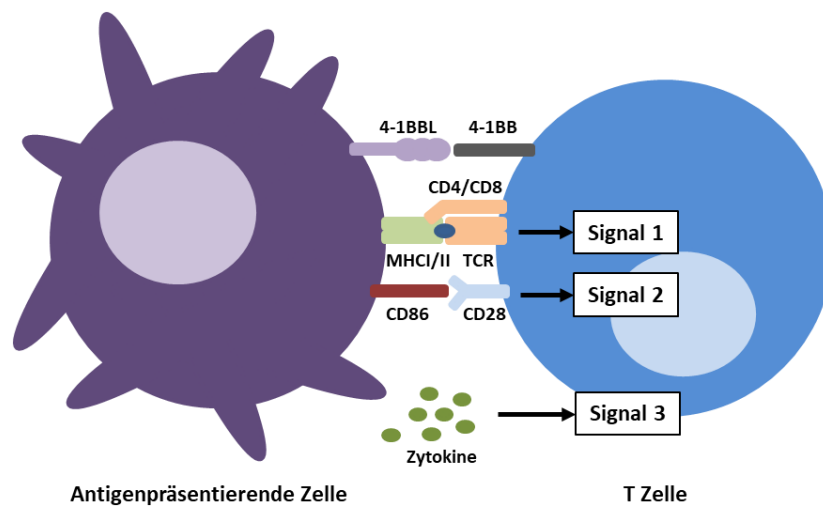
Diese Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Generierung neuer bispezifischer Antikörper zur tumorspezifischen Aktivierung von T Zellen <sup>119</sup>. Deshalb sollen im Folgenden die zellbiologischen Grundlagen zur T Zellaktivierung näher erläutert werden.

## 1.4 T Zellaktivierung

### 1.4.1 Physiologische T Zellaktivierung

Im Gegensatz zu Antikörpern, welche direkt in Wechselwirkung mit Pathogenen oder Toxinen treten können, erkennen T Zellen fremde Antigene nur in Form von Peptiden, welche von auf körpereigenen Zellen exprimierten MHC-Molekülen präsentiert werden (Abbildung 1-3). Unter physiologischen Bedingungen erkennen T Zellen diesen Komplex über ihren T Zellrezeptor („*T cell receptor*“, TCR), einem Protein, welches in seiner Struktur dem Fab-Fragment eines Antikörpers sehr ähnlich ist. Jeder TCR besteht aus zwei Polypeptidketten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. In den meisten Fällen handelt es sich um eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette, seltener um eine  $\gamma$ - und eine  $\delta$ -Kette. Jede Kette besteht aus einer variablen Region, einer konstanten Domäne und einem kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich, welcher nach Aktivierung, zusammen mit dem Adapterprotein CD3, für die intrazelluläre Signalweiterleitung verantwortlich ist <sup>120,121</sup>. Diese wird durch die sich gegenseitig ausschließenden Co-Rezeptoren CD4 und CD8 unterstützt. CD4 positive T Zellen werden auch als T Helferzellen bezeichnet und unterstützen B Zellen bei der Ausdifferenzierung, sowie Makrophagen und zytotoxische T Zellen bei der Aktivierung. Letztere sind durch das Molekül CD8 definiert und induzieren durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen, oder durch die Expression des Fas-Liganden Apoptose in z.B. virusinfizierte Zellen.

Die Interaktion zwischen TCR und MHC, auch als Erstsinal bezeichnet, führt jedoch nur zu einer kurzzeitigen Aktivierung der T Zelle, welche anschließend häufig in einen inaktiven Zustand - auch als Anergie bezeichnet - fällt, oder sogar stirbt <sup>24,25</sup>. Dies wird durch sogenannte kostimulatorische Signale verhindert. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Interaktion zwischen dem auf T Zellen konstitutiv exprimierten CD28 und seinen Liganden CD80 und CD86, welche auf antigenpräsentierenden Zellen („antigen presenting cell“, APC) exprimiert werden <sup>122</sup>. Häufig spielen aber auch Vertreter der TNF Rezeptorfamilie eine wichtige Rolle. Dazu zählen im Besonderen Ox40 (CD134) und 4-1BB (CD137), welche im Gegensatz zu CD28 erst nach Aktivierung der T Zelle durch das primäre Signal exprimiert werden <sup>123-126</sup>. Kostimulatorische Moleküle sorgen so für eine verstärkte und langanhaltende Proliferation der T Zellen.



**Abbildung 1-3: Aktivierung einer T Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle.** T Zellen benötigen für eine langanhaltende Aktivierung und Differenzierung drei Signale. Das erste ist die Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptidkomplex, das zweite ist ein Kostimulator wie CD28 oder 4-1BB und das dritte Signal wird durch Zytokine vermittelt.

Neben den direkten Zell-Zell-Kontakten zwischen T Zellen und APCs spielen auch Zytokine eine wichtige Rolle <sup>127</sup>. Das zu Beginn einer Infektion von Makrophagen ausgeschüttete TNF- $\alpha$  fördert die Einwanderung und Aktivierung von Lymphozyten. Durch die anschließende Bildung von IL-12 kommt es zur Differenzierung naiver CD4 Zellen und zur Aktivierung zytotoxischer T Zellen, welche nun das autokrin wirkende IL-2 bilden <sup>128</sup>. Dies führt zur verstärkten Proliferation und der Bildung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  <sup>129</sup>.

Eine Integration dieser drei Signale verhindert Anergie und sorgt für die Proliferation und die Differenzierung von naiven T Zellen zu sogenannten Effektorzellen <sup>130,131</sup>. Im Verlauf der Immunantwort bilden sich auch zentrale Gedächtniszellen, die spezifisch für ein bereits

erkanntes Antigen sind und für lange Zeit im Körper verbleiben. Sie halten sich wie naive T Zellen eher in den lymphatischen Organen auf, können aber bei erneutem Antigenkontakt als Effektor-Gedächtniszellen, mit einem hohen zytotoxischen Potential, wieder in das periphere Gewebe migrieren.

In den vergangenen Jahren wurden immer weitere Regulatoren der T Zell-abhängigen Immunantwort entdeckt <sup>122</sup>. In diesem Zusammenhang soll noch besonders das Protein PD-1 erwähnt werden <sup>132</sup>. Es wird von aktivierten T Zellen exprimiert und ist an der Hemmung der T Zellantwort beteiligt, indem es unter anderem die Genexpression von IL-10 einleitet, welches seinerseits die CD28 Signalgebung und Bildung verschiedener Zytokine inhibiert, und somit eine überschießende Immunreaktion verhindert <sup>133</sup>.

#### **1.4.2 T Zellaktivierung durch monoklonale Antikörper**

Ein wichtiger Ansatz bei der Immuntherapie von Tumoren ist die Modulation der T Zellantwort mit Antikörpern, entweder durch Interaktion mit dem TCR oder mit kostimulatorischen Molekülen. Dabei versucht man die physiologische T Zellaktivierung durch Antikörper nachzuahmen.

Der erste in diesem Zusammenhang zugelassene Antikörper war der bereits erwähnte Muromonab-CD3, welcher für die Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen zugelassen wurde. Er bindet an das Molekül CD3, welches als Co-Rezeptor des TCR fungiert. Dies führt zu einer kurzzeitigen Aktivierung der T Zellen, durch das Fehlen eines kostimulatorischen Signals werden die T Zellen im späteren Verlauf jedoch anerg und sterben <sup>89-91</sup>. Die Gabe von Muromonab-CD3 kann jedoch auch zu starken Nebenwirkungen führen <sup>134</sup>. Durch die Interaktion des Antikörpers mit Fc $\gamma$  Rezeptoren werden, besonders nach der ersten Infusion, unspezifisch T Zellen aktiviert und es kommt zu einer massiven Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Dies wird als Zytokinfreisetzungssyndrom („*cytokine release syndrome*“, CRS) bezeichnet und kann zu Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Muskel- und Gelenkschmerzen führen.

Sogenannte CD28 „Superagonisten“, wie der Antikörper TGN1412 (Theralizumab), können T Zellen unabhängig vom TCR über das kostimulatorische Molekül CD28 aktivieren <sup>135,136</sup>. TGN1412 führt zur Expansion von regulatorischen T Zellen. Sie regulieren das Immunsystem und sorgen für Selbsttoleranz, indem sie u.a. anti-inflammatorische Zytokine ausschütten. In Tiermodellen konnte TGN1412 erfolgreich bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden <sup>137-139</sup>. Im Jahr 2006 wurde der Antikörper im Rahmen der Phase-I-Studie an acht Probanden getestet. Nach weniger als einer Stunde kam es jedoch auch hier zu einer



massiven Freisetzung von Zytokinen <sup>140</sup>. Bereits nach wenigen Stunden litten die Probanden an multiplen Organversagen und mussten auf die Intensivstation verlegt werden.

Antikörper wie Urelumab und Utomilumab binden an das Antigen 4-1BB, welches T und NK Zellen nach ihrer Aktivierung exprimieren <sup>141</sup>. Dies führt zur Sekretion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ , sowie zu einer vermehrten Bildung von anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie <sup>126,142,143</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass agonistische 4-1BB Antikörper dadurch in der Lage sind T Zellanergie zu verhindern und zu durchbrechen <sup>144</sup>. Die ersten klinischen Daten mit Urelumab waren zwar vielversprechend, es kam jedoch auch zu einer dosisabhängigen Lebertoxizität <sup>145</sup>. Dies erfolgt wahrscheinlich durch eine MHC-unabhängige und unspezifische Aktivierung von Effektor-Gedächtniszellen in der Leber <sup>146</sup>. Utomilumab zeigt ein verbessertes Sicherheitsprofil im Vergleich zu Urelumab <sup>147</sup>. Die Gründe sind noch nicht abschließend geklärt, liegen aber u.a. in der agonistischen Aktivität, dem Epitop, dem Isotyp und der Fähigkeit den Liganden 4-1BBL zu blockieren.

Mittlerweile versucht man mit Antikörpern noch viele weitere immunregulatorische Moleküle bei der Immuntherapie zu nutzen <sup>148</sup>. Besonders vielversprechend ist hier das regulatorische System PD-L/PD-L1, mit bereits sechs zugelassenen Antikörpern. Die meisten dieser Antikörper haben eine verringerte Bindung an das Komplementsystem und Fc-Rezeptoren um Nebenwirkungen zu reduzieren <sup>149</sup>. Trotzdem können bei der Therapie Hautausschläge, Colitis oder Hepatitis auftreten <sup>150</sup>.

### **1.4.3 T Zellaktivierung durch bispezifische Antikörper**

Trotz vieler Erfolge bei der Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern kommt es häufig zu Nebenwirkungen. Meist geschieht dies durch eine systemische, nicht auf den Tumor konzentrierten T Zellaktivierung. Dadurch kommt es zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen (CRS) oder zu Schädigungen der Leber <sup>134,140,146,150</sup>. Bispezifische Antikörper könnten hier die Lösung des Problems sein. Durch ihre zwei Spezifitäten können sie einerseits an ein tumorassoziiertes Antigen binden und andererseits an ein immunmodulierendes Molekül. Dies führt zu einer Tumorzell-restringierten Aktivierung des Immunsystems und zu einer Reduktion der Nebenwirkungen <sup>151</sup>.

Bereits 1985 wurden die ersten bispezifischen Antikörper entwickelt, welche durch die Interaktion mit CD3 zu einer Tumorzell-abhängigen T Zellantwort führen <sup>152,153</sup>. Wie bereits eingangs erwähnt, folgten mit Catumaxomab (2009) und Blinatumomab (2014) die ersten klinischen Zulassungen für bispezifische Antikörper, die auf eben diesem Mechanismus basieren <sup>115,116</sup>. Ein häufiges Problem ist jedoch, dass eine Interaktion mit dem TCR alleine

nicht zu einer langfristigen T Zellaktivierung, sondern zu Anergie oder zum Zelltod führt<sup>24,25</sup>. Außerdem können so nur T Gedächtniszellen zur Proliferation angeregt werden, während naive Zellen deutlich abhängiger von einem Kostimulus sind<sup>154-156</sup>.

Jung et al. postulierten deshalb schon 1987 die Kombination von zwei verschiedenen bispezifischen Antikörpern, mit der Idee die physiologische T Zellaktivierung besser abzubilden. Es konnte gezeigt werden, dass die simultane Stimulation der T Zelle durch CD3 und CD28 zu einer stärkeren T Zellproliferation und Tumorzelllyse führt<sup>157-161</sup>. Allerdings kam die Entwicklung neuer bispezifischer Antikörper mit CD28 durch den Vorfall mit TGN1412 ins Stocken. Erst durch neuere Studien rückte die Kombinationstherapie wieder stärker in den Fokus. Sie setzen auf verbesserte und stärker auf den Tumor beschränkte T Zellaktivierung unter Vermeidung von CD28 Superagonisten<sup>162</sup>.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass auch die Verwendung von agonistischen 4-1BB Antikörper einen positiven Effekt auf die Behandlung mit bispezifischen CD3 Antikörpern hat<sup>163</sup>. Durch ein immer besseres Verständnis der molekularen Vorgänge bei der T Zellaktivierung, weiß man heute, dass die PD-L/PD-L1-Interaktion CD28 aus dem synaptischen Spalt zwischen T und Tumorzelle verdrängt. Antikörper, welche diese Interaktion blockieren, können so die Aktivität von bispezifischen CD28 Antikörpern signifikant steigern<sup>164</sup>.

Im Allgemeinen sind bispezifische Antikörper heute gut verträglich. Dies liegt auch an den immer besseren Möglichkeiten Nebenwirkungen zu behandeln. Die teils lebensbedrohliche Freisetzung von Zytokinen kann mit Steroiden wie Dexamethason behandelt werden, dies führt jedoch auch zur T Zellinhibierung<sup>165,166</sup>. Tocilizumab, ein anti-IL-6 Rezeptor-Antikörper, verhindert die Nebenwirkungen des CRS, ohne einen negativen Einfluss auf die Tumorzelllyse zu haben<sup>167,168</sup>.

## **1.5 Tumorassoziierte Antigene**

Um die Nebenwirkungen bispezifischer Antikörper weiter zu reduzieren, sollte die T Zellaktivierung möglichst auf den Tumor begrenzt sein. Dafür ist die Wahl des richtigen TAA entscheidend. Im Idealfall sollte das Antigen nur von Tumorzellen und nicht von benignen Geweben exprimiert werden.

Bei der Behandlung von Leukämien konnten so bereits große Erfolge erzielt werden. Die Antikörper Rituximab und Blinatumomab binden mit CD20 und CD19 Antigene, welche nur von B Zellen exprimiert werden<sup>50,116</sup>. Die Behandlung von soliden Tumoren gestaltet sich

schwieriger, da die Penetration von Antikörper und Immunzellen durch die suppressive Mikroumgebung des Tumors erschwert wird <sup>169</sup>. Gerade die Penetration von Immunzellen in den Tumor ist bei der Immuntherapie aber von zentraler Bedeutung <sup>170,171</sup>. Einige Antigene werden durch die Bindung eines Antikörpers auch internalisiert, oder die Antikörper werden durch eine lösliche Variante des Antigens abgefangen. Beides verhindert eine langfristige Aktivierung der T Zellen im Tumor.

Um die Penetration von T Zellen in den Tumor und die Proliferation der T Zellen in Abhängigkeit verschiedener Antikörper und die damit verbundene Tumorzelllyse besser untersuchen zu können, wurde in dieser Studie das Antigen „*tyrosinase-related protein 1*“ (TRP1 oder gp75) verwendet <sup>172-175</sup>. Dabei handelt es sich um ein membranständiges Enzym, welches sowohl im Menschen als auch in der Maus, an der Melaninsynthese in gesunden und malignen Melanozyten beteiligt ist.

Entscheidend für die Versorgung eines Tumors mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ist die Vaskularisierung. Ein ideales TAA sollte deshalb nicht nur auf dem Tumor selbst, sondern auch auf den tumorinfiltrierenden Gefäßen exprimiert sein. Die Idee dahinter ist, dass es durch die Lyse der Tumorgefäße zu einer „Öffnung“ des Tumors kommt, woraus eine stärkere Infiltrierung von Immunzellen resultiert, sowie eine Unterbrechung der für den Tumor so wichtigen Sauerstoffversorgung. Der Antikörper TRC105 bindet zum Beispiel an Endoglin, ein Protein, welches in hohem Maße auf proliferierenden Tumorgefäßen exprimiert wird <sup>176</sup>. Er verhindert die Bindung des Liganden und lysiert die Zellen über ADCC. Hier fokussiert sich diese Arbeit auf das Antigen B7-H3 (CD276). Dabei handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein der B7 Familie, also um ein Protein, welches wahrscheinlich als Kostimulus für T Zellen fungiert. Die endgültige Funktion von B7-H3 konnte allerdings noch nicht geklärt werden und auch der Rezeptor wurde noch nicht identifiziert <sup>177,178</sup>. B7-H3 wird häufig auf Tumoren und Tumorgefäßen exprimiert, während die Expression auf benignem Gewebe gering ist <sup>179-181</sup>. Daher könnte sich B7-H3 gut eignen um das sogenannte „*dual-targeting*“, die gleichzeitige Lyse von Tumor und Gefäßen, zu untersuchen <sup>182</sup>.

## 1.6 Tumormodelle in Mäusen

Eine besondere Herausforderung in der präklinischen Evaluierung von neuen Antikörpern ist die Entwicklung von in vivo Testmodellen, welche den Tumor und dessen Eigenschaften möglichst akkurat abbilden. Nur so können Nutzen und Sicherheit der Substanz für den klinischen Gebrauch garantiert werden. Dies wurde durch den Vorfall mit dem Antikörper TGN1412 verdeutlicht. Die Sicherheit des Antikörpers sollte final in Makaken verifiziert werden, für welche der Antikörper in weit höheren Konzentrationen verträglich war als später für den Menschen. Dort wurde ein CRS durch die CD28-abhängige Aktivierung von Effektor-Gedächtnis T Zellen ausgelöst, ein Molekül, welches von Makaken Effektor-Gedächtnis T Zellen nicht exprimiert wird<sup>183</sup>. Über 95% der Krebsmedikamente, welche für die Phase I Studie zugelassen werden, scheitern so an der klinischen Zulassung, teilweise auch bedingt durch den Mangel an validierten präklinischen Modellen<sup>184</sup>.

Wie bereits eingangs erwähnt, wurden viele immunbiologische Zusammenhänge durch Experimente mit Mäusen hergestellt. Bis heute bilden sie daher auch die größte Gruppe von Versuchstieren bei der präklinischen Evaluation von Krebsmedikamenten<sup>185</sup>. Durch in vivo Modelle in Mäusen können verschiedene Parameter einer Substanz, wie der ihr zugrundeliegende Mechanismus und die Effektivität, untersucht werden. Wichtig dabei ist immer das klinische Ziel vor Augen zu haben, um durch die Wahl des richtigen Modells Schlüsse für das weitere Vorgehen ziehen zu können. Am besten wird ein Antikörper dabei in verschiedenen Modellen getestet<sup>186</sup>. In vitro Experimente können bei der Wahl der richtigen Zelllinie, dem richtigen Behandlungsregime und vor allem bei der Wahl des richtigen Kandidaten helfen. Außerdem sollten auch dieselben Kriterien wie in der Klinik bei der Bewertung von Mausmodellen angewendet werden. Während in Mausmodellen häufig messbare Kriterien wie Tumorgröße Anwendung finden, schaut man in klinischen Studien eher auf die Überlebensrate oder das progressionsfreie Überleben<sup>187</sup>.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Transplantations- und Mutationsmodellen. In Mutationsmodellen werden Tiere untersucht, welche durch spontane oder induzierte Mutationen bestimmte Eigenschaften besitzen<sup>188</sup>. In der Onkologie sind Transplantationsmodelle jedoch deutlich häufiger. Im Folgenden soll nun näher auf diese eingegangen, sowie ihre Vor- und Nachteile behandelt werden.

### 1.6.1 Syngene Modelle

Das einfachste und kostengünstigste Modell ist das sogenannte syngene Modell. Hierunter versteht man die Übertragung von lebenden Zellen zwischen genetisch identischen Individuen, oder Tieren desselben Inzuchtstammes. Als Beispiel sei hier, auf Grund der Bedeutung für diese Arbeit, die Injektion der Melanomzelllinie B16-F10 in C57BL/6 Mäuse genannt <sup>189,190</sup>.

Bei syngenem Modellen ist keine Transplantatabstoßung zu erwarten, da Spender und Empfänger genetisch identisch sind. Dies bedeutet aber auch, dass die Anzahl an Zelllinien, welche für die Versuche in Frage kommen, begrenzt ist. Häufig werden die Tumorzellen dabei als Flankentumor unter die Haut gespritzt (subkutan), dies ermöglicht ein schnelles Monitoring des Tumorwachstums, da es einfach gemessen werden kann. Bei Flankentumoren handelt es sich häufig um sogenannte ektope Tumore. Dies bedeutet, dass Herkunftsgewebe und Zielgewebe sich unterscheiden und die Tumorzellen nicht in die korrekte anatomische Position gebracht werden. Als Beispiel sei hier auch das häufig verwendete „Lungenmetastasenmodell“ mit B16-F10 genannt. Dabei handelt sich nicht um echte Metastasen, die Zellen werden intravenös gespritzt und bleiben in den engen Kapillaren der Lunge hängen. Dies bedeutet, dass ein solches Modell das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen in einem Tumor wie Tumorstammzellen, normale und Tumorzellen, sowie natürlich Immunzellen, nur bedingt wiedergeben kann und die Reaktion auf ein Medikament gegebenenfalls anderes ausfällt <sup>191-193</sup>. Ebenso durchläuft eine Zelllinie nicht die klassischen Stadien der Tumorentwicklung und wächst viel schneller als vergleichbare Tumore im Menschen <sup>194</sup>. Des Weiteren bilden subkutan injizierte Tumore meist ein abgekapseltes System und daher selten Metastasen <sup>195</sup>. Den ektopen Modellen gegenüber stehen die orthotopen Modelle, bei denen der Injektionsort identisch mit dem Herkunftsgewebe der Zellen ist. Von orthotopen Modellen verspricht man sich daher eine bessere Abbildung der zugrundeliegenden Krankheit im Menschen <sup>196</sup>. Sie sind jedoch deutlich aufwendiger, da sie meistens eine Operation der Maus beinhalten und allein die Messung der Tumorgröße schon schwierig ist.

Syngene Modelle finden in immunkompetenten Tieren statt, wodurch die Immunantwort gut abgebildet werden kann. Trotzdem gibt es, und das zeigen die Experimente mit TGN1412 deutlich, Unterschiede in den Immunsystemen verschiedener Spezies, welche bei der Interpretation der Ergebnisse immer bedacht werden müssen <sup>197,198</sup>. Dies betrifft sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem und den Metabolismus der Tiere.

Für diese Arbeit ist von besonderer Bedeutung, dass therapeutische Antikörper, für den Einsatz im Menschen, meist nicht in syngenem Mausmodellen getestet werden können. Viele von ihnen werden durch die Immunisierung von Mäusen, mittels Hybridom-Technologie, generiert und reagieren daher nicht mit murinen Antigenen<sup>88</sup>. Es werden sogenannte Surrogat-Antikörper benötigt, welche an die orthologen murinen Proteine binden. Da diese Antikörper andere Eigenschaften wie Affinität oder Antigen-Epitop haben können, kann man mit Surrogat-Antikörper nicht die spezifische Wirkung eines klinisch relevanten Antikörpers untersuchen.

In dieser Arbeit werden syngene Modelle und Surrogat-Antikörper daher vor allem verwendet, um den Einfluss verschiedener „Antikörper-Familien“ auf das Tumorstadium zu testen. Dabei geht es weniger um die spezifische Wirkung einzelner Antikörper, sondern um ein allgemeines Verständnis über die Wirkung von bispezifischen Antikörpern in Gegenwart eines funktionellen Immunsystems.

### **1.6.2 Xenograft-Modelle**

Anders als bei den syngenem Modellen sind bei Xenograft-Modellen Spender und Empfänger genetisch nicht identisch. Daher müssen in diesen Modellen immundefiziente Mäuse verwendet werden, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern.

In Xenograft-Modellen verwendete man früher häufig SCID („*severe combined immunodeficiency*“) Mäuse, welche keine funktionellen B und T Zellen bilden können, wogegen die Zahl an Erythrozyten, Neutrophilen und NK Zellen im Normalbereich liegt<sup>199,200</sup>. Durch Kreuzung mit NOD („*non-obese diabetic mouse*“) Mäusen konnte auch die adaptive Immunantwort durch das Komplementsystem, dendritische Zellen und Makrophagen reduziert werden<sup>201,202</sup>. Durch die Generierung von NSG (NOD SCID gamma) Mäusen, in denen eine Mutation im IL-2R $\gamma$  Gen vorliegt, kann auch die NK Zellaktivierung verhindert werden<sup>203</sup>. Diese Mäuse sind optimale Rezipienten für humane Tumorzelllinien oder PBMCs<sup>204</sup>.

Im Gegensatz zu syngenem Modellen können in Xenograft-Modellen humane Zelllinien verwendet werden, da es nicht zu einer Abstoßung des Transplantats kommt. Dies ermöglicht die direkte Analyse von klinischen relevanten Antikörpern in Gegenwart des humanen Antigens. Handelt es sich allerdings um einen immunstimulatorischen Antikörper, müssen zusätzlich Effektorzellen (Leukozyten) verabreicht werden. Dies erfolgt häufig durch die intravenöse Gabe von humanen PBMCs. In diesem System sind Langzeitstudien daher nur

schwer realisierbar, weil es mit der Zeit zu einer xenogenen Immunreaktion kommt („*graft-versus-host disease*“, GvHD).

Xenograft-Modelle werden heute in der Onkologie weit häufiger als syngene Modelle verwendet, obwohl ihnen ein intaktes Immunsystem fehlt und sie deshalb nur selten aussagekräftige Daten für spätere klinische Studien liefern können <sup>187</sup>.

### 1.6.3 Humanisierte Mausmodelle

Statt Zelllinien kann auch primäres Material aus humanen Tumoren in immundefiziente Mäuse implantiert werden, diese bezeichnet man auch als PDX („*patient-derived xenograft*“) Modelle. Diese entsprechen eher der natürlichen Tumorbiologie als Zelllinien und können, durch Auswahl des entsprechenden Transplantats, auch verschiedene Stadien der Tumorentwicklung repräsentieren. Durch vorherige Charakterisierung des Tumors können diejenigen ausgewählt werden, welche sich wirklich für das entsprechende in vivo Modell eignen <sup>205</sup>.

Ein Nachteil von PDX Modellen ist, dass sie in immundefizienten Mäusen durchgeführt werden. Dies macht die Evaluation von immunregulatorischen Antikörpern schwierig. Deshalb gibt es verschiedene Versuche ein humanes Immunsystem in immundefizienten Mäusen zu implementieren. Dies erfolgt durch die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen <sup>206</sup>. Alternativ können auch humane Gene in die Keimbahn von Mäusen eingebracht werden. Dort ersetzen sie orthologen Gene der Maus. Dies ermöglicht, dass man humane Antikörper in einer immunkompetenten Maus testen kann <sup>162</sup>.

Es gibt noch weitere Möglichkeiten Mäuse zu humanisieren, auf diese wird im weiteren Verlauf der Arbeit aber nicht mehr eingegangen <sup>184,185</sup>.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Generierung, Optimierung und Charakterisierung bispezifischer Antikörper, zur zielzellrestringierten T Zellantwort an Tumoren. Der Fokus liegt dabei auf der Evaluation solcher Antikörper in Mausmodellen. Dabei sollen verschiedene Themen bearbeitet werden:

1. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluation von bispezifischen Surrogat-Antikörper in syngenem Mausmodellen. Nach der Produktion und biochemischen Charakterisierung, wurden unter Verwendung dieser Antikörper zwei Fragestellungen bearbeitet:
  - Wie effektiv ist die Monotherapie mit TAAxCD3 Antikörpern, wie sie bereits in der Klinik etabliert sind, in syngenem Mausmodellen und damit in immunkompetenten Mäusen? Dafür wurde ein bispezifischer Surrogat-Antikörper generiert, welcher gegen das Melanozyten-Antigen TRP1 und den CD3 Rezeptor gerichtet ist und dieses Konstrukt in verschiedenen in vitro und in vivo Systemen getestet.
  - Kann der Therapieerfolg durch eine sogenannte Kombinationstherapie weiter verbessert werden? Dafür wurden zwei weitere bispezifische Surrogat-Antikörper generiert, welche die kostimulatorischen Moleküle CD28 und 4-1BB aktivieren. Diese wurden in verschiedenen Systemen mit dem bispezifischen anti-CD3 Antikörper kombiniert.
2. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob sich der therapeutische Effekt von bispezifischen Antikörper verbessert, wenn das Tumorantigen nicht nur auf dem Tumor selbst, sondern auch auf den Tumorgefäßen exprimiert ist („*dual targeting*“)? Dies soll unter Verwendung von Antikörpern gegen das Tumorantigen B7-H3 untersucht werden, von dem bekannt ist, dass es auf beiden Strukturen überexprimiert ist. Dafür wurde zuerst eine Reihe von anti-B7-H3 Antikörper charakterisiert und diese anschließend in ein bispezifisches Format (B7-H3xCD3) überführt.



## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Klonierung neuer Antikörper

Alle Antikörper im IgG oder IgGsc Format wurden basierend auf dem Vektor pGH1.2 exprimiert (für Vektorkarte siehe Abbildung 5-7, Anhang). Virtuelle Klonierungen wurden dabei mit dem Programm Geneious durchgeführt. Die variablen Sequenzen der Antikörper wurden mithilfe des GeneArt GeneOptimizers (Thermo Fisher Scientific) Codon-optimiert und in das Grundgerüst eines humanen I $\gamma$ 1 $\kappa$  Antikörpers eingebaut (Tabelle 2-1). Dabei enthielt das IgGsc Format zusätzlich einen C-terminalen scFv, in welchen die variablen Domänen über einen flexiblen (GGGS)<sub>3</sub> Linker miteinander verbunden sind (Abbildung 3-2) <sup>119,207</sup>. Anschließend wurden die V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> und scFv Sequenzen bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific) de novo synthetisiert und die DNA, über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen, in den Vektor eingefügt. In den Fc-Teil der Moleküle wurden die Mutationen E233P, L234V, L235A,  $\Delta$ G236, D265G, A327Q und A330S (EU Index) eingefügt, um die Bindung von Fc-Rezeptoren und des Komplementsystems zu verhindern (FcKo Mutationen).

**Tabelle 2-1: Ursprung der Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Proteine.**

Antikörper	Antigen	Quelle
TA99	TRP1	Benonisson et al. <sup>208</sup>
MOPC-21	-	Zekri et al. <sup>207</sup>
10B3	huPSMA	Zekri et al. <sup>207</sup>
2C11	muCD3	Gilliland et al. <sup>209</sup>
PV1	muCD28	Patent US20040116675A1
LOB12.3	mu4-1BB	Rickert et al. <sup>210</sup>
UCHT-1	huCD3	Zekri et al. <sup>207</sup>
B7-H3-Fc	-	UniProtKB - Q5ZPR3 (CD276_HUMAN)

Die Sequenzen des extrazellulären Teils von B7-H3 wurden ebenfalls de novo synthetisiert und im pGH1.2 Vektor über die Gelenkregion mit dem Fc-Teil eines humanen I $\gamma$ 1 Antikörpers verbunden.

Die anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper wurden von Dr. Timo Manz durch Immunisierung von BALB/c Mäusen generiert und anschließend von Dr. Latifa Zekri-Metref sequenziert (beide AG Jung, Universität Tübingen).

Weitere anti-B7-H3 Antikörper wurden von Dr. Timo Manz, in Kooperation mit Prof. Stefan Dübel (Universität Braunschweig), aus einer humanen Phagen-Bibliothek isoliert. Die variablen Domänen der Antikörper lagen in Form eines scFv im Vektor pHAL14 vor<sup>211</sup>. Dabei sind die V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> Domänen über einen flexiblen GSASAPKLEEGEFSEARV-Linker miteinander verbunden. Anschließend wurden sie, zur leichteren Charakterisierung, über entsprechende Restriktionsschnittstellen in den Vektor pCMV2.5 kloniert und dort über die Gelenkregion mit dem Fc-Teil eines humanen Igγ1 Antikörpers verbunden (scFv-Fc Format, Abbildung 3-21).

### **2.1.2 Restriktionsverdau, Ligation und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Alle Restriktionen wurden mit den entsprechenden Enzymen (New England BioLabs) als Doppelverdau, entsprechend den Angaben des Herstellers, durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Lösungen mit Ladepuffer (Gel Loading Dye, Purple (6x), New England BioLabs) versetzt und die DNA-Fragmente über Agarosegele (1% (w/v) Agarose, 0.1 µg/mL Ethidiumbromid (beide Roth)) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (Tabelle 5-1, Anhang) verwendet und die Gele liefen für 40 min bei 100 V (Electrophoresis Power Supply EPS-3500, Pharmacia). Nach Vergleich mit dem Standard (1 kb Plus DNA Ladder, New England BioLabs) wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend, wie vom Hersteller angegeben, mit einem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert.

Für die Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:5 gemischt und nach Herstellerangaben, für 30 min bei Raumtemperatur, mit T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific) inkubiert.

Für die stabile Transfektion von Zellen, mit linearisierten Plasmiden, wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Roth) versetzt, gevortext und zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten drei Extraktionen mit je einem Volumenanteil Chloroform (Merck), um Phenolreste zu entfernen. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 0.1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (Roth)

und 2.5 Volumen Ethanol (Merck), für 1 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde die DNA mittels einer Tischzentrifuge ( $17\,000 \times g$  für 1 h bei  $4^{\circ}\text{C}$ , Heraeus Biofuge Fresco, Thermo Electron) pelletiert, der Überstand verworfen und die DNA in  $50 \mu\text{L H}_2\text{O}$  gelöst.

### 2.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien und Anlegen von Bakterienkulturen

Die DNA-Lösung aus der Ligation wurde mit  $100 \mu\text{L}$  chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific, expandiert und eingefroren von Beate Pömmel, IFIZ, Universität Tübingen) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 1 min ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  durchgeführt (Inkubationsschüttler Thriller, Peqlab). Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium (Tabelle 5-1, Anhang) wurden die Zellen für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor sie, in verschiedenen Verdünnungen, auf je einer LB<sub>Amp</sub> Agarplatte (Tabelle 5-1, Anhang) ausgestrichen und für weitere 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurden (Brutschrank Heraeus, Thermo Electron).

Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5 mL LB<sub>Amp</sub> Medium (Tabelle 5-1, Anhang) überführt. Nach einer Inkubation für 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm (Multitron, Infors) wurde die DNA über das QIAGEN® Plasmid Mini Kit (Qiagen) isoliert. Wurden größere Mengen an DNA benötigt, wie für die transiente Transfektion von CHO Zellen, wurden 300 mL einer LB<sub>Amp</sub> Kultur angesetzt und wie beschrieben inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolation der DNA über das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

### 2.1.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde extern von den Firmen Microsynth und GATC Biotech durchgeführt. Dafür wurden, wie von der jeweiligen Firma angegeben, die entsprechenden Mengen Plasmid und Sequenzierungsprimer miteinander gemischt und versandt (Abbildung 5-7, Anhang + Tabelle 2-2). Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit einem Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) gemessen.

**Tabelle 2-2: Sequenzierungsprimer für die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.**

Primer	Sequenz
pGH primer fow	5'-CGCCACCAGACATAATAGCTGA-3'
pGH primer rev	5'-CAGATGGCTGGCAACTAGGAAGG-3'
pCMV primer fow	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
pCMV primer rev	5'-TCTATTGGGAACCAAGCTGG-3'

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Passagieren von Zellen**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC) oder bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Sie wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert (Brutschrank APT.line™, Binder) und, wenn nicht anders beschrieben, in RPMI compl. Medium kultiviert (Tabelle 5-1, Anhang). Um adhärent wachsende Zellen zu ernten, wurden diese einmal mit DPBS (Thermo Fisher Scientific) gewaschen und anschließend mit Accutase® (Pan Biotech) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in RPMI compl. resuspendiert und mit Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Suspensionszellen wurden einfach resuspendiert und mit dem entsprechenden Volumen an frischem Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Alle Zelllinien wurden regelmäßig von Claudia Falkenburger (IFIZ, Universität Tübingen) auf Mycoplasmen getestet.

Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerzählkammer (Brand), entsprechend den Herstellerangaben, bestimmt. Tote Zellen wurden unter Verwendung einer Trypanblaulösung (0.1%, Sigma-Aldrich) identifiziert und der entsprechende Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Zellzahl berücksichtigt.

### **2.2.2 Kryokonservierung von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen, wie im vorherigen Absatz beschrieben, abgelöst und anschließend für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Electron). Das Pellet wurde mit Einfriermedium (Tabelle 5-1, Anhang) auf 2x10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt und je 1 mL Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt (Greiner Bio-One). Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einem, mit Isopropanol (Merck) gefüllten, Mr. Frosty™ (Nalgene) bei -80°C heruntergekühlt (Freezer E 80-450 S, Colora Messtechnik). Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt (-196°).

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37°C in einem Wasserbad (Umwälzthermostat Julabo 19, Julabo) aufgetaut und in 10 mL RPMI compl. überführt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt (Greiner Bio-One).

### 2.2.3 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur stabilen Transfektion von Zelllinien mit membranständigen Antigenen, wurden 4-8 µg des entsprechenden Vektors durch das Restriktionsenzym PvuI, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, linearisiert und die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion von Verunreinigungen befreit.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag vor der Transfektion subkultiviert, um zu gewährleisten, dass sie sich am Tag der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Für die Transfektion wurden  $10^6$  Zellen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, geerntet und 3x mit kaltem RPMI 1640 (ohne Zusätze) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 300 µL kaltem RPMI 1640 resuspendiert und in eine Gene Pulser® Elektroporationsküvette (Spaltbreite 4 mm, Bio-Rad) überführt. Dort wurden sie für 5 min auf Eis mit 10 µL der linearisierten DNA inkubiert, bevor die Elektroporation mit einem Gene Pulser® II (Bio-Rad) bei 230 V und 975 µF durchgeführt wurde. Unmittelbar danach wurden die Zellen in RPMI compl. aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wurde zur Selektion transfizierter Klone das Antibiotikum Geneticin G418 (Endkonzentration 1 mg/mL, Sigma-Aldrich) zugegeben.

Positive Klone wurden von Dr. Thomas Feger (IFIZ, Universität Tübingen) mittels Durchflusszytometrie identifiziert und isoliert (FACSJazz™, BD). Dafür wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, mit einem direkt-markierten Antikörper für das entsprechende Antigen gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von G418 wieder in Kultur genommen.

