

# **Charakterisierung eines Fc-optimierten CD19-Antikörpers zur Immuntherapie der BCP-ALL**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Ursula Jördis Eva Seidel

aus Filderstadt

Tübingen

2015

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.10.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

apl. Prof. Dr. Peter Lang

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Die pädiatrische B-Linien akute lymphatische Leukämie (BCP-ALL) .....	13
1.2 Tumormimmuntherapie mit Antikörpern.....	18
1.3 Zielantigene zur immuntherapeutischen Behandlung der BCP-ALL .....	32
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	37
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.1 Materialien.....	38
2.2 Zellbiologische Methoden .....	55
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	59
2.4 Analytische Methoden.....	64
2.5 Präparative Methoden.....	68
2.6 Funktionelle Analysen.....	69
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>74</b>
3.1 CD19 als Zielantigen der BCP-ALL.....	74
3.2 Präklinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE.....	82
3.3 Klinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE .....	103
3.4 Weitere potentielle Zielantigene zur Therapie der BCP-ALL.....	118
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>122</b>
4.1 CD19 als Zielantigen der BCP-ALL.....	122
4.2 Präklinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE.....	124
4.3 Klinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE .....	131
4.4 Weitere potentielle Zielantigene zur Therapie der BCP-ALL.....	135
4.5 Ausblick.....	137
<b>5 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>138</b>
<b>6 Anhang</b> .....	<b>155</b>
6.1 Publikationen.....	155
6.2 Danksagung .....	157
<b>7 Erklärung</b> .....	<b>158</b>

## Bilderverzeichnis

<b>Bild 1-1: B-Zellentwicklung.....</b>	<b>14</b>
<b>Bild 1-2: Definition von Begriffen in der BCP-ALL Diagnostik.....</b>	<b>15</b>
<b>Bild 1-3: Struktur eines humanen IgG1-Antikörpers. ....</b>	<b>18</b>
<b>Bild 1-4: Effektormechanismen therapeutischer Antikörper.....</b>	<b>19</b>
<b>Bild 1-5: Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) in der Tumorimmuntherapie.....</b>	<b>25</b>
<b>Bild 1-6: Rekombinante Modifikation von Antikörpern.....</b>	<b>29</b>
<b>Bild 3-1: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CD19 und HLA-I auf primären BCP-ALL Blasten.....</b>	<b>75</b>
<b>Bild 3-2: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CD19 und HLA-I auf leukämischen Zelllinien. ....</b>	<b>76</b>
<b>Bild 3-3: Quantitative Oberflächenexpression von CD19 und HLA-I auf MCF-7- CD19tm-Transfektanten.....</b>	<b>77</b>
<b>Bild 3-4: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen MCF-7-CD19-Transfektanten.....</b>	<b>79</b>
<b>Bild 3-5: CD19-Antigenmodulation auf leukämischen Blasten durch 4G7SDIE..</b>	<b>80</b>
<b>Bild 3-6: CD19-Rekonstitution auf leukämischen Zelllinien. ....</b>	<b>81</b>
<b>Bild 3-7: Bindung von 4G7SDIE auf BCP-ALL Blasten und NALM-16. ....</b>	<b>82</b>
<b>Bild 3-8: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen MHH-CALL-4.....</b>	<b>83</b>
<b>Bild 3-9: Analyse des Einflusses der Fc-Optimierung von 4G7SDIE.....</b>	<b>84</b>
<b>Bild 3-10: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen BCP-ALL Blasten.....</b>	<b>85</b>
<b>Bild 3-11: Halbmaximale Lyse von BCP-ALL Blasten durch 4G7SDIE-vermittelte ADCC. ....</b>	<b>86</b>
<b>Bild 3-12: Kreuzblockierungsexperimente mit CD19-Antikörpern.. ....</b>	<b>87</b>
<b>Bild 3-13: Funktionelle Kreuzblockierung von Blinatumomab durch 4G7SDIE.. .....</b>	<b>89</b>
<b>Bild 3-14: Indirekte Detektion der ADCC primärer <math>\gamma\delta</math>-T Zellen.....</b>	<b>91</b>
<b>Bild 3-15: Korrelation der CD16-Expression von <math>\gamma\delta</math>-T Zellen mit der vermittelten ADCC.....</b>	<b>93</b>
<b>Bild 3-16: Indirekte Detektion der ADCC expandierter <math>\gamma\delta</math>-T Zellen.....</b>	<b>94</b>
<b>Bild 3-17: 4G7SDIE-vermittelte ADCC durch expandierte <math>\gamma\delta</math>-T Zellen gegen BCP- ALL Blasten. ....</b>	<b>95</b>
<b>Bild 3-18: Dynamische Analyse der 4G7SDIE-vermittelten ADCC mit expandierten <math>\gamma\delta</math>-T Zellen.....</b>	<b>96</b>
<b>Bild 3-19: Dynamische Analyse der 4G7SDIE-vermittelte ADCC mit expandierten <math>\gamma\delta</math>-T Zellen.....</b>	<b>97</b>

<b>Bild 3-20: Einfluss des FcyRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC.....</b>	<b>99</b>
<b>Bild 3-21: Einfluss des FcyRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC.....</b>	<b>99</b>
<b>Bild 3-22: Einfluss des FcyRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die N19-C16-vermittelte ADCC.....</b>	<b>101</b>
<b>Bild 3-23: Einfluss des FcyRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die N19-C16-vermittelte ADCC.....</b>	<b>101</b>
<b>Bild 3-24: Klinisches Ansprechen der 4G7SDIE-behandelten Patienten..</b>	<b>104</b>
<b>Bild 3-25: ADCC durch Patienteneffektorzellen gegen MHH-CALL-4..</b>	<b>105</b>
<b>Bild 3-26: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen autologe leukämische Blasten über den Therapieverlauf..</b>	<b>107</b>
<b>Bild 3-27: B-Zelldepletion durch 4G7SDIE..</b>	<b>108</b>
<b>Bild 3-28: Serumhalbwertszeit 4G7SDIE.....</b>	<b>109</b>
<b>Bild 3-29: Serumkonzentration von 4G7SDIE über den Therapieverlauf.....</b>	<b>110</b>
<b>Bild 3-30: Analyse auf HACAs. ....</b>	<b>110</b>
<b>Bild 3-31: CD19-Antigenmodulation auf primären Blasten 4G7SDIE-behandelter Patienten.....</b>	<b>111</b>
<b>Bild 3-32: CD19-Antigenmodulation und CD19-Rekonstitution auf leukämischen Blasten des Patienten. ....</b>	<b>113</b>
<b>Bild 3-33: CD19-Antigenmodulation und CD19-Rekonstitution auf leukämischen Blasten des Patienten #11.....</b>	<b>115</b>
<b>Bild 3-34: CD19-Rekonstitution auf leukämischen Blasten des Patienten #14. 1*10<sup>6</sup> KM-MNC des Patienten #14 wurden mit CD19-PE (Klon 4G7).....</b>	<b>116</b>
<b>Bild 3-35: Inhibition der Blinatumomab-Aktivität durch residualen 4G7SDIE in Patientenserum.....</b>	<b>117</b>
<b>Bild 3-36: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von FLT3 auf primären pädiatrischen Blasten..</b>	<b>119</b>
<b>Bild 3-37: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CDCP1 auf primären pädiatrischen BCP-ALL Blasten.....</b>	<b>120</b>
<b>Bild 3-38: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von Endoglin auf primären pädiatrischen BCP-ALL Blasten.....</b>	<b>121</b>

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1-1: Zugelassene Antikörper für die immuntherapeutische Behandlung maligner Erkrankungen.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 1-2: Die Familie der humanen Fc-Rezeptoren für IgG-Antikörper.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 1-3: Studien zum Einfluss des FcγRIIIa-Polymorphismus auf das klinische Ansprechen unter Antikörpertherapie.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabelle 2-1: Bispezifische Antikörper .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 2-2: Unkonjugierte Antikörper .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 2-3: Konjugierte Sekundärantikörper.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 2-4: Konjugierte Antikörper .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 2-5: Isotypkontrollen.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 2-6: PBMC-Panel .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 2-7: CD107a/ICS-Panel .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 2-8: CD107a/ICS-Panel-γδ .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 2-9: T-Zellaktivierungspanel.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 2-10: γδ-T Zellpanel .....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 3-1: Expansion humaner γδ-T Zellen .....</b>	<b>90</b>
<b>Tabelle 3-2: FcγRIIIa-Genotypen .....</b>	<b>98</b>
<b>Tabelle 3-3: Patientencharakteristika zu den EuTDA Tests mit MHH-CALL-4..</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BCP-ALL	<i>Pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia</i> , pädiatrische B-Linien akute lymphoblastische Leukämie
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
c-ALL	<i>Common ALL</i>
CAR T Zelle	<i>chimeric-antigen receptor modified T cell</i> , chimärer Antigenrezeptor-modifizierte T Zelle
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i> , Komplement-abhängige Zytotoxizität
CDCC	<i>Complement-dependent cellular cytotoxicity</i> , Komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität
CDCP1	<i>CUB domain-containing protein 1</i>
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CI	<i>Cell Index</i> , Zellindex
CIP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CR	<i>Complete response, complete remission</i> , komplettes Ansprechen, Komplettremission
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	<i>Double-distilled water</i> , demineralisiertes Wasser
DFS	<i>Disease-free survival</i> , krankheitsfreies Überleben

DLBCL	<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> ; diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
dNTPs	Desoxynucleotid-Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
EC <sub>50</sub>	<i>Half-maximal effective concentration</i> , mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EFS	<i>Event-free survival</i> , ereignisfreies Überleben
E:T	<i>Effector to target ratio</i> , Effektor-zu-Zielzellverhältnis
F	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FcγR	IgG Fc-Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FLT3	<i>FMS-related tyrosine kinase 3</i>
FR	<i>Framework region</i>
g	Gramm
*g	Mittlere Erdschwerebeschleunigung
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i> , gute Herstellungspraxis
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
GvL	<i>Graft versus leukemia</i>
h	Stunde
HACA	<i>Human anti-chimeric antibody</i> , anti-chimärer-Antikörper
HAMA	<i>Human anti-mouse antibody</i> , anti-Maus-Antikörper
HLA-I	<i>Human leukocyte antigen class I</i> , humanes Leukozytenantigen Klasse I
IC	<i>Immune complex</i> , Immunkomplex
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i> , intrazelluläre Zytokinfärbung
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
IU	<i>International Unit</i> , Internationale Einheit

---

K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
KM-MNC	Mononukleäre Zellen des Knochenmarks
l	Liter
M	Mol
MAC	<i>Membrane attack complex</i> , Membranangriffskomplex
(m)CRC	<i>(Metastatic) colorectal cancer</i> , kolorektales Karzinom
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
mm	Millimeter
mM	Millimol
µM	Mikromol
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
MRD	<i>Minimal residual disease</i> , minimale Resterkrankung
NA	<i>Neutrophil specific antigen</i>
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptors</i> , natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> , Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
OD	Optische Dichte
ORR	<i>Overall response rate</i> , Gesamtansprechen
OS	<i>Overall survival</i> , Gesamtüberleben
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCD	<i>Programmed-cell death</i> , programmierter Zelltod
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion

---

PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
PSF	<i>Progression-free survival</i> , progressionsfreies Überleben
RFS	<i>Relapse-free survival</i> , rezidivfreies Überleben
RQ-PCR	<i>Real-time quantitative PCR</i> , Echtzeit quantitative PCR
s	Sekunden
sALCL	<i>Systemic anaplastic large cell lymphoma</i> , systemisches anaplastisches großzelliges Lymphom
SAM	S-Adenosylmethionine
SCCHN	<i>Squamous cell carcinoma of the head and neck</i> , Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses
scFv	<i>Single-chain variable fragment</i> , scFv-Fragment
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SFI	Spezifische Fluoreszenzintensität
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SZT	Stammzelltransplantation
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
T <sub>Regs</sub>	Regulatorische T Zellen
U	<i>Unit</i> , Einheit
V	Valin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## Zusammenfassung

Die pädiatrische B-Linien akute lymphoblastische Leukämie („*pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia*“, BCP-ALL) ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Obwohl die Erkrankung heutzutage bei 80 % der Patienten erfolgreich behandelt wird, ist die Prognose für primär refraktäre oder rezidierte BCP-ALLs sehr schlecht. Selbst nach einer erfolgreichen Stammzelltransplantation (SZT) bleibt das Rezidivrisiko beträchtlich und korreliert signifikant mit der minimalen Resterkrankung („*minimal residual disease*“, MRD) vor oder nach SZT. Aufgrund der vorteilhaften Effektor-zu-Zielzellverhältnisse erscheinen MRD-Konstellationen allerdings besonders geeignet für eine immuntherapeutische Intervention mit therapeutischen Antikörpern.

Für den Einsatz in individuellen Heilversuchen wurde ein Fc-optimierter CD19-Antikörper (4G7SDIE) in pharmazeutischer Qualität hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst CD19 als Zielantigen für die BCP-ALL evaluiert und 4G7SDIE präklinisch charakterisiert. CD19 wurde von allen analysierten leukämischen Blasten exprimiert und die Oberflächenexpressionsmodulation durch 4G7SDIE war heterogen aber moderat. Es konnte eine signifikante Korrelation des CD19-Expressionsniveaus mit der 4G7SDIE-vermittelten Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität („*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*“, ADCC) gezeigt werden. Zudem konnte die biologische Aktivität des Fc-optimierten Antikörpers 4G7SDIE bezüglich der Abtötung von leukämischen Blasten sowie die Überlegenheit von 4G7SDIE gegenüber seines chimärisierten Pendant  $\chi$ 4G7 gezeigt werden. Die ADCC war die alleinige Effektorfunktion von 4G7SDIE und sowohl natürliche Killerzellen (NK Zellen) als auch  $\gamma\delta$ -T Zellen wurden als die vermittelnden Effektorzellen identifiziert. Des Weiteren konnte kein Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit 4G7SDIE festgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass 4G7SDIE ein von anderen CD19-Antikörpern nicht unabhängiges Epitope erkennt und die T-Zellaktivierung durch den CD19xCD3 bispezifischen Antikörper Blinatumomab vollständig inhibieren kann.

Im Rahmen von individuellen Heilversuchen wurden 14 MRD-positive BCP-ALL Patienten mit 4G7SDIE behandelt. Anhand von Proben dieser Patienten wurden begleitende Untersuchungen durchgeführt, die zur Vorbereitung einer klinischen Phase I/II Studie mit 4G7SDIE dienen sollten. Zudem wurde die biologische Aktivität von 4G7SDIE bezüglich der Lyse von autologen Blasten behandelter Patienten sowie die Effektorzellaktivität der behandelten Patienten gezeigt. Es wurden die

Serumhalbwertszeiten und Serumspiegel von 4G7SDIE über den Therapieverlauf bestimmt. Zudem wurde gezeigt, dass es zu keiner Bildung von anti-Antikörpern unter 4G7SDIE-Therapie kam, sowie dass gesunde B-Zellen unter der 4G7SDIE-Therapie eliminiert wurden. Das klinische Ansprechen der behandelten Patienten wurde in Bezug auf die generierten *in vitro* Daten betrachtet, wobei, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahlen, keine Zusammenhänge erkennbar waren. Zudem wurde eine Methode etabliert, die CD19-Expression auf leukämischen Blasten behandelter Patienten zuverlässig zu analysieren. Für 2 Patienten wurde gezeigt, dass die CD19-Antigenexpression unter einer 4G7SDIE-Behandlung auf den leukämischen Blasten deutlich moduliert wird. Dies könnte auf einen Tumorevasionsmechanismus hindeuten, welcher im Rahmen einer klinischen Studie näher betrachtet werden sollte. Eine Rekonstitution der CD19-Expression nach 4G7SDIE-Therapieende wurde in 3/3 analysierten Patienten beobachtet. Diese Ergebnisse könnten zur Findung der optimalen Therapiezyklen und verabreichten Dosen von 4G7SDIE beitragen. Des Weiteren wurde eine Methode zur Detektion von residualen Serumspiegeln von 4G7SDIE, welche eine Therapie mit Blinatumomab beeinträchtigen könnten, etabliert und es wurde gezeigt, dass 3 Wochen nach Therapieende noch Serumkonzentrationen von 4G7SDIE vorhanden sein können, die eine T-Zellaktivierung durch Blinatumomab inhibieren. Für eine geplante Folgetherapie nach einer 4G7SDIE-Behandlung mit CD19-Antikörpern wie Blinatumomab sind deshalb Untersuchungen zur Rekonstitution der CD19-Expression sowie zu inhibierenden Serumspiegeln von 4G7SDIE unerlässlich. Abschließend wurden Untersuchungen zur Identifikation weiterer potentieller Zielantigene für die Therapie der pädiatrischen BCP-ALL durchgeführt. Die Antigene FLT3 und Endoglin wurden auf einem großen Anteil der untersuchten BCP-ALL Proben exprimiert, wohingegen CD19 kein geeignetes Zielantigen zu sein scheint.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit vielversprechende anti-leukämische Effekte von 4G7SDIE gezeigt und Vorarbeiten zur Vorbereitung einer geplanten Phase I/II Studie geleistet. Die Ergebnisse und etablierten Methoden können in einer Phase I/II Studie zum Patientenmonitoring, der Patientenstratifizierung sowie der optimalen Wahl der Therapiezyklen und verabreichten Dosen beitragen. Zudem wurden potentielle Limitationen von 4G7SDIE aufgezeigt, die im Rahmen einer Studie genauer betrachtet werden sollten.

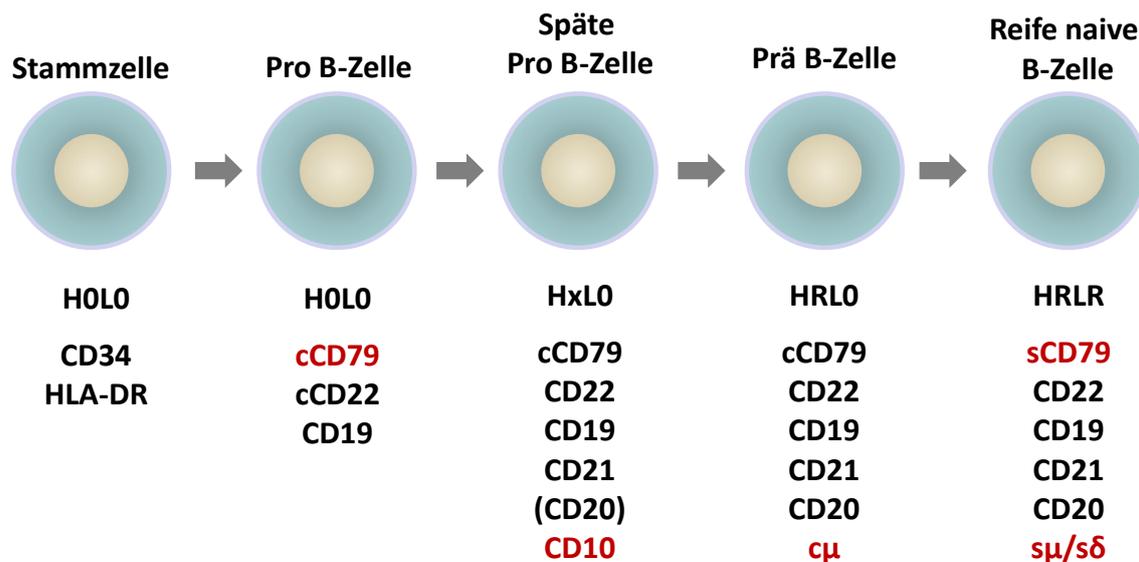
# 1 Einleitung

## 1.1 Die pädiatrische B-Linien akute lymphatische Leukämie (BCP-ALL)

Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) handelt es sich um eine maligne Erkrankung der lymphatischen Reihe des blutbildenden Systems. Die Ursache ist eine neoplastische Transformation einzelner Vorläuferzellen der B- oder T-Zellreihe. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation dieser rasch proliferierenden malignen, unreifen Zellen, den sogenannten leukämischen Blasten, im Knochenmark und dem peripheren Blut. Auch alle anderen lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz, sowie nicht lymphatische Organe wie Leber, Zentralnervensystem (ZNS), Hoden Haut und Knochen können befallen sein. Dadurch wird eine normale Hämatopoese unterdrückt und es kommt zu einer Zytopenie aller Zellreihen (Anämie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie) sowie zur Schädigung der Körperorgane <sup>1</sup>. Bei der pädiatrischen B-Linien akuten lymphatischen Leukämie („*pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia*“, BCP-ALL) handelt es sich um eine ALL aus Vorläuferzellen der B-Zellreihe im Kindesalter. Unbehandelt führt die BCP-ALL innerhalb weniger Monate zum Tod.

### 1.1.1 Inzidenz und Klassifizierung

Leukämien sind mit 38,9 % die häufigste Krebs-assoziierte Todesursache bei Kindern <sup>2</sup>. Unter den pädiatrischen Leukämien macht die BCP-ALL mit über 80 % den größten Anteil aus und stellt zusammen mit der T-ALL mit 25 % die häufigste maligne Erkrankungen im Kindesalter dar <sup>3, 4</sup>. Die BCP-ALL wird durch die Marker CD19<sup>+</sup>, zytoplasmatisches CD79a<sup>+</sup> und zytoplasmatisches oder membrangebundenes CD22<sup>+</sup> charakterisiert <sup>5</sup>. CD34 und CD10 werden abhängig vom Subtyp der BCP-ALL exprimiert (**Bild 1-1**). Die BCP-ALL wird in folgende Subtypen unterteilt: die Pro B-ALL (B-I), charakterisiert durch HLA-DR<sup>+</sup>, TdT<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>-</sup>, zytoplasmatisches  $\mu$  Immunglobulin (Ig)<sup>-</sup>, die common ALL (c-ALL, B-II), welche sich durch das Fehlen von zytoplasmatischen  $\mu$  Ig und der Expression von CD10 auszeichnet, die Prä B-ALL (B-III) mit dem Markerprofil zytoplasmatisches  $\mu$  Ig<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, sowie eine seltene Unterform der Prä B-ALL (B-IV) mit einer Expression von sowohl zytoplasmatischen als auch membrangebundenen  $\mu$  Ig ohne eine funktionelle leichte Kette (**Bild 1-1**) <sup>5</sup>.



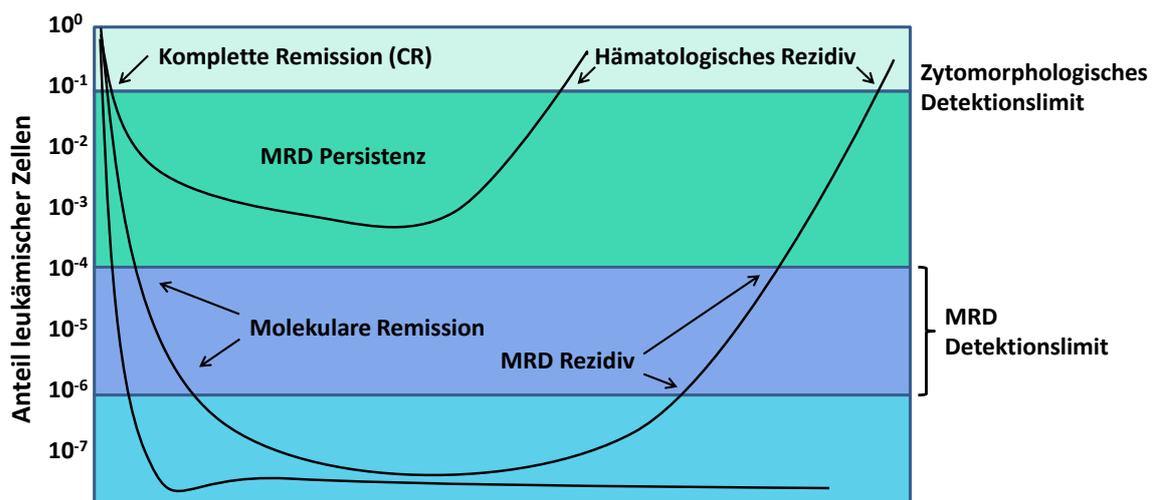
**Bild 1-1: B-Zellentwicklung.** In dem Stadium der Pro B-Zelle wird CD79 und CD22 zytoplasmatisch (cCD79, cCD22) und CD19 auf der Zelloberfläche exprimiert. Erst im nächsten Stadium der späten Pro B-Zelle oder frühen B-Zelle werden die Gensegmente der schweren Immunglobulinkette umgelagert (VDJ<sub>H</sub>, HxL0) und CD10 wird transient exprimiert. CD20 kann in diesem Stadium exprimiert werden. Das Stadium der Prä B-Zelle ist durch das Fehlen einer CD10 Expression aber die Expression einer zytoplasmatischen  $\mu$ -Immunglobulinkette (c $\mu$ ) charakterisiert. Reife naive B Zellen exprimieren IgM/IgD und CD79 auf der Zelloberfläche (s $\mu$ /s $\delta$ , sCD79). H = „heavy chain“, schwere Immunglobulinkette, L = „light chain“, leichte Immunglobulinkette, 0 = nicht umgelagert, x = wird umgelagert, R = „rearranged“, umgelagert, c = „cytoplasmic“, zytoplasmatisch, s = „surface“, Zelloberflächenexpression. Modifiziert nach Béné, 2005 <sup>6</sup>.

Die c-ALL macht mit 75 % den größten Anteil unter den BCP-ALLs aus und hat, aufgrund einer meist günstigen Zytogenetik, die beste Prognose. Die Pro B-ALL ist mit 5 % die seltenste Form der BCP-ALL, wobei der Anteil unter Kleinkindern deutlich höher ist. Die Pro B-ALL ist meist mit einer prognostisch ungünstigen Zytogenetik assoziiert <sup>7</sup>.

### 1.1.2 Diagnostik der BCP-ALL

Bei einem Verdacht einer Leukämieerkrankung wird eine zytomorphologische, durchflusszytometrische oder molekulare Analyse des peripheren Blutes oder Knochenmarks durchgeführt. Im Mikroskop ist ein deutlich erhöhter Anteil unreifer Leukozyten, den leukämischen Blasten, zu erkennen. In einer multiparametrischen durchflusszytometrischen Untersuchung werden typische zelluläre Marker der verschiedenen Leukämieformen analysiert und lassen, anhand des Immunphänotyps, eine Klassifizierung sowohl der verschiedenen Leukämieformen, als auch der Unterformen einzelner Leukämien, wie der Pro-B-ALL, Prä-B-ALL und c-ALL, zu <sup>8</sup>. In einer molekularen Analyse mittels Echtzeit quantitativer PCR („real-time quantitative PCR“, RQ-PCR) werden Translokationsfusionsgene oder patientenindividuelle Immunglobulin (Ig)- oder T-Zellrezeptorgene („T-cell receptor“, TCR) detektiert <sup>9</sup>.

Während der B-Zellentwicklung lagern sich die V-, D- und J-Segmente der Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgene um und es kommt zu Deletionen und Insertionen an den Verbindungsstellen („*junctional sites*“) wodurch einzigartige Gensequenzen für jede Zelle und ihre Vorläufer entstehen. Da die BCP-ALL aus einer einzelnen Vorläuferzelle, die eine neoplastische Transformation durchgemacht hat, entsteht, haben die malignen Zellen in der Regel klonale Antigenrezeptor-Genrearrangements. Dadurch lassen sie sich mittel der RQ-PCR quantitativ von normalen Zellen unterscheiden. Obwohl die Umlagerung der Immunglobulingene in der BCP-ALL dominiert, sind in bis zu 90% aller BCP-ALLs auch Umlagerungen der T-Zellrezeptorgene detektierbar <sup>10</sup>. Die lichtmikroskopische Beurteilung hat eine Sensitivitätsgrenze von 1 % - 5 % leukämischen Blasten <sup>11, 12</sup>. Somit erfordert die Detektion und Quantifizierung der minimalen Resterkrankung („*minimal residual disease*“, MRD), welche durch eine Leukämieast unter 5 % Blasten definiert ist <sup>13</sup>, sensitivere Methoden wie die multiparametrische Durchflusszytometrie <sup>14</sup> und die RQ-PCR <sup>15</sup>. Das Detektionslimit ist abhängig von der Qualität der patientenindividuellen Markern und liegt zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-6}$ . Generell gilt eine MRD  $< 10^{-6}$ , in manchen Fällen auch  $< 10^{-4}$ , als nicht mehr quantifizierbar <sup>12</sup>. Ein komplettes Ansprechen („*complete response*“, CR) ist definiert durch keine lichtmikroskopisch detektierbaren Blasten und somit einer Leukämieast  $< 1\%$ . Von einem hämatologischen Rezidiv wird somit bei einer wiederkehrenden Leukämieast von  $\geq 1\%$  gesprochen, bei einer auf MRD-Negativität folgenden detektierbaren MRD von einem MRD Rezidiv und bei einer MRD Last  $< 10^{-4}$  bis  $< 10^{-6}$  von einer molekularen Remission (**Bild 1-2**).



**Bild 1-2: Definition von Begriffen in der BCP-ALL Diagnostik.** <sup>16</sup>

### 1.1.3 Prognose

Die Behandlung der BCP-ALL ist eine der größten Erfolgsgeschichten der modernen Medizin. Die noch in den 1960er Jahren als nahezu unheilbar geltende Erkrankung, gehört heutzutage mit einem initialen Ansprechen von 95 % und einem Langzeitüberleben von über 80 % zu den Krebsarten mit der besten Prognose<sup>2, 4, 17-19</sup>. Diese deutliche Verbesserung der Prognose ist vor allem einer optimierten Initialtherapie durch neue, neu kombinierte und patientenindividuell dosierten Chemotherapeutika sowie Fortschritten in der Risikostratifizierung, der Stammzelltransplantation (SZT) und Erfahrungen aus multizentrischen Studien zuzuschreiben<sup>17, 20</sup>. Allerdings stellt die BCP-ALL, aufgrund der Häufigkeit der Erkrankung, immer noch einen hohen Anteil an Todesfällen bei Kindern dar. Vor allem primär therapierefraktäre Patienten, d.h. Patienten die auf die initiale Therapie nicht ansprechen, sowie rezidierte Patienten, d.h. Patienten die zwar durch die Initialtherapie, eine morphologische Remission („*complete remission*“, CR) erreichten aber einen Rückfall erlitten, haben mit einem 5-Jahres Überleben von 15 % - 50 % weiterhin eine sehr schlechte Prognose<sup>21-24</sup>. Mit jedem weiteren Rezidiv sinkt die Überlebenschance beträchtlich und für viele dieser Patienten gibt es nach Ausschöpfen der konventionellen Behandlungen inklusive wiederholter SZT keine alternativen Therapien mehr. Zudem kommt es bei vielen Patienten durch intensive Chemotherapie, Bestrahlung und SZT zu akuten und späten Komplikationen<sup>25, 26</sup>. Deshalb ist das Voranschreiten neuartiger Therapien wie der Immuntherapie mit Antikörpern oder zellulären Agenzien, die Therapie mit „*small molecules*“ wie Tyrosin-Kinase Inhibitoren sowie eine präzisierte Risikostratifizierung durch genomische Analysen, eine wichtige Entwicklung welche das Überleben der BCP-ALL Patienten mit ungünstiger Prognose langfristig verbessern kann<sup>20, 27-31</sup>.

### 1.1.4 MRD als stärkster prognostischer Faktor

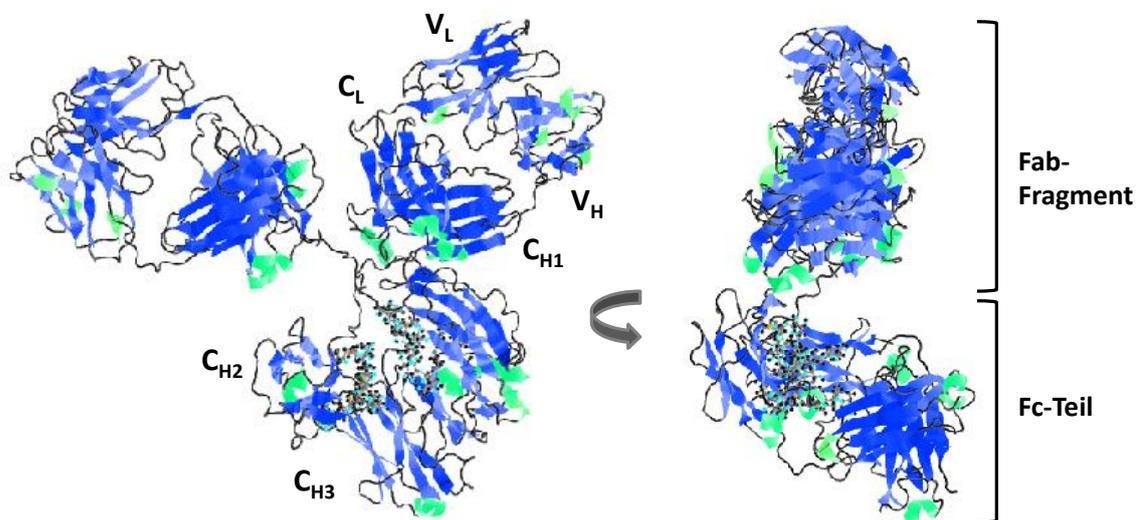
Obwohl 95 % der neu diagnostizierten BCP-ALL Patienten durch Standardtherapien zunächst eine komplette zytomorphologische Remission erreichen, rezidivieren 25 % - 30 % dieser Patienten im weiteren Krankheitsverlauf<sup>13, 32, 33</sup>. Im Falle einer zytomorphologischen Remission können jedoch noch bis zu 5 % leukämische Blasten im Differentialblutbild vorhanden sein, was bis zu  $10^{10}$  Blasten im Körper eines Patienten entspricht<sup>34</sup>. Somit liegt es nahe, dass die deutlich sensitivere Detektion von bis zu  $10^{-6}$  Blasten durch eine MRD-Diagnostik, die Beurteilung der Gesamtleukämiebelastung verbessert, wodurch wiederum eine optimierte Risikostratifizierung und ein verbessertes Überleben erzielt werden könnten. In zahlreichen Studien wurde die prognostische Signifikanz der MRD in der BCP-ALL gezeigt. Es wurde sowohl für Patientenkohorten nach der Induktionstherapie<sup>13, 32, 35-</sup>

<sup>38</sup>, nach einer Reinduktionstherapie <sup>39</sup>, bei rezidivierten Patienten <sup>40, 41</sup>, vor SZT <sup>42-48</sup> und nach SZT <sup>49-52</sup> eine signifikante Korrelation zwischen MRD-Positivität und Rezidivrisiko beschrieben. Mehrere Studien zeigten darüber hinaus, dass die MRD als Risikostratifizierungskriterium anderen Kriterien wie Alter bei Erstdiagnose, Leukozytenzahl, Zytogenetik und Ansprechen auf Prednisone überlegen ist <sup>38, 53-55</sup>. Die klinische Signifikanz der MRD und ihre direkte Korrelation mit dem Rezidivrisiko wird inzwischen in vielen klinischen Studien zur Risikostratifizierung eingesetzt <sup>56</sup>. Der MRD-Status nimmt somit unter Anderem Einfluss auf den Zeitpunkt einer SZT, die Stammzellspenderauswahl, die Konditionierung und Therapiestrategien nach SZT zur Optimierung des Transplantat-gegen-Leukämie („*graft versus leukemia*“, GvL) Effekts haben kann. Eine detektierbare MRD nach SZT ist mit einer besonders ungünstigen Prognose assoziiert und kann deshalb zum Absetzen von Immunsuppressiva, dem zusätzlichen Einsatz von zellulären und molekularen Therapien oder der Einleitung einer weiteren SZT führen <sup>57</sup>. Auch wenn noch nicht direkt gezeigt wurde, dass diese Strategien zur Reduktion der MRD das Überleben signifikant verbessern, deuten mehrere Studien die eine Korrelation zwischen Rezidivrisiko und MRD Level gezeigt haben, darauf hin <sup>58, 59</sup>. In rezidivierten Patienten mit einem MRD Level von  $< 10^{-3}$  an Tag +36 der Rezidivbehandlung wurde ein signifikant besseres Überleben beobachtet als für Patienten mit einem MRD Level  $> 10^{-3}$  <sup>40</sup>. Zudem wurde gezeigt, dass für Patienten mit einem ersten oder zweiten Rezidiv der MRD Level vor einer SZT ein wichtiger prognostischer Faktor für das Überleben nach Transplantation ist <sup>42</sup>. Eine nicht nachweisbare MRD und eine MRD  $< 10^{-4}$  war mit einer signifikant höheren Überlebenschance assoziiert als bei einer MRD  $\geq 10^{-4}$  oder  $> 10^{-3}$  vor SZT. Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation von MRD Level an verschiedenen Zeitpunkten nach SZT (Tag +30, +60, +90 und +180) und dem Rezidivrisiko gezeigt <sup>52</sup>. Eine Strategie zur Reduktion der MRD sowohl vor als auch nach SZT, ist die Immuntherapie mit therapeutischen Antikörpern.

## 1.2 Tumormimmuntherapie mit Antikörpern

### 1.2.1 Struktur von Antikörpern

Die molekulare Struktur von Antikörpern wurde 1969 aufgeklärt <sup>60</sup>. Es wurde die vollständige Aminosäuresequenz eines Antikörpers des Isotyps IgG1 identifiziert und gezeigt, dass dieser aus vier Polypeptidketten besteht, von denen je zwei identisch sind. Die Polypeptidketten werden aufgrund ihres Molekulargewichts als schwere (50 kDa) und leichte Ketten (25 kDa) bezeichnet und sind über intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verknüpft. Die einzelnen schweren und leichten Ketten sind jeweils wiederum aus einzelnen Immunglobulin-Domänen aufgebaut.



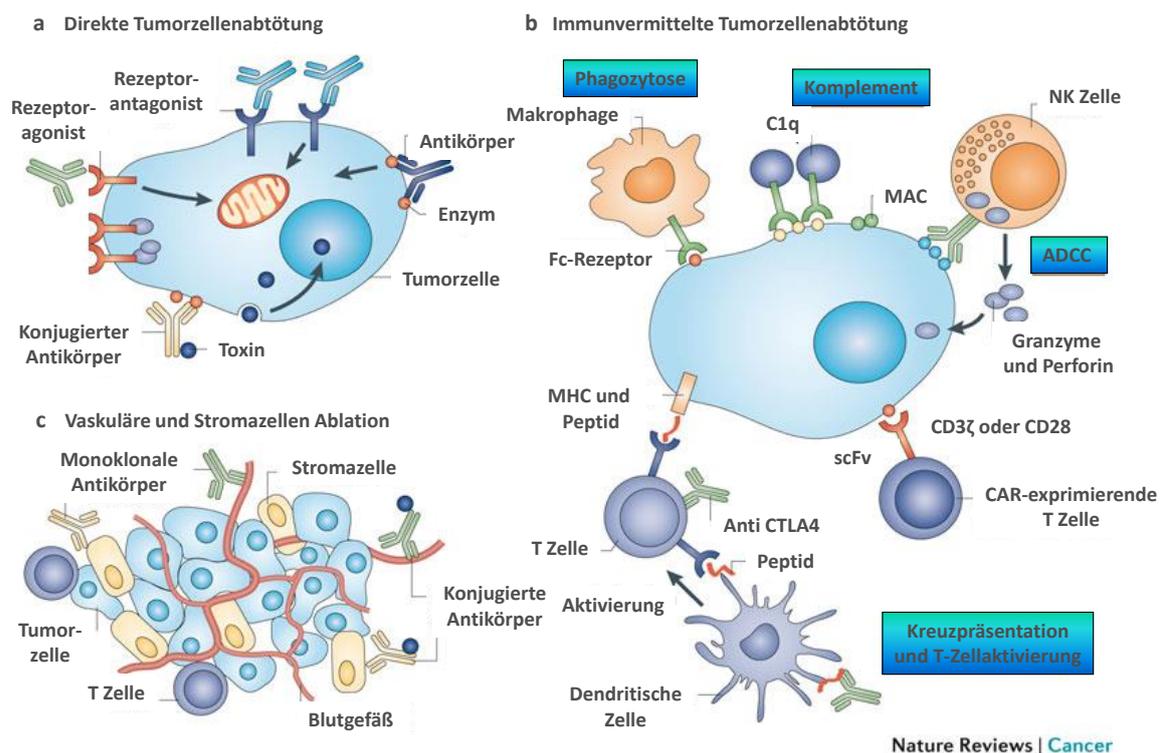
**Bild 1-3: Struktur eines humanen IgG1-Antikörpers.** Die Struktur wurde durch Röntgenstrukturanalyse 1998 von Harris et al. bestimmt (modifiziert nach RCSB PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) PDB ID: 1IGY)<sup>61</sup>.

Jede dieser Domänen ist eine zylinderförmige Struktur, in der mehrere Polypeptidstränge ( $\beta$ -Stränge) antiparallel zu zwei  $\beta$ -Faltblättern gepackt sind, welche durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zusammen gehalten werden. Die leichten Ketten bestehen jeweils aus einer konstanten ( $C_L$ ) sowie einer variablen ( $V_L$ ) Domäne und werden dem Typ kappa ( $\kappa$ ) oder lambda ( $\lambda$ ) zugeordnet. Die schweren Ketten bestehen neben einer variablen ( $V_H$ ) Domäne aus einer vom Isotyp abhängigen Anzahl (drei oder vier) an konstanten ( $C_H$ ) Domänen. Die beiden leichten Ketten manchen mit den  $V_H$ - und  $C_{H1}$ -Domänen das  $F(ab')_2$ -Fragment aus, der Fc-Teil wird von den weiteren  $C_H$ -Domänen gebildet (**Bild 1-3**). Die konstante Region der schweren Kette ist essentiell für die Effektorfunktion eines Antikörpers und wird von verschiedenen Genen kodiert, welche den Isotyps eines Antikörpers definieren. Beim Menschen können 9 verschiedene Isotypen (IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1,

IgA2, IgE) exprimiert werden. Die Sequenz der konstanten Domänen ist innerhalb eines Subtyps stets gleich, die Sequenzen der variablen Domänen variiert hingegen erheblich. Innerhalb der variablen Domänen wird zwischen den vier, für Stabilität sorgenden, relativ konservierten Bereichen („*framework regions*“, FR) und den drei dazwischen liegenden hypervariablen, die Antigenpezifität bestimmenden, Bereichen („*complementary determining regions*“, CDR) unterschieden<sup>62</sup>. Von einem V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Paar wird je eine Antigenbindungsstelle ausgebildet.

### 1.2.2 Effektormechanismen therapeutischer Antikörper

Therapeutische Antikörper können, wie auch natürlich vorkommende Antikörper, verschiedene Wirkungsmechanismen haben. Während allein durch Bindung eines Antikörpers an ein Antigen bereits ein direkter Einfluss auf die Zielzelle ausgeübt werden kann, werden andere Effektormechanismen durch Effektorzellen oder -moleküle, welche über den Fc-Teil des Antikörpers rekrutiert wurden, vermittelt (**Bild 1-4**).