### 2.2.4 Kultivierung von Hybridomen

Hybridome wurden nach dem Auftauen in IMDM compl. Medium (Tabelle 5-1, Anhang) kultiviert, bis eine Gesamtzahl von  $10^8$  Zellen erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g abzentrifugiert und das Pellet in 1 L Advanced DMEM compl. (1.25% FCS) aufgenommen (Tabelle 5-1, Anhang). Die Reduktion der FCS Konzentration ist notwendig, um während der Aufreinigung die Bindung der im FCS enthaltenen Antikörper an die Protein A Säule zu minimieren. Die Zellsuspension wurde dann auf drei Nunc™ TripleFlask™ Zellkulturkolben (Thermo Fisher Scientific) aufgeteilt und für 7-10 Tage inkubiert.

Nach Ende der Inkubation wurde der Zellüberstand bei 6079 x g abzentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Thermo Fisher Scientific), sterilfiltriert (Steritop®, 0.22µm, Merck) und mit NaN<sub>3</sub>

(Endkonzentration 0.02%, Merck) versetzt. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Der Isotyp von Hybridom-Antikörpern wurde mit dem Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit bestimmt (Thermo Fisher Scientific).

### **2.2.5 Transiente Transfektion von CHO Zellen**

Alle rekombinanten Antikörper und Proteine wurden in transient transfizierten CHO („*chinese hamster ovary*“) Zellen exprimiert. Die meisten davon im ExpiCHO™ Expression System (Thermo Fisher Scientific). Einzig Antikörper mit einem von 2C11 abgeleiteten scFv wurden in FreeStyle™ CHO-S Zellen produziert (Thermo Fisher Scientific). Dies war notwendig, weil der 2C11 scFv von ExpiCHO™ Zellen nicht intakt produziert werden konnte<sup>212</sup>.

ExpiCHO-S™ Zellen wurden, wie vom Hersteller angegeben, bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit und 95 rpm (Multitron Cell, Infors HT), in ExpiCHO™ Expression Medium kultiviert. Dafür wurden Nalgene™ Einweg-Erlenmeyerkolben verwendet (Thermo Fisher Scientific). Für die Transfektion wurde das „High Titer Protocol“ verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 3-4x10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt. Für die Transfektion selbst wurde eine Zellzahl von 6x10<sup>6</sup> Zellen/mL verwendet und diese mit 1µg Plasmid (Verhältnis schwere zu leichte Kette 6:4) pro 1 mL Zellkulturvolumen transfiziert. Dafür wurden die Plasmide mit dem angegebenen Volumen an OptiPRO™ Medium verdünnt und dann mit ExpiFectamine™ CHO Reagent, ebenfalls verdünnt in OptiPRO™ Medium, gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wurden nach Protokoll ExpiFectamine™ CHO Enhancer und ExpiCHO™ Feed zugegeben und die Zellen für 10-12 Tage bei dann 32°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Überstand, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, geerntet.

FreeStyle™ CHO-S Zellen wurden in FreeStyle™ Expression Medium (+ 8 mM Glutamin, Sigma-Aldrich) kultiviert (siehe ExpiCHO-S™ Zellen). Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 0.6x10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt. Drei Stunden vor der Transfektion erfolgte die Zugabe von 1.25% des Zellkulturvolumens an DMSO (Merck). Anschließend wurden 0.5 µg Plasmid (Verhältnis schwere zu leichte Kette 6:4) pro 1 mL Zellkulturvolumen mit FreeStyle™ Expression Medium (ohne Glutamin, 2.5% des Zellkulturvolumens) gemischt. Diese Lösung wurde mit Polyethylenimin (3 µg/mL Zellkulturvolumen, MW 25000, Polysciences), ebenso verdünnt in FreeStyle™ Expression Medium (ohne Glutamin), gemischt. Nach 15 min Inkubation wurde die Lösung zu den Zellen gegeben. Nach weiteren

24 h wurde CHO CD EfficientFeed™ B hinzugegeben (15% des Zellkulturvolumens), sowie Temperatur und CO<sub>2</sub> Gehalt gesenkt (siehe ExpiCHO-S™ Zellen). Anschließend wurde der Überstand, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, geerntet.

### **2.2.6 Isolation von Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen und humanen PBMCs**

Milzzellen wurden aus C57BL/6N (Charles River) Mäusen isoliert. Dafür wurden die Tiere zunächst, unter Isofluran-Narkose (CP-Pharma), durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde ihnen mit sterilem OP-Besteck die Milz entnommen und mittels eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (Easystrainer 100 µm, Greiner Bio-One) in ein steriles, mit DPBS gefülltes, Plastikzentrifugationsröhrchen (50 mL, Greiner Bio-One) gedrückt. Dann wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und Erythrozyten mittels ACK Lysepuffer (Lonza) lysiert. Die Zellen wurden schlussendlich in RPMI compl. aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1).

Humane PBMCs wurden von Carolin Walker (AG Jung, Universität Tübingen) durch Dichtegradientenzentrifugation aus humanem, heparinisierem Vollblut gesunder Spender gewonnen. Dafür wurde das Blut 1:2 mit DPBS verdünnt und 25 mL dieser Lösung über 14 mL Biocoll™ Separation Solution (Merck) geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 560 x g, bei ausgeschalteter Zentrifugenbremse. Anschließend wurde die Interphase mit den PBMCs abgenommen und zweimal mit 50 mL DPBS gewaschen. Die PBMCs wurden dann in RPMI compl. aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Wurden isolierte T Zellen benötigt, wurde diese über ein humanes Pan T Zell Isolation Kit, wie vom Hersteller angegeben (Miltenyi Biotec), aufgereinigt.

Die polyklonale Proliferation von murinen und humanen T Zellen wurde durch die Mitogene Concanavalin A bzw. Phytohämagglutinin induziert (beide Sigma-Aldrich).

## **2.3 Biochemische Charakterisierung von Antikörpern**

### **2.3.1 Aufreinigung von Antikörpern über Protein A**

Alle Antikörper und Proteine wurden über eine HiTrap™ MabSelect™ SuRe Säule (Protein A, Flussrate 1 mL/min) und das ÄKTA™ pure System (beides GE Healthcare) aufgereinigt. Anschließend erfolgte über eine HiLoad™ 16/600 Superdex 200 pg Säule (Flussrate 1.4 mL/min, GE Healthcare) die chromatographische Fraktionierung von monomeren Antikörpern, unter Ausschluss von Aggregaten. Als Laufmittel diente DPBS, für die Elution der Proteine wurde 0.1 M Glycinpuffer (pH 2.5, Roth) verwendet.

Anschließend wurden die Antikörper und Proteine über einen Spritzenvorsatzfilter (Millex-GV, 0.22 µm, Merck) sterilfiltriert und die Konzentration, unter Beachtung des Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts, mit Hilfe eines Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Antikörper wurden in Kryoröhrchen bei 4°C gelagert.

Wurden Proteine für Mausversuche benötigt, wurde zusätzlich die Endotoxinkonzentration der jeweiligen Charge über das LAL („*limulus ameobocyte lysate*“) Testsystem Endosafe®-PTS (Charles River) bestimmt. Die Proteine wurden nur verwendet, wenn die Konzentration unter 0.5 EU/mL war.

### **2.3.2 Analytische Größenausschluss-Chromatographie**

Alle aufgereinigten Proteine wurden anschließend auf einer analytischen Größenausschluss-Chromatographie auf Aggregate, Fragmente und Verunreinigungen untersucht.

Hierzu wurde das UHPLC-System Dionex UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) mit einer Superdex™ 200 Increase 10/300 GL Säule (GE Healthcare) verwendet. Dabei wurden 10 µg Protein mit einer Flussrate von 0.375 mL/min analysiert. Die Retentionszeit der Proteine wurde bei einer Adsorption von 220 nm gemessen. Als Proteinstandard wurden ein Gel Filtration Standard (Bio-Rad) verwendet: Thyroglobulin (670 kDa), γ-Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B12 (1.35 kDa).

### **2.3.3 Analytische Gelelektrophorese**

Das Molekulargewicht und die Reinheit einzelner Proteine wurde mittels SDS-PAGE („*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“) verifiziert.

Für jedes Protein wurden dafür 3 µg Protein mit 2x Laemmli Sample Buffer versetzt und anschließend auf ein vorgefertigtes 10% Mini-Protean® TGX™ Gel geladen (beides Bio-Rad). Reduzierte Proben wurden durch Zugabe von 5% β-Mercaptoethanol (Roth) hergestellt. Dieses führt zur Reduzierung der Disulfidbrücken in den Antikörpern und damit zur Dissoziation von leichten und schweren Ketten. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, bevor die Proteine in einer Mini-Protean® Tetra Vertical Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad) bei 100 V für 80 min aufgetrennt wurden. Als Proteinstandard wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific) verwendet.



Die Proteinbanden wurden für eine Stunde mit Brilliant Blue Lösung angefärbt, bevor sie erst für eine weitere Stunde und dann über Nacht mit Brilliant Blue Entfärbelösung gewaschen wurden (Tabelle 5-1, Anhang).

### **2.3.4 Verdau von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen und Analyse mittels Massenspektrometrie (MS)**

Die Identität einzelner Banden einer SDS-PAGE wurde mittels Massenspektrometrie verifiziert.

Dafür wurden die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Trypsin (Promega) verdaut, inklusive Reduktion und Alkylierung der Proben. Dieser Vorgang wird genau in Shevchenko et al. beschrieben <sup>213</sup>. Nach 24 h wurden die Peptide mittels ZipTip C<sub>18</sub> Pipettenspitzen (Millipore) extrahiert und aufgereinigt. Anschließend wurden sie in 35 µL 80% Acetonitril-0.1% Trifluoressigsäure (beide Roth) eluiert und dann getrocknet. Schlussendlich wurden die Peptide in 15 µL 1% Acetonitril-0.05% Trifluoressigsäure aufgenommen und bis zur weiteren Prozessierung bei 4°C gelagert. Die abschließende Analyse der Proben mittels MS wurde von Dr. Michael Ghosh durchgeführt (IFIZ, Universität Tübingen) und wird genau in Hörner et al. beschrieben <sup>212</sup>.

### **2.3.5 Durchflusszytometrie**

Die Bindung von Antikörpern an zellulär gebundene Antigene wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Dazu wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, geerntet und gezählt. Anschließend wurden 1-5x10<sup>5</sup> Zellen pro Well in eine 96-Well Rundbodenplatte überführt (Greiner Bio-One). Die Zellen wurden für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 50 µL FACS Puffer (Tabelle 5-1, Anhang) die gewünschte Konzentration an Antikörper zugegeben. Zellen und Antikörper wurden für 45 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit 150 µL FACS Puffer gewaschen, bevor der entsprechende Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper (Tabelle 2-3) in 50 µL FACS Puffer zugegeben und mit den Zellen für 45 min bei 4°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in 200 µL FACS Puffer aufgenommen.

Schlussendlich wurde die Antikörperbindung am FACSCalibur oder FACSCanto II (beide BD) analysiert. Die Auswertung der Messung erfolgte über die Software FlowJo. EC<sub>50</sub> Werte wurden in GraphPad Prism über nicht-lineare Regression („*One site competition*“) bestimmt.

Die konzentrationsabhängige Internalisierung von Antigen-Antikörper-Komplexen wurde durch Inkubation des entsprechenden Antikörpers mit einer Antigen-exprimierenden Zelllinie bestimmt. Dafür wurden  $10^5$  Zellen pro Well, in RPMI compl., für 24 h in einer 96-Well Flachbodenplatte (Greiner Bio-One) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, in eine 96-Well Rundbodenplatte überführt und die Zellen 2x mit 150  $\mu$ L FACS Puffer gewaschen. Dann wurde der zuvor verwendete Antikörper in Sättigung (10  $\mu$ g/mL) zugegeben, um erneut alle Antigene auf den Zellen zu besetzen. Anschließend erfolgte, wie weiter oben beschrieben, die Färbung mit dem entsprechenden Sekundärantikörper.

**Tabelle 2-3: Konjugierte Antikörper, welche für die durchflusszytometrische Analyse von Zellen verwendet wurden.** Alle Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben verdünnt.

Spezifität	Klon/Bezeichnung	Isotyp	Konjugat	Hersteller
Biotin	Streptavidin	-	PE	Thermo Fisher Scientific
huCD4	OKT4	Maus IgG2b $\kappa$	Pacific Blue	BioLegend
huCD8a	RPA-T8	Maus IgG1 $\kappa$	FITC	BioLegend
huCD69	FN50	Maus IgG1 $\kappa$	APC/Cy7	BioLegend
huCD276	MIH42	Maus IgG1 $\kappa$	PE/Cy7	BioLegend
huIgG, F(ab') <sub>2</sub>	Polyklonales F(ab') <sub>2</sub> Serum	Ziege	PE	Jackson ImmunoResearch
muCD4	GK1.5	Ratte IgG2b $\kappa$	APC	BioLegend
muCD8a	53-6.7	Ratte IgG2a $\kappa$	FITC	BioLegend
muCD25	3C7	Ratte IgG2b $\kappa$	APC/Cy7	BioLegend
muCD44	IM7	Ratte IgG2b $\kappa$	APC/Cy7	BioLegend
muCD62L	MEL-14	Ratte IgG2a $\kappa$	Pacific Blue	BioLegend
muCD69	H1.2F3	Hamster IgG	PE	BioLegend
muCD223	C9B7W	Ratte IgG1 $\kappa$	PE/Cy7	BioLegend
muCD276	RTAA15	Ratte IgG2a $\kappa$	PE	BioLegend
muCD279	29F.1A12	Ratte IgG2a $\kappa$	PE/Cy7	BioLegend
muIgG, Fc $\gamma$	Polyklonales Serum	Ziege	PE	Jackson ImmunoResearch

Für Bindungskompetitionsexperimente wurde zunächst die gewünschte Menge an Antikörper biotinyliert. Dafür wurde das EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Überschüssiges Biotin wurde mittels einer PD-10 Entsalzungssäule (GE Healthcare) entfernt. Für die Färbung selbst wurde die gewünschte Zelllinie zunächst geerntet und in einer 96-Well Rundbodenplatte in FACS Puffer ausplattiert. Dann wurde der gewünschte (nicht-biotinylierte) Antikörper in verschiedenen Konzentrationen für 15 min mit

den Zellen bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt ermöglicht es den Antikörpern die entsprechenden Epitope, auf den jeweiligen Antigenen, zu besetzen und zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und der zu testende, biotinylierte Antikörper in Sättigung (10 µg/mL) zugegeben. Dieser wurde anschließend über Streptavidin-PE detektiert (Tabelle 2-3).

### **2.3.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Bindung von Antikörpern an rekombinant hergestellte Antigene wurde mittels ELISA bestimmt. Dieser Abschnitt befasst sich mit der B7-H3 Epitop-Charakterisierung. Der PSMA-ELISA, zur Bestimmung der Serumhalbwertszeit, wird in Kapitel 2.6.1 ausgeführt und der ELISA zur Konzentrationsbestimmung von IFN-γ in Kapitel 2.6.2.

Zunächst wurden 1 µg/mL rekombinantes B7-H3, in 50 µL DPBS pro Well, über Nacht bei 4°C, auf einer ELISA-Platte (96-Well Half Area Microplate, Greiner Bio-One) immobilisiert. Am nächsten Tag wurde die Platte für eine Stunde durch Zugabe von 100 µL pro Well 5% BSA (in DPBS, Roth) geblockt. Anschließend wurde die Platte 2x mit DPBST (0.05% Tween-20 in DPBS, Merck) und 2x mit DPBS gewaschen, bevor die entsprechenden Antikörper in Sättigung (10 µg/mL, in 50 µL DPBS verdünnt) zugegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert wurden. Die Platte wurde dann erneut gewaschen bevor der HRP gekoppelte Sekundärantikörper (Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch) zugegeben wurde. Nach erneutem Waschen wurden 40 µL pro Well TMB Peroxidase Substrat Kit (Seracare) hinzugefügt und die Reaktion nach dem Farbumschlag mit 20 µL pro Well 1 M Phosphorsäure (Merck) gestoppt. Die optische Dichte wurde anschließend bei 450 nM mit einem SpectraMax 340 (Molecular Devices) bestimmt.

## **2.4 Funktionelle in vitro Charakterisierung von Antikörpern**

### **2.4.1 <sup>3</sup>H-Tymin Proliferationstest**

Als Nachweismethode für die Proliferation von T Zellen wurde ein <sup>3</sup>H-Thymin Proliferationstest verwendet. <sup>3</sup>H-Thymin wird während der Proliferation in die neu synthetisierte DNA der Zellen eingebaut und kann anschließend detektiert werden.

Um zu verhindern, dass während des Versuchs, neben den T Zellen auch die Tumorzellen proliferieren, wurden diese durch die γ-Strahlung einer <sup>137</sup>Cäsiumquelle (Gammacell 1000 Elite, MDS Nordion) inaktiviert. Die Zellen wurden für 20 min bestrahlt, dies entspricht einer Strahlendosis von ca. 120 Gy.

Anschließend wurde die gewünschte Anzahl an Tumorzellen und T Zellen, sowie die gewünschte Antikörper-Konzentration in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  RPMI compl. für zwei Tage inkubiert. Danach wurde zu jeder Probe 0.5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin (in 50  $\mu\text{L}$  RPMI compl., Hartmann Analytics) gegeben und die Proben für weitere 16 h inkubiert. Die Proben wurden dann geerntet (Cell Harvester, Inotech Biosystems International) und auf eine Filtermatte (Printed Filtermat A, Perkin Elmer) überführt. Die Filtermatten wurden dann bei 50°C getrocknet (Trockenschrank Heraeus, Thermo Electron) und zusammen mit einem Szintillationscocktail (Ultima Gold, Perkin Elmer) in eine Plastikfolie (Sample Bag for MicroBeta<sup>TM</sup>, Perkin Elmer) eingeschweißt. Anschließend wurden die Proben mit einem MicroBeta<sup>2</sup> (Perkin Elmer) gemessen.

#### **2.4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Antikörper vermittelten Tumorzelllyse**

Die simultane Analyse von T Zellaktivierung und Proliferation, sowie die Antikörper abhängige Lyse von Tumorzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie am FACS Canto II.

Dafür wurde die gewünschte Zahl an humanen T Zellen oder murinen Milzzellen, zusammen mit der entsprechenden Zahl an Tumorzellen, sowie der gewünschten Antikörperkonzentration, für 3-4 Tage in einer 96-Well Flachbodenplatte (Gesamtvolumen 200  $\mu\text{L}$ ) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen in eine 96-Well Rundbodenplatte überführt. Adhärente Zellen wurden zusätzlich mit Accutase® abgelöst. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und in FACS-Puffer + 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Flebogamma (Grifols) resuspendiert. Dabei handelt es sich um humane IgG Moleküle, welche die, auf Immunzellen vorhandenen, Fc-Rezeptoren blockieren und dadurch die unspezifische Bindung der direkt-markierten Antikörper verhindern. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C, wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und mit den direkt-markierten Antikörpern gefärbt. Diese wurden in 50  $\mu\text{L}$  FACS Puffer, für 45 min bei 4°C, mit den Zellen inkubiert (Tabelle 2-3). Anschließend wurden die Zellen 2x mit 150  $\mu\text{L}$  FACS Puffer gewaschen und schlussendlich in 200  $\mu\text{L}$  FACS Lyse-Puffer (1 Tropfen/mL Negative Control Compensation Particles, BD + 0.005% 7-AAD Viability Staining Solution, BioLegend) analysiert.

Die Kompensationspartikel im FACS Lyse-Puffer wurden durch Größenausschluss im FSC-A/SSC-A identifiziert und als Stopkriterium verwendet. Dies ermöglicht eine Standardisierung der Zellzahl, in einem definierten Volumen, da diese sich durch Proliferation und Lyse von behandelten bzw. unbehandelten Proben ändern kann. Um Antigen-positive Zellen zu identifizieren, wurden FMO („*fluorescence minus one*“) Kontrollen angesetzt, in

denen jeweils ein direkt-markierter Antikörper fehlt. Die Kompensation wurde mit einfach gefärbten Anti-Mouse Ig,  $\kappa$  Compensation Particles (BD) erstellt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software. Zunächst wurden die viablen Zellen (7-AAD<sup>-</sup>) identifiziert. Anschließend wurden die Effektorzellen als CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> definiert. Ausgehend davon wurden Aktivierung (CD25<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup>), Anergie (CD223<sup>+</sup> und CD279<sup>+</sup>) und Differenzierung (CD44 und CD62L) bestimmt. Tumorzellen wurden, mangels eines weiteren Tumormarkers, als CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> definiert und durch Größenausschluss im FSC-A/SSC-A von weiteren Lymphozyten getrennt.

### **2.4.3 Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen (LEGENDplex)**

Zytokinlevel wurden, wie vom Hersteller beschrieben, mittels des Partikel-basierten LEGENDplex<sup>TM</sup> (BioLegend) Systems bestimmt. Jede Partikelpopulation ist dabei mit einem spezifischen Antikörper gegen ein Zytokin konjugiert (in dieser Arbeit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 oder IL-10). Die gebundenen Zytokine können anschließend über einen biotinylierten Detektionsantikörper nachgewiesen werden. Anschließend wird mittels Durchflusszytometrie das Fluoreszenzsignal einzelner Partikel-Populationen bestimmt. Die genaue Konzentration der einzelnen Zytokine kann anschließend durch eine Standardkurve und die LEGENDplex<sup>TM</sup> Data Analysis Software ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Zytokinlevel wurde ein Tumorzelllyse-Experiment, wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, durchgeführt. Nach 96 h wurde die 96-Well Flachbodenplatte für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und 50  $\mu$ L Überstand für die Analyse abgenommen.

### **2.4.4 xCELLigence (Echtzeit Impedanzmessung)**

Das xCELLigence<sup>®</sup> System (ACEA Bioscience) ermöglicht die Analyse von Tumorzelllyse in Echtzeit. Das Prinzip basiert auf der Wechselwirkung von adhärennten Zellen mit Elektroden, welche den Zellwiderstand (Impedanz) in regelmäßigen Abständen messen. Dadurch kann indirekt eine Aussage über die Anzahl und die Viabilität von Zellen getroffen werden. Für die Versuche wurden spezielle 96-Well Flachbodenplatten mit integrierten Elektroden verwendet (E-Plate 96, ACEA Bioscience).

Um den Hintergrund des Mediums zu bestimmen, wurden 50  $\mu$ L pro Well RPMI compl. in eine E-Plate 96 gegeben und die Messung gestartet. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Tumorzellen, ebenfalls in 50  $\mu$ L Medium, ausgesät und die Platte für 24 h inkubiert. Dies ermöglicht das Anwachsen der Tumorzellen. Anschließend wurden, in je

50  $\mu$ L Medium, die gewünschte Anzahl an Effektorzellen, sowie die gewünschte Antikörper-Konzentration zugegeben.

Die Messung erfolgte alle 15 min. Die relative Änderung der Impedanz wird als dimensionsloser Zellindex dargestellt. Proliferieren die Tumorzellen wird er größer, sterben die Zellen und lösen sich von der Platte ab, wird er kleiner.

## **2.5 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten**

### **2.5.1 Färbung von Tissue Micro Arrays (TMAs)**

Alle immunhistochemischen Arbeiten wurden von Christine Beschorner durchgeführt und von Prof. Bence Sipos (beide Pathologisches Institut, Universität Tübingen) bewertet.

TMAs, mit humanem Tumor- und Normalgewebe (Frozen Tissue Array – Human Tumor and Normal Tissue, BioChain) oder mit murinem Normalgewebe (FDA Standard Frozen Tissue Array – Mouse Normal, BioChain), wurden mit Aceton fixiert und mit 10  $\mu$ g/mL Antikörper gefärbt. Die Primärantikörper wurden anschließend, wie vom Hersteller angegeben, über einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper abgegriffen (Peroxidase Goat Anti-Human IgG oder Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch). Die Färbung erfolgte schließlich über das DAB-Substrat Kit (Zytomed).

### **2.5.2 Färbung von syngenem und Xenograft-Tumoren**

Die immunhistochemische Färbung von syngenem und Xenograft-Flankentumoren war notwendig, um die Expression von Tumorantigenen auf Zelllinien *in vivo* zu überprüfen.

Flankentumore wurden durch die subkutane Injektion von  $10^5$  B16-F10 bzw.  $10^6$  LNCaP in C57BL/6 bzw. NSG Mäuse (beide Charles River) induziert. Nach 14 Tagen wurden die Tiere, unter Isofluran-Narkose, durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde ihnen mit sterilem OP-Besteck der Tumor entnommen und in Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.<sup>TM</sup> Compound, Sakura) bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Danach wurden mit einem Kryotom Schnitte mit einer Stärke von 2.5  $\mu$ m angefertigt, diese über Nacht getrocknet und in Aceton fixiert. Die Färbung erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

## 2.6 Mausversuche

### 2.6.1 Bestimmung der Serumhalbwertszeit

Die Serumhalbwertszeit der Antikörper 10B3x2C11 (PSMAxmuCD3) und 10B3xUCHT-1 (PSMAxhuCD3) wurde in 6-8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (Charles River) ermittelt. Alle Tierversuche wurden unter Beachtung des 3R-Prinzips („*replace, reduce, refine*“), gemäß den ARRIVE-Richtlinien und den Richtlinien des europäischen Tierschutzgesetzes (2010/63/EU) durchgeführt. Sie erfolgten unter Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen. Alle Mäuse wurden in den Tierhaltungen der Universität Tübingen unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

Den Mäusen wurden je 20 µg Antikörper, in 100 µL DPBS, intravenös in die Schwanzvene gespritzt. Nach 1, 3, 6, 9, 24 und 48 h wurden den Mäusen, unter Isofluran-Kurzzeitnarkose, mit einer Natrium-heparinisierten Hämatokrit-Kapillare (Hirschmann) 100 µL Blut aus dem Venenplexus entnommen. Das Blut wurde in einem Serumröhrchen (Microvette 500 Z, Sarstedt) für 10 min bei 1500 x g abzentrifugiert und das Serum gewonnen.

Die Serumkonzentration der Antikörper wurde über einen PSMA-Sandwich-ELISA bestimmt. Dafür wurde 1 µg/mL des monoklonalen anti-PSMA Antikörpers J591 (bindet ein anderes Epitop als 10B3, hergestellt durch Dr. Martin Pflügler, AG Jung, Universität Tübingen), in 30 µL DPBS, über Nacht bei 4°C, auf einer ELISA-Platte immobilisiert<sup>207</sup>. Am nächsten Tag wurde die Platte, wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, geblockt und gewaschen. Als nächstes wurden 5 µg/mL rekombinantes PSMA-His (hergestellt durch Dr. Martin Pflügler, AG Jung, Universität Tübingen), in 30 µL DPBS, zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und die Serumproben (1:5 in 50 µL DPBS verdünnt) zugegeben. Zusätzlich wurde eine Standardreihe mit 10B3x2C11 und 10B3xUCHT-1 erstellt. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen und die IgGsc Antikörper mit einem HRP gekoppelten Sekundärantikörper (Peroxidase Goat Anti-Human IgG, Jackson ImmunoResearch) detektiert. Anschließend wurde die Platte, wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, entwickelt. Die Serumhalbwertszeit wurde durch lineare Regression aus der Standardkurve ermittelt.

### **2.6.2 Toxizitätsmodell**

Die Verträglichkeit des Antikörpers 10B3x2C11 wurde in C57BL/6 Mäusen, durch regelmäßige Gewichtskontrolle und den IFN- $\gamma$  Serumspiegel, verifiziert.

Den Mäusen wurden je 20  $\mu$ g Antikörper, in 100  $\mu$ L DPBS, intraperitoneal verabreicht. Als Positivkontrolle diente der parentale IgG2C11 Antikörper (BioLegend). Nach 24 h wurde den Mäusen, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, Blut abgenommen um den IFN- $\gamma$  Serumspiegel zu bestimmen. Die Bestimmung erfolgte, entsprechend der Herstellerangaben, mittels eines Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Sets (BD).

Anschließend wurde das Gewicht der Mäuse in regelmäßigen Abständen überprüft. Ein Gewichtsverlust von mehr als 20% führte zur Termination der entsprechenden Maus.

### **2.6.3 Lungenmetastasenmodell**

Die Effizienz bispezifischer Surrogat-Antikörper wurde in C57BL/6-B16-F10 Mausmodellen untersucht <sup>214</sup>.

Dafür wurden B16-F10, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, geerntet und anschließend mit DPBS auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Im Lungenmetastasenmodell wurden die Mäuse für 2-3 min unter einer Wärmelampe platziert, bis die Schwanzvenen deutlich hervortraten. Dann erfolgte die intravenöse Injektion von  $3 \times 10^5$  B16-F10 in 200  $\mu$ L DPBS. Dafür wurden die Mäuse in einen „Restrainer“ gesetzt. Antikörper wurden, wie in den einzelnen Versuchen beschrieben, in 100  $\mu$ L DPBS, intraperitoneal verabreicht. Gleichzeitig erfolgte eine Gewichtskontrolle. Nach 14 Tagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Lungen entnommen. Diese wurden mit DPBS gewaschen und dann für 24 h in Bouin'scher Lösung (Sigma-Aldrich) fixiert. Am nächsten Tag wurden die fünf Lungenflügel separiert und die Metastasen gezählt.



#### **2.6.4 Flankenmodell**

Im Flankenmodell wurden die Mäuse vor Injektion der Zellen mit einer Kombination aus Rompun und Ketamidol, entsprechend der Herstellerangaben, narkotisiert (Rompun 2%, Bayer + Ketamidol, WDT). Dies war notwendig, um eine sichere Injektion der Zellen zu gewährleisten. Um den Tumor anschließend leichter messen zu können, wurde die Einstichstelle rasiert. Anschließend wurden den Mäusen, je nach Experiment,  $10^4$ - $10^5$  B16-F10, in 100  $\mu$ L DPBS, subkutan in die Flanke gespritzt. Antikörper wurden, wie in den einzelnen Versuchen beschrieben, intraperitoneal verabreicht. Das Tumolvolumen ( $(\text{Länge} \times \text{Breite}^2)/2$ ) wurde in regelmäßigen Abständen mit einem Caliper bestimmt. Ein Tumordurchmesser von mehr als 1.5 cm wurde als Abbruchkriterium definiert. Zusätzlich wurde das Gewicht der Mäuse überprüft.

#### **2.7 Statistik**

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten werden als der Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung oder den Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm GraphPad Prism. Der statistische Test, welcher der Analyse zugrunde liegt, ist unter den jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Daten wurden vorher auf Normalverteilung überprüft. Ein p-Wert  $< 0.05$  wird als statistisch signifikant angesehen.



### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Immunstimulatorische Surrogat-Antikörper im syngenem Mausmodell

Ausgangspunkt für den ersten Teil der Arbeit war, dass viele immunregulatorische Antikörper im Laufe der präklinischen Entwicklung nur in immundefizienten Mäusen mit adoptiv transferierten, humanen Immunzellen getestet werden. Dies führt selten zu aussagekräftigen Daten über deren späteren klinischen Erfolg<sup>187</sup>. Deshalb sollten Antikörper zusätzlich in immunkompetenten Mäusen getestet werden.

Aus diesem Grund haben Benonisson et al. ein syngenes Mausmodell etabliert, um immunstimulatorische Antikörper auch in immunkompetenten Mäusen testen zu können<sup>208,215</sup>. Dafür entwickelten sie einen bispezifischen Surrogat-Antikörper im „knob-into-hole“ Format, der gegen das Melanozyten-Antigen TRP1 und den murinen CD3 Rezeptor gerichtet ist. In dieser Arbeit wurde ein bispezifischer Antikörper mit denselben Spezifitäten entwickelt, welcher aber das, bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierte, IgGsc Format hat (Abbildung 3-2)<sup>119,207</sup>. Dabei handelt es sich um ein humanes IgG1 Grundgerüst mit einem an die C<sub>H</sub>3 Domäne gekoppelten scFv. Um die Interaktion mit Fcγ Rezeptoren und damit eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems zu verhindern, wurden folgende FcKo-Mutationen in die C<sub>H</sub>2 Domäne der Antikörper eingefügt: E233P, L234V, L235A, ΔG236, D265G, A327Q und A330S (EU Index).

Außerdem wurden in diesem Format zwei weitere bispezifische Surrogat-Antikörper gegen die Kostimuli CD28 und 4-1BB entwickelt. Dabei sitzt die Spezifität für das Tumorantigen TRP1 im Fab-Arm (Klon TA99), während die Spezifitäten für die murinen, immunregulatorischen Antigene CD3 (Klon 2C11), CD28 (Klon PV1) und 4-1BB (Klon LOB12.3) im scFv sitzen (Abbildung 3-2).

Durch die Kombination des primären T Zellstimulus durch den TCR, mit den Kostimuli CD28 oder 4-1BB, soll es zu einer verstärkten T Zellaktivierung und Proliferation kommen. Zusätzlich soll die Differenzierung naiver T Zellen erleichtert und Anergie verhindert werden. Dies soll schlussendlich zu einer verbesserten Tumorzelllyse führen. Die unterschiedlichen Kombinationen wurde zuerst in verschiedenen in vitro Systemen getestet werden, bevor eine Analyse durch verschiedene Tumormodelle in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen erfolgte.

### 3.1.1 Generierung und Produktion in verschiedenen CHO Systemen

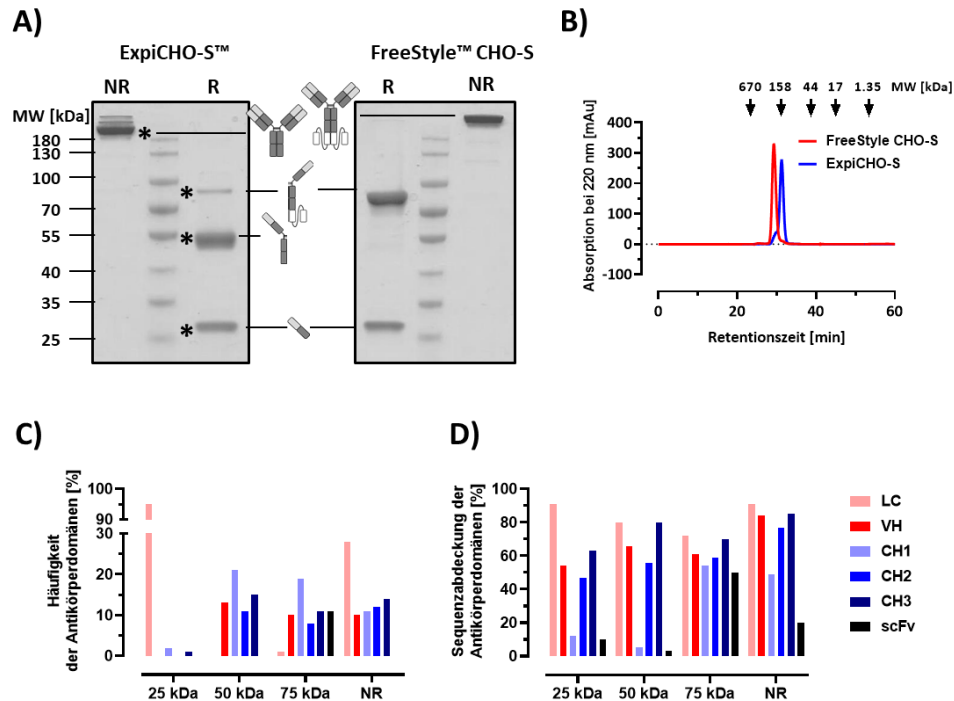
Die Antikörper wurden, wie in Material & Methoden beschrieben, in transient transfizierten CHO Zellen produziert und über Protein A aufgereinigt. Eine Besonderheit trat bei bispezifischen IgGsc Antikörpern mit einem vom Klon 2C11 abgeleiteten scFv auf (schematische Darstellung in Abbildung 3-2). Diese wurde bereits in Hörner et al. beschrieben, soll aber im Rahmen dieser Arbeit nochmals kurz erläutert werden<sup>212</sup>.

In FreeStyle™ CHO-S Zellen produzierter Antikörper zeigt erwartungsgemäß auf einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zwei Banden (Abbildung 3-1A). Die untere Bande repräsentiert dabei die leichte Kette (~25 kDa) und die obere Bande die schwere Kette mit dem C-terminalen 2C11-scFv (~75 kDa). Unter nicht reduzierenden Bedingungen und auf einer Größenausschluss-Chromatographie migriert das Protein ebenfalls entsprechend seines Molekulargewichts (~200 kDa) (Abbildung 3-1B). Wird dasselbe Protein allerdings in ExpiCHO-S™ Zellen produziert, zeigt sich auf einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen eine weitere Bande bei ca. 50 kDa. Auch in der Größenausschluss-Chromatographie eluiert das Protein deutlich später als der in FreeStyle™ CHO-S Zellen produzierte Antikörper. Dies spricht für ein geringeres Molekulargewicht von in ExpiCHO-S™ Zellen produziertem Protein.

Aus diesem Grund wurden gekennzeichnete Banden (\*), aus der ExpiCHO-S™ Produktion, aus der SDS-PAGE ausgeschnitten und wie in Material & Methoden beschrieben mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden die Peptide mittels MS analysiert (durchgeführt von Dr. Michael Ghosh, IFIZ, Universität Tübingen) (Abbildung 3-1C+D).

Die 25 kDa Bande konnte entsprechend den Erwartungen als leichte Kette identifiziert werden, da die Peptide dieser Domäne am häufigsten vorkamen und auch fast deren komplette Sequenz abgedeckt werden konnte. Aufgrund der hohen Sensitivität des MS, konnten auch geringe Mengen von anderen Domänen nachgewiesen werden. Die 50 kDa Bande konnte als schwere Kette ohne den C-terminalen scFv identifiziert werden, da alle anderen Domänen mit ähnlicher Häufigkeit gefunden wurden (V<sub>H</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub>). Mit Ausnahme der C<sub>H1</sub> Domäne und des fehlenden scFv konnten auch die Sequenzen aller anderen Domänen zu mindestens 50% abgedeckt werden. Die 75 kDa Bande konnte als die komplette schwere Kette mit dem C-terminalen scFv identifiziert werden, da Peptide aus allen Domänen gefunden und deren Sequenzen zu mindestens 50% abgedeckt wurden. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen sind noch zwei weitere Banden über der Hauptbande zu erkennen. Allerdings lagen diese zu nahe zusammen, um einzeln analysiert zu werden.

Deshalb wurde nur die Hauptbande mittels MS analysiert. Sie konnte als IgG Molekül ohne scFv identifiziert werden, da alle anderen Domänen in ähnlicher Häufigkeit gefunden wurden und deren Sequenz zu mindestens 50% abgedeckt werden konnte.

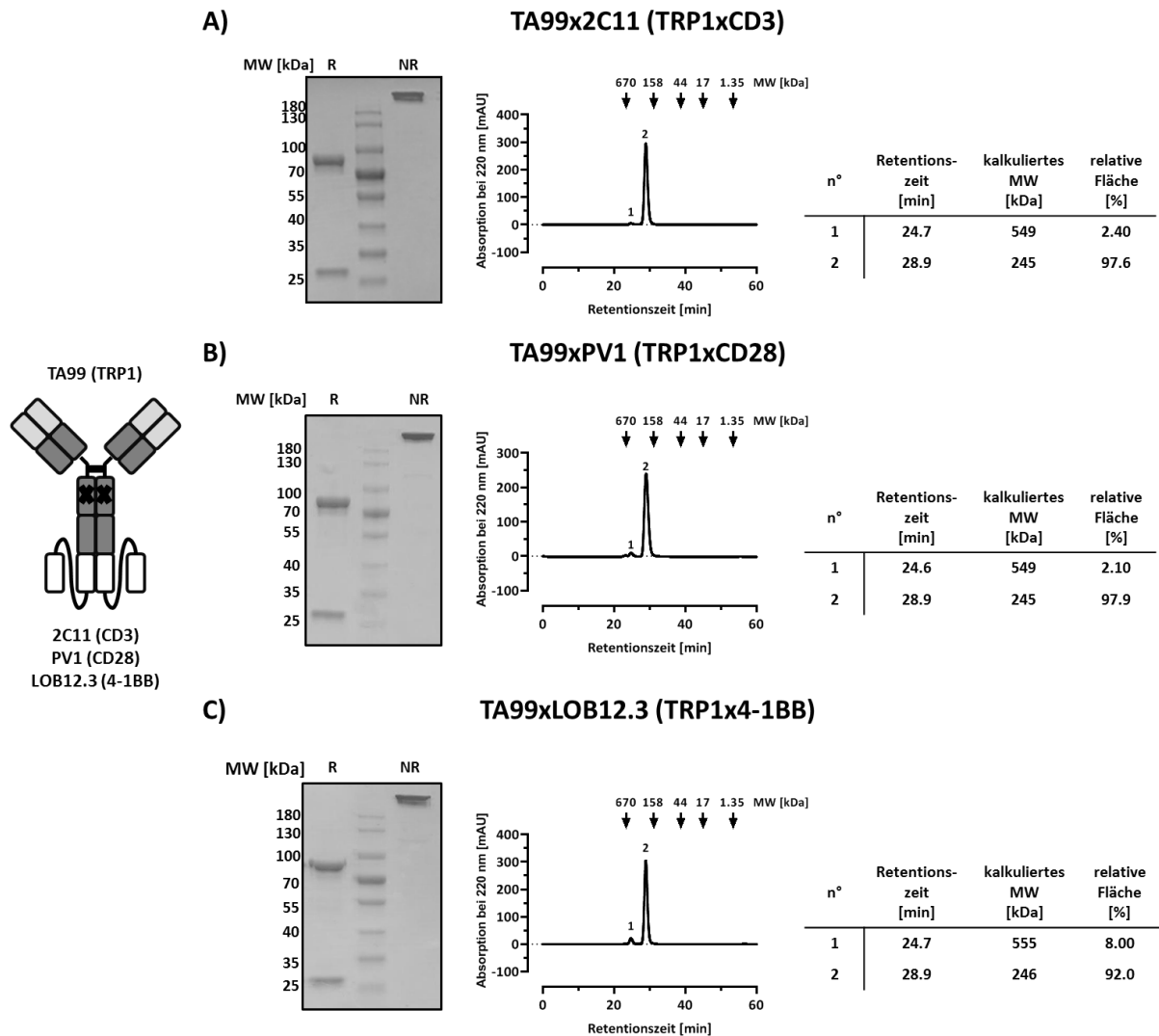


**Abbildung 3-1: Produktion eines bispezifischen Antikörpers mit einem von 2C11 abgeleiteten scFv in verschiedenen CHO Systemen.** Der bispezifische Antikörper wurde in ExpiCHO-S™ und FreeStyle™ CHO-S Zellen produziert. **A)** Das richtige Molekulargewicht (MW) und die Reinheit des Antikörpers wurde unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen auf einer SDS-PAGE überprüft. Markierte Banden (\*) wurden für die MS Analyse ausgeschnitten. **B)** Außerdem wurde die Menge an Aggregaten und sonstigen Verunreinigungen durch eine Größenausschluss-Chromatographie quantifiziert. **C)** Bestimmung der Häufigkeit und **D)** Sequenzabdeckung der einzelnen Antikörperdomänen in verschiedenen SDS-PAGE Banden mittels MS.

Durch die Integration von MS in den Produktionsprozess konnte bestätigt werden, dass bispezifische Antikörper im IgGsc Format, mit einem von 2C11 abgeleiteten scFv, in ExpiCHO-S™ Zellen, anders als in FreeStyle™ CHO-S Zellen, nicht vollständig produziert werden. Als Ursache wird ein Abbruch der Translation an der artifizialen Struktur des scFv vermutet, wodurch es zur Sezernierung eines einfachen IgG Antikörpers ohne C-terminalen scFv kommt.

### 3.1.2 Biochemische Charakterisierung

Alle weiteren Antikörper im IgGsc Format, ohne einen von 2C11 abgeleiteten scFv, wurden in transient transfizierten ExpiCHO-S<sup>TM</sup> Zellen produziert und über Protein A aufgereinigt. Das richtige Molekulargewicht und die Reinheit wurden ebenfalls über eine SDS-PAGE verifiziert (Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: Biochemische Charakterisierung verschiedener bispezifischer Surrogat-Antikörper im IgGsc Format.** Eine schematische Darstellung des IgGsc Formats ist auf der linken Seite gezeigt. Die Mutationen in der C<sub>H</sub>2 Domäne, welche für die Attenuierung der Effektorfunktion zuständig sind, wurden durch ein (x) gekennzeichnet. Das richtige Molekulargewicht (MW) und die Reinheit der Antikörper TA99x2C11 (A), TA99xPV1 (B) und TA99xLOB12.3 (C) wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen auf einer SDS-PAGE überprüft (links). Außerdem wurde die Menge an Aggregaten und sonstigen Verunreinigungen durch eine Größenausschluss-Chromatographie quantifiziert (Mitte und Tabelle auf der rechten Seite).

Unter reduzierenden Bedingungen zeigen alle Antikörper zwei Banden. Die untere Bande repräsentiert dabei die leichte Kette (~25 kDa), während die obere Bande für die schwere Kette mit dem C-terminalen scFv steht (~75 kDa). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist nur eine einzelne Bande zu sehen, welche für das gesamte IgGsc Molekül steht (~200 kDa). Andere Banden, wie sie durch Verunreinigungen oder Antikörperfragmente entstehen können, sind nicht zu sehen.

Zusätzlich wurde die Reinheit der Antikörper mittels Größenausschluss-Chromatographie verifiziert (Abbildung 3-2). Durch diese Methode kann auch der Anteil an Aggregaten berechnet werden, dies ist besonders für immunregulatorische Antikörper von Bedeutung, da es durch Aggregate zu einer unspezifischen Aktivierung von Immunzellen kommen kann. Alle Antikörper zeigen hier eine sehr hohe Reinheit des Monomers ( $n^{\circ}2 > 90\%$ ) und nur sehr wenige, deutlich abzugrenzende Aggregate ( $n^{\circ}1 < 10\%$ ). Die Monomere haben eine Retentionszeit von 28.9 min, mithilfe des Proteinstandards ergibt sich dadurch ein kalkuliertes Molekulargewicht von ca. 245 kDa. Dies ist etwas mehr als das theoretisch berechnete Molekulargewicht von 200 kDa. In der Größenausschluss-Chromatographie migrieren die Proteine aber in ihrer nativen Form und haben daher Wassermoleküle gebunden. Der kalkulierte Wert entspricht daher dem hydrodynamischen Radius der Antikörper und nicht dem theoretisch berechneten Wert.

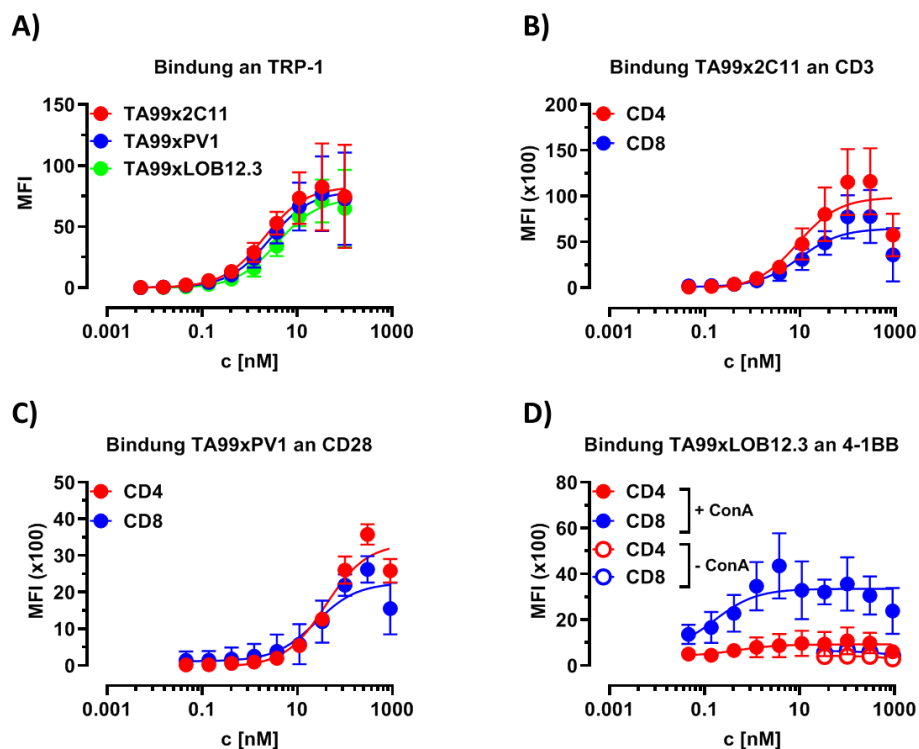
Die konzentrationsabhängige Bindung der Antikörper an die korrespondierenden Antigene wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Affinität des Antikörperklons TA99 an das Antigen TRP1, welches auf der murinen Melanomzelllinie B16-F10 exprimiert wird, liegt für alle drei bispezifischen Antikörper im niedrigen nanomolaren Bereich ( $EC_{50} = 2-4$  nM, Abbildung 3-3A).

Um die Bindung an verschiedene kostimulatorische Moleküle zu analysieren, wurden Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen isoliert. Anschließend erfolgte eine separate Analyse auf CD4 und CD8 T Zellen. Der Antikörperklon 2C11, welcher im IgGsc Format – dies gilt auch für die anderen immunregulatorischen Antikörper PV1 und LOB12.3 – als scFv vorliegt, bindet an das Molekül CD3 mit einem  $EC_{50}$  Wert von ca. 9 nM (Abbildung 3-3B). Die Bindung des Antikörpers PV1 an CD28 liegt deutlich darunter, dies gilt für die Bindung an CD4 T Zellen ( $EC_{50} = 39.7$  nM) und an CD8 T Zellen ( $EC_{50} = 24.7$  nM) (Abbildung 3-3C).

Das Antigen 4-1BB wird nicht konstitutiv auf T Zellen exprimiert, sondern erst nach deren Aktivierung<sup>125,126</sup>. Um die konzentrationsabhängige Bindung von LOB12.3 an 4-1BB messen zu können, wurden die Milzzellen daher für 72 h mit Concanavalin A (ConA) behandelt.

Dabei handelt sich um ein Lektin aus der Jackbohne, das murine T Zellen aktiviert. Der Antikörper LOB12.3 zeigt eine sehr hohe Affinität im subnanomolaren Bereich ( $EC_{50} = 0.17-0.48$  nM), wobei die Expression von 4-1BB auf CD8 deutlich stärker als auf CD4 T Zellen ausfällt (Abbildung 3-3D).

Da alle drei Antikörper nur einen sehr geringen Anteil an Aggregaten aufweisen und eine spezifische Bindung an ihre Antigene zeigen, wurden sie weiteren funktionellen in vitro Charakterisierungen unterzogen.



$EC_{50}$ [nM]	TRP1	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
TA99x2C11 (TRP1xCD3)	2.06 ± 2.16	9.06 ± 7.07	9.84 ± 3.25
TA99xPV1 (TRP1xCD28)	2.64 ± 2.82	39.7 ± 11.6	24.7 ± 6.54
TA99xLOB12.3 (TRP1x4-1BB)	3.76 ± 3.21	0.48 ± 0.76	0.17 ± 0.05

**Abbildung 3-3: Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung verschiedener Surrogat-Antikörper mittels Durchflusszytometrie.** A) Bindung der Antikörper TA99x2C11, TA99xPV1 und TA99xLOB12.3 an das Antigen TRP1 auf B16-F10. B) Bindung des Antikörpers TA99x2C11 an den CD3 Rezeptor auf CD4 und CD8 T Zellen. C) Bindung des Antikörpers TA99xPV1 an CD28 auf CD4 und CD8 T Zellen. D) Bindung des Antikörpers TA99xLOB12.3 an das Antigen 4-1BB auf CD4 und CD8 T Zellen. Da 4-1BB nicht konstitutiv auf T Zellen exprimiert wird, wurden diese zusätzlich mit ConA aktiviert. Die  $EC_{50}$  Werte der einzelnen Kurven sind in der Tabelle unter den Graphen aufgeführt. Mittelwert ± Standardabweichung,  $n \geq 3$ .



### 3.1.3 Funktionelle in vitro Charakterisierung

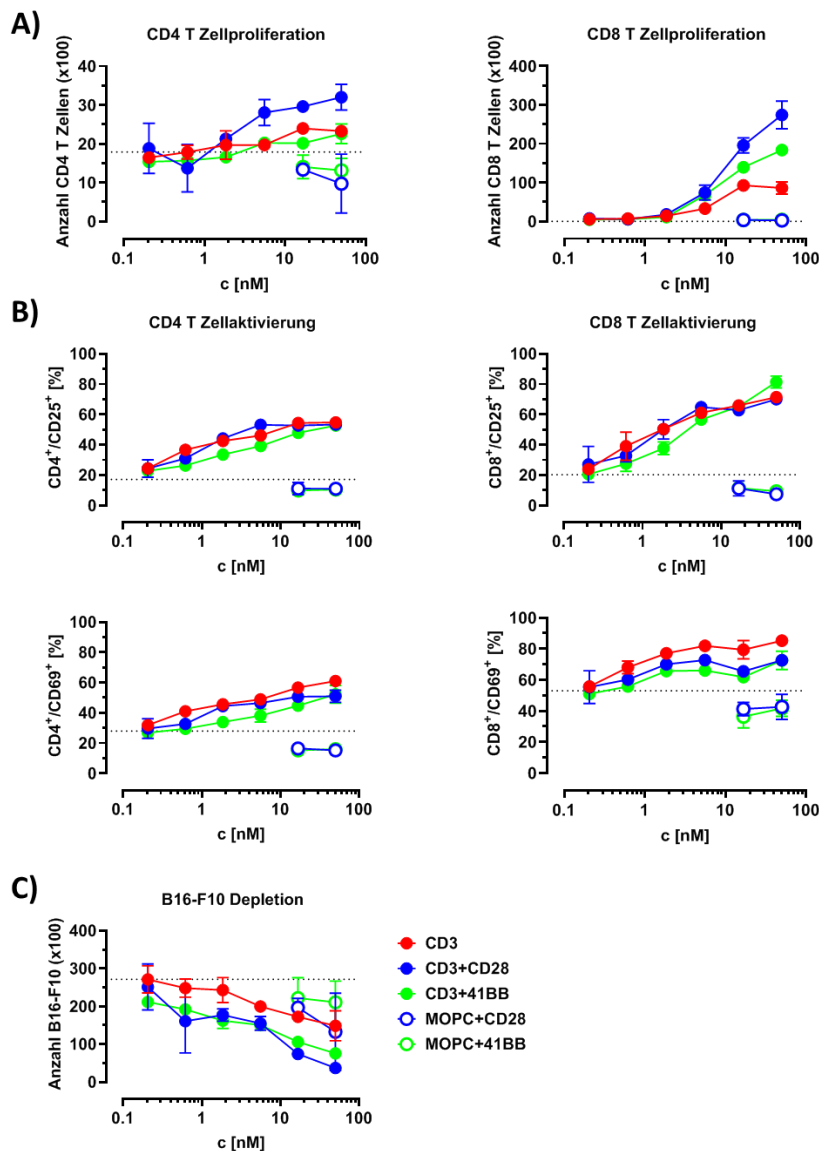
Die wichtigsten zu analysierenden Eigenschaften der hier vorgestellten Antikörper sind die Fähigkeit zur konzentrationsabhängigen und zielzellrestringierten T Zellaktivierung, sowie zur Tumorzelllyse. Als Tumorzellen dienen in den nächsten Versuchen TRP1-positive B16-F10 und als Effektorzellen Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen. Diese wurden zusammen mit den Antikörpern für vier Tage inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Der Antikörper TA99x2C11 führt, durch die Aktivierung des CD3 Rezeptors, zur konzentrationsabhängigen Proliferation der T Zellen (Abbildung 3-4A). Um der physiologischen Abhängigkeit der T Zellaktivierung von einem Kostimulus Rechnung zu tragen, wurde TA99x2C11 noch mit dem CD28 Agonisten TA99xPV1 kombiniert. Dies führt zu einer deutlich verstärkten Proliferation, vor allem von CD8 T Zellen. Diese sind aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften von besonderer Bedeutung für die Tumorzelllyse. Die Kombination von TA99x2C11 mit dem 4-1BB Agonisten TA99xLOB12.3 führt ausschließlich zur verstärkten Proliferation von CD8 T Zellen, dies liegt wahrscheinlich daran, dass CD4 T Zellen auch nach Aktivierung kaum 4-1BB exprimieren (Abbildung 3-3D). Obwohl der Antikörperklon LOB12.3 deutlich affiner ist als PV1 (Abbildung 3-3), fällt die T Zellproliferation durch die Stimulation von CD28 höher aus.

Um sicherzustellen, dass es durch die Antikörper nicht zur unspezifischen Aktivierung und Proliferation von T Zellen kommt, wurde zusätzlich eine MOPCx2C11 Kontrolle generiert (Abbildung 5-1, Anhang). Der Antikörper MOPC (Klon MOPC-21) bindet dabei kein (bekanntes) Antigen. Weder die Kombination von MOPCx2C11 mit TA99xPV1 noch die mit TA99xLOB12.3 führt zu einer Proliferation der T Zellen. Dies zeigt, dass der Antikörperklon 2C11, in seiner löslichen Form, nicht in der Lage ist T Zellen zu aktivieren. Stattdessen bedarf es einer Immobilisierung des Antikörpers über das Antigen TRP-1. Außerdem sind die CD28 und 4-1BB Agonisten vom primären Signal der T Zellaktivierung abhängig.

Der Aktivierungsstatus der T Zellen wurde mittels der Marker CD25 und CD69 überprüft<sup>216</sup>. CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker, der schon nach 4 h exprimiert wird und dessen Expression nach 48 h deutlich abnimmt. CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2R, ist dagegen ein später Aktivierungsmarker, dessen Expression auch noch nach Tagen messbar ist. Es zeigt sich für TA99x2C11 eine deutliche und konzentrationsabhängige Zunahme der Expression von CD25 und CD69 (Abbildung 3-4B). Dabei fällt die Aktivierung von CD8 T Zellen etwas stärker aus, der Marker CD69 lässt aber auch eine stärkere Aktivierung von CD8 T Zellen per se

erkennen. Interessanterweise scheint die Stimulation von CD3, durch TA99x2C11, schon zu einer maximalen Aktivierung der T Zellen zu führen. Weder die Kostimulation mit CD28 noch die mit 4-1BB führt zu einer verstärkten Aktivierung der T Zellen. Wichtig ist zu erwähnen, dass die Kontrollen mit MOPCx2C11 zu keiner Aktivierung führen. Dies unterstreicht die Abhängig des Systems vom primären Signal über CD3 und dessen Immobilisierung durch das Tumorantigen.



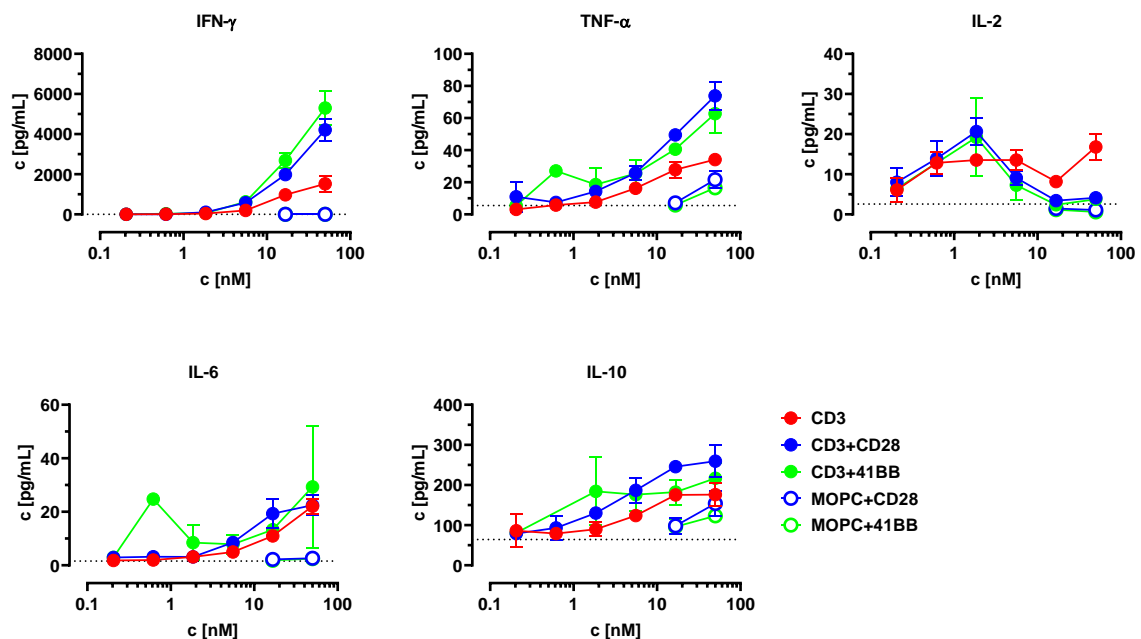
**Abbildung 3-4: Funktionelle in vitro Charakterisierung verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.**  $5 \times 10^3$  B16-F10 und  $2 \times 10^5$  C57BL/6 Milzzellen wurden für vier Tage mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen (entspricht bei Kombination der Gesamtmenge an Protein) inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **A)** Anschließend wurde die Proliferation von CD4 (links) und CD8 (rechts) T Zellen bestimmt. **B)** Die Aktivierung der T Zellen wurde über die Marker CD25 und CD69 überprüft. **C)** Ebenso wurde die konzentrationsabhängige Lyse der Tumorzellen analysiert.

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.

CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1, 4-1BB=TA99xLOB12.3, MOPC=MOPCx2C11

Schließlich wurde die Depletion der Tumorzelllinie B16-F10 analysiert (Abbildung 3-4C). Durch den Antikörper TA99x2C11 kommt es zu einer schwachen, aber konzentrationsabhängigen Lyse der Zielzellen. Dieser Effekt kann durch die Kombination mit den kostimulierenden Antikörpern deutlich verstärkt werden. Dabei scheint es nur minimale Unterschiede zwischen CD28 und 4-1BB zu geben.

Durch die Kombination des hier verwendeten bispezifischen anti-CD3 Antikörpers mit anti-CD28/4-1BB Antikörpern kann also eine konzentrationsabhängige Aktivierung und Proliferation der T Zellen erzeugt werden, welche dann wiederum die Tumorzellen lysieren. Da B16-F10 eine sehr schnell proliferierende Zelllinie ist, kann allerdings keine komplette Lyse erzeugt werden. Neben dem primären Signal durch den TCR und dem Kostimulus spielen auch Zytokine eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T Zellen <sup>127</sup>. Deshalb wurde der Überstand aus dem Experiment in Abbildung 3-4 auf die Sekretion verschiedener Zytokine überprüft (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-5: Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.** Der Überstand aus Abbildung 3-4 wurde auf die Freisetzung der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 und IL-10 untersucht.

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.

CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1, 4-1BB=TA99xLOB12.3, MOPC=MOPCx2C11

Der Antikörper TA99x2C11 induziert eine starke, konzentrationsabhängige Sekretion des Zytokins IFN- $\gamma$ , dieses wird von CD4 und CD8 T Zellen nach einer Antigen-spezifischen Aktivierung gebildet<sup>129</sup>. Der Effekt wird außerdem durch die kostimulatorischen Antikörper TA99xPV1 und TA99xLOB12.3 deutlich verstärkt. Erfolgt kein primäres Signal, durch den CD3 Rezeptor, wird kein IFN- $\gamma$  freigesetzt. Zusätzlich kommt es auch zu einer konzentrationsabhängigen Ausschüttung von TNF- $\alpha$ .

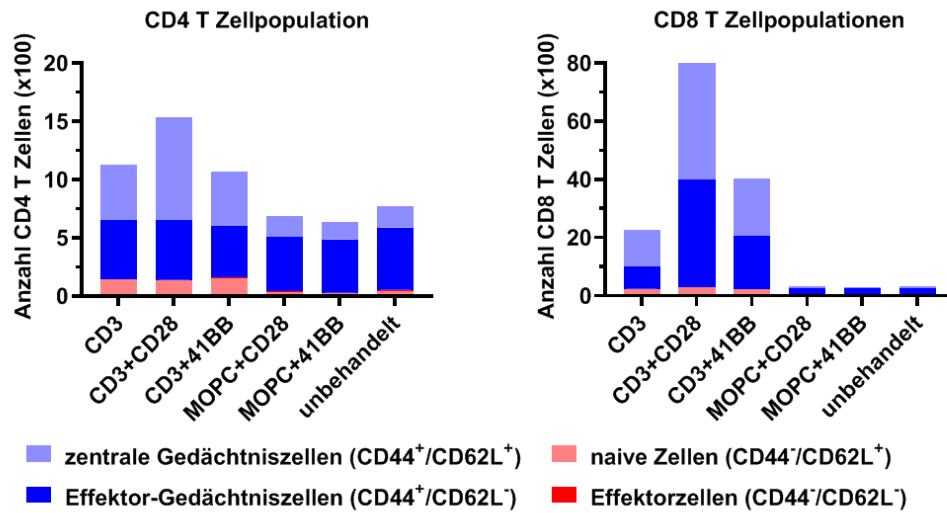
Interessanterweise kommt es nur zu einer geringen, nicht streng konzentrationsabhängigen Freisetzung von IL-2, obwohl es hauptsächlich von T Zellen gebildet wird und für die Differenzierung von naiven zu Effektor- und Gedächtnis-Zellen von großer Bedeutung ist<sup>217</sup>. Allerdings wird IL-2 nur in den ersten Stunden nach der T Zellaktivierung gebildet, während die Zytokinlevel in diesem Versuch erst nach vier Tagen analysiert wurden<sup>218</sup>. Außerdem kommt es zu einer geringen Freisetzung von IL-6, einem Zytokin, welches hauptsächlich von Makrophagen gebildet wird. Neben den aktivierenden Zytokinen wird auch das Zytokin IL-10 konzentrationsabhängig freigesetzt<sup>133</sup>. Es inhibiert unter anderem die CD28 Signalgebung und damit die T Zellantwort.

### 3.1.4 T Zelldifferenzierung und Anergie

Für bispezifische TAAxCD3 Antikörper, wie Blinatumomab, ist bekannt, dass sie vor allem Gedächtniszellen zur Proliferation anregen, während naive Zellen stärker von einem Kostimulus bei der Aktivierung abhängen<sup>154-156</sup>. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, welche T Zellpopulationen durch die unterschiedlichen immunstimulatorischen Antikörper aktiviert und, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, expandiert werden. Dabei wurde zwischen naiven T Zellen (CD44<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup>) und den sich nach Aktivierung daraus bildenden Effektorzellen (CD44<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>), sowie den zentralen Gedächtniszellen („*central memory cells*“, CM, (CD44<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>)) und den sich wiederum daraus bildenden Effektor-Gedächtniszellen („*effector memory cells*“, EM, (CD44<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>)) unterschieden. Für dieses Experiment wurden erneut B16-F10 für vier Tage mit C57BL/6 Milzzellen und den verschiedenen Antikörpern inkubiert. Die Analyse erfolgte wieder mittels Durchflusszytometrie.

Der Antikörper TA99x2C11 stimuliert über CD3 den TCR und liefert damit das primäre Signal der T Zellaktivierung. Dies sorgt für die Proliferation und Aktivierung von CD4 CM Zellen (Faktor 3) (Abbildung 3-6). CD4 EM Zellen proliferieren im Gegensatz zu CD4 CM Zellen nicht und sind weniger stark aktiviert (Abbildung 3-7). CD4 Effektorzellen sind in diesem System kaum zu finden, sie haben allerdings auch nur eine kurze Halbwertszeit und

sind eher im peripheren Gewebe als in dem hier analysierten lymphatischen Gewebe (Milz) zuhause<sup>130</sup>. Zusätzlich kommt es zu einer Expansion von naiven CD4 T Zellen (Faktor 3-7). Ob es auch zu einer Differenzierung von naiven T Zellen zu Gedächtniszellen kommt, kann in diesem System leider nicht analysiert werden. Durch den anti-4-1BB Antikörper kommt es zu keinen weiteren Veränderungen, dies kann daran liegen, dass CD4 T Zellen auch nach Aktivierung kaum 4-1BB exprimieren (Abbildung 3-2D). Durch das sekundäre CD28 Signal kommt es hingegen zu einer verstärkten Expansion von CD4 CM Zellen (Faktor 5).



Expansion (X-Fach)	CD4				CD8			
	CM	EM	EFF	Naive	CM	EM	EFF	Naive
CD3	2.78	0.92	0.63	3.09	19.2	3.54	0.77	7.16
CD3+CD28	4.78	0.98	0.47	3.20	60.4	14.7	1.06	8.65
CD3+4-1BB	2.69	0.85	0.31	3.74	34.8	9.45	0.49	7.21
MOPC+CD28	1.02	0.88	0.47	0.83	1.23	1.03	0.57	1.03
MOPC+4-1BB	0.90	0.86	0.53	0.59	0.91	0.99	0.51	0.59

**Abbildung 3-6: T Zelldifferenzierung in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.**  $5 \times 10^3$  B16-F10 und  $2 \times 10^5$  C57BL/6 Milzzellen wurden für 4 Tage mit 50 nM Antikörper inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Anschließend wurde die Anzahl verschiedener CD4 (links) und CD8 (rechts) T Zellpopulationen quantifiziert. Die Tabelle darunter zeigt den Expansionsfaktor im Vergleich zur unbehandelten Gruppe.

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.

CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1, 4-1BB=TA99xLOB12.3, MOPC=MOPCx2C11

CM=zentrale Gedächtniszelle, EM=Effektor-Gedächtniszelle, EFF=Effektorzelle

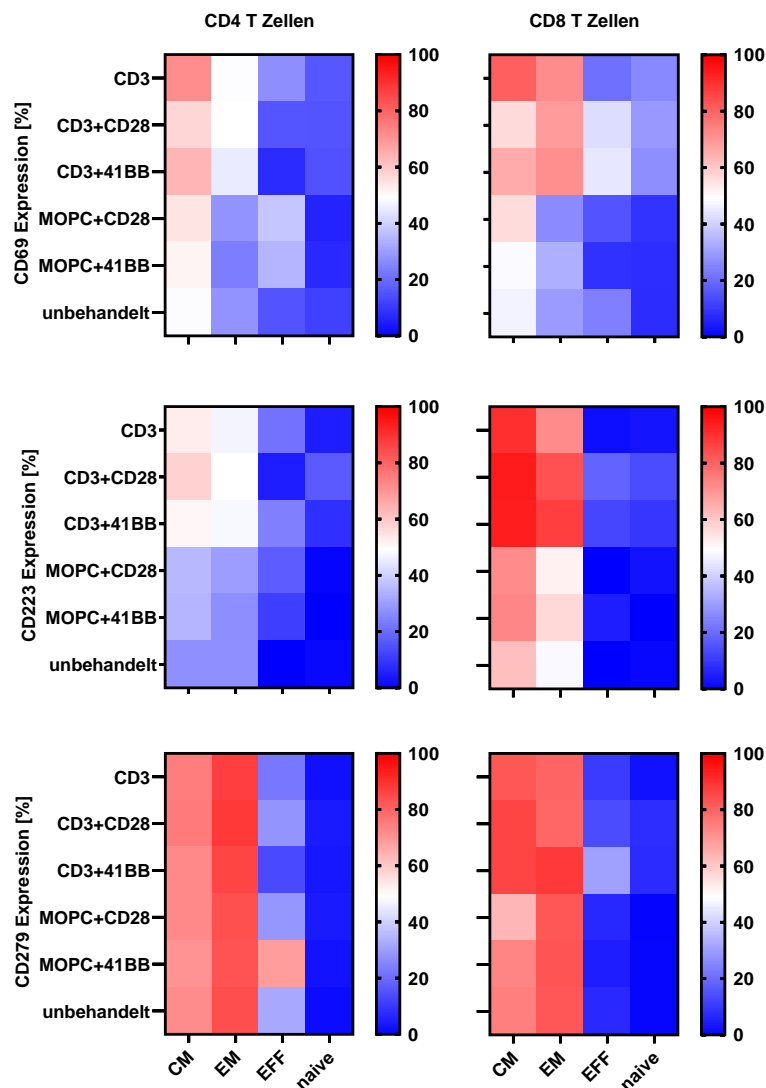
Für CD8 T Zellen zeichnet sich ein ähnliches Muster ab, mit einer deutlich stärkeren Aktivierung. Durch die Stimulation von CD3 kommt es zu einer Expansion von naiven CD8 T Zellen (Faktor 7) und CD8 CM Zellen (Faktor 19). Es ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zu CD4 T Zellen, nun auch CD8 EM Zellen expandiert werden (Faktor 3.5), was aufgrund ihres hohen zytotoxischen Potenzials von besonderer Bedeutung ist. Die Aktivierung von CD8 CM und EM Zellen fällt deutlich stärker als die der korrespondierenden CD4 Populationen aus (Abbildung 3-7). Effektorzellen scheinen auch unter den CD8 T Zellen, zumindest in diesem System, kaum eine Rolle zu spielen. Durch die Kombination mit TA99xPV1 kommt es zu einer massiv verstärkten Proliferation von CD8 CM (Faktor 60) und EM (Faktor 15) Zellen. Dies gilt auch für die Kombination mit TA99xLOB12.3 (CM Faktor 35 und EM Faktor 9.5).

Es kann festgehalten werden, dass es durch den hier verwendeten anti-CD3 Antikörper 2C11 vor allem zur Expansion von T Gedächtniszellen und in geringerem Maße auch zur Expansion von naiven T Zellen kommt. Ein Kostimulus durch CD28 oder 4-1BB kann diesen Effekt massiv verstärken. Interessanterweise scheint es dabei vor allem zu einer Aktivierung von T Gedächtniszellen zu kommen.

Es ist bekannt, dass T Zellen durch eine langanhaltende Aktivierung, ohne sekundäres Signal, in einen anergen Zustand verfallen<sup>24,25</sup>. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob sich die Expression der Erschöpfungs- bzw. Anergie-Marker Lag3 und PD-1 in Abhängigkeit der T Zellstimuli ändert (Abbildung 3-7). Lag3 und PD-1 werden auf aktivierten T Zellen exprimiert und inhibieren deren Proliferation und die Aktivierung<sup>132</sup>.

Die Expression von Lag3 korreliert mit der Aktivierung der T Zellen und deren CD69 Expression, sowie der daraus resultierenden Proliferation (siehe auch Abbildung 3-6A). Für CD4 T Zellen bedeutet dies, dass Lag3 nur auf Gedächtniszellen exprimiert wird, nicht aber auf naiven und Effektorzellen. Eine Expression ist nur in den Gruppen zu finden, welche auch ein primäres Signal durch den Antikörper TA99x2C11 erhalten haben. Die zusätzliche Kostimulation durch CD28 oder 4-1BB ändert die Lag3 Expression nicht. CD8 T Gedächtniszellen zeigen eine stärkere Expression von Lag3. Dies gilt allerdings auch für die Gruppen, welche kein primäres Signal erhalten haben, sowie die unbehandelte Gruppe. Es scheint so, also ob B16-F10 die Expression von Lag3 auf CD8 T Zellen zu einem gewissen Maße allein induzieren können.

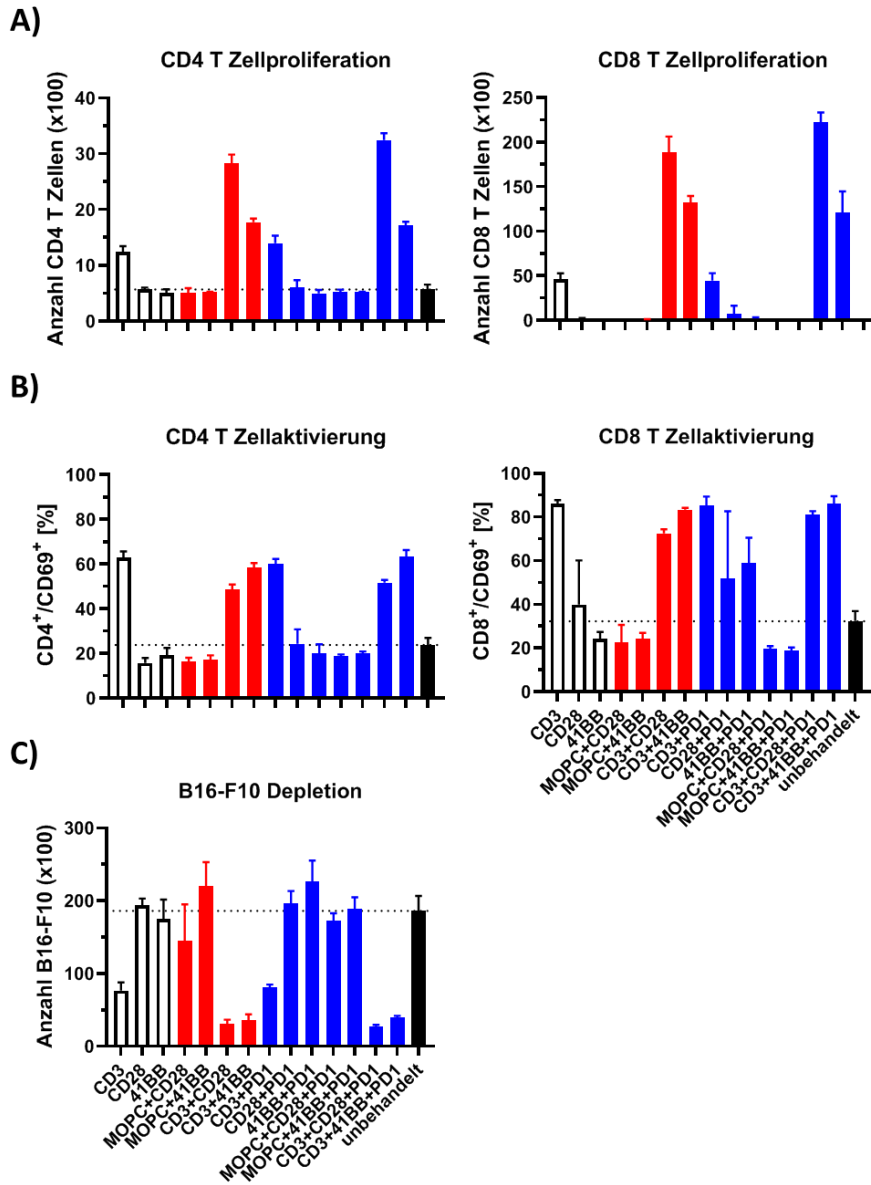
Durch den Einsatz der anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab konnten große Erfolge bei der Behandlung von Melanomen erzielt werden <sup>148</sup>. Aus der Literatur ist auch bekannt, dass B16-F10 den Liganden von PD-1 exprimieren <sup>219</sup>. Deshalb wurde im Folgenden die Expression von PD-1, in Abhängigkeit verschiedener T Zellstimuli, auf verschiedenen T Zellpopulationen untersucht. Interessanterweise wird PD-1 nur auf Gedächtniszellen exprimiert, und zwar unabhängig vom Stimulus. Es scheint so, als ob B16-F10 einen direkten Einfluss auf die Expression von PD-1 nehmen können, um dadurch die T Zellantwort zu unterdrücken.