**Bild 1-4: Effektormechanismen therapeutischer Antikörper.** ADCC: „Antibody-dependent cellular cytotoxicity“, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität; MAC: „Membrane attack complex“, Membranangriffskomplex; MHC: „Major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex; scFv: „single-chain variable fragments“, scFv-Fragmente. Modifiziert nach Scott et al.<sup>63</sup>

### 1.2.2.1 Direkte Effektormechanismen

Hierbei beruht die Wirkung eines Antikörpers allein auf der Bindung an ein Antigen. Durch die Bindung des Antikörpers können eine Dimerisierung oder Kinaseaktivierung blockiert werden, zytotoxische Agentien zu Tumorzellen transportiert werden sowie intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden, die die Proliferation oder Zytokinproduktion einer Zelle beeinflussen oder einen programmierten Zelltod („*programmed-cell death*“, PCD) induzieren (**Bild 1-1A**). Ein Beispiel für einen Antikörper welcher zu lebensbedrohlichen Zytokinausschüttungen („*cytokine-release syndrome*“) führte, ist der superagonistische CD28 Antikörper TGN1412 <sup>64</sup>. Der Typ II CD20 Antikörper Obinutuzumab (GA101) ist ein Beispiel für einen Antikörper welcher, neben anderen Effektorfunktionen, durch die bloße Antigenbindung eine Zelltod-auslösende Signalkaskade in einer Ziellzelle induzieren kann <sup>65</sup> (**Tabelle 1-1**). Bei Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) handelt es sich um ein CD33-spezifisches Immunkonjugat welches seine Effektorfunktion durch den Transport das zytotoxische Calicheamicin-Toxin in Zielzellen vermittelt <sup>66</sup> (**Tabelle 1-1**). Weiterhin kann der direkte Effekt eines therapeutischen Antikörpers auf der Blockierung eines Antigens beruhen, wodurch dieses keine Interaktion mit dem korrespondierenden Rezeptor oder Liganden mehr eingehen kann. Beispiele für diese Klasse an therapeutischen Antikörpern sind sogenannte „Checkpoint-Inhibitoren“ wie Ipilimumab, Pembrolizumab und Nivolumab <sup>67</sup> (**Bild 1-4B, Tabelle 1-1**). Während Ipilimumab den inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 (CD152, „*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*“) blockiert, wird durch Pembrolizumab und Nivolumab PD-1 (CD279, „*programmed cell death protein-1*“) auf aktivierten T-Zellen opsonisiert. Durch Blockierung von CTLA-4 wird dessen Konkurrenz mit dem aktivierenden Korezeptor CD28 um eine Bindung an CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen und somit die Inhibition der T-Effektorzelle verhindert <sup>68, 69</sup>. CTLA-4 wird jedoch auch von regulatorischen T Zellen (T<sub>Regs</sub>) exprimiert und es ist noch unklar, ob die Blockade von CTLA-4 eine Verringerung der immunsuppressiven Effektorfunktion von T<sub>Regs</sub> bzw. deren Depletion oder die Blockierung inhibitorischer Signale in T-Effektorzellen der bedeutendere Effektormechanismus von Ipilimumab ist <sup>70, 71</sup>. Im Falle von PD-1 wird die Auslösung eines inhibierenden Signals in der PD-1 exprimierenden T Zelle durch den auf Tumorzellen exprimierten Liganden PD-L1 blockiert <sup>72</sup>. Diese „Checkpoint-Inhibitoren“ haben, insbesondere in Kombination, zu einer deutlich verbesserten Prognose im Melanom geführt <sup>73-78</sup>. Zudem wurden für andere solide Tumore bereits erste vielversprechende klinischen Daten publiziert <sup>79-</sup>

**Tabelle 1-1: Zugelassene Antikörper für die immuntherapeutische Behandlung maligner Erkrankungen** <sup>82-84</sup>(Stand 08.05.2015)

Bezeichnung	Handelsname	Antigen	Format	Indikationen	Effektormechanismen	Zulassungsjahr USA / EU
<b>Dinutuximab (ch14.18)</b>	<i>Unituxin</i>	GD2	Chimärisiertes IgG1	Hochrisiko- Neuroblastom	CDC, ADCC	2015 / ---
<b>Nivolumab</b>	<i>Opdivo</i>	PD-1	Humanes IgG4	Melanom	Inhibition von PD-1 Signalkaskaden	2014 / ---
<b>Blinatumomab</b>	<i>Blinicyto</i>	CD19xCD3	BiTE	Adulte B-Linien ALL	T-Zellrekrutierung	2014 / ---
<b>Pembrolizumab</b>	<i>Keytruda</i>	PD-1	Humanes IgG4	Melanom	Inhibition von PD-1 Signalkaskaden	2014 / ---
<b>Ramucirumab</b>	<i>Cyramza</i>	VEGFR2	Humanes IgG1	Magenkrebs	Inhibition von VEGFR2 Signalkaskaden	2014 / 2014
<b>Obinutuzumab</b>	<i>Gazyva</i>	CD20	Humanisiertes IgG1, glykooptimiert	CLL	ADCC, direkter Zelltod	2013 / 2014
<b>Trastuzumab emtansine</b>	<i>Kadcyla</i>	HER2	Humanisiertes IgG1, Immunkonjugat	Mammakarzinom	ADCC, Inhibition von HER2 Signalkaskaden, Transport eines Maytaninoid-Toxins in Zielzellen	2013 / 2013
<b>Pertuzumab</b>	<i>Perjeta</i>	HER2	Humanisiertes IgG1	Mammakarzinom	ADCC, Inhibition von HER2 Signalkaskaden	2012 / 2013
<b>Brentuximab vedotin</b>	<i>Adcetris</i>	CD30	Chimärisiertes IgG1, Immunkonjugat	Hodgkin Lymphom, sALCL	Transport des Monomethyl Auristatin E (MMAE)-Toxins in Zielzellen	2011 / 2012
<b>Ipilimumab</b>	<i>Yervoy</i>	CTLA-4	Humanes IgG1	Melanom	Inhibition von CTLA-4 Signalkaskaden	2011 / 2011
<b>Ofatumumab</b>	<i>Arzerra</i>	CD20	Humanes IgG1	CLL	CDC, ADCC	2009 / 2010
<b>Catumaxomab</b>	<i>Removab</i>	EpCAMxCD3	Ratte / Maus Fusionskonstrukt	Maligne Aszites	T-Zellrekrutierung, Aktivierung von FcγR <sup>+</sup> Zellen	--- / 2009

Fortsetzung Tabelle 1-1: Zugelassene Antikörper für die immuntherapeutische Behandlung maligner Erkrankungen<sup>82-84</sup> (Stand 08.05.2015)

Bezeichnung	Handelsname	Antigen	Format	Indikationen	Effektormechanismen	Zulassungsjahr USA / EU
<b>Panitumumab</b>	<i>Vectibix</i>	EGFR	Humanes IgG2	Darmkrebs	Inhibition von EGFR Signalkaskaden	2006 / 2007
<b>Bevacizumab</b>	<i>Avastin</i>	VEGF	Humanisiertes IgG1	Darmkrebs, NSCLC, Glioblastom	Inhibition von VEGF Signalkaskaden	2004 / 2005
<b>Cetuximab</b>	<i>Erbix</i>	EGFR	Chimärisiertes IgG1	Darmkrebs, SCCHN	ADCC, Inhibition von EGFR Signalkaskaden	2004 / 2004
<b>Tositumomab- I131</b>	<i>Bexxar</i>	CD20	Murines IgG2a, Immunkonjugat	Follikuläre und transformierte NHL	ADCC, direkter Zelltod, Transport des Radionuklids <sup>131</sup> I in Zielzellen	2003* / ---
<b>Ibritumomab tiuxetan</b>	<i>Zevalin</i>	CD20	Murines IgG1, Immunkonjugat	B-Zell und follikuläre NHL	Transport des Radionuklids <sup>90</sup> Y in Zielzellen	2002 / 2004
<b>Alemtuzumab</b>	<i>Campath-1H</i>	CD52	Humanisiertes IgG1	CLL	CDC, ADCC, direkter Zelltod	2001* / 2001*
<b>Gemtuzumab ozogamicin</b>	<i>Mylotarg</i>	CD33	Humanisiertes IgG4, Immunkonjugat	AML	Transport des Calicheamicin- Toxins in Zielzellen	--- / 2000*
<b>Trastuzumab</b>	<i>Herceptin</i>	HER2	Humanisiertes IgG1	Mammakarzinom, Magenkrebs	ADCC, Inhibition von HER2 Signalkaskaden	1998 / 2000
<b>Rituximab</b>	<i>Rituxan</i>	CD20	Chimärisiertes IgG1	B-Zell und follikuläre NHL, CLL	CDC, ADCC	1997 / 1998

\* nicht mehr im Handel. CDC: „*complement-dependent cytotoxicity*“, Komplement-abhängige Zytotoxizität; ADCC „*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*“, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität; BiTE: „*Bispecific T-cell engager*“; CLL: Chronische lymphatische Leukämie; sALCL: „*systemic anaplastic large cell lymphoma*“, systemisches anaplastisches großzelliges Lymphom; FcRγ: IgG Fc-Rezeptor, NSCLC: „*Non-small cell lung cancer*“, Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom; SCCHN: „*Squamous cell carcinoma of the head and neck*“, Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom, AML: Akute myeloische Leukämie

Tabelle 1-2: Die Familie der humanen Fc-Rezeptoren für IgG-Antikörper<sup>85-87</sup>

Rezeptor		Signal-molekül	Affinität für Ig-Subklassen	Zelltyp	Affinität für Allotypen	Effektormechanismen
<b>FcγRI (CD64)</b>		ITAM	hoch IgG1 = IgG3 > IgG4 > IgG2	Monozyten, Makrophagen, aktivierte Neutrophile, DCs		Phagozytose, Stimulation, Aktivierung respiratorischer Burst, Induziertes Abtöten von Zellen
<b>FcγRII (CD32)</b>	FcγRIIa	ITAM	niedrig IgG1 > IgG3 = IgG2 > IgG4	Myeloische Zellen, DCs, Thrombozyten	R131 < H131 bei IgG2 und IgG3	Phagozytose, Ausschüttung von Granula (Eosinophile)
	FcγRIIb	ITIM	niedrig IgG1 = IgG3 > IgG4 > IgG2	Myeloische Zellen, B Zellen, dendritische Zellen	T187 (unfähig mit Lipid Rafts zu assoziiieren) < I187	Phagozytose, Stimulationsinhibition
	FcγRIIc	ITAM	niedrig	NK Zellen	Nur ein Allotyp führt zur zellulären Expression	Phagozytose, Entfernung von ICs
<b>FcγRIII (CD16)</b>	FcγRIIIa	ITAM	niedrig IgG1 = IgG3	NK Zellen, Monozyten, Makrophagen, γδ-T Zellen	158F < 158V	Induziertes Abtöten von Zellen (ADCC)
	FcγRIIIb	--- (GPI- Anker)	niedrig IgG1 = IgG3	Neutrophile	NA1, NA2	Durch ICs induzierte Sekretion von toxischen Substanzen

ITAM: „Immunoreceptor tyrosine-based activation motif“; ITIM: „Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“; DCs: Dendritische Zellen, ICs: „Immune complexes“, Immunkomplexe, NA: „Neutrophil specific antigen“

### 1.2.2.2 Immunvermittelte Effektormechanismen

Zu den immunvermittelten Effektormechanismen gehören die von dem Fc-Teil eines Antikörpers abhängigen Mechanismen Phagozytose, Komplement-abhängige Zytotoxizität („*complement-dependent cytotoxicity*“, CDC) , Komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität („*complement-dependent cellular cytotoxicity*“, CDCC) und Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität („*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*“, ADCC) (**Bild 1-4B, Tabelle 1-2**). Antikörper-vermittelte Phagozytose wird durch Fc $\gamma$ - und Fc $\alpha$ -Rezeptor tragende phagozytische Zellen, hauptsächlich Neutrophile und Makrophagen, vermittelt (**Tabelle 1-1**). Hierbei werden Antikörper-markierte Zellen von phagozytischen Zellen aufgenommen und verdaut.

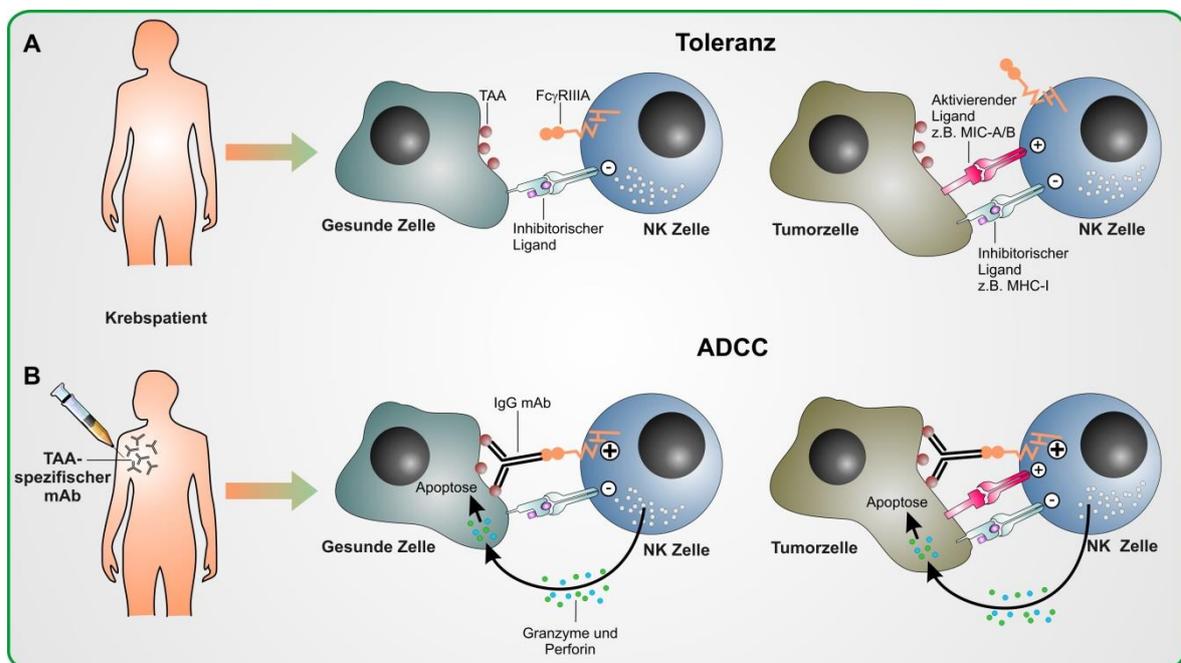
Bei der CDC wird durch die Immobilisierung von IgM- oder IgG-Antikörper auf der Antigen-tragenden Zielzelle eine Konformationsänderung der Antikörper induziert. Dadurch wird die Bindung des Komplementfaktors C1q an ein Motiv in der CH<sub>2</sub>-Domäne ermöglicht und die klassische Komplementkaskade ausgelöst. Die terminalen Komplementkomponenten bilden einen membranangreifenden Komplex („*membrane-attack complex*“, MAC) welcher die Lyse der Zielzelle auslöst <sup>88</sup> (**Bild 1-4**). Zur Auslösung der Komplementkaskade müssen mindestens zwei Fc-Teile an ein C1q-Molekül binden. Da IgM-Antikörper mehrere Bindungsstellen aufweisen, sind diese die effizientesten Induktoren der Komplementkaskade. Andere Isotypen, insbesondere IgG1 und IgG3, können bei ausreichender Antigendichte und geeigneter Antigenverteilung allerdings auch das Komplementsystem aktivieren. Im Verlauf der klassischen Komplementkaskade entstehen zudem chemotaktische, proinflammatorische sowie opsonisierende Spaltprodukte (C4b und C3b), wodurch Immunzellen aktiviert werden können. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um die CDCC.

Eine Sonderstellung nehmen die chimären Antigenrezeptor-modifizierten T Zellen („*chimeric-antigen receptor modified T cells*“ CAR T Zellen) und bispezifische Antikörper ein. Bei CAR T Zellen handelt es sich um genetisch modifizierte T Zellen welche einen membrangebundenen Antikörper-ähnlichen Rezeptor mit intrazellulären und kostimulatorischen Aktivierungsdomänen exprimieren durch dessen Antigenbindung die T Zelle aktiviert wird und zu einer Zielzellyse führt (**Bild 1-4B**). Im Falle von bispezifischen Antikörpern werden die Zielzelle und die Effektorzelle nicht wie bei monoklonalen Antikörpern über die Spezifität des Antikörpers für die Zielzelle und die Bindung des Fc-Teil an einen Fc-Rezeptor auf der Effektorzelle quervernetzt, sondern durch die zwei Spezifitäten des Antikörpers für Antigene auf der Ziel- und der Effektorzelle. Ein Beispiel hierfür ist der kürzlich zugelassene BiTE („*Bispecific T-cell engager*“) Blinatumomab welcher über die

Spezifität für CD19 ALL Zellen der B-Zelllinie und über CD3 T-Effektorzellen rekrutiert (**Tabelle 1-1**).

### 1.2.2.3 ADCC

Die ADCC wird durch den aktivierenden Fc-Rezeptor FcγRIIIa (CD16) vermittelt, welcher von zytotoxischen CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK Zellen sowie von Subpopulationen von γδ-T Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (**Tabelle 1-2**). NK Zellen gelten als Hauptmediatoren der ADCC, da diese nicht den inhibitorischen Rezeptor FcγRIIb koexprimieren <sup>86</sup>. Die Effizienz der FcγRIIIa-Signalkaskade hängt von der Avidität eines Antikörpers ab und wird durch eine multimere oder multivalente Bindung eines Antikörpers an sein kognates Antigen ausgelöst. Diese aktivierende Signale überwiegen gegenüber den inhibitorischen Signalen und die NK Zelle wird aktiviert und schüttet zytotoxische Granula aus (**Bild 1-5**) <sup>89</sup>.



**Bild 1-5: Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) in der Tumormimmuntherapie.** (A) Wenn positive Signale von aktivierenden Rezeptoren nicht den Signalen inhibitorischer Rezeptoren überwiegen, ist eine NK Zelle gesunden als auch malignen Zellen gegenüber tolerant. (B) Durch die Quervernetzung einer NK Zelle und der Tumor-assoziierten Antigen (TAA)-tragenden Zielzelle durch einen Antikörper der IgG Klasse werden aktivierende Signale in der NK Zelle induziert. Diese überwiegen den inhibitorischen Signalen und es werden zytotoxische Granula ausgeschüttet, welche den Tod der Zielzelle auslösen. Je nachdem auf welchem Zelltyp das TAA exprimiert wird können sowohl maligne als auch gesunde Zellen durch die ADCC abgetötet werden. Modifiziert nach Seidel et al. <sup>90</sup>

Durch Kostimulation anderer aktivierender Rezeptoren wie NKG2D, DNAM-1, 2B4 und die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren („natural cytotoxicity receptors“, NCR) NKp46, NKp44 und NKp30, kann die NK Zellaktivierung synergistisch verstärkt werden <sup>91-93</sup>. Die Bedeutung der ADCC für einen anti-Tumoreffekt wurde in mehreren Mausmodellen mit FcγRezeptor-Mutanten oder Fc-attenuierten Antikörpern gezeigt <sup>94-96</sup>. Im Menschen wurde bisher in einer Studie gezeigt, dass Trastuzumab-

behandelte Brustkrebspatienten welche auf die Antikörpertherapie ansprachen, eine gesteigerte Fähigkeit zur ADCC-Vermittlung *in vitro* zeigten <sup>97</sup>. Die Tiermodellstudien legen nahe, dass die ADCC eine bedeutende Rolle in der *in vivo* Aktivität von Antikörpern gegen maligne Erkrankungen spielt. Es wurden erst wenige Studien zum direkten Einfluss der ADCC auf die Tumorreaktivität im Menschen, wie zum Beispiel die Untersuchung eines therapeutischen Antikörpers mit der ADCC als einzigen Effektormechanismus, publiziert <sup>98</sup>. Zudem ist bisher kein Antikörper zugelassen, welcher die ADCC als alleinigen Effektormechanismus besitzt (**Tabelle 1-1**).

#### 1.2.2.3.1 Der Einfluss des FcγRIIIa-Polymorphismus auf die ADCC

Das FcγRIIIa-kodierende Gen FCGR3A trägt einen Einzelnukleotid-Polymorphismus („*single nucleotide polymorphism*“, SNP) an der Nukleotidposition 526 [Thymidin (T) → Guanin (G)], welcher in einem Aminosäureaustausch an Position 158 von Phenylalanin (F) zu Valin (V) resultiert (**Tabelle 1-2**). Es wurde gezeigt, dass humanes IgG1 stärker an den FcγRIIIa-158V Allotyp bindet als an FcγRIIIa-158F <sup>99, 100</sup>. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass die stärkere Bindung an den FcγRIIIa-158V Allotyp auf einer erhöhten Affinität von IgG1 Antikörpern beruht, der Oberflächenexpressionslevel von FcγRIIIa jedoch nicht durch den FcγRIIIa-F158V-Allotyp beeinflusst wird <sup>101, 102</sup>. Zudem wurde der Einfluss des FcγRIIIa-Polymorphismus auf das klinische Ansprechen unter Antikörpertherapie in einigen Studien betrachtet. Es wurden teilweise widersprüchliche Daten publiziert, wobei der FcγRIIIa-Polymorphismus zumindest bei einer Rituximab Monotherapie einen Einfluss auf das klinische Ansprechen zu haben scheint (**Tabelle 1-3**). Da Trastuzumab bei den meisten Indikationen in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt wird, stehen keine Untersuchungen mit Trastuzumab als Monotherapie und dem FcγRIIIa-Polymorphismus zur Verfügung (**Tabelle 1-3**). Dies und der Faktor, dass die Inhibition von HER2 Signalkaskaden einer der Haupteffektormechanismen von Trastuzumab ist, erschweren die Beurteilung des Einflusses des FcγRIIIa-Polymorphismus und der ADCC auf das klinische Ansprechen. Auch im Fall von Cetuximab wurden konträre Studien publiziert, mit Ergebnissen von einem besseren klinischen Ansprechen von FcγRIIIa-V/V Patienten über keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen bis zu einem Überlebensnachteil von FcγRIIIa-V/V Patienten (**Tabelle 1-3**).

**Tabelle 1-3: Studien zum Einfluss des FcγRIIIa-Polymorphismus auf das klinische Ansprechen unter Antikörpertherapie**

Studie	Antikörper	Therapie	Entität	Patienten	Ergebnis
Cartron et al. <sup>103</sup>	<b>Rituximab</b>	Monotherapie	Follikuläres NHL	49	Klinisches und molekulares Ansprechen bei FcγRIIIa-V/V Genotyp signifikant besser
Weng und Levy <sup>104</sup>	<b>Rituximab</b>	Monotherapie	Follikuläres NHL	87	Korrelation zwischen dem klinischen Ansprechen, PFS und FcγRIIIa-V/V Genotyp
Ghielmini et al. <sup>105</sup>	<b>Rituximab</b>	Monotherapie	Follikuläre und Mantelzelllymphome	306	EFS von Patienten mit FcγRIIIa-V/V Genotyp signifikant besser
Prochazka et al. <sup>106</sup>	<b>Rituximab</b>	Risiko-adaptierte Chemotherapie	Follikuläres Lymphom	102	EFS und OS von Patienten mit FcγRIIIa-V Allotyp nicht signifikant besser
Dornan et al. <sup>107</sup>	<b>Rituximab</b>	Chemotherapie	Rezidierte und refraktäre CLL	210	PFS von Patienten mit FcγRIIIa-V Allotyp nicht signifikant besser
Kim et al. <sup>108</sup>	<b>Rituximab</b>	R-CHOP	DLBCL	113	Bei FcγRIIIa-V Allotyp signifikant höhere CR Rate aber kein besseres OS
Carlotti et al. <sup>109</sup>	<b>Rituximab</b>	R-CHOP	Follikuläres Lymphom	94	ORR molekulares Ansprechen und EFS korrelieren nicht mit FcγRIIIa-V Allotyp
Mitrovic et al. <sup>110</sup>	<b>Rituximab</b>	R-CHOP	DLBCL	58	ORR, EFS und OS korrelieren nicht mit FcγRIIIa-V Allotyp
Varoczy et al. <sup>111</sup>	<b>Rituximab</b>	R-CHOP	DLBCL	51	EFS und OS korrelieren nicht mit FcγRIIIa-V/V Genotyp
Liu et al. <sup>112</sup>	<b>Rituximab</b>	R-CHOP	DLBCL	164	ORR und OS korrelieren nicht mit FcγRIIIa-V/F-Polymorphismus
Lin et al. <sup>113</sup>	<b>Alemtuzumab</b>	Monotherapie	CLL	33	Klinisches Ansprechen korreliert nicht mit FcγRIIIa-V/F-Polymorphismus

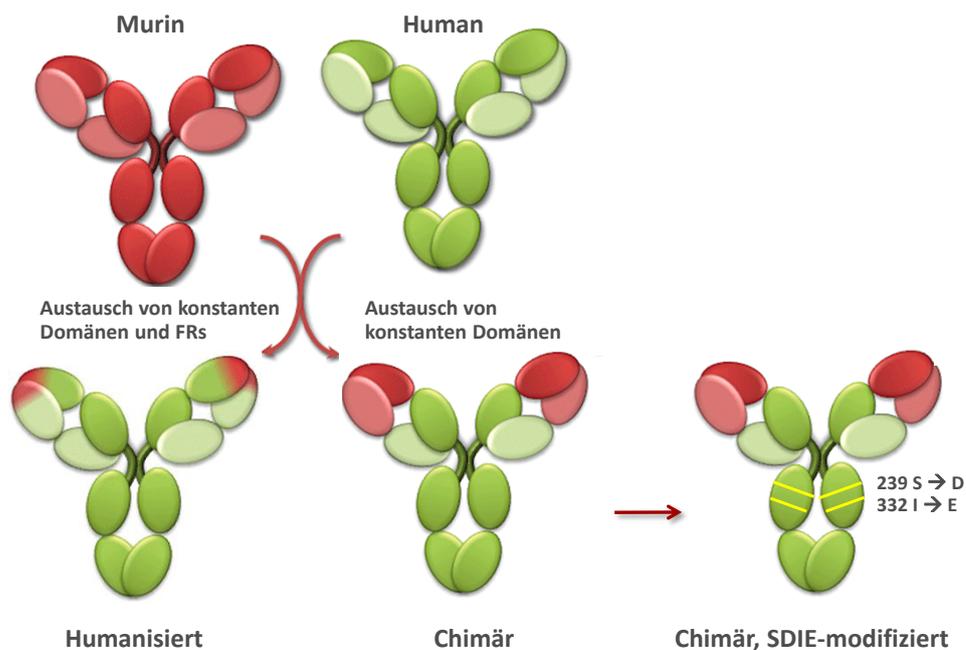
**Fortsetzung Tabelle 1-3: Studien zum Einfluss des FcγRIIIa-Polymorphismus auf das klinische Ansprechen unter Antikörpertherapie**

Studie	Antikörper	Therapie	Entität	Kohorten- größe	Ergebnis
Musolino et al. <sup>97</sup>	<b>Trastuzumab</b>	Chemotherapie	Mammakarzinom	54	Korrelation zwischen dem klinischen Ansprechen, PFS und FcγRIIIa-V/V Genotyp
Tamura et al. <sup>114</sup>	<b>Trastuzumab</b>	Mono- oder Chemotherapie	Mammakarzinom	50	FcγRIIIa-V/V Genotyp korreliert nicht mit dem pathologischen aber leicht mit dem objektiven Ansprechen
Hurvitz et al. <sup>115</sup>	<b>Trastuzumab</b>	Chemotherapie	Mammakarzinom	1189	DFS korreliert nicht mit FcγRIIIa-V/F-Polymorphismus
Norton et al. <sup>116</sup>	<b>Trastuzumab</b>	Chemotherapie	Mammakarzinom	1325	FcγRIIIa-V/V Genotyp korreliert nicht mit besserem DFS
Bibeau et al. <sup>117</sup>	<b>Cetuximab</b>	Chemotherapie	mCRC	69	FcγRIIIa-V/V Genotyp signifikant besseres PFS, unabhängig von KRAS-Mutationsstatus
Zhang et al. <sup>118</sup>	<b>Cetuximab</b>	Monotherapie	mCRC	39	FcγRIIIa-V/V Genotyp signifikant schlechteres PFS
Dahan et al. <sup>119</sup>	<b>Cetuximab</b>	Chemotherapie	CRC	58	FcγRIIIa-V/V Genotyp signifikant schlechteres OS
Park et al. <sup>120</sup>	<b>Cetuximab</b>	Chemotherapie	mCRC	107	Keine Korrelation zwischen dem klinischen Ansprechen und FcγRIIIa-Polymorphismus
Calemma et al. <sup>121</sup>	<b>Cetuximab</b>	Chemotherapie	mCRC	74	FcγRIIIa-V/V Genotyp korreliert mit besserem klinischen Ansprechen und PFS
Kjersem et al. <sup>122</sup>	<b>Cetuximab</b>	Chemotherapie	mCRC	497	Keine Korrelation zwischen PFS oder OS und FcγRIIIa-Polymorphismus

PSF: „*Progression-free survival*“, Progressionsfreies Überleben; EFS: „*Event-free survival*“, Ereignisfreies Überleben; OS: „*Overall survival*“, Gesamtüberleben; DFS: „*Disease-free survival*“, Krankheitsfreies Überleben; ORR: „*Overall response rate*“, Gesamtansprechen; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; CLL: Chronische lymphatische Leukämie; DLBCL: „*Diffuse large B-cell lymphoma*“; Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; (m)CRC: „(metastatic) colorectal cancer“, Kolorektales Karzinom

### 1.2.3 Rekombinante Modifikation von Antikörpern

Durch die von Köhler und Milstein entwickelte Hybridom-Technologie wurde die Produktion muriner monoklonaler Antikörper mit einer definierten Spezifität möglich <sup>123</sup>. Als therapeutische Antikörper eignen sich murine Antikörper aufgrund der Bildung von neutralisierenden anti-Maus-Antikörper („*human anti-mouse antibodies*“, HAMA) nur bedingt. Eine wiederholte Applikation muriner Antikörper kann neben einer geringeren Wirksamkeit zu einem anaphylaktischen Schock führen. Zudem haben murine Antikörper eine geringe biologische Wirksamkeit, da murine Fc-Teile nur schwach mit humanen Fc-Rezeptoren und dem Komplementprotein C1q interagieren. Ein monoklonaler therapeutischer Antikörper wird meist chimärisiert oder humanisiert (**Bild 1-6**). Hierbei werden murine Anteile des Antikörpers unter Erhalt der Spezifität ausgetauscht um die Immunogenität zu verringern und die Vermittlung von immunvermittelten Effektormechanismen zu erhöhen <sup>124, 125</sup>.



**Bild 1-6: Rekombinante Modifikation von Antikörpern.** Bei der Chimärisierung werden die variablen Domänen eines Mausantikörpers (rot) mit konstanten Domänen eines humanen Antikörpers (grün) fusioniert. Bei der Humanisierung werden die murinen konstanten Domänen (rot) und die murinen Framework regions (FRs) der variablen Domänen durch humane Sequenzen (grün) ausgetauscht. Bei SDIE-modifizierten Antikörpern werden zudem in der humanen C<sub>H2</sub>-Domäne die Aminosäuren an Position 239 und 332 (gelb) ausgetauscht <sup>126</sup>. Modifiziert nach Chames et al. <sup>127</sup>

Bei der Chimärisierung werden die konstanten Domänen durch humane Bereiche eines beliebigen Isotyps ersetzt. Werden zusätzlich die *framework regions* 1-4 innerhalb der variablen Domänen durch humane Sequenzen ausgetauscht, handelt es sich um eine Humanisierung des Antikörpers (**Bild 1-6**). Ein humanisierter Antikörper hat eine weiter reduzierte Immunogenität als ein chimärisierter Antikörper, allerdings kann durch die Humansierung die Struktur der Antigen-

Bindestelle beeinflusst werden, wodurch der Antikörper an Affinität verlieren kann<sup>128</sup>. Bei der *phage display*-Technologie wird von Beginn an mit vollhumanen Sequenzen gearbeitet. Hierbei werden aus humanen Antikörper-Bibliotheken stammende variable Domänen auf humane konstante Bereiche kloniert<sup>129</sup>. Eine weitere Methode zur Generierung vollhumaner Antikörper ist die Verwendung von Mäusen, welche transgen für humane Immunglobulinloci sind<sup>130</sup>.

### 1.2.3.1 Optimierung von Antikörpern

Der Großteil der immunvermittelten Effektormechanismen von therapeutischen Antikörpern hängen von dem Fc-Teil des Antikörpers ab. Die Effizienz der Effektorzellaktivierung wird wiederum durch die Stärke der Fc-Teil/Fcγ-Rezeptor-Interaktion bestimmt und hängt von der Anzahl der Interaktionen sowie der Struktur des Antikörpers und des Rezeptors ab. Die klinische Relevanz einer affineren Fc-Teil/Fcγ-Rezeptor-Interaktion wurde in Kapitel 1.2.2.3.1 anhand des FcγRIIIa-Polymorphismus bereits vorgestellt. Zudem konnte durch Mutagenese und veränderte Glykosylierungsmuster auf Seiten des Antikörpers eine direkte Korrelation zwischen der Affinität der Interaktion zwischen Fc-Teil und Fcγ-Rezeptor und der ADCC gezeigt werden<sup>131-134</sup>. Somit wird davon ausgegangen, dass durch eine Optimierung von Antikörpern die ADCC und dadurch die klinische Effizienz eines therapeutischen Antikörpers deutlich verbessert werden kann. Die häufigsten Ansätze die hierzu verfolgt werden sind der Austausch von einzelnen Aminosäuren im Fc-Teil (Fc-Optimierung) und die Modifikation von Glykosylierungsmustern des Fc-Teils (Glykooptimierung). Durch diese Modifikationen kann eine 5- bis 100-fach erhöhte ADCC erreicht werden<sup>126, 134-139</sup>.

Der Ansatz der Fc-Optimierung strebt neben dem primären Ziel, die Affinität für aktivierende Fc-Rezeptoren zu erhöhen, auch die Verringerung der Affinität für inhibitorische Fc-Rezeptoren an. Durch sogenanntes *Fc-Remodelling* können mutierte Antikörper entwickelt werden, die diesen Anforderungen entsprechen. Es wurde für die Antikörper Rituximab und Trastuzumab gezeigt, dass ein Austausch der Aminosäuren an Position 239 [Serin (S) → Aspartat (D)] und Position 332 [Isoleucin (I) → Glutamat (E)] zu einer signifikant erhöhten ADCC *in vitro* führte (**Bild 1-6**)<sup>126</sup>. Zudem wurde in Makaken eine gesteigerte B-Zelldepletion durch SDIE-Mutanten, abgeleitet von Rituximab oder einem CD19-Antikörper, im Vergleich zu ihren chimären Äquivalenten gezeigt<sup>126, 140</sup>. Einige dieser Fc-optimierten Antikörper gegen hämatologische Antigene wie CD19, CD20, CD30, CD40 und CD135 sind zur Zeit in der präklinischen und frühen klinischen Evaluation<sup>98, 141-146</sup>. Alle diese Fc-optimierten Antikörper zeigen eine deutlich gesteigerte ADCC. Eine Fc-Modifikation kann aber auch das Inhibieren einer Effektorfunktion, wie die zum

Teil mit einer hohen Toxizität assoziierten CDC, zum Ziel haben. Der im Neuroblastom eingesetzte GD2 Antikörper hu14.18K322A trägt einen Aminosäureaustausch an Position 322 [Lysin (K) → Alanin (A)] wodurch die Komplementaktivierung des parentalen Antikörpers hu14.18 inaktiviert wurde <sup>126, 147</sup>. Zudem gab es bereits Studien zu Fc-Optimierungen welche die Affinität an den niedrig affineren FcγRIIIa-158F Allotyp verbessern und somit den potentiellen Einfluss des FcγRIIIa-Polymorphismus neutralisieren sollen <sup>148-150</sup>.

Typische Serum IgG1-Antikörper tragen an der Aminosäureposition N297 eine N-Glykosylierung, an deren proximalen N-Acetylglucosaminrest in 95 % der Fälle ein Fucoserest angefügt ist <sup>151</sup>. Eine Abwesenheit des Fucoserests führt zu einer deutlich erhöhten ADCC von IgG1 Antikörpern, da durch die Defucosylierung von N297 eine stärkere Affinität der Fc-Teil/Fcγ-Rezeptor Interaktion erreicht wird <sup>139, 152</sup>. Glykooptimierten Antikörpern fehlt dieser Fucoserest. Die Glykooptimierung wird durch die Produktion der Antikörper in einer N-Acetylglucosamintransferase III (GnTIII)-transfizierten CHO Zelllinie oder einer CHO Zelllinie mit eliminiertes intrinsischer α-1,6-Fucosyltransferase (FUT8) erzielt <sup>136, 153</sup>. Alternativ können glykooptimierte Antikörper auch durch Sf21 Insektenzell-Expressionssysteme generiert werden <sup>154, 155</sup>. Einige dieser glykooptimierten Antikörper gegen Antigene wie CD19, CD20, EGFR, GD2 und CCR4 befinden sich zur Zeit in der präklinischen und klinischen Evaluation <sup>154, 156-160</sup>.

### 1.3 Zielantigene zur immuntherapeutischen Behandlung der BCP-ALL

Die allogene SZT ist die erste angewandte Krebsimmuntherapie <sup>161</sup>. Der immuntherapeutische Erfolg beruht neben der Erradikation der Leukämie durch Chemotherapie und Bestrahlung auf dem GvL-Effekt, wobei die Immunzellen eines Fremdspenders residuale leukämische Blasten des Rezipienten abtöten <sup>162</sup>. Vor allem in hämatologischen Erkrankungen, und insbesondere in der BCP-ALL, ist sie sehr effektiv und bereits Teil der Standardtherapie der refraktären und rezidivierten BCP-ALL (siehe 1.1.3). Zudem wurden neben experimentellen Immuntherapien wie dem adoptiven Zelltransfer und der Peptidvakzinierung bereits einige therapeutische Antikörper in klinischen Studien eingesetzt. „*Checkpoint-Inhibitoren*“ (siehe 1.2.2.1) wurden bisher nur in soliden pädiatrischen Tumoren eingesetzt, so dass sich die Antikörpertherapie der BCP-ALL bisher auf Zielzellantigene beschränkt <sup>163</sup>.

Die CD20 Antikörper Ritximab und Obinutuzumab sind in adulten hämatologischen sowie autoimmunen Erkrankungen äußerst effizient <sup>164-167</sup>. Für pädiatrische Erkrankungen liegen allerdings erst sehr wenige Daten vor <sup>168</sup>. Zudem ist CD20 nur auf 10 % - 50 % der BCP-ALLs heterogen exprimiert <sup>154, 169-171</sup>. Dadurch sind immuntherapeutische CD20 Antikörper nur für einen kleinen Teil der BCP-ALL Patienten geeignet.

CD22 ist ein Antigen welches von über 95 % der BCP-ALLs exprimiert wird <sup>171, 172</sup>. Allerdings zeigte der CD22 Antikörper Epratuzumab in einer Phase I/II Studie in der BCP-ALL keine klinische Aktivität <sup>173</sup>. Da CD22 bei einer Antikörperbindung schnell internalisiert wird, ist dieses Antigen prädestiniert für Immunkonjugate <sup>174</sup>. Zwei CD22 Immunkonjugate wurden bereits in frühen klinischen Studien in der BCP-ALL erprobt <sup>175, 176</sup>.

Der CD52 Antikörper Alemtuzumab war für die Behandlung der CLL bis 2012 zugelassen (**Tabelle 1-1**). In der BCP-ALL wurde in einer Phase II Studie allerdings eine nur geringe klinische Aktivität von Alemtuzumab beobachtet <sup>177</sup>. Zudem wird CD52 von B Zellen aber auch von T Zellen, NK Zellen, Monozyten, Makrophagen, DCs, Neutrophilen und Mastzellen exprimiert. Unter der Therapie mit Alemtuzumab kommt es zu einer starken Immunsuppression, welche mit einem hohen Infektionsrisiko verbunden ist <sup>178, 179</sup>. Weitere Antigene, welche von BCP-ALL Blasten exprimiert werden, sind CD10, CD34 und HLA-DR (siehe 1.1.1, **Bild 1-1**). Aufgrund der Expression dieser Antigene auf Stammzellen beziehungsweise T Zellen, sind dies eher ungeeignete Antigene für die Immuntherapie der BCP-ALL.

### 1.3.1 CD19 als Zielantigen der BCP-ALL

CD19 ist ein transmembranes Zelloberflächenprotein von 95 kDa mit zwei extrazellulären Domänen der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und einem langen intrazytoplasmatischen Teil mit einem aktivierenden Signalmotiv. Das CD19-Molekül ist ein ubiquitärer Marker der B-Zellreihe, spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen und ist Teil des B-Zellrezeptorkomplexes<sup>180-183</sup>. CD19 wird bis zur terminalen B-Zelldifferenzierung in allen Entwicklungsstadien der B-Zellreihe, und dadurch auf allen Subtypen der BCP-ALL, exprimiert (**Bild 1-1**)<sup>184</sup>. Auf reifen B Zellen ist die CD19-Expression allerdings dreimal höher als auf unreifen B Zellen<sup>180</sup>. Zudem wird CD19 außer auf B-Zellen und ihren Vorläufern und follikulären DCs von keinem Zelltyp, auch nicht von hämatopoetischen Stammzellen, exprimiert und bei einer Antikörperbindung in geringerem Ausmaß internalisiert als CD22<sup>174, 185, 186</sup>. Diese vorteilhafte Gewebeverteilung sowie die stabile, homogene und universelle Expression auf BCP-ALL Blasten, machen CD19 zu einem attraktiven Zielantigen der BCP-ALL.

#### 1.3.1.1 CD19-Konstrukte zur Behandlung der BCP-ALL

Obwohl CD19 ein vielversprechendes Zielantigen ist, wurden bisher nur wenige klinische Studien in der BCP-ALL mit CD19-Antikörpern durchgeführt. Zu unkonjugierten, nicht-optimierten CD19-Antikörper liegen bisher keine Studien vor.

Optimierte CD19-Antikörper (siehe 1.2.3.1) wurden bisher *in vitro*, im Mausmodell und in anderen Entitäten als der BCP-ALL charakterisiert. Der glykooptimierte chimärisierter CD19-Antikörper chim4G7 zeigte eine zytotoxische Aktivität gegen BCP-ALL Blasten *in vitro*, wurde aber bisher nicht klinisch eingesetzt<sup>154, 155</sup>. Der glykooptimierte CD19-Antikörper MEDI-551 zeigte *in vitro* und in einem BCP-ALL Mausmodell eine zytolytische Aktivität<sup>187</sup>. Zudem wird die klinische Aktivität von MEDI-551 momentan in mehreren klinischen Studien in adulten Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen der B-Zellreihe evaluiert<sup>188-193</sup>. Weitere glykooptimierte CD19-Antikörper wie GBR401 und MDX-1324, scheinen nach Studien *in vitro*, im Mausmodell und zur B Zellepletion in Makaken sowie einer Studie in der CLL nicht weiter verfolgt zu werden<sup>194-196</sup>. Der Fc-optimierte CD19-Antikörper MOR208 (xmAb5574), zeigte gegen pädiatrische BCP-ALL Blasten eine deutlich erhöhte Aktivität gegenüber der chimärisierten Variante *in vitro*<sup>146</sup>. Eine klinische Aktivität von MOR208 wurde kürzlich in einer Phase I Studie in der CLL gezeigt<sup>98</sup>. Zudem wurde eine Phase II Studie in der adulten refraktären oder rezidierten B-Linien ALL kürzlich abgeschlossen<sup>197</sup>. Weitere Studien werden momentan in adulten Patienten mit verschiedenen Entitäten, zum Teil in Kombination mit Lenalidomid, durchgeführt<sup>198-200</sup>.

In adulten Erkrankungen der B-Zellreihe zeigten CD19-Immunkonjugate (**Bild 1-4**) keine klinische Aktivität<sup>201-207</sup>. Allerdings wurde für das CD19-Immunkonjugat CD19-ETA' eine lytische Aktivität gegen BCP-ALL Blasten *in vitro* gezeigt<sup>208</sup>. Zudem lieferte das CD19-Immunkonjugat SAR3419 vielversprechende Ergebnisse in einem BCP-ALL Mausmodell<sup>209</sup>. Eine klinische Phase II Studie mit SAR3419 wurde in der adulten ALL durchgeführt aber noch nicht publiziert<sup>210</sup>. SGN-CD19A ist ein weiteres CD19-Immunkonjugat und befindet sich momentan in einer Phase I Studie in der pädiatrischen und adulten B-Linien ALL sowie anderen Erkrankungen der B-Zellreihe<sup>211</sup>. Eine Kombination eines CD19-Immunkonjugats mit einem CD22-Immunkonjugat (Combotox) zeigte in einer Phase I Studie in der BCP-ALL ein Ansprechen in 10/17 Kindern. Allerdings war diese Therapie mit einer hohen Toxizität assoziiert<sup>212</sup>. Ein CD19xCD22 bispezifisches Immunkonjugat (DT2219ARL) wurde in einer Phase I Studie in der BCP-ALL evaluiert, die Ergebnisse wurden bisher jedoch nicht publiziert<sup>213,214</sup>.

*In vitro* wurden zudem verschieden CD19xCD16 bispezifische Konstrukte charakterisiert<sup>215, 216</sup>. Diese rekrutieren NK Zellen und andere CD16-positive Effektorzellen über ihre CD16-Spezifität, wurden klinisch jedoch bisher nicht eingesetzt. Zudem wurden mehrere CD19xCD3 bispezifische Konstrukte wie CD19xCD3 DART, AFM11 und, der prominenteste Vertreter, Blinatumomab entwickelt<sup>217-219</sup>.

#### 1.3.1.1.1 Blinatumomab

Der CD19xCD3 bispezifische Antikörper im BiTE-Format, Blinatumomab, rekrutiert durch seine CD3-Spezifität T-Effektorzellen (siehe 1.2.2.2)<sup>219</sup>. Blinatumomab ist ein 55 kDa großes Molekül mit einer geringen Serumhalbwertszeit von etwa 2 h, weshalb die Administration durch kontinuierliche Infusion über mehrere Wochen mithilfe einer Pumpe erfolgt<sup>220,221</sup>. Da Blinatumomab schwerwiegende Nebenwirkungen wie ein lebensbedrohliches Zytokinausschüttungssyndrom („*Cytokine release syndrome*“) und neurologische Toxizitäten haben kann, muss auf eine niedrige und exakte Dosierung geachtet werden<sup>222</sup>. Die klinische Wirksamkeit wurde sowohl für das NHL, sowie die adulte rezidierte und refraktäre B-Linien ALL nachgewiesen<sup>223, 224</sup>. In einer Phase II Studie in der adulten rezidierten und refraktären B-Linien ALL wurde in 32 % (n = 185) der Patienten eine CR erreicht<sup>224</sup>. Zudem wurde in einer Phase II Studie in der MRD-positiven adulten B-Linien ALL ein molekulares Ansprechen, welches als eine MRD-Reduktion auf  $< 10^{-4}$  innerhalb von 4 Behandlungszyklen definiert wurde, von 80 % der Patienten (n = 20) beobachtet<sup>225</sup>. Ein Vergleich mit historischen Kontrollgruppen ergab eine deutliche Verlängerung des rezidivfreien Überlebens („*relapse-free survival*“, RFS)<sup>221</sup>. Aufgrund dieser Daten wurde Blinatumomab von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung

der adulten Philadelphia-Chromosom-negativen rezidierten und refraktären B-Linien ALL kürzlich zugelassen (**Tabelle 1-1**)<sup>226</sup>. In der pädiatrischen B-Linien ALL wurden die ersten klinischen Erfahrungen in Einzelheilversuchen mit 2 MRD-positiven BCP-ALL Patienten an der Kinderklinik Tübingen gesammelt. Beide Patienten hatten keine schwerwiegenden Reaktionen auf die Therapie und sprachen mit einer CR an<sup>227</sup>. Zudem wurden 9 weitere, nach SZT rezidierte, BCP-ALL Patienten im Rahmen von Einzelheilversuchen behandelt<sup>228</sup>. In 4 Patienten wurde eine CR im ersten Behandlungszyklus erreicht, zwei weitere Patienten sprachen nach einer komplementären Chemotherapie mit einer CR an. Vier Patienten wurden einer weiteren SZT unterzogen. Allerdings wurden in 3 Patienten schwerwiegende Nebenwirkungen beobachtet. Aufgrund dieser erfolgsversprechenden Ergebnisse wurde eine Phase I/II Studie in der rezidierten und refraktären BCP-ALL begonnen<sup>229</sup>. Ein Einschlusskriterium dieser Studie ist ein Blastenanteil von mindestens 25 % im Knochenmark. Für Patienten mit einem niedrigeren Blastenanteil besteht die Möglichkeit zur Teilnahme an einem „*expanded access*“ Protokoll mit Blinatumomab an wenigen ausgewählten Zentren<sup>230</sup>. Aufgrund der Dosis-limitierenden Toxizität von Blinatumomab wurde die maximal tolerierbare Dosis („*maximum tolerated dose*“, MTD) auf 5 µg/m<sup>2</sup>/24 h für die erste Behandlungswoche und 15 µg/m<sup>2</sup>/24 h für den weiteren Verlauf der Therapie festgelegt<sup>221</sup>. In adulten B-Linien ALL-Patienten wurden bei dieser geringen Dosierung alle zirkulierenden B Zellen eliminiert und Serumlevel von 0,6 ng/ml erreicht<sup>225</sup>. Von schwerwiegenden Nebenwirkungen wurde bisher in nur einem Patienten, welcher mit dem IL-6-Rezeptor Antikörper Tocilizumab erfolgreich behandelt werden konnte, berichtet<sup>231</sup>. Im Rahmen von Kongresspräsentationen wurde von einem klinische Ansprechen (CR) in 12/39 BCP-ALL Patienten (31 %) berichtet. Ein „*Cytokine release syndrome*“ wurde in 3/39 Patienten (18 %) sowie schwerwiegenden Nebenwirkungen („*Adverse Events* ≥ *Grade 3*“) in bis zu 26 % der Patienten beschrieben<sup>232, 233</sup>.

#### 1.3.1.1.2 CD19-CAR T Zellen

Bei CD19-CAR T Zellen handelt es sich um genetisch modifizierte T Zellen, welche ein membrangebundenes *single-chain variable Fragment* (scFv-Fragment) eines CD19-Antikörpers sowie kostimulatorische Endodomänen (CD28, OX40 oder 4-1BB) und eine intrazelluläre Aktivierungsdomäne (die ζ-Kette des TCR-Komplexes) exprimieren<sup>234</sup>. Durch die Antigenbindung wird die CAR-exprimierende T Zelle aktiviert und lysiert die Zielzelle. Aufgrund der Gefahr einer „*graft versus host disease*“ (GvHD) durch allogene T Zellen, handelt es sich bei den CAR T Zellen zumeist um autologe expandierte T Zellen des Patienten, welche mit dem CAR Konstrukt transduziert wurden<sup>31</sup>. In einigen präklinischen und einer klinische Studie im Neuroblastom mit GD2-CAR T Zellen wurden allogene virusspezifische T Zellen zur Generation der CAR T Zellen eingesetzt<sup>235-237</sup>. Dieser Ansatz soll unter Vermeidung

einer GvHD, eine Anwendbarkeit in einem umfangreicheren Maßstab ermöglichen und durch die *in vivo* Kostimulation der T Zellen durch eine latente Virusinfektion zur Verlängerung der Persistenz der CAR T Zellen beitragen. Einerseits ist die Persistenz der CAR T Zellen erwünscht, auf der anderen Seite führt eine unkontrollierte Persistenz dieser zu einer B Zelldepletion auf unbestimmte Zeit <sup>238</sup>. Zudem besteht durch eine Integration des viralen Vektors theoretisch die Gefahr der Aktivierung von Protoonkogenen und somit der malignen Transformation der transduzierten T Zelle <sup>239-242</sup>. Der Einsatz von sogenannten „*safety switches*“ oder „*suicide genes*“ soll eine kontrollierte Elimination von CAR T Zellen erlauben <sup>243</sup>.