**Abbildung 3-7: Aktivierung, Erschöpfung und Anergie von T Zellen in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Surrogat-Antikörper.** Die einzelnen T Zellpopulationen aus Abbildung 3-6 wurden auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (oben) analysiert, sowie der Marker CD223 (Lag3, mitte) und CD279 (PD-1, unten), welche von erschöpften bzw. anergen T Zellen exprimiert werden.

CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1, 4-1BB=TA99xLOB12.3, MOPC=MOPCx2C11  
 CM=zentrale Gedächtniszelle, EM=Effektor-Gedächtniszelle, EFF=Effektorzelle

Deshalb wurde der Einfluss des anti-PD-1 Antikörperklons RMP1-14 auf die Effizienz verschiedener immunregulatorischer Antikörper untersucht (Abbildung 3-8). Waite et al. konnten zeigen, dass dieser Antikörper die PD-1/PD-L1 Interaktion inhibiert und es dadurch zu einer verbesserten CD28 Signalgebung kommt <sup>164</sup>.



**Abbildung 3-8: Einfluss der Inhibierung der PD-1/PD-L1 Interaktion auf die T Zellproliferation und -aktivierung.**  $5 \times 10^3$  B16-F10 und  $2 \times 10^5$  C57BL/6 Milzzellen wurden für 4 Tage mit 50 nM bispezifischem Antikörper (entspricht bei Kombination der Gesamtmenge an Protein) inkubiert. Um die Interaktion zwischen PD-1 und seinem Liganden zu inhibieren, wurde der agonistische Klon RMP1-14 (10  $\mu$ g/mL) verwendet und die Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. **A)** Proliferation der CD4 (links) und CD8 (rechts) T Zellen in Abhängigkeit verschiedener immunregulatorischer Antikörper. **B)** Die Aktivierung der T Zellen wurde über den Marker CD69 quantifiziert. **C)** Ebenso wurde die konzentrationsabhängige Lyse der Tumorzellen analysiert. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten. CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1, 4-1BB=TA99xLOB12.3, MOPC=MOPCx2C11, PD-1=RMP1-14



Trotz einer massiven Expression von PD-1 auf CD4 und CD8 Gedächtniszellen, welche unabhängig von den verschiedenen immunregulatorischen Antikörpern auftritt, führt RMP1-14 zu keiner erhöhten T Zellproliferation (Abbildung 3-8A, siehe auch Abbildung 3-7). Weder für das primäre Signal durch TA99x2C11 und die damit verbundene Stimulation von CD3, noch für die Kombination mit den Kostimuli CD28 und 4-1BB. Auch die T Zellaktivierung, durch die Expression von CD69 quantifiziert, ändert sich kaum durch die Inhibierung der PD-1/PD-L1 Interaktion (Abbildung 3-8B). Dies führt schlussendlich auch zu keiner veränderten Lyse von B16-F10.

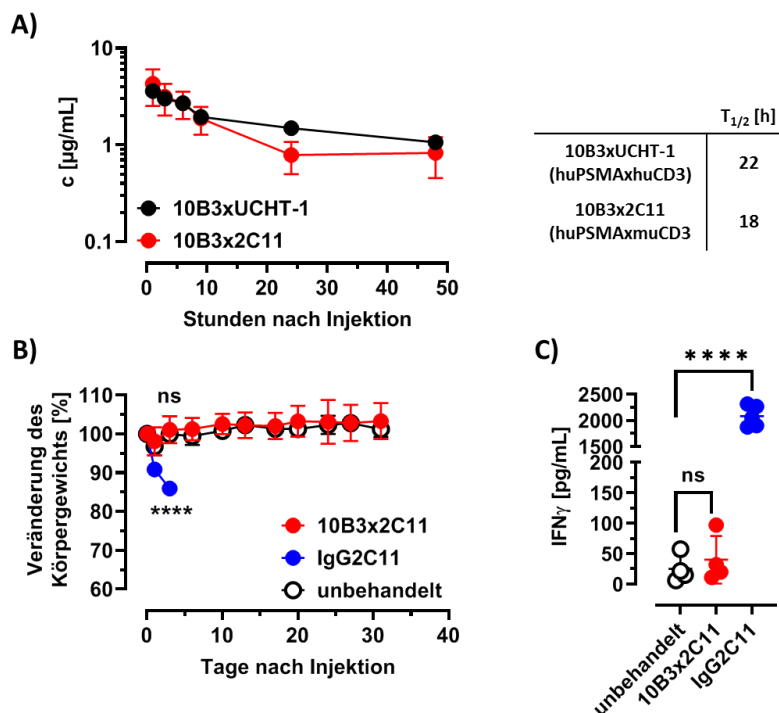
Durch die verschiedenen kostimulatorischen Antikörper kommt es also zu einer (zielzellrestringierten) Expression von Lag3 und PD-1 auf T Gedächtniszellen, welche aber auch teilweise durch B16-F10 hervorgerufen werden kann. Von beiden Molekülen ist bekannt, dass sie die Aktivierung und Proliferation von T Zellen unterdrücken. Trotzdem hat die Blockade der PD-1/PD-L1 Interaktion, zumindest in vitro, keinen Einfluss auf das System.

### **3.1.5 Serumhalbwertszeit und Verträglichkeit**

Für die Effektivität eines immunstimulatorischen Antikörpers ist häufig von Bedeutung, dass dieser eine möglichst lange Serumhalbwertszeit hat. Das hier vorgestellte Format kann über seinen Fc-Teil mit dem FcRn Rezeptor interagieren und liegt mit einem Molekulargewicht von 200 kDa deutlich über der Nierenschwelle (30-50 kDa), sodass eine entsprechend lange Serumhalbwertszeit zu erwarten ist. Die Halbwertszeit eines bispezifischen Antikörpers in diesem Formats wurde bereits von Zekri et al. bestimmt <sup>207</sup>.

Um zu überprüfen, ob sich die hier vorgestellten Surrogat-Antikörper ähnlich verhalten, wurde die TRP1 Bindedomäne durch einen anti-human-PSMA (Prostata-spezifisches Membran-Antigen) Antikörper (Klon 10B3) ausgetauscht. Dieser Schritt war notwendig, um die Menge an Antikörper im Serum mittels PSMA-ELISA bestimmen zu können. Exemplarisch wurde für den Antikörper TA99x2C11 (TRP1xmuCD3) der Antikörper 10B3x2C11 (huPSMAXmuCD3) generiert und dessen Halbwertszeit mit der von 10B3xUCHT-1 (huPSMAXhuCD3, aus Zekri et al.) verglichen (Abbildung 5-2, Anhang). Die Halbwertszeit der beiden Antikörper wurde in C57BL/6 Mäusen bestimmt und liegt zwischen 18 und 22 Stunden (Abbildung 3-9A). Dies bedeutet, dass es durch die Interaktion von 10B3x2C11 mit einem murinem Antigen (CD3), im Vergleich zu 10B3xUCHT-1, welcher in der Maus kein Zielantigen hat, zu keiner veränderten Halbwertszeit kommt.

Der anti-CD3 Antikörper Muromonab-CD3 führt im Menschen, durch die Interaktion mit Fc-Rezeptoren, zu einer systemischen Aktivierung von T Zellen und damit zu einer massiven Produktion von Zytokinen <sup>134</sup>. Dies soll bei den hier thematisierten Antikörpern, durch die weiter oben bereits eingeführten FcKo-Mutationen, verhindert werden. Stattdessen soll es durch die Bindung an das Antigen TRP1 zu einer zielzellrestringierten Immunantwort kommen. Um zu verifizieren, dass die FcKo-Mutationen die Fc-Rezeptorbindung wirklich verhindern und dass es auch sonst zu keiner unspezifischen Aktivierung von T Zellen kommt, wurde die Verträglichkeit von 10B3x2C11 in C57BL/6 Mäusen getestet. Im Gegensatz zu TRP1, welches auch auf normalen Melanozyten exprimiert wird, bindet 10B3 nicht an murines PSMA <sup>174,207</sup>. Dadurch kann es zu keiner unspezifischen T Zellaktivierung, durch die Immobilisierung des Antikörpers in nicht-relevantem Gewebe kommen.



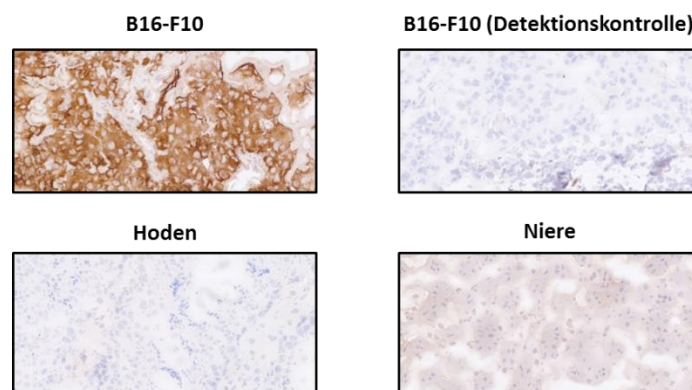
**Abbildung 3-9: Serumhalbwertszeit und Verträglichkeit von zielzellrestringierten, bispezifischen anti-CD3 Surrogat-Antikörpern.** **A)** C57BL/6 Mäusen wurden 20 µg Antikörper intravenös verabreicht. Nach 1, 3, 6, 9, 24 und 48 Stunden wurde den Mäusen retrobulbär Blut abgenommen und die Antikörper-Konzentration durch einen PSMA-ELISA bestimmt. Die Halbwertszeit wurde mittels einer Standardgerade berechnet und ist rechts neben dem Graphen gezeigt. Mittelwert ± Standardabweichung von 5 Mäusen pro Gruppe. **B)** C57BL/6 Mäusen wurde 20 µg Antikörper intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurde die Verträglichkeit durch regelmäßige Gewichtskontrolle überprüft. **C)** Den Mäusen aus B) wurde nach 24 Stunden retrobulbär Blut entnommen und die IFN- $\gamma$  Serumkonzentration mittels ELISA quantifiziert. Mittelwert ± Standardabweichung von mind. 4 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Signifikanz, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, wurde mithilfe einer One-Way ANOVA (Post-Hoc-Test: Dunnett) berechnet (ns = nicht signifikant, \*\*\*\* = p < 0.0001).

Um die Verträglichkeit und die unspezifische Aktivierung von 10B3x2C11 zu testen, wurde C57BL/6 Mäusen 20 µg Antikörper verabreicht (Abbildung 3-9B+C). Zusätzlich wurde einer Gruppe monoklonaler 2C11 injiziert, welcher mit den Fc-Rezeptoren der Maus interagieren kann und von dem bekannt ist, dass er zu einer unspezifischen und systemischen Aktivierung von T Zellen führt<sup>220,221</sup>. Durch die Injektion von monoklonalem 2C11 kommt es zu einem massiven Gewichtsverlust der Mäuse, was laut Tierversuchsantrag einen Abbruch des Experiments bedeutete. Zusätzlich sorgt die systemische Aktivierung von T Zellen für eine massive Freisetzung von IFN-γ, was nach 24 Stunden mittels ELISA gemessen werden kann. Durch die FcKo-Mutationen in 10B3x2C11 kann dies verhindert werden. Die Mäuse verlieren, im Vergleich zu Kontrollgruppe, kein Gewicht und es kann kein signifikant erhöhter Serumspiegel von IFN-γ gemessen werden.

Die Ergebnisse belegen zusammengefasst, dass das hier vorgestellte IgGsc-Format, die in Mäusen erwartete Halbwertszeit von ca. 22 Stunden aufweist<sup>222</sup>. Außerdem kommt es zu keiner systemischen und unspezifischen Aktivierung von T Zellen, dies wird durch die FcKo Mutationen verhindert.

### 3.1.6 Funktionelle in vivo Charakterisierung im Flankenmodell

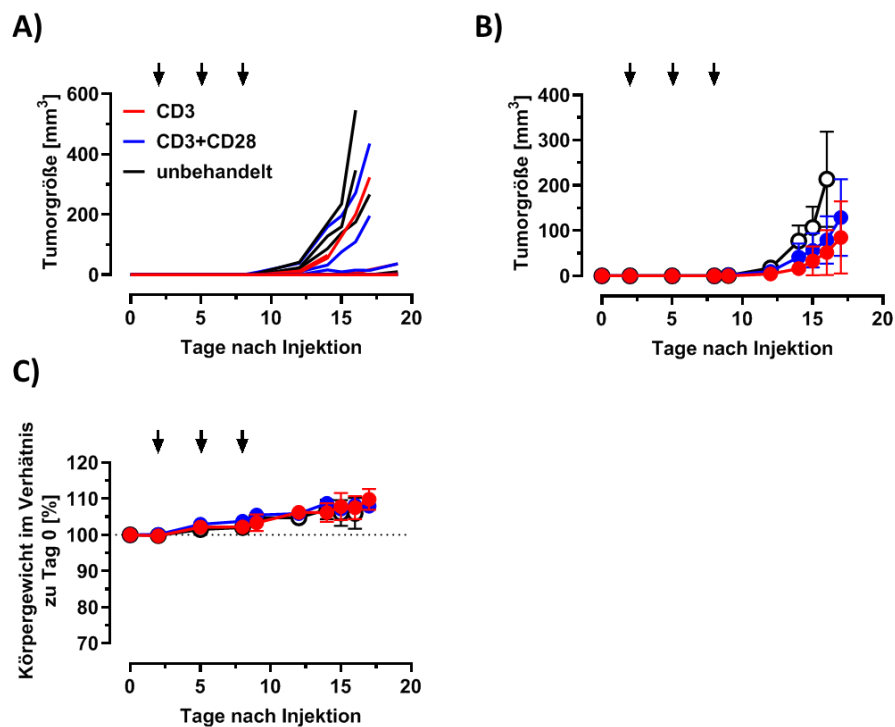
Das B16-F10 Flankenmodell wird in der Tumorforschung häufig für die Evaluation von immuntherapeutischen Substanzen verwendet. Typischerweise werden dabei C57BL/6 Mäusen 10<sup>5</sup> Zellen in der Flanke unter die Haut gespritzt. Nach 5-10 Tagen bildet sich ein tastbarer Tumor<sup>214</sup>. Das Wachstum des Tumors kann anschließend einfach mit einem Caliper gemessen werden.



**Abbildung 3-10: Expression von TRP1 auf B16-F10 Flankentumoren.** Um sicherzustellen, dass B16-F10 das Antigen TRP1 nicht nur in vitro, sondern auch in vivo exprimieren, wurde ein Flankentumor entnommen und die Expression von TRP1 mittels Immunhistochemie verifiziert.

Um sicherzustellen, dass B16-F10 das Antigen TRP1 nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* exprimieren, wurde ein B16-F10 Flankentumor entnommen und die TRP1 Expression durch Immunhistochemie verifiziert (Abbildung 3-10). Dafür wurde ein monospezifischer TA99 Antikörper mit humanem FcKo Fc-Teil benutzt (Abbildung 5-3, Anhang). Es zeigt sich eine starke und spezifische Färbung auf B16-F10 Tumoren, nicht aber auf anderen Geweben.

In einem ersten Experiment wurden den Mäusen je  $10^5$  B16-F10 subkutan in die Flanke injiziert. Zusätzlich wurde an den Tagen 2, 5 und 8 mit jeweils  $12.5 \mu\text{g}$  Antikörper behandelt, ein Schema, welches für ähnliche Antikörper bereits in der Literatur beschrieben ist<sup>208,215</sup>.



**Abbildung 3-11: Wachstum von B16-F10 Flankentumoren in C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörpern.** A) Den Mäusen wurden  $10^5$  Zellen subkutan in Flanke injiziert und das Wachstum der Tumore in regelmäßigen Abständen mit einem Caliper bestimmt. An den Tagen 2, 5 und 8 wurden die Mäuse intraperitoneal mit  $12.5 \mu\text{g}$  Antikörper (entspricht bei Kombination der Gesamtmenge an Protein) behandelt. B) Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der einzelnen Behandlungsgruppen aus A) (5 Mäuse pro Gruppe). C) Die Mäuse aus A) wurden in regelmäßigen Abständen gewogen um einen Therapie-abhängigen Gewichtsverlust auszuschließen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.  
 CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1

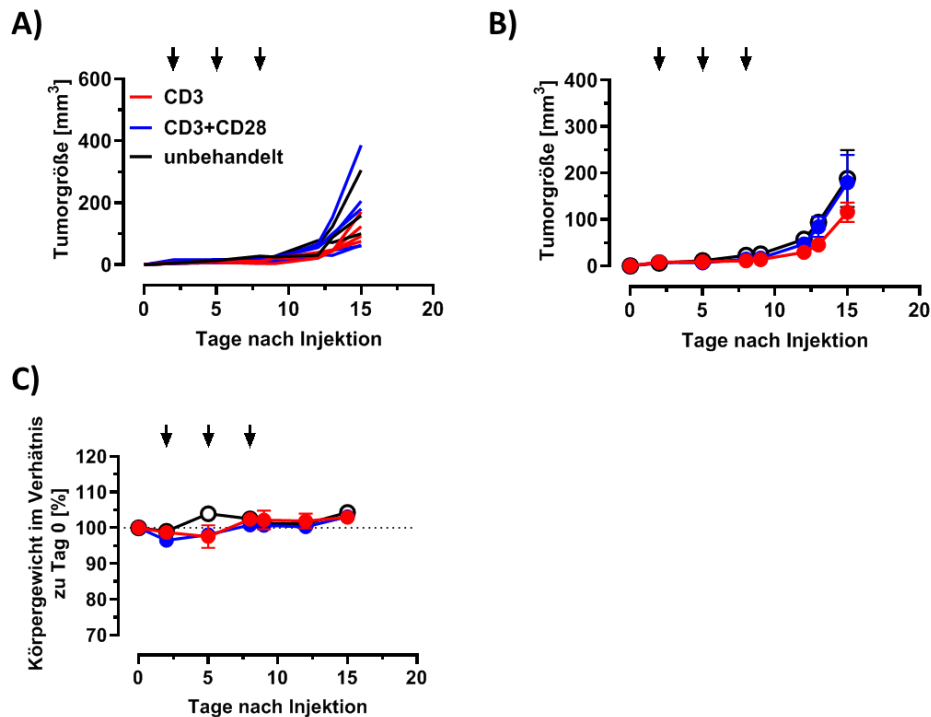
Es zeigte sich ein sehr heterogenes Tumorwachstum in der unbehandelten Gruppe (Abbildung 3-11A). In drei Mäusen war nach spätestens 12 Tagen ein deutlicher Tumor zu ertasten, in einer Maus allerdings erst nach Tag 19 und eine Maus blieb bis zum Ende des Experiments tumorfrei. In der mit TA99x2C11 behandelten Gruppe blieb ebenfalls ein Tier tumorfrei und es zeigte sich ein leicht verzögertes, aber nicht signifikant reduziertes Tumorwachstum (Abbildung 3-11A). Die Kombination mit TA99xPV1, obwohl in vitro deutlich potenter, erzielte keinen verbesserten Effekt. Jedoch blieben in dieser Gruppe zwei Tiere tumorfrei. Da es in diesem ersten Versuch um die Etablierung des Versuchs ging, wurde zunächst auf die Kombination mit TA99xLOB12.3 und entsprechende Isotyp-Kontrollen verzichtet.

Durch das sehr heterogene Wachstum der Tumore innerhalb der einzelnen Gruppen, und der damit verbundenen hohen Standardabweichung, konnte kein signifikanter Therapieerfolg der verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörper erzielt werden. Mit größeren Gruppen könnte man die hohe Standardabweichung evtl. korrigieren und somit Signifikanzen erzeugen, darauf wurde im Folgenden allerdings verzichtet. Anzumerken ist, dass in diesem Modell weder ein CD3 Stimulus alleine, noch die Kombination mit CD28 zu einem Gewichtsverlust der Mäuse führte (Abbildung 3-11C). Dies unterstreicht die Zielzellrestriktion der hier verwendeten Antikörper.

Um das Tumorwachstum für weiterführende Versuche homogener zu gestalten, wurden  $10^4$  B16-F10 in Matrigel subkutan in die Flanke gespritzt (Abbildung 3-12). Matrigel ist eine Proteinmatrix, welche von murinen Sarkomzellen produziert wird. Es ähnelt der extrazellulären Matrix vieler Gewebe und unterstützt dadurch das Wachstum der Zellen<sup>223</sup>.

Durch das Matrigel kommt es zu einem gleichmäßigeren Tumorwachstum und keines der Tiere blieb bis Ende des Experiments tumorfrei. Allerdings wachsen Tumore mit Matrigel auch deutlich schneller. Während mit Matrigel die ersten Tumore schon an Tag 2 ertasten werden konnten (evtl. auch bedingt durch das Matrigel selbst), war dies ohne Matrigel erst an Tag 10 der Fall. Deshalb ist zu bemerken, dass Matrigel einen erheblichen Einfluss auf das Tumorwachstum hat und damit auch einen Einfluss auf die Immuntherapie haben kann.

Es erfolgte eine erneute Behandlung der Mäuse mit TA99x2C11 und in Kombination mit TA99xPV1 an den Tagen 2, 5 und 8 (je 12.5 µg). Jedoch konnte in diesem Versuch kein Erfolg der Therapie mehr festgestellt werden (Abbildung 3-12B). Trotzdem kann auch hier angemerkt werden, dass es durch die Antikörper zu keinen Nebenwirkungen kommt und die Mäuse durch die Behandlung nicht an Gewicht verlieren (Abbildung 3-12C).



**Abbildung 3-12: Wachstum von B16-F10 Flankentumoren mit Matrigel in C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörpern.** A) Den Mäusen wurden  $10^4$  Zellen subkutan in Flanke injiziert und das Wachstum der Tumore in regelmäßigen Abständen mit einem Caliper bestimmt. An den Tagen 2, 5 und 8 wurde die Mäuse intraperitoneal mit  $12.5 \mu\text{g}$  Antikörper (entspricht bei Kombination der Gesamtmenge an Protein) behandelt. B) Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der einzelnen Behandlungsgruppen aus A) (3-4 Mäuse pro Gruppe). C) Die Mäuse aus A) wurden in regelmäßigen Abständen gewogen um einen Therapie-abhängigen Gewichtsverlust auszuschließen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. CD3=TA99x2C11, CD28=TA99xPV1

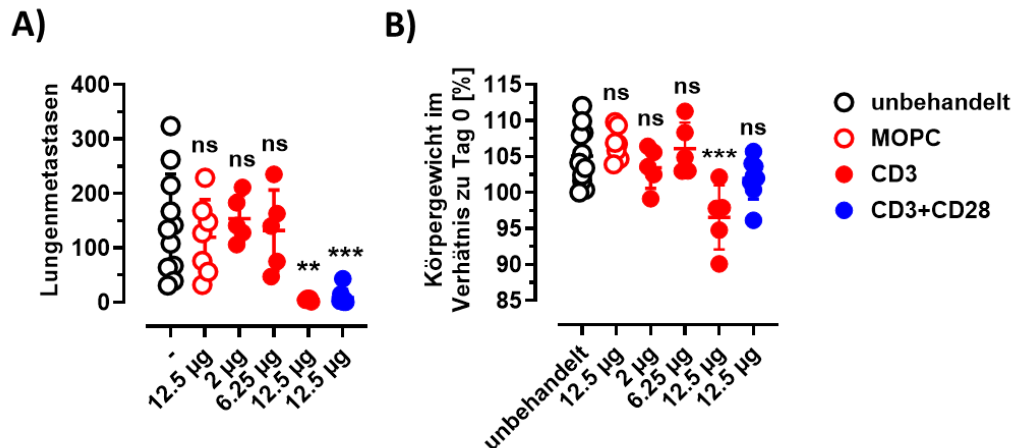
Insgesamt kann resümiert werden, dass kein robustes B16-F10 Flankenmodell etabliert werden konnte, in welchem man zuverlässig, die in dieser Arbeit generierten, immunregulatorischen Antikörper hätte testen können. Leider handelt es sich bei B16-F10 um eine sehr aggressiv und heterogen wachsende Zelllinie, welche zudem kaum immunogen ist.

### 3.1.7 Funktionelle in vivo Charakterisierung im Lungenmetastasenmodell

Das B16-F10 Lungenmetastasenmodell ist ein weiteres Tumormodell, um die Effektivität von therapeutischen Antikörpern zu bewerten. Die Zellen werden C57BL/6 Mäusen intravenös in die Schwanzvene verabreicht und bleiben in den engen Kapillaren der Lunge hängen. Der Begriff „Metastasen“ ist in diesem Zusammenhang allerdings irreführend, da es sich nicht um echte Metastasen handelt, sondern um einzelne Primärtumore<sup>214</sup>.

In dieser Arbeit wurden den Mäusen  $3 \times 10^5$  Zellen injiziert. Nach 2 Wochen wurden die Lungen entnommen und fixiert. Ohne Behandlung konnten im Schnitt ca. 141 Metastasen pro Lunge gezählt werden (Abbildung 3-13A). Durch die Behandlung mit je  $12.5 \mu\text{g}$  TRP1xCD3

Antikörper, an den Tagen 1, 4 und 7, kann die Anzahl an Metastasen signifikant reduziert werden. Es waren nur noch einzelne Metastasen, bis zu 7, auf den Lungen erkennbar. Niedrigere Konzentration dieses Antikörpers zeigen keinen Therapieerfolg mehr. Durch die Isotyp-Kontrolle MOPC $\times$ CD3, welche kein bekanntes Tumorantigen bindet, kommt es in der höchsten Konzentration (12.5  $\mu$ g) zu keiner Reduktion der Tumorlast. Dies unterstreicht die Zielzellrestriktion des hier verwendeten Moleküls.



**Abbildung 3-13: Anzahl von B16-F10 Lungenmetastasen in C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit verschiedenen immunregulatorischen Surrogat-Antikörpern.** A) Den Mäusen wurden  $3 \times 10^5$  B16-F10 intravenös in die Schwanzvene injiziert. An den Tagen 1, 4 und 7 wurde die Mäuse intraperitoneal mit 12.5  $\mu$ g Antikörper (entspricht bei Kombination der Gesamtmenge an Protein) behandelt. Nach 14 Tagen wurden die Lungen entnommen und die Metastasen gezählt. B) Das Gewicht der Mäuse aus A) nach zwei Wochen im Verhältnis zu Tag 0. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mind. 5 Mäusen pro Gruppe. Die statistische Signifikanz, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, wurde mithilfe einer One-Way ANOVA (Post-Hoc-Test: Dunnett) berechnet (ns = nicht signifikant, \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ). CD3=TA99 $\times$ 2C11, CD28=TA99 $\times$ PV1, MOPC=MOPC $\times$ CD3

Wird die Behandlung des bispezifischen anti-CD3 Antikörpers mit dem CD28 Agonisten TA99 $\times$ PV1 kombiniert (je 6.25  $\mu$ g), kommt es, im Gegensatz zur Monotherapie, erneut zu einer signifikanten Reduktion der Tumorlast. Dies zeigt, dass die Kombination von agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern nicht nur in vitro, sondern auch in vivo die Tumorzelllyse verbessern kann.

Anders als in den Experimenten im letzten Kapitel mit 10B3 $\times$ 2C11, führt TA99 $\times$ 2C11 in der höchsten Konzentration (12.5  $\mu$ g) zu leichten Nebenwirkungen, da es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem leichten Gewichtsverlust der Mäuse kommt (Abbildung 3-13B). Dies kann daran liegen, dass das Antigen TRP1 nicht nur auf B16-F10 exprimiert wird, sondern auch auf normalen Melanozyten<sup>174</sup>. Hier zeigen sich erneut die Vorteile der Kombinationstherapie, bei der es zu keinem Gewichtsverlust kommt.

Anders als im Flankenmodell, konnte in dem hier verwendeten Lungenmetastasenmodell, die Effektivität der bispezifischen Surrogat-Antikörper gezeigt werden. In Zukunft soll noch die Kombination mit dem bispezifischen 4-1BB Agonisten TA99xLOB12.3, sowie einem blockierenden anti-PD-1 Antikörper erfolgen. Außerdem soll das Dosisschema weiter untersucht werden. Dabei stellt sich die Frage, wann die erste Injektion der Antikörper spätestens erfolgen muss, um noch einen Therapieerfolg erzielen zu können, und wie oft diese Dosis appliziert werden muss.



### 3.2 „Dual targeting über B7-H3“ – Gleichzeitige Lyse von Tumor und Tumorgefäßen

Ein ideales Tumorantigen sollte nicht nur auf dem Tumor selbst, sondern auch auf den Tumorgefäßen exprimiert sein. Die Idee dahinter ist, dass es durch die zusätzliche Lyse der Tumorgefäße zu einer „Öffnung“ des Tumors kommt und zu einem verstärkten Influx von T Zellen. Seaman et al. beschreiben, dass das Antigen B7-H3 (CD276) genau diese Anforderungen erfüllt <sup>179,182</sup>. Es ist ein Marker für Neo-Angiogenese ist und wird auf der Tumolvaskulatur von Nagern und Menschen exprimiert, aber kaum auf normalen Gefäßen. Gleichzeitig wird B7-H3 aber auch auf vielen Tumoren exprimiert, während die Expression auf gesundem Gewebe eher gering ist (Tabelle 3-1). Daher könnte B7-H3 ein ideales Antigen sein, um mit immunstimulatorischen Antikörpern sowohl den Tumor als auch die Tumorgefäße anzugreifen.

Um die Effizienz von B7-H3 als vaskuläres Zielantigen zu untersuchen, sollte ein Mausmodell entwickelt werden, bei dem eine huB7-H3 positive Zelllinie subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert wird. Die infiltrierenden Gefäße sollten dann laut Literatur positiv für murines B7-H3 sein. Durch die Kombination von bispezifischen Antikörpern gegen das humane oder das murine Protein, welches nur auf dem Tumor bzw. den dazugehörigen Gefäßen exprimiert wird, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die (zusätzliche) Lyse der Tumolvaskulatur auf die Therapie hat.

**Tabelle 3-1: Immunhistochemische Färbung von humanem B7-H3 auf normalem und Tumorgewebe.** Die Expression des Antigens B7-H3 auf verschiedenen Geweben wurde mittels Immunhistochemie ermittelt. Es ist beispielhaft die Auswertung für den Antikörper HEK-5 gezeigt. Alle anderen anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigen ein ähnliches Färbemuster. Die Auswertung erfolgte durch Prof. Bence Sipos (Pathologisches Institut, Universität Tübingen). Nicht vorhanden (-), schwach (+), mittel (++) und stark (+++).

Gewebe	Benignes Gewebe			Tumor		
	Parenchym	Stroma	Gefäße	Parenchym	Stroma	Gefäße
Magen	-	-	-	++	+++	+++
Dünndarm	-	-	-	++	+++	+++
Dickdarm	+	+	+	+++	++	+++
Gehirn	-	-	-	++	+	+
Niere	-	-	-	+	++	+++
Leber	++	++	++	+	+++	+++
Lunge	-	-	-	+	+++	+++
Pankreas	-	-	-	+++	++	+++
Haut	-	-	-	+++	++	++
Skelettmuskulatur	-	-	-	+++	++	+++
Prostata	+	+	+	+++	+++	+++
Brust	+	+	+	+++	++	+++
Eierstock	+	+	+	++	+++	+++
Gebärmutter	+	+	+	+++	+++	+++

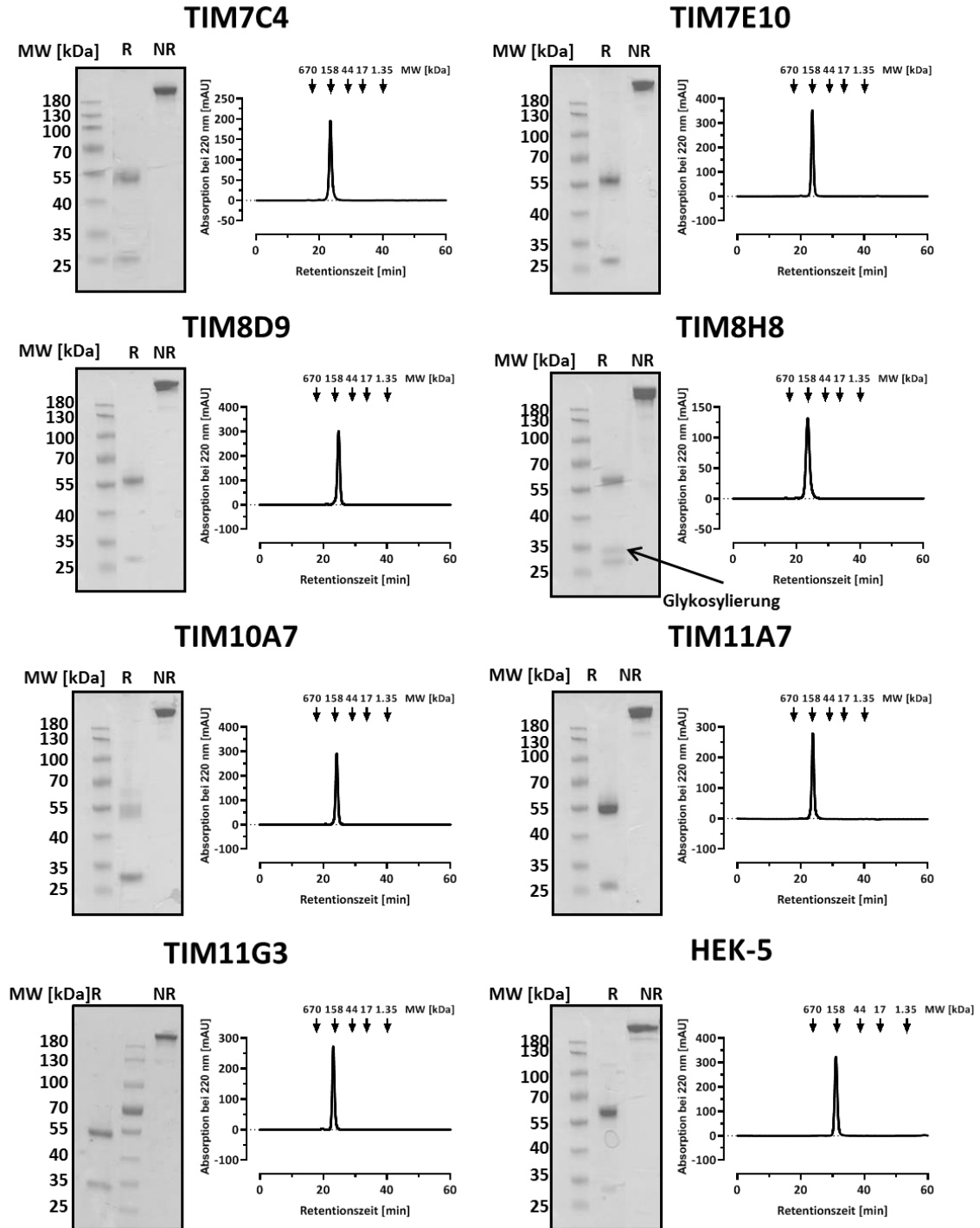
Dafür wurden zuerst zwei unterschiedliche Gruppen von anti-B7-H3 Antikörpern charakterisiert. Beide wurden von Dr. Timo Manz (AG Jung, Universität Tübingen), mittels Hybridom- oder Phage-Display-Technologie hergestellt, letztere in Kooperation mit Prof. Stefan Dübel (Universität Braunschweig). Anschließend wurden vielversprechende Kandidaten ins bispezifische Format überführt und weiter charakterisiert.

Die bispezifischen Antikörper wurden im bereits weiter oben eingeführten IgGsc Format generiert und tragen die damit verbundenen FcKo-Mutationen, um eine unspezifische Immunantwort zu verhindern (Abbildung 3-23D). Im C-terminalen scFv befindet sich in allen weiteren, in diesem Abschnitt behandelten, bispezifischen Molekülen, eine humanisierte Variante von UCHT-1. Dabei handelt es sich um einen anti-huCD3 Antikörper, welcher nach Immobilisierung T Zellen aktiviert und zur Proliferation anregt <sup>224</sup>. Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein Xenograft-Modell entwickelt werden soll und immundefiziente Mäuse keine funktionellen T Zellen haben, sollte zusätzlich eine intraperitoneale Gabe von humanen PBMCs erfolgen.

### **3.2.1 Biochemische Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper**

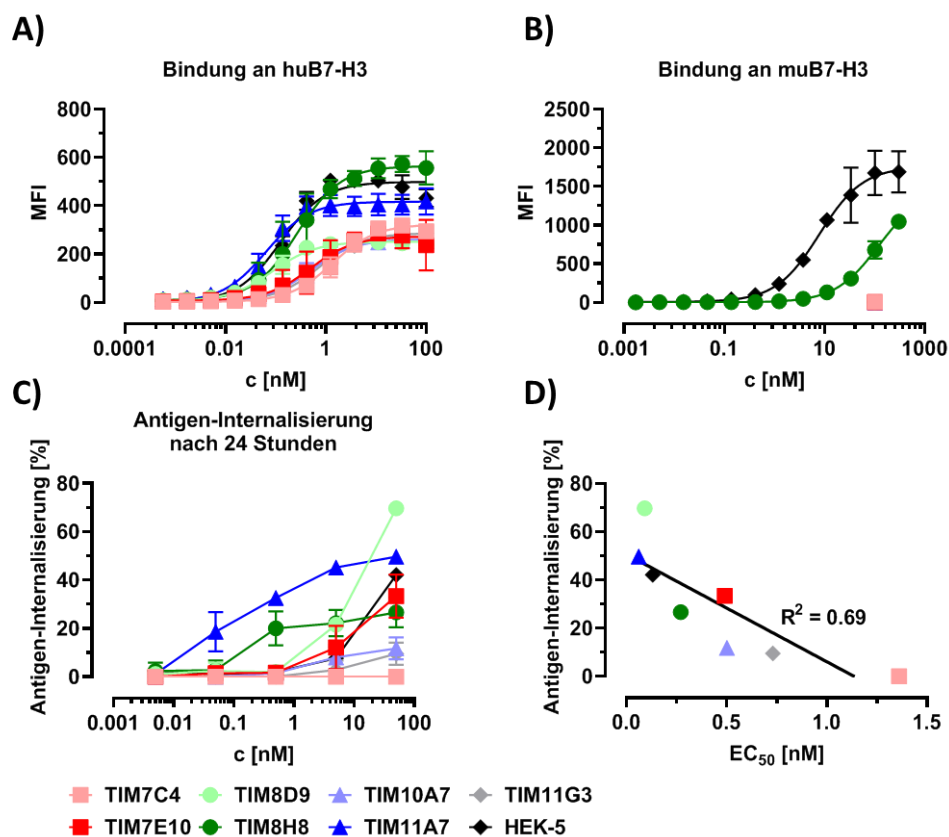
Durch die Immunisierung von Balb/c Mäusen konnten insgesamt sieben anti-B7-H3 Antikörper generiert werden, alle haben den murinen Isotyp IgG1 $\kappa$  (Tabelle 3-2). HEK-5 ist ein bereits etablierter anti-B7-H3 Antikörper, welcher freundlicherweise von Dr. Hans-Jörg Bühring (Universität Tübingen) bereitgestellt wurde. Er diente in vielen weiteren Versuchen als Kontrolle. Die restlichen Antikörper wurden, wie in Material & Methoden beschrieben, direkt aus den Zellkultur-Überständen der fusionierten Mylomzellen über Protein A aufgereinigt. Das korrekte Molekulargewicht und die Reinheit wurden anschließend über eine SDS-PAGE verifiziert (Abbildung 3-14).

Unter reduzierenden Bedingungen zeigen fast alle Antikörper zwei Banden. Die untere Bande repräsentiert dabei die leichte Kette (~25 kDa), während die obere Bande für die schwere Kette steht (~50 kDa). Einzig TIM8H8 zeigt unter nicht reduzierenden Bedingungen drei Banden. Durch die Sequenzierung dieses Antikörpers konnte später festgestellt werden, dass sich in der CDR3 der leichten Kette eine Glykosylierungsstelle (-NYS-) befindet. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist jeweils nur eine einzelne Bande zu sehen, welche für das gesamte IgG Molekül steht (~150 kDa). Durch Größenausschluss-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass alle Antikörper frei von Aggregaten und Verunreinigungen sind. Außerdem konnte das Molekulargewicht von ca. 150 kDa verifiziert werden.



**Abbildung 3-14: Biochemische Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Antikörper, hergestellt durch Hybridom-Technologie.** Das richtige Molekulargewicht und die Reinheit der unterschiedlichen Antikörper wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen auf einer SDS-PAGE überprüft (links). Außerdem wurde die Menge an Aggregaten und sonstigen Verunreinigungen durch eine Größenausschluss-Chromatographie analysiert (rechts).

Die konzentrationsabhängige Bindung der Antikörper an humanes und murines B7-H3 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Tabelle 3-2). Die Affinität für humanes B7-H3, welches auf Granta-519, einer humanen B Zellymphom-Zelllinie, exprimiert wird, liegt für alle Antikörper, außer TIM7C4, im subnanomolaren Bereich (Abbildung 3-15A). Eine Bindung an murines B7-H3 würde man von Antikörpern, welche mittels Hybridom-Technologie generiert wurden nicht erwarten, da diese eigentlich nicht mit murinen Antigenen reagieren<sup>88</sup>. Trotzdem wurde die Bindung auf, mit murinem B7-H3 transfizierten, B16-F10 getestet. Erstaunlicherweise zeigten HEK-5 ( $EC_{50} = 7.82$  nM) und in gewissem Maße auch TIM8H8 eine Bindung an murines B7-H3 (Abbildung 3-15B).



**Abbildung 3-15: Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung und -Internalisierung verschiedener anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper mittels Durchflusszytometrie.** A) Bindung der anti-B7-H3 Antikörper an humanes B7-H3 auf Granta-519 Zellen. B) Bindung an mit murinem B7-H3 transfizierte B16-F10. C) Antigen-Antikörper-Komplex Internalisierung auf humanem B7-H3 auf Granta-519 Zellen nach 24 Stunden. D) Korrelation zwischen Affinität und Internalisierung auf humanem B7-H3 bei einer Konzentration von 50 nM. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n \geq 3$ .

Nach der Bindung eines Antikörpers an sein Antigen, kommt es häufig zu einer Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Bei einigen Anwendungen, wie bei ADCs, ist dies gewünscht, da das Toxin seine Wirkung nur so in der Zelle entfalten kann<sup>105</sup>. In anderen Bereichen schränkt eine Internalisierung die Wirkung der Antikörper stark ein, wenn z.B. ADCC ausgelöst werden soll<sup>225</sup>.

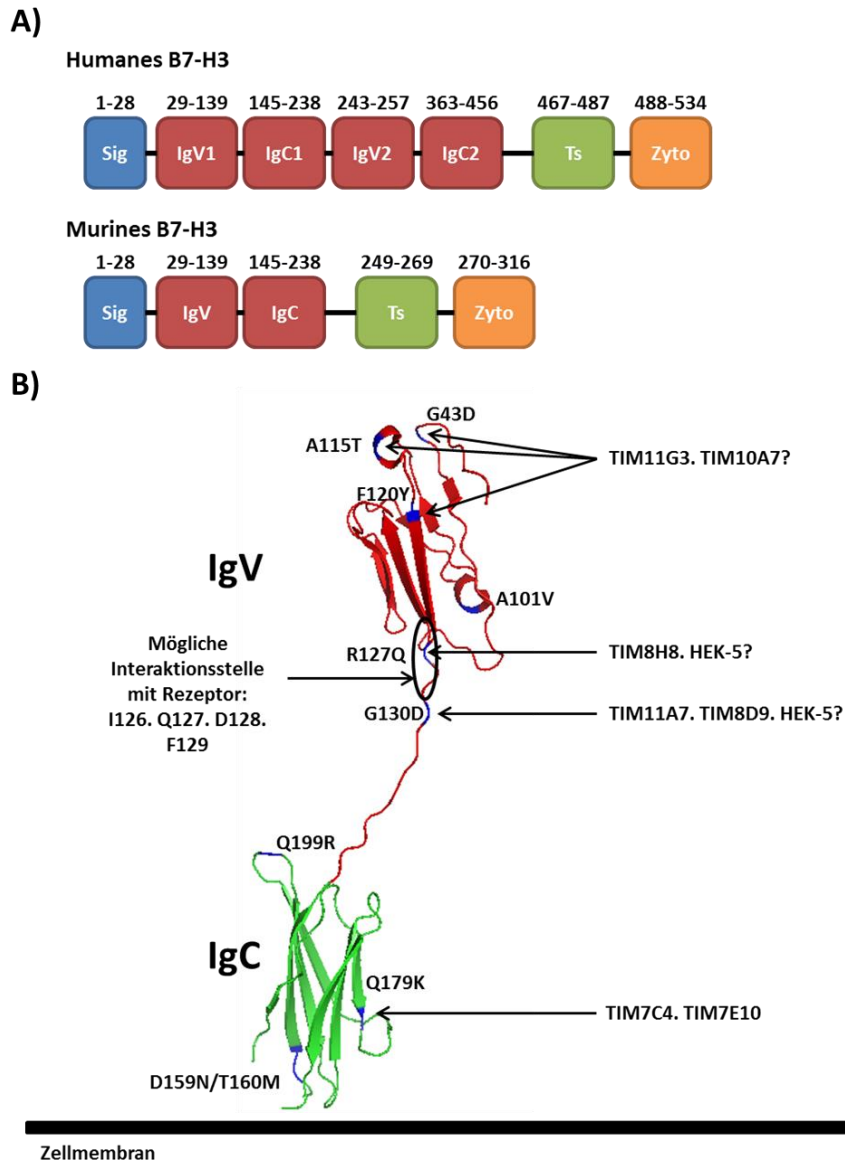
In dieser Arbeit sollen die anti-B7-H3 Antikörper später in ein bispezifisches Format konvertiert werden und T Zellen am Tumor aktivieren und zur Proliferation anregen. Daher kann auch hier davon ausgegangen werden, dass eine verstärkte Internalisierung der Aktivität der Antikörper im Weg steht. Die konzentrationsabhängige Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde nach 24 h auf Granta-519 Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abbildung 3-15C+D). Dabei zeigt sich eine klare Korrelation zwischen Affinität und Internalisierung. Je affiner ein Antikörper ist, desto höher ist die Internalisierung. Bei hoch-affinen Antikörpern, wie TIM8D9, liegt sie bei fast 70%, während sie bei niedrig-affinen Antikörpern, wie TIM7C4, gar nicht stattfindet (Tabelle 3-2).

**Tabelle 3-2: Eigenschaften der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper.**

Antikörper	Isotyp (Maus)	huB7-H3 EC <sub>50</sub> [nM]	muB7-H3 EC <sub>50</sub> [nM]	Internalisierung huB7-H3 bei 50 nM [%]	Epitop
<b>TIM7C4</b>	IgG1κ	1.36 ± 0.92	-	-	Q179
<b>TIM7E10</b>	IgG1κ	0.49 ± 0.71	-	33	Q179
<b>TIM8D9</b>	IgG1κ	0.09 ± 0.03	-	70	G130
<b>TIM8H8</b>	IgG1κ	0.27 ± 0.20	(119)	27	R127
<b>TIM10A7</b>	IgG1κ	0.50 ± 0.34	-	12	P34/G43/A115/F120?
<b>TIM11A7</b>	IgG1κ	0.06 ± 0.02	-	50	G130
<b>TIM11G3</b>	IgG1κ	0.73 ± 0.31	-	10	P34/G43/A115/F120
<b>HEK-5</b>	IgG2ακ	0.13 ± 0.02	7.82 ± 4.20	42	In der Nähe von R127 und G130

### 3.2.2 Epitop Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper

Eine weitere Eigenschaft, welche die Aktivität von bispezifischen, immunstimulatorischen Antikörpern beeinflussen kann, ist das Epitop an welches sie binden. Murines B7-H3 besteht aus 316 Aminosäuren: einem Signalpeptid, einer extrazellulären Domäne (IgV-IgC = 2IgB7-H3), einer transmembran Region und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich (Abbildung 3-16A). Durch Exon-Duplikation besteht das humane Proteine aus 4 Ig-Domänen (IgV1-IgC1-IgV2-IgC2 = 4IgB7-H3)<sup>226</sup>. B7-H3 ist ein hoch konserviertes Molekül, das humane und das murine Protein haben eine Sequenzidentität von ca. 88% (Abbildung 5-5, Anhang)<sup>177</sup>.



**Abbildung 3-16: Kristallstruktur von B7-H3 und Bindestellen der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper.** **A)** Schematische Struktur von humanem und murinem B7-H3. B7-H3 ist ein Typ 1 Transmembranprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid (blau), gefolgt von den extrazellulären IgV und IgC Domänen (rot), einer Transmembranregion (grün) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (orange). Adaptiert von Wang et al. <sup>178</sup> **B)** Kristallstruktur von murinem B7-H3, es sind die Aminosäuren 35 bis 238 gezeigt. Im Rahmen der Epitop-Charakterisierung wurden verschiedene Aminosäuren (blau) im humanen Protein durch die entsprechenden aus dem murinen Protein ersetzt. Die (potenziellen) Epitope der einzelnen Antikörper sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die potentielle Interaktionsstelle des murinen Proteins, mit dem bisher unbekanntem Rezeptor, liegt zwischen den Aminosäuren 126 und 129. Adaptiert von Vigdorovich et al. <sup>227</sup>. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt (PDB: 4I0K).

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die anti-B7-H3 Antikörper, aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen IgV1 und IgV2 sowie IgC1 und IgC2, sowohl IgV1-IgC1 als auch IgV2-IgC2 des humanen Proteins binden können. Deshalb wurde ein IgV1-IgC1-IgV2-IgC2-Fc Fusionsprotein hergestellt (Dr. Timo Manz, AG Jung, Universität Tübingen), welches über Protein A aufgereinigt wurde. Dieses rekombinante Protein besteht aus den

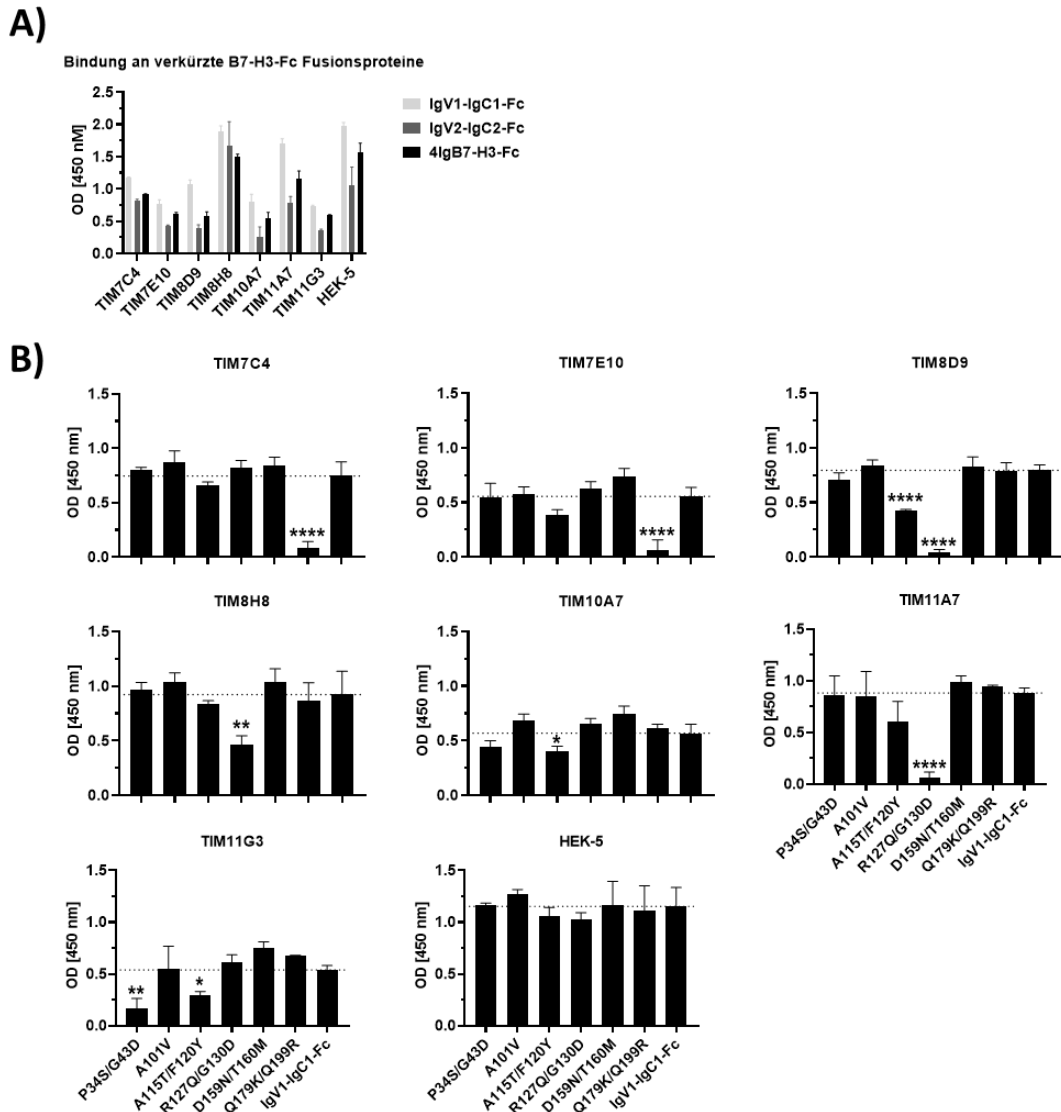
Aminosäuren 29-461 des humanen Proteins, gekoppelt an die Gelenkregion eines humanen IgG1 Antikörpers. Zusätzlich wurde noch ein IgV1-IgC1-Fc (Aminosäuren 29-242) und ein IgV2-IgC2-Fc (Aminosäuren 243-461) Protein generiert (Abbildung 5-4, Anhang). Alle acht Antikörper zeigen eine vergleichbare Bindung an alle drei Fusionsproteine, wie im ELISA gezeigt werden konnte (Abbildung 3-17A). Dies spricht dafür, dass zwei Antikörper zur selben Zeit an ein humanes B7-H3 Molekül binden könnten.

Es konnte bereits gezeigt, dass keiner der Antikörper, außer HEK-5 und TIM8H8, an das murine Protein bindet (Abbildung 3-15B). Deshalb wurde geschlussfolgert, dass die Antikörper an Aminosäuren im humanen Protein binden müssen, welche im murinen Protein nicht vorkommen. Deshalb wurden die Sequenzen der extrazellulären Domänen, von humanem und murinem B7-H3, verglichen und festgestellt, dass diese sich nur in 12 Aminosäuren unterscheiden (Abbildung 5-5, Anhang). Anschließend wurden die humanen Aminosäuren im IgV1-IgC1-Fc Fusionsprotein durch die entsprechenden murinen Aminosäuren ersetzt. Der Einfachheit halber wurden zuerst nur Doppelmutanten generiert. Anschließend wurde die Bindung der Antikörper an die B7-H3-Fc Mutanten im ELISA gemessen und mit der an das IgV1-IgC1-Fc WT Protein verglichen (Abbildung 3-17B). Dadurch konnte das Epitop für einige Antikörper bereits gut eingegrenzt werden. Der Antikörper HEK-5, und mit Abstrichen auch TIM8H8, bindet neben humanem auch murines B7-H3. HEK-5 zeigt deshalb bei keiner der Mutanten eine reduzierte Bindung. Einige Antikörper zeigen auch eine reduzierte Bindung an mehrere Mutanten.

Von einigen Doppelmutanten wurden deshalb Einzelmutanten hergestellt, um die Bindung der Antikörper an humanes B7-H3 besser eingrenzen zu können (Abbildung 3-18). Für einige Antikörper konnte so das Epitop genau bestimmt werden (Abbildung 3-16 + Tabelle 3-2). TIM7C4 und TIM7E10 binden an Q179 und damit ein Epitop in der Nähe der Zellmembran. TIM8D9 und TIM11A7 binden an G130, eine Aminosäure zwischen der IgV und der IgC Domäne. TIM8H8 bindet direkt daneben an R127. Für HEK-5 konnte kein eindeutiges Epitop definiert werden, er bindet aber wahrscheinlich in der Nähe von TIM8H8 und TIM8D9, weil die Bindung von TIM8D9 durch die von HEK-5 inhibiert wird und die Bindung von HEK-5 selbst durch die von TIM8H8 inhibiert wird (Abbildung 5-6, Anhang). Für den Antikörper TIM11G3 konnte das Epitop ebenfalls nur eingegrenzt werden, es liegt wahrscheinlich an dem der Membran abgewandten N-Terminus. Ein Epitop für TIM10A7 konnte nicht klar definiert werden. Die Daten aus dem ELISA lassen vermuten, dass es auch am N-Terminus

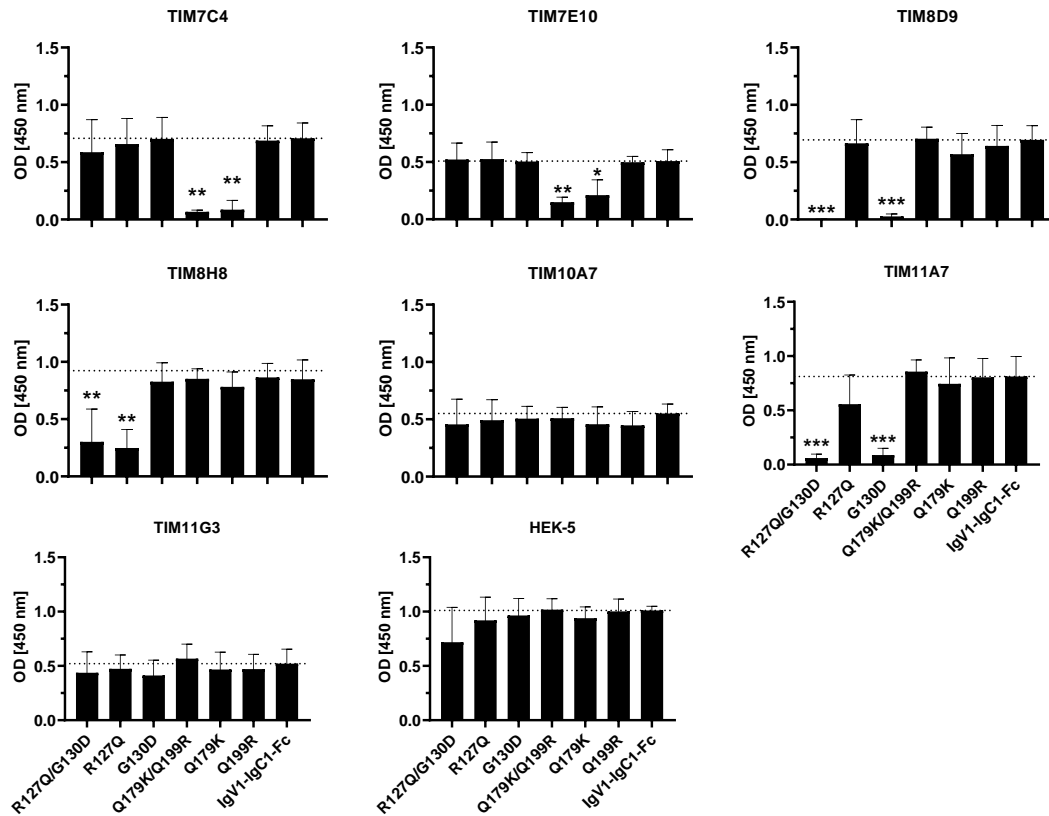
liegt, es scheint aber nicht dasselbe Epitop wie TIM11G3 zu sein, da sich beide Antikörper in ihrer Bindung nicht blockieren (Abbildung 5-6, Anhang).

Insgesamt konnten drei Gruppen an anti-B7-H3 Antikörpern anhand des Epitops ausgemacht werden. Die erste Gruppe bindet an die IgV Domäne (TIM11G3 und TIM10A7), die zweite Gruppe bindet die IgC Domäne (TIM7C4 und TIM7E10) und die dritte Gruppe bindet den Loop zwischen IgV und IgC Domäne (TIM8H8, TIM8D9, TIM11A7 und HEK-5).



**Abbildung 3-17: Epitop Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper (1).**  
**A)** Bindung der Antikörper an verschiedene Versionen von B7-H3-Fc Fusionsproteinen. Die Bindung wurde durch einen ELISA bestimmt. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.  
**B)** Bindung der Antikörper an verschiedene Mutanten des humanen IgV1-IgC1-Fc Fusionsproteins. Die Messung erfolgte ebenfalls mittels ELISA. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ . Die statistische Signifikanz, im Vergleich zum Wildtyp, wurde mithilfe einer One-Way ANOVA (Post-Hoc-Test: Dunnett) berechnet (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ).



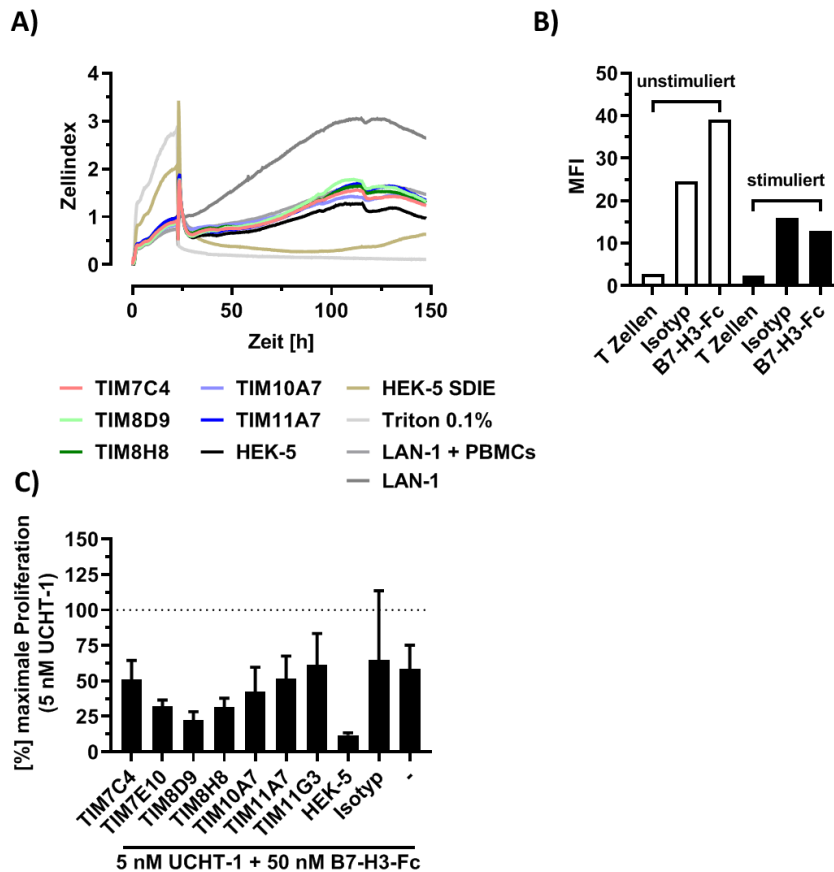


**Abbildung 3-18: Epitop Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper (2).** Bindung der Antikörper an verschiedene Mutanten des humanen IgV1-IgC1-Fc Fusionsproteins. Die Messung erfolgte mittels ELISA. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ . Die statistische Signifikanz, im Vergleich zum Wildtyp, wurde mithilfe einer One-Way ANOVA (Post-Hoc-Test: Dunnett) berechnet (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ).

### 3.2.3 Funktionelle in vitro Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper

Ein Hinweis auf eine potente T Zellrekrutierung des späteren bispezifischen Formats könnte die Fähigkeit eines Antikörpers sein ADCC auszulösen, da dies auch durch Immunzellen, in Form von NK Zellen, ausgelöst wird.

Dafür wurde die NK Zell-vermittelte Lyse von huB7-H3 positiven LAN-1 Zellen in einem Impedanz-basierten Echtzeit Experiment verfolgt (Abbildung 3-19A). Durch die Zugabe von PBMCs kommt es zu einer allogenen, NK Zell vermittelten Lyse der Zielzellen, welche aber durch die anti-B7-H3 Antikörper nicht mehr weiter verstärkt wird. Allerdings ist bekannt, dass der murine Isotyp IgG1, welchen fast alle hier verwendeten Antikörper besitzen, keine Apoptose auslöst<sup>228</sup>. Außerdem binden humane Fc-Rezeptoren murine Antikörper schlecht bis gar nicht<sup>229</sup>. Als Kontrolle diente in diesem Experiment chimärer HEK-5 Antikörper, welcher einen humanen Fc-Teil besitzt, in Kombination mit den in der Einleitung eingeführten SDIE-Mutationen, und dadurch eine potente NK Zellaktivierung induziert.



**Abbildung 3-19: Funktionelle in vitro Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper.**

A) Es wurden  $10^4$  LAN-1 Zellen für 24 Stunden die Adhärenz ermöglicht, bevor  $5 \times 10^5$  humane PBMCs und 100 nM Antikörper zugegeben wurden. Anschließend wurde die Viabilität der Tumorzellen in einem Impedanz-basierten Echtzeitexperiment (xCELLigence®) gemessen. B)  $10^5$  isolierte T Zellen wurden für 3 Tage mit Plastik-immobilisiertem UCHT-1 stimuliert. Anschließend wurde die Bindung von rekombinantem B7-H3-Fc (1000 nM) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. C)  $2 \times 10^5$  T Zellen wurden für 3 Tage mit 5 nM UCHT-1 und 50 nM B7-H3-Fc, jeweils Plastik-immobilisiert, sowie 50 nM Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation durch  $^3\text{H}$  Thymidininkorporation analysiert und die Werte auf die durch UCHT-1 induzierte Proliferation genormt. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.

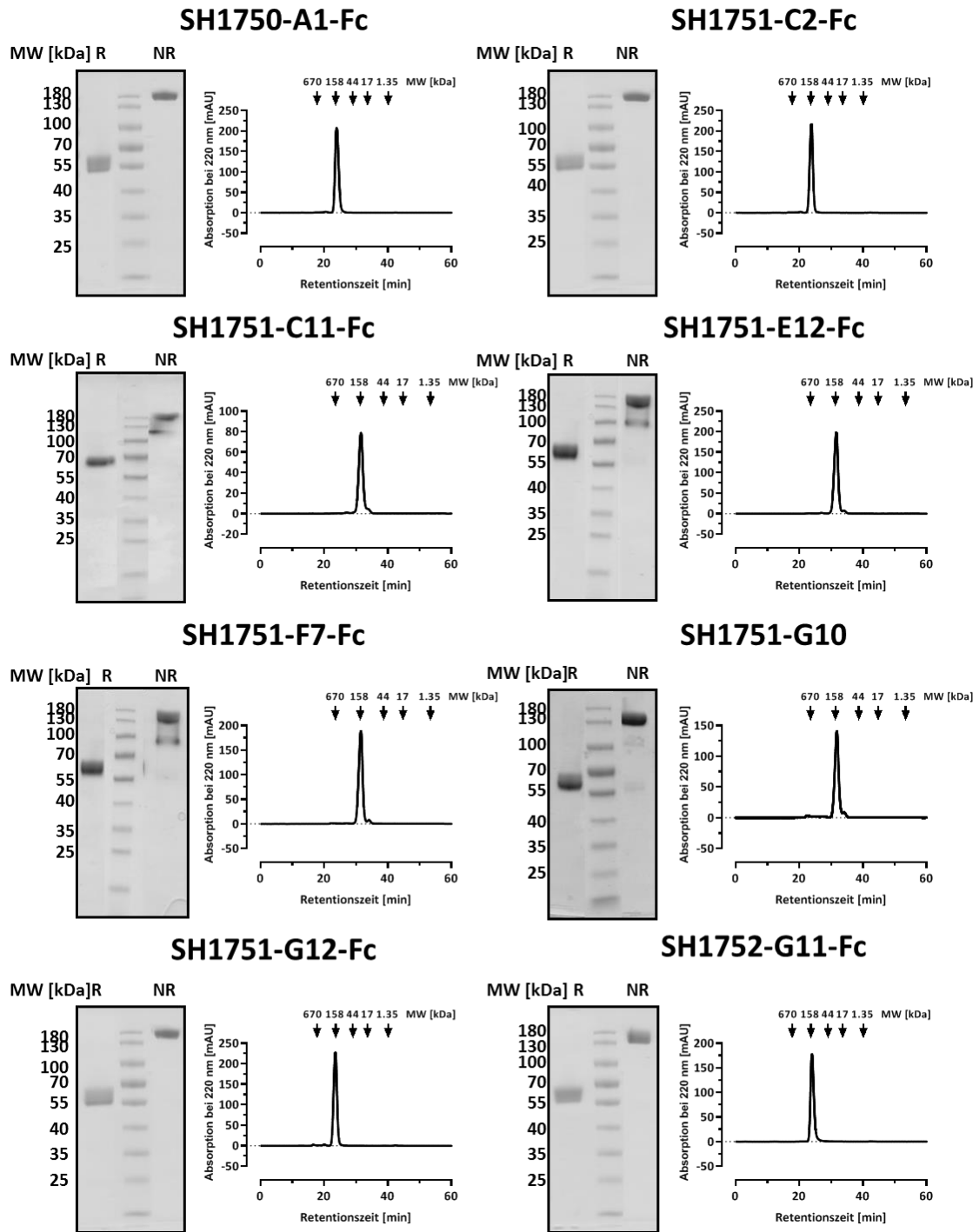
Die genaue Funktion von B7-H3 ist noch nicht bekannt und es gibt widersprüchliche Daten über die Rolle des Proteins als Immunregulator<sup>177,178</sup>. Gesichert scheint nur zu sein, dass der Rezeptor von (aktivierten) T Zellen exprimiert wird. Deshalb wurden isolierte T Zellen für 3 Tage mit monoklonalem UCHT-1 stimuliert und anschließend die Bindung des 4IgB7-H3-Fc Fusionsproteins mittels Durchflusszytometrie analysiert. Allerdings konnte weder eine Bindung an stimulierte noch an unstimulierte T Zellen festgestellt werden (Abbildung 3-19B).

Obwohl eine Expression des B7-H3 Rezeptors auf T Zellen in dieser Arbeit nicht verifiziert werden konnte, zeigen Vigdorovich et al., dass B7-H3 die Proliferation von aktivierten T Zellen um ca. 50% reduzieren kann <sup>227</sup>. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden T Zellen für drei Tage mit monoklonalem UCHT-1 stimuliert (Abbildung 3-19C). In Gegenwart von 4IgB7-H3-Fc Fusionsprotein wird die Proliferation deutlich reduziert. Vigdorovich et al. Stellen die These auf, dass die Interaktion zwischen B7-H3 und dem bisher unbekanntem Rezeptor durch einen sogenannten FG-Loop definiert wird, welchen man auch bei anderen Mitgliedern der B7 Familie findet. Diese Region liegt im murinen Protein zwischen den Aminosäuren 126 und 129. Genau in diesem Bereich befindet sich auch das Epitop der Antikörper TIM8D9, TIM8H8, TIM11A7 und HEK-5 (Abbildung 3-16). Durch HEK-5, TIM8D9 und TIM8H8 wird die Proliferation der T Zellen weiter gehemmt. Dies geschieht aber auch durch TIM7E10, welcher ein anderes Epitop besitzt, nicht aber durch TIM11A7, welcher in direkter Nähe zum FG-Loop bindet.

Es konnte also gezeigt, werden, dass immobilisiertes B7-H3 die Proliferation von T Zellen inhibieren kann, auch wenn der Rezeptor und seine Funktion nicht identifiziert werden konnten. Die anti-B7-H3 Antikörper scheinen, in Abhängigkeit von ihrem Epitop, die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor beeinflussen zu können.

### **3.2.4 Biochemische Charakterisierung Phage-Display-Antikörper**

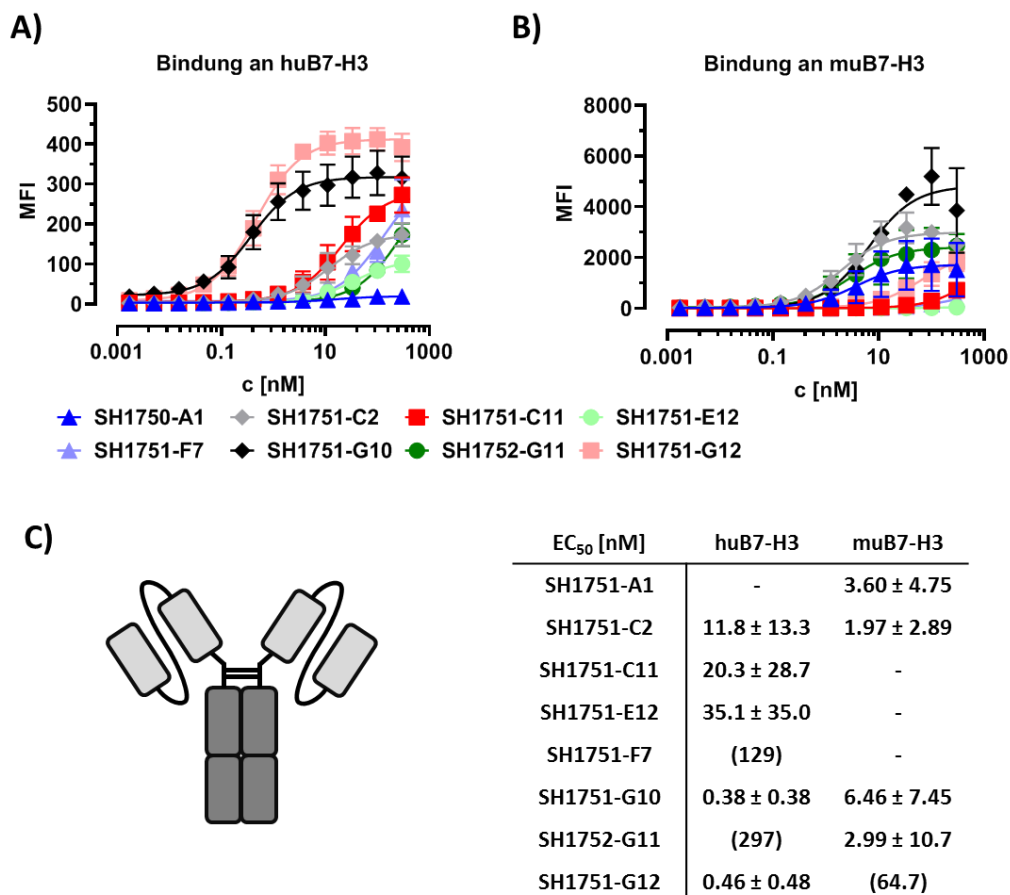
Neben den Hybridom-Antikörpern wurden acht weitere anti-B7-H3 Antikörper von Dr. Timo Manz generiert. Diese wurden in Kooperation mit Prof. Stefan Dübel (Universität Braunschweig) durch Selektion auf humanem und/oder murinem B7-H3 aus einer humanen Phage-Display-Bibliothek isoliert. Die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette werden dabei, auf der Oberfläche der Phagen, als scFv exprimiert und wurden für weitere Experimente in das scFv-Fc-Format überführt, in welchem die scFvs an die Gelenkregion eines humanen IgG1 Antikörpers gekoppelt sind (Abbildung 3-21C). Dies ermöglicht eine leichtere Charakterisierung der Antikörper in nachfolgenden Versuchen. Außerdem kann nur so die tatsächliche, bivalente Bindung der Antikörper, sprich die Avidität, an das Antigen bestimmt werden. Die Antikörper wurden aus den Zellkultur-Überständen von transient transfizierten CHO Zellen über Protein A aufgereinigt.



**Abbildung 3-20: Biochemische Charakterisierung verschiedener anti-B7-H3 Antikörper, hergestellt durch Phage-Display-Technologie.** Das richtige Molekulargewicht und die Reinheit der unterschiedlichen Antikörper wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen auf einer SDS-PAGE überprüft (links). Außerdem wurde die Menge an Aggregaten und sonstigen Verunreinigungen durch eine Größenausschluss-Chromatographie analysiert (rechts).

Die Integrität der Antikörper, mit einem theoretischen Molekulargewicht von 100 kDa, wurde über eine SDS-PAGE verifiziert (Abbildung 3-20). Unter reduzierenden Bedingungen ist jeweils nur eine Bande zu erkennen. Diese haben ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und repräsentieren jeweils das halbe Molekül. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist ebenfalls nur eine Bande zu erkennen, welche für das Ganze Molekül steht. Die Größenausschluss-Chromatographie bestätigte, dass alle Antikörper frei von Aggregaten und Verunreinigungen sind.

Die konzentrationsabhängige Bindung der Antikörper an humanes und murines B7-H3 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Bindung an auf Granta-519 Zellen exprimiertes huB7-H3 fällt sehr unterschiedlich aus (Abbildung 3-21A). Nur fünf von acht Antikörpern zeigen eine Bindung und nur bei zweien liegt sie im subnanomolaren Bereich.