Nachdem CD19-CAR T Zellen in der CLL, Lymphomen und der adulten B-Linien ALL bereits Erfolge zeigten <sup>244-246</sup>, wurde in zwei BCP-ALL Patienten im offenen Rezidiv eine klinische Aktivität der CD19-CAR T Zellen beobachtet <sup>247</sup>. Beide Patienten zeigten zunächst eine CR wobei ein Patient mit CD19-negativen Blasten rezidierte. In beiden Patienten wurde ein „*Cytokine release syndrome*“ beschrieben. In einer Phase I Studie mit rezidierten oder MRD-positiven BCP-ALL erreichten 70 % der Patienten (n = 20) eine CR und 60 % eine molekulare Remission <sup>248</sup>. Drei Patienten erlitten ein „*Cytokine release syndrome*“ und wurden mit Tocilizumab behandelt. Zur Zeit werden zahlreiche Studien mit polyklonalen autologen und allogenen virusspezifischen CD19-CAR T Zellen in der rezidierten BCP-ALL, der MRD-positiven BCP-ALL als auch in einem prophylaktischen Ansatz durchgeführt <sup>249-261</sup>. Zusammenfassend zeigen CD19-CAR T Zellen eine beeindruckende klinische Aktivität in der BCP-ALL, verursachen jedoch häufig ein lebensbedrohliches „*Cytokine release syndrome*“. Durch eine Standardisierung der Therapie und der Reduktion der Leukämiebelastung vor Therapie können diese schwerwiegenden Nebenwirkungen in Zukunft vermutlich reduziert werden <sup>262</sup>.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die präklinische sowie klinische Charakterisierung des Fc-optimierten CD19-Antikörpers 4G7SDIE im Rahmen eines immuntherapeutischen Einsatzes in der BCP-ALL. Aufgrund des immer noch sehr hohen Rezidivrisikos MRD-positiver BCP-ALL Patienten, werden neue Therapieoptionen, wie verschiedene immuntherapeutische Ansätze, zur Verbesserung der Heilungschancen dringend benötigt. Für die BCP-ALL ist neben der SZT keine weitere Immuntherapie, wie zum Beispiel ein geeigneter therapeutischer Antikörper, zugelassen. Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit CD19 als Zielantigen für die BCP-ALL charakterisiert werden. Dazu sollte die CD19-Expression auf BCP-ALL Blasten, die Oberflächenexpressionsmodulation von CD19 durch 4G7SDIE und der Einfluss der CD19-Expressionstärke auf die Zytolyse durch 4G7SDIE analysiert werden. Nachdem die Eignung von CD19 als Zielantigen bestätigt wurde, sollte die biologische Aktivität von 4G7SDIE bezüglich der Abtötung von leukämischen Blasten untersucht werden. Zudem wurden die Effektormechanismen sowie die Effektor-vermittelnden Zellen analysiert. Des Weiteren sollte der Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit 4G7SDIE untersucht werden.

Im Rahmen der klinischen Charakterisierung von 4G7SDIE wurden Untersuchungen, welche zur Vorbereitung einer Phase I/II Studie beitragen sollten, durchgeführt. Zunächst sollte die biologische Aktivität von 4G7SDIE sowie die Effektorzellaktivität der 4G7SDIE-behandelten Patienten untersucht werden. Zudem wurden pharmakokinetische Untersuchungen, welche zur Dosisfindung und Bestimmung der Therapiezyklen beitragen sollten, durchgeführt. Es wurde eine Methode zur Analyse der CD19-Expression unter der Therapie mit 4G7SDIE benötigt und der Einfluss einer vorherigen 4G7SDIE-Behandlung auf eine spätere Blinatumomabtherapie wurde untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation potentieller prognostischer Faktoren, welche das klinische Ansprechen beeinflussen könnten. Zudem sollten weitere potentielle Antigene zur Behandlung der BCP-ALL mithilfe vorhandener therapeutischer Antikörper identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

autoMACS Pro Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Badthermostat	Memmert, Schwabach
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank Heraeus Hera Cell	ThermoScientific,Waltham, USA
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank Heraeus BBD 6220	ThermoScientific,Waltham, USA
Dispenser Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer LSRII	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Elektrophoresekammern B1A und B2	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese Netzteil EPS 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophorese Netzteil PowerPac	BioRad, München
Elektroporator GenePulser II	BioRad, München
FACSJazz	BD, Heidelberg
Fein- und Tischwaagen	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsgerät CN-TFX	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Heizrührer MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette Discovery 20 – 200 µl	Abimed, Langenfeld
NanoDrop 2000	Peqlab, Erlangen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Sterilbank Biowizard	Kojair, Mänttä-Vilppula, Finnland
Thermocycler Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg

Thermocycler PTC-100	BioRad, München
Thermocycler C1000	BioRad, München
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson, St. Louis, USA
UV-Tisch FLX-20 M	Vilber Lourmat, Eberhardzell
VICTOR Multi label reader	Wallac, Tuku, Finnland
Vortex Reagenzglasmischer	neoLab, Heidelberg
xCELLigence RTCA	AceaBiosciences, San Diego, USA
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Glas- und Plastikwaren

Bechergläser, Glas	Schott, Mainz
Bechergläser, Plastik	Vitalab, Großostheim
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser, 24 x 50 mm	R. Langenbrinck, Teningen
E-Plate View 96 PET	AceaBiosciences, San Diego, USA
Einfrierbehältnis Mr. Frosty	Nalgene, Hereford, UK
Einmalpipetten Plastik 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, Kaiserslautern
Einmalspritzen Plastik	B. Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten 4 mm	Peqlab, Erlangen
FACS-Röhrchen 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glasflaschen 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l	Schott, Mainz
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Messzylinder Plastik 250 ml, 500 ml, 1 l	Vitalab, Großostheim
Mikrotiterplatte Costar 96 Kavitäten	Corning, Kaiserslautern
Rundboden	
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Weinheim
Parafilm M	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten, Long size	WU, Mainz
PCR-Softtubes 0.5 ml	Biozym, Oldenburg
Petrischalen 35 mm, 94 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen MBP 10 µl	Sigma, Steinheim
Pipettenspitzen, gestopft 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Oldendorf
Polypropylen-Röhrchen 50 ml („Falcon“)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polystyrol-Röhrchen 15 ml („Falcon“)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark Professional, Roswell, USA
Reagenzreservoir 25 ml, 100 ml	VWR, Radnor, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Rundboden-Röhrchen Falcon 15 ml	BD, Heidelberg
Safety-Multifly-Kanülen, Butterfly, Nr.2 grün	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	Braun, Tuttlingen
S-Monovetten Serum, EDTA K2-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flach-/Rundboden 96-Kavitäten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten Flachboden 6-Kavitäten	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten Flachboden 12-Kavitäten	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturplatten Flachboden 24- und 48-Kavitäten	Corning, Kaiserslautern
Zellsieb Nylon 40 µm, 70 µm, 100 µm	BD, Heidelberg

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose Methamorph	Lonza, Basel, Schweiz
Agarose Tabletten	Bioline, Taunton, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BATDA Reagents	PerkinElmer, Waltham, USA
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD, Heidelberg

β-Mercaptoethanol 14,3 M	Roth, Karlsruhe
Biocoll Separationslösung	Biochrom AG, Berlin
GoTaq Flexi Buffer	Promega, Madison, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA) A-3059, ≥ 98 %	Sigma, Steinheim
DELFI A Europium Lösung	PerkinElmer, Waltham, USA
DELFI A Lysepuffer	PerkinElmer, Waltham, USA
Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs)	Promega, Madison, USA
Destilliertes Wasser, DNase / Rnase frei	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DNA-Ladepuffer Orange G (10x)	MBL International, Woburn, USA
DNA-Standards 1 kb Marker, 100 bp Marker	New England Biolabs, Frankfurt
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma, Steinheim
Ethanol, vergällt (96%)	SAV-Liquid Production, Flintsbach
Ethanol, zur Analyse (100%)	Merck, Darmstadt
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
EDTA-Lösung pH 8.0 0,5 M	PanReac AppliChem, Gatersleben
FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow	BD, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung 37 %	PanReac AppliChem, Gatersleben
GelRed Nucleic Acid Stain 10.000x	Biotium, Hayward, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium 25.000 U/ml	ratiopharm, Ulm
Incidin Plus	ECOLAB Healthcare, Monheim a.R.
Isopropanol	Merck, Darmstadt
IVIg-Präparat Privigen (humane Immunglobuline)	CSL Behring, King of Prussia, USA
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Lysing-Buffer	Uniphotheke, Tübingen
Magnesiumchlorid [1,5 mM]	Promega, Madison, USA
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe

Saponin S-7900, Sapogenin $\geq 10\%$	Sigma, Steinheim
TBE-Puffer (10x)	Uniapotheke, Tübingen
Trizma Base	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4 %	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Tween-20	PanReac AppliChem, Gatersleben

### 2.1.3.1 Zellkulturreagentien und –zusätze

AB Humanserum, hitzeinaktiviert	Life Technologies, Carlsbad, USA
Accutase-Lösung	Sigma, Steinheim
Brefeldin A	Sigma, Steinheim
DNase I (aus Rinderpankreas, 100 mg)	Roche, Mannheim
EMEM	Lonza, Basel, Schweiz
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
G418-BC Sulfate	Biochrom AG, Berlin
GolgiStop (Monensin)	BD, Heidelberg
IMDM mit Hapes und L-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Ionomycin	Sigma, Steinheim
L-Glutamin [200 mM]	Biochrom AG, Berlin
MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	Sigma, Steinheim
Proleukin S IL-2	Novartis, Basel, Schweiz
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Zoledronsäure 4 mg/100 ml (147,01 nM)	Hexal, Holzkirchen

### 2.1.3.2 Stocklösungen für die Zellkultur

$\beta$ -Mercaptoethanol-Stocklösung [100 mM]	in DPBS
Brefeldin A-Stocklösung [5 mg/ml]	in DMSO
DNase I-Stocklösung [10 mg/ml]	in ddH <sub>2</sub> O
G418-Stocklösung [25–50 mg/ml]	in Zellkulturmedium

Ionomycin-Stocklösung [1 mM]	in Ethanol
PMA-Stocklösung [100 µg/ml]	in DMSO
Proleukin S IL-2 [20.000 IU/ml], [1*10 <sup>6</sup> IU/ml]	in ddH <sub>2</sub> O

### 2.1.3.3 Zellkulturmedien

AB-Medium	10 % AB Humanserum 1 % Penicillin/Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 1 % nicht-essentielle Aminosäuren  50 µM β-Mercaptoethanol in 500 ml IMDM Hepes L-Glu
Auftaumedium	3 µg/ml DNase I in Vollmedium
Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
IMDM-10 %-Medium	10 % FCS, hitzeinaktiviert 1 % Penicillin/Streptomycin in IMDM Hepes L-Glu
MCF-7-Medium	10 % FCS, hitzeinaktiviert 1 % Penicillin/Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 1 % L-Glutamin in EMEM
MHH-CALL-4-Medium	20 % FCS, hitzeinaktiviert 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin in RPMI 1640

RPMI 1640-10 %-Medium	10 % FCS, hitzeinaktiviert 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin in RPMI 1640
-----------------------	---

#### 2.1.3.4 Puffer und Medien für die Molekularbiologie

Ampicillin-Stocklösung [100 mg/ml]	Ampicillin in ddH <sub>2</sub> O
DNA-Ladepuffer (6x)	30 % Glycerin 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau in ddH <sub>2</sub> O, pH 7.6
dNTP-Stocklösung [10 mM]	je 10 mM ATP, dCTP, dGTP und dTTP in ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin-Stocklösung [100 mg/ml]	Kanamycin in ddH <sub>2</sub> O
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l ddH <sub>2</sub> O, pH 7
LB-Kan-Platten	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar 5 g NaCl 1 ml Kanamycin-Stocklösung ad 1 l ddH <sub>2</sub> O, pH 7
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA in ddH <sub>2</sub> O, pH 8.5
TBE-Laufpuffer (10x)	Unipothke Tübingen

**2.1.3.5 Enzyme**

Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
Deoxyribonuclease (DNase I)	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme, diverse	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
VentR DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt

**2.1.3.6 Puffer und Reagentien für die Durchflusszytometrie**

AB Humanserum	Lonza, Basel, Schweiz
Cytofix/Cytoperm Fixierungs- und Permeabilisierungslösung	BD, Heidelberg
PBSE-Puffer	2 mM EDTA in 1x DPBS
FACS-Puffer	2 mM EDTA 2 % fötales Kälberserum (FCS) 0,01 % Natriumazid in 1x DPBS
FACS-Fleboy-Puffer	2 mM EDTA 1 % fötales Kälberserum (FCS) 0,01 % Natriumazid 50 µg/ml IVIg-Präparat in 1x DPBS
MACS-Puffer	2mM EDTA 0,5 % BSA
PermWash-Puffer	0,1 % Saponin S-7900 0,5 % BSA 0,02 % Natriumazid in 1x DPBS

Sortierungspuffer	2 mM EDTA 2 % fötales Kälberserum (FCS) in 1x DPBS
-------------------	--

### 2.1.3.7 Gebrauchsfertige Kits

AbC Anti-Mouse Bead Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
ArC Amine Reactive Compensation Bead Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIFIKIT	Dako, Hamburg
TCR $\gamma$ / $\delta$ <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg oder Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen. Sequenzierungen wurden von der Firma Microsynth aus Balgach in der Schweiz durchgeführt.

#### 2.1.4.1 Primer zur Amplifizierung von FCGR3A

FCGR3A-fw alt.mo	5'-cct ggt gtt tac att gag <b>gcc</b> tcc t-3'
FCGR3A-rev long	5'-aca gag ctg caa acc tac cct gc-3'

#### 2.1.4.2 Primer zur Insertion von BamHI- und XbaI-Schnittstellen an CD19-cDNA

CD19-BamHI-for	5'-tag gat ccg ccg cca cca tgc cac ctc ctc gcc tcc tct tcc tcc tct tcc-3'
CD19-XbaI-rev	5'-gtg tct aga tta tca cct ggt gct cca ggt gcc cat gcg gcc ccc tcc tcc cc -3'

#### 2.1.4.3 Sequenzierungsprimer

FCGR3A-rev Blast	5'-aca gag ctg caa acc tac cc-3'
------------------	----------------------------------

CD19-Seq.1	5'-cac cgt ggc aac ctg acc-3'
CD19-Seq.2	5'-cag ctg aga cct tcc agc c-3'
CV001-For	5'-ggc agt gta gtc tga gca gta c-3'
CV001-Rev	5'-ggc aaa caa cag atg gct ggc-3'

### 2.1.5 Plasmide

pOTB7-CD19 (GenBank: BC006338.2)	source Bioscience, Berlin
pGH-1	Ludger Grosse-Hovest, Universität Tübingen

### 2.1.6 Bakterienstämme

E. coli DH5 $\alpha$  von MBI Fermentas, St. Leon-Rot mit dem Genotyp F-( $\Phi$ 80d $\Delta$ (lacZ)M15)recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r-k m+k supE44 relA1 deoR  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169

### 2.1.7 Patienten

Im Rahmen von individuellen Heilversuchen wurden 14 MRD-positive BCP-ALL Patienten mit dem CD19-Antikörper 4G7SDIE behandelt. Die Behandlung der Patienten wurde, nach einem Aufklärungsgespräch und schriftlichen Einverständniserklärung der gesetzlichen Vertreter, begonnen. Jeder individuelle Heilversuch wurde dem Regierungspräsidium Tübingen angezeigt.

### 2.1.8 Primäre Zellen

#### 2.1.8.1 Blutproben gesunder Spender

Blutproben gesunder Spender wurden, nach einem Aufklärungsgespräch und schriftlicher Einverständniserklärung, gewonnen. Teilweise wurden diese freundlicherweise von Frau Prof. Dr. D. Wernet, Klinische Transfusionsmedizin Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Blutentnahmen bei gesunden Spendern, sowie die damit verbundenen Untersuchungen, wurden durch die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen unter der Projektnummer 622/2012B01 am 12. Dezember 2012 genehmigt.

### **2.1.8.2 Blut- und Knochenmarksproben pädiatrischer BCP-ALL Patienten**

Blut- und Knochenmarksproben, zur Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes („*peripheral blood mononuclear cells*“, PBMC), und mononukleärer Zellen des Knochenmarks (KM-MNC) sowie leukämischen Blasten, wurden von BCP-ALL Patienten, nach einem Aufklärungsgespräch und schriftlichen Einverständniserklärung der gesetzlichen Vertreter, im Rahmen von Routineblutentnahmen aus Peripherblut oder aus Restgewebe von Knochenmarkspunktionen gewonnen und durch das KMT-Labor der Kinderklinik Tübingen kryokonserviert. Die Proben, als auch die Daten, wurden bei Aufnahme in die Gewebe-, Blut- oder Datenbank pseudonymisiert. Die zugehörigen Anträge wurden unter den Projektnummern 27/2008BO1, 24/2009BO2 und 622/2012BO1 am 31. März 2008, 03. Februar 2009 bzw. 12. Dezember 2012 genehmigt.

### **2.1.9 Zelllinien**

#### ***DAUDI (DSMZ-Nr.: ACC 78)***

Diese humane Zelllinie entstammt einem pädiatrischen Burkitt Lymphom und wurde von der DSMZ, Braunschweig bezogen. Diese Zelllinie wird in RPMI 1640-10 %-Medium kultiviert.

#### ***MCF-7 (DSMZ-Nr.: ACC 115)***

Diese adhärente, humane Mammakarzinomlinie stammt aus der Zelllinienbank des Instituts für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen. Diese Zelllinie wird in MCF-7-Medium kultiviert.

#### ***MCF-7-CD19tm***

Die verschiedenen MCF-7-CD19tm-Transfektanten wurden im Rahmen dieser Arbeit mit humanem CD19 stabil transfiziert (siehe 2.2.2.9). Diese Transfektanten wurden in MCF-7-Medium, supplementiert mit 1 mg/ml des Selektionsantibiotikums G418, kultiviert.

#### ***MHH-CALL-4 (DSMZ-Nr.: ACC 337)***

Diese humane hämatopoetische Zelllinie entstammt B-Zell-Vorläufern einer pädiatrischen pre B-ALL und wurde von der DSMZ, Braunschweig bezogen. Diese Zelllinie wird in MHH-CALL-4-Medium kultiviert.

#### ***NALM-6 (DSMZ-Nr.: ACC 128)***

Diese humane hämatopoetische Zelllinie entstammt B-Zell-Vorläufern einer ALL und wurde von der DSMZ, Braunschweig bezogen. Diese Zelllinie wird in RPMI 1640-10 %-Medium kultiviert.

***NALM-16 (DSMZ-Nr.: ACC 680)***

Diese humane hämatopoetische Zelllinie wurde aus der Zelllinienbank des Instituts für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen bezogen. Sie entstammt B-Zell-Vorläufern einer pädiatrischen ALL. Diese Zelllinie wird in RPMI 1640-10 %-Medium kultiviert.

***RAJI (DSMZ-Nr. ACC 319)***

Diese humane hämatopoetische Zelllinie entstammt einem pädiatrischen Burkitt Lymphom und wurde aus der Zelllinienbank des Instituts für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen bezogen. Diese Zelllinie wird in RPMI 1640-10 %-Medium kultiviert.

***REH***

Diese humane hämatopoetische Zelllinie entstammt B-Zell-Vorläufern einer pädiatrischen ALL und wurde aus der Zelllinienbank des Instituts für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen bezogen. Diese Zelllinie wird in MHH-CALL-4-Medium kultiviert.

***SEM (DSMZ-Nr.: ACC 546)***

Diese humane hämatopoetische Zelllinie entstammt B-Zell-Vorläufern einer pädiatrischen ALL und wurde von der DSMZ, Braunschweig bezogen. Diese Zelllinie wird in IMDM-10 %-Medium kultiviert.

**2.1.10 Antikörper*****CD19-Antikörper 4G7SDIE und  $\chi$ 4G7***

Das Hybridom des murinen Antikörpers 4G7 wurde 1984 an der University of California, Stanford, USA generiert <sup>263</sup>. Die Klonierung, Chimärisierung sowie die SDIE-Modifikation der Antikörper  $\chi$ 4G7 und 4G7SDIE wurde am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen durchgeführt und durch Hofmann *et al.* beschrieben <sup>145</sup>. Für eine GMP („good manufacturing practice“, GMP)-konforme Produktion von 4G7SDIE wurden die Codon-optimierten Antikörpersequenzen in den Expressionsvektor pGH-1 kloniert und in CHO Zellen serum-frei stabil transfiziert. Der durch die CHO Zellen produzierte 4G7SDIE wurde mithilfe von Einwegmaterialien in einem 100 l-BioWave Reaktor zur Fermentation, einem ÄKTaready System zur Aufreinigung durch Protein A, Ionenaustausch sowie hydrophobe Interaktionschromatographie in Reinräumen der Medizinischen Fakultät Tübingen durch die Firma SYNIMMUNE, Tübingen aufgereinigt und durch die

Apotheke der Kinderklinik Tübingen aliquotiert. Zur Produktion einer weiteren Charge wurde die Firma Celonic in Basel, Schweiz beauftragt.

### ***Bispezifische CD19-CD16- und CD19-CD3-Antikörperkonstrukte N19-C16 und N19-CU***

Die bispezifischen Antikörper N19-C16 (CD19-CD16) und N19-CU (CD19-CD3) wurden in dem sogenannten Fabsc-Format durch die Arbeitsgruppe Jung am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen hergestellt. Diese bispezifischen Formate enthalten den CD19-Antikörper (Klon 4G7) als Fab-Fragment, welches durch eine Fc-attenuierte C<sub>H2</sub>-Domäne mit einem C-terminalen scFv-Fragment, abgeleitet von einem CD16-Antikörper (Klon 3G8) bzw. CD3-Antikörper (Klon UCHT1), verbunden ist <sup>264</sup>. Die Antikörper wurden durch transfizierte Sp2/0-Ag14 Zellen produziert und mithilfe einer Affinitätschromatographie mit  $\kappa$ -select aufgereinigt.

### ***Blinatumomab (BLINCYTO, MT103, AMG103)***

Der CD19xCD3 bispezifische Antikörper im BiTE-Format, Blinatumomab, wurde von Amgen Research GmbH, München zum Einsatz in einer multizentrischen Phase II Studie der Kinderklinik Tübingen zur Verfügung gestellt <sup>229</sup>. Dieses bispezifische Format enthält ein scFv-Fragment, abgeleitet von einem CD19-Antikörper (Klon HD37), welches durch eine Peptidbrücke mit einem CD3-spezifischen scFv-Fragment verbunden ist <sup>219, 265, 266</sup>. In dieser Arbeit wurden Reste von Blinatumomab, welche nicht mehr für die Behandlung von Patienten geeignet sind, verwendet.

### ***Weitere Antikörper***

In **Tabelle 2-2** bis **Tabelle 2-9** sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um murine Antikörper.

**Tabelle 2-1: Bispezifische Antikörper**

Bezeichnung	Spezifitäten	Klone	Format	Bezugsquelle
<b>Blinatumomab</b>	humCD19- humCD3	HD37-TR66	BiTE	AMGEN Research GmbH, München
<b>N19-C16</b>	humCD19- humCD16	4G7-3G8	Fab-scFv	Dr. L. Grosse-Hovest, Universität Tübingen
<b>N19-CU</b>	humCD19- humCD3	4G7-UCHT1	Fab-scFv	Dr. L. Grosse-Hovest, Universität Tübingen
<b>NF-C16</b>	humFLT3- humCD16	4G8-3G8	Fab-scFv	Dr. M. Hofmann, Universität Tübingen
<b>NF-CU</b>	humFLT3- humCD3	4G8-UCHT1	Fab-scFv	Dr. M. Hofmann, Universität Tübingen
<b>NP-C16</b>	humPSMA- humCD16	J591-3G8	Fab-scFv	F. Vogt, Universität Tübingen
<b>NP-CU</b>	humPSMA- humCD3	J591-3G8	Fab-scFv	F. Vogt, Universität Tübingen

**Tabelle 2-2: Unkonjugierte Antikörper**

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Isotyp	Bezugsquelle
<b>4G7</b>	humCD19	Maus	IgG1	BD, #347540
<b>χ4G7</b>	humCD19	chimär Maus/Mensch	IgG1	Dr. L. Grosse-Hovest, Universität Tübingen
<b>4G7SDIE</b>	humCD19	chimär Maus/Mensch Fc-optimiert	IgG1	SYNIMMUNE GmbH, Tübingen
<b>4G8</b>	humFLT3	Maus	IgG1	Dr. M. Hofmann, Universität Tübingen
<b>χ4G8</b>	humFLT3	chimär Maus/Mensch	IgG1	Dr. M. Hofmann, Universität Tübingen
<b>4G8-SDIEM</b>	humFLT3	chimär Maus/Mensch Fc-optimiert	IgG1	Dr. M. Hofmann, Universität Tübingen
<b>8-3H/10</b>	humCDCP1	Maus	IgG2a	F. Vogt, Universität Tübingen
<b>HD37</b>	humCD19	Maus	IgG1	Prof. G. Moldehauer, DKFZ Heidelberg
<b>K-ro22</b>	humEndoglin	Maus	IgG2a	Dr. K. Schwarz, Universität Tübingen
<b>χPSMA</b>	humPSMA	chimär Maus/Mensch	IgG1	F. Vogt, Universität Tübingen
<b>PSMA-SDIEM</b>	humPSMA	chimär Maus/Mensch Fc-optimiert	IgG1	F. Vogt, Universität Tübingen
<b>W6/32</b>	HLA-Klasse I	Maus	IgG2a	Prof. S. Stevanović, Universität Tübingen

Tabelle 2-3: Konjugierte Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Markierung	Bezugsquelle
Polyklonales F(ab') <sub>2</sub> α-Human-IgG	humanes IgG (Fc)	Ziege	R-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg (109-116-098)
Polyklonales F(ab') <sub>2</sub> α-Maus-IgG	murines IgG (F(ab') <sub>2</sub> )	Ziege	R-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg (115-116-072)

Tabelle 2-4: Konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
CD3-APC	SK7	IgG1	1:25	BD, #345767
CD4-PerCp	SK3	IgG1	1:25	BD, #345770
CD10-PerCp	MEM-78	IgG1	1:10	Exbio, #PC-209-T100
CD14-PerCp	TÜK4	IgG2a	1:10	Miltenyi, #130-094-969
CD19-FITC	LT19	IgG1	1:11	Miltenyi, #130-091-328
CD19-PE	4G7	IgG1	1:5	BD, #345776
CD19-PE	HIB19	IgG1	1:5	BD, #555413
CD19-PE	J3-119	IgG1	1:5	Beckman Coulter, #IM2665
CD19-APC	SJ25C1	IgG1	1:5	BD, #345791
CD33-PE/Cy7	WM-53	IgG1	1:25	eBioscience, #25-0338-42
CD34-APC	581	IgG1	1:100	Biologend, #343510
CD45-APC/Cy7	HI30	IgG1	1:20	Biologend, #304014
CD117-BV421	104D2	IgG1	1:25	Biologend, #313216
HLA-B8-FITC	Unbekannt	IgG2b	1:5	OneLambda, #FH0536A
HLA-DR-PB	Mem-12	IgG1	1:25	Exbio, #PB-474-T100

Tabelle 2-5: Isotypkontrollen

Bezeichnung	Klon	Markierung	Bezugsquelle
IgG1	MOPC-21	---	BD, #555746
IgG1-FITC	MOPC-21	Fluoresceinisothiocyanat	Biologend, #400107
IgG1-PE	MOPC-21	R-Phycoerythrin	Biologend, #400111
IgG1-PerCp	MOPC-21	Peridininchlorophyll	Biologend, #400148
IgG1-PE/Cy7	MOPC-21	R-Phycoerythrin/Cyanin 7	Biologend, #400126
IgG1-APC	MOPC-21	Allophycocyanin	Biologend, #400119
IgG1-APC/Cy7	MOPC-21	Allophycocyanin/Cyanin 7	Biologend, #400128
IgG1-AF700	MOPC-21	Alexa Fluor 700	Biologend, #400144
IgG1-PB	MOPC-21	Pacific Blue	Biologend, #400131
IgG1-BV421	MOPC-21	Brilliant Violet 421	Biologend, #400157
IgG1-BV711	MOPC-21	Brilliant Violet 711	Biologend, #400167
IgG2a	G155-178	---	Prof. S. Stevanović, Universität Tübingen
IgG2a-PerCp	MOPC-173	Peridininchlorophyll	Biologend, #400250
IgG2b-FITC	MCP-11	Fluoresceinisothiocyanat	Biologend, #400309
IgG2b-PE	MCP-11	R-Phycoerythrin	Biologend, #400311

Tabelle 2-6: PBMC-Panel

Bezeichnung	Klon	Färbung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
LIVE/DEAD-Aqua	---	Lebend-Tot	---	1:400	Life Technologies, #L34957
TCR $\gamma\delta$ -FITC	11F2	extrazellulär	IgG1	1:5	BD, #347903
CD3-PerCp	SK7	extrazellulär	IgG1	1:40	Biolegend, #344814
CD56-PE/Cy7	HCD56	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #318318
CD16-AF700	3G8	Extrazellulär	IgG1	1:80	Exbio, #A7-646-T100

Tabelle 2-7: CD107a/ICS-Panel

Bezeichnung	Klon	Färbung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
LIVE/DEAD-Yellow	---	Lebend-Tot	---	1:400	Life Technologies, #L34959
CD107a-APC	H4A3	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #328620
TCR $\gamma\delta$ -FITC	11F2	extrazellulär	IgG1	1:5	BD, #347903
CD3-PerCp	SK7	extrazellulär	IgG1	1:40	Biolegend, #344814
CD56-PE	HCD56	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #318306
TNF $\alpha$ -PB	MAb11	intrazellulär	IgG1	1:200	Biolegend, #502920
IFN $\gamma$ -BV711	4S.B3	intrazellulär	IgG1	1:100	Biolegend, #502539

Tabelle 2-8: CD107a/ICS-Panel- $\gamma\delta$ 

Bezeichnung	Klon	Färbung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
LIVE/DEAD-Aqua	---	Lebend-Tot	---	1:400	Life Technologies, #L34957
CD107a-APC	H4A3	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #328620
CD45-APC/Cy7	HI30	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #304014
TCR $\gamma\delta$ -FITC	11F2	extrazellulär	IgG1	1:5	BD, #347903
CD3-PerCp	SK7	extrazellulär	IgG1	1:40	Biolegend, #344814
CD56-PE/Cy7	HCD56	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #318318
TNF $\alpha$ -PB	MAb11	intrazellulär	IgG1	1:200	Biolegend, #502920
IFN $\gamma$ -BV711	4S.B3	intrazellulär	IgG1	1:100	Biolegend, #502539

**Tabelle 2-9: T-Zellaktivierungspanel**

Bezeichnung	Klon	Färbung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
LIVE/DEAD-Yellow	---	Lebend-Tot	---	1:400	Life Technologies, #L34959
CD56-PE	NCAM16.2	extrazellulär	IgG2b	1:5	BD, #345812
CD3-PE/Cy7	HIT3a	extrazellulär	IgG1	1:200	Biolegend, #300316
CD4-APC/Cy7	RPA-T4	extrazellulär	IgG1	1:100	Biolegend, #345768
CD8-PB	SK1	extrazellulär	IgG1	1:100	Biolegend, #344718
CD69-APC	L78	extrazellulär	IgG1	1:40	BD, #340560

**Tabelle 2-10:  $\gamma\delta$ -T Zellpanel**

Bezeichnung	Klon	Färbung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
LIVE/DEAD-Aqua	---	Lebend-Tot	---	1:400	Life Technologies, #L34957
TCR $\gamma\delta$ -FITC	11F2	extrazellulär	IgG1	1:5	BD, #347903
CD19-PE	4G7	extrazellulär	IgG1	1:5	BD, #345776
CD3-PerCp	SK7	extrazellulär	IgG1	1:40	Biolegend, #344814
CD16-AF700	3G8	extrazellulär	IgG1	1:80	Exbio, #A7-646-T100
CD8-APC/Cy7	SK1	extrazellulär	IgG1	1:100	Biolegend, #344714
CD4-BV421	RPA-T4	extrazellulär	IgG1	1:20	Biolegend, #300532

### 2.1.11 Verwendete Software

Adobe Acrobat Reader 9.0	Adobe Systems, San José, USA
BD FACSDiva 6.13	BD, Heidelberg
CellQuest	BD, Heidelberg
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, USA
FlowJo V10	Tree Star, Ashland, USA
GATCViewer	GATC Biotech, Konstanz
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
MS Office 2003 und 2010	Microsoft, Redmond, USA
RTCA Software 1.2.1	AceaBiosciences, San Diego, USA

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Prokaryoten

#### 2.2.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Es wurden 70 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit einem Ligationsansatz (2.3.2) resuspendiert und in einem 15 ml Falcon 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock von 1 min bei 42 °C durchgeführt, wodurch die Bakterien die zugefügte DNA aufnehmen. Nach kurzem Abkühlen der Bakterien auf Eis wurde ca. 300 µl LB-Medium zugegeben und es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm. Verschiedene Volumina dieser Vorkultur (z.B. 60 µl, 120 µl und 180 µl) wurden auf mehreren LB-Kan-Platten mit Hilfe eines sterilen Drigalskispatels ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

#### 2.2.1.2 Anlegen von *E. coli* Kulturen

Es wurden einzelne Klone von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf einer neuen Selektionsplatte (Masterplatte) ausgestrichen. Danach wurde mit derselben Spitze ein Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, hier 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin) angeimpft. Sollte die Kultur für eine anschließende Mini-Plasmid-Präparation verwendet werden, wurde sie für ca. 16 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Um größere Ausbeuten an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde die Kultur zunächst 8 h lang unter obigen Bedingungen angezogen. Von dieser Vorkultur wurde ein 200 µl Aliquot benutzt um ein größeres Volumen LB-Medium mit Selektionsantibiotikum anzuimpfen. Für eine folgende Midi-Plasmid-Präparation wurden 100 ml bzw. für eine Maxi-Plasmid-Präparation 200 ml, in einem 500 ml-Schikanekolben eingesetzt. Diese Kultur wurde für ca. 16 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 250 rpm angezogen.

#### 2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (Kultivierung siehe 2.2.1.2) erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit bzw. Plasmid Midi/Maxi Kit von QIAGEN, deren Grundlage die alkalische Lyse ist <sup>267</sup>. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

## 2.2.2 Eukaryoten

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank kultiviert.

### 2.2.2.1 Passagieren von Zelllinien

Handelte es sich um Suspensionszellen, konnte einfach ein der Zelldichte entsprechendes Volumen an Zellsuspension abgenommen werden und durch frisches Vollmedium ersetzt werden. Leicht adhärente Zellen wurden zuvor mit Hilfe von Scherkräften, das heißt durch seitliches Abklopfen des Kulturgefäßes, vom Flaschenboden gelöst. Im Falle von adhärennten Zellen war das Ablösen vom Boden des Kulturgefäßes durch Trypsin/EDTA-Lösung oder Accutase nötig. Das Kulturmedium wurde vollständig abgenommen und der Zellrasen mehrmals mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung oder Accutase bedeckt und für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich zu der enzymatischen Ablösung durch Trypsin/EDTA oder Accutase kann durch seitliches Abklopfen die Ablösung der Zellen vom Gefäßboden unterstützt werden. Die Aktivität des Trypsin/EDTA bzw. der Accutase wurde durch Zugabe vom 4-fachen Volumen Vollmedium gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt und der Resuspension der Zellen in Vollmedium konnte wie mit Suspensionszellen verfahren werden.

### 2.2.2.2 Isolierung von PBMC, KM-MNC und leukämischen Blasten

Mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMC, KM-MNC sowie leukämische Blasten aus antikoagulierten Peripherblutproben, Knochenmarkpunktaten oder Nebenprodukten aus Thrombozytapheresen isoliert. Hierzu wurde die hohe Dichte von 1,077 g/ml der verwendeten Biocoll Separationslösung bestehend aus einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, genutzt. Die Separationslösung wurde mit der, mindestens 1:2 mit DPBS verdünnte, Probe überschichtet und bei 800 \*g für 30 min ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Dabei reichern sich die PBMC, KM-MNC und leukämische Blasten entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Überstand, bestehend aus Plasma und Thrombozyten, und der Separationslösung an. Erythrozyten und Granulozyten befinden sich aufgrund ihrer höheren Dichte im Zellpellet. Die PBMC-Schicht wurde abgenommen und mit 50 ml DPBS gewaschen und bei 500 \*g für 10 min zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten und Zentrifugationen bei 400 \*g bzw. 300 \*g für 10 min, wurden die isolierten Zellen im entsprechenden Vollmedium aufgenommen.

### **2.2.2.3 Isolierung humaner genomischer DNA**

Genomische DNA wurde aus Vollblut oder PBMC unter Verwendung des QIAamp DNA Blood Mini Kits von QIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. Das System basiert auf Säulchen mit Silicamembranen, die DNA nach Aufschluss der Zellmembran unter Hochsalzbedingungen binden. Nach Waschschritten wurde die DNA mit einem Niedrigsalzpuffer oder ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die DNA Proben wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.2.2.4 Gewinnung von Serumproben**

Humanes Vollblut wurde in S-Monovetten für Serum abgenommen und aufrecht für mindestens 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Durch ein mit dem Gerinnungsaktivator Kaolin beschichtetes Kunststoffgranulat wird die Gerinnung beschleunigt. Das Fibrinogen wird durch die Gerinnung verbraucht und befindet sich in dem Blutgerinnsel. Durch Zentrifugation bei 2000 \*g für 10 min wurde das Blutgerinnsel pelletiert wobei durch das Kunststoffgranulat die Diffusion von Stoffen aus dem Blutgerinnsel in die Serumphase verhindert wird. Anschließend wurde das Serum abgenommen und in Kryoröhrchen bei -20 °C eingefroren.

### **2.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität**

Zur Bestimmung der Konzentration lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde eine Trypanblaufärbung eingesetzt. Trypanblau färbt tote Zellen an, deren Membranintegrität zerstört ist, indem es in sie eindringt. Lebende Zellen bleiben hingegen ungefärbt und können mithilfe eines Lichtmikroskops gezählt werden. Zum Auszählen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Glasplatte mit einer Tiefe von 0,1 mm in die neun Quadrate definierter Größe eingätzt sind und jeweils ein Volumen von 0,1 µl fassen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:2 mit einer 0,1 % Trypanblaulösung versetzt und die Lebendzellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die lebenden Zellen in zwei oder vier Großquadranten der Neubauer-Kammer gezählt, der Mittelwert daraus bestimmt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Kammerfaktors von 10<sup>4</sup> die Zellzahl/ml Zellsuspension bestimmt. Erythrozyten können lichtmikroskopisch nicht von PBMC und KM-MNC unterschieden werden. Mithilfe einer 1:10-Präinkubation der Zellsuspension mit Lysis-Buffer können kontaminierende Erythrozyten lysiert werden.

### **2.2.2.6 Subklonierung von Zelllinien**

Um reine Einzelklone zu erhalten wurde die Zellsuspension auf eine theoretische Zelldichte von 0,3 Zellen pro Kavität verdünnt und in eine 96-Kavitäten Flachbodenplatte ausgesät. Nach einigen Tagen wurden lichtmikroskopisch

Einzelklone identifiziert. Diese wurden über 24-, 12- und 6-Kavitäten Platten auf Kulturflaschen expandiert.

#### **2.2.2.7 Kryokonservierung von Zellen**

Die Zellen wurden geerntet und  $2 \cdot 10^6$  -  $1 \cdot 10^7$  Zellen in 1 ml oder bis zu  $1 \cdot 10^8$  Zellen in 2 ml  $4^\circ\text{C}$  kaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in einem Einfrierbehältnis Mr. Frosty bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Durch Isopropanol in der Einfrierbox, welches ein definiertes Abkühlen von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  bewirkt, sowie das DMSO im Einfriermedium wird die Entstehung von Eiskristallen vermieden. Kurzfristig können die kryokonservierten Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden. Für die längerfristige Aufbewahrung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.2.8 Auftauen kryokonservierter Zellen**

Die Kryoröhrchen wurden kurz im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad angetaut. Sobald nur noch ein kleiner Teil gefroren war, wurden die kryokonservierten Zellen vorsichtig mit warmem Auftaumedium in einem Gesamtvolumen von 10 ml resuspendiert. Durch Abzentrifugieren der Zellen (10 min,  $300 \cdot g$ ) und anschließender Aufnahme in Vollmedium wurde das zytotoxische DMSO aus der Suspension entfernt und die Zellen konnten in Kulturgefäße ausgesät werden.

#### **2.2.2.9 Stabile Transfektion mittels Elektroporation**

Es wurden pro Transfektion  $1 \cdot 10^7$  Zellen der Mammakarzinomlinie MCF-7, welche 48 h vor der Transfektion passagiert wurden, eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und, um die Elektrolytkonzentration zu verringern, dreimal mit 50 ml kaltem, serumfreien IMDM-Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde in maximal  $250 \mu\text{l}$  serumfreien IMDM aufgenommen und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (mit einer  $25 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$  Spalte) überführt. Die zu transfizierenden linearisierten und gefällten DNA-Konstrukte wurden der Zellsuspension zugegeben und unter mehrmaligem Schütteln 5 – 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte unter einer Spannung von 200 V und  $975 \mu\text{F}$ , wobei die Zeitkonstante zwischen 40 und 80 liegen sollte. Nach erfolgtem Puls wurde die Küvette geschüttelt und die gesamte Zellsuspension in eine 1:2 Verdünnungsreihe mit acht Verdünnungsschritten eingesetzt, wobei warmes IMDM-Vollmedium verwendet wurde. Es wurden je  $50 \mu\text{l}$  pro Kavität in acht 96-Kavitätenplatten ausgesät. Zur Selektion wurde 24 h nach der Transfektion das Selektionsantibiotikum G418 in  $50 \mu\text{l}$  Vollmedium pro Kavität und einer finalen Konzentration von  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben.

Nach 10–14 Tagen konnten Kavitäten mit viablen, sich teilenden Zellen unter dem Mikroskop identifiziert werden. Einzelklone wurden über 48-, 24-, 12- und 6-Kavitätenplatten auf Kulturflaschen expandiert und die G418-Konzentration wurde auf 1 mg/ml erhöht.

Die Antigen-Expression wurde bestimmt, indem > 40 Klone bis auf 48- bzw. 12-Kavitätenplatten expandiert und mittels Durchflusszytometrie (2.4.1 und 2.4.1.2) auf die CD19-Expression auf den MCF-7-Transfektanten getestet wurden. War die Antigenexpression einer MCF-7-Transfektante nicht homogen, erfolgte eine Sortierung auf die angestrebte Antigendichte mittels Durchflusszytometrie (2.5.2).

#### **2.2.2.10 Expansion von $\gamma\delta$ -T Zellen**

Es wurden  $1,5 \cdot 10^6$  PBMC pro Kavität in 450  $\mu$ l in 24-Kavitätenplatten in AB-Medium, supplementiert mit 400 nM Zoledronsäure und 100 IU/ml Proleukin S IL-2, ausgesät. Alle 2 – 3 Tagen wurde den Zellen 300  $\mu$ l AB-Medium mit 400 nM Zoledronsäure und 100 IU/ml Proleukin S IL-2 zugegeben. Nach 12 – 14 Tagen wurden die expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen gerntet und mithilfe einer positiven MACS-Separation (2.5.1) aufgereinigt. Nach einer Reinheitskontrolle mittels FACS-Analyse (2.4.1) wurden die aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T Zellen bei  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in AB-Medium, supplementiert mit 400 IU/ml Proleukin S IL-2, in 6-Kavitätenplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach der Übernachtskubation hatten die isolierten  $\gamma\delta$ -T Zellen die FITC-Markierung durch die positive MACS-Separation verloren und die TCR $\gamma\delta$ -Oberflächenexpression war wieder hergestellt.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) wurde in dieser Arbeit zur Genotypisierung gesunder Spender auf einen SNP in dem Gen FCGR3A, zur Klonierung und dem Anfügen von Restriktionsschnittstellen angewendet. Die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Tübingen hat der Blutentnahme und Genotypisierung der Spender unter der Projektnummer 622/2012B01 am 12. Dezember 2012 zugestimmt.

#### **2.3.1.1 Genotypisierung FCGR3A-158V/F**

Als Matrize für die PCR wurde genomische DNA eingesetzt. Die verwendeten Primer sind so gewählt, dass der Bereich um den SNP enthalten ist. Des Weiteren wurden in den Hinwärtsprimer 2 vorsätzliche Fehlpaarungen eingefügt, woraus 8

Fehlpaarungen mit FCGR3B resultierten. Dadurch soll die Amplifikation von FCGR3B, dessen Sequenz zu 98 % homolog zu FCGR3A ist, ausgeschlossen werden.

Ansatz	50 ng genomische DNA	
	10 µl 5x GoTaq Flexi Buffer	
	3 µl MgCl <sub>2</sub> [1,5 mM]	
	1,5 µl DMSO	
	1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)	
	1 µl je Primer (10 µM)	
	0,25 µl GoTaq DNA Polymerase	
	ad 50 µl ddH <sub>2</sub> O	
Programm	95 °C 5 min	
	95 °C 30 s	
	60 °C 30 s	35 Zyklen
	72 °C 1,5 min	
	72 °C 8 min	
	8 °C ∞	

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt (2.3.3.3) und die Bande mit der Größe von 980 Basenpaaren (bp) daraus präpariert (2.3.3.4). Anschließend wurden die Proben für die Sequenzierung durch die Firma microsynth aufbereitet (2.3.4.2).

### 2.3.1.2 Extension von DNA-Fragmenten

Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen wurden Überhangsprimer, welche mit mindestens 30 Basen komplementär zur Matrize sind, verwendet.

Ansatz	1 µl Plasmid-DNA bzw. 8 µl PCR-Produkt
	10 µl 10x Thermo Pol Puffer (NEB)
	4 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
	1 µl je Primer (10 µM)
	ad 99 µl ddH <sub>2</sub> O
	1 µl Vent-Polymerase (Zugabe während initialer Denaturierung)

Programm	95 °C 5 min	
	95 °C 30 s	
	66 °C 30 s	30 Zyklen
	72 °C 1,5 min	
	72 °C 1 min/1000 bp	
	72 °C 10 min	

Über diese angefügten Restriktionsschnittstellen konnte das DNA-Fragment anschließend in einen bestimmten Expressionsvektor kloniert werden (2.3.2). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt (2.3.3.3) und daraus präpariert (2.3.3.4). Anschließend wurden sie in eine zur Klonierung in Vektoren präparativ verdaut (2.3.3.2).

### 2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde ein molares Insert/Vektor-Verhältnis von ca. 3:1 gewählt und die T4-DNA-Ligase eingesetzt.

Der verwendete Expressionsvektor pGH-1 wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geöffnet, so dass ein Amplikon, das mit denselben Restriktionsenzymen präparativ verdaut wurde, in der korrekten Orientierung in den Vektor inserieren konnte. Durch die Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme wurden nicht kompatible Enden generiert, wodurch eine Religation des Vektors verhindert wurde.

Ansatz	bis zu 16 µl asymmetrisch verdautes DNA-Fragment
	1 – 5µl geöffnet und CIP-behandelter Expressionsvektor pGH-1
	2 µl 10xPuffer
	5 U T4-DNA-Polymerase
	ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O

Die Ligation, die über Nacht bei 16 °C erfolgte, wurde anschließend in eine Transformation (2.2.1.1) eingesetzt.

### 2.3.3 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

#### 2.3.3.1 Analytischer Restriktionsverdau

Durch einen analytischen Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym wurde überprüft, ob Plasmide das gewünschte DNA-Insert tragen.

Ansatz

- 1 µl 10x Reaktionspuffer (NEB)
- 1 µl 10x BSA (NEB) falls Enzym dies erfordert
- 10 U Restriktionsenzym (NEB)
- 1 µl Plasmid-DNA, gewonnen aus einer Mini-Prep
- ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 1 h bei der als optimal angegeben Temperatur inkubiert und anschließend komplett auf einem 1 % analytischen Gel aufgetrennt.

#### 2.3.3.2 Präparativer Restriktionsverdau

Der präparative Restriktionsverdau wurde zur Öffnung von Expressionsvektoren und dem Verdau von PCR-Produkten, um diese in Expressionsvektoren klonieren zu können, eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, um Fragmente bzw. Vektoren mit ungleichen Enden zu generieren, was die korrekte Orientierung des Inserts unterstützen soll bzw. die Religation der Vektoren verhindert.

Ansatz

- 10 µl 10x Reaktionspuffer (NEB)
- 20 µM S-Adenosylmethionine (SAM) oder 1 µl 10x BSA (NEB) falls Enzyme dies erfordern
- 20 U pro Restriktionsenzym (NEB)
- 15 µl Plasmid-DNA
- ad 100 µl ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde mind. 4 h oder über Nacht bei der als optimal angegeben Temperatur inkubiert und anschließend komplett auf einem präparativen 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Bei einem präparativen Verdau zur Öffnung eines Expressionsvektors wurde zur Minimierung der Religationsfähigkeit des Vektors eine Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden durch „CIPen“ (engl.: „*calf intestinal phosphatase*“) durchgeführt. Dem verdauten Ansatz wurde 10 U alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP)

zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung und Entfernung des Enzyms erfolgte in einer anschließenden Inkubation von 10 min bei 65 °C und einer Gelextraktion.