**Abbildung 3-21: Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung verschiedener anti-B7-H3 Phage-Display-Antikörper mittels Durchflusszytometrie. A)** Bindung der anti-B7-H3 Antikörper an humanes B7-H3 auf Granta-519 Zellen. **B)** Bindung an mit murinem B7-H3 transfizierte B16-F10. Die berechneten EC<sub>50</sub> Werte sind in der Tabelle unter den Graphen aufgeführt. Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3. Werte in Klammern geben EC<sub>50</sub> Werte an, welche nur theoretisch berechnet wurden. **C)** Schematische Darstellung eines scFv-Fc Konstrukts.

Ähnlich sieht es für die Bindung an murines B7-H3 aus, welches auf transfizierten B16-F10 exprimiert wird (Abbildung 3-21B). Vier der acht Antikörper zeigen eine Bindung im niedrigen nanomolaren Bereich, während die anderen vier gar nicht binden. Hervorzuheben sind die Antikörper SH1751-C2 und SH1751-G10, da sie eine Bindung an humanes und murines B7-H3 zeigen.

Durch Verwendung der Phage-Display Technologie konnten neben humanen auch murine B7-H3-Binder isoliert werden, welche für das weitere Vorgehen essenziell sind. Nur sie können durch Bindung der muB7-H3 positiven Tumervaskulatur zu deren Lyse in den geplanten Xenograft-Modellen führen.

### **3.2.5 Generierung und biochemische Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper**

Wie bereits eingangs erwähnt ist das Ziel dieses Teils der Arbeit zu untersuchen, welchen Einfluss die Lyse von Tumorgefäßen, in Kombination mit der Lyse von Tumorzellen, auf den Erfolg der Tumorthherapie hat. Dabei soll ein Tumormodell in immundefizienten Mäusen mit adoptiv transferierten Immunzellen (intraperitoneale Gabe von humanen PBMCs) etabliert werden. Die verwendete Tumorzelllinie soll dabei humanes B7-H3 exprimieren, während die Tumorgefäße murines B7-H3 exprimieren. Dafür wurden verschiedene anti-B7-H3 Antikörper in das bereits bekannte IgGsc Format konvertiert (Abbildung 3-23D).

Insgesamt sollen drei Bedingungen getestet werden:

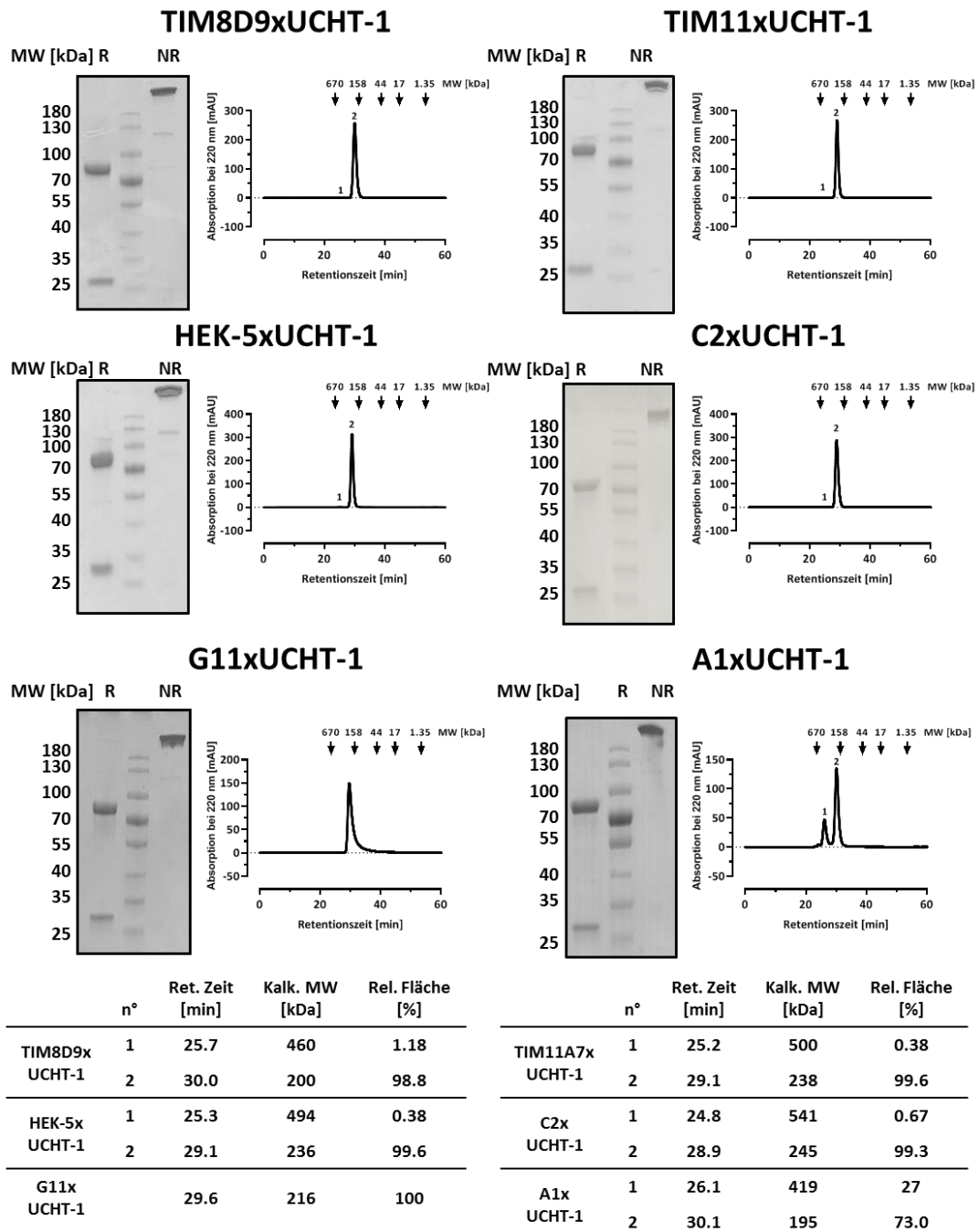
- 1) Nur Lyse der Tumorzellen mit von TIM8D9 und TIM11A7 abgeleiteten bispezifischen Antikörpern. Diese binden nur humanes B7-H3 und sollten daher nicht mit den murinen Tumorgefäßen interagieren.
- 2) Simultane Lyse von Tumorzellen und Tumorgefäßen durch bispezifische Varianten der kreuzreaktiven Antikörper HEK-5 und SH1751-C2.
- 3) Nur Lyse der Tumorgefäße mit bispezifischen Derivaten von SH1751-A1 und SH1752-G11. Diese binden nur murines B7-H3 und sollten daher nicht mit den humanen Tumorzellen interagieren.

Die Produktion erfolgte erneut in transient transfizierten CHO Zellen. Die Antikörper wurden anschließend über eine Protein A Säule aufgereinigt. Das richtige Molekulargewicht wurde über eine SDS-PAGE verifiziert (Abbildung 3-22). Unter reduzierenden Bedingungen zeigen alle Antikörper zwei Banden. Die untere repräsentiert die leichte Kette (~25 kDa), während die obere Bande für die schwere Kette mit dem kovalent verbundenen scFv steht (~75 kDa). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist jeweils nur eine Bande zu sehen, welche für das gesamte IgGsc Molekül steht (~200 kDa). Andere Banden, wie sie durch Verunreinigungen, z.B. durch die Produktionszelllinie, entstehen können sind nicht zu sehen.

Die Antikörper wurden auch hier zusätzlich über eine Größenausschluss-Chromatographie analysiert. Dies ist wichtig, um die Menge an Aggregaten zu quantifizieren. Fast alle Antikörper haben eine sehr hohe Reinheit des Monomers ( $n^{\circ}2 > 98\%$ ) und kaum Aggregate ( $n^{\circ}1 < 2\%$ ). Dies ist sehr wichtig für immunstimulatorische Antikörper, da Aggregate eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems induzieren können. Nur der Antikörper A1xUCHT-1 zeigt deutliche Aggregate (~25%), bei denen es sich auf Grund ihrer Größe wahrscheinlich um Dimere handelt. Es konnte außerdem das theoretisch berechnete Molekulargewicht von ca. 200 kDa bestätigt werden. Verunreinigungen sind auch in der Größenausschluss-Chromatographie nicht zu erkennen.

Die konzentrationsabhängige Bindung der Antikörper an die Antigene B7-H3 und CD3 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Um die Bindung an humanes und murines B7-H3 zu bestimmen, wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 mit je einem der beiden Antigene transfiziert.

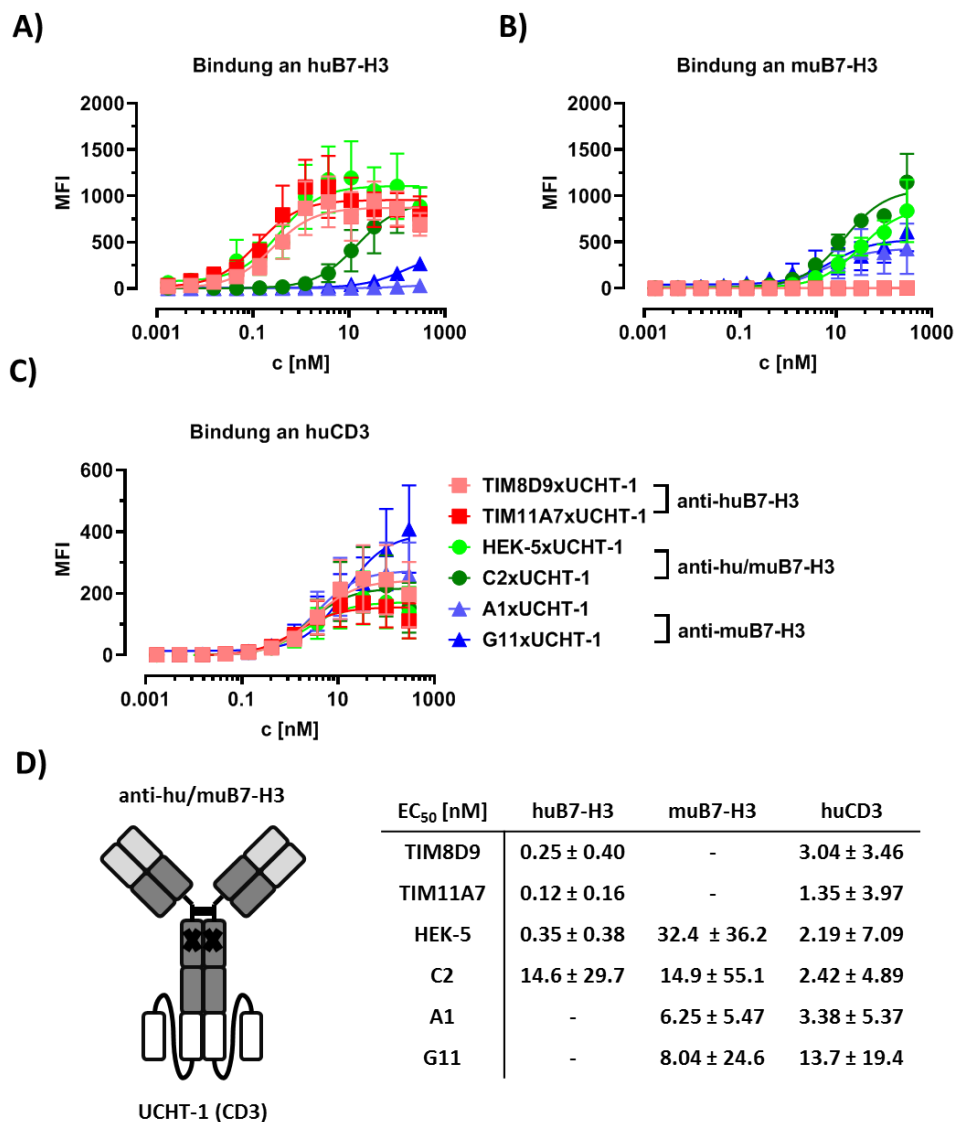
Dabei zeigen die Antikörper TIM8D9xUCHT-1, TIM11A7xUCHT-1 und HEK-5xUCHT-1 eine Bindung im subnanomolaren Bereich an humanes B7-H3 (Abbildung 3-23A). Dies ist im Einklang mit den Werten, welche bereits für die parentalen monoklonalen Antikörper auf Granta-519 Zellen ermittelt wurden (Abbildung 3-15A). Der Antikörper C2xUCHT-1 bindet humanes B7-H3 mit einer Affinität von ca. 15 nM, einem Wert, der ebenfalls vergleichbar ist mit dem vorherigen Wert des parentalen scFv-Fc Moleküls (Abbildung 3-21A). Dies ist entscheidend, da das Format des Antikörpers SH1751-C2 geändert wurde und er nun nicht mehr als scFv, sondern als Fab exprimiert wird. Die Antikörper A1xUCHT-1 und G11xUCHT-1 zeigen nur eine residuale Bindung an humanes B7-H3.



**Abbildung 3-22: Biochemische Charakterisierung verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper im IgGsc Format.** Das richtige Molekulargewicht (MW) und die Reinheit der Antikörper wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen auf einer SDS-PAGE überprüft (links). Außerdem wurde die Menge an Aggregaten und sonstigen Verunreinigungen durch eine Größenausschluss-Chromatographie quantifiziert (rechts und Tabelle unter dem Graphen).



Die Antikörper HEK-5xUCHT-1 und C2xUCHT-1 sind kreuz-reaktiv und binden daher auch an murines B7-H3 (Abbildung 3-23B). Die Werte, die für das bispezifische Konstrukt ermittelt wurden, liegen etwas unter denen der parentalen Antikörper (Abbildung 3-15B + Abbildung 3-21B). Die Antikörper A1xUCHT-1 und G11xUCHT-1 binden ebenfalls an murines B7-H3, ihre Affinität bleibt, trotz Veränderung des Formats, im Vergleich zu den parentalen Konstrukten unverändert. Die Antikörper TIM8D9xUCHT-1 und TIM11A7xUCHT-1 binden nicht an murines B7-H3.



**Abbildung 3-23: Bestimmung der konzentrationsabhängigen Antigen-Bindung verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper mittels Durchflusszytometrie.** A) Bindung der Antikörper an mit huB7-H3 transfizierte L929. B) Bindung der Antikörper an mit muB7-H3 transfizierte L929. C) Bindung der Antikörper an CD3 auf Jurkats. Die EC<sub>50</sub> Werte der einzelnen Kurven sind der Tabelle unter den Graphen aufgeführt. D) Schematische Darstellung des IgGsc Formats. Die Mutationen in der C<sub>H</sub>2 Domäne, welche für die Attenuierung der Effektorfunktion zuständig sind, wurden durch ein (x) gekennzeichnet.

Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3.

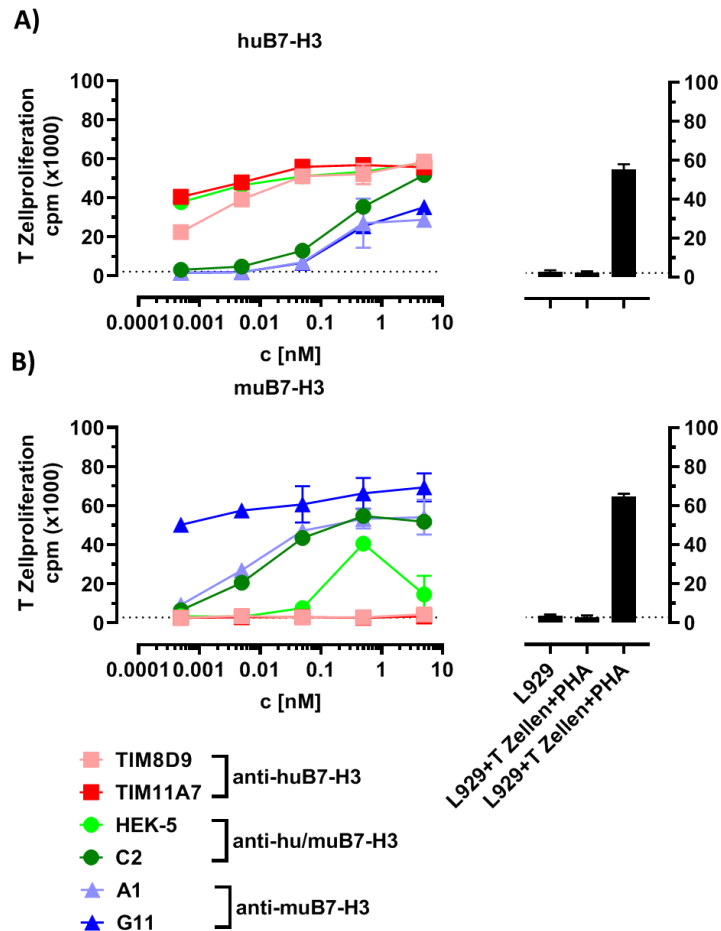
Die bispezifischen Konstrukte binden neben B7-H3 noch an den CD3 Rezeptor, dieser wird auf der humanen T Zelllinie Jurkat exprimiert (Abbildung 3-23C). Alle Antikörper binden CD3 konzentrationsabhängig ( $EC_{50} = 1-4 \text{ nM}$ ). Dieser Wert ist vergleichbar mit anderen, von UCHT-1 abgeleiteten Konstrukten, welche bereits in dieser Arbeitsgruppe generiert wurden<sup>207</sup>. Einzig der Antikörper G11xUCHT-1 zeigt eine leicht verminderte Bindung an CD3 ( $EC_{50} = 13.7 \text{ nM}$ ).

Insgesamt konnten so erfolgreich sechs verschiedene bispezifische Antikörper generiert werden. Je zwei sind spezifisch für humanes bzw. murines B7-H3 und zwei sind kreuz-reaktiv.

### 3.2.6 Funktionelle in vitro Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper

In diesem Kapitel ist es erneut von besonderer Bedeutung, dass die immunstimulatorischen Antikörper eine zielzellestringierte T Zellantwort hervorrufen. Nur dann kann klar abgegrenzt werden, welcher Therapieeffekt durch die Lyse der Tumorzellen und welcher durch Lyse der Tumorgefäße zustande kommt. Deshalb wurde im Folgenden die T Zellproliferation in Abhängigkeit des Zielantigens B7-H3 untersucht. Als Zielzellen wurden mit humanem oder murinem B7-H3 transfizierte L929 verwendet, um zu verhindern, dass durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Zelllinien eine unspezifische Aktivierung entsteht. Als Effektorzellen wurden T Zellen aus humanen PBMCs isoliert. Dies war notwendig, weil die in PBMCs enthaltenen Monozyten, durch Kontakt mit Plastik, aktiviert werden und selbst B7-H3 exprimieren<sup>230</sup>. Dies würde zu einer „on-target off-tumor“ Aktivierung der T Zellen führen.

In Gegenwart von humanem B7-H3 induzieren vor allem die von den Hybridom-Antikörpern abgeleiteten Konstrukte TIM8D9xUCHT-1, TIM11A7xUCHT-1 und HEK-5xUCHT-1, aufgrund ihrer hohen Affinität, eine starke und konzentrationsabhängige Pan-T Zellaktivierung (Abbildung 3-24A). Als Kontrolle für die T Zellaktivierung diente das Lektin Phytohämagglutinin (PHA). Auch der kreuz-reaktive Antikörper C2xUCHT-1 induziert eine konzentrationsabhängige T Zellaktivierung in Gegenwart von humanem B7-H3, diese findet allerdings, bedingt durch seine schlechtere Affinität, erst in höheren Konzentrationen als bei den vorherigen Antikörpern statt. Allerdings induzieren auch die ursprünglich als rein murine Binder identifizierten Antikörper A1xUCHT-1 und G11xUCHT-1 in hohen Konzentrationen T Zellproliferation. Für A1xUCHT-1 könnte dies durch den relativ hohen Anteil an Aggregaten erklärt werden (Abbildung 3-22) und für G11xUCHT-1 durch eine residuale Bindung an humanes B7-H3 in hohen Konzentrationen (Abbildung 3-23A).



**Abbildung 3-24: Induktion der T Zellproliferation verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper in Gegenwart von humanem oder murinem B7-H3.**  $2 \times 10^4$  bestrahlte und mit humanem B7-H3 A) oder murinem B7-H3 B) transfizierte L929 und  $5 \times 10^4$  isolierte humane T Zellen wurden mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen für drei Tage inkubiert und anschließend die inkorporierte Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin detektiert. Um die maximale T Zellproliferation zu bestimmen wurden die Zellen mit  $10 \mu\text{g/mL}$  PHA inkubiert. Alle Antikörper sind im IgGsc Format (B7-H3xCD3). Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.

In Gegenwart von murinem B7-H3 induzieren die Antikörper TIM8D9xUCHT-1 und TIM11A7xUCHT-1 keine T Zellproliferation (Abbildung 3-24A). Der Antikörper HEK-5xUCHT-1 zeigt nur eine schlechte Bindung an murines B7-H3 und daher auch nur eine schwache T Zellaktivierung in hohen Konzentrationen. Die Antikörper A1xUCHT-1 und C2xUCHT-1 induzieren eine starke, konzentrationsabhängige T Zellproliferation, während der Antikörper G11xUCHT-1 eine noch stärkere T Zellproliferation induziert.

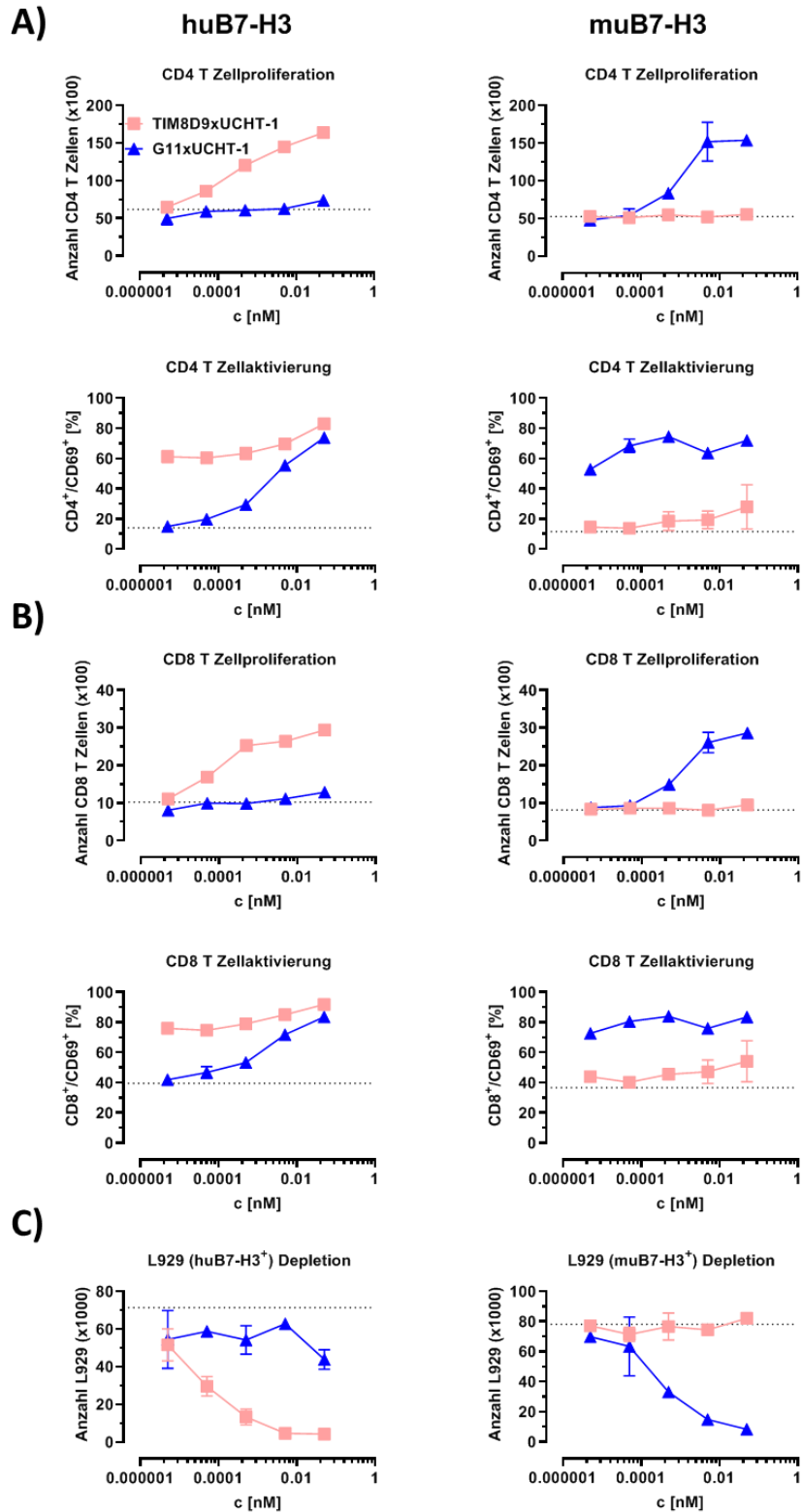
Das nächste Experiment fokussiert sich auf die Antikörper TIM8D9xUCHT-1 und G11xUCHT-1. Ersterer zeigt eine exklusive T Zellaktivierung in Gegenwart von humanem B7-H3 und kann dadurch eingesetzt werden, um in den geplanten Xenograft-Modellen die huB7-H3 positiven Tumorzellen zu lysieren. Der Zweite Antikörper induziert eine sehr starke T Zellproliferation in Verbindung mit murinem B7-H3 und kann daher verwendet werden um

die infiltrierenden, muB7-H3 positiven Tumorgefäße zu lysieren. Der ursprüngliche Plan beinhaltete auch die Verwendung eines kreuz-reaktiven Antikörpers zur simultanen Lyse von Tumor und Gefäßen. Da eine tatsächliche Unterscheidung in vivo nur schwer möglich ist, fokussiert sich die weitere Arbeit auf die gewebsspezifischen Antikörper TIM8D9xUCHT-1 und G11xUCHT-1. Beide Antikörper wurden nun in einem Durchflusszytometrie-basierten Versuch weiter charakterisiert. Wie im vorherigen Experiment wurden dafür L929, transfiziert mit humanem oder murinem B7-H3, und isolierte T Zellen für drei Tage mit unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen inkubiert.

Der Antikörper TIM8D9xUCHT-1 bindet ausschließlich an humanes B7-H3 und zeigt eine konzentrationsabhängige Proliferation und Aktivierung von CD4 und CD8 T Zellen in Gegenwart von huB7-H3 positiven L929. Die Spezifität des Antikörpers für humanes B7-H3 wird dadurch unterstrichen, dass es in Verbindung mit murinem B7-H3 weder zu einer Aktivierung noch zu einer Proliferation der T Zellen kommt (Abbildung 3-25A+B). Die Proliferation korreliert mit der Tumorzelllyse, nur huB7-H3 positive L929 werden konzentrationsabhängig mittels TIM8D9xUCHT-1 lysiert (Abbildung 3-25C).

Der Antikörper G11xUCHT-1 bindet vor allem das murine Protein und zeigt nur eine residuale Bindung an das humane Protein. In Gegenwart von muB7-H3 positiven Zellen kommt es deshalb zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung und Proliferation von CD4 und CD8 T Zellen, sowie zur Tumorzelllyse von muB7-H3 positiven L929. Allerdings kommt es in höheren Konzentrationen auch in Verbindung mit dem humanen Protein zu einer Aktivierung der T Zellen, wenn auch die Proliferation und die damit verbundene Tumorzelllyse ausbleiben.

Als Fazit dieses Kapitels ergibt sich, dass mit TIM8D9xUCHT-1 ein hoch potenter und spezifischer Antikörper generiert wurde. Er induziert die Lyse von huB7-H3 positiven Zellen und erfüllt damit die Anforderung in einem Xenograft-Modell ausschließlich die huB7-H3 positiven Tumorzellen, unter Ausschluss von muB7-H3 positiven Tumorgefäßen, zu binden und dort zielzellrestringiert T Zellen zu aktivieren. Leider konnte kein Antikörper generiert werden, welcher wirklich spezifisch für muB7-H3 positive Zellen (sprich Tumorgefäße) ist. Der Antikörper G11xUCHT-1 zeigt zwar eine residuale Bindung an das humane Protein, diese scheint aber auszureichen, um eine schwache Aktivierung von T Zellen zu induzieren. Dies bedeutet, dass in den Xenograft-Modellen nur ein sehr enges Therapiefenster bleibt, indem es zwar zur Lyse der Tumorgefäße kommt, aber noch zu keiner Lyse des Tumors selbst.



**Abbildung 3-25: Funktionelle in vitro Charakterisierung der immunstimulatorischen Antikörper TIM8D9xUCHT-1 und G11xUCHT-1.**  $5 \times 10^4$  L929, transfiziert mit humanem (links) oder murinem (rechts) B7-H3, wurden für drei Tage mit  $2 \times 10^4$  T Zellen und verschiedenen Antikörper-Konzentrationen inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **A)** Anschließend wurde die Proliferation und die Aktivierung (CD69) der CD4 T Zellen bestimmt. **B)** Proliferation und Aktivierung (CD69) der CD8 T Zellen. **C)** Zusätzlich wurde noch die konzentrationsabhängige Lyse der Tumorzellen analysiert. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von technischen Triplikaten.

### 3.2.7 Immunhistochemische Analyse der muB7-H3 Expression in Mäusen

Wie bereits eingangs erwähnt, wird B7-H3 auf vielen humanen Tumoren, aber auch auf einigen gesunden Geweben exprimiert (Tabelle 3-1, Anhang). Dies legt nahe, dass B7-H3 auch in Mäusen nicht nur auf Tumoren und der damit verbundenen Neovaskulatur zu finden ist, sondern auch auf normalem Gewebe.

Deshalb wurde die Expression von B7-H3 auf verschiedenen murinen Geweben bestimmt. Die Analyse erfolgte durch immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper SH1751C2-Fc (Tabelle 3-3). In Mäusen zeigt sich dabei ein ähnliches Bild wie im Menschen. B7-H3 wird auch auf einigen gesunden Geweben exprimiert. Besonders hervorzuheben sind hier Leber, Lunge, Niere und die Eierstöcke, auf Grund ihrer hohen parenchymalen Expression. Außerdem scheint die B7-H3 Expression auch nicht ausschließlich auf die Neovaskulatur beschränkt zu sein, man findet es auch auf den Gefäßen des Dickdarms, der Haut und der Gebärmutter.

Seaman et al. zeigen, dass die infiltrierenden Gefäße in verschiedenen Maus-Tumormodellen (auch mit humanen Zelllinien) positiv für murines B7-H3 sind<sup>182</sup>. Allerdings handelt es sich dabei um keine echten Tumore, sondern um Flankenmodelle mit Tumorzelllinien. Deshalb sollte verifiziert werden, ob ein in dieser Arbeitsgruppe etabliertes Tumormodell mit der huB7-H3 positiven Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP, ebenfalls muB7-H3 positive Gefäße aufweist<sup>207</sup>.

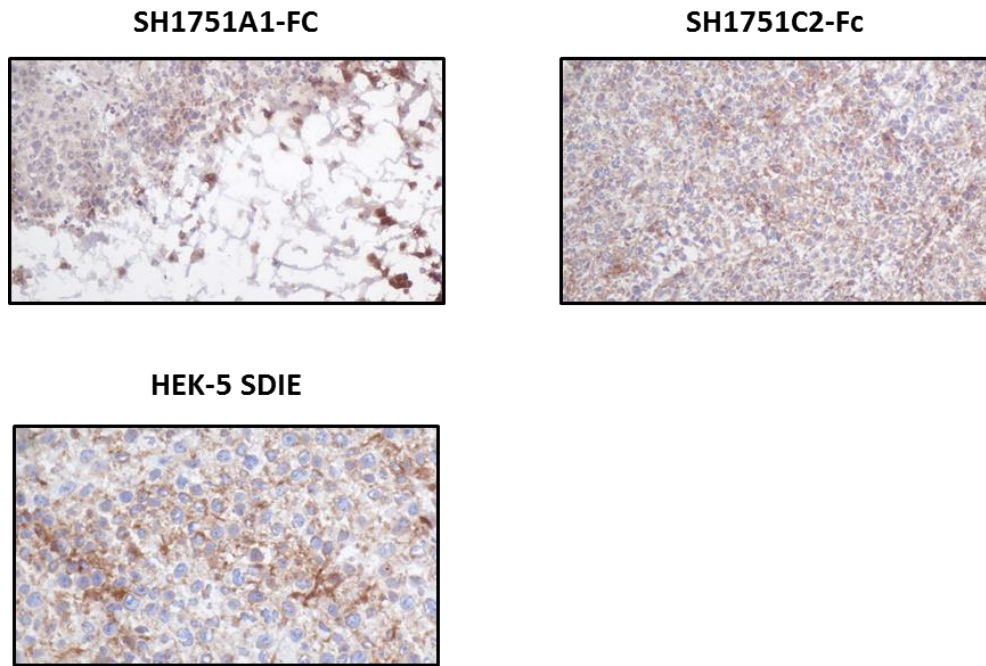
Dafür wurden  $10^6$  LNCaP Zellen subkutan in die Flanke von NSG Mäusen injiziert und der Tumor nach zwei Wochen entfernt. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit den anti-muB7-H3 Antikörpern A1, C2 und HEK-5 SDIE (Abbildung 3-26). Der Antikörper A1 bindet nur murines B7-H3 und zeigt deshalb nur eine schwache Hintergrundfärbung des Tumors. Gefäße konnten von Prof. Bence Sipos (Pathologisches Institut, Universität Tübingen) in den LNCaP Tumoren nicht mit Sicherheit erkannt werden. Dies macht auch eine Aussage über deren mögliche B7-H3 Expression problematisch. Eine Schwierigkeit bestand darin, dass es sich bei Flankentumoren nicht um ein echtes Gewebe handelt, sondern eher um eine „weiche Masse“ loser Zellen, welche schwer für die immunhistochemische Färbung aufzubereiten ist. In der Peripherie sind einzelne muB7-H3 positive Zellen zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um infiltrierende Makrophagen handelt. Die kreuz-reaktiven Antikörper C2 und HEK-5 SDIE färben den Tumor an und bestätigen damit die Expression von humanem B7-H3 auf LNCaP in vivo. Gefäße konnten allerdings auch in diesen Färbungen nicht sicher identifiziert werden.

An diesem Punkt wurde das Projekt aus folgenden Gründen nicht mehr weiterverfolgt:

1. Es konnte zwar ein zielzellrestringierter huB7-H3xCD3 Antikörper generiert werden, aber kein ausreichend spezifischer muB7-H3xCD3 Antikörper.
2. Murines B7-H3 wird in Mäusen nicht nur auf Tumorgefäßen exprimiert, sondern auch auf gesundem Gewebe und normalen Gefäßen. Dies könnte zu einer veränderten Antikörper-Konzentration am Tumor oder zu Nebenwirkungen der muB7-H3xCD3 Antikörpern führen.
3. Es konnte nicht mit Sicherheit gezeigt werden, dass Tumorgefäße in LNCaP Flankentumoren murines B7-H3 exprimieren.

**Tabelle 3-3: Immunhistochemische Färbung von murinem B7-H3 auf verschiedenen Geweben.** Die Expression des Antigens B7-H3 auf verschiedenen murinen Geweben wurde mittels immunhistochemischer Färbung des Antikörpers C2 ermittelt. Die Auswertung erfolgte durch Prof. Bence Sipos (Pathologisches Institut, Universität Tübingen). Nicht vorhanden (-), schwach (+), mittel (++) und stark (+++).

<b>Gewebe</b>	<b>Parenchym</b>	<b>Stroma</b>	<b>Gefäße</b>
<b>Magen</b>	-	-	+
<b>Dünndarm</b>	-	-	-
<b>Dickdarm</b>	-	-	+++
<b>Gehirn</b>	-	-	-
<b>Niere</b>	++	-	-
<b>Leber</b>	+++	-	-
<b>Lunge</b>	++	-	-
<b>Pankreas</b>	-	-	-
<b>Haut</b>	-	-	+++
<b>Skelettmuskulatur</b>	-	-	-
<b>Brust</b>	-	-	-
<b>Eierstock</b>	++	-	-
<b>Gebärmutter</b>	-	+	++



**Abbildung 3-26: Expression von B7-H3 auf LNCaP Flankentumoren und Tumorgefäßen.** Um sicherzustellen, dass die Tumor-infiltrierenden Gefäße wirklich positiv für murines B7-H3 sind, wurde ein huB7-H3 positiver LNCaP Flankentumor aus NSG Mäusen entnommen und versucht die Expression von humanem und murinem B7-H3 mittels Immunhistochemie zu verifizieren. Die Färbungen wurden mit drei verschiedenen anti-muB7-H3 Antikörpern durchgeführt.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 Immunstimulatorische Surrogat-Antikörper im syngenem Mausmodell

Bispezifische Antikörper, welche eine zielzellrestringierte T Zellantwort am Tumor auslösen, haben in vergangenen Jahrzehnten eine immer größere Bedeutung in der Krebstherapie erlangt. 2009 wurde mit Catumaxomab (EpCAMxCD3) der erste bispezifische Antikörper zugelassen, welcher T Zellen aktivieren kann <sup>115</sup>. 2014 folgte die Zulassung des sicherlich prominentesten Vertreters Blinatumomab <sup>116</sup>. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine Plattform (IgGsc Format) zur Generierung bispezifischer Antikörper etabliert, welche über den TCR Co-Rezeptor CD3, eine Tumorzell-restringierte Aktivierung von T Zellen induzieren können <sup>119,207</sup>. Zu nennen sind hier unter anderem ein PSMAxCD3 Antikörper (CC-1) zur Behandlung von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen (NCT04104607) und ein FLT3xCD3 Konstrukt zur Behandlung von akuten myeloischen Leukämien (AML).

Eine präklinische Bewertung solcher Antikörper erfolgt *in vivo* häufig in Xenograft-Modellen. Sie ermöglichen die Evaluation von klinisch relevanten Antikörpern an humanen Tumorzelllinien. In Xenograft-Modellen sind Spender und Empfänger also nicht genetisch identisch und die Versuche müssen daher in immunsupprimierten Mäusen durchgeführt werden. Diese verfügen über kein intaktes Immunsystem <sup>199-203</sup>. Um trotzdem eine Bewertung immunstimulatorischer Antikörper in Xenograft-Modellen vornehmen zu können, erfolgt deshalb die Applikation von humanen Leukozyten, häufig in Form von PBMCs <sup>204</sup>. Dabei stellt sich aber die Frage, wie akkurat diese die komplexen Vorgänge eines intakten Immunsystems abbilden können und ob die Analyse von immunstimulatorischen Antikörpern in solchen Systemen überhaupt sinnvoll ist. Heutzutage werden deshalb zunehmend humanisierte Mäuse in der Tumorforschung verwendet. Dabei werden zum Beispiel die murinen Gene für immunregulatorische Antigene, wie den TCR oder CD28, durch die orthologen humanen Gene ersetzt <sup>162</sup>. Doch auch hier sind Zweifel an der Aussagekraft der Modelle angebracht. Es ist nicht abschließend geklärt, ob die humanen Proteine in der Maus tatsächlich die Funktion des ursprünglichen Proteins restlos abbilden können.

Eine alternative zu den immunsupprimierten Modellen sind daher die syngenem Modelle. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Antikörper in Gegenwart eines intakten Immunsystems getestet werden können, für immunstimulatorische Antikörper ein Vorteil von unschätzbarem Wert. Obwohl die ersten bispezifischen Antikörper zur zielzellrestringierten T Zellantwort schon seit über einem Jahrzehnt zugelassen sind, gibt es nur sehr wenige Daten über sie in immunkompetenten Mäusen. Dies liegt unter anderem an dem hohen Aufwand der

betrieben werden muss, um die passenden Surrogat-Antikörper für diese Modelle zu entwickeln. Diese werden meistens benötigt, weil die klinischen interessanten Moleküle nicht mit den orthologen Proteinen in der Maus kreuz-reagieren. Erst in den letzten Jahren gab es einige Publikationen, welche sich zum Beispiel mit der Effektivität von immunstimulatorischen anti-CD3 Antikörpern in syngenem Mausmodellen beschäftigt haben<sup>208,215,231,232</sup>. Noch dünner ist die Datenlage, wenn es um die Kombination verschiedener bispezifischer Antikörper geht<sup>157</sup>. Dabei ist gerade diese in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Forschung gerückt, da man sich durch die Inklusion verschiedener Kostimuli, wie CD28 oder 4-1BB, eine verstärkte T Zellantwort verspricht<sup>162-164</sup>. Viele bispezifische Antikörper scheitern schlussendlich in der klinischen Studie, weil die während der präklinischen Entwicklung durchgeführten Tiermodelle keine hinreichend aussagekräftigen Daten liefern<sup>184,187</sup>.

Vor diesem Hintergrund beschäftigte sich der erste Teil der Arbeit mit der Evaluation von bispezifischen Antikörpern in syngenem Mausmodellen. Dafür wurden verschiedene immunstimulatorische Surrogat-Antikörper generiert und deren Effizienz in immunkompetenten Mäusen analysiert. Damit handelt es sich bei dieser Arbeit um eine der ersten, welche sich mit der Kombinationstherapie von verschiedenen bispezifischen Antikörpern zur T Zellaktivierung in syngenem Mausmodellen beschäftigt. Diese konnten erfolgreich *in vitro* charakterisiert und anschließend in einem B16-F10 Lungenmetastasenmodell in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen eingesetzt werden.

#### **4.1.1 Generierung und biochemische Charakterisierung**

Viele rekombinante Antikörper werden durch die Immunisierung von Mäusen mit humanen Antigenen generiert. Diese mittels Hybridom-Technologie hergestellten Antikörper binden meist nicht an die orthologen murinen Proteine und sind daher für syngene Modelle unbrauchbar<sup>88</sup>.

Aus diesem Grund wurde zunächst ein bispezifischer anti-CD3 Surrogat-Antikörper im IgGsc Format generiert, stellvertretend für die bereits in unserer Arbeitsgruppe entwickelten und klinisch relevanten Antikörper. Der Surrogat-Antikörper bindet über den Fab-Arm (Klon TA99) an das Melanozyten-Antigen TRP1, welches unter anderem auf der murinen Melanomzelllinie B16-F10 exprimiert wird. Der Antikörperklon TA99 wurde in der Vergangenheit bereits vielfach eingesetzt, um in syngenem Modellen B16-F10 Tumore zu behandeln<sup>233,234</sup>. In neueren Arbeiten wurde er auch erfolgreich als bispezifischer Antikörper zur T Zellrekrutierung verwendet<sup>208,215</sup>. Zusätzlich bindet der hier entwickelte Surrogat-

Antikörper über seinen C-terminalen scFv, welcher vom monoklonalen Antikörper 2C11 abgeleitet wurde, an murines CD3. An dieses und an TRP1 zeigt er eine gute Bindung, im niedrigen nanomolaren Bereich. TA99x2C11 basiert, wie alle anderen bispezifischen Antikörper in diesem Kapitel, auf einem humanen Igγ1κ Antikörper. Durch die FcKo Mutationen im Fc-Teil des Antikörpers wird die systemische Aktivierung von T Zellen verhindert<sup>207</sup>.

Während sich bei hämatologischen Krebserkrankungen Ziel- und Effektorzellen in räumlicher Nähe befinden, stellt die Penetration einer ausreichenden Zahl von T Zellen in solide Tumore eines der zentralen Probleme der T Zell-basierten Immuntherapie dar<sup>110</sup>. Dabei konnte bereits eine direkte Korrelation zwischen klinischer Prognose und der Anzahl infiltrierender Immunzellen hergestellt werden<sup>26</sup>. Um die Effektivität von T Zellen, in der immunsuppressiven Umgebung des Tumors, weiter zu verbessern, wurde in dieser Arbeit versucht die physiologische T Zellaktivierung durch Inklusion der T Zell Kostimuli CD28 und 4-1BB besser abzubilden. Beide Antigene wurden in jüngster Vergangenheit erfolgreich in bispezifischen Formaten in verschiedenen Mausmodellen eingesetzt<sup>162,235</sup>.

Deshalb wurden zwei weitere Surrogat-Antikörper im IgGsc Format generiert, welche neben dem Tumorantigen TRP1 an die Kostimuli CD28 (Klon PV1) und 4-1BB (LOB12.3) binden. Der Klon PV1 zeigt eine eher schwache Bindung an CD28, während die Bindung von LOB12.3 an 4-1BB im subnanomolaren Bereich liegt. Dieser Unterschied sollte beim funktionellen Vergleich der beiden Kostimuli unbedingt beachtet werden, auch wenn nicht notwendigerweise eine strenge Korrelation zwischen Affinität und Effektivität besteht.

Alle Antikörper wurden vor ihrer Verwendung biochemisch analysiert. Die Produktion von bispezifischen, von 2C11 abgeleiteten IgGsc Antikörpern in ExpiCHO-S™ Zellen verdeutlicht, wie wichtig die biochemische Charakterisierung von Antikörpern durch SDS-PAGE und Größenausschlusschromatographie ist<sup>212</sup>. In Verbindung mit einer MS Analyse konnte gezeigt werden, dass ein 2C11-scFv im ExpiCHO-S™ System nicht produziert werden kann. Die fehlerhafte Synthese von scFvs in ExpiCHO-S™ Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe anschließend noch häufiger beobachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass ExpiCHO-S™ Zellen Antikörpertiter generieren, welche bis zu 100fach höher als in FreeStyle™ CHO-S Zellen erreichte Titer sein können<sup>236</sup>. Es wird vermutet, dass es durch die erhöhte Translationsgeschwindigkeit zum Abbruch der Proteinbiosynthese an der artifizialen Struktur von verschiedenen scFvs kommt. Des Weiteren konnte durch die

biochemische Charakterisierung ausgeschlossen werden, dass Aggregate oder Endotoxine eine unspezifische Immunantwort induzieren.

#### **4.1.2 Funktionelle in vitro Charakterisierung**

Die in dieser Arbeit generierten Surrogat-Antikörper sollen eine zielzellrestringierte Aktivierung und Proliferation von T Zellen sowie eine Antikörper-abhängige Zielzell-Lyse induzieren. Eine erste funktionelle Charakterisierung der Antikörper erfolgte in verschiedenen in vitro Experimenten.

Der Antikörper TA99x2C11 induziert, durch die Aktivierung des CD3 Rezeptors, eine konzentrations- und Tumorzell-abhängige Proliferation von CD4 und CD8 T Zellen. Dies resultiert in der Lyse der Tumorzellen. Durch die Aktivierung der T Zellen kommt es auch zur Ausschüttung von Zytokinen, vor allem von IFN- $\gamma$ , einem Zytokin, welches von T Zellen nach Antigenkontakt gebildet wird <sup>129</sup>.

Die Kombination von TA99x2C11, mit einem der beiden kostimulatorischen Moleküle, TA99xPV1 (anti-CD28) oder TA99xLOB12.3 (anti-4-1BB), führt zu einer deutlich verstärkten Proliferation der T Zellen und zu einer verstärkten Freisetzung von Zytokinen. Besonders hervorzuheben ist, dass die Kostimuli allein zu keiner Aktivierung und auch zu keiner Proliferation der T Zellen führen. Dies hebt die Abhängigkeit der Kostimuli vom primären Signal der T Zellaktivierung hervor. Schließlich führt die Kombinationstherapie auch zu einer verstärkten Tumorzelllyse.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Surrogat-Antikörper, in einem autologen in vitro System, eine zielzellrestringierte T Zellantwort induzieren und dass die Kombinationstherapie mit kostimulierenden bispezifischen Antikörpern der Monotherapie dabei deutlich überlegen ist.

#### **4.1.3 T Zelldifferenzierung und Anergie**

Neben einer verstärkten T Zellproliferation erhofft man sich von der Kombinationstherapie auch eine bessere Aktivierung von naiven T Zellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass bispezifische anti-CD3 Antikörper vor allem T Gedächtniszellen zur Proliferation anregen. Naive T Zellen hingegen sind deutlich abhängiger vom sekundären Signal und haben allgemein eine höhere Aktivierungsschwelle <sup>154-156</sup>. Dies wurde sehr genau anhand von Blinatumomab (CD19xCD3) untersucht, welcher 2014 für die Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zugelassen wurde <sup>116</sup>.

Deshalb wurde auch in dieser Arbeit in *in vitro* Experimenten untersucht, wie sich die T Zellpopulationen in Abhängigkeit verschiedener immunstimulatorischer Surrogat-Antikörper entwickeln. Der anti-CD3 Antikörper TA99x2C11 führt dabei, ähnlich wie Blnatumomab, vor allem zur Expansion von T Gedächtniszellen. Besonders die Subpopulation der CM Zellen besitzt offensichtlich ein hohes proliferatives Potential<sup>130</sup>. Zusätzlich kommt es zu einer schwachen Proliferation von naiven T Zellen, ob es allerdings auch zu einer Differenzierung dieser Zellen kommt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es sollte auch nicht unerwähnt bleiben, dass die Identifizierung von T Zellpopulationen komplex ist und ihre Funktionen in vielen Aspekten noch nicht abschließend definiert und charakterisiert sind. In jedem Fall führt die Kombination mit den beiden kostimulatorischen Antikörpern TA99xPV1 (anti-CD28) und TA99xLOB12.3 (anti-4-1BB) zu einer verstärkten T Zellproliferation, aber zu keiner qualitativen Änderung der T Zellpopulationen. Eine Fragestellung, die es deshalb in Zukunft zu klären gilt, ist, ob es eine Antikörper-vermittelte Differenzierung von T Zellen gibt. In Verbindung mit einem erhöhten Antigenkontakt, durch die Antikörper-induzierte Tumorzelllyse, könnte dies eine Immunität gegen den Tumor erzeugen. Dies wurde zwar schon in verschiedenen Mausmodellen untersucht, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen<sup>157,208</sup>.

Ein weiterer Vorteil der Kombinationstherapie könnte die Verhinderung von Anergie sein. Diese entsteht immer dann, wenn kostimulatorische Signale fehlen. Bei CAR T Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Inkorporation kostimulatorischer Signaldomänen wie CD28 und 4-1BB in den chimären Antigenrezeptor Anergie verhindert werden kann<sup>47,48</sup>.

Allerdings sind anerge T Zellen nur sehr schwer zu charakterisieren und von anderen Zellpopulationen wie erschöpften T Zellen abzugrenzen<sup>24,25</sup>. Während Anergie durch einen fehlenden Kostimulus induziert wird, entsteht Erschöpfung durch wiederholte Stimulation. Die Abgrenzung mag eventuell aber auch eher eine Definitionsfrage sein, als durch tatsächliche, funktionelle Unterschiede messbar. In dieser Arbeit wurde Anergie durch die Marker Lag3 (CD223) und PD-1 (CD279) definiert<sup>132</sup>. Von ihnen ist bekannt, dass sie auf aktivierten T Zellen exprimiert werden und diese inhibieren<sup>24</sup>.

Die Tumorzell-abhängige Stimulation durch TRP1xCD3 führt *in vitro* zu einer zielzellrestringierten Expression von Lag3 auf T Gedächtniszellen. PD-1 hingegen wird Antikörper-unabhängig auf T Gedächtniszellen exprimiert. Die Kombination mit kostimulatorischen Molekülen verändert dieses Expressionsmuster nicht. Dies könnte darauf hindeuten, dass aktivierte T Zellen tatsächlich mit der Zeit einen anergen bzw. erschöpften

Zustand erreichen. Insbesondere weil aus der Literatur bekannt ist, dass B16-F10 eine wenig immunogene Zelllinie ist, die hohe Mengen an PD-L1 exprimiert<sup>214,219</sup>.

Daraus wurde geschlussfolgert, dass es in diesem System zu einer Interaktion zwischen PD-1 und seinem Liganden kommen könnte. Waite et al. konnten in syngen Mausmodellen zeigen, dass der anti-PD1 Antikörper RMP1-14 erfolgreich bei der Behandlung von Flankentumoren eingesetzt werden kann<sup>164</sup>. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die beiden therapeutischen anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab ebenfalls Anergie durchbrechen können<sup>148</sup>. In vitro Experimente mit RMP1-14 konnten, in Kombination mit unseren IgGsc Surrogat-Antikörpern, jedoch keinen Effekt der Blockierung der PD-1/PD-L1 Interaktion nachweisen.

In dieser Arbeit konnten damit keine Hinweise gefunden werden, dass zusätzliche kostimulatorische Signale durch bispezifische Antikörper T Zelldifferenzierung fördern oder T Zellanergie verhindern können. Anergie oder erschöpfte T Zellen entstehen allerdings erst nach einem längeren Zeitraum, wenn zum Beispiel der Kostimulus fehlt, oder es im Rahmen einer chronischen Krankheit zu einer permanenten T Zellaktivierung kommt<sup>24</sup>. Deshalb müssen die in vitro Daten in Zukunft um Daten aus syngene Mausmodelle erweitert werden. Dort könnten die Tumor-infiltrierenden T Zellen dann in Langzeitstudien untersucht werden.

#### **4.1.4 Serumhalbwertszeit und Verträglichkeit**

Neben der Spezifität und Funktionalität sind auch die Serumhalbwertszeit und die Verträglichkeit von immunstimulatorischen Antikörpern entscheidend für ihren therapeutischen Erfolg.

Im Blutstrom zirkulierende IgG Antikörper haben eine Halbwertszeit von 10-21 Tagen. Die hier vorgestellten Surrogat-Antikörper, im IgGsc Format, haben ein Molekulargewicht von ca. 200 kDa und sind damit deutlich größer als normale IgG Antikörper. Außerdem können sie, trotz der im Molekül enthaltenen FcKo Mutationen, über ihren Fc-Teil mit den humanen und murinen FcRn Rezeptoren interagieren.<sup>207,237</sup> In C57BL/6 Mäusen konnte eine Halbwertszeit der bispezifischen IgGsc Surrogat-Moleküle von 22 Stunden ermittelt werden. Dieser Wert deckt sich mit Daten aus Literatur. Zekri et al. geben für unseren PSMAxCD3 Antikörper ebenfalls eine Halbwertszeit von 22 Stunden in C57BL/6 Mäusen an<sup>207</sup>.

Neben der Serumhalbwertszeit wurde auch die Verträglichkeit von bispezifischen anti-CD3 Surrogat-Antikörpern in C57BL/6 überprüft. Während es durch den monoklonalen anti-CD3 Antikörper 2C11 bereits nach wenigen Stunden zu einer massiven Freisetzung von IFN- $\gamma$

kommt und die Mäuse nach wenigen Tagen sterben, kann dies durch das bispezifische Format verhindert werden. Die FcKo Mutationen verhindern dabei eine Immobilisierung der Antikörper über Fc-Rezeptoren und damit eine unspezifische, nicht auf den Tumor beschränkte Immunantwort.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass das in dieser Gruppe etablierte IgGsc Format, auch als Surrogat-Molekül in immunkompetenten Mäusen, eine gute Halbwertszeit hat und Nebenwirkungen, durch eine auf den Tumor beschränkte Aktivität, reduziert werden können. Durch die Zielzellrestriktion könnten somit deutlich höhere und damit therapeutisch effektive Dosen verabreicht werden, während eine systemische T Zellaktivierung, wie bei monoklonalen Antikörpern (z.B. Muromonab-CD3 oder TGN1412), verhindert werden kann<sup>134,140</sup>.

#### **4.1.5 Funktionelle in vivo Charakterisierung**

Ziel dieses Kapitels war es die Effektivität von immunstimulatorischen Surrogat-Antikörpern in syngenem Modellen zu bewerten, also in Mäusen mit einem funktionellen Immunsystem. Dazu wurde das gut etablierte B16-F10-C57BL/6 System verwendet. In diesem werden die Zellen entweder subkutan als Flankentumor inokuliert oder sie werden intravenös in die Schwanzvene verabreicht, wonach sich die Zellen nach kurzer Zeit in der Lunge ablagern und dort Metastasen bilden<sup>214</sup>.

Im Flankenmodell konnte kein Therapieerfolg erzielt werden, weder mit dem bispezifischen anti-CD3 Surrogat-Antikörper TA99x2C11 noch in der Kombination mit dem anti-CD28 Antikörper TA99xPV1. Dies ist bemerkenswert, da das Dosierungsregime aus der Literatur übernommen wurde. Benonisson et al. konnten dort mit einer „knob-into-hole“ Variante von TA99x2C11 erfolgreich etablierte B16-F10 Flankentumore behandeln<sup>208,215</sup>. Allerdings konnte in der hier vorgelegten Arbeit auch kein homogen wachsendes Flankenmodell mit dieser Zelllinie etabliert werden. Damit verdeutlicht dieses Experiment, wie schwierig sich die Behandlung von soliden Tumoren auch mit einer Kombinationstherapie gestalten kann, besonders wenn es sich wie bei B16-F10 um eine sehr schnell wachsende und wenig immunogene Zelllinie handelt<sup>214</sup>.

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die murine IgG2a Variante von TA99 nur bedingt effektiv bei der Behandlung von soliden Tumoren ist, auch wenn es sich dabei nur um kleine Läsionen handelt<sup>238</sup>. Allerdings konnte sie schon erfolgreich bei der Behandlung von B16-F10 Lungenmetastasen eingesetzt werden. Deshalb wurden die bispezifischen Surrogat-Antikörper anschließend noch in diesem Modell getestet. Hier konnte nun ein Therapieerfolg

verzeichnet werden. Der anti-CD3 Surrogat-Antikörper verhinderte in der höchsten Konzentration (12.5 µg) fast vollständig das Anwachsen der Tumorzellen in der Lunge. Durch die Kombination mit dem CD28 Surrogat-Antikörper konnte die injizierte Menge des anti-CD3 Antikörpers um 50% reduziert werden, ohne einen Verlust an Effektivität. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Antikörper, und die damit verbundene Aktivierung der T Zellen, von der Immobilisierung des Antikörpers an die Tumorzellen abhängig ist.

Damit konnte erstmals im syngenem Mausmodell, unter Verwendung von rekombinanten Surrogat-Antikörpern, gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie - durch CD3 und CD28 - mit bispezifischen Antikörpern der Monotherapie - durch CD3 alleine - überlegen ist. Dies könnte ein wichtiger Schritt sein, um solche Reagenzien in Zukunft besser verstehen zu können und damit ihren Einsatz im Patienten zu ermöglichen.

#### **4.1.6 Ausblick**

Während bispezifische anti-CD3 Antikörper in der Klinik bereits etabliert sind, liegt die Zukunft der modernen Immuntherapie in der Kombination mit kostimulatorischen Signalen. Insbesondere bei der Behandlung von soliden Tumoren. Hier könnten die in dieser Arbeit beschriebenen syngenem Mausmodelle und Surrogat-Antikörper helfen zu verstehen, wie eine verbesserte und langanhaltende T Zellaktivierung induziert werden kann. Sie könnten außerdem wichtige Daten liefern, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. In Zukunft sollten diese Modelle deshalb weiter optimiert und durch andere Zelllinien und Antigene erweitert werden.



## 4.2 „Dual targeting über B7-H3“ – Gleichzeitige Lyse von Tumor und Tumorgefäßen

Der erste Teil dieser Arbeit widmete sich den Effektorfunktionen von immunstimulatorischen Antikörpern und deren Charakterisierung in syngenesischen Mausmodellen. Der zweite Teil fokussierte sich auf das Tumorantigen, welches für die Antikörper-vermittelte Zielzellrestriktion der Immunantwort verantwortlich ist. In den vergangenen Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen die These aufgestellt, dass ein „ideales“ Tumorantigen nicht nur auf dem Tumor selbst exprimiert wird, sondern auch auf den Tumorgefäßen („*dual targeting*“) <sup>182,207</sup>. Die Idee dahinter ist, dass es durch die lysierten Tumorgefäße zu einem verstärkten Influx von Immunzellen in den Tumor kommt.

B7-H3 (CD276) scheint diesen Anspruch in besonderer Weise zu erfüllen, da es in der Literatur als Tumorantigen und als Marker für Neo-Angiogenese beschrieben ist <sup>179</sup>. Dies gilt für Mensch und Nager gleichermaßen. Die hohe parenchymale und vaskuläre Expression von B7-H3 auf verschiedenen humanen Tumorentitäten konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch verifiziert werden. Allerdings darf nicht unerwähnt bleiben, dass B7-H3 auch auf einigen gesunden Geweben exprimiert wird. Im Menschen und in der Maus betrifft dies vor allem die Leber. Während der klinischen Studie mit einem B7-H3xCD3 Antikörper (MGD009) wurde bereits gezeigt, dass dies zu reversiblen Schädigungen der Leber führen kann (NCT02628535).

Ziel dieses Kapitels war es, ein Xenograft-Modell mit adoptiv transferierten PBMCs zu entwickeln, um die These des „*dual targeting*“ in Mäusen zu überprüfen. Dafür sollte eine huB7-H3 positive Zelllinie als Flankentumor in immundefizienten NSG Mäuse etabliert werden. Die infiltrierenden Gefäße sollten dann laut Literatur positiv für murines B7-H3 sein. Durch die Kombination verschiedener B7-H3xCD3 Antikörper, gegen das humane oder murine Protein, sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Lyse der Tumorgefäße auf die Therapie hat.

#### 4.2.1 Biochemische Charakterisierung der anti-B7-H3 Antikörper

Als Grundlage für spätere bispezifische Konstrukte wurde zuerst eine Reihe von anti-B7-H3 Antikörpern auf ihre Eigenschaften getestet. Diese wurden mittels Hybridom- oder Phage-Display-Technologie hergestellt.

Die Hybridom-Antikörper erwiesen sich als hoch-affin für humanes B7-H3. Die Affinität der Phage-Display Antikörper dagegen gestaltet sich deutlich variabler. Während manche Klone eine Bindung im subnanomolaren Bereich aufweisen, zeigen andere fast gar keine Bindung. Dies liegt vermutlich an den unterschiedlichen Techniken, mit denen die Antikörper generiert wurden. Während es bei der Immunisierung von Mäusen zur Affinitätsreifung in den Antikörper-produzierenden B-Zellen kommt, fehlt diese beim Phage-Display<sup>88</sup>. Dort werden die Antikörper aus den Keimbahngenen einer humanen Antikörper-Bibliothek generiert<sup>96</sup>. Ein großer Vorteil der Phage-Display Technologie ist jedoch, dass es, anders als bei der Hybridom-Technologie, zu keiner „Selektion gegen Selbst“ kommt. Dadurch konnte eine Reihe hoch-affiner Antikörper gegen murines B7-H3 etabliert sowie einige kreuz-reaktive Antikörper identifiziert werden.

In Kombination ermöglichten beide Technologien die Herstellung verschiedener Antikörper gegen das humane und/oder das murine B7-H3 Protein, wie sie später für die Etablierung von unterschiedlichen B7-H3xCD3 Antikörpern benötigt wurden. Anschließend erfolgte noch eine weitere Charakterisierung, insbesondere der Hybridom-Antikörper.

Nach der Bindung eines Antikörpers an sein Antigen, kommt es häufig zu einer Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Für die anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper konnte hier eine deutliche Korrelation zwischen Internalisierung und Affinität nachgewiesen werden. Je stärker die Bindung, desto stärker ist auch die Internalisierung.

Bei der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern sollte daher ein Klon gewählt werden, welcher den Wirkmechanismus optimal unterstützt. Bei einigen Anwendungen, wie bei ADCs, kann eine Internalisierung von Vorteil sein, da das Toxin seine Wirkung in der Zelle entfalten muss<sup>105</sup>. Bei anderen Indikationen verhindert eine Internalisierung unter Umständen den Therapieerfolg. Dies gilt insbesondere, wenn, wie in dieser Arbeit gewünscht, eine Interaktion mit Immunzellen stattfinden muss<sup>225</sup>.

#### 4.2.2 Epitop Charakterisierung der anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper

Ein weiterer Parameter, welcher für die Funktionalität eines Antikörpers, als bispezifisches Konstrukt zur T Zellrekrutierung, entscheidend sein kann, ist das Epitop. Der extrazelluläre Teil des humanen B7-H3 Proteins besteht aus 4 Ig-Domänen, welche durch Exon-Duplikation entstanden sind (IgV1-IgC1-IgV2-IgC2) <sup>226</sup>. Ergebnisse aus dieser Arbeit lassen vermuten, dass zwei Antikörper zur selben Zeit an ein B7-H3 Molekül binden. Für einige der Hybridom-Antikörper konnte das Epitop im Übrigen genau bestimmt werden.

TIM7C4 und TIM7E10 binden an die membrannahe IgC Domäne. In der Literatur wird beschrieben, dass Antikörper mit membrannahen Epitopen sich besonders gut für bispezifische Konstrukte eignen, weil die immunologische Synapse, also der Abstand zwischen Tumor- und T Zelle, so möglichst gering ist <sup>239,240</sup>. Für TIM7C4 konnte in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass er daher in bispezifischen Formaten besonders potent ist (Dr. Latifa Zekri-Metref, AG Jung, Universität Tübingen). Die Antikörper TIM11G3 und TIM10A7 binden an die IgV Domäne. Die dritte Gruppe der Hybridom-Antikörper bindet an den Loop zwischen der IgV und IgC Domäne.

Sequenzvergleiche mit anderen Mitgliedern der B7 Familie legen nahe, dass dieser Loop für die Interaktion von B7-H3 mit seinem Rezeptor verantwortlich ist <sup>227</sup>. Der Rezeptor selbst wurde allerdings noch nicht identifiziert, man vermutet ihn auf (aktivierten) T Zellen. In dieser Arbeit konnte er aber weder auf aktivierten noch auf ruhenden T Zellen gefunden werden. Ebenso wenig ist die Funktion von B7-H3 bekannt, wahrscheinlich handelt es sich aber um einen Immunregulator <sup>177,178</sup>. Ergebnisse von Vigdorovich et al. und aus dieser Arbeit lassen vermuten, dass B7-H3 die T Zellaktivierung inhibiert. Die hier generierten anti-B7-H3 Hybridom-Antikörper scheinen, in Abhängigkeit ihres Epitops, die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor beeinflussen zu können. Dies drückt sich in einer weiter reduzierten T Zellantwort aus.

Neben der Verwendung von B7-H3 als Tumorantigen gibt es deshalb auch verschiedene Überlegungen, über Antikörper die Interaktion zwischen B7-H3 und seinem Rezeptor zu beeinflussen <sup>241</sup>. Mit dem Ziel eine verbesserte T Zellantwort zu ermöglichen. Die Identifizierung der Epitope der einzelnen anti-B7-H3 Antikörper könnte in Zukunft dabei helfen einen geeigneten Klon zu wählen. Voraussetzung hierfür ist allerdings ein besseres Verständnis über die Funktion von B7-H3 und dessen bisher unbekanntem Rezeptor.

### 4.2.3 Generierung und biochemische Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper

Im Folgenden wurden ausgewählte anti-B7-H3 Antikörper ins IgGsc-Format überführt. Dieses beinhaltet einen C-terminalen, von UCHT-1 abgewandelten, scFv zur T Zellaktivierung über den CD3 Rezeptor<sup>207</sup>. Ziel dabei war es diese Antikörper anschließend in einem Xenograft-Modell auf ihre Effektivität zu testen. Die verwendete Tumorzelllinie soll dabei humanes B7-H3 exprimieren, während die Tumorgefäße murines B7-H3 exprimieren. Durch die Wahl des entsprechenden Antikörperklons sollte eine gezielte Lyse des huB7-H3 positiven Tumors und/oder des muB7-H3 positiven Tumorendothels erzielt und diese anschließend bewertet werden („*dual targeting*“).

Es konnten zwei bispezifische Antikörper generiert werden, welche ausschließlich an die humane Variante von B7-H3 binden (TIM8D9xUCHT-1 und TIM11A7 xUCHT-1). Eine Bindung an murines B7-H3 findet nicht statt, da die Antikörper durch die Immunisierung von Mäusen hergestellt wurden und Hybridom-Antikörper meist nicht mit murinen Antigen interagieren. Zusätzlich wurden zwei kreuz-reaktive Antikörper im IgGsc Format generiert (HEK-5xUCHT-1 und C2xUCHT-1). Antikörper, welche ausschließlich an das murine Protein binden, konnten in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Der Antikörper A1xUCHT-1 weist hier zwar eine hohe Spezifität auf, war aber auf Grund seiner hohen Tendenz Aggregate zu bilden für funktionelle Versuche unbrauchbar. Der Antikörper G11xUCHT-1, ursprünglich als muriner Binder identifiziert, zeigt neben der Bindung an das murine Protein auch eine residuale Bindung an humanes B7-H3. Der Grund dafür könnte die hohe Sequenzidentität von ca. 88% zwischen beiden Proteinen und eine fehlende Negativselektion auf humanes B7-H3 beim Phage-Display sein<sup>177</sup>.

Insgesamt konnten so fünf bispezifische Antikörper generiert werden, welche neben ihrer Bindung an CD3 unterschiedliche Affinitäten an die humane und/oder die murine Variante von B7-H3 zeigen.

#### 4.2.4 Funktionelle Charakterisierung der B7-H3xCD3 Antikörper

Entscheidend in diesem Kapitel der Arbeit war, dass die bispezifischen Antikörper absolut zielzellrestringiert sind. Denn nur dann kann der mögliche Effekt der Therapie klar auf seine Ursache zurückgeführt werden. In diesem Fall sollte ein Xenograft-Modell entwickelt werden, in welchem es entweder zu einer B7-H3 vermittelten Lyse des Tumors oder der infiltrierenden Gefäße kommt.

In den funktionellen Versuchen konnten zwei Antikörper identifiziert werden (TIM8D9xUCHT-1 und TIM11A7xUCHT-1), welche spezifisch T Zellen in Gegenwart des humanen B7-H3 Proteins aktivieren. In vivo würde dies zu einer spezifischen Lyse der B7-H3 positiven Tumorzellen führen. Zwei weitere Antikörper (HEK-5xUCHT-1 und C2xUCHT-1) induzieren als kreuz-reaktive Antikörper eine Proliferation von T Zellen in Gegenwart des humanen und murinen Proteins. In vivo hätte dies wahrscheinlich eine Lyse des huB7-H3-positiven Tumors und des muB7-H3 positiven Tumorendothels zur Folge gehabt und eine tatsächliche Unterscheidung beider Vorgänge wäre damit in vivo allerdings kaum zu unterscheiden gewesen. Spezifischer wäre hier der Einsatz eines Antikörpers gewesen, welcher nur die Lyse der infiltrierenden Gefäße induziert, um diese dann mit der spezifischen Lyse des Tumors zu vergleichen. Hier wurden die Antikörper A1xUCHT-1 und G11xUCHT-1 als vielversprechend eingestuft. Beide erwiesen sich in funktionellen Versuchen aber nicht als spezifisch genug, da sie in hohen Konzentrationen auch in Gegenwart von humanem B7-H3 T Zellen aktivieren. Bei A1xUCHT-1 lässt sich dies durch den hohen Anteil an Aggregaten erklären und bei G11xUCHT-1 durch die residuale Bindung an das humane Protein in hohen Konzentrationen.

In immunhistochemischen Untersuchungen wurden zudem folgende Befunde erhoben:

- 1) Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen eine deutliche Expression von murinem B7-H3 auf gesundem Gewebe, wie der Leber. Dadurch hätten murine Binder auch in diesen Organen lokalisieren können, während humane Binder im Xenograft-Modell wohl hochspezifisch am Tumor akkumuliert wären. Dies hätte eine aufwendige Dosiskompensation zur Folge gehabt.
- 2) In der Literatur wird beschrieben, dass B7-H3 auf der Neovaskulatur von Flankentumoren in verschiedenen Mausmodellen exprimiert wird<sup>182</sup>. Dies konnte in dieser Arbeit nie zweifelsfrei bestätigt werden.

Deshalb wurde entschieden, die Fragestellung des „*dual targeting*“ im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr weiter zu verfolgen.

#### **4.2.5 Ausblick**

Obwohl dieses Projekt zu keinem erfolgreichen Abschluss gebracht werden konnte, bleibt die Fragestellung des „*dual targeting*“ weiterhin von zentraler Bedeutung. Durch die zusätzliche Lyse der Tumorzellen könnte es zu einer verbesserten T Zellinfiltration in den Tumor kommen. Dies könnte eine Behandlung von soliden Tumoren durch bispezifische Antikörper ermöglichen, welche bis heute, aufgrund der immunsuppressiven Bedingungen innerhalb eines Tumors, nur unzureichend möglich ist <sup>109,110</sup>. In Zukunft sollte der Fokus deshalb noch auf andere vaskuläre Antigene wie Endoglin (Eng, CD105) und ED-B (eine Spleißingvariante von Fibronectin) gerichtet werden <sup>106–108,176</sup>.

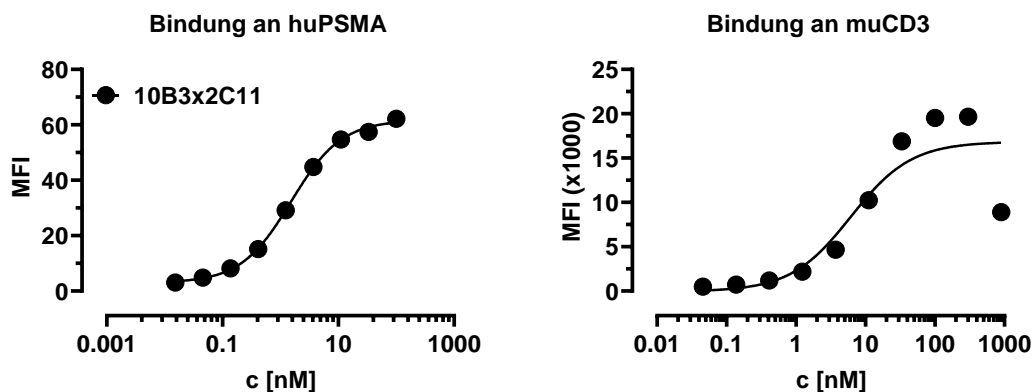
Bisher ist die Funktion von B7-H3 noch nicht eindeutig geklärt, wahrscheinlich handelt es sich aber um einen Immunregulator, welcher auf aktivierte T Zellen wirkt <sup>177,178</sup>. Zukünftige Arbeiten sollten sich deshalb damit beschäftigen, inwieweit therapeutische anti-B7-H3 Antikörper die Interaktion mit dem bisher noch nicht identifizierten Rezeptor beeinflussen können. Trotzdem bleibt B7-H3 ein hoch interessantes Tumorantigen, da es auf vielen Tumorentitäten eine hohe parenchymale und vaskuläre Expression zeigt, wie in dieser und anderen Arbeiten gezeigt werden konnte <sup>179</sup>.

Des Weiteren lieferte diese Arbeit wichtige Daten für die Generierung eines B7-H3xCD3 Konstrukts, dessen GMP („*good manufacturing practice*“) Produktion und klinische Phase I Studie in Kürze folgen sollen.

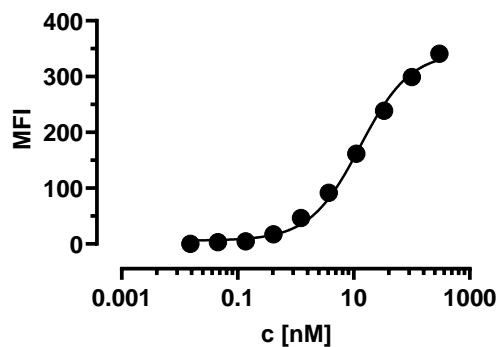
## 5 ANHANG

### 5.1 Abbildungen

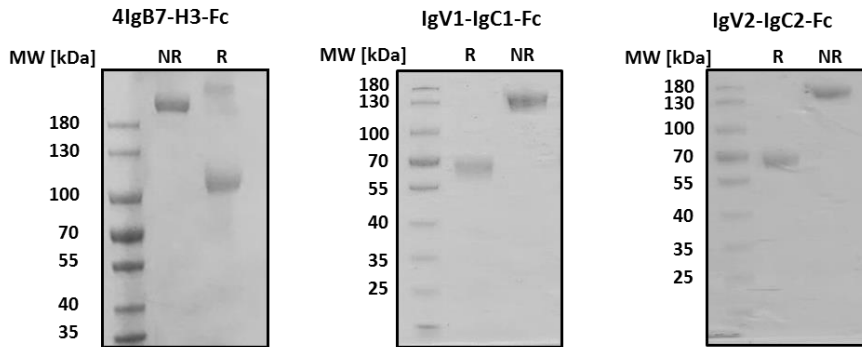
**Abbildung 5-1: Konzentrationsabhängige Antigen-Bindung der Isotyp-Kontrolle MOPCx2C11.** Der Antikörperklon MOPC-21 hat keine bekannte Spezifität und bindet daher nicht an die Tumorzelllinie B16-F10, während der Klon 2C11 an CD3 auf CD4 T Zellen binden kann. Die Messung erfolgte durch Durchflusszytometrie.



**Abbildung 5-2: Konzentrationsabhängige Antigen-Bindung von 10B3x2C11.** Der Antikörperklon 10B3 bindet an humanes PSMA, welches auf der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP exprimiert wird (links), während der Klon 2C11 an murines CD3 bindet, welches man auf murinen CD4 T Zellen findet (rechts). Die Messung erfolgte durch Durchflusszytometrie.



**Abbildung 5-3: Konzentrationsabhängige Antigen-Bindung von T99huFcKo.** Der Antikörperklon TA99 bindet an das Melanozyten-Antigen TRP1, welches auf der Melanomzelllinie B16-F10 exprimiert wird. Die Messung erfolgte durch Durchflusszytometrie.



**Abbildung 5-4: SDS-PAGE verschiedener B7-H3-Fc Fusionsproteine.** Das 4IgB7-H3-Fc bzw. die beiden 2IgB7-H3-Fc Fusionsproteine haben ein theoretisches Molekulargewicht von 144 bzw. 98 kDa, migrieren in der SDS-PAGE, auf Grund vieler Glykosylierung, aber deutlich höher.