### **2.3.3.3 Analytische und präparative Auftrennung von DNA-Gemischen in Agarose-Gelen**

DNA-Fragmente besitzen eine, zu ihrer Größe proportionale, negative Ladung und lassen sich deshalb in einer Agarosematrix elektrophoretisch nach ihrer Größe auftrennen. Die verwendeten 1 % - 2 % Agarosegele enthielten 0,4 µg/ml – 0,7 µg/ml Ethidiumbromid oder 1x GelRed welche in die DNA-Fragmente interkalieren und diese unter UV-Licht bei 312 nm Wellenlänge sichtbar werden lässt. Wurden keine Banden zwischen 300 bp und 500 bp erwartet, wurden die aufzutrennenden DNA-Lösungen mit 6x Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt. Ansonsten wurde 10x OrangeG-Ladepuffer verwendet und die Proben auf das Agarosegel in 1x TAE-Laufpuffer oder 1x TBE-Laufpuffer aufgetragen. Als Größenstandards wurden 1 kb bzw. 100 bp DNA-Leitern verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung von der Kathode zur Anode erfolgte für analytische Gele bei 140 V, bei präparativen Gelen bei 100 V – 120 V.

### **2.3.3.4 Präparation von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen**

DNA-Banden von präparativen Agarosegelen wurden auf einem UV-Tisch visualisiert und einzelne Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die präparierten Gelstücke wurden im 3-fachen Volumen ihres Gewichtes von maximal 0,3 mg in QC-Puffer bei Raumtemperatur aufgelöst. Unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN wurde die DNA aus dem Gel nach Herstellerangaben extrahiert. Das System basiert auf Säulchen mit Silicamembranen, die DNA unter Hochsalzbedingungen binden und von denen die DNA nach Waschschritten mit Niedrigsalzpuffer oder ddH<sub>2</sub>O eluiert werden kann. Die präparierten DNA-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.3.3.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung**

Vor der Transfektion eukaryotischer Zellen mit linearisierter Vektor-DNA wurde diese von hydrophoben Verunreinigungen und Proteinen durch eine Phenolextraktion gereinigt. Hierzu wurde die linearisierte DNA 1:2 mit einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1) unter starkem Vortexen gemischt und zur Phasentrennung in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die in der oberen wässrigen Phase gelösten Nukleinsäuren wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Um verbliebenes Phenol zu entfernen wurden drei

Extraktionen mit Chloroform durchgeführt. Eventuelle Reste der organischen Phase wurden mit der Pipette entfernt.

Zur Aufkonzentrierung der Nukleinsäuren wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und dem 2,5-fachen Volumen -20 °C kalten absoluten Ethanol gemischt und für mindestens 1 h bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde die gefällte DNA in der Tischzentrifuge 30 min – 60 min bei 16000\*g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 40 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **2.3.4 Analyse der Nukleinsäuren**

#### **2.3.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Durch Bildung des Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> kann der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Der optimale Wert beträgt 1,8. Für die Messungen wurde ein NanoDrop ND-1000 verwendet.

#### **2.3.4.2 Sequenzierung**

Zur Sequenzierung amplifizierter und aufgereinigter DNA wurde die Firma Microsynth beauftragt.

Ansatz	22,5 ng/100 bp DNA
	30 pmol Sequenzierungsprimer
	ad 15 µl ddH <sub>2</sub> O

Die Ergebnisse wurden mithilfe des Programms GATCViewer analysiert.

## **2.4 Analytische Methoden**

### **2.4.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse wurde in dieser Arbeit zur Quantifizierung von Zellpopulationen, dem qualitativen und quantitativen Nachweis der Antigenexpression auf Zelloberflächen, dem Nachweis von intrazellulären Antigenen und Zytokinen, zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit von Antikörpern auf Antigenen, sowie zur Bestimmung von Antikörperkonzentrationen in Serumproben eingesetzt. Dabei werden Zellen anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung von Licht bezüglich ihrer Größe und

Granularität charakterisiert. Gleichzeitig wird die Vitalität von Zellen sowie die Expression von Antigenen bzw. die Bindungsfähigkeit eines Antikörpers an ein exprimiertes Antigen durch Fluorochrom-markierte Antikörper bzw. Reagenzien qualitativ und quantitativ bestimmt, indem die Fluoreszenz der durch Laser angeregter Fluorochrome in verschiedenen Wellenlängen detektiert wird.

Es wurden pro Test  $2,5 \cdot 10^5$  –  $1 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen geerntet, die Lebendzellzahl bestimmt, und die Zellen in PBSE-Puffer auf eine Konzentration von  $1,25 \cdot 10^6$  –  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Es wurden pro Test 200  $\mu$ l Zellsuspension in einer 96-Kavitäten Costar Mikrotiterplatte ausgesät und bei 650 \*g 2 min pelletiert. Zur Anfärbung toter Zellen, damit diese aus der Analyse ausgeschlossen werden können, wurde das Zellpellet mit 50  $\mu$ l Färbelösung (in PBSE-Puffer) in eines LIVE/DEAD Fixable Dead Stain Kits resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Durch das Fluorochrom-markierte aminreaktive Reagenz werden freie Amine angefärbt. Bei einer nicht intakten Zellmembran sind zusätzlich zu den extrazellulären Aminen intrazelluläre Amine erreichbar wodurch eine messbar erhöhte Fluoreszenz in toten Zellen auftritt. Anschließend wurden die Zellen zweimal 2 min bei 650 \*g in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l FACS-Fleboy-Puffer bei humanen Primärzellen bzw. FACS-Puffer bei Zelllinien gewaschen. Der Zusatz von humanen Immunglobulinen in dem FACS-Fleboy-Puffer dient der Absättigung von Fc-Rezeptoren auf den Zielzellen, die unspezifische Signale verursachen könnten. Dieser Puffer wurde allerdings nur bei der Analyse mit Antikörpern ohne humanen Anteil eingesetzt, da es ansonsten zu einer Kreuzreaktion kommen würde. Das Zellpellet wurde mit 50  $\mu$ l Antikörperlösung in FACS-Fleboy-Puffer oder FACS-Puffer resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in FACS-Fleboy-Puffer oder FACS-Puffer gewaschen. War der Primärantikörper Fluorochrom-markiert und keine anschließende intrazelluläre Färbung (2.4.1.1) gewünscht, wurde das Zellpellet zur Fixierung in 80  $\mu$ l – 200  $\mu$ l FACS-Puffer mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. PFA führt zu einer Quervernetzung von Proteinen, wodurch ein Verlust an Fluoreszenzintensität über mehrere Tage verhindert wird. Wurden unmarkierte Primärantikörper eingesetzt, wurde das Zellpellet nach der Primärfärbung mit 50  $\mu$ l 1:100 in FACS-Fleboy-Puffer oder FACS-Puffer verdünntem Sekundärantikörper 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach denselben Waschsritten wie oben beschrieben wurde das Zellpellet in 80  $\mu$ l – 200  $\mu$ l FACS-Puffer mit 1 % PFA aufgenommen und in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt. Falls in einer Probe Fluorochrome mit überlappenden Emissionspektren eingesetzt wurden, musste eine Kompensation durchgeführt werden. Diese bewirkt, durch Definition der individuellen Emission jedes eingesetzten Fluorochroms, dass die detektierte

Fluoreszenz in einem bestimmten Kanal ausschließlich von dem gewünschten Fluorochrom stammt. Hierzu wurden Mikropartikel der Firma Invitrogen, welche murine Antikörper (AbC beads) bzw. aminreaktive Reagenzien (ArC beads) binden, mit jeweils einem Fluorochrom markiert und mit einer Negativprobe analysiert. Es wurden 20 µl Mikropartikel mit 1 µl – 5 µl Antikörper bzw. 0,2 µl aminreaktiven Reagenz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. In allen Experimenten wurden entsprechende Isotyp-, Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Die Messung erfolgte an einem FACSCalibur oder LSRII. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte unter der Verwendung der CellQuest-Software, BD FACSDiva oder FlowJo.

#### **2.4.1.1 Intrazelluläre Zytokinfärbung**

Werden Zellen *in vitro* stimuliert und mit Inhibitoren, welche die Sekretion von Zytokinen verhindern und zu einer Akkumulation dieser im Zytoplasma führen, inkubiert, kann eine intrazelluläre Anfärbung dieser Zytokine mittels Durchflusszytometrie erfolgen (siehe 2.6.3 CD107a-Degranulations-Test mit intrazellulärer Zytokinfärbung). Nach der oben beschriebenen Zelloberflächenfärbung zur Identifikation der verschiedenen Zellpopulation wurden hierzu die Zellen in 100 µl Cytofix/Cytoperm resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Fixierung durch das PFA in dem Cytofix/Cytoperm dient dem Erhalt der intrazellulären Antigene der Zellen sowie der Zellmorphologie während durch Saponin eine Permeabilisation der Zellmembran erfolgt. Anschließend wurden die Zellen zweimal 2 min bei 650 \*g in einem Gesamtvolumen von 200 µl PermWash-Puffer gewaschen. Durch den saponinenthaltenden PermWash-Puffer wird der permeabilisierte Zustand der Zellen aufrechterhalten. Das Zellpellet wurde mit 50 µl Antikörperlösung in PermWash-Puffer resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PermWash-Puffer gewaschen und in 80 µl – 200 µl FACS-Puffer mit 1 % PFA aufgenommen, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

#### **2.4.1.2 Quantitative Durchflusszytometrie**

Zur Bestimmung der absoluten Antigendichte auf Zelloberflächen mittels indirekter Durchflusszytometrie wurde das QIFIKIT von Dako eingesetzt. Hierbei werden an murine Antikörper gekoppelte Mikropartikelpopulationen, mit definierter Anzahl an Antigenbindestellen für murine Antikörper, gleichzeitig mit den zu untersuchenden Zellen analysiert. Durch Auftragen der Fluoreszenzintensitäten gegen die Anzahl der Antigenbindestellen auf den Mikropartikelpopulationen, wird eine Standardkurve generiert aus welcher sich die Antigendichte auf den analysierten Zellen ableiten

lässt. Prinzipiell wurde wie in 2.4.1 beschrieben verfahren, der primäre Antikörper muss jedoch ungekoppelt, monoklonal und murinen Ursprungs mit einem IgG Isotyp sein. Zunächst erfolgte gegebenenfalls eine Anfärbung toter Zellen mit einem LIVE/DEAD Fixable Dead Stain Kit. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher das zu quantifizierende Antigen bindet, bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle erfolgte in sättigender Konzentration in FACS-Fleboy-Puffer oder FACS-Puffer für 40 min bei 4 °C. Nachdem die Zellen als auch 50 µl der Mikropartikelpopulationen-Lösungen („*set-up beads*“ und „*calibration beads*“) zweimal in einem Gesamtvolumen von 200 µl FACS-Fleboy-Puffer oder FACS-Puffer gewaschen wurden, erfolgte eine Inkubation (30 min bei 4 °C) der Zellen als auch der „*set-up beads*“ und „*calibration beads*“ mit einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper in FACS-Puffer. Neben dem im Kit enthaltenen FITC-markierten polyklonalen anti-Maus IgG Sekundärantikörper können hierzu polyklonale anti-Maus IgG-oder F(ab')<sub>2</sub>-spezifische Antikörper, markiert mit einem beliebigen Fluorochrom, verwendet werden. Bei der Untersuchung von Zelllinien bzw. einer homogenen Zellpopulation konnten diese nach einem weiteren Waschschrift fixiert und analysiert werden. Wurde eine multiparametrische Analyse mit weiteren Zellmarkern zur Definition einzelner Subpopulationen angestrebt, folgte zunächst ein Waschschrift mit FACS-Puffer mit 4 % hitzeinaktiviertem Mausserum um eine unspezifische Bindung der residualen anti-Maus Antikörper an murine Fluorochrom-markierte Tertiärantikörper zu verhindern. Anschließend wurde das Zellpellet mit 50 µl Tertiärantikörperlösung in FACS-Puffer resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in FACS-Puffer wurden die Zellen fixiert und bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

#### **2.4.1.3 Analyse der Konkurrenz von Antikörpern um eine Antigenbindung mittels Durchflusszytometrie**

Im Falle von Konkurrenzexperimenten wurde prinzipiell wie in 2.4.1 beschrieben verfahren. Die Inkubation von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen einer CD19-exprimierenden Zelllinie pro Kavität mit dem chimärisierten CD19-Antikörper 4G7SDIE erfolgte in verschiedenen Konzentrationen in 50 µl FACS-Puffer für 30 min bei 4 °C. Anschließend wurde jedoch nicht gewaschen, sondern der weitere zu analysierende murine CD19-Antikörper in sättigender Konzentration in 50 µl FACS-Puffer zugegeben und für weitere 40 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 2 min bei  $650 \cdot g$  in einem Gesamtvolumen von 200 µl FACS-Puffer gewaschen, das Zellpellet in 80 µl – 200 µl FACS-Puffer mit 1 % PFA aufgenommen, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert.

#### **2.4.1.4 Bestimmung der Serumkonzentration von therapeutischen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie**

Die Bestimmung der Konzentrationen des therapeutischen Antikörpers 4G7SDIE in Serum von behaltene Patienten erfolgte nach einer von Dr. Martin Hofmann, Universität Tübingen entwickelten Methode bei welcher prinzipiell wie in 2.4.1 beschrieben verfahren wurde. Serumproben zu verschiedenen Therapiezeitpunkten sowie eine Probe, welche vor Behandlungsbeginn gewonnen wurde, wurden in FACS-Puffer verdünnt. Mithilfe des Serums vor Behandlungsbeginn, welchem definierte Konzentrationen an 4G7SDIE zugesetzt wurden, wurde ein Standard generiert. Es wurden  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen der CD19-exprimierenden Zelllinie NALM-16 pro Kavität mit 50  $\mu$ l der verdünnten Serumproben für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 2 min bei 650 \*g in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen und in 50  $\mu$ l R-PE-markiertem polyklonalen Ziege-anti-humanen IgG Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach denselben Waschschritten wie oben beschrieben wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l FACS-Puffer mit 1 % PFA aufgenommen, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch Auftragen der Fluoreszenzintensitäten der Standardproben der jeweiligen Verdünnung gegen die zugegebene Antikörperkonzentration, wurde eine Standardkurve generiert aus welcher sich die Antikörperkonzentration in den analysierten Serumproben ableiten lässt.

## **2.5 Präparative Methoden**

### **2.5.1 Separation von $\gamma\delta$ -T Zellen mittels MACS**

Zur Anreicherung oder Depletion von Zellpopulationen aus einem heterogenen Zellgemisch wurde die MACS-Technologie von Miltenyi Biotec angewandt. Die zu depletierenden bzw. anzureichernden Zellen wurden über spezifische Antikörper oder einen Antikörper-Cocktail markiert. Diese Antikörper sind oder werden durch einen Sekundärantikörper an Eisenoxidpartikel gekoppelt. Das Antikörper-markierte Zellgemisch wurde in einer paramagnetischen Eisenoxid-Trennsäule durch ein angelegtes magnetisches Feld aufgetrennt. Unmarkierte Zellen passieren die Säule, während Antikörper-markierte Zellen bis zur Entfernung des Magnetfeldes in der Säule zurück gehalten werden.

In dieser Arbeit wurde zur Markierung von  $\gamma\delta$ -T Zellen das Anti-TCR  $\gamma/\delta$  MicroBeads Kit, human nach den Angaben des Herstellers Miltenyi Biotec eingesetzt. Die Isolation der  $\gamma\delta$ -T Zellen erfolgte mithilfe eines autoMACS der Firma Miltenyi Biotec.

## 2.5.2 Sortierung von Zellen mittels FACS

Die Sortierung von Zellen mittels „*fluorescence-activated cell sorting*“ (FACS) wurde in dieser Arbeit zur Isolierung homogener Zellpopulationen aus Mischpopulationen angewendet. Dabei handelt es sich um eine Unterform der Durchflusszytometrie wobei die Zellen nach Größe, Granularität und Fluoreszenz sortiert werden können. Einzelne Flüssigkeitstropfen, mit idealerweise einer Zelle pro Tropfen, werden durchflusszytometrisch analysiert und basierend auf den gemessenen Parametern elektrisch geladen. Durch ein elektrostatisches Ablenkungssystem werden die einzelnen Tropfen in verschiedene Gefäße verteilt. Die Zellen wurden geerntet, zweimal in 5 ml Sortierungspuffer gewaschen und durch einen 40 µm Zellsieb gefiltert. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt, und die Zellsuspension wurde bei einer Konzentration von  $1 \cdot 10^7 - 2 \cdot 10^7$  Zellen/ml Antikörperlösung in einem 15 ml Falcon-Röhrchen 30 min bei 4 °C unter regelmäßigen Invertieren des Röhrchens inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen pelletiert (5 min, 125 \*g) und zweimal mit 5 ml Sortierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei einer Konzentration von  $1 \cdot 10^7 - 2 \cdot 10^7$  Zellen/ml mit 1:75 verdünntem Sekundärantikörper 30 min bei 4 °C unter regelmäßigem Invertieren des Röhrchens inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal in Sortierungspuffer gewaschen und bei einer Konzentration von  $1 \cdot 10^7 - 2 \cdot 10^7$  Zellen/ml in Sortierungspuffer mit 1 mg/ml DNase I resuspendiert. Bis zur zeitnahen Analyse wurden die Zellen auf Eis gehalten. Direkt vor der Analyse wurden die Zellen noch einmal mithilfe eines Zellsiebs vereinzelt. Die Sortierung erfolgte an einem FACSJazz. Anschließend wurden die sortierten Zellen in Vollmedium aufgenommen, in Kulturgefäße ausgesät und bis zu einer durchflusszytometrischen Kontrolle kultiviert.

## 2.6 Funktionelle Analysen

### 2.6.1 Europium-TDA Zytotoxizitätstest

Der DELFIA EuTDA Zytotoxizitätstest von PerkinElmer basiert auf der Aufnahme des Fluoreszenz-verstärkenden Liganden BATA in viable Zellen und dessen Umsatz zu TDA durch Acetylerasen im Zytoplasma. Der Ligand TDA kann aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften intakte Zellmembranen nicht passieren. Nur durch Schädigung der Membranintegrität, wie durch eine Zellyse, wird TDA in den Zellüberstand sekretiert. TDA bildet mit Europium ein stabiles fluoreszierendes Chelat (EuTDA), welches durch zeitauflösende Fluorometrie quantifiziert werden kann.

Als Zielzellen wurden kryokonservierte Blasten von BCP-ALL Patienten oder die Zelllinie MHH-CALL-4 eingesetzt. Nach dem Auftauen der Blasten wurden diese in einer Zellkonzentration von etwa  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$  in AB-Medium ( $37^\circ\text{C}$ ) in einem 15 ml Falcon 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Blasten auf  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$  eingestellt und  $3 \mu\text{l}$  BATDA pro ml Zellsuspension zugegeben. Unter ständiger Rotation durch einen MACSMix Tube Rotator wurden die Blasten für 1 h im  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank inkubiert.

MHH-CALL-4 wurden bei einer Konzentration von  $1,7 \cdot 10^6/\text{ml}$  –  $2,5 \cdot 10^6/\text{ml}$  geerntet und auf  $2 \cdot 10^6/\text{ml}$  in MHH-CALL-4-Medium ( $37^\circ\text{C}$ ) eingestellt. Pro ml Zellsuspension wurden  $2,5 \mu\text{l}$  BATDA zugegeben. Die Inkubation unter Rotation erfolgte für 45 min im  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml des entsprechenden warmen Vollmediums resuspendiert und bei  $300 \cdot \text{g}$  5 min pelletiert. In drei weiteren Waschschrritten wurden jeweils 5 ml Vollmedium eingesetzt, in einem finalen Waschschrtritt 10 ml Vollmedium. Die BATDA-markierten Zielzellen wurden auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^5/\text{ml}$  eingestellt. Es wurden  $25 \mu\text{l}$  der Zellsuspension bzw.  $5 \cdot 10^3$  Zielzellen pro Kavität einer 96-Kavitäten Costar Mikrotiterplatte ausgesät. Zur Bestimmung des freien TDAs in Lösung wurde 1 ml der Zellsuspension erneut bei  $300 \cdot \text{g}$  5 min pelletiert und  $25 \mu\text{l}$  des Überstandes pro Kavität ausgesät. Zur Bestimmung der Maximalfreisetzung von TDA wurde 1 ml der Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt. Mittels Ultraschallbehandlung von zweimal 1 min wurden alle Zellen vollständig lysiert. Es wurden  $25 \mu\text{l}$  der Zellsuspension pro Kavität ausgesät. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Maximalfreisetzung des TDAs ist die Zugabe von  $30 \mu\text{l}$  Lysepuffer zu den ausgesäten Zielzellen. Die spontane Freisetzung des TDAs wurde durch Zielzellen ohne Effektorzellen und Effektormolekülen bestimmt. Nach der Zugabe von Effektorzellen, therapeutischer Antikörper und Serum wird der Ansatz 2 h im  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden  $20 \mu\text{l}$  des Überstandes mit  $200 \mu\text{l}$  DELFIA Europium Solution für 15 min – 30 min auf einem Plattformschüttler inkubiert. Die gebildeten Europium-TDA Chelate wurden in einem VICTOR Multi label reader quantifiziert. Die spezifische Zelllyse berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{experimentelle TDA Freisetzung} - \text{spontane TDA Freisetzung}}{\text{maximale TDA Freisetzung} - \text{spontane TDA Freisetzung}} \times 100$$

Die ADCC [%] berechnet sich aus der spezifischen Lyse mit Effektorzellen und Antikörper abzüglich der Lyse mit Effektorzellen.

### 2.6.2 Impedanz-basierter Echtzeit-Zytotoxizitätstest (xCELLigence)

Das xCELLigence-System basiert auf der wiederholten Bestimmung der Impedanz im Verlauf eines Versuchsansatzes. Die Impedanz wird durch Zellen, die auf den Boden einer Multikavitätenplatte adhären, erhöht. Lösen sich diese Zellen durch Zellyse von dem Kavitätenboden, wird die Impedanz verringert und kann durch das xCELLigence System quantifiziert werden. Aufgrund der wiederholten Messung der Impedanz ist eine Beobachtung der Zellyse im Zeitverlauf möglich.

Zunächst wurden 50 µl Vollmedium in jede Kavität einer 96-Kavitäten E-Plate View 96 PET vorgelegt. In einem xCELLigence RTCA Gerät wurde die Hintergrundimpedanz bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bestimmt. Anschließend wurden die adhären Zielzellen geerntet, bei 130 \*g für 5 min pelletiert und in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und der Resuspension in 10 ml Vollmedium wurden die Zellen durch einen 40 µm Zellsieb gefiltert um Zellklumpen zu entfernen. Die Zielzellen wurden auf 1x10<sup>5</sup>/ml eingestellt und 50 µl der Zellsuspension pro Kavität ausgesät. Die Zielzellen wurden in der Platte unter regelmäßiger Bestimmung der Impedanz 20 h – 28 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Hierbei wurde angestrebt, dass sich die Zielzellen in einem Wachstumsplateau befinden bevor Effektorzellen zugegeben werden. Anschließend wurden Effektorzellen sowie therapeutische bzw. Kontrollantikörper in jeweils 50 µl zugegeben. Die Impedanz wurde alle 15 min für mindestens weitere 48 h beobachtet. Die gemessene Impedanz wird als ein dimensionsloser Zellindex („Cell Index“, CI) angegeben. Dieser wurde auf den Zeitpunkt der Zugabe der Effektorzellen normalisiert. Die spezifische Zellyse berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{spezifische Lyse} = \frac{\text{norm.CI ohne Effektorzellen} - \text{norm.CI Probe}}{\text{norm.CI ohne Effektorzellen}} \times 100$$

Die ADCC [%] wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{ADCC} [\%] = \frac{\text{norm.CI mit Effektorzellen} - \text{norm.CI Probe mit Antikörper}}{\text{norm.CI mit Effektorzellen}} \times 100$$

### 2.6.3 CD107a-Degranulations-Test mit intrazellulärer Zytokinfärbung

CD107a wird auf Zelloberflächen von Effektorzellen transient exprimiert wenn es zu einer Degranulation dieser kommt. CD107a dient somit als ein Surrogatmarker für die Zytotoxizität von Effektorzellen welcher durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Eine weitere Effektorfunktion ist die Produktion von Zytokinen wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  welche in demselben Ansatz durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung analysiert werden kann. Es wurden pro Kavität einer 96-Kavitäten Costar Mikrotiterplatte 0,5\*10<sup>6</sup> Effektorzellen und 0,5\*10<sup>6</sup> Zielzellen in jeweils 50 µl

AB-Medium ausgesät. Der zu untersuchende therapeutische Antikörper sowie eine Isotypkontrolle wurden in final sättigender Konzentration in 40 µl – 50 µl AB-Medium zugegeben. Als Positivkontrolle wurde gegebenenfalls eine finale Konzentration von 50 ng/ml PMA mit 1 µM Ionomycin eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden Effektorzellen ohne Zielzellen analysiert. Um sowohl eine Internalisierung von CD107a als auch die Sekretion der produzierten Zytokine im Rahmen der zellulären Stimulation zu verhindern, wurden die Inhibitoren GolgiStop (Monensin) und Brefeldin A eingesetzt. Monensin blockiert den Proteintransport zum Golgikomplex, während Brefeldin A den Golgikomplex selbst zerstört. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum und Zytoplasma und Sekretion von Proteinen wird verhindert. In 50 µl AB-Medium wurden eine finale Konzentration von 2 µM GolgiStop mit 10 µg/ml Brefeldin A zugegeben. Der eingesetzte Fluorochrom-markierte CD107a-Antikörper kann direkt in den Ansatz gegeben werden, wodurch eine Internalisierung von CD107a weiter unterbunden werden soll. Diese Variante wurde bevorzugt wenn eine geringe Expression von CD107a erwartet wurde. Das Gesamtvolumen beträgt 200 µl pro Kavität. Nach einer Inkubation von 14 h – 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurde eine FACS-Analyse (2.4.1) mit anschließender intrazellulärer Zytokinfärbung („*intracellular cytokine staining*“, ICS) (2.4.1.1) durchgeführt. Wurde der Fluorochrom-markierte CD107a-Antikörper bereits in den Ansatz gegeben, erfolgte keine weitere Färbung damit in der FACS-Analyse. Die verwendeten Kombinationen von Antikörpern zur FACS-Analyse und intrazellulären Zytokinfärbung sind in **Tabelle 2-7: CD107a/ICS-Panel** und **Tabelle 2-8: CD107a/ICS-Panel-γδ** aufgeführt.

#### **2.6.4 Durchflusszytometrische Analyse der induzierten Expressionsmodulation von Antigenen**

Um durch die Bindung von therapeutischen Antikörpern induzierte Veränderungen der Expression eines Antigens auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde eine Methode von Hofmann *et al.* angewendet <sup>145</sup>. Hierbei wurden 2,5\*10<sup>5</sup> Zielzellen pro Kavität einer 96-Kavitäten Costar Mikrotiterplatte zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von 4G7SDIE in 200 µl Vollmedium für 5 h – 48 h im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert.

Im Falle der Analyse der Rekonstitution der Antigenexpression wurden bestrahlte MHH-CALL-4 (25 Gy) und RAJI (100 Gy) als Zielzellen eingesetzt. Hierbei wurden 2,5\*10<sup>5</sup> Zielzellen pro Kavität einer 96-Kavitäten Costar Mikrotiterplatte zusammen mit 1 µg/ml 4G7SDIE in 200 µl Vollmedium für 24 h im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zielzellen 2 min mit 650 \*g abzentrifugiert und

in einem Gesamtvolumen von 200 µl Vollmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach 4 weiteren Waschschrritten wurden die Zellen in 200 µl Vollmedium resuspendiert und für bis zu 10 weitere Tage in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Eine Kontrolle wurde nicht gewaschen und unter dem weiteren Vorhandensein von 4G7SDIE inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zielzellen 2 min mit 650 \*g abzentrifugiert und in einem Gesamtvolumen von 200 µl kalten FACS-Puffer resuspendiert, zentrifugiert, in 50 µl einer Antikörperlösung (2 µg/ml 4G7SDIE) resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit FACS-Puffer wurde das Zellpellet in 50 µl 1:100 in FACS-Puffer verdünntem R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment resuspendiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C und zwei weiteren Waschschrritten wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer mit 1 % PFA aufgenommen, in 0,5 ml FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert.

### **2.6.5 Analyse der Kompetition von Antikörpern um eine Antigenbindungsstelle mittels Bestimmung der T-Zellaktivierung**

Um die Kompetition um eine Antigenbindungsstelle eines monospezifischen Antikörpers mit einem T-Zell aktivierenden bispezifischen Antikörper zu untersuchen, wurde eine modifizierte Methode zur Seruntiterbestimmung von Blinatumomab nach Bargou *et al.* angewendet<sup>223</sup>. Hierbei wurden  $0,75 \cdot 10^6$  –  $1 \cdot 10^6$  PBMC pro Kavität einer 96-Kavitäten Costar Mikrotiterplatte in 50 µl – 100 µl AB-Medium ausgesät. Die in der PBMC-Probe enthaltenen B-Zellen können als Zielzellen dienen. Alternativ wurden  $2,5 \cdot 10^5$  NALM-6 als Zielzellen zugegeben. Es wurden verschiedene Konzentrationen an 4G7SDIE oder Serumproben in 50 µl zugegeben und für 30 min im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde 1 ng/ml Blinatmomab in 50 µl AB-Medium zugegeben und für 14 h – 18 h im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen 2 min mit 650 \*g abzentrifugiert eine FACS-Analyse mit den Antikörpern aus **Tabelle 2-9: T-Zellaktivierungspanel** durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

Für die Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE als potentiellen therapeutischen Antikörper zur Behandlung der MRD in der pädiatrischen BCP-ALL, wurden zunächst Untersuchungen zur Expression von CD19 auf leukämischen Blasten, der Oberflächenexpressionsmodulation von CD19 auf leukämischen Blasten und dem Zusammenhang der CD19-Expression und der 4G7SDIE-vermittelten ADCC durchgeführt. Zudem wurde die biologische Aktivität des Fc-optimierten Antikörpers bezüglich der Abtötung von leukämischen Blasten bestimmt und mit der des chimärisierten Pendants verglichen. Es wurde die Sättigung von 4G7SDIE auf leukämischen Blasten, beziehungsweise die Konzentrationen die zur effektiven Lyse der leukämischen Blasten benötigt wird, bestimmt und die ADCC vermittelten Effektorzellen charakterisiert. Des Weiteren wurde der Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit CD19-Antikörpern untersucht.

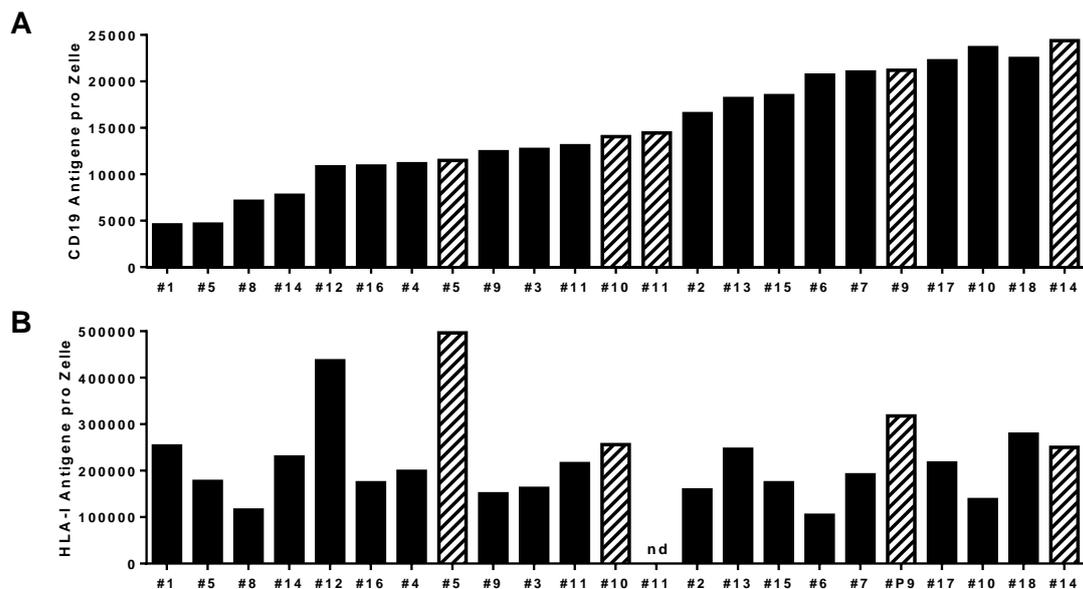
Anhand Proben einiger MRD-positiver BCP-ALL Patienten, die im Rahmen von individuellen Heilversuchen mit 4G7SDIE behandelt wurden, wurden begleitende Untersuchungen durchgeführt die zur Vorbereitung einer klinischen Studie mit 4G7SDIE dienen sollten. Es wurde eine Methode etabliert CD19 auf leukämischen Blasten behandelter Patienten zuverlässig zu analysieren, sowie etwaige residuale Serumspiegel von 4G7SDIE, welche eine erfolgreiche Therapie mit Blinatumomab inhibieren könnten, zu bestimmen. Zudem wurde die biologische Aktivität von 4G7SDIE bezüglich der Lyse von autologen Blasten behandelter Patienten sowie die Effektorzellaktivität der behandelten Patienten untersucht. Es wurden die Serumhalbwertszeiten und Serumspiegel von 4G7SDIE bestimmt, sowie die Bildung von anti-Antikörpern unter 4G7SDIE-Therapie. Zudem wurde das klinische Ansprechen der behandelten Patienten in Bezug auf die generierten *in vitro* Daten betrachtet. Abschließend wurden Untersuchungen zur Identifikation weiterer potentieller Zielantigene für die Therapie der pädiatrischen BCP-ALL durchgeführt.

### **3.1 CD19 als Zielantigen der BCP-ALL**

#### **3.1.1 Quantifizierung der Antigenexpression auf leukämischen Blasten und Zelllinien**

CD19 ist als geeignetes Zielantigen für die immuntherapeutische Behandlung der pädiatrischen BCP-ALL bekannt. Um zu untersuchen, in welcher absoluten

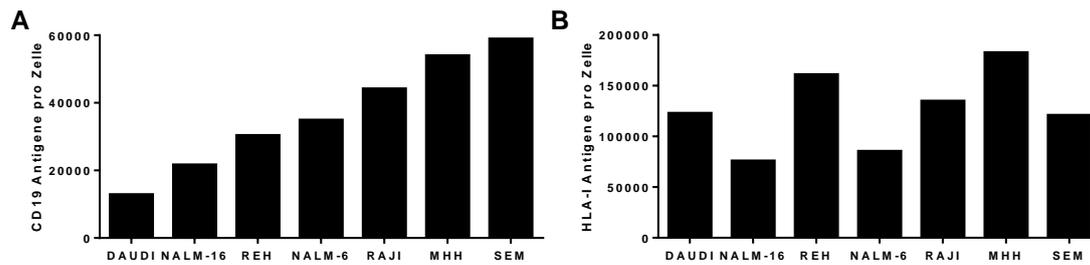
Expressionsstärke CD19 auf der Zelloberfläche leukämischer Blasten der BCP-ALL vorkommt, wurde die Expression von CD19 sowie HLA-I mithilfe des QIFIKITs quantifiziert. Die untersuchten Blasten stammen aus der Biobank der Kinderklinik Tübingen. Bei der Analyse der FACS-Färbung wurden die leukämischen Blasten mit dem für den jeweiligen Patienten relevanten Markern CD10 und oder CD34 selektiert und die CD19-Expression quantifiziert.



**Bild 3-1: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CD19 und HLA-I auf primären BCP-ALL Blasten.**  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC von 23 BCP-ALL Patienten wurden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  4G7 (A),  $20 \mu\text{g/ml}$  W6/32 (HLA-I spezifisch) (B) beziehungsweise den Isotypkontrollen IgG1 sowie IgG2a inkubiert. Die Anfärbung der Mikropartikelpopulation und Antikörper-markierten Zellen erfolgte durch einen FITC-konjugierten Anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Leukämische Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD10-PerCp und CD34-APC auf CD10<sup>+</sup> und/oder CD34<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die Antigendichte anhand einer Standardkurve berechnet. Die schraffierten Balken stammen von 4G7SD1E-behandelten Patienten vor Beginn der Therapie. nd = nicht untersucht.

CD19 wurde auf allen analysierten leukämischen Blasten exprimiert (**Bild 3-1**). Die Antigendichte betrug im Mittel  $1,5 \cdot 10^4$  Antigene pro Zelle mit einer Spanne von  $4,5 \cdot 10^3$  bis  $2,4 \cdot 10^4$ . Die HLA-I Expression lag im Mittel bei  $2,2 \cdot 10^5$  Antigenen pro Zelle und reichte von  $1,0 \cdot 10^5$  bis  $5,0 \cdot 10^5$ . Die Variation der Expressionsstärke von CD19 von Faktor 5 korrelierte nicht mit dem Blastenphänotyp oder der immunologischen Subtypen oder des Differenzierungsgrades der Leukämie (Daten nicht gezeigt).

Um geeignete Zielzellen für funktionelle Tests, für welche keine primären Blasten zur Verfügung standen, zu identifizieren, wurden leukämische Zelllinien auf ihre CD19 und HLA-I Expression untersucht.



**Bild 3-2: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CD19 und HLA-I auf leukämischen Zelllinien.**  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen wurden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  4G7 (A),  $20 \mu\text{g/ml}$  W6/32 (B) beziehungsweise den Isotypkontrollen IgG1 sowie IgG2a inkubiert. Die Anfärbung der Mikropartikelpopulation und Antikörper-markierten Zellen erfolgte durch einen FITC-konjugierten Anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die Antigendichte anhand einer Standardkurve berechnet. nd = nicht untersucht. MHH = MHH-CALL-4

In **Bild 3-2** ist dargestellt, dass die CD19-Antigendichte auf den Zelllinien DAUDI und NALM-16 im mittleren bzw. oberen Bereich des auf leukämischen Blasten detektierten Bereiches lag. Die Expression auf REH und NALM-6 war höher als auf den leukämischen Blasten. RAJI, MHH-CALL-4 und SEM zeigten eine deutlich höhere CD19-Oberflächenexpression. Die HLA-I Expression der Zelllinien war mit einem Mittel von  $1,26 \cdot 10^5$  etwa die Hälfte der auf leukämischen Blasten detektierten Antigendichte. Das auf BCP-ALL Blasten detektierte Expressionsmittel wurde durch keine der untersuchten Zelllinien erreicht. Bei *in vitro* Untersuchungen mit leukämischen Zelllinien wird eine mit leukämischen Blasten vergleichbare CD19 und HLA-I Expression angestrebt.

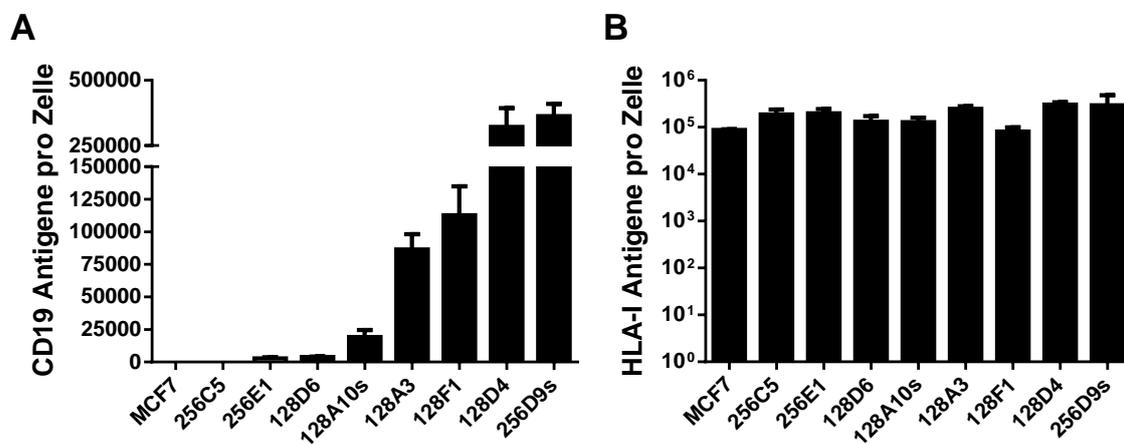
### 3.1.2 4G7SDIE-vermittelte ADCC in Abhängigkeit der CD19-Expression

In **Bild 3-1** wurde gezeigt, dass die CD19-Expression auf leukämischen Blasten um Faktor 5 variieren kann. Da durch eine höhere Antigendichte, mehr Antikörpermoleküle binden können und somit auch eine erhöhte NK-Zellaktivierung auslösen könnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Expressionsstärke eines Antigens (CD19) Einfluss auf die Effizienz der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität haben könnte. Um andere Variablen, wie beispielsweise unterschiedliche HLA-Expressionen der Zielzellen, die einen Einfluss auf die ADCC haben können, auszuschließen, wurden Transfektanten generiert. Es wurde die Zelllinie MCF-7 gewählt, da es sich hierbei um eine leicht transfizierbare Zelllinie und eine etablierte Zielzelllinie für die NK Zell-vermittelte Lyse handelt.

#### 3.1.2.1 Generierung von MCF-7-CD19-Transfektanten

Der Vektor pOTB7-CD19, mit der Sequenz des transmembranen CD19-Moleküls, wurde bei der Firma source Bioscience erworben und in den Expressionsvektor pGH-1 umklont. In einer PCR Reaktion mit pOTB7-CD19 als Matrize wurden die

Schnittstellen für BamHI und XbaI durch Überhangsprimern angefügt. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde mit BamHI und XbaI präparativ verdaut und in den, mit denselben Restriktionsenzymen geöffneten, Expressionsvektor pGH1 kloniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung der klonierten Fragmente verifiziert. Unter Verwendung einer Maxi-Kultur eines korrekten Klones wurden die Expressionsvektoren vervielfältigt und anschließend durch das Restriktionsenzym BclI linearisiert. Nach einer Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung wurden MCF-7-Zellen mit dem Expressionsvektor stabil transfiziert. Es wurden mehrere Einzelzellklone expandiert und die Expression von CD19 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. Einzelne Klone mit verschiedenen CD19-Expressionsstärken wurden ausgewählt und die CD19-Zelloberflächenexpression quantitativ mithilfe des QIFIKITs bestimmt.



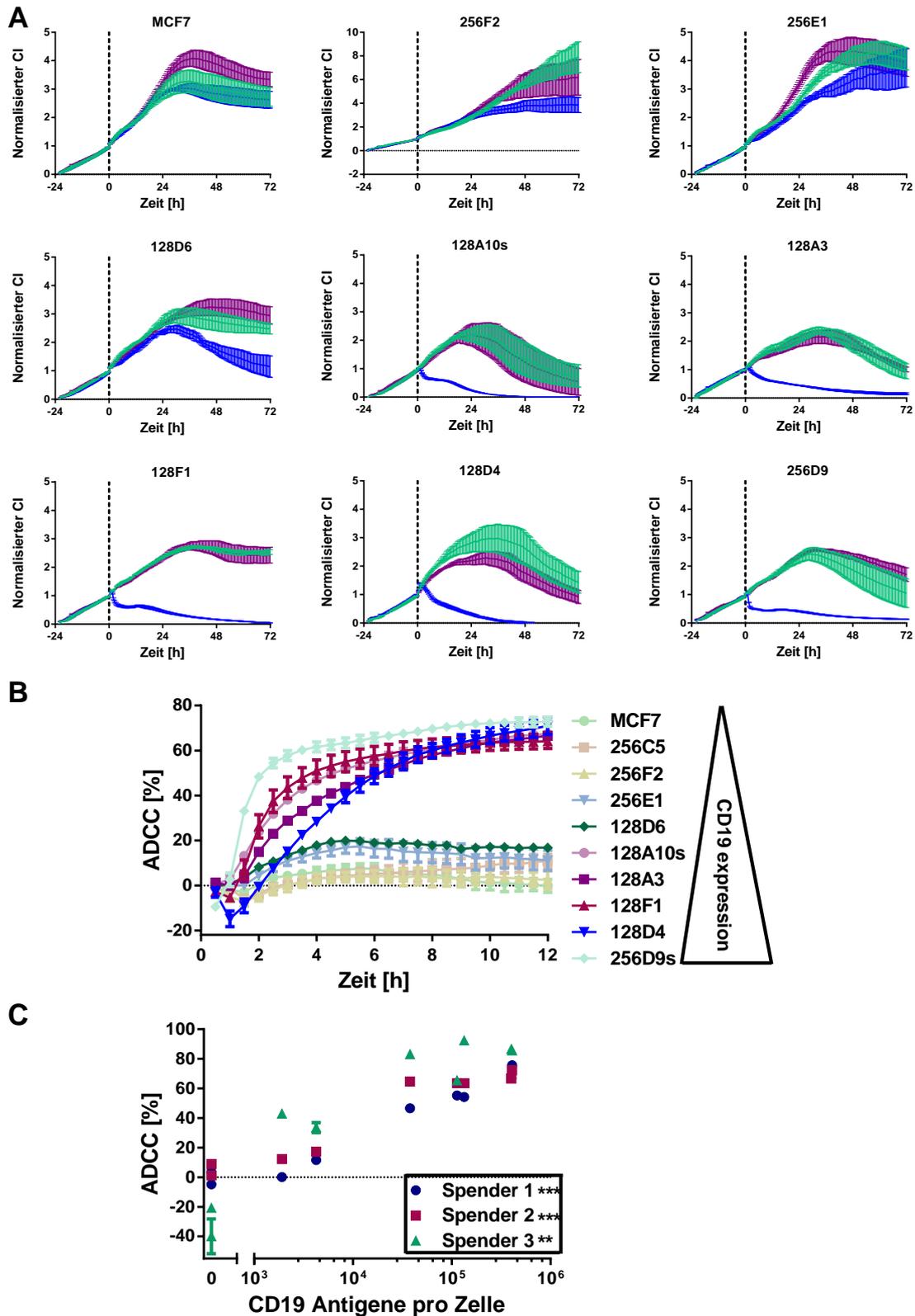
**Bild 3-3: Quantitative Oberflächenexpression von CD19 und HLA-I auf MCF-7-CD19<sup>tm</sup>-Transfektanten.**  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen der MCF-7-CD19<sup>tm</sup>-Transfektanten wurden mit  $5 \mu\text{g/ml}$  4G7 (A),  $20 \mu\text{g/ml}$  W6/32 (B) beziehungsweise den Isotypkontrollen IgG1 sowie IgG2a inkubiert. Die Anfärbung der Mikropartikelpopulation und Antikörper-markierten Zellen erfolgte durch einen FITC-konjugierten Anti-Maus IgG Sekundärantikörper. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die Antigendichte anhand einer Standardkurve berechnet. Der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente sowie deren Standardabweichung (SD) sind dargestellt.

Da die analysierten Klone eine schwache oder wiederum sehr hohe CD19-Expression, nicht jedoch ein auf Blasten natürlich vorkommendes Expressionsniveau (**Bild 3-1**), aufwiesen wurden zwei Mischklone (128A10 und 256D9) auf die entsprechenden Expressionsstärken mittels FACS sortiert. Die CD19-Expression der sortierten Subpopulation von  $1 \cdot 10^6$  bzw.  $2 \cdot 10^5$  Zellen wurde nach weiterer Kultivierung und Expansion erneut quantitativ bestimmt. Klon 128A10s exprimiert  $1,9 \cdot 10^4$  ( $\pm 5,4 \cdot 10^3$ ) CD19-Antigene pro Zelle wohingegen Klon 256D9 weiterhin eine sehr hohe CD19-Expression mit  $3,6 \cdot 10^5$  ( $\pm 4,7 \cdot 10^4$ ) CD19-Antigenen pro Zelle aufweist. Die Expression des Klons 128D6 mit  $3,8 \cdot 10^3$  ( $\pm 3,9 \cdot 10^2$ ) Antigenen pro Zelle liegt etwas unter dem Bereich der auf leukämischen Blasten detektiert wurde, die Expression von  $4,1 \cdot 10^4$  Antigenen pro Zelle von Klon 128A10s liegt im oberen Bereich. HLA-I ist

mit  $1,8 \cdot 10^5$  ( $\pm 8,4 \cdot 10^4$ ) Antigenen pro Zelle auf den verschiedenen MCF-7-CD19tm-Transfektanten exprimiert und liegt in dem Bereich der auf leukämischen Blasten detektiert wurde.

### 3.1.2.2 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegenüber CD19-Transfektanten

Um die zellvermittelte Zytotoxizität von Effektorzellen in Abhängigkeit der CD19-Expression auf Zielzellen zu untersuchen, wurden Impedanz-basierte Echtzeit-Zytotoxizitätstests (xCELLigence) mit den verschiedenen CD19-Transfektanten und PBMC von 3 gesunden Spender durchgeführt. Hierzu wurden MCF-7-CD19tm Zellen ausgesät und, nach einer Expansion dieser, die Effektorzellen, 4G7SDIE sowie der Kontrollantikörper 4G8DEM, der das auf MCF-7 nicht exprimierte Antigen FLT3 bindet, zugegeben. Die Impedanz wurde in Form des dimensionslosen CIs über einen Zeitraum von weiteren 72 h gemessen (**Bild 3-4A**). Die CIs wurden auf den Zeitpunkt der Zugabe normalisiert. Aus den normalisierten CIs wurde die ADCC, bezogen auf die Zugabe von Effektorzellen ohne Antikörper, berechnet (**Bild 3-4B**). Die ADCC zu ausgewählten Zeitpunkten wurde gegen die CD19-Antigendichte auf den Zielzellen aufgetragen und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. In **Bild 3-4C** ist die Korrelation mit der ADCC von 10 h nach Zugabe der Effektorzellen dargestellt. Es konnte für alle analysierte Spender eine signifikant positive Korrelation zwischen CD19-Expression und 4G7SDIE-vermittelter ADCC gezeigt werden. Auch für die analysierten Zeitpunkte von 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Zugabe der Effektorzellen konnte für alle Spender eine signifikant positive Korrelation von CD19-Antigenexpression mit 4G7SDIE-vermittelter ADCC beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



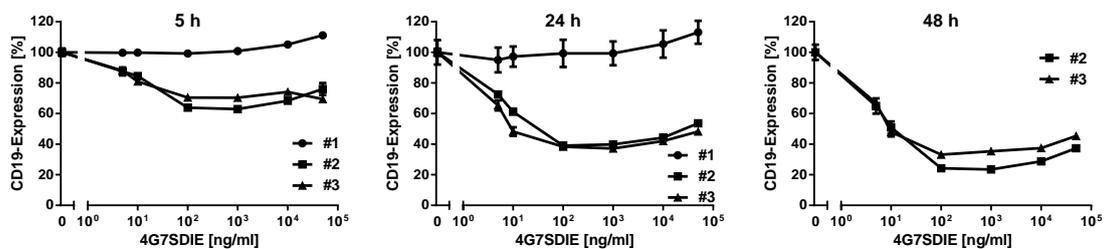
**Bild 3-4: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen MCF-7-CD19-Transfektanten.** (A) 5.000 MCF-7-CD19<sup>tm</sup> Zellen wurden in 96-Kavitäten E-Platten ausgesät. Nach 22 h (gestrichelte Linie,  $t_0$ ) wurden PBMC im E:T 20:1 (grün) sowie PBMC (20:1) und Antikörper 4G7SDIE [10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] (blau) oder PBMC (20:1) und Kontrollantikörper 4G8DEM [10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] (violett), dessen Antigen nicht auf den MCF-7 Zellen exprimiert wird, zugegeben. Die Impedanz wurde im Abstand von 30 min für weitere 72 h bestimmt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf die Impedanzwerte von  $t_0$  normalisiert und der dimensionslose normalisierte CI auf der y-Achse aufgetragen. Der repräsentative Spender #2 aus 3, in unabhängigen Experimenten

analysierten Spendern, ist dargestellt. Der Mittelwert dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt. **(B)** Die ADCC wurde für 12 h nach Zugabe der Effektorzellen berechnet und ist exemplarisch für Spender 2 von 3 in unabhängigen Experimenten analysierten Spendern dargestellt. Der Mittelwert dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt. **(C)** Die ADCC aller analysierten Spender ( $n = 3$ ) zum Zeitpunkt  $t = 10$  h nach Zugabe der Effektorzellen wurde gegen die CD19-Antigenexpression der MCF7-CD19-Transfektanten aufgetragen. Der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente zur Bestimmung der CD19-Antigenexpression, sowie der Mittelwert technischer Replikate zur Bestimmung der ADCC, sind dargestellt. Eine statistische Analyse auf die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ergab folgende Werte: Spender 1: spearman  $r = 0,95$  (\*\*\*), Spender 2: spearman  $r = 0,93$  (\*\*\*), Spender 3: spearman  $r = 0,90$  (\*\*).

### 3.1.3 4G7SDIE-induzierte Modulation der CD19-Oberflächenexpression

#### 3.1.3.1 CD19-Antigenmodulation durch 4G7SDIE

Die Modulation oder der Antigenverlust unter der Behandlung mit therapeutischen Antikörpern ist ein häufig beobachtetes Phänomen, welches die Vermittlung der Effektorfunktionen eines Antikörpers negativ beeinflussen könnte. Deshalb wurde die, durch die Bindung von 4G7SDIE induzierte, Veränderungen der CD19-Expression auf der Zelloberfläche untersucht. Hierzu wurden leukämische Blasten von 3 BCP-ALL Patienten mit verschiedenen Konzentrationen von 4G7SDIE über 5 h, 24 h und 48 h inkubiert. Anschließend wurde nach einer FACS-Färbung mit sättigenden Konzentrationen von 4G7SDIE und einem R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment in einer durchflusszytometrischen Analyse die residuale CD19-Oberflächenexpression bestimmt.



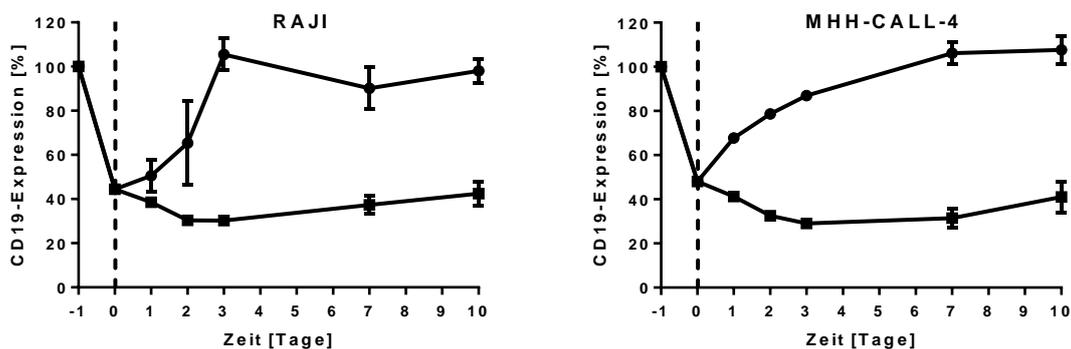
**Bild 3-5: CD19-Antigenmodulation auf leukämischen Blasten durch 4G7SDIE.**  $2,5 \cdot 10^5$  leukämische Blasten wurden mit 4G7SDIE Konzentrationen von 5 ng/ml bis 50  $\mu$ g/ml für 5 h, 24 h oder 48 h inkubiert. Nach einer anschließenden FACS-Färbung mit 2  $\mu$ g/ml 4G7SDIE und einem R-PE-konjugiertem Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die relative CD19-Oberflächenexpression bezogen auf die detektierte Fluoreszenz auf der unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt.

Eine verminderte CD19-Oberflächenexpression drückt sich in einer Beeinträchtigung des detektierten Fluoreszenzsignals aus. Bezogen auf das Fluoreszenzsignal, welches auf nicht mit 4G7SDIE behandelten Proben detektiert wurde, wurde die residuale CD19-Expression kalkuliert. Die beobachtete CD19-Modulation war bei den analysierten leukämischen Blasten sehr unterschiedlich. Nach 5 h 4G7SDIE-Exposition war eine von der 4G7SDIE Konzentration abhängige Antigenmodulation im Fall von Blast #2 und Blast #3 zu beobachten. Jedoch wurde die

CD19-Oberflächenexpression von Blast #1 durch die Bindung von 4G7SDIE nicht beeinträchtigt. Nach 24 h Exposition war die noch detektierbare CD19-Oberflächenexpression geringer als nach 5 h, nach 48 h war die Antigenmodulation nicht wesentlich höher als nach 24 h. Aufgrund einer limitierten Verfügbarkeit von Zellen des Blast #1 konnte hier kein 48 h Wert bestimmt werden.

### 3.1.3.2 Rekonstitution der CD19-Oberflächenexpression

Nachdem eine Antigenmodulation durch 4G7SDIE auf leukämischen Blasten beobachtet wurde, die durch verlängerte Inkubation zwar nicht verstärkt wurde, jedoch erhalten blieb, stellte sich die Frage ob es sich um eine transiente oder dauerhafte Modulation handelt. Hierzu wurde, nach einer 24 h Inkubation der Zielzellen mit 1 µg/ml 4G7SDIE, der Antikörper durch Waschen der Zellen entfernt oder im Kulturmedium belassen und die residuale CD19-Oberflächenexpression, wie in 3.1.3.1 beschrieben, an mehreren Zeitpunkten bestimmt. Zunächst wurden primäre BCP-ALL Blasten als Zielzellen eingesetzt. Aufgrund der kurzen Kultivierbarkeit primärer Blasten scheiterte dieser Ansatz jedoch (Daten nicht gezeigt).



**Bild 3-6: CD19-Rekonstitution auf leukämischen Zelllinien.**  $2,5 \cdot 10^5$  bestrahlte MHH-CALL-4 (25 Gy) oder RAJI (100 Gy) wurden mit 1 µg/ml 4G7SDIE für 24 h inkubiert, anschließend gewaschen (Tag 0, ---) und ohne 4G7SDIE weiter kultiviert (●). Eine Kontrolle wurde nicht gewaschen, so dass 4G7SDIE weiterhin im Kulturmedium vorhanden war (■). An den markierten Zeitpunkten wurden FACS-Färbungen mit 2 µg/ml 4G7SDIE und einem R-PE-konjugiertem Ziege anti-human Fc-spezifischen  $F(ab')_2$  Fragment durchgeführt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert sowie die relative CD19-Oberflächenexpression bezogen auf die detektierte Fluoreszenz auf der unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt.

Alternativ wurde der Ansatz mit den Zelllinien RAJI und MHH-CALL-4 durchgeführt, welche in Vorversuchen, im Gegensatz zu NALM-16 und DAUDI, eine ausgeprägte Antigenmodulation zeigten. Um eine Proliferation der Zelllinien zu verhindern wurden diese bestrahlt. Nach 24 h ist die residuale CD19-Expression bei beiden Zelllinien auf etwa 50 % der ursprünglichen Expression reduziert (**Bild 3-6**). Bleibt der Antikörper im Kulturmedium, wird dieses Level an Modulation über den analysierten Zeitraum erhalten. Wird jedoch der im Kulturmedium vorhandene 4G7SDIE entfernt, kommt es zu einer Rekonstitution der

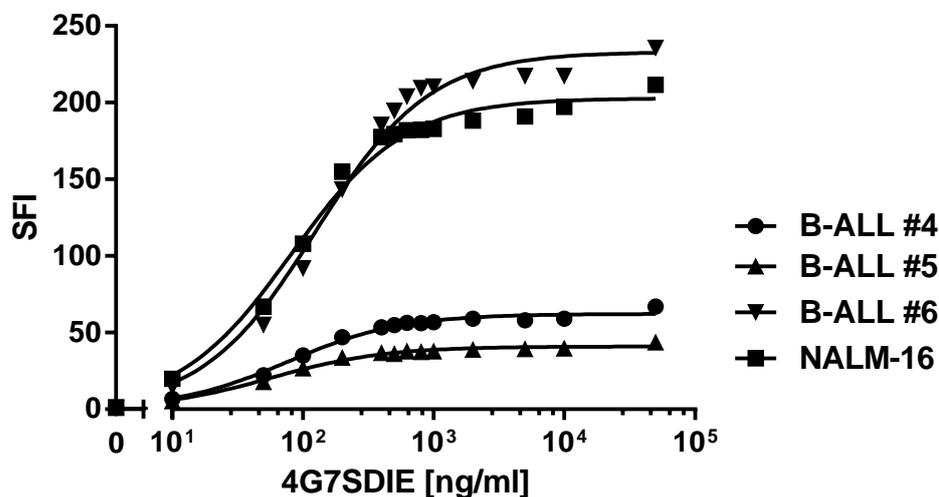
CD19-Oberflächenexpression. Nach 3 Tagen ist die ursprüngliche CD19-Expression der Zelllinie RAJI, nach 7 Tagen die der MHH-CALL-4, wieder erreicht.

## 3.2 Präklinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE

Zur Evaluation des CD19-Antikörpers 4G7SDIE zur potentiellen immuntherapeutischen Behandlung der MRD der BCP-ALL wurde dieser präklinisch charakterisiert.

### 3.2.1 Analyse der Antigenbindung 4G7SDIE auf leukämischen Blasten

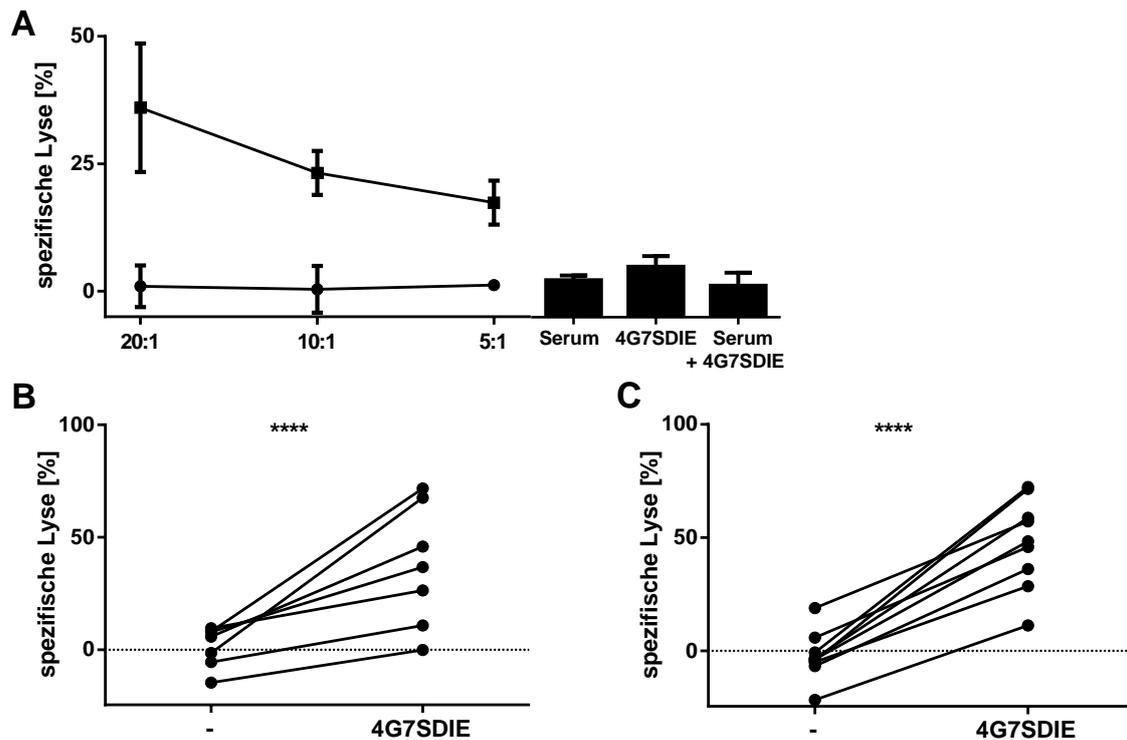
Die CD19-Antigenbindung des Antikörpers 4G7SDIE wurde auf BCP-ALL Blasten und der Zelllinie NALM-16 durchflusszytometrisch analysiert (**Bild 3-7**). Die Bindungsanalyse ergab für 4G7SDIE die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) von 77 ng/ml bei B-ALL#4, 57 ng/ml bei B-ALL#5, 126 ng/ml bei B-ALL#5 und 82 ng/ml bei NALM-16. Daraus ergibt sich ein mittlerer  $K_d$  von 86 ng/ml ( $\pm 29$ ). Bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$  ist die Sättigung erreicht. In den weiteren *in vitro* Experimenten wurden deshalb Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE eingesetzt.



**Bild 3-7: Bindung von 4G7SDIE auf BCP-ALL Blasten und NALM-16.**  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen 4G7SDIE inkubiert. Die Anfärbung von 4G7SDIE erfolgte durch ein R-PE-konjugiertes Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment. Die Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD10-PerCp und CD34-APC auf CD10<sup>+</sup> und/oder CD34<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die spezifische Fluoreszenzintensität (SFI) durch Division des MFIs der Probe durch den MFI der nur mit Sekundärantikörper gefärbten Kontrolle bestimmt. Die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) wurden durch eine Regressionsanalyse bestimmt.

### 3.2.2 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegenüber der Zelllinie MHH-CALL-4

Es wurde in 2 h DELFIA EuTDA-Tests die Kapazität zur ADCC durch 4G7SDIE gegen die pädiatrische Leukämiezelllinie MHH-CALL-4 mit Effektorzellen gesunder Spender untersucht. Die eingesetzten Effektor-zu-Zielzellverhältnisse („effector to target ratio“, E:T) waren 20:1, 10:1 und 5:1.



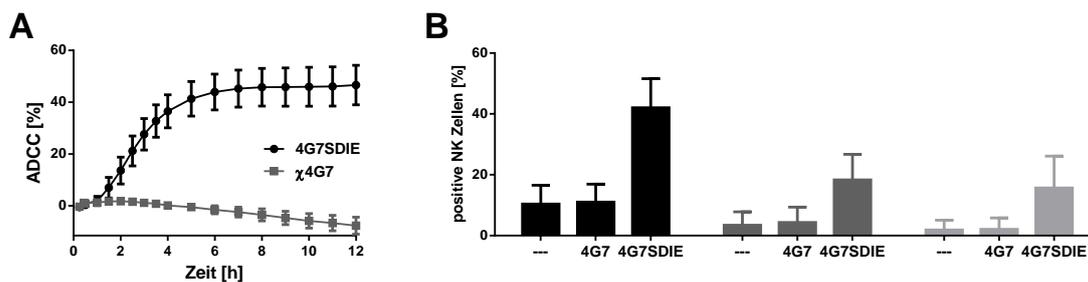
**Bild 3-8: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen MHH-CALL-4.** (A) 5.000 BATDA-markierte MHH-CALL-4 wurden mit PBMC (●) oder PBMC und 4G7SDIE [1 µg/ml] (■) 2 h inkubiert. Für die Komplementlysekontrolle und Detektion der direkten Zytotoxizität durch 4G7SDIE wurden Zielzellen ohne Effektorzellen mit Serum des PBMC-Spenders, 4G7SDIE oder Serum mit 4G7SDIE [1 µg/ml] inkubiert. Das freigesetzte TDA wurde im Komplex mit Europium fluorometrisch quantifiziert und die spezifische Lyse berechnet. Es ist ein repräsentatives Experiment aus 24 dargestellt. Der Mittelwert dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt. (B) BATDA-markierte MHH-CALL-4 wurden mit PBMC von 7 Spendern oder PBMC und 4G7SDIE [1 µg/ml] in 2 h EuTDA-Zytotoxizitätstests analysiert. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sind dargestellt. (C) BATDA-markierte MHH-CALL-4 wurden mit PBMC eines Spenders oder PBMC und 4G7SDIE [1 µg/ml] in 2 h EuTDA-Zytotoxizitätstests analysiert. Die einzelnen Tests (n = 9) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Der Mittelwert dreier technischer Replikate ist dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

Komplement-vermittelte Lyse oder direkte Zytotoxizität durch 4G7SDIE wurde in keinem der durchgeführten Tests detektiert und ist beispielhaft in **Bild 3-8A** dargestellt. Die einzige Effektorfunktion von 4G7SDIE ist die ADCC. Je höher das E:T-Verhältnis war, umso höher war auch die spezifische Lyse (**Bild 3-8A**). In **Bild 3-8B** ist die spezifische Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 von 7 verschiedenen Spendern dargestellt. **Bild 3-8C** zeigt die spezifische Lyse durch PBMC desselben Spenders zu verschiedenen Testzeitpunkten. Je nach Spender, aber auch bei

demselben Spender zu verschiedenen Testzeitpunkten, ergab sich eine starke Varianz in der Vermittlung von ADCC durch 4G7SDIE. Es konnte jedoch in allen Fällen eine Erhöhung der Zelllyse durch 4G7SDIE gezeigt werden.

### 3.2.3 Vergleich des Fc-optimierten 4G7SDIE mit dem chimärisierten $\chi$ 4G7

Die Kapazität des Fc-optimierten Antikörpers 4G7SDIE zur ADCC wurde bereits gezeigt. Um zu untersuchen, ob das nicht-optimierte chimärisierte Pendant,  $\chi$ 4G7, ebenfalls ADCC vermittelt und den Einfluss der Fc-Optimierung zu bestimmen, wurden Impedanz-basierte Echtzeit-Zytotoxizitätstests (xCELLigence) sowie CD107a-Degranulationstests in Kombination mit einem ICS durchgeführt. CD107a wird auf Zelloberflächen von Effektorzellen transient exprimiert, wenn es zu einer Degranulation dieser kommt. CD107a dient somit als ein Surrogatmarker für Zytotoxizität von Effektorzellen welcher durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Eine weitere Effektorfunktion ist die Produktion von Zytokinen wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  welche in demselben Ansatz durch ein ICS analysiert werden kann.



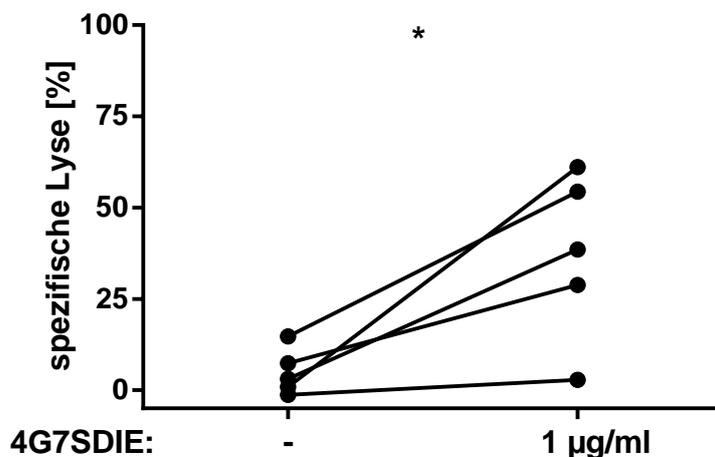
**Bild 3-9: Analyse des Einflusses der Fc-Optimierung von 4G7SDIE.** (A) 5.000 MCF-7-CD19<sup>tm</sup> 128A10s Zellen wurden in 96-Kavitäten E-Platten ausgesät und nach 22 h wurden PBMC im E:T 20:1 sowie PBMC und Antikörper 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] oder PBMC und nicht-optimierter Antikörper  $\chi$ 4G7 [1  $\mu$ g/ml] zugegeben. Als Negativkontrollen wurden 4G8DEM [1  $\mu$ g/ml] und  $\chi$ PSMA [1  $\mu$ g/ml] eingesetzt. Die Impedanz wurde im Abstand von 15 min für weitere 48 h bestimmt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf die Impedanzwerte von  $t_0$  normalisiert. Anhand der dimensionslosen normalisierten CIs wurde die ADCC [%] bezogen auf Effektorzellen ohne Antikörperzugabe für ausgewählte Zeitpunkte berechnet. Die Mittelwerte aus 12 unabhängigen Experimenten mit verschiedene Spendern sowie deren SD sind dargestellt. (B)  $0,5 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit  $0,5 \cdot 10^6$  NALM-6, Antikörpern 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] oder  $\chi$ 4G7 [1  $\mu$ g/ml] sowie Brefeldin A und Monensin 16 h inkubiert. Es wurden die Negativkontrollen ohne Zielzellen bzw. ohne Antikörper sowie eine Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin mitgeführt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden CD3-CD56<sup>+</sup> Zellen als NK Zellen definiert und darauf selektioniert. Es wurde die CD107a- (schwarz), TNF $\alpha$ - (grau) sowie die IFN $\gamma$ -Expression (hellgrau) der NK Zellen bestimmt. Die Mittelwerte aus 12 unabhängigen Experimenten mit verschiedene Spendern sowie deren SD sind dargestellt.

Die xCELLigence-Tests wurden mit PBMC 12 gesunder Spender und MCF-7-CD19-Transfektante 128A10s (E:T 20:1) als Zielzellen wie in 3.1.2.2 bereits beschrieben durchgeführt. Für die CD107a/ICS-Tests wurden NALM-6 als Zielzellen (E:T 1:1) mit PBMC 12 gesunder Spender, 1  $\mu$ g/ml Antikörper sowie Monensin und Brefeldin A zur Inhibition der Sekretion von Zytokinen und Internalisierung von CD107a für 16 h bei

37 °C inkubiert. Die Zellen werden nach einer FACS-Färbung sowie intrazellulären Zytokinfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Die verwendeten FACS-Antikörper sind in **Tabelle 2-7: CD107a/ICS-Panel** aufgeführt. Während mit 4G7SDIE eine deutliche ADCC sowie CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression detektiert wurde, vermittelt der nicht-optimierte  $\chi$ 4G7 bei derselben Konzentration von 1  $\mu$ g/ml keine messbare ADCC sowie keine gesteigerte CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression gegenüber der Kontrolle ohne Antikörper.

### 3.2.4 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegenüber leukämischen Blasten

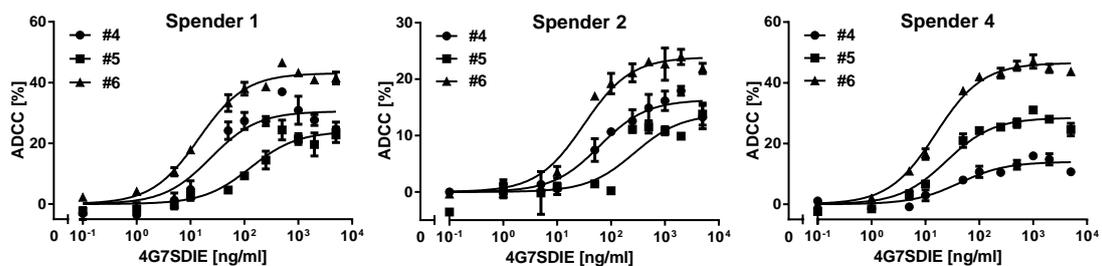
Es wurde in 2 h DELFIA EuTDA-Tests die Kapazität zur ADCC durch 4G7SDIE gegen primäre leukämische Blasten von 5 verschiedenen BCP-ALL Patienten mit Effektorzellen eines gesunden Spenders untersucht. Die E:T-Verhältnisse waren 20:1, 10:1 und 5:1. In **Bild 3-10** ist das E:T-Verhältnis von 20:1 dargestellt. Es konnte gegen primäre Blasten in allen Fällen eine Erhöhung der Zelllyse durch 4G7SDIE gezeigt werden. Es wurde jedoch eine starke Varianz in der Vermittlung von ADCC durch 4G7SDIE gegen die verschiedenen leukämischen Blasten beobachtet.



**Bild 3-10: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen BCP-ALL Blasten.** 5.000 BATDA-markierte leukämische Blasten wurden mit PBMC (E:T 20:1) oder PBMC und 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] in 2 h EuTDA-Zytoxizitätstests analysiert. Die Tests wurden gegen Blasten 5 verschiedener BCP-ALL Patienten mit PBMC eines Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Der Mittelwert dreier technischer Replikate ist dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

### 3.2.5 Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration von 4G7SDIE

Zur Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration von 4G7SDIE zur Lyse von BCP-ALL Blasten wurden 2 h DELFIA EuTDA-Tests gegen 3 primäre leukämische Blasten mit unterschiedlicher CD19-Oberflächenexpression (siehe 3.1.1) mit PBMC 3 gesunder Spender durchgeführt. Das E:T-Verhältnis war 20:1 und es wurden Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 5 µg/ml 4G7SDIE eingesetzt. Bei Konzentrationen von 1 µg/ml ist die maximal mögliche Lyse bei allen Blasten und allen Spendern erreicht. Die mittlere effektive Konzentration („half-maximal effective concentration“, EC<sub>50</sub>) gibt die Antikörperkonzentration an, bei welcher die Hälfte der maximal möglichen Zellen lysiert wurde. Der EC<sub>50</sub> war im Mittel 65 ng/ml (± 55) wobei erneut eine starke Varianz in der Vermittlung von ADCC durch 4G7SDIE gegen die verschiedenen leukämischen Blasten beobachtet wurde die sich auch in stark variierenden EC<sub>50</sub>-Werten widerspiegelte.



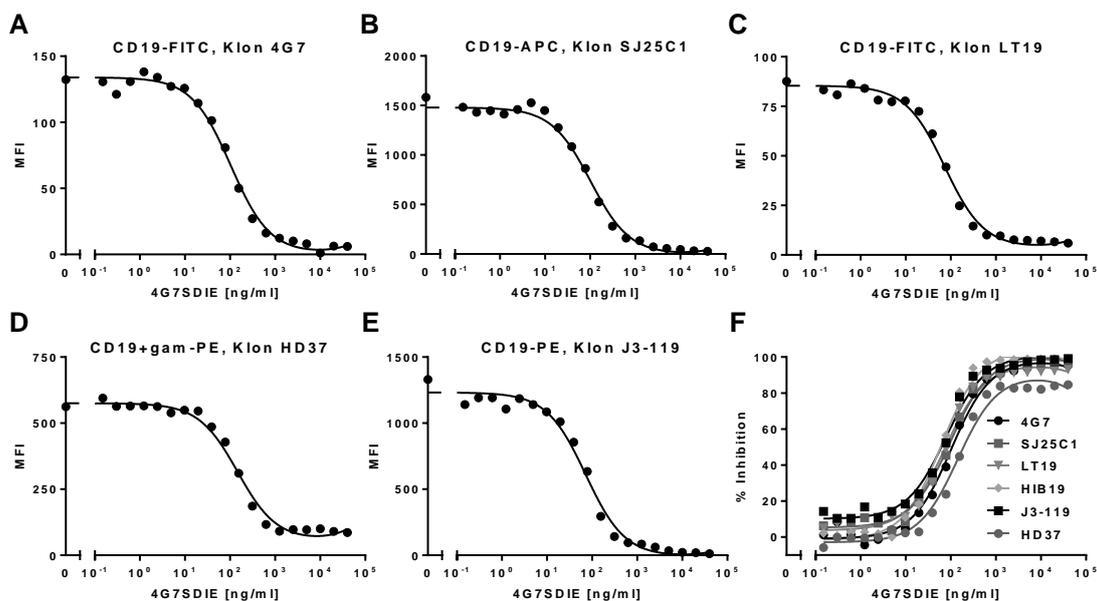
**Bild 3-11: Halbmaximale Lyse von BCP-ALL Blasten durch 4G7SDIE-vermittelte ADCC.** 5.000 BATDA-markierte leukämische Blasten wurden mit PBMC (E:T 20:1) oder PBMC und 4G7SDIE in Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 5 µg/ml in 2 h EuTDA-Zytoxizitätstests analysiert. Die Tests wurden gegen 3 verschiedene BCP-ALL Blasten mit PBMC 3 gesunder Spender durchgeführt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt.

Gegen BCP-ALL Blast #6 wurde von allen Spendern die stärkste ADCC vermittelt und die EC<sub>50</sub>-Werte lagen im Mittel bei 27 ng/ml (± 8). Dieser Blast exprimiert die höchste CD19-Antigendichte der analysierten Blasten (siehe 3.1.1). Die EC<sub>50</sub>-Werte für Blast #5, der die niedrigste CD19-Oberflächenexpression hat, lagen im Mittel bei 116 ng/ml (± 74). Für Blast #4 wurden im Mittel EC<sub>50</sub>-Werte von 53 ng/ml (± 20) bestimmt. Spender 1 und Spender 4 vermittelten insgesamt eine ausgeprägtere ADCC als Spender 2 gegen dieselben Blasten. Außerdem wurde beobachtet, dass Spender 4, im Gegensatz zu Spender 1 und Spender 2, gegen Blast #5 eine stärkere ADCC vermittelte als gegen Blast #4, welcher eine höhere CD19-Antigendichte trägt.

### 3.2.6 Charakterisierung des Epitops von 4G7SDIE durch Kreuzblockierungsstudien

Die durchflusszytometrische Analyse der CD19-Expression auf Patientenzellen zur Detektion normaler B Zellen sowie leukämischer Blasten ist Teil der Routineuntersuchungen im Therapieverlauf. Bei 4G7SDIE-behandelten Patienten konnte in Routine-FACS-Analysen keine CD19-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte einerseits auf das Nichtvorhandensein von B Zellen als auch leukämischen Blasten im Patienten zurück zu führen sein, aber auch auf die, durch gebundenen 4G7SDIE aus dem Patientenserum, Maskierung des Epitops.

Um zu untersuchen, ob es einen CD19-Antikörper gibt, der ein von 4G7SDIE unabhängiges Epitop bindet, wurden Kreuzblockierungsstudien auf der Zelllinie NALM-16 durchgeführt.



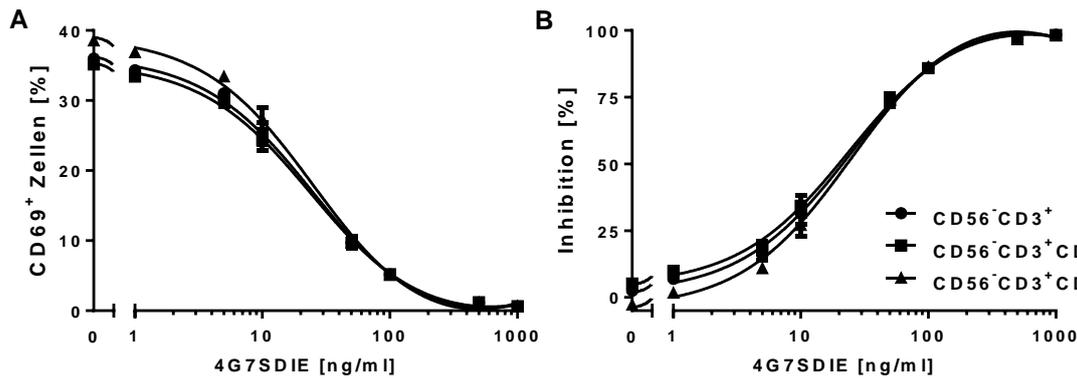
**Bild 3-12: Kreuzblockierungsexperimente mit CD19-Antikörpern.**  $2,5 \cdot 10^5$  NALM-16 wurden mit 0,01 ng/ml bis 40  $\mu$ g/ml 4G7SDIE vorinkubiert, anschließend mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Kreuzblockierung von 4G7-PE durch 4G7SDIE als Positivkontrolle. (B) Kreuzblockierung von SJ25C1-APC durch 4G7SDIE. (C) Kreuzblockierung von LT19-FITC durch 4G7SDIE. (D) Kreuzblockierung von HD37 durch 4G7SDIE. (E) Kreuzblockierung von J3-119-PE durch 4G7SDIE. (F) Zusammengefasste Inhibition der analysierten CD19-Antikörper durch 4G7SDIE. % Inhibition =  $100 - (MFI \text{ Probe} / MFI \text{ Kontrolle ohne 4G7SDIE}) \cdot 100$ .

Es wurden  $2,5 \cdot 10^5$  NALM-16 Zellen mit 4G7SDIE in Konzentrationen von 0,01 ng/ml bis 40  $\mu$ g/ml vorinkubiert. Der eingesetzte Antikörper kann währenddessen unbeeinträchtigt auf dem CD19-Antigen binden. Anschließend wurde entweder ein Fluorochrom-konjugierter CD19-Antikörper oder ein unkonjugierter muriner CD19-Antikörper zugegeben. Bei Letzterem wird der murine Antikörper durch einen R-PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG spezifischen Antikörper angefärbt. Die gefärbten

Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Der später zugegebene Antikörper konkurriert nun im Falle eines überlappenden Epitops mit dem zuerst eingesetzten Antikörper um eine Antigenbindung, was sich in einer konzentrationsabhängigen Beeinträchtigung des Fluoreszenzsignals in der durchflusszytometrischen Analyse ausdrückt. In Kreuzblockierungsexperimenten mit den Antikörpern SJ25C1, LT 19, HD37 und J3-119 ist eine von der 4G7SDIE-Konzentration abhängige Beeinträchtigung des Fluoreszenzsignals von allen getesteten Antikörpern zu beobachten (**Bild 3-12B,C,D,E**). Diese ist vergleichbar mit der konzentrationsabhängigen Verringerung des Fluoreszenzsignals, die durch eine Vorinkubation mit 4G7SDIE und Detektion durch denselben Klon, 4G7, verursacht wird (**Bild 3-12A**). Wird die prozentuale Inhibition durch 4G7SDIE berechnet, wird deutlich, dass es zu einer vollständigen Verdeckung der Epitope der getesteten CD19-Antikörper kommt (**Bild 3-12F**). Es konnte somit gezeigt werden, dass der Antikörper 4G7SDIE ein mit den Antikörpern SJ25C1, LT 19, HD37 und J3-119 überlappendes Epitop des CD19-Antigens erkennt. Die Epitope müssen nicht dieselben sein, sind aber nicht unabhängig voneinander.

### 3.2.7 Kreuzblockierungsstudien zur Inhibition von Blinatumomab durch 4G7SDIE

Die Kreuzblockierungsexperimente mit den Antikörpern HD37 und 4G7SDIE haben gezeigt, dass diese beiden Antikörper nicht voneinander unabhängige Epitope erkennen. Da das CD19-bindende scFv-Fragment des BiTEs Blinatumomab von dem Antikörper HD37 abgeleitet ist (siehe 2.1.10), wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass die Wirkung von Blinatumomab bzw. die Bindung von Blinatumomab an CD19-exprimierende Zielzellen durch 4G7SDIE inhibiert werden könnte. Zur Überprüfung ob 4G7SDIE mit Blinatumomab um Antigenbindungsstellen konkurriert, wurde eine Methode zur Serumtiterbestimmung von Blinatumomab modifiziert<sup>223</sup>. Hierbei wird die Konkurrenz von 4G7SDIE und Blinatumomab über die T-Zellaktivierung durch Blinatumomab analysiert. Es wurden  $1 \cdot 10^6$  PBMC eines gesunden Spenders, welche CD19-positive B Zellen als Zielzellen für die 4G7SDIE- und Blinatumomab-Bindung enthalten, mit Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1 µg/ml 4G7SDIE vorinkubiert und anschließend mit 1 ng/ml Blinatumomab, was den maximal erreichten Serumspiegeln *in vivo* entspricht, 18 h bei 37 °C inkubiert. In einer anschließenden FACS-Analyse wurde die T-Zellaktivierung durch Blinatumomab bestimmt. Die eingesetzten Antikörper sind in **Tabelle 2-9: T-Zellaktivierungspanel** aufgeführt.



**Bild 3-13: Funktionelle Kreuzblockierung von Blinatumomab durch 4G7SDIE.**  $1 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit 1 ng/ml bis 1  $\mu$ g/ml 4G7SDIE vorinkubiert und anschließend mit 1 ng/ml Blinatumomab 18 h inkubiert. In einer anschließenden FACS-Analyse wurde der Anteil CD69-positiver T Zellen bestimmt. Als Negativkontrolle wurde eine PBMC-Probe ohne Zugabe von 4G7SDIE oder Blinatumomab mitgeführt. (A) Der Anteil CD69-positiver Zellen wurde auf T Zellen, selektioniert auf CD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> oder CD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, bestimmt. Die Negativkontrolle wurde von allen Werten dividiert. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie die zugehörigen Standardabweichungen (SD) sind dargestellt. (B) Die prozentuale Inhibition der maximal möglichen T-Zellaktivierung ist dargestellt. % Inhibition =  $100 - (\% \text{ CD69}^+ \text{ T Zellen Probe} / \% \text{ CD69}^+ \text{ T Zellen ohne 4G7SDIE}) \cdot 100$ .

Es wurde eine von der 4G7SDIE-Konzentration abhängige Beeinträchtigung des Anteils CD69-positiver T Zellen, definiert durch Selektion auf CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>, beobachtet (**Bild 3-13A**). Die Anzahl CD69-positiver T-Zellen war bei sättigenden Konzentrationen von 4G7SDIE nicht höher als bei nicht durch Blinatumomab stimulierten T-Zellen. Wird die prozentuale Inhibition durch 4G7SDIE berechnet, wird deutlich, dass es zu einer vollständigen Verdeckung des Epitops von Blinatumomab durch 4G7SDIE kommt (**Bild 3-13B**). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) gibt die Konzentration eines Inhibitors an, bei welcher eine halbmaximale Inhibition wird und lag bei 28 ng/ml. Somit reichen Konzentrationen von 28 ng/ml 4G7SDIE aus, um 50 % der CD19-abhängigen T-Zellaktivierung durch Blinatumomab zu inhibieren. Darüber hinaus inhibieren 4G7SDIE Konzentrationen über 100 ng/ml die CD19-abhängige T-Zellaktivierung durch Blinatumomab nahezu vollständig.

### 3.2.8 Untersuchung der ADCC von NK Zellen und $\gamma\delta$ -T Zellen

In den bisherigen Experimenten wurden als Effektorzellen meist PBMC eingesetzt. Die darin vorkommende Subpopulation der NK Zellen ist der prominenteste ADCC-vermittelnde Zelltyp. Der ADCC vermittelnde Rezeptor Fc $\gamma$ RIIIa wird neben NK Zellen auf Monozyten, Makrophagen und  $\gamma\delta$ -T Zellen exprimiert. Um zu untersuchen ob  $\gamma\delta$ -T Zellen mit den Antikörpern 4G7SDIE und N19-C16 ebenso ADCC vermitteln können, wurden sowohl mit primären als auch expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen CD107a/ICS-Tests und xCELLigence-Tests durchgeführt. Diese Daten wurden bereits publiziert <sup>268</sup>.

### 3.2.8.1 Expansion von CD16<sup>+</sup> $\gamma\delta$ -T Zellen

PBMC 6 gesunder Spender wurden 12 – 14 Tage mit Proleukin S IL-2 und Zoledronsäure nach einem GMP-geeigneten Protokoll kultiviert um  $\gamma\delta$ -T Zellen zu expandieren. Die Isolation der expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen erfolgte durch eine positive MACS-Selektion und nach Bestimmung der Reinheit der isolierten  $\gamma\delta$ -T Zellen mittels FACS-Analyse mit den Antikörpern aus **Tabelle 2-10:  $\gamma\delta$ -T Zellpanel** wurden die aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T Zellen in Proleukin S IL-2 supplementiertem Medium über Nacht kultiviert, wodurch die FITC-Markierung durch die positive MACS-Separation verloren und die TCR $\gamma\delta$ -Oberflächenexpression wieder hergestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Negativselektion der  $\gamma\delta$ -T Zellen war nicht möglich, da das verfügbare Negativselektionskit CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T Zellen depletiert (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation, Miltenyi Biotec) und alternative Strategien mit selbst zusammengestellten Antikörpercocktails keine ausreichende Reinheit erzielten (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 3-1: Expansion humaner  $\gamma\delta$ -T Zellen**

	$\gamma\delta$ -T Zellen vor Exp. [%]	Exp. tage	$\gamma\delta$ -T Zellen nach Exp. [%]	CD16 <sup>+</sup> $\gamma\delta$ -T Zellen nach Exp. [%]	Expansion aller Zellen	Expansion $\gamma\delta$ -T Zellen
#1	2,24	13	35,9	22,70	0,93	14,84
#2	1,60	13	43,8	30,26	1,12	30,66
#3	4,51	14	60,6	35,10	2,13	28,59
#4	1,20	13	33,8	28,90	0,88	24,84
#5	5,18	13	32,0	24,00	1,01	6,22
#6	2,50	12	48,0	18,32	1,57	30,13
Ø	<b>2,87</b>	<b>13</b>	<b>42,35</b>	<b>26,55</b>	<b>1,27</b>	<b>22,55</b>
SD	<b>1,61</b>	<b>0,63</b>	<b>10,85</b>	<b>6,02</b>	<b>0,49</b>	<b>9,91</b>

#: Spendernummer; Ø: Mittelwert; SD: Standardabweichung

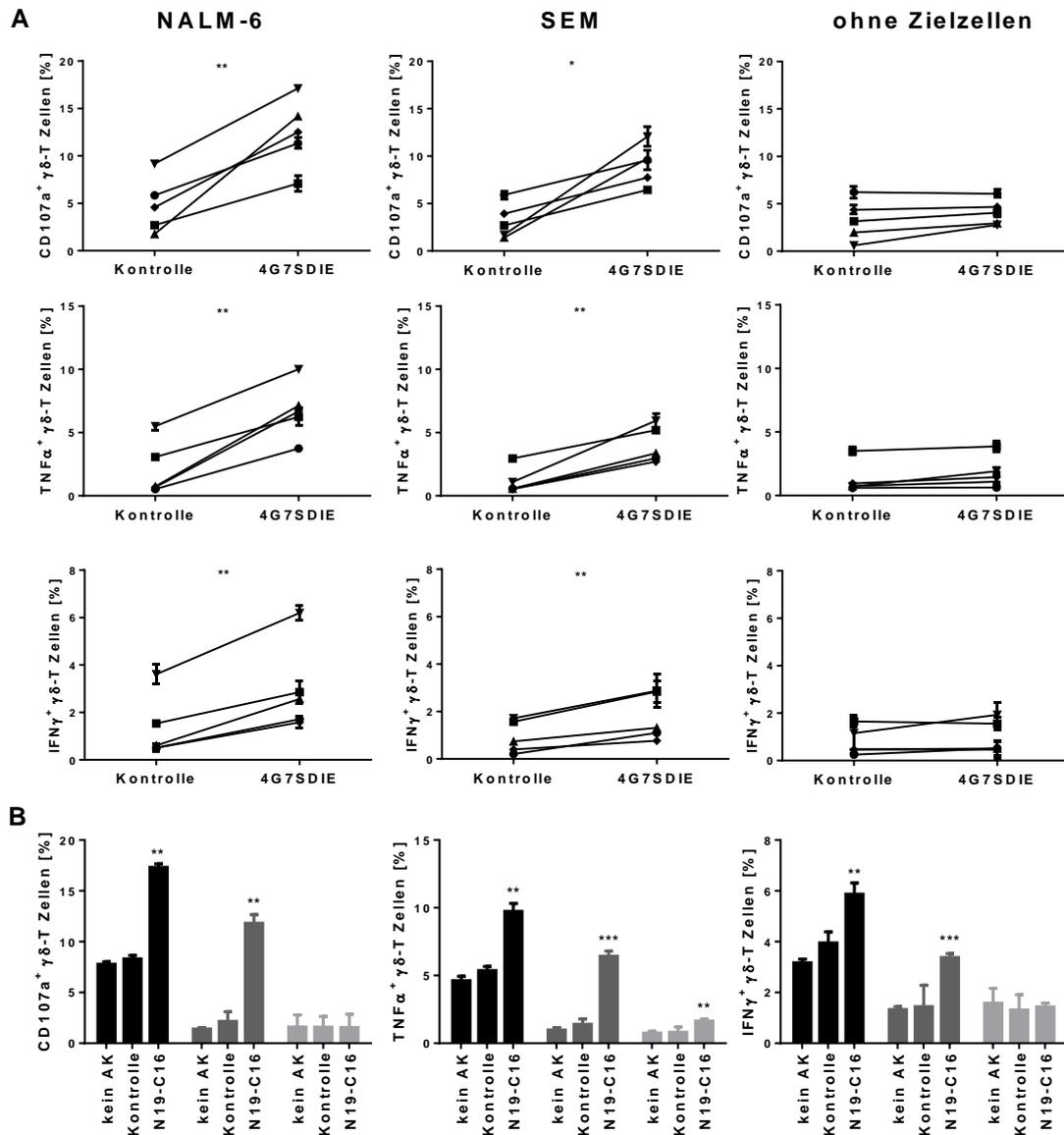
Die  $\gamma\delta$ -T Zellen konnten von 2,87 % ( $\pm 1,48$ ) der eingesetzten PBMC auf 42,35 % ( $\pm 10,85$ ) der expandierten Zellen angereichert werden. Es wurde eine 1,27-fache ( $\pm 0,49$ ) Expansion der gesamten Zellen und eine 22,55-fache Expansion der  $\gamma\delta$ -T Zellen erreicht. Der Anteil CD16-positiver  $\gamma\delta$ -T Zellen nach Expansion war 26,55 % ( $\pm 6,02$ ) (**Tabelle 3-1**).

### 3.2.8.2 Indirekte Detektion der ADCC in CD107a/ICS-Test

Aufgrund des niedrigen Anteils von  $\gamma\delta$ -T Zellen in PBMC Proben (**Tabelle 3-1**) erfordert die Isolation von genügend  $\gamma\delta$ -T Zellen für direkte Zytotoxizitätstests wie 2 h EuTDA Tests und xCELLigence-Tests große Zellmengen. Eine, für geringe Zellzahlen geeignete, Methode zur indirekten Detektion der Zytotoxizität und Zytokinsekretion von  $\gamma\delta$ -T Zellen ist der bereits beschriebene CD107a/ICS-Test.

Hierbei ist keine Isolation der  $\gamma\delta$ -T Zellen erforderlich da die Selektion auf  $\gamma\delta$ -T Zellen mittels FACS-Analyse erfolgt.

### 3.2.8.2.1 Indirekte Detektion der ADCC primärer $\gamma\delta$ -T Zellen



**Bild 3-14: Indirekte Detektion der ADCC primärer  $\gamma\delta$ -T Zellen.**  $0,5 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit  $0,5 \cdot 10^6$  NALM-6 (schwarz), SEM (dunkelgrau) oder ohne Zielzellen (hellgrau) und ohne oder mit Antikörpern 4G7SDIE [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] (A) oder N19-C16 [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] (B) sowie Brefeldin A und Monensin 16 h inkubiert. Es wurde eine Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin mitgeführt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden  $\text{CD}3^+\text{TCR}\gamma\delta^+$  Zellen als  $\gamma\delta$ -T Zellen definiert. In (A) sind die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten sowie die zugehörigen SD aus 5 unabhängigen Experimenten mit 5 verschiedenen PBMC-Spendern dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt. In (B) sind die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten sowie die zugehörigen SD eines repräsentativen Experiments aus 3 unabhängigen Experimenten mit 3 verschiedenen PBMC-Spendern dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

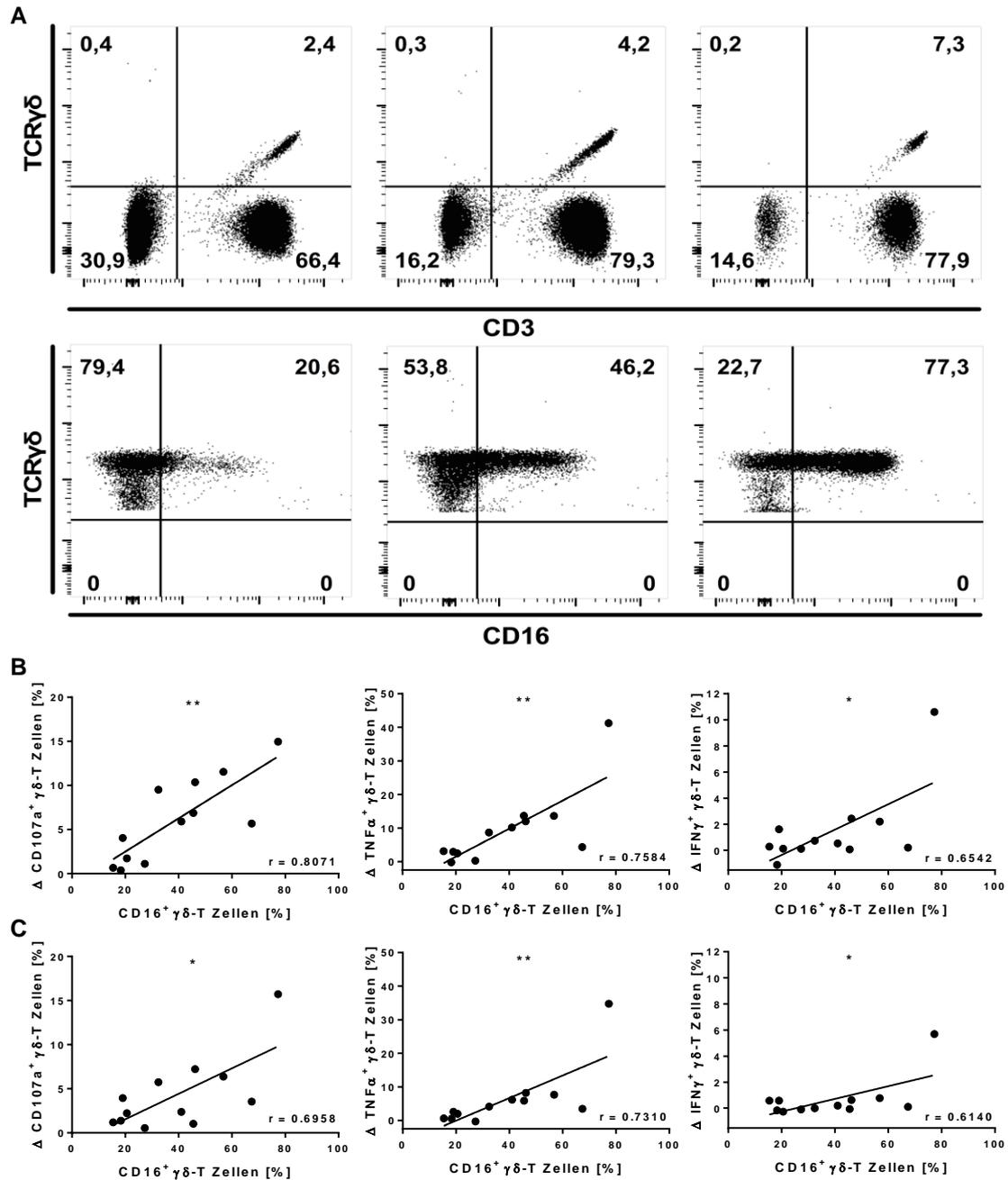
PBMC gesunder Spender wurden mit NALM-6 oder SEM als Zielzellen sowie den Antikörpern 4G7SDIE oder N19-C16 in einem CD107a/ICS-Test inkubiert. Die

$\gamma\delta$ -T Zellen (selektioniert auf CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) wurden mittels FACS-Analyse auf ihre CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression analysiert. Die eingesetzten Antikörper sind in **Tabelle 2-8: CD107a/ICS-Panel- $\gamma\delta$**  aufgeführt. Bei Inkubation mit den Zielzellen alleine sowie mit Antikörpern 4G7SDIE oder N19-C16, aber ohne Zielzellen, wurde die CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression kaum erhöht. Wurde jedoch 4G7SDIE (**Bild 3-14A**) oder N19-C16 (**Bild 3-14B**) zugefügt, war gegen die Zielzellen NALM-6 als auch SEM eine signifikante Steigerung der CD107a- und TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression zu beobachten. Die IFN $\gamma$ -Expression bewegte sich jedoch im niedrigen Prozentbereich. Diese Beobachtungen deuten auf die Fähigkeit von 4G7SDIE und N19-C16 zur Vermittlung von  $\gamma\delta$ -T Zellen-abhängiger ADCC hin.

#### 3.2.8.2.2 Korrelation der CD16-Expression der $\gamma\delta$ -T Zellen mit der vermittelten ADCC

Die CD16-Expression von Effektorzellen konnte aufgrund technischer Limitationen nicht in den CD107a/ICS-Tests detektiert werden, wenn ein therapeutischer Antikörper untersucht wurde. Das Fluoreszenzsignal von CD16 war in den Proben mit Antikörper kaum detektierbar (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die in 3.2.8.2.1 eingesetzten PBMC Proben vor den CD107a/ICS-Tests mithilfe der Antikörper der **Tabelle 2-10:  $\gamma\delta$ -T Zellpanel** auf ihren Anteil CD16-positiver  $\gamma\delta$ -T Zellen analysiert.

In **Bild 3-15A** sind 3 exemplarische PBMC Proben dargestellt. Wie bereits in der Literatur beschrieben, exprimierten die  $\gamma\delta$ -T Zellen ein Kontinuum an CD16<sup>269, 270</sup>. Der mittlere Anteil CD16-positiver  $\gamma\delta$ -T Zellen aller  $\gamma\delta$ -T Zellen war 38,93 % ( $\pm 20,43$ ). Nach Abzug der CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression bei Inkubation mit den Zielzellen alleine von der Expression mit Zielzellen und 4G7SDIE oder N19-C16, wurden die  $\Delta$ CD107a-,  $\Delta$ TNF $\alpha$ - und  $\Delta$ IFN $\gamma$ -Expression gegen den Anteil CD16-positiver  $\gamma\delta$ -T Zellen aufgetragen. Es wurde eine positive Korrelation der CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Expression durch Stimulation mit 4G7SDIE und N19-C16 und dem Anteil CD16-positiver  $\gamma\delta$ -T Zellen beobachtet.

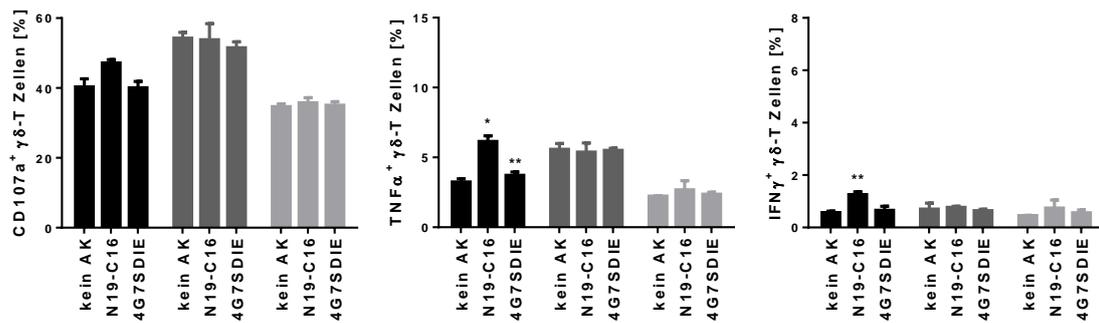


**Bild 3-15: Korrelation der CD16-Expression von  $\gamma\delta$ -T Zellen mit der vermittelten ADCC.** Der CD16-positive Anteil der eingesetzten  $\gamma\delta$ -T Zellen in den PBMC-Proben wurde vor funktionelle Tests durchflusszytometrisch bestimmt. Die Selektionshierarchie war: Lymphozyten, Einzelzellen, lebende Zellen, CD3 $^+$ TCR $\gamma\delta^+$ , TCR $\gamma\delta^+$ CD16 $^+$ . In (A) ist die Selektion für 3 repräsentative Proben dargestellt. Der Anteil CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -positiver CD3 $^+$ TCR $\gamma\delta^+$  Zellen durch Stimulation mit Zielzellen alleine, wurde von dem Anteil CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -positiver CD3 $^+$ TCR $\gamma\delta^+$  Zellen durch Stimulation mit Zielzellen und 4G7SDIE (B) oder N19-C16 (C) abgezogen. Es wurde eine statistische Analyse auf die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt.

### 3.2.8.2.3 Indirekte Detektion der ADCC expandierter $\gamma\delta$ -T Zellen

$\gamma\delta$ -T Zellen wurden, wie bereits beschrieben, aus PBMC expandiert. Anschließend wurde die TCR $\gamma\delta$ -positive Fraktion isoliert, für weitere 24 h kultiviert und anschließend in einen CD107a/ICS-Test mit NALM-6 oder SEM eingesetzt. Es wurde

eine hohe Grundaktivierung von 30 % - 50 % CD107a-positiven  $\gamma\delta$ -T Zellen beobachtet (**Bild 3-16**). Durch 4G7SDIE oder N19-C16 konnte die CD107a-Expression nicht signifikant gesteigert werden. Die TNF $\alpha$ -Expression konnte durch 4G7SDIE und N19-C16 signifikant um wenige Prozent positive Zellen gesteigert werden. Die IFN $\gamma$ -Expression wurde lediglich durch N19-C16 signifikant erhöht, bewegte sich allerdings immer noch im sehr niedrigen Prozentbereich.



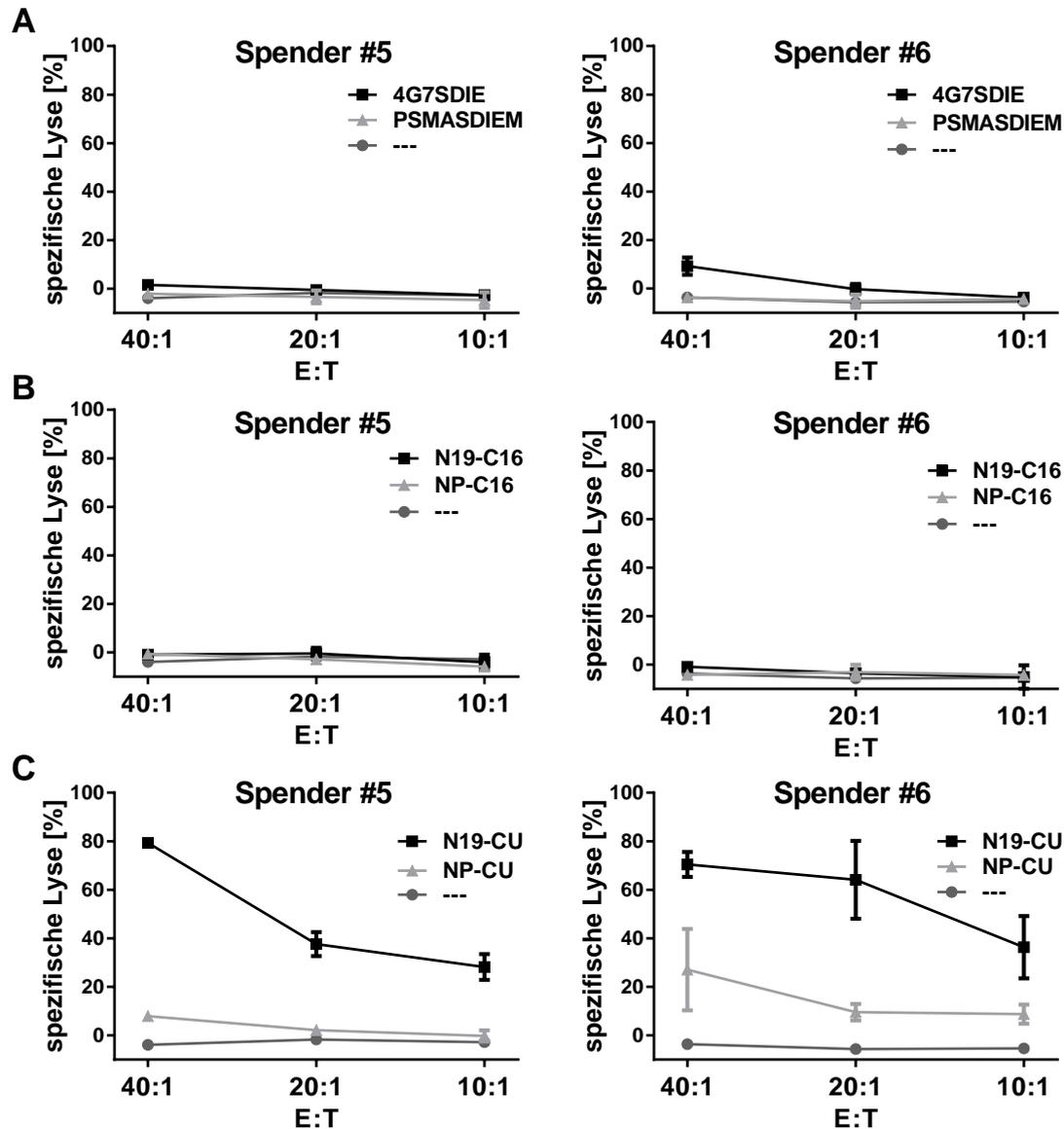
**Bild 3-16: Indirekte Detektion der ADCC expandierter  $\gamma\delta$ -T Zellen.**  $0,5 \cdot 10^6$  expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen wurden mit  $0,5 \cdot 10^6$  NALM-6 (schwarz), SEM (dunkelgrau) oder ohne Zielzellen (hellgrau) und ohne oder mit Antikörpern 4G7SDIE [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] oder N19-C16 [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] sowie Brefeldin A und Monensin 16 h inkubiert. Es wurde eine Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin mitgeführt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen als  $\gamma\delta$ -T Zellen definiert. Es sind die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten sowie die zugehörigen SD dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Student's t-Tests durchgeführt.

### 3.2.8.3 Direkte Detektion der ADCC expandierter $\gamma\delta$ -T Zellen

Über die CD107a/ICS-Tests konnte eine indirekte Zytotoxizität primärer  $\gamma\delta$ -T Zellen mit 4G7SDIE und N19-C16 nachgewiesen werden. Für expandierte  $\gamma\delta$ -T Zellen war diese Methode jedoch nicht geeignet. Außerdem kann in CD107a/ICS-Tests die tatsächliche Zytolyse der Zielzellen nicht gezeigt werden. Hierzu sind die funktionellen Tests wie 2 h EuTDA Tests und xCELLigence-Tests geeignet, erfordern jedoch, da eine Isolation der  $\gamma\delta$ -T Zellen nötig ist, große Zellzahlen. Aufgrund dieser technischen Limitation wurde die direkte ADCC von  $\gamma\delta$ -T Zellen nur mit expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen untersucht.

#### 3.2.8.3.1 Detektion der ADCC in 2 h EuTDA Tests

Nach der Isolation expandierter  $\gamma\delta$ -T Zellen (Reinheit 99,5 %  $\pm$  0,62) und deren weiteren Kultivierung von 24 h zur Wiedererlangung der TCR  $\gamma\delta$ -Expression, wurden 2 h EuTDA Tests mit 4G7SDIE und N19-C16 gegen primäre leukämische Blasten eines BCP-ALL Patienten (#6) durchgeführt. Es wurde durch 4G7SDIE als auch durch N1-C16 keine signifikante Steigerung der Lyse der Zielzellen in diesem Endpunktttest detektiert. Als Positivkontrolle wurde der CD19xCD3 bispezifische Antikörper N19-CU mitgeführt welcher alle T Zellen über CD3 rekrutiert. Dieser steigerte die, ohne Antikörper sehr schwache, Zielzelllyse deutlich (**Bild 3-17**).

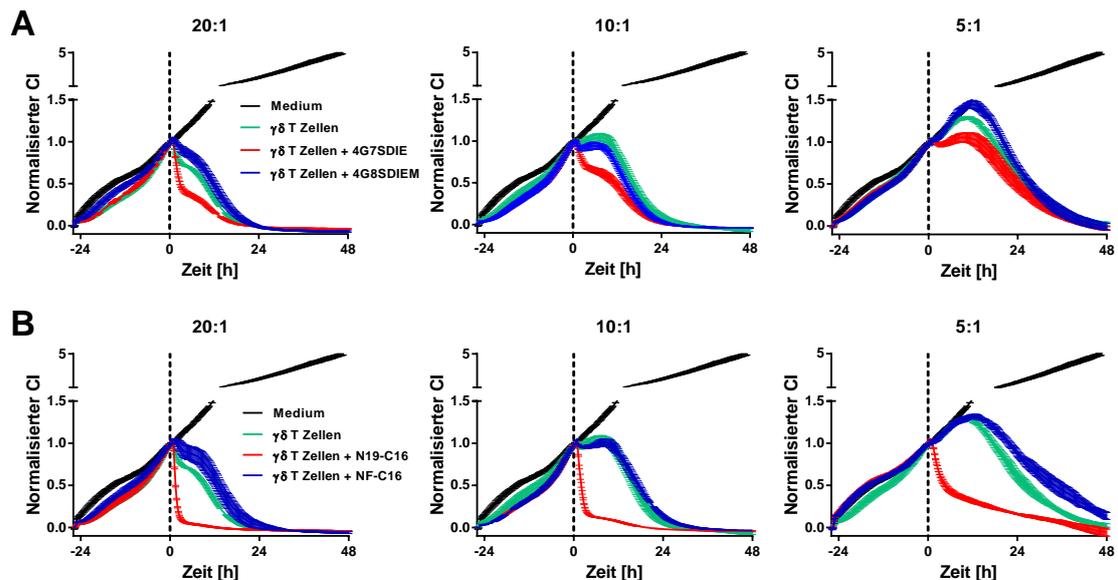


**Bild 3-17: 4G7SDIE-vermittelte ADCC durch expandierte  $\gamma\delta$ -T Zellen gegen BCP-ALL Blasten.** (A) 5.000 BATDA-markierte leukämische Blasten (#6) wurden in verschiedenen E:T-Verhältnissen mit expandierten und isolierten  $\gamma\delta$ -T Zellen und 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] (A), N19-C16 [1  $\mu$ g/ml] (B) oder der Positivkontrolle N19-CU [100 ng/ml] (C) in 2 h EuTDA-Zytoxizitätstests analysiert. Die zu untersuchenden Antikörper (4G7SDIE, N19-C16 oder N19-CU) sind in schwarz dargestellt, die Kontrollantikörper (4G8SDIEM, NP-C16 oder NP-CU) sind in hellgrau dargestellt und die Kontrolle mit expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen ist in dunkelgrau dargestellt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie die zugehörigen SD zweier repräsentativer Spender aus 4 analysierten sind dargestellt.

### 3.2.8.3.2 Detektion der ADCC in xCELLigence-Tests

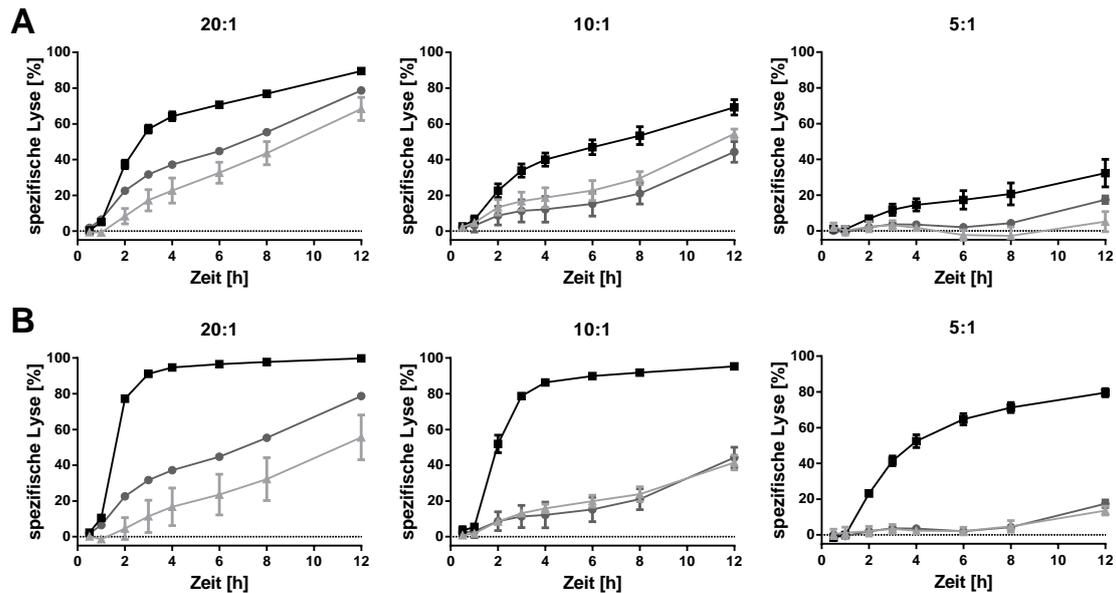
Da der 2 h EuTDA ungeeignet zur Detektion von  $\gamma\delta$ -T Zellen-vermittelter ADCC mit 4G7SDIE und N19-C16 schien, wurden xCELLigence-Tests mit einer deutlich längeren Testlaufzeit und dem Vorteil der Echtzeitmessung der Zelllyse durchgeführt. Hierzu wurde die im Rahmen dieser Arbeit generierte MCF7-CD19tm-128A10s Transfektante eingesetzt, da diese eine ähnliche CD19-Oberflächenexpression wie die in den bisherigen Experimenten eingesetzten NALM-6 und der leukämische Blast #6

trägt (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Hierzu wurden die MCF-7-CD19<sup>tm</sup>-128A10s Zellen ausgesät und nach einer Expansion dieser, wurden expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen sowie Medium, Kontrollantikörper 4G8DEM und NF-C16 die beide das auf MCF-7 nicht exprimierte Antigen FLT3 binden oder 4G7SDIE und N19-C16 zugegeben. Die Impedanz wurde in Form des CIs über einen Zeitraum von weiteren 48 h gemessen und die CIs auf den Zeitpunkt der Zugabe normalisiert (**Bild 3-18**).



**Bild 3-18: Dynamische Analyse der 4G7SDIE-vermittelten ADCC mit expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen.** 5.000 MCF-7-CD19<sup>tm</sup>-128A10s Zellen wurden in 96-Kavitäten E-Platten ausgesät. Nach 25 h (gestrichelte Linie,  $t_0$ ) wurden keine Effektorzellen (schwarz), expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen (grün), expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen und Antikörper 4G7SDIE [1  $\mu\text{g/ml}$ ] (A) oder N19-C16 [1  $\mu\text{g/ml}$ ] (rot) (B) sowie expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen und Kontrollantikörper 4G8DEM [1  $\mu\text{g/ml}$ ] (A) oder NF-C16 [1  $\mu\text{g/ml}$ ] (blau) (B), deren Antigen FLT3 nicht auf den MCF-7 Zellen exprimiert wird, zugegeben. Die Impedanz wurde im Abstand von 15 min für weitere 48 h bestimmt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf die Impedanzwerte von  $t_0$  normalisiert und der dimensionslose normalisierte CI auf der y-Achse aufgetragen. Ein repräsentativer Spender aus 4, in unabhängigen Experimenten analysierten Spendern, ist dargestellt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt.

Es konnte eine vom E:T-Verhältnis abhängige Zielzelllyse durch die expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen in Form von abnehmenden Impedanzwerten beobachtet werden. Die Mediumkontrolle wurde nicht in ihrer Expansion, ausgedrückt durch steigende Impedanzwerte, beeinträchtigt. Abhängig von dem eingesetzten E:T-Verhältnis waren nach 24 h – 48 h alle Zielzellen durch die expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen lysiert. Die Zugabe von 4G7SDIE oder N19-C16 erhöhte die Zielzelllyse beträchtlich was die Fähigkeit der  $\gamma\delta$ -T Zellen zur ADCC mit 4G7SDIE und N19-C16 zeigt. Es fällt auf, dass zu verschiedenen Zeitpunkten die Differenz zwischen der Zielzelllyse durch  $\gamma\delta$ -T Zellen alleine und  $\gamma\delta$ -T Zellen mit 4G7SDIE oder N19-C16 unterschiedlich ist.



**Bild 3-19: Dynamische Analyse der 4G7SDIE-vermittelte ADCC mit expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen.** 5.000 MCF-7-CD19tm-128A10s Zellen wurden in 96-Kavitäten E-Platten ausgesät. Nach 25 h ( $t_0$ ) wurden keine Effektorzellen, expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen (dunkelgrau), expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen und Antikörper 4G7SDIE [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] (A) oder N19-C16 [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] (schwarz) (B) sowie expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen und Kontrollantikörper 4G8DEM [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] (A) oder NF-C16 [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] (hellgrau) (B) zugegeben. Die Impedanz wurde im Abstand von 15 min für weitere 48 h bestimmt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf die Impedanzwerte von  $t_0$  normalisiert. Die spezifische Lyse wurde für ausgewählte Zeitpunkte nach Zugabe der expandierten und isolierten  $\gamma\delta$ -T Zellen berechnet und ist exemplarisch für einen Spender von 4, in unabhängigen Experimenten analysierten Spendern, dargestellt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt.

Aus den normalisierten CIs wurde die spezifische Lyse, bezogen auf die Zugabe der expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen, für ausgewählte Zeitpunkte berechnet (**Bild 3-19**). Bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 nahm die spezifische Lyse im Zeitverlauf stark zu und erreichte, in diesem exemplarischen Beispiel aus 4 durchgeführten Experimenten, 79 % 12 h nach Zugabe der expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen. Auch bei den E:T-Verhältnissen von 10:1 und 5:1 stieg die spezifische Lyse rasch an und erreichte 12 h nach Zugabe der expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen 44 % bzw. 17 %. Die Zugabe von 4G7SDIE oder N19-C16 erhöhte die Zielzelllyse beträchtlich und es wird erneut deutlich, dass der Unterschied zwischen der Zielzelllyse durch  $\gamma\delta$ -T Zellen alleine und  $\gamma\delta$ -T Zellen mit 4G7SDIE oder N19-C16 abhängig von dem betrachteten Zeitpunkt ist. Der größte Unterschied der Antikörper-unabhängigen Lyse und der 4G7SDIE-vermittelten ADCC wurde 4 h nach Zugabe der  $\gamma\delta$ -T Zellen bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 und 8 h nach Zugabe bei den E:T-Verhältnissen 10:1 und 5:1 detektiert. Die N19-C16-vermittelte ADCC war nach 4 h (20:1), 6 h (10:1) bzw. 8 h (5:1) in Relation zu der Antikörper-unabhängigen Lyse durch expandierte  $\gamma\delta$ -T Zellen alleine, am höchsten.

### 3.2.9 Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC

#### 3.2.9.1 Genotypisierung FcγRIIIa-158V/F

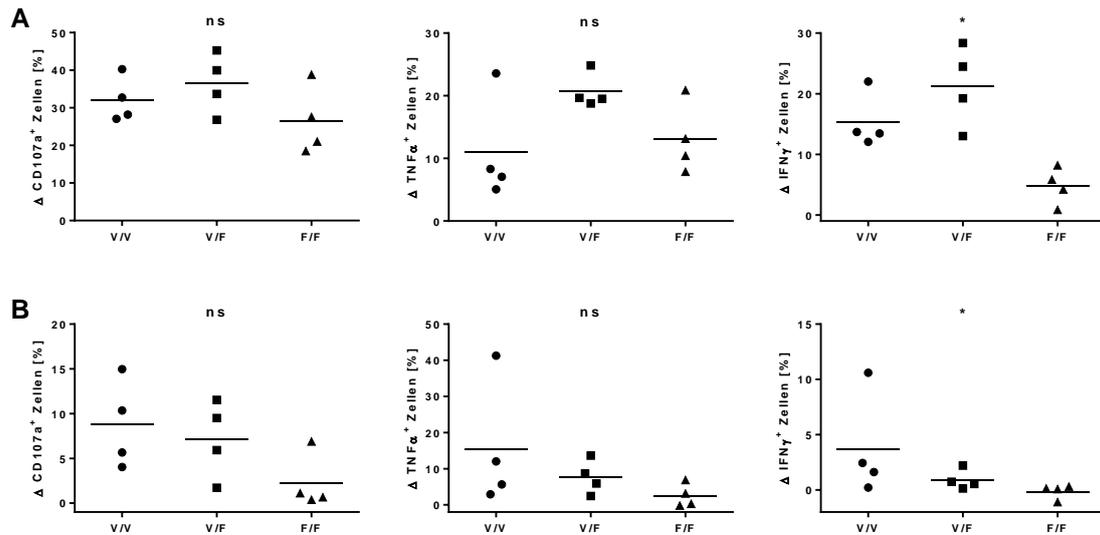
Es wurde der FcγRIIIa-158V/F-Genotyp von 41 gesunden Spendern bestimmt. Hierzu wurde eine allelspezifische PCR, welche den Bereich des SNP in Exon 4 an Aminosäureposition 158 des FcγRIIIa (bzw. Nucleotid 559 des FCGR3A) umfasst, etabliert. Aufgrund der ausgeprägten Homologie von 98 % zwischen FCGR3B und FCGR3A war hierbei darauf zu achten, keine Sequenzen von FCGR3B zu amplifizieren welche die Bestimmung der FCGR3A-Allotypen verfälschen würde. Hierzu wurden ein zu FCGR3A komplementären Hinwärtsprimer in einem weniger homologen Bereich gewählt. Zusätzlich wurden der Hinwärtsprimer so konstruiert, dass 2 vorsätzliche Fehlpaarungen mit FCGR3A und anstatt ursprünglich 6, 8 Fehlpaarungen mit FCGR3B entstehen. Dies verhindert die unerwünschte Anlagerung des Primers an FCGR3B. Der Rückwärtsprimer, etwa 200 bp nach dem SNP, ist vollständig homolog zu FCGR3A und FCGR3B. Die PCR-Produkte von 980 bp wurden nach einer Aufreinigung mit einer verkürzten Variante des Rückwärtsprimers sequenziert. Die Frequenz der verschiedenen Genotypen ist in **Tabelle 3-2** dargestellt. Es fällt auf, dass nur 10 % der Spender homozygot für Valin an Position 158 waren, wohingegen die heterozygote Variante sowie der Anteil homozygoter Spender für den 158F-Allotyp fast gleich häufig war.

**Tabelle 3-2: FcγRIIIa-Genotypen**

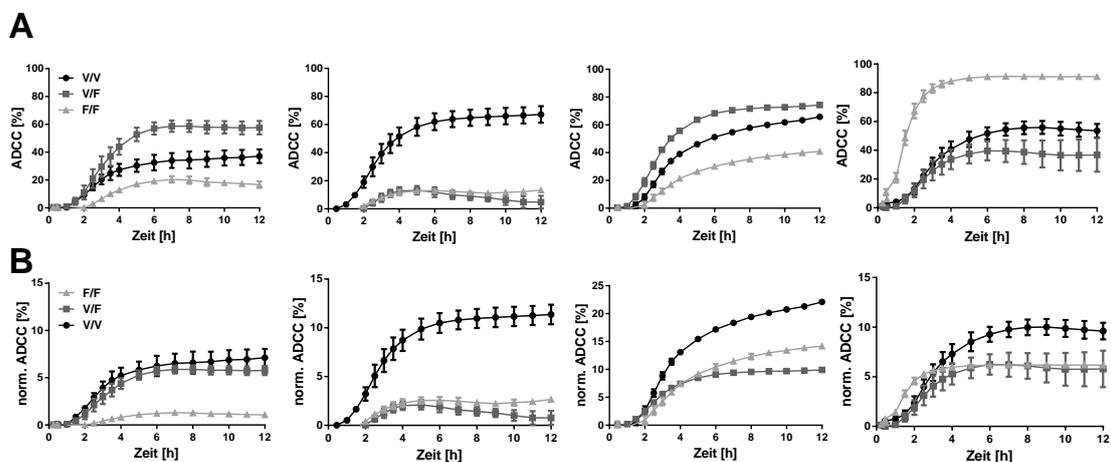
Genotyp	Positive Spender
FcγRIIIa-158-F/F	19/41 (46 %)
FcγRIIIa-158-V/F	18/41 (44 %)
FcγRIIIa-158-V/V	4/41 (10 %)

#### 3.2.9.2 Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit 4G7SDIE

Um zu untersuchen welchen Einfluss der FcγRIIIa-158V/F-Genotyp auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat, wurden xCELLigence-Test sowie CD107a/ICS-Tests mit PBMC von jeweils 4 Spendern jedes Genotyps durchgeführt. Die xCELLigence-Tests wurden mit PBMC der typisierten Spendern und der MCF-7-CD19-Transfektante 128A10s (E:T 20:1) als Zielzellen wie in 3.1.2.2 bereits beschrieben durchgeführt. Die CD107a/ICS-Tests wurden mit NALM-6 als Zielzellen (E:T 1:1) und PBMC der typisierten Spender wie in 3.2.3 bereits beschrieben durchgeführt. Die verwendeten FACS-Antikörper sind in **Tabelle 2-7: CD107a/ICS-Panel** aufgeführt. Es wurde bei den Effektorzellen auf NK Zellen (CD3-CD56<sup>+</sup>) (**Bild 3-20A**) oder γδ-T Zellen (CD3<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup>) (**Bild 3-20B**) selektioniert. Sowohl bei den NK Zellen als auch den γδ-T Zellen waren die Mediane der verschiedenen FcγRIIIa-158V/F-Genotypen für ΔCD107a und ΔTNFα nicht signifikant verschieden (**Bild 3-20A,B**).



**Bild 3-20: Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC.**  $0,5 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit  $0,5 \cdot 10^6$  NALM-6 oder NALM-6 und Antikörper 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] sowie Brefeldin A und Monensin 16 h inkubiert. Es wurden die Negativkontrollen ohne Zielzellen bzw. ohne Antikörper sowie eine Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin mitgeführt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen als NK Zellen (A) und CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen als  $\gamma\delta$ -T Zellen (B) definiert und darauf selektiert. Es wurde die CD107a-, TNF $\alpha$ - sowie die IFN $\gamma$ -Expression der Effektorzellen analysiert und  $\Delta$ CD107a,  $\Delta$ TNF $\alpha$  und  $\Delta$ IFN $\gamma$  als die Differenz zwischen der Probe mit NALM-6 als Zielzellen und der Probe mit NALM-6 und 4G7SDIE definiert. Die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten sind dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Kruskal-Wallis Tests durchgeführt.



**Bild 3-21: Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC.** (A) 5.000 MCF-7-CD19<sup>tm</sup> 128A10s Zellen wurden in 96-Kavitäten E-Platten ausgesät und nach 22 h wurden PBMC im E:T20:1 oder PBMC und Antikörper 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] zugegeben. Als Negativkontrollen wurde 4G8DEM [1  $\mu$ g/ml] eingesetzt. Die Impedanz wurde im Abstand von 15 min für weitere 48 h bestimmt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf die Impedanzwerte von  $t_0$  normalisiert. Anhand der dimensionslosen normalisierten CIs wurde die ADCC [%] bezogen auf Effektorzellen ohne Antikörperzugabe für ausgewählte Zeitpunkte berechnet. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt. (B) Die in (A) dargestellte ADCC [%] wurde auf den jeweiligen NK Zellanteil (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) in den eingesetzten PBMC normalisiert.

Bei  $\Delta$ IFN $\gamma$  wurde ein signifikanter Unterschied detektiert. Da CD107a als Surrogatmarker für die Zytotoxizität gilt, deuten diese limitierten Experimente darauf

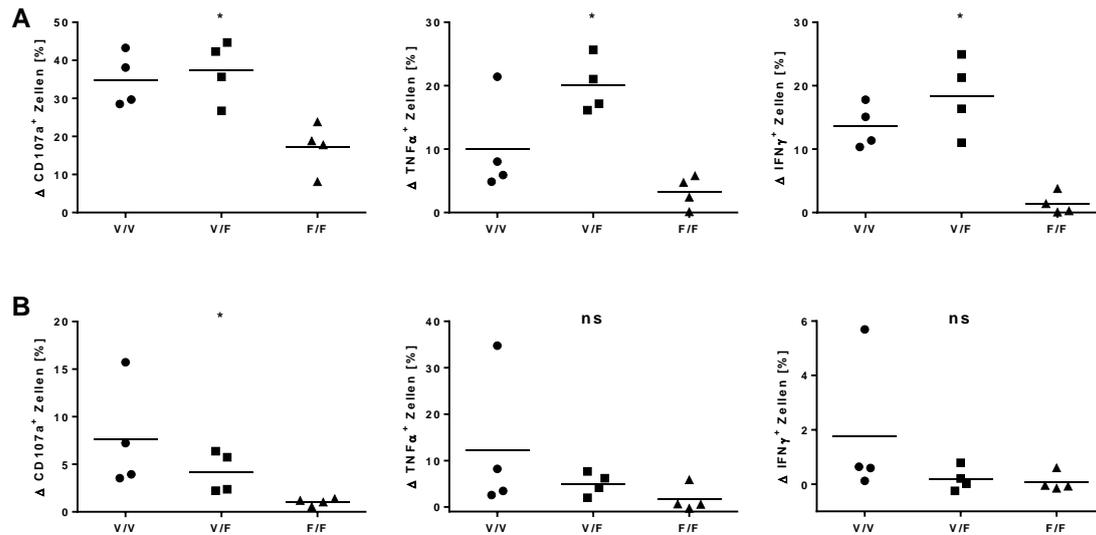
hin, dass der FcγRIIIa-158V/F-Genotyp keinen Einfluss auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat.

Im Falle der xCELLigence-Tests wurde zunächst die ADCC der gesamten PBMC als Effektorzellen betrachtet (**Bild 3-21A**). Der Anteil an NK Zellen unter den PBMC bei verschiedenen Spendern lag zwischen 2,9 % der PBMC und 15,7 % der PBMC. Die dadurch entstehenden, unterschiedlichen E:T-Verhältnisse von NK Zellen zu Zielzellen könnten einen potentiellen Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus maskieren. Deshalb wurde die in den funktionellen Tests eingesetzten PBMC auf den Anteil an NK Zellen (CD3-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) durchflusszytometrisch mit den Antikörpern der **Tabelle 2-6: PBMC-Panel** analysiert und die gemessene ADCC auf den NK Zellanteil normalisiert (**Bild 3-21B**). Die 4G7SDIE-vermittelte ADCC der Spender des FcγRIIIa-158V/V-Genotyps war in einem von 4 Tests höher als die der anderen Genotypen. In zwei Fällen vermittelte der heterozygote FcγRIIIa-158V/F-Genotyp die höchste ADCC, in einem weiteren der FcγRIIIa-158F/F-Genotyp. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es keinen Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC gibt (**Bild 3-21A**).

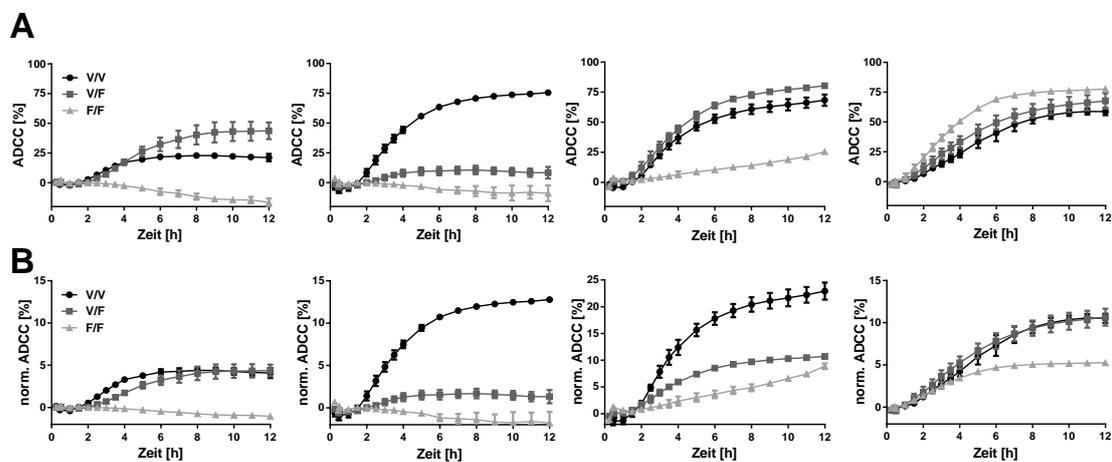
Wird die ADCC jedoch auf den Anteil zytotoxischer NK Zellen in den eingesetzten PBMC-Proben normalisiert, ist in drei der 4 durchgeführten Experimente die normalisierte ADCC der heterozygoten FcγRIIIa-158V/F- mit der der homozygoten FcγRIIIa-158F/F-Spender vergleichbar (**Bild 3-21B**). In einem der Tests war die normalisierte ADCC des heterozygoten FcγRIIIa-158V/F-Spenders vergleichbar mit dem FcγRIIIa-158V/V-Spenders. Die normalisierte ADCC der 158V/V-Spender war stets die höchste. Diese vorläufigen Daten deuten darauf hin, dass der FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus einen Einfluss auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat, welcher jedoch durch variierende NK Zellanteile der verschiedenen Spender überdeckt wird.

### 3.2.9.3 Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit N19-C16

Das C-terminale scFv-Fragment des CD19xCD16 bispezifischen Antikörpers N19-C16 ist von dem CD16-Antikörper 3G8 abgeleitet. Um zu untersuchen welchen Einfluss der FcγRIIIa-158V/F-Genotyp auf die N19-C16-vermittelte ADCC hat, wurden wie in 3.2.9.2 beschrieben CD107a/ICS-Tests (**Bild 3-22A,B**) sowie xCELLigence-Tests (**Bild 3-23A,B**) mit PBMC von jeweils 4 Spendern jedes Genotyps durchgeführt. Im Falle der NK Zellen waren die Mediane der verschiedenen FcγRIIIa-158V/F-Genotypen für  $\Delta$ CD107a,  $\Delta$ TNF $\alpha$  und  $\Delta$ IFN $\gamma$  signifikant verschieden (**Bild 3-22A**). Im Falle der  $\gamma\delta$ -T Zellen waren die Mediane der verschiedenen FcγRIIIa-158V/F-Genotypen nur für  $\Delta$ CD107a signifikant verschieden (**Bild 3-22B**). Allerdings waren die detektierten  $\Delta$ TNF $\alpha$  und  $\Delta$ IFN $\gamma$  im Allgemeinen sehr niedrig.



**Bild 3-22: Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die N19-C16-vermittelte ADCC.**  $0,5 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit  $0,5 \cdot 10^6$  NALM-6 oder NALM-6 und Antikörper N19-C16 [1  $\mu$ g/ml] sowie Brefeldin A und Monensin 16 h inkubiert. Es wurden die Negativkontrollen ohne Zielzellen bzw. ohne Antikörper sowie eine Positivkontrolle mit PMA und Ionomycin mitgeführt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen als NK Zellen (A) und CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen als  $\gamma\delta$ -T Zellen (B) definiert und darauf selektiert. Es wurde die CD107a-, TNF $\alpha$ - sowie die IFN $\gamma$ -Expression der Effektorzellen analysiert und  $\Delta$ CD107a,  $\Delta$ TNF $\alpha$  sowie  $\Delta$ IFN $\gamma$  als die Differenz zwischen der Probe mit NALM-6 als Zielzellen und der Probe mit NALM-6 und 4G7SDIE definiert. Die Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten sind dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels eines Kruskal-Wallis Tests durchgeführt.



**Bild 3-23: Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die N19-C16-vermittelte ADCC.** (A) 5.000 MCF-7-CD19<sup>tm</sup> 128A10s Zellen wurden in 96-Kavitäten E-Platten ausgesät und nach 22 h wurden PBMC im E:T 20:1 oder PBMC und Antikörper N19-C16 [1  $\mu$ g/ml] zugegeben. Die Impedanz wurde im Abstand von 15 min für weitere 48 h bestimmt. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf die Impedanzwerte von  $t_0$  normalisiert. Anhand der dimensionslosen normalisierten CIs wurde die ADCC [%] bezogen auf Effektorzellen ohne Antikörperzugabe für ausgewählte Zeitpunkte berechnet. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt. (B) Die in (A) dargestellte ADCC [%] wurde auf den jeweiligen NK Zellanteil (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) in den eingesetzten PBMC normalisiert.

Diese limitierten Experimente deuten darauf hin, dass der Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Genotyp einen Einfluss auf die N19-C16-vermittelte ADCC hat. Es fällt weiter auf, dass ein Allel

des FcγRIIIa-158V-Allotyps für eine gesteigerte ADCC auszureichen scheint, da für den homozygoten FcγRIIIa-158V/F-Genotyp auf NK Zellen kein geringeres  $\Delta$ CD107a,  $\Delta$ TNF $\alpha$  und  $\Delta$ IFN $\gamma$  als für den FcγRIIIa-158V/V-Genotyp zu beobachten war. Die heterozygoten FcγRIIIa-158F/F-Genotypen hingegen exprimierten deutlich geringere  $\Delta$ CD107a,  $\Delta$ TNF $\alpha$  und  $\Delta$ IFN $\gamma$  auf NK Zellen (**Bild 3-22A**).

Wie bereits für die 4G7SDIE-vermittelte ADCC beobachtet, vermittelt auch N19-C16 eine höhere ADCC bei Spendern des FcγRIIIa-158V/V-Genotyps in einem von 4 xCELLigence-Experimenten (**Bild 3-23A**). In zwei Fällen vermittelte der heterozygote FcγRIIIa-158V/F-Genotyp die höchste ADCC und in einem der FcγRIIIa-158F/F-Genotyp. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass, trotz des eingesetzten Klons 3G8, es keinen Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die N19-C16-vermittelte ADCC gibt. Wird die ADCC jedoch auf den Anteil zytotoxischer NK Zellen in den eingesetzten PBMC-Proben normalisiert, ist in zwei der 4 durchgeführten Experimente die normalisierte ADCC der homozygoten FcγRIIIa-158V/V-Spender am höchsten und in den anderen zwei die normalisierte ADCC der heterozygoten FcγRIIIa-158V/F- mit der der homozygoten FcγRIIIa-158V/V-Spender vergleichbar (**Bild 3-23B**). In allen durchgeführten Tests war jedoch die normalisierte ADCC der FcγRIIIa-158F/F-Spender am geringsten. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse der CD107a/ICS-Tests worin der FcγRIIIa-158F/F-Genotyp eine signifikant geringere ADCC vermittelte. Diese vorläufigen Daten deuten darauf hin, dass der FcγRIIIa-158V-Allotyp einen Einfluss auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat, welcher jedoch durch variierende NK Zellanteile der verschiedenen Spender überdeckt wird. Es scheint ein Allel des FcγRIIIa-158V-Allotyps für eine gesteigerte ADCC auszureichen. Um diese Hypothesen und vorläufigen Beobachtungen zu überprüfen, wären jedoch weitere Experimente nötig. Aufgrund des geringen FcγRIIIa-158V/V-Spenderanteils unter den typisierten Spendern war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

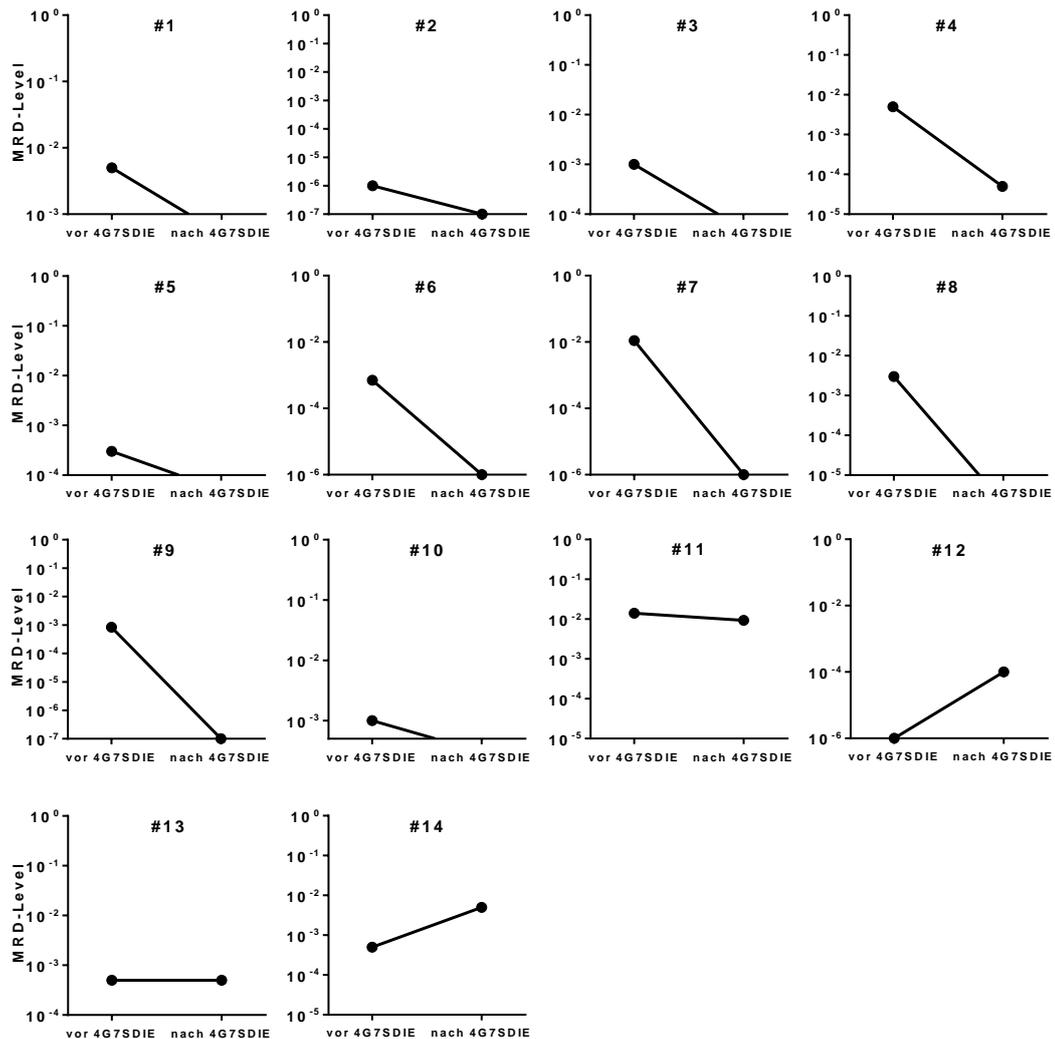
### 3.3 Klinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE

An der Universitätskinderklinik Tübingen und der Universitätskinderklinik Düsseldorf wurden 14 Patienten mit refraktärer oder rezidivierter BCP-ALL und persistierender MRD im Rahmen von individuellen Heilversuchen mit 4G7SDIE behandelt. Um das Risiko eines Rezidivs dieser Hochrisikopatienten zu verringern, sollte durch 4G7SDIE eine Reduktion bzw. Eradikation der MRD-Last vor oder nach SZT erreicht werden. Anhand Proben dieser 4G7SDIE-behandelten MRD-positiven BCP-ALL Patienten wurden in dieser Arbeit begleitende Untersuchungen durchgeführt, die zur Vorbereitung einer klinischen Studie mit 4G7SDIE dienen sollten.

#### 3.3.1 Klinisches Ansprechen der 4G7SDIE-behandelten Patienten

Für alle behandelten Patienten wurde im Laufe der Therapie mit 4G7SDIE die MRD-Last bestimmt. Die MRD Level wurden durch Analyse der individuellen Immunglobulin-, T-Zellrezeptorgenrearrangements oder, bei BCR-ABL-positiven Patienten, des BCR-ABL-Translokationsfusionsgens mittels RQ-PCR in akkreditierten Einrichtungen der Unikliniken Frankfurt a.M. und Kiel bestimmt und nach Richtlinien des EuroMRD Konsortiums bewertet <sup>15</sup>. Das Detektionslimit ist, je nach den patientenindividuellen identifizierten Markern, von Patient zu Patient verschieden. Generell gilt eine MRD  $< 10^{-6}$ , in manchen Fällen auch  $< 10^{-4}$  als nicht mehr quantifizierbar. In Einzelfällen wurde das MRD-Niveau mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie durch Kai-Erik Witte der Kinderklinik Tübingen bestimmt. Die Auswertung der MRD Befunde erfolgte durch Dr. med. Patrick Schlegel der Kinderklinik Tübingen.

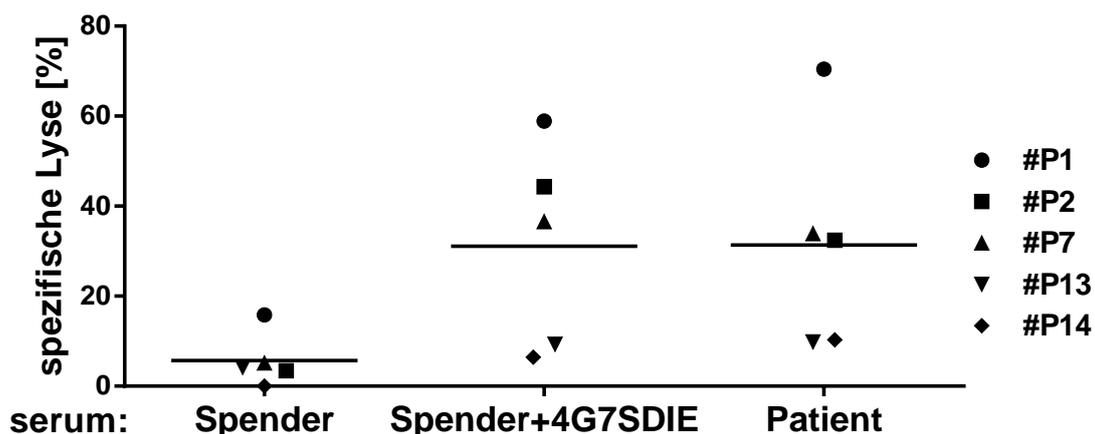
In **Bild 3-24** ist das beste Ansprechen der einzelnen Patienten unabhängig von dem Therapiezeitpunkt dargestellt. Es wurde eine MRD-Reduktion um mindestens eine log-Stufe oder unter das patientenindividuelle Detektionslimit bei 10 der 14 behandelten Patienten (#1 - #10) detektiert. Patienten #2 und #8 wurden unter der Antikörpertherapie qualitativ MRD-negativ. Allerdings wurden Patienten #8 und #9 während der Therapie mit 4G7SDIE parallel mit Tyrosinkinaseinhibitoren aufgrund der Diagnose einer BCR-ABL-positiven Leukämie behandelt, so dass eine beobachtete MRD-Reduktion nicht eindeutig dem 4G7SDIE zugeordnet werden konnte. Bei 4 Patienten (#11 - #14) wurde zu keinem Therapiezeitpunkt eine MRD-Reduktion erreicht.



**Bild 3-24: Klinisches Ansprechen der 4G7SDIE-behandelten Patienten.** Es ist jeweils das beste Ansprechen unabhängig vom Therapiezeitpunkt dargestellt. Ein MRD Level von  $10^{-7}$  ist als qualitativ negativ definiert. Die MRD-Level wurden durch Analyse der individuellen Immunglobulin- oder T-Zellrezeptorgenrearrangements oder, bei BCR-ABL-positiven Patienten, des BCR-ABL-Translokationsfusionsgens mittels RQ-PCR bestimmt. Einzelne MRD-Bestimmungen stammen aus einer Analyse mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie.

### 3.3.2 ADCC gegen Zelllinie MHH-CALL-4 mit Patienteneffektorzellen

Um zu untersuchen, ob die Effektorzellen von 4G7SDIE-behandelten Patienten zu einer Vermittlung von ADCC fähig sind, wurden 2 h DELFIA EuTDA-Tests gegen die pädiatrische Leukämiezelllinie MHH-CALL-4 durchgeführt. In **Bild 3-25** ist die spezifische Lyse bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 von 5 4G7SDIE-behandelten Patienten dargestellt.



**Bild 3-25: ADCC durch Patienteneffektorzellen gegen MHH-CALL-4.** 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen BCP-ALL Blasten. 5.000 BATDA-markierte MHH-CALL-4 Zellen wurden mit Patienten-PBMC (E:T 20:1) und Serum eines gesunden Spenders sowie Patienten-PBMC, Serum eines gesunden Spenders und 4G7SDIE [1 µg/ml] sowie Patienten-PBMC und Serum des Patienten welches eine Stunde nach einer 4G7SDIE-Infusion gewonnen wurde in 2 h EuTDA-Zytoxizitätstests analysiert. Die Patienten-PBMC wurde vor einer 4G7SDIE-Infusion gewonnen. Der Mittelwert dreier technischer Replikate ist dargestellt.

Je nach Patient ergab sich eine starke Varianz in der Vermittlung von ADCC durch 4G7SDIE. Es konnte jedoch in allen Fällen, sowohl mit Serum eines gesunden Spenders welchen 4G7SDIE zugesetzt wurde, als auch mit Serum der Patienten, welches eine Stunde nach einer 4G7SDIE-Infusion gewonnen wurde, eine Erhöhung der Zelllyse durch 4G7SDIE gezeigt werden. Da die spezifische Lyse durch gesundes Serum mit zugesetztem 4G7SDIE ähnliche Lysewerte wie das 4G7SDIE-enhaltende Patientenserum lieferte, war eine niedrige spezifische Lyse mit Patientenserum vermutlich weniger auf inhibierende Faktoren in dem Patientenserum, als auf die geringere Fähigkeit der Patienteneffektorzellen zur ADCC, zurück zu führen. Es fällt auf, dass Patient #13 und #14 eine sehr geringe ADCC vermittelten. Dies sind zwei der 4 Patienten, die auf die Behandlung mit 4G7SDIE nicht mit einer MRD-Reduktion angesprochen haben (siehe 3.3.1). Die NK Zellanteile unter den in den Tests eingesetzten PBMC wurden für einen Teil der Patienten, durch MTAs des KMT-Routinelabors der Kinderklinik Tübingen, bestimmt. Außerdem wurde der 4G7SDIE Seramtiter in dem eingesetzten Patientenserum bestimmt (**Tabelle 3-3**).

**Tabelle 3-3: Patientencharakteristika zu den EuTDA Tests mit MHH-CALL-4**

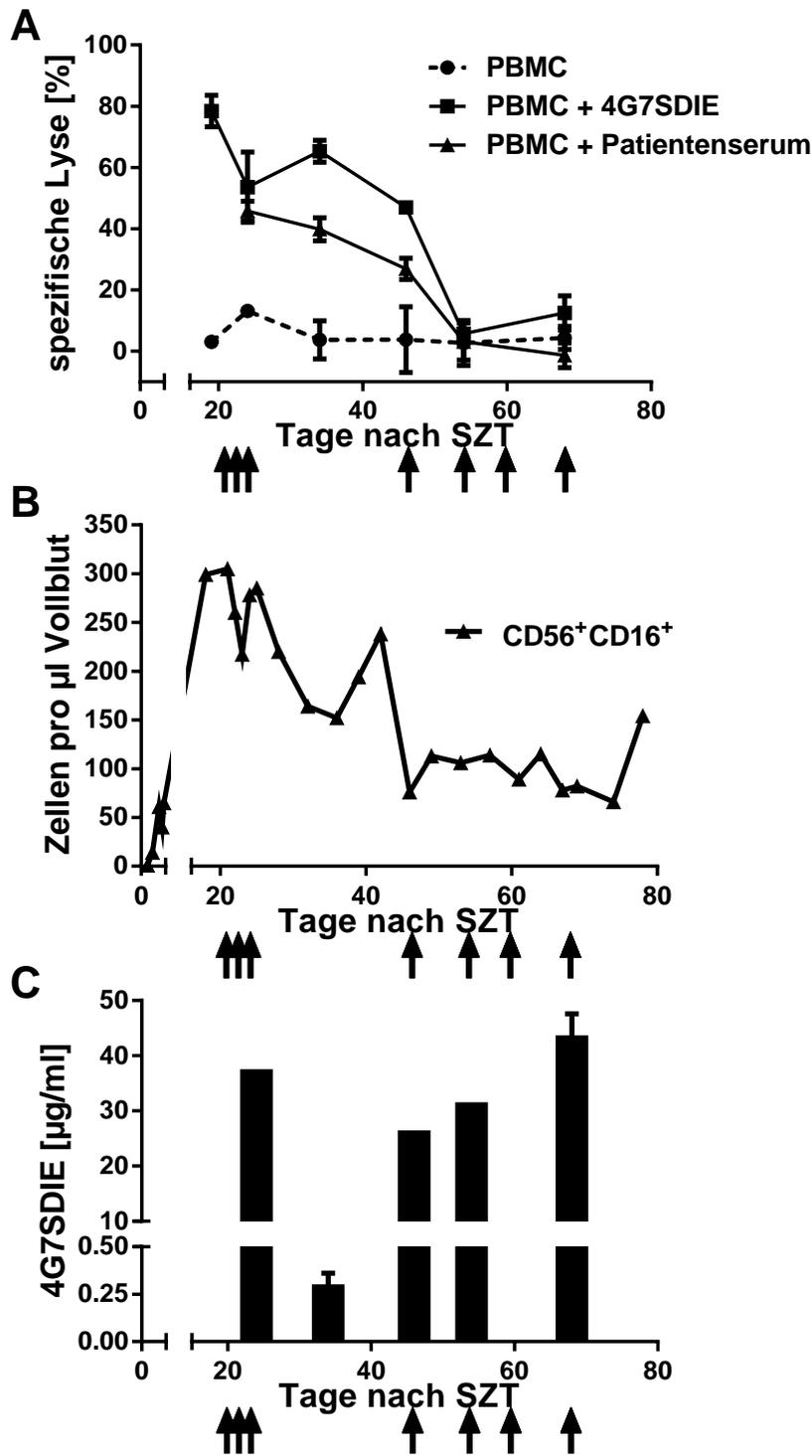
Patient	Therapiezeitpunkt	4G7SDIE-Zyklus	Serumtiter	NK Zellanteil [% der PBMC]
#1	Tag -23 vor SZT	1	33 µg/ml	nd
#2	Tag +342 nach SZT	28	14 µg/ml	12 %
#7	Tag +12 nach SZT	1	12 µg/ml	66 %
#13	Tag -9 vor SZT	1	22 µg/ml	nd
#14	Tag +31 nach SZT	7	17 µg/ml	33 %

SZT: Stammzelltransplantation; nd: nicht bestimmt

Es fällt auf, dass Patient #14 mit einem NK Zellanteil von 33 % eine deutlich geringere ADCC vermittelte als beispielsweise Patient #2 mit einem NK Zellanteil von 12 % (**Bild 3-25, Tabelle 3-3**). In allen eingesetzten Patientenseren wurden sättigende Konzentrationen von 4G7SDIE gemessen (**Tabelle 3-3**).

### 3.3.3 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegenüber autologen leukämischen Blasten

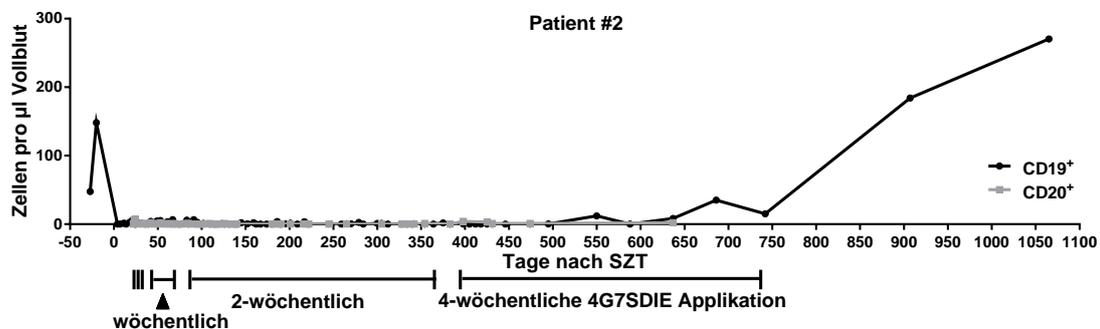
In einer MRD-Situation sind sehr wenige leukämische Blasten, die als Zielzellen in funktionellen Tests dienen können, vorhanden. Deshalb muss zur Untersuchung der 4G7SDIE-vermittelten ADCC gegenüber autologen Blasten auf kryokonservierte Proben von einem Zeitpunkt, an dem die Patienten sich im offenen Rezidiv befanden, zurückgegriffen werden. Hier ist exemplarisch ein Verlauf des Patienten #2 dargestellt, welcher nach haploidentischer SZT mit 4G7SDIE behandelt wurde. Da in dem Patient das eigene Immunsystem durch die Immunzellen eines Elternteils ersetzt wurde, handelt es sich nicht um eine autologe Situation sondern um eine haploidentische, wobei dies die tatsächliche Situation *in vivo* zum Therapiezeitpunkt darstellt. Die Patienteneffektorzellen und das Patientenserum wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und in 2 h EuTDA Tests analysiert (**Bild 3-26A**). Die NK Zellfrequenzen wurden durch MTAs des KMT-Routinelabors der Kinderklinik Tübingen bestimmt (**Bild 3-26B**). Außerdem wurden die 4G7SDIE-Konzentrationen im eingesetzten Patientenserum bestimmt. Diese befanden sich zu allen analysierten Zeitpunkten in einem sättigenden Bereich (**Bild 3-26C**). Durch 4G7SDIE, im autologen Patientenserum oder im Test zugegeben, wird die spezifische Lyse der Patientenblasten durch die haploidentischen PBMC des Patienten #2 deutlich erhöht. Die detektierte spezifische Lyse war kurz nach der SZT höher als zu späteren Therapiezeitpunkten. Es fällt auf, dass kurz nach der SZT auch der NK Zellanteil deutlich höher ist als im weiteren Therapieverlauf. Dieser Umstand führt zu höheren NK-Zell-zu-Zielzell-Verhältnissen in den Tests zu früheren Therapiezeitpunkten und spiegelt die Situation *in vivo* wider.



**Bild 3-26: 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen autologe leukämische Blasten über den Therapieverlauf.** (A) Primäre kryokonservierte Blasten des Patienten #2 wurden mit PBMC von Patient #2 nach haploidentischer SZT, gewonnen jeweils vor einer 4G7SDIE-Infusion, in 2 h EuTDA Tests analysiert (E:T-Verhältnis 20:1). Es wurde Medium, 4G7SDIE [1  $\mu$ g/ml] oder Serum des Patienten welches eine Stunde nach einer 4G7SDIE-Infusion gewonnen wurde, zugesetzt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie die zugehörigen Standardabweichungen (SD) sind dargestellt. Die Zeitpunkte von 4G7SDIE-Infusionen sind mit Pfeilen markiert. (B) Die NK-Zellzahlen wurden durch FACS-Analysen von Vollblutproben und Selektion auf CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> bestimmt. (C) Serumproben sowie Serumproben vor Therapiebeginn mit definierten 4G7SDIE-Konzentrationen wurden mit NALM-16 inkubiert. Die gebundenen 4G7SDIE Antikörper wurden durch indirekte Durchflusszytometrie detektiert und die Serumkonzentrationen mittels einer Standardkurve kalkuliert.

### 3.3.4 B-Zelldepletion durch 4G7SDIE

Da nicht nur leukämische Blasten, sondern alle B Zellen, CD19 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, ist eine B-Zelldepletion *in vivo* ein weiterer Parameter der Effizienz von 4G7SDIE. Deshalb, und weil eine B-Zelldefizienz eine Substitution mit Immunglobulinen erfordert, wurde im Therapieverlauf der Anteil an B Zellen durch MTAs des KMT-Routinelabors der Kinderklinik Tübingen bestimmt. Da, wie in 3.2.6 beschrieben, kein CD19-Antikörper gefunden wurde der ein unabhängiges Epitop von 4G7SDIE erkennt, und somit die Möglichkeit besteht, dass CD19 durch 4G7SDIE maskiert ist, wurde neben CD19, CD20 als zusätzlicher Marker für B Zellen in das Routinepanel aufgenommen.



**Bild 3-27: B-Zelldepletion durch 4G7SDIE.** Die B-Zellzahlen wurden durch FACS-Analysen von Vollblutproben und Selektion auf CD19<sup>+</sup> bzw. CD20<sup>+</sup> bestimmt. Die ersten 3 4G7SDIE-Infusionen erfolgten an drei aufeinander folgenden Tagen, die weiteren Intervalle der 4G7SDIE-Infusionen sind angegeben.

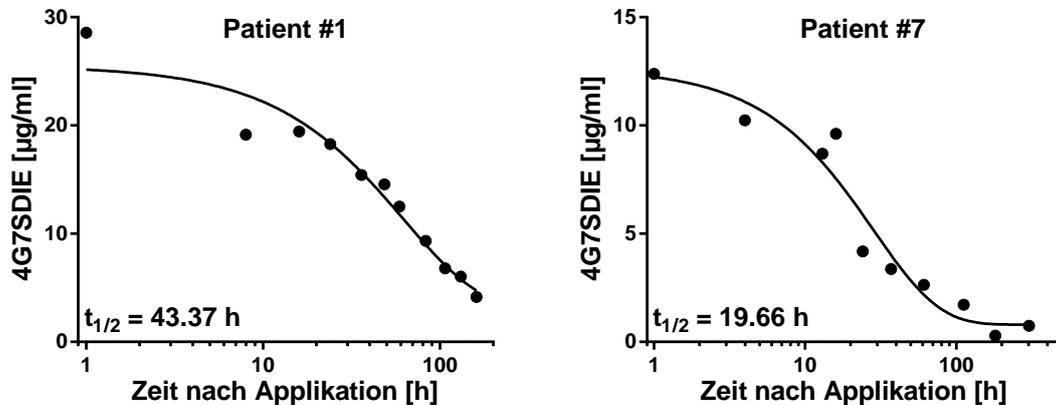
Es ist exemplarisch die B-Zelldepletion von Patient #2 über den Therapieverlauf dargestellt (**Bild 3-27**). Die B-Zellrekonstitution nach SZT wird vollständig inhibiert und es wurden keine CD19<sup>+</sup> oder CD20<sup>+</sup> B Zellen über den Therapieverlauf detektiert. Nach Therapieende stiegen die B-Zellzahlen rasch an.

### 3.3.5 Serumkonzentrationen von 4G7SDIE

#### 3.3.5.1 Bestimmung der Serumhalbwertszeit von 4G7SDIE

Die Serumhalbwertszeit von 4G7SDIE wurde für zwei Patienten im ersten Antikörperzyklus bestimmt (**Bild 3-28**). Hierzu wurde eine Serumprobe vor der ersten Antikörpergabe nach Zugabe von definierten 4G7SDIE-Konzentrationen zur Erstellung einer Standardkurve eingesetzt und Serumproben von verschiedenen Zeitpunkten nach der ersten 4G7SDIE Infusion analysiert. Patient #1 wurden 40 mg/m<sup>2</sup> 4G7SDIE verabreicht und die MRD lag bei 5\*10<sup>-3</sup>. Es wurde eine maximale Serumkonzentration von 28,6 µg/ml 4G7SDIE erreicht und die bestimmte Serumhalbwertszeit war 43 h. Patient #7 wurden 20 mg/m<sup>2</sup> 4G7SDIE verabreicht

und die MRD lag bei  $1,1 \cdot 10^{-2}$ . In diesem Fall wurde eine maximale Serumkonzentration von  $12,4 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE erreicht und die bestimmte Serumhalbwertszeit war 20 h.

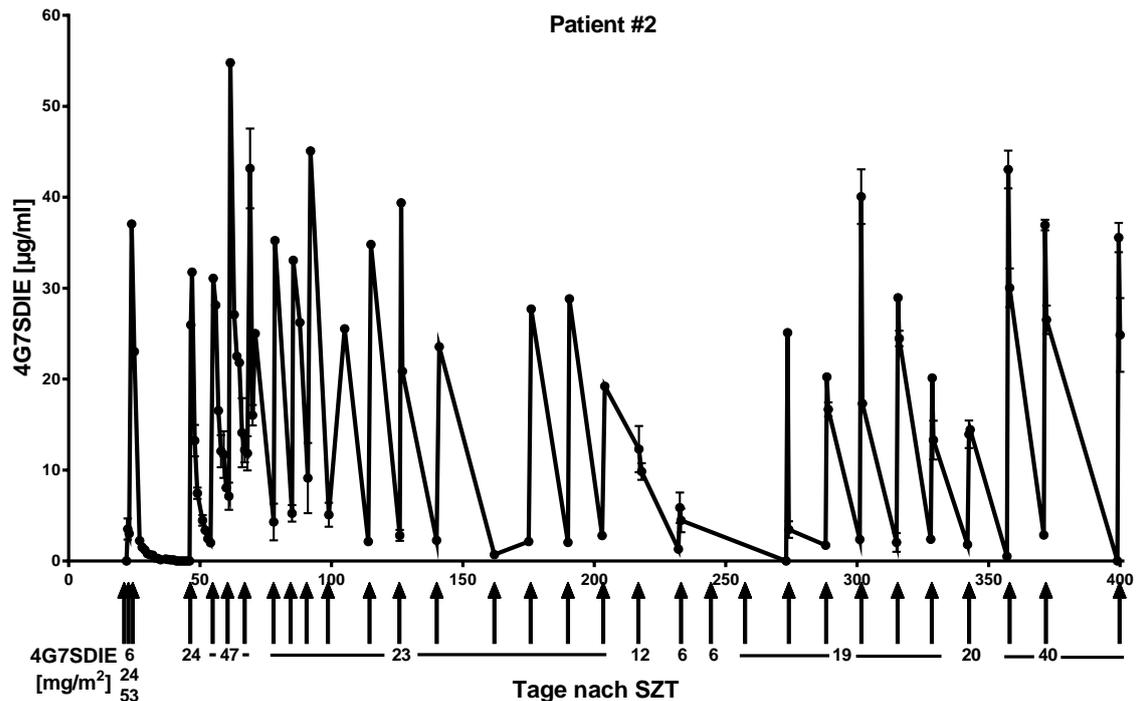


**Bild 3-28: Serumhalbwertszeit 4G7SDIE.** Serumproben nach der ersten 4G7SDIE-Applikation sowie Serumproben vor Therapiebeginn mit definierten 4G7SDIE-Konzentrationen wurden mit NALM-16 inkubiert. Die gebundenen 4G7SDIE Antikörper wurden durch indirekte Durchflusszytometrie detektiert und die Serumkonzentrationen mittels einer Standardkurve kalkuliert. Die Serumhalbwertszeiten wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalysen bestimmt. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sind dargestellt.

Nach 6,5 Tagen (#1) bzw. 12,5 Tagen (#7) waren noch Serumkonzentrationen von  $4,1 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $0,74 \mu\text{g/ml}$  messbar. Diese Konzentrationen liegen noch im sättigenden Bereich. Es wurden keine Serumproben von späteren Zeitpunkten analysiert, da die zweite Infusion von 4G7SDIE am darauffolgenden Tag erfolgte.

### 3.3.5.2 Serumkonzentrationen von 4G7SDIE im Therapieverlauf

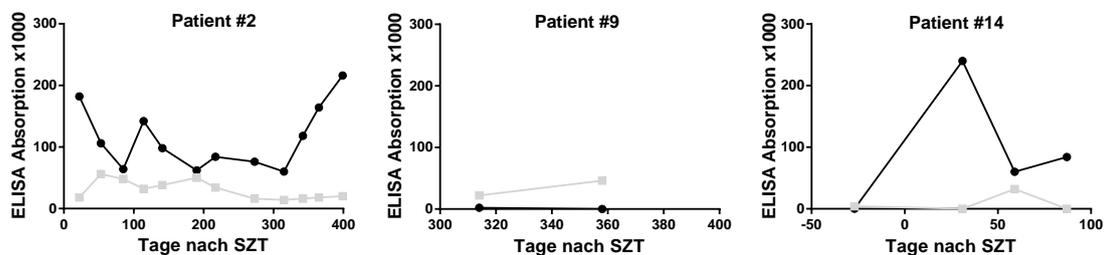
Mit Serumproben des Patienten #2 wurde eine Analyse der Serumkonzentrationen von 4G7SDIE über den Therapieverlauf durchgeführt (**Bild 3-29**). Sowohl die applizierte Dosen als auch der Abstand zwischen den Applikationen variierte und spiegelt sich in den gemessenen Serumkonzentrationen wider. Die Serumkonzentrationen fielen zwischen zwei Antikörperzyklen, bei einer Dosis von  $20 \text{ mg/m}^2$ , nicht unter eine sättigende Konzentration von 4G7SDIE.



**Bild 3-29: Serumkonzentration von 4G7SDIE über den Therapieverlauf.** Serumproben über den 4G7SDIE-Therapieverlauf sowie Serumproben vor Therapiebeginn mit definierten 4G7SDIE-Konzentrationen wurden mit NALM-16 inkubiert. Die gebundenen 4G7SDIE Antikörper wurden durch indirekte Durchflusszytometrie detektiert und die Serumkonzentrationen mittels einer Standardkurve kalkuliert. Die Zeitpunkte von 4G7SDIE-Infusionen sind mit Pfeilen markiert. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie die zugehörigen SD sind dargestellt.

### 3.3.6 Bildung von anti-Antikörpern unter 4G7SDIE-Therapie

Die Erzielung hoher Serumkonzentrationen von 4G7SDIE über den Therapieverlauf in **Bild 3-29** deutet bei diesem Patienten nicht auf die Bildung von anti-Antikörpern hin. Da es sich bei dem Antikörper 4G7SDIE jedoch um einen chimärisierten Antikörper handelt, ist die Bildung von anti-Antikörpern gegen den murinen Teil des Antikörpers oder auch anti-Idiotypen möglich.



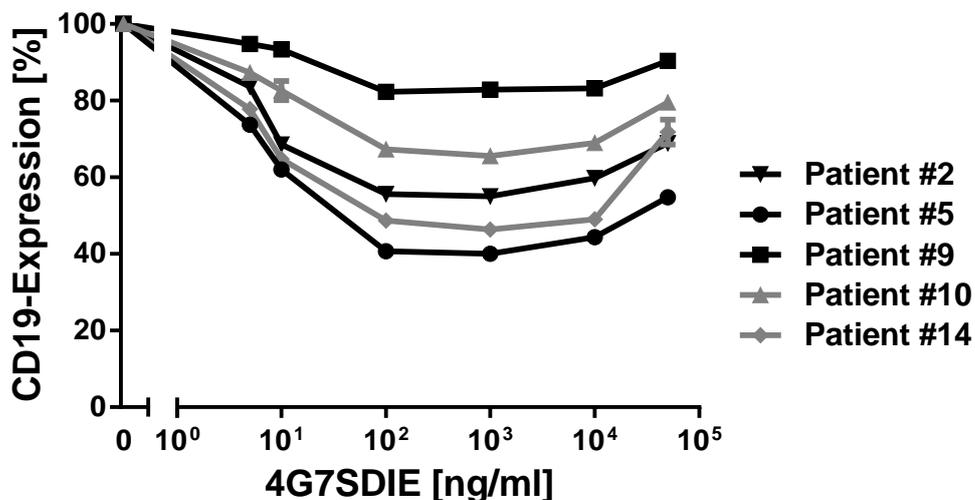
**Bild 3-30: Analyse auf HACAs.** Auf einer ELISA-Platte wurden  $F(ab')_2$ -Fragmente von 4G7SDIE immobilisiert und daran bindende Antikörper aus dem Patientenserum detektiert. In schwarz ist das Signal durch Antikörper der Klasse IgG dargestellt, in grau das Signal durch Antikörper der Klasse IgM.

Deshalb wurden in Kooperation mit Prof. Dr. med. Reinhild Klein, Medizinische Klinik II, Tübingen Serumproben von behandelten Patienten mittels einer ELISA-

basierten Methode auf anti-Antikörper („*human anti-chimeric antibodies*“, HACAs) analysiert. Hierbei werden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente von 4G7SDIE auf einer ELISA-Platte immobilisiert und daran bindende Antikörper aus dem Patientenserum detektiert. Es wurden von 3 Patienten unter 4G7SDIE-Therapie Serumproben im 4-wöchigen Abstand untersucht (**Bild 3-30**). Als Referenz diente das Serum vor Therapiebeginn. Ein Anstieg der optischen Dichte ist ein Indikator für das Vorhandensein von HACAs im Patientenserum. Bei keinem der analysierten Patientenseren wurde ein starker Anstieg der optischen Dichte beobachtet was darauf hindeutet, dass keine HACAs in den betrachteten Therapieabschnitten gebildet wurden.

### 3.3.7 4G7SDIE-induzierte Antigenmodulation auf Patientenblasten

In 3.1.3 wurde die sehr heterogene CD19-Antigenmodulation auf BCP-ALL Blasten beschrieben. Da dies die Vermittlung der Effektorfunktion von 4G7SDIE negativ beeinflussen könnte, wurden primäre leukämische Blasten einiger 4G7SDIE-behandelter Patienten auf ihre CD19-Antigenmodulation analysiert.



**Bild 3-31: CD19-Antigenmodulation auf primären Blasten 4G7SDIE-behandelter Patienten.**  $2,5 \cdot 10^5$  leukämische Blasten wurden mit 4G7SDIE Konzentrationen von 5 ng/ml bis 50 µg/ml für 24 h inkubiert. Nach einer anschließenden FACS-Färbung mit 2 µg/ml 4G7SDIE und R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die relative CD19-Oberflächenexpression bezogen auf die detektierte Fluoreszenz auf der unbehandelten Kontrolle bestimmt. Leukämische Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD10-PerCp und CD34-APC auf CD10<sup>+</sup> und/oder CD34<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. Die Mittelwerte dreier technischer Replikate sowie deren SD sind dargestellt.

Hierzu wurden leukämische Blasten von 5 4G7SDIE-behandelten BCP-ALL Patienten mit verschiedenen Konzentrationen von 4G7SDIE über 24 h inkubiert. Anschließend wurde nach einer FACS-Färbung mit sättigenden Konzentrationen von 4G7SDIE und einem R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment in einer

durchflusszytometrischen Analyse die residuale CD19-Oberflächenexpression bestimmt. Eine Selektion auf leukämische Blasten erfolgte mit dem für den jeweiligen Patienten relevanten Markern CD10 und/oder CD34.

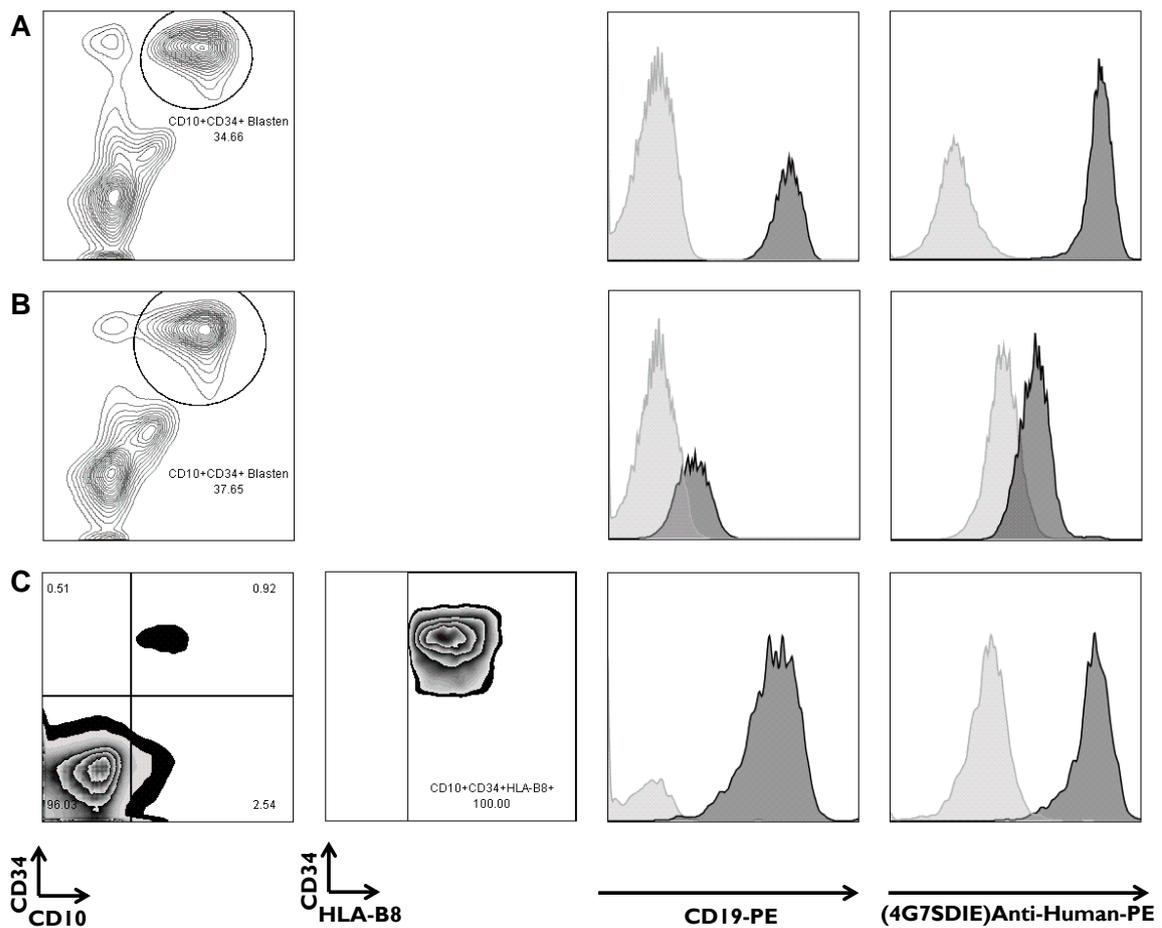
Nach 24 h 4G7SDIE-Exposition war eine von der 4G7SDIE Konzentration abhängige Antigenmodulation in allen Fällen zu beobachten (**Bild 3-31**). Die Antigenmodulation auf den primären Blasten der Patienten #5, #14 und #2 war zwar moderat, aber ausgeprägter als bei Patient #10 und Patient #9. Ein Zusammenhang zwischen der CD19-Antigenmodulation und dem klinischen Ansprechen wurde in dieser kleinen Gruppe analysierter Patienten nicht beobachtet.

### **3.3.8 CD19-Antigenmodulation und –Rekonstitution auf Blasten 4G7SDIE-behandelter Patienten**

In Routineuntersuchungen des KMT-Labors der Kinderklinik Tübingen wurde bei einigen Patienten, die unter 4G7SDIE-Therapie ein Rezidiv erlitten, auf den leukämischen Blasten keine CD19-Oberflächenexpression detektiert. Dies könnte einerseits auf den tatsächlichen Verlust der CD19-Oberflächenexpression, oder aber auf eine Maskierung von CD19 durch gebundenen therapeutischen 4G7SDIE zurück zu führen sein. In 3.2.6 wurde gezeigt, dass 4G7SDIE die Bindung der üblicherweise in FACS-Analysen eingesetzten CD19-Antikörper blockiert. Aus diesem Grund ist eine Analyse mit einer direkten FACS-Färbung und diesen Antikörpern nicht geeignet, die CD19-Expression auf Blasten unter 4G7SDIE-Therapie zuverlässig zu bestimmen. Zur Umgehung dieser Problematik wurde eine Methode etabliert, mit welcher, bereits gebundener therapeutischer 4G7SDIE sowie freies CD19 simultan detektiert werden kann.

Hierbei werden  $1 \cdot 10^6$ , falls verfügbar KM-MNC oder PBMC mit leukämischen Blasten vor 4G7SDIE-Therapiebeginn, sowie KM-MNC oder PBMC mit Rezidivblasten nach 4G7SDIE-Therapie durchflusszytometrisch analysiert. In einer Probe wird freies CD19 auf der Zelloberfläche durch CD19-PE (Klon 4G7) in einer direkten Färbung detektiert. In einer weiteren Probe wird gebundener therapeutischer 4G7SDIE auf den Rezidivblasten bzw. die Hintergrundfärbung auf den primären Blasten durch ein R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment bestimmt. In der dritten Probe wird durch Präinkubation der Zellen mit 10 µg/ml 4G7SDIE und der anschließenden Sekundärfärbung mit einem R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment der bereits gebundene therapeutische 4G7SDIE sowie freies CD19 auf der Zelloberfläche der leukämischen Blasten detektiert. Die Selektion auf leukämische Blasten erfolgt in allen Proben, nach der Sekundärfärbung und einer

Absättigung freier anti-humaner Antikörper durch 4 % Humanserum, mit patientenspezifischen Markern.



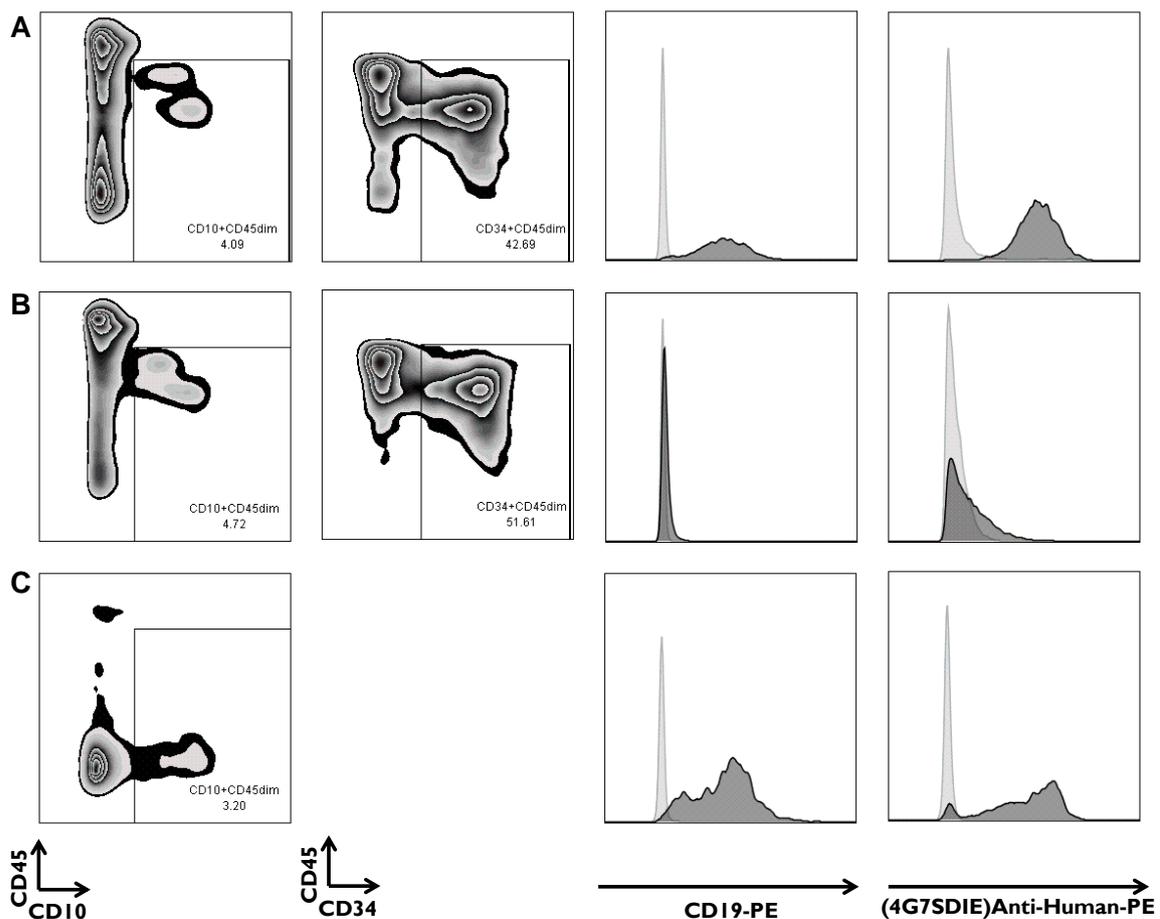
**Bild 3-32: CD19-Antigenmodulation und CD19-Rekonstitution auf leukämischen Blasten des Patienten #7.**  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC des Patienten #7 wurden mit CD19-PE (Klon 4G7) (schwarz, mittlere Abbildung), ohne Antikörper (grau, mittlere Abbildung), mit  $10 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE und R-PE-konjugiertem Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment (schwarz, rechte Abbildung) oder R-PE-konjugiertem Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment (grau, rechte Abbildung) inkubiert. Die Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD10-PerCp und CD34-APC auf CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. (A) Diese KM-MNC Probe wurde 35 Tage vor SZT und vor der ersten 4G7SDIE-Infusion gewonnen. (B) Diese KM-MNC Probe wurde 29 Tage vor SZT und nach zwei Infusionen mit 4G7SDIE von jeweils  $40 \text{ mg/m}^2$  gewonnen. (C) Diese KM-MNC Probe wurde 100 Tage nach SZT und 24 Tage nach der letzten 4G7SDIE Infusion von  $40 \text{ mg/m}^2$  gewonnen. Die Blasten dieser Rezidivprobe wurden durch die Selektion auf CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>HLA-B8<sup>+</sup>-Zellen identifiziert da HLA-B8 nur auf den Zellen des Patienten, nicht jedoch auf den Zellen des Stammzellspenders der haploidentischen SZT exprimiert wurde.

In der Analyse von KM-MNC des Patienten #7, welcher zunächst vor SZT im offenen Rezidiv mit einem Blastenanteil von 35 % der Lymphozyten mit 4G7SDIE behandelt wurde, wurde zunächst in der Probe vor Verabreichung des Antikörpers (**Bild 3-32A**) die ursprüngliche Expression von CD19 bestimmt. Hierzu wurde eine direkte Anfärbung von CD19 sowie die indirekte Färbung durchgeführt. In demselben Ansatz wurde die KM-MNC-Probe nach zweimaliger Infusion von 4G7SDIE analysiert und ein deutlich reduziertes Fluoreszenzsignal für CD19, sowohl in der direkten als auch der indirekten Färbung, detektiert (**Bild 3-32B**). Bei beiden Färbungen ist das

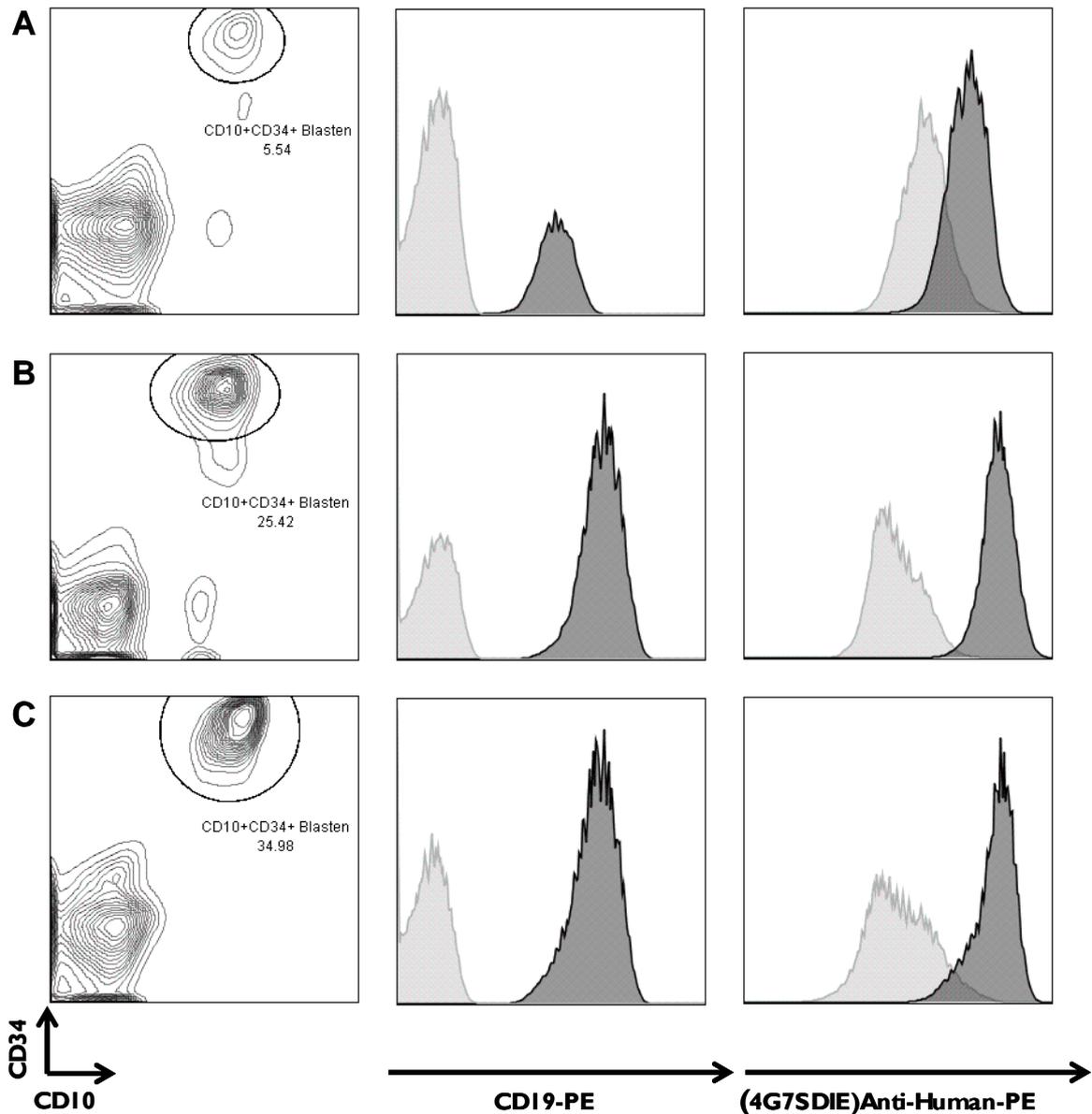
Fluoreszenzsignal der durch CD19-Antikörper gefärbten Proben (schwarz) jedoch höher als bei der Kontrolle ohne Antikörper bzw. der nur mit R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment gefärbten Probe (grau). Es muss somit noch freies CD19 verfügbar sein, an welches die eingesetzten Antikörper binden können. Eine Erhöhung der Hintergrundfärbung durch das R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment alleine in der KM-MNC-Probe nach den 4G7SDIE-Infusionen (**Bild 3-32B**, rechte Abbildung, grau) im Vergleich zu der Probe vor den Infusionen (**Bild 3-32A**, rechte Abbildung, grau) spricht dafür, dass gebundener therapeutischer 4G7SDIE auf den Blasten vorhanden ist. Nach einem Rezidiv des Patienten #7 am Tag 100 nach SZT wurde 24 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion von 40 mg/m<sup>2</sup> eine weitere KM-MNC-Probe auf die CD19-Expression analysiert. In diesem Fall konnten leukämische Blasten durch die Selektion neben CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> auf HLA-B8<sup>+</sup> erfolgen da der Patient HLA-B8-positiv war, der haploidentische Stammzellspender allerdings nicht. Es wurde ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal mit einer deutlich höheren spezifischen Fluoreszenzintensität (SFI = MFI Probe / MFI Kontrolle) als in **Bild 3-32B** detektiert. Vergleicht man die SFIs von **Bild 3-32C** mit **Bild 3-32A**, scheint die ursprüngliche CD19-Expression noch nicht wieder erreicht zu sein obwohl ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Da die KM-MNC-Probe von **Bild 3-32C** jedoch nicht im selben Ansatz wie **Bild 3-32A,B** analysiert wurde, kann keine sichere Aussage über die relative CD19-Expression getroffen werden. 24 Tage nach der letzten Antikörperinfusion sind Blasten des Patienten #7 zumindest nicht CD19-negativ und CD19 ist auf den leukämischen Blasten deutlich detektierbar.

In der Analyse von KM-MNC des Patienten #11, welcher zunächst vor SZT mit einem geringen Blastenanteil von 1,7 % der Lymphozyten mit 4G7SDIE behandelt wurde, wurde zunächst in der Probe vor Verabreichung des Antikörpers (**Bild 3-33A**) die ursprüngliche Expression von CD19 bestimmt. In demselben Ansatz wurden eine KM-MNC-Probe nach dreimaliger Infusion von 4G7SDIE (20 mg/m<sup>2</sup>) (**Bild 3-33B**) sowie eine KM-MNC-Probe im Rezidiv nach einer haploidentischer SZT und 18 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion (10 mg/m<sup>2</sup>) mit einem Blastenanteil von 3,2 % der Lymphozyten analysiert (**Bild 3-33C**). Eine CD34-Selektion konnte bei den Rezidivblasten nicht vorgenommen werden, da die leukämischen Blasten nicht mehr CD34-positiv waren. In **Bild 3-33B** ist kaum noch ein Fluoreszenzsignal für CD19, sowohl in der direkten als auch der indirekten Färbung, detektierbar. Bei beiden Färbungen ist das Fluoreszenzsignal der durch CD19-Antikörper gefärbten Proben (schwarz) kaum höher als bei der Kontrolle ohne Antikörper bzw. der nur mit R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment gefärbten Probe (grau). Da auch die Hintergrundfärbung durch das R-PE Ziege anti-human Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment alleine in der KM-MNC-Probe nach den 4G7SDIE-Infusionen (**Bild 3-33B**, rechte Abbildung, grau) im Vergleich zu der Probe vor den Infusionen (**Bild 3-33A**,

rechte Abbildung, grau) nicht erhöht ist, scheint CD19 nicht durch gebundenen 4G7SDIE maskiert zu sein, sondern tatsächlich kaum noch auf der Zelloberfläche der leukämischen Blasten exprimiert zu sein. In **Bild 3-33C** ist dargestellt, dass 18 Tage nach der letzten Antikörperinfusion von  $10 \text{ mg/m}^2$  wieder eine deutliche CD19-Oberflächenexpression auf den Rezidivblasten detektierbar ist. Die Fluoreszenzsignale und die SFIs, sowohl in der direkten als auch der indirekten Detektion, erreichten dasselbe Niveau wie in der KM-MNC-Probe vor der ersten Antikörperinfusion. Somit scheint die ursprüngliche CD19-Oberflächenexpression auf den Rezidivblasten des Patienten #11 wieder erreicht zu sein.



**Bild 3-33: CD19-Antigenmodulation und CD19-Rekonstitution auf leukämischen Blasten des Patienten #11.**  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC des Patienten #11 wurden mit CD19-PE (Klon 4G7) (schwarz, mittlere Abbildung), ohne Antikörper (grau, mittlere Abbildung), mit  $10 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE und R-PE-konjugiertem Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment (schwarz, rechte Abbildung) oder R-PE-konjugiertem Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment (grau, rechte Abbildung) inkubiert. (A) Diese KM-MNC Probe wurde 56 Tage vor SZT und vor der ersten 4G7SDIE-Infusion gewonnen. Die Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD45-APC/Cy7, CD10-PerCp und CD34-APC auf  $CD45^{\text{dim}}CD10^+CD34^+$ -Zellen identifiziert und betragen 1,7 % der lebenden Lymphozyten. (B) Diese KM-MNC Probe wurde 50 Tage vor SZT und nach drei Infusionen mit 4G7SDIE von jeweils  $20 \text{ mg/m}^2$  gewonnen. Die Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD45-APC/Cy7, CD10-PerCp und CD34-APC auf  $CD45^{\text{dim}}CD10^+CD34^+$ -Zellen identifiziert und betragen 2,4 % der lebenden Lymphozyten. (C) Diese KM-MNC Probe wurde 259 Tage nach SZT und 18 Tage nach der letzten 4G7SDIE Infusion von  $10 \text{ mg/m}^2$  gewonnen. Die Blasten dieser Rezidivprobe wurden durch die Selektion auf  $CD45^{\text{dim}}CD10^+$ -Zellen identifiziert und betrug 3,2 %.



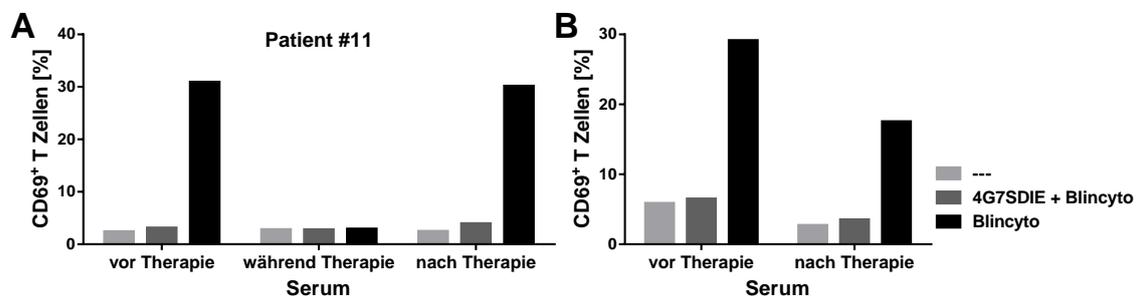
**Bild 3-34: CD19-Rekonstitution auf leukämischen Blasten des Patienten #14.**  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC des Patienten #14 wurden mit CD19-PE (Klon 4G7) (schwarz, mittlere Abbildung), ohne Antikörper (grau, mittlere Abbildung), mit  $10 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE und R-PE-konjugiertem Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment (schwarz, rechte Abbildung) oder R-PE-konjugiertem Anti-Human-IgG(Fc)  $F(ab')_2$  Fragment (grau, rechte Abbildung) inkubiert. Die Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD10-PerCp und CD34-APC auf CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. (A) Diese KM-MNC Probe wurde 241 Tage nach SZT und 20 Tage nach der letzten 4G7SDIE Infusion von  $40 \text{ mg/m}^2$  gewonnen. (B) Diese KM-MNC Probe wurde 258 Tage nach SZT und 37 Tage nach der letzten 4G7SDIE Infusion von  $40 \text{ mg/m}^2$  gewonnen. (C) Diese KM-MNC Probe wurde 272 Tage nach SZT und 51 Tage nach der letzten 4G7SDIE Infusion von  $40 \text{ mg/m}^2$  gewonnen.

Von Patient #14 waren keine primären Blasten verfügbar. Es wurden jedoch KM-MNC an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der letzten Antikörperinfusion analysiert. Die detektierten Fluoreszenzsignale und SFIs 37 Tage nach der letzten Antikörperinfusion von  $40 \text{ mg/m}^2$  (Bild 3-34B), waren deutlich höher als bei der KM-MNC-Probe 20 Tage nach der letzten Antikörperinfusion (Bild 3-34A). Eine weitere Steigerung der Fluoreszenzsignale bzw. SFIs 51 Tage nach der letzten Antikörperinfusion

gegenüber 37 Tagen danach, wurde nicht beobachtet. Somit scheint die CD19-Rekonstitution bei Patient #14 länger als 20 Tage, jedoch nicht länger als 37 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion anzudauern.

### 3.3.9 Inhibition der Blinatumomab-Aktivität durch residuale Serumspegel von 4G7SDIE

In 3.2.7 wurde gezeigt, dass die T-Zellaktivierung durch Blinatumomab, und somit dessen Effektorfunktion, bereits durch niedrige Konzentrationen von 4G7SDIE inhibiert wird. Konzentrationen von 28 ng/ml 4G7SDIE reichten aus, um bereits 50 % der CD19-abhängigen T-Zellaktivierung durch Blinatumomab zu inhibieren, 4G7SDIE Konzentrationen über 100 ng/ml inhibierten die CD19-abhängige T-Zellaktivierung durch Blinatumomab nahezu vollständig. Bei der in dieser Arbeit angewandten Methode zur Bestimmung der Serumkonzentrationen liegt das Detektionslimit bei etwa 100 ng/ml. Deshalb war eine sensitivere Methode nötig, welche geringste Mengen von 4G7SDIE in Patientenserum, welche eine T-Zellaktivierung durch Blinatumomab inhibieren könnten, detektieren kann. Hierzu wurde die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Analyse der Konkurrenz von 4G7SDIE und Blinatumomab über die Detektion der T-Zellaktivierung modifiziert.



**Bild 3-35: Inhibition der Blinatumomab-Aktivität durch residualen 4G7SDIE in Patientenserum.**  $1 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit Patientenserum (hellgrau und schwarz) oder Patientenserum mit  $1 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE (dunkelgrau) vorinkubiert und anschließend mit Medium (hellgrau) oder  $1 \text{ ng/ml}$  Blinatumomab (dunkelgrau und schwarz) 18 h inkubiert. In einer anschließenden FACS-Analyse wurde der Anteil CD69-positiver T Zellen, selektioniert auf CD56-CD3<sup>+</sup>, bestimmt. (A) Von Patient #11 wurden Serumproben vor der ersten 4G7SDIE-Infusion, 1 h nach einer 4G7SDIE-Infusion und 20 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion analysiert. (B) Von diesem Patienten wurden Serumproben vor der ersten 4G7SDIE-Infusion und 21 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion analysiert.

Es wurden  $1 \cdot 10^6$  PBMC, welche CD19-positive B Zellen als Zielzellen für die 4G7SDIE- und Blinatumomab-Bindung enthalten, mit Serum von einem bestimmten Therapiezeitpunkt eines 4G7SDIE-behandelten Patienten oder, als Positivkontrolle zur Inhibition der T-Zellaktivierung, mit dem zu untersuchenden Serum und  $1 \mu\text{g/ml}$  4G7SDIE präinkubiert und anschließend mit  $1 \text{ ng/ml}$  Blinatumomab, was den maximal erreichten Serumspegeln *in vivo* entspricht, 18 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Eine

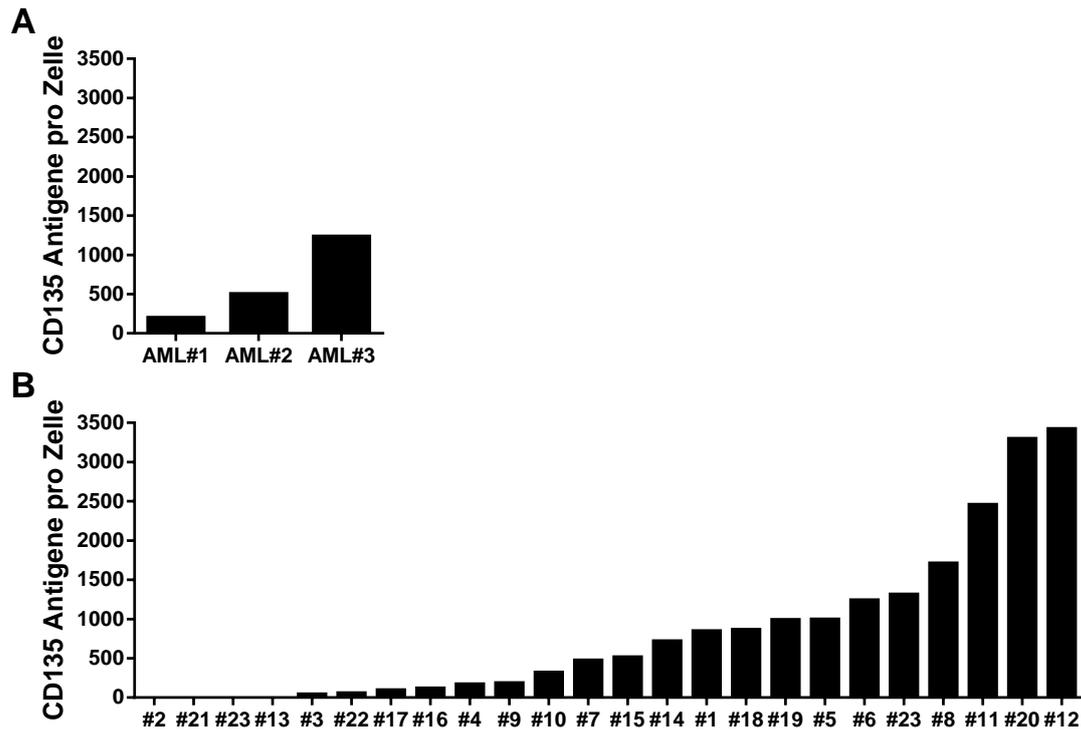
Negativkontrolle ohne Zugabe von Blinatumomab wurde mitgeführt. In einer anschließenden FACS-Analyse wurde die T-Zellaktivierung durch Blinatumomab bestimmt. Die eingesetzten Antikörper sind in **Tabelle 2-9: T-Zellaktivierungspanel** aufgeführt.

In **Bild 3-35** ist die Analyse der Seren von zwei 4G7SDIE-behandelten Patienten dargestellt. Die Seren vor Beginn der 4G7SDIE-Therapie wurden analysiert um die maximal mögliche T-Zellaktivierung durch Blinatumomab zu bestimmen und betrug 30,9 % der CD3<sup>+</sup> T Zellen (**Bild 3-35A**) bzw. 29,1 % der CD3<sup>+</sup> T Zellen (**Bild 3-35B**). Durch Zugabe von 4G7SDIE in das Serum vor Therapie wurde in beiden untersuchten Patientenseren die T-Zellaktivierung vollständig inhibiert. Von Patient #11 wurde eine Serumprobe, welche im Therapieverlauf eine Stunde nach einer 4G7SDIE-Infusion gewonnen wurde, analysiert. Aufgrund vermutlich sehr hoher 4G7SDIE Serumkonzentrationen, wie in 3.3.5.2 beschrieben, war keine T-Zellaktivierung durch Blinatumomab detektierbar. Von Patient #11 (**Bild 3-35A**) wurde 20 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion von 10 mg/m<sup>2</sup> eine Serumprobe analysiert. Es wurde eine T-Zellaktivierung von 30,1 % der CD3<sup>+</sup> T Zellen detektiert. Somit ist zu dem analysierten Zeitpunkt keine 4G7SDIE Konzentration mehr vorhanden welche eine T-Zellaktivierung durch Blinatumomab inhibieren könnte. In **Bild 3-35B** wurde Serum analysiert welches 21 Tage nach der letzten 4G7SDIE-Infusion von 40 mg/m<sup>2</sup> gewonnen wurde analysiert. In diesem Fall betrug die T-Zellaktivierung durch Blinatumomab 17,5 %, was auf eine Inhibition durch residualen 4G7SDIE im Patientenserum an dem untersuchten Zeitpunkt hindeutet.

## 3.4 Weitere potentielle Zielantigene zur Therapie der BCP-ALL

### 3.4.1 FLT3 (CD135)

FLT3 (CD135) ist als geeignetes Zielantigen für die Immuntherapie mit FLT3-Antikörpern der AML im Erwachsenenalter beschrieben. Um zu untersuchen, ob FLT3 auch ein geeignetes Zielantigen zur Therapie der pädiatrischen AML sowie der pädiatrischen BCP-ALL ist, wurde die absolute Expressionsstärke von FLT3 auf leukämischen Blasten von 3 AML Patienten sowie 24 BCP-ALL Patienten mithilfe des QIFIKITs quantifiziert. Die untersuchten Blasten stammen aus der Biobank der Kinderklinik Tübingen. Bei der Analyse der FACS-Färbung wurden die leukämischen Blasten mit dem für den jeweiligen Patienten relevanten Markern selektiert und die FLT3-Expression quantifiziert.



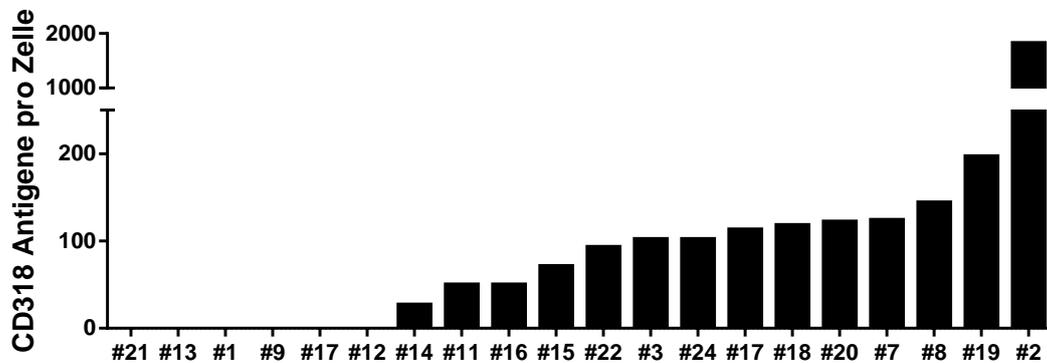
**Bild 3-36: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von FLT3 auf primären pädiatrischen Blasten.** (A)  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC von 3 pädiatrischen AML Patienten wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  murinem FLT3-Antikörper 4G8 beziehungsweise der Isotypkontrolle IgG1 inkubiert. Die Anfärbung der Mikropartikelpopulation und Antikörper-markierten Zellen erfolgte durch einen R-PE-konjugierten Anti-Maus  $F(ab')_2$  Sekundärantikörper. Leukämische Blasten wurden bei AML#1 durch die Selektion auf  $CD45^{\text{dim}}CD117^+CD33^+CD34^+$ , bei AML#2 durch die Selektion auf  $CD3\text{-HLA-DR}^+CD33^+$  und bei AML#3 durch die Selektion auf  $CD14\text{-}CD117^+CD33^+$  identifiziert. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wird die Antigendichte anhand einer Standardkurve berechnet. (B) Analyse von pädiatrischen BCP-ALL Blasten auf die FLT3-Oberflächenexpression. Leukämische Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD10-PerCp und CD34-APC auf  $CD10^+$  und/oder  $CD34^+$ -Zellen identifiziert.

In Abbildung **Bild 3-36A** ist die FLT3-Expression auf leukämischen Blasten der AML Patienten dargestellt. Die FLT3-Antigendichte betrug auf dieser geringen Probenanzahl im Mittel  $6,44 \cdot 10^2$  ( $\pm 5,32 \cdot 10^2$ ) und reichte von  $1,98 \cdot 10^2$  bis  $1,23 \cdot 10^3$ . In Abbildung **Bild 3-36B** ist dargestellt, dass die FLT3-Antigenexpression auf BCP-ALL Blasten sehr heterogen ist. Vier der 24 analysierten Proben exprimierten kein FLT3 auf der Zelloberfläche wohingegen auf 12/24 eine Expression von über 500 Antigenen pro Zellen detektiert wurde. Die mittlere FLT3-Antigendichte betrug  $8,24 \cdot 10^2$  ( $\pm 1 \cdot 10^3$ ) wobei die höchste detektierte FLT3-Antigendichte  $3,42 \cdot 10^3$  betrug.

### 3.4.2 CDCP1 (CD318)

Eine Expression von CDCP1 (CD318) ist im unterschiedlichen Umfang für die AML, CML und ALL im Erwachsenenalter beschrieben. Um zu untersuchen, ob CDCP1 auch ein geeignetes Zielantigen zur Therapie der pädiatrischen BCP-ALL ist, wurde die absolute Expressionsstärke von CDCP1 auf leukämischen Blasten von 20 BCP-ALL

Patienten mithilfe des QIFIKITs quantifiziert. Bei der Analyse der FACS-Färbung wurden die leukämischen Blasten mit dem für den jeweiligen Patienten relevanten Markern CD19, CD10 und oder CD34 selektiert und die CDCP1-Expression quantifiziert.

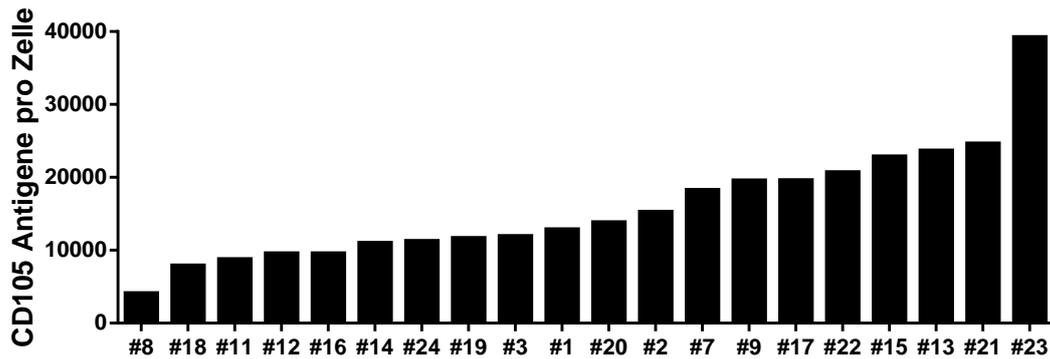


**Bild 3-37: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von CDCP1 auf primären pädiatrischen BCP-ALL Blasten.** (A)  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC von 20 pädiatrischen BCP-ALL Patienten wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  murinem CDCP1-Antikörper 8-3H/10 beziehungsweise der Isotypkontrolle IgG2a inkubiert. Die Anfärbung der Mikropartikelpopulation und Antikörper-markierten Zellen erfolgte durch einen R-PE-konjugierten Anti-Maus  $F(ab')_2$  Sekundäntikörper. Leukämische Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD19-BV785, CD10-PerCp und CD34-APC auf CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> und/oder CD19<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-Zellen identifiziert. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wird die Antigendichte anhand einer Standardkurve berechnet.

Eine CDCP1-Oberflächenexpression von  $> 2 \cdot 10^2$  CDCP1-Antigene pro Zelle wurde auf einer von 20 analysierten BCP-ALL Blasten mit  $1,82 \cdot 10^3$  detektiert. Die mittlere CDCP1-Antigendichte betrug  $1,57 \cdot 10^2$  ( $\pm 3,97 \cdot 10^2$ ).

### 3.4.3 Endoglin (CD105)

Endoglin (CD105) ist als vaskuläres Zielantigen für die Immuntherapie verschiedener soliden Tumore beschrieben. Um zu untersuchen, ob Endoglin auch auf Blasten der pädiatrischen BCP-ALL exprimiert wird, wurde die absolute Expressionsstärke von Endoglin auf leukämischen Blasten von 20 BCP-ALL Patienten mithilfe des QIFIKITs quantifiziert. Bei der Analyse der FACS-Färbung wurden die leukämischen Blasten mit dem für den jeweiligen Patienten relevanten Markern CD19, CD10 und oder CD34 selektiert und die Endoglin-Expression quantifiziert.



**Bild 3-38: Quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression von Endoglin auf primären pädiatrischen BCP-ALL Blasten.** (A)  $1 \cdot 10^6$  KM-MNC von 20 pädiatrischen BCP-ALL Patienten wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  murinem Endoglin-Antikörper K-ro22 beziehungsweise der Isotypkontrolle IgG2a inkubiert. Die Anfärbung der Mikropartikelpopulation und Antikörper-markierten Zellen erfolgte durch einen R-PE-konjugierten Anti-Maus  $F(ab')_2$  Sekundärantikörper. Leukämische Blasten wurde durch die Selektion mit den Antikörpern CD19-BV785, CD10-PerCp und CD34-APC auf  $CD19^+CD10^+$  und/oder  $CD19^+CD34^+$ -Zellen identifiziert. Nach einer durchflusszytometrischen Analyse wird die Antigendichte anhand einer Standardkurve berechnet.

Es wurde eine Endoglin-Oberflächenexpression auf allen analysierten BCP-ALL Blasten detektiert. Die Endoglin-Antigendichte betrug im Mittel  $1,58 \cdot 10^4$  ( $\pm 7,99 \cdot 10^3$ ) und reichte von  $4,08 \cdot 10^3$  bis  $3,92 \cdot 10^4$ . Somit die liegt Endoglin-Oberflächenexpression auf den analysierten BCP-ALL Blasten in demselben Bereich wie die CD19-Oberflächenexpression.

## 4 Diskussion

### 4.1 CD19 als Zielantigen der BCP-ALL

#### 4.1.1 CD19-Expression und Abhängigkeit der 4G7SDIE-vermittelten ADCC

Obwohl einige therapeutische Antikörper gegen hämatologische Antigene wie CD20 und CD52 bereits zugelassen sind (**Tabelle 1-1**), sind sie zur immuntherapeutischen Anwendung in der BCP-ALL weniger geeignet. CD20 wird auf BCP-ALL Blasten meist nicht homogen und auf 50 % - 90 % aller BCP-ALLs überhaupt nicht exprimiert <sup>154, 169, 170</sup>. Die Therapie mit CD52 Antikörpern ist aufgrund der ubiquitären CD52 Expression mit einem hohen Infektionsrisiko assoziiert <sup>178, 179</sup>. CD22 ist aufgrund seiner raschen Internalisierung durch eine Antikörperbindung eher für Immunkonjugate geeignet und wurde in klinischen Studien bereits getestet aber noch nicht zugelassen (**Tabelle 1-1**). Die Attraktivität von CD19 als Zielantigen der BCP-ALL resultiert aus der exklusiven Expression auf der B-Zellreihe und follikulären dendritischen Zellen sowie der stabilen, homogenen und universellen Expression von CD19 auf BCP-ALL Blasten <sup>154, 184, 185</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mittlere CD19-Expression von  $1,5 \cdot 10^4$  ( $4,5 \cdot 10^3 - 2,4 \cdot 10^4$ ,  $n = 23$ ) CD19-Antigenen pro Zelle detektiert (**Bild 3-1**). Diese liegt deutlich über der publizierten Antigendichte von  $4 \cdot 10^3$  ( $4,5 \cdot 10^2 - 1,7 \cdot 10^4$ ,  $n = 54$ ) CD22 Antigenen pro BCP-ALL Blast <sup>176</sup>. Eine homogene und universelle CD19-Expression auf primären BCP-ALL Blasten konnte bestätigt werden. Allerdings variierte die CD19-Antigendichte zwischen verschiedenen BCP-ALLs stark, wodurch die Frage aufkam, ob die CD19-Expressionsstärke einen Einfluss auf die ADCC mit dem CD19-Antikörper 4G7SDIE haben könnte. Ein Zusammenhang zwischen der initialen CD19-Expression auf den primären Blasten eines Patienten und dem klinischen Ansprechen konnte in dieser geringen Anzahl analysierter Patienten nicht beobachtet werden (**Bild 3-1, Bild 3-24**). In einem Modellsystem mit CD19-Transfektanten mit demselben genetischen Hintergrund konnte gezeigt werden, dass die CD19-Expression mit der 4G7SDIE-vermittelten ADCC positiv korreliert (**Bild 3-4**). Die CD19-Antigendichte hat somit einen Einfluss auf die Effizienz der 4G7SDIE-vermittelten ADCC. Bei der Untersuchung von 3 leukämischen Blasten konnte in 2 von 3 Spendern eine höhere 4G7SDIE-vermittelte ADCC gegen BCP-ALLs mit einer höheren CD19-Antigendichte beobachtet werden (**Bild 3-11**). Dies bestätigt, dass die CD19-Expression für die 4G7SDIE-vermittelte ADCC relevant ist, andere Einflussfaktoren wie die HLA-Expression der Blasten und weitere

Interaktionen zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren und Liganden, ebenso einen Einfluss auf die Effizienz der Zielzellyse haben. Der relative Einfluss der CD19-Antigendichte auf die ADCC gegen BCP-ALL Blasten *in vivo*, bleibt unklar.

#### 4.1.2 4G7SDIE-induzierte Modulation der CD19-Oberflächenexpression

Die stabile Antigenexpression ist für den Erfolg unkonjugierter therapeutischer Antikörper mit immunvermittelten Effektormechanismen essentiell. Die Modulation oder der Antigenverlust durch therapeutische Antikörper ist allerdings ein häufig beobachtetes Phänomen. Für Typ I CD20 Antikörper wie Rituximab wurde in der CLL und dem Mantezelllymphom *in vitro* eine ausgeprägte CD20-Modulation beschrieben<sup>271</sup>. Im Falle des CD30-Antikörpers Lintuzumab wurde dessen Versagen in einer Phase III Studie zum Teil der induzierten CD30-Modulation zugeschrieben<sup>272</sup>. Das Antigen CD22 ist für seine rapide Internalisierung durch Antikörperbindung bekannt<sup>174</sup>. Während eine Studie mit dem unkonjugierten CD22-Antikörper Epratuzumab in der BCP-ALL nicht erfolgreich war, zeigten CD22-Immunkonjugate, welche sich die Internalisierung zunutze machen, erste klinische Erfolge<sup>173, 175, 176</sup>. Die Literaturlage zur Antigenmodulation durch CD19-Antikörper ist nicht eindeutig. Durch den Antikörper HD37 wurde eine, in Relation zu CD22 geringe, aber intermediäre Modulation von CD19 auf DAUDI Zellen beschrieben<sup>273</sup>. Eine weitere Publikation beschreibt eine rapide Internalisierung von CD19 durch HD37 und andere CD19-Antikörper auf den Zelllinien DAUDI und RAMOS<sup>274</sup>. Bei den Zelllinien RAJI und ARH77 sowie auf reifen B Zellen wurde eine geringe CD19-Modulation beobachtet. Die Autoren führen die unterschiedliche Ausprägung der CD19-Modulation auf eine inverse Korrelation mit der CD21-Expression zurück. Auf den Zelllinien RAJI und Namalwa wurde durch den CD19-Antikörper B43 eine starke Internalisierung induziert<sup>275</sup>. In einer weiteren Studie wurde von einer sehr geringen CD19-Internalisierung durch ein CD19-Immunkonjugat basierend auf dem Klon FMC63 berichtet<sup>186</sup>. Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich unter Anderen um RAJI und RAMOS Zellen und die Ergebnisse wurden mit dem CD22-Immunkonjugat BL22 verglichen, welches eine deutlich höhere Effizienz bezüglich der Internalisierung sowie Zielzelltod zeigte. Auf primären CLL Zellen wurde durch die Klone J4.119 und HD237 kaum eine CD19-Modulation aber eine deutliche CD22-Modulation induziert<sup>276</sup>.

Die Analyse der CD19-Modulation auf primären BCP-ALL Blasten ergab eine moderaten, aber sehr heterogenen, Verlust der Oberflächenexpression nach 24 h von 0 % - 60 % (**Bild 3-5, Bild 3-31**). Für die Zelllinien RAJI und MHH-CALL-4 konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Exposition zu sättigenden 4G7SDIE-Konzentrationen die Reduktion der CD19-Oberflächenexpression aufrecht

erhält, wohingegen die Entfernung von 4G7SDIE eine vollständige Rekonstitution der CD19-Expression innerhalb von 3 – 7 Tagen erlaubt (**Bild 3-6**). Da gezeigt wurde, dass die Antigendichte von CD19 einen direkten Einfluss auf die Effizienz der 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat (**Bild 3-4**), könnte der Grad der CD19-Modulation einen Einfluss auf den therapeutischen Erfolg von 4G7SDIE haben. Es bleibt unklar weshalb die verschiedenen BCP-ALLs eine so variable CD19-Modulation nach 4G7SDIE Exposition zeigten. Für Rituximab wurde beschrieben, dass eine Expression des inhibitorischen Rezeptors FcγRIIb (CD32) auf Zielzellen der B-Zellreihe mit einer ausgeprägteren Internalisierung von CD20 und einer verminderten Phagozytose durch Makrophagen korrelierte <sup>277</sup>. Zudem korrelierte eine hohe FcγRIIb-Expression mit einem schlechteren PFS von Mantelzelllymphompatienten. Die Kombination von Rituximab mit einem blockierenden FcγRIIb-Antikörper wurde patentiert <sup>278</sup>. Zudem wurden ADCC-vermittelnde FcγRIIb-Antikörper entwickelt <sup>279</sup>. In einer größeren Patientenkohorte wäre die Analyse auf die FcγRIIb-Expression auf BCP-ALL Blasten und der Korrelation mit der CD19-Modulation durch 4G7SDIE sowie der Einfluss einer Blockierung von FcγRIIb eine interessante Fragestellung. Möglicherweise könnte eine Kombination solcher Antikörper mit 4G7SDIE die CD19-Modulation *in vivo* verringern und dadurch die klinische Effizienz von 4G7SDIE gesteigert werden.

## 4.2 Präklinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE

Obwohl CD19, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, ein vielversprechendes Zielantigen der BCP-ALL ist, ist bisher kein monoklonaler CD19-Antikörper für diese Entität zugelassen (1.3.1.1). Andere Formate wie Immunkonjugate, CAR T Zellen und BiTEs sind, obgleich klinisch erfolgreich, mit gewissen Nachteilen behaftet. So zeigten CD19-Immunkonjugate (Combotox, SAR3419) eine klinische Aktivität, waren jedoch mit einer hohen Toxizität assoziiert <sup>211, 212</sup>. Für CD19-CAR T Zellen konnte in einer Phase I Studie eine beeindruckende klinische Aktivität in der BCP-ALL nachgewiesen werden <sup>248</sup>. Die Therapie mit CD19-CAR T Zellen ist jedoch mit einem hohen Risiko für ein „*cytokine release syndrome*“ assoziiert und CAR T Zellen können unter Umständen dauerhaft im Patienten persistieren, was zu einer andauernden B Zellepletion führt <sup>238, 247, 248</sup>. Die Generierung von autologen CD19-CAR T Zellen ist mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden, wodurch die Behandlung großer Patientenkohorten erschwert wird. Zudem erfolgt die Generierung und Anwendung in klinischen Studien bisher nur an spezialisierten Zentren <sup>249-261</sup>. Der in der adulten B-Linien ALL zugelassene CD19xCD3 BiTE Blinatumomab ist für BCP-ALL Patienten momentan im

Rahmen einer Phase II Studie, mit dem Einschlusskriterium von mindestens 25 % leukämischen Blasten im Knochenmark, oder über ein „*expanded access*“ Protokoll an wenigen ausgewählten Zentren verfügbar<sup>229, 230</sup>. Somit ist für ein Großteil der MRD-positiven BCP-ALL Patienten keine Therapieoption vorhanden. Zudem ist das Risiko für schwerwiegende Nebenwirkungen unter einer Blinatumomabtherapie hoch, weshalb die Risiken bei einem Einsatz in einer nicht akut lebensbedrohlichen MRD-Situation abgewägt werden müssen<sup>231-233</sup>. Da eine MRD-Positivität in der BCP-ALL sowohl vor als auch nach einer SZT jedoch mit einer äußerst schlechten Prognose assoziiert ist, ist eine frühzeitige immuntherapeutische Behandlung mit einer möglichst geringen Toxizität sinnvoll<sup>42, 52</sup>. Hierfür wurde der Fc-optimierte CD19-Antikörper 4G7SDIE generiert und in pharmazeutischer Qualität hergestellt (2.1.10)<sup>145</sup>. Zunächst wurde 4G7SDIE im Rahmen dieser Arbeit präklinisch charakterisiert.

#### **4.2.1 Effektormechanismen, Fc-Optimierung und zytolytische Aktivität von 4G7SDIE**

Zunächst wurde durch eine Titration auf BCP-ALL Blasten und NALM-16 Zellen gezeigt, dass eine halbmaximale Sättigung bei unter 100 ng/ml und bei 1 µg/ml die maximale Antigenbindung erreicht ist (**Bild 3-7**). Die biologische Aktivität von 4G7SDIE wurde in Zytotoxizitätstests mit einer Zelllinie und gesunden Effektorzellspendern untersucht. Es konnte eine erhöhte Lyse mit Effektorzellen und 4G7SDIE, aber weder mit 4G7SDIE alleine noch mit autologem Serum der Effektorzellspender und 4G7SDIE, induziert werden (**Bild 3-8A**). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die ADCC, nicht jedoch die direkte Zytotoxizität oder CDC, der Effektormechanismus von 4G7SDIE ist. In funktionellen Vergleichstests mit dem chimärisierten Pendant zu 4G7SDIE,  $\chi$ 4G7, und dem Fc-optimierten 4G7SDIE wurde stets eine deutlich höhere ADCC beziehungsweise NK Zelldegranulation und NK Zellaktivierung für 4G7SDIE beobachtet (**Bild 3-9**). Der chimärisierte Antikörper  $\chi$ 4G7 vermittelte bei einer Konzentration von 1 µg/ml keine ADCC und induzierte keine NK Zelldegranulation oder -aktivierung. Die Fc-Optimierung scheint somit für diesen Antikörper zur effizienten Vermittlung seiner Effektorfunktion essentiell zu sein. Zudem konnte die Lyse von primären BCP-ALL Blasten durch PBMC durch die Zugabe von 4G7SDIE beträchtlich gesteigert werden (**Bild 3-10**). Die EC<sub>50</sub> wurde bei variierenden 4G7SDIE-Konzentrationen, im Mittel bei 65 ng/ml 4G7SDIE, erreicht, die maximale Lyse war bei 1 µg/ml stets erreicht (**Bild 3-11**). Somit wurde die biologische Aktivität von 4G7SDIE gegen leukämische Blasten der BCP-ALL *in vitro* nachgewiesen. Dabei wurde allerdings eine deutliche Varianz in der Lyse der verschiedenen BCP-ALL Blasten durch denselben PBMC-Spender beobachtet (**Bild**

**3-10, Bild 3-11**). Zudem wurde eine Varianz der Lyse von denselben Zielzellen durch unterschiedliche PBMC-Spender beobachtet (**Bild 3-8B, Bild 3-11**). Auf Seiten der Effektorzellen könnte der Anteil an ADCC-vermittelnden Effektorzellen in der PBMC-Population, die Expression aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren wie die „*killer cell immunoglobulin-like receptors*“ (KIRs), die NK Zelllizenzierung sowie der FcγRIIIa-158V/F-Genotyp einen Einfluss auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC<sup>90-93, 280-284</sup> haben. Potentielle Einflussfaktoren auf Seiten der Zielzelle sind die quantitative CD19- und HLA-Expression sowie weitere aktivierende und inhibitorische Liganden wie KIR-Liganden oder die NKG2D Liganden MICA, MICB und ULBP1-4 (**Bild 1-5**). Eine eindeutige Korrelation zwischen CD19- oder HLA-Expression und 4G7SDIE-vermittelter ADCC konnte nicht beobachtet werden (**Bild 3-1, Bild 3-11**). Vermutlich ist dies auf einem Zusammenspiel mehrerer Einflussfaktoren und der geringen Zahl an Experimenten begründet. Zudem wurde bereits eine deutliche Interassayvarianz bei denselben Zielzellen mit demselben Effektorzellspender zu verschiedenen Testzeitpunkten beobachtet (**Bild 3-8C**).

#### 4.2.2 Kreuzblockierung von CD19-Antikörpern und Blinatumomab

Die durchflusszytometrische Analyse der CD19-Expression unter der Behandlung mit 4G7SDIE und anderen CD19-Antikörpern zur Detektion normaler B Zellen als auch residualer leukämischer Blasten, ist ein wichtiger Bestandteil von Begleituntersuchungen im Therapieverlauf. Um die durchflusszytometrische Detektion einer CD19-Expression nicht zu beeinträchtigen, muss das Epitop des Antikörpers, welcher zur Analyse eingesetzt wird, unabhängig von dem Epitop des therapeutischen Antikörpers sein. In der Literatur wurde bereits eine vollständige Kreuzblockierung des CD19-Antikörpersklons HD37 durch den Klon 4G7 beschrieben<sup>285</sup>. Zudem wurde eine Kreuzblockierung der CD19-Antikörper B43 und AB1 durch BU-12, F974A2, HD37, SJ25C1 und der beiden Antikörper untereinander beschrieben<sup>275</sup>. In Kreuzblockierungsstudien mit 4G7SDIE wurden die CD19-Antikörperklone HD37, SJ25C1, LT19, J3-119 und 4G7 analysiert (**Bild 3-12**). Alle untersuchten Antikörper wurden in ihrer Bindung vollständig, und vergleichbar mit dem Kontrollantikörper 4G7, inhibiert. Somit erkennen die analysierten CD19-Antikörperklone von 4G7SDIE nicht unabhängige Epitope und sind für eine durchflusszytometrische Analyse der CD19-Expression unter einer Therapie mit 4G7SDIE nicht geeignet.

Da das CD19-bindende scFv-Fragment von Blinatumomab auf dem Klon HD37 basiert (2.1.10), war davon auszugehen, dass 4G7SDIE die Aktivität von Blinatumomab gegen CD19-exprimierende Zielzellen inhibieren könnte. Im Falle einer vorangehenden Behandlung mit 4G7SDIE könnte die klinische Aktivität von Blinatumomab somit

inhibiert werden. In funktionellen Kreuzblockierungsstudien wurde gezeigt, dass bereits bei einer Konzentration von 28 ng/ml 4G7SDIE die Aktivierung von 50 % der durch Blinatumomab maximal aktivierbaren T Zellen, und bei Konzentrationen zwischen 100 ng/ml und 1 µg/ml 4G7SDIE die Aktivierung aller T Zellen durch Blinatumomab inhibiert wird (**Bild 3-13**). Somit reichen vermutlich bereits geringste residuale Serumspiegel von 4G7SDIE aus um die klinische Aktivität von Blinatumomab zu beeinträchtigen. Bei einer geplanten Therapie mit Blinatumomab nach vorheriger 4G7SDIE-Behandlung sollte darauf geachtet werden, dass idealerweise kein 4G7SDIE mehr im Serum des Patienten vorhanden ist.

### 4.2.3 4G7SDIE-vermittelte ADCC von NK Zellen und $\gamma\delta$ -T Zellen

Neben NK Zellen wird der ADCC-vermittelnde Rezeptor Fc $\gamma$ RIIIa auf Monozyten, Makrophagen und  $\gamma\delta$ -T Zellen exprimiert