**IgV domains**

```

muIgV      ----VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRD
huIgV1     ----LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQD
huIgV2     PTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRD
           :**** ***** ***** *****:***:
           ↑           ↑
muIgV      QGSAYSNRTALFPDLLVQGNASLRLQVRVVTDEGSYTCFVSIQDFDSAASVSLQVA 111
huIgV1     QGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIIRDFGSAASVSLQVA 111
huIgV2     QGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIIRDFGSAASVSLQVA 115
           *****:*****:*****:****:*****:*.*****
           ↑           ↑           ↑           ↑           ↑
    
```

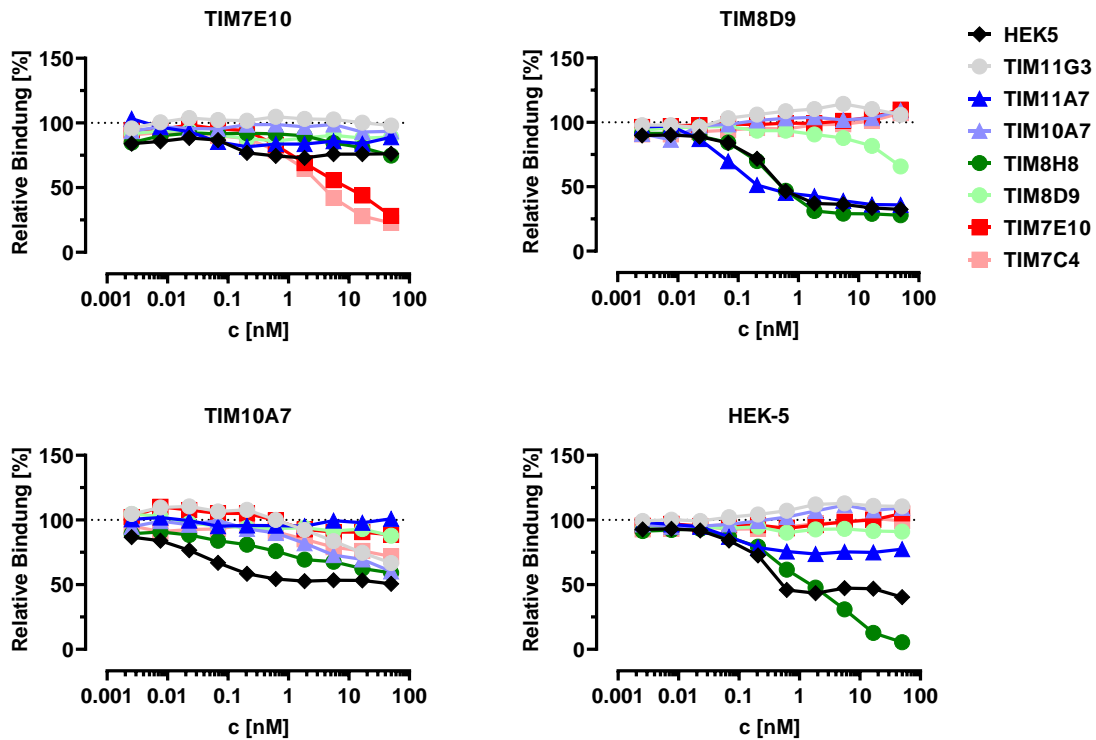
**IgC domains**

```

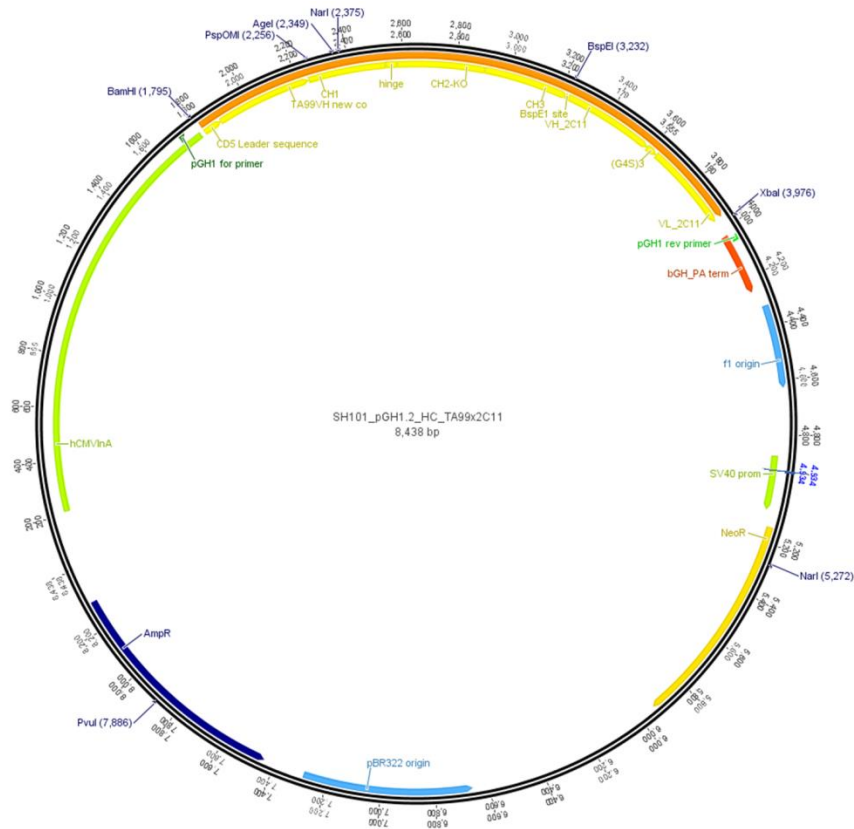
muIgC      PSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDV
huIgC1     PSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV
huIgC2     PSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV
           *****:*****:*****:*****:*****:*****
           ↑           ↑           ↑           ↑
muIgC      HSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT 94
huIgC1     HSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTIT 94
huIgC2     HSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT 94
           **:*****:*****:*****
    
```

**Abbildung 5-5: Aminosäure-Sequenzvergleich von humanem und murinem B7-H3.** Aminosäuren, welche im Rahmen der Epitop Charakterisierung ausgetauscht wurden, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.





**Abbildung 5-6: Konzentrationsabhängige Bindungskompetition verschiedener anti-B7-H3 Antikörper an humanes B7-H3.** Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen für 15 min mit B7-H3 positiven Granta-519 Zellen inkubiert. Anschließend wurde biotinylierter TIM7E10, TIM8D9, TIM10A7 oder HEK-5 in Sättigung (10 µg/mL) zugegeben und diese über Streptavidin-PE abgegriffen. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 5-7: Vektorkarte des Plasmids pGH1.2.** Exemplarisch ist die schwere Kette eines IgGsc Moleküls gezeigt. AmpR =  $\beta$ -Lactamase Gen für die Ampicillin-Resistenz, pBR322 = Replikationsursprung, NeoR = Neomycin-Geneticin(G418)-Resistenzgen, SV40 prom = Promotor, hCMVlnA = humaner CMV Promotor, bGH\_PA term = C-terminaler Poly A Teil. Das Gen für den Antikörper selbst ist in Gelb und die Binderegionen für die Sequenzierungsprimer sind in grün dargestellt.

## 5.2 Tabellen

**Tabelle 5-1: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer.**

<b>Puffer oder Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Advanced DMEM compl.	Advanced DMEM (Thermo Fisher Scientific), 1.25% FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (alle Sigma-Aldrich)
Brilliant Blue Entfärbelösung	50% H <sub>2</sub> O, 40% Methanol (Merck), 10% Essigsäure (Roth)
Brilliant Blue Färbelösung	50% H <sub>2</sub> O, 40% Methanol (Merck), 10% Essigsäure (Roth), 0.1 % Brillant Blau R 250 (Roth)
Einfríermedium	90% FCS (Sigma-Aldrich), 10 % DMSO (Merck)
FACS Puffer	1% FCS (Sigma-Aldrich), 0.02% NaN <sub>3</sub> in DPBS (Merck)
IMDM compl.	IMDM 1640, 1x MEM-NEAA (beide Thermo Fisher Scientific), 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 1x Natrium-Pyruvat (alle Sigma-Aldrich), 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)
LB <sub>(Amp)</sub> Medium	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Bacto-Hefeextrakt (beide BD), 5 g NaCl (Roth), (0.1 mg/mL Ampicillin (Roth))
LB <sub>Amp</sub> Agarplatten	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Bacto-Hefeextrakt, 15g/L Bacto-Agar (alle BD), 0.1 mg/mL Ampicillin (Roth)
RPMI compl.	RPMI 1640, 1x MEM-NEAA (beide Thermo Fisher Scientific), 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 1x Natrium-Pyruvat (alle Sigma-Aldrich), 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base (Roth), 1 M Essigsäure (Roth), 50 mM EDTA (Roth) in H <sub>2</sub> O, pH 8.5



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Peto, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* **411**, 390–395 (2001).
2. Burnet, F. M. The Concept of Immunological Surveillance. in *Prog Exp Tumor Res* vol. 13 1–27 (1970).
3. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. Busch. Verhandlungen Ärztlicher Gesellschaften. *Berl Klin Wochenschr* **12**, 137–138 (1868).
7. Bruns, P. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste. *Beitr Klin Chir* **3**, 443–466 (1888).
8. Coley, W. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg* **14**, 199–220 (1891).
9. Coley, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc. R. Soc. Med.* **3**, 1–48 (1910).
10. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **42**, 17–47 (1909).
11. Baldwin, R. W. Immunity to Transplanted Tumour: The Effect of Tumour Extracts on the Growth of Homologous Tumours in Rats. *Br. J. Cancer* **9**, 646–651 (1955).
12. Baldwin, R. W. Immunity to Methylcholanthrene-Induced Tumours in Inbred Rats Following Atrophy and Regression of the Implanted Tumours. *Br. J. Cancer* **9**, 652–657 (1955).
13. Old, L. J. & Boyse, E. A. Immunology of Experimental Tumors. *Annu. Rev. Med.* **15**, 167–186 (1964).

14. Rygaard, J. & Povlsen, C. O. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol.* **82**, 99–106 (1974).
15. Stutman, O. Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. *Science (80-. )*. **183**, 534–536 (1974).
16. Ikehara, S., Pahwa, R. N., Fernandes, G., Hansen, C. T. & Good, R. A. Functional T cells in athymic nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 886–888 (1984).
17. Maleckar, J. R. & Sherman, L. A. The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J. Immunol.* **138**, 3873–6 (1987).
18. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. ‘Natural’ killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* **5**, 117–21 (1975).
19. Pross, H. F. & Jondal, M. Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **21**, 226–35 (1975).
20. Herberman, R. B. & Holden, H. T. Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* **27**, 305–77 (1978).
21. Shankaran, V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–11 (2001).
22. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
23. von Mensdorff-Pouilly, S. *et al.* Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J. Clin. Oncol.* **18**, 574–83 (2000).
24. Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z. & Zou, W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 214–221 (2013).
25. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).

26. Senovilla, L. *et al.* Trial watch. *Oncoimmunology* **1**, 1323–1343 (2012).
27. Koopman, L. A., Corver, W. E., van der Slik, A. R., Giphart, M. J. & Fleuren, G. J. Multiple Genetic Alterations Cause Frequent and Heterogeneous Human Histocompatibility Leukocyte Antigen Class I Loss in Cervical Cancer. *J. Exp. Med.* **191**, 961–976 (2000).
28. Algarra, I., Cabrera, T. & Garrido, F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum. Immunol.* **61**, 65–73 (2000).
29. Seliger, B., Maeurer, M. J. & Ferrone, S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* **21**, 455–464 (2000).
30. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* **117**, 1147–1154 (2007).
31. Khong, H. T. & Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* **3**, 999–1005 (2002).
32. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
33. Walker, P. R., Saas, P. & Dietrich, P. Y. Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 564–572 (1998).
34. Gajewski, T. F. *et al.* Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol. Rev.* **213**, 131–145 (2006).
35. Arruebo, M. *et al.* Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers (Basel)*. **3**, 3279–3330 (2011).
36. Ma, M., Liu, J., Jin, S. & Wang, L. Development of tumour peptide vaccines: From universalization to personalization. *Scand. J. Immunol.* **91**, 1–21 (2020).
37. Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P. N. N. & Rammensee, H.-G. G. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 187–195 (2004).
38. Rammensee, H.-G. Entwicklung therapeutischer Peptidimpfstoffe gegen Krebs. *Arzneimittelforschung* **62**, S5–S7 (2012).

39. Rammensee, H.-G. G. *et al.* A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *J. Immunother. Cancer* **7**, 1–18 (2019).
40. Weide, B. *et al.* Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. *J. Immunother.* **32**, 498–507 (2009).
41. Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H. G. & Jung, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1–7 (2000).
42. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422 (2010).
43. Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science (80-. )*. **348**, 62–68 (2015).
44. Morgan, D., Ruscetti, F. & Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science (80-. )*. **193**, 1007–1008 (1976).
45. Eberlein, T. J., Rosenstein, M. & Rosenberg, S. A. Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2. *J. Exp. Med.* **156**, 385–97 (1982).
46. Rosenberg, S. A. *et al.* Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1485–1492 (1985).
47. June, C. H. & Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 64–73 (2018).
48. Curran, K. J., Pegram, H. J. & Brentjens, R. J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J. Gene Med.* **14**, 405–415 (2012).
49. Makita, S., Yoshimura, K. & Tobinai, K. Clinical development of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci.* **108**, 1109–1118 (2017).



50. Plosker, G. L. & Figgitt, D. P. Rituximab: A review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* **63**, 803–843 (2003).
51. Rueckert, S., Ruehl, I., Kahlert, S., Konecny, G. & Untch, M. A monoclonal antibody as an effective therapeutic agent in breast cancer: Trastuzumab. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**, 853–866 (2005).
52. Singh, S. *et al.* Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr. Clin. Pharmacol.* **13**, 85–99 (2018).
53. Hankin, E. H. A Cure for Tetanus and Diphtheria. *Nature* **43**, 121–123 (1890).
54. Behring, E. & Kitasato, S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **16**, 1113–1114 (1890).
55. Ehrlich, P. Über die Gewinnung, Werthbestimmung und Verwerthung des Diphtherieheilserums. *Hyg. Rundschau* **4** 1140–1152 (1894).
56. Ehrlich, P., Kossel, H. & Wassermann, A. Ueber Gewinnung und Verwendung des Diphtherieheilserums. *Dtsch. medizinische Wochenschrift* **20** 353–355 (1894).
57. Ehrlich, P. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. London* **66**, 424–448 (1900).
58. Heidelberger, M. & Kendall, F. E. A QUANTITATIVE THEORY OF THE PRECIPITIN REACTION. *J. Exp. Med.* **62**, 467–484 (1935).
59. Tiselius, A. & Kabat, E. A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.* **69**, 119–132 (1939).
60. Svedberg, T. & Rinde, H. THE ULTRA-CENTRIFUGE, A NEW INSTRUMENT FOR THE DETERMINATION OF SIZE AND DISTRIBUTION OF SIZE OF PARTICLE IN AMICROSCOPIC COLLOIDS. *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 2677–2693 (1924).
61. Porter, R. The structure of gamma-globulins and antibodies. *Gellhorn A Hirschb. E, Ed. Basic Probl. Neoplast. Dis. Columbia Univ. Press. New York.* (1962).
62. Edelman, G. M. & Gally, J. A. A MODEL FOR THE 7S ANTIBODY MOLECULE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **51**, 846–853 (1964).

63. Nisonoff, A., Markus, G. & Wissler, F. C. Separation of Univalent Fragments of Rabbit Antibody by Reduction of a Single, Labile Disulphide Bond. *Nature* **189**, 293–295 (1961).
64. Roitt, I. M., Greaves, M. F., Torrigiani, G., Brostoff, J. & Playfair, J. H. The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet* **2**, 367–371 (1969).
65. Rowe, D. S. & Fahey, J. L. a New Class of Human Immunoglobulins. Ii. Normal Serum Igd. *J. Exp. Med.* **121**, 185–199 (1965).
66. Heremans, J. F., Heremans, M. T. & Schultze, H. E. Isolation and description of a few properties of the  $\beta$ 2A-globulin of human serum. *Clin. Chim. Acta* **4**, 96–102 (1959).
67. Ishizaka, K. & Ishizaka, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. *J. Allergy* **37**, 169–185 (1966).
68. Edelman, G. M. *et al.* The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 78–85 (1969).
69. Edelman, G. M. & Gally, J. A. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J. Exp. Med.* **116**, 207–227 (1962).
70. Hilschmann, N. & Craig, L. C. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **53**, 1403–1409 (1965).
71. Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119–126 (1959).
72. PORTER, R. R. CHEMICAL STRUCTURE OF  $\gamma$ -GLOBULIN AND ANTIBODIES. *Br. Med. Bull.* **19**, 197–201 (1963).
73. Rouet, R., Lowe, D. & Christ, D. Stability engineering of the human antibody repertoire. *FEBS Lett.* **588**, 269–277 (2014).
74. Rossi, G. & Nisonoff, A. Crystallization of Fragment Fab of human IgG myeloma proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 914–918 (1968).

75. Wu, T. T. & Kabat, E. A. 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 (1970).
76. Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N. & Pirrotta, V. Organization of Immunoglobulin Genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **42**, 921–931 (1978).
77. Hozumi, N. & Tonegawa, S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3628–3632 (1976).
78. Grawunder, U., West, R. B. & Lieber, M. R. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 172–180 (1998).
79. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. & Hood, L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* **19**, 981–992 (1980).
80. Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. & Mathis, D. Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science (80- )*. **261**, 1175–1178 (1993).
81. Komori, T., Okada, A., Stewart, V. & Alt, F. W. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science (80- )*. **261**, 1171–1175 (1993).
82. McKean, D. *et al.* Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3180–3184 (1984).
83. Brandtzaeg, P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 3–15 (2003).
84. Sörman, A., Zhang, L., Ding, Z. & Heyman, B. How antibodies use complement to regulate antibody responses. *Mol. Immunol.* **61**, 79–88 (2014).
85. Ravetch, J. V & Bolland, S. IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290 (2001).

86. Sulica, A., Morel, P., Metes, D. & Herberman, R. B. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int. Rev. Immunol.* **20**, 371–414 (2001).
87. Seidel, U. J. E., Schlegel, P. & Lang, P. Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. *Front. Immunol.* **4**, 1–8 (2013).
88. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
89. Kung, P. C., Goldstein, G., Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science (80-. )*. **206**, 347–349 (1979).
90. Ortho Multicenter Transplant Study Group. A Randomized Clinical Trial of OKT3 Monoclonal Antibody for Acute Rejection of Cadaveric Renal Transplants. *N. Engl. J. Med.* **313**, 337–342 (1985).
91. Hooks, M. A., Wade, C. S. & Millikan, W. J. Muromonab CD-3: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation. *Pharmacotherapy* **11**, 26–37 (1991).
92. Schroeder, T. J. *et al.* Antimurine Antibody Foramtion Following OKT3 Therapy. *Transplantation* **49**, 48–51 (1990).
93. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6851–6855 (1984).
94. Maloney, D. G. *et al.* IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90**, 2188–95 (1997).
95. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522–525 (1986).
96. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (80-. )*. **228**, 1315–1317 (1985).

97. Lee, E. C. *et al.* Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat. Biotechnol.* **32**, 356–363 (2014).
98. Saunders, K. O. Conceptual approaches to modulating antibody effector functions and circulation half-life. *Front. Immunol.* **10**, 1–20 (2019).
99. Lazar, G. A. *et al.* Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 4005–4010 (2006).
100. Shields, R. L. *et al.* High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc $\gamma$ R. *J. Biol. Chem.* **276**, 6591–6604 (2001).
101. Wines, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W. H. I., Barnes, N. & Hogarth, P. M. The IgG Fc Contains Distinct Fc Receptor (FcR) Binding Sites: The Leukocyte Receptors Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RIIIa Bind to a Region in the Fc Distinct from That Recognized by Neonatal FcR and Protein A. *J. Immunol.* **164**, 5313–5318 (2000).
102. Shields, R. L. *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc $\gamma$ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* **277**, 26733–26740 (2002).
103. Dall’Acqua, W. F., Kiener, P. A. & Wu, H. Properties of Human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc Receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.* **281**, 23514–23524 (2006).
104. Robbie, G. J. *et al.* A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 6147–6153 (2013).
105. Jen, E. Y. *et al.* FDA Approval: Gemtuzumab Ozogamicin for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **24**, 3242–3246 (2018).
106. Carnemolla, B. *et al.* Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood* **99**, 1659–1665 (2002).

107. Kaspar, M., Trachsel, E. & Neri, D. The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **67**, 4940–4948 (2007).
108. Ebbinghaus, C. *et al.* Engineered vascular-targeting antibody-interferon- $\gamma$  fusion protein for cancer therapy. *Int. J. Cancer* **116**, 304–313 (2005).
109. Melero, I., Rouzaut, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T-Cell and NK-Cell Infiltration into Solid Tumors: A Key Limiting Factor for Efficacious Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov.* **4**, 522–526 (2014).
110. Ma, S. *et al.* Current progress in car-t cell therapy for solid tumors. *Int. J. Biol. Sci.* **15**, 2548–2560 (2019).
111. Nisonoff, A. & Rivers, M. M. Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 460–462 (1961).
112. Brennan, M., Davison, P. & Paulus, H. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science (80-. )*. **229**, 81–83 (1985).
113. Milstein, C. & Cuello, A. C. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* **305**, 537–540 (1983).
114. Choi, B. D. *et al.* Bispecific antibodies engage T cells for antitumor immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 843–853 (2011).
115. Seimetz, D., Lindhofer, H. & Bokemeyer, C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM $\times$ anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 458–467 (2010).
116. Bargou, R. *et al.* Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science (80-. )*. **321**, 974–977 (2008).
117. Brinkmann, U. & Kontermann, R. E. The making of bispecific antibodies. *MAbs* **9**, 182–212 (2017).
118. Sedykh, S. E., Prinz, V. V., Buneva, V. N. & Nevinsky, G. A. Bispecific antibodies: Design, therapy, perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 195–208 (2018).

119. Coloma, M. J. & Morrison, S. L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat. Biotechnol.* **15**, 159–163 (1997).
120. Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell  $\alpha\beta$  receptors. *J. Mol. Biol.* **295**, 979–995 (2000).
121. Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. HOW TCRS BIND MHCS, PEPTIDES, AND CORECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 419–466 (2006).
122. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
123. Higgins, L. M. *et al.* Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J. Immunol.* **162**, 486–93 (1999).
124. Akiba, H. *et al.* CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J. Immunol.* **162**, 7058–7066 (1999).
125. Hurtado, J. C., Kim, S. H., Pollok, K. E., Lee, Z. H. & Kwon, B. S. Potential role of 4-1BB in T cell activation: Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J. Immunol.* **155**, 3360–3367 (1995).
126. Hurtado, J. C., Kim, Y. J. & Kwon, B. S. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J. Immunol.* **158**, 2600–9 (1997).
127. Curtsinger, J. M. *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **162**, 3256–62 (1999).
128. Olejniczak, K. & Kasprzak, A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review. *Med. Sci. Monit.* **14**, RA179-89 (2008).
129. Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (80-. ).* **260**, 547–549 (1993).
130. Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. & Lugli, E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2797–2809 (2013).

131. Golubovskaya, V. & Wu, L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **8**, (2016).
132. Nguyen, L. T. & Ohashi, P. S. Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 45–56 (2015).
133. Ng, T. H. S. *et al.* Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Front. Immunol.* **4**, 1–13 (2013).
134. ABRAMOWICZ, D. *et al.* RELEASE OF TUMOR NECROSIS FACTOR, INTERLEUKIN-2, AND GAMMA-INTERFERON IN SERUM AFTER INJECTION OF OKT3 MONOCLONAL ANTIBODY IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation* **47**, 606–608 (1989).
135. Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T. & Hünig, T. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: Evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol.* **27**, 239–247 (1997).
136. Lühder, F. *et al.* Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med.* **197**, 955–966 (2003).
137. Lin, C. H. & Hünig, T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur. J. Immunol.* **33**, 626–638 (2003).
138. Beyersdorf, N. *et al.* Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **202**, 445–455 (2005).
139. Beyersdorf, N., Hanke, T., Kerkau, T. & Hünig, T. CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4+CD25+ regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.* **5**, 40–45 (2006).
140. Suntharalingam, G. *et al.* Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1018–1028 (2006).
141. Chester, C., Sanmamed, M. F., Wang, J. & Melero, I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood* **131**, 49–57 (2018).
142. Lee, H.-W. *et al.* 4-1BB Promotes the Survival of CD8 + T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-x L and Bfl-1 . *J. Immunol.* **169**, 4882–4888 (2002).



143. Maus, M. V. *et al.* Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat. Biotechnol.* **20**, 143–148 (2002).
144. Wilcox, R. A. *et al.* Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* **103**, 177–184 (2004).
145. Sznol, M. *et al.* Phase I study of BMS-663513, a fully human anti-CD137 agonist monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced cancer (CA). *J. Clin. Oncol.* **26**, 3007–3007 (2008).
146. Lin, G. H. Y., Snell, L. M., Wortzman, M. E., Clouthier, D. L. & Watts, T. H. GITR-Dependent Regulation of 4-1BB Expression: Implications for T Cell Memory and Anti-4-1BB-Induced Pathology. *J. Immunol.* **190**, 4627–4639 (2013).
147. Segal, N. H. *et al.* A phase 1 study of PF-05082566 (anti-4-1BB) in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3007–3007 (2014).
148. Marhelava, K., Pilch, Z., Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A. & Zagozdzon, R. Targeting negative and positive immune checkpoints with monoclonal antibodies in therapy of cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–21 (2019).
149. Kellner, C., Otte, A., Cappuzzello, E., Klausz, K. & Peipp, M. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus. Med. Hemotherapy* **44**, 327–336 (2017).
150. Friedman, C. F., Proverbs-Singh, T. A. & Postow, M. A. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA Oncol.* **2**, 1346 (2016).
151. Wu, Z. & Cheung, N. V. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **182**, 161–175 (2018).
152. Perez, P., Hoffman, R. W., Shaw, S., Bluestone, J. A. & Segal, D. M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature* **316**, 354–356 (1985).
153. Staerz, U. D., Kanagawa, O. & Bevan, M. J. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* **314**, 628–631 (1985).

154. Wong, R. *et al.* Blinatumomab induces autologous T-cell killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* **98**, 1930–1938 (2013).
155. Croft, M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 431–437 (1994).
156. Berard, M. & Tough, D. F. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology* **106**, 127–138 (2002).
157. Grosse-Hovest, L. *et al.* Tumor-growth inhibition with bispecific antibody fragments in a syngeneic mouse melanoma model: The role of targeted T-cell co-stimulation via CD28. *Int. J. Cancer* **80**, 138–144 (1999).
158. Jung, G., Ledbetter, J. A. & Muller-Eberhard, H. K. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 4611–4615 (1987).
159. Otz, T., Große-Hovest, L., Hofmann, M., Rammensee, H. G. & Jung, G. A bispecific single-chain antibody that mediates target cell-restricted, supra-agonistic CD28 stimulation and killing of lymphoma cells. *Leukemia* **23**, 71–77 (2009).
160. Grosse-Hovest, L. *et al.* A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1334–1340 (2003).
161. Brandl, M., Große-Hovest, L., Holler, E., Kolb, H. J. & Jung, G. 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**, 1264–1270 (1999).
162. Skokos, D. *et al.* A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaaw7888 (2020).
163. Chiu, D. *et al.* A PSMA-Targeting CD3 Bispecific Antibody Induces Antitumor Responses that Are Enhanced by 4-1BB Costimulation. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 596–608 (2020).

164. Waite, J. C. *et al.* Tumor-targeted CD28 bispecific antibodies enhance the antitumor efficacy of PD-1 immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaba2325 (2020).
165. Brandl, C. *et al.* The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1551–1563 (2007).
166. Li, J. *et al.* CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity. *Sci. Transl. Med.* **11**, 1–13 (2019).
167. Kauer, J. *et al.* Tocilizumab, but not dexamethasone, prevents CRS without affecting antitumor activity of bispecific antibodies. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000621 (2020).
168. Genentech, I. FDA Approves Genentech’s Actemra (Tocilizumab) for the Treatment of CAR T Cell-Induced Cytokine Release Syndrome. *Genentech, a Memb. Roche Gr.* 4–7 (2017).
169. Pallasch, C. P. *et al.* Sensitizing Protective Tumor Microenvironments to Antibody-Mediated Therapy. *Cell* **156**, 590–602 (2014).
170. Thurber, G. M., Zajic, S. C. & Wittrup, K. D. Theoretic criteria for antibody penetration into solid tumors and micrometastases. *J. Nucl. Med.* **48**, 995–999 (2007).
171. Thurber, G. M., Schmidt, M. M. & Wittrup, K. D. Antibody tumor penetration. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, (2008).
172. Thomson, T. M., Mattes, M. J., Roux, L., Old, L. J. & Lloyd, K. O. Pigmentation-Associated Glycoprotein of Human Melanomas and Melanocytes: Definition with a Mouse Monoclonal Antibody. *J. Invest. Dermatol.* **85**, 169–174 (1985).
173. Box, N. F. *et al.* Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1. *Mamm. Genome* **9**, 50–53 (1998).
174. Ghanem, G. & Fabrice, J. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. *Mol. Oncol.* **5**, 150–155 (2011).
175. Takechi, Y., Hara, I., Naftzger, C., Xu, Y. & Houghton, A. N. A melanosomal membrane protein is a cell surface target for melanoma therapy. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1837–42 (1996).

176. Duffy, A. G. *et al.* Phase I and preliminary phase II study of TRC105 in combination with sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4633–4641 (2017).
177. Li, G., Quan, Y., Che, F. & Wang, L. B7-H3 in tumors: friend or foe for tumor immunity? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 245–253 (2018).
178. Wang, L., Kang, F. B. & Shan, B. E. B7-H3-mediated tumor immunology: Friend or foe? *Int. J. Cancer* **134**, 2764–2771 (2014).
179. Seaman, S. *et al.* Genes that Distinguish Physiological and Pathological Angiogenesis. *Cancer Cell* **11**, 539–554 (2007).
180. Brunner, A., Hinterholzer, S., Riss, P., Heinze, G. & Brustmann, H. Immunoexpression of B7-H3 in endometrial cancer: Relation to tumor T-cell infiltration and prognosis. *Gynecol. Oncol.* **124**, 105–111 (2012).
181. Zang, X. *et al.* Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas. *Mod. Pathol.* **23**, 1104–1112 (2010).
182. Seaman, S. *et al.* Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature. *Cancer Cell* **31**, 501-515.e8 (2017).
183. Eastwood, D. *et al.* Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4 + effector memory T-cells. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 512–526 (2010).
184. Ireson, C. R., Alavijeh, M. S., Palmer, A. M., Fowler, E. R. & Jones, H. J. The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *Br. J. Cancer* **121**, 101–108 (2019).
185. Day, C. P., Merlino, G. & Van Dyke, T. Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. *Cell* **163**, 39–53 (2015).
186. Holen, I., Speirs, V., Morrissey, B. & Blyth, K. In vivo models in breast cancer research: Progress, challenges and future directions. *DMM Dis. Model. Mech.* **10**, 359–371 (2017).
187. Johnson, J. I. *et al.* Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br. J. Cancer* **84**, 1424–1431 (2001).
188. Berns, A. Improved mouse models. *Nature* **410**, 1043–1044 (2001).

189. Talmadge, J. E., Singh, R. K., Fidler, I. J. & Raz, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am. J. Pathol.* **170**, 793–804 (2007).
190. DeVita, V. T. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 8643–8653 (2008).
191. Mosely, S. I. S. *et al.* Rational selection of syngeneic preclinical tumor models for immunotherapeutic drug discovery. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 29–41 (2017).
192. Kuo, T. H. *et al.* Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res.* **13**, 627–30.
193. Wilmanns, C., Fan, D., O'Brian, C. A., Bucana, C. D. & Fidler, I. J. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int. J. Cancer* **52**, 98–104 (1992).
194. Kerbel, R. S. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev.* **17**, 301–4 (1998).
195. Fidler, I. J. 7th Jan Waldenström Lecture. The Biology of Human Cancer Metastasis. *Acta Oncol. (Madr)*. **30**, 668–675 (1991).
196. Hoffman, R. M. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest. New Drugs* **17**, 343–59 (1999).
197. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
198. Bailey, M., Christoforidou, Z. & Lewis, M. C. The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **152**, 13–19 (2013).
199. Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527–530 (1983).
200. Custer, R. P., Bosma, G. C. & Bosma, M. J. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am. J. Pathol.* **120**, 464–77 (1985).

201. Shultz, L. D. *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* **154**, 180–91 (1995).
202. Greiner, D. L. *et al.* Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *Am. J. Pathol.* **146**, 888–902 (1995).
203. Ito, M. *et al.* Nod/scid/□. *Bone* **100**, 3175–3182 (2002).
204. Shultz, L. D., Ishikawa, F. & Greiner, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 118–130 (2007).
205. Tentler, J. J. *et al.* Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 338–50 (2012).
206. Lang, J., Weiss, N., Freed, B. M., Torres, R. M. & Pelanda, R. Generation of hematopoietic humanized mice in the newborn BALB/c-Rag2null Il2rynull mouse model: a multivariable optimization approach. *Clin. Immunol.* **140**, 102–16 (2011).
207. Zekri, L. *et al.* An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol. Med.* **13**, 1–15 (2021).
208. Benonisson, H. *et al.* CD3-Bispecific Antibody Therapy Turns Solid Tumors into Inflammatory Sites but Does Not Install Protective Memory. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 312–322 (2019).
209. Gilliland, L. K. *et al.* Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *Tissue Antigens* **47**, 1–20 (1996).
210. Rickert, K. W. *et al.* Combining phage display with de novo protein sequencing for reverse engineering of monoclonal antibodies. *MAbs* **8**, 501–512 (2016).
211. Steinwand, M. *et al.* The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs* **6**, 204–218 (2014).
212. Hörner, S. *et al.* Mass spectrometry for quality control of bispecific antibodies after SDS-PAGE in-gel digestion. *Biotechnol. Bioeng.* bit.27817 (2021) doi:10.1002/bit.27817.

213. Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860 (2007).
214. Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr. Protoc. Immunol.* **39**, (2000).
215. Labrijn, A. F. *et al.* Efficient Generation of Bispecific Murine Antibodies for Pre-Clinical Investigations in Syngeneic Rodent Models. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
216. Caruso, A. *et al.* Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* **27**, 71–76 (1997).
217. Liao, W., Lin, J. & Leonard, W. J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 598–604 (2011).
218. Sojka, D. K., Bruniquel, D., Schwartz, R. H. & Singh, N. J. IL-2 Secretion by CD4 + T Cells In Vivo Is Rapid, Transient, and Influenced by TCR-Specific Competition. *J. Immunol.* **172**, 6136–6143 (2004).
219. Pilon-Thomas, S., Mackay, A., Vohra, N. & Mulé, J. J. Blockade of Programmed Death Ligand 1 Enhances the Therapeutic Efficacy of Combination Immunotherapy against Melanoma. *J. Immunol.* **184**, 3442–3449 (2010).
220. Donckier, V. *et al.* Modulation of the release of cytokines and reduction of the shock syndrome induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice by interleukin-10. *Transplantation* **57**, 1436–9 (1994).
221. Jacobs, F., Dubois, C., Carlier, Y. & Goldman, M. Administration of anti-CD3 monoclonal antibody during experimental Chagas' disease induces CD8+ cell-dependent lethal shock. *Clin. Exp. Immunol.* **103**, 233–8 (1996).
222. Booth, B. J. *et al.* Extending human IgG half-life using structure-guided design. *MAbs* **10**, 1098–1110 (2018).
223. Hughes, C. S., Postovit, L. M. & Lajoie, G. A. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **10**, 1886–1890 (2010).

224. Shalaby, M. R. *et al.* Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J. Exp. Med.* **175**, 217–225 (1992).
225. Reddy, V. *et al.* Internalization of rituximab and the efficiency of B cell depletion in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2046–2055 (2015).
226. Ling, V. *et al.* Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: Divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* **82**, 365–377 (2003).
227. Vigdorovich, V. *et al.* Structure and t cell inhibition properties of b7 family member, B7-H3. *Structure* **21**, 707–717 (2013).
228. Stewart, R., Hammond, S. A., Oberst, M. & Wilkinson, R. W. The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer. *J. Immunother. Cancer* **2**, 29 (2014).
229. Bruhns, P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640–5649 (2012).
230. Prasad, D. V. R. *et al.* Murine B7-H3 Is a Negative Regulator of T Cells. *J. Immunol.* **173**, 2500–2506 (2004).
231. Amann, M. *et al.* Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3. *Cancer Res.* **68**, 143–151 (2008).
232. Schlereth, B. *et al.* Potent inhibition of local and disseminated tumor growth in immunocompetent mouse models by a bispecific antibody construct specific for murine CD3. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 785–796 (2006).
233. Hara, I., Takechi, Y. & Houghton, A. N. Implicating a role for immune recognition of self in tumor rejection: passive immunization against the brown locus protein. *J. Exp. Med.* **182**, 1609–1614 (1995).
234. Boross, P. *et al.* Anti-tumor activity of human IgG1 anti-gp75 TA99 mAb against B16F10 melanoma in human FcgammaRI transgenic mice. *Immunol. Lett.* **160**, 151–157 (2014).



235. You, G. *et al.* B7-H3×4-1BB bispecific antibody augments antitumor immunity by enhancing terminally differentiated CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes. *Sci. Adv.* **7**, 1–16 (2021).
236. Jain, N. K. *et al.* A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Protein Expr. Purif.* **134**, 38–46 (2017).
237. Abdiche, Y. N. *et al.* The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs* **7**, 331–343 (2015).
238. Murer, P. *et al.* Targeted Delivery of TNF Potentiates the Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity . *J. Invest. Dermatol.* **139**, 1339–1348 (2019).
239. Li, J. *et al.* Membrane-Proximal Epitope Facilitates Efficient T Cell Synapse Formation by Anti-FcRH5/CD3 and Is a Requirement for Myeloma Cell Killing. *Cancer Cell* **31**, 383–395 (2017).
240. Bluemel, C. *et al.* Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 1197–1209 (2010).
241. Lee, Y. H. *et al.* Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function. *Cell Res.* **27**, 1034–1045 (2017).



## 7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei Prof. Dr. Gundram Jung, Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und Prof. Dr. Alexander Weber für die Betreuung meiner Dissertation, die konstruktiven Gespräche und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Dr. Latifa Zekri-Metref, Dr. Martin Pflügler, Dr. Joseph Kauer, Dr. Timo Manz, Dr. Fabian Vogt und Lukas Osburg möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit danken und für die Einarbeitung in eine Vielzahl von neuen Methoden. Karin Teppert und Moustafa Moustafa-Oglou danke ich für die Mithilfe des in dieser Arbeit nicht behandelten CD95 Projekts. Natürlich bedanke ich mich auch bei allen anderen, die über die Jahre Mitglieder der AG Jung waren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Beate Pömmerl und Carolin Walker für die Hilfe im Laboralltag bedanken, sowie allen anderen Elchen für die sehr gute Arbeitsatmosphäre in der Abteilung für Immunologie.

Bei Dr. Melanie Märklin, Ilona Hagelstein und der ganzen AG Salih möchte ich mich für die Zusammenarbeit und für die Unterstützung bei den Mausversuchen bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meiner Frau Mariangela für die Unterstützung in all den Jahren bedanken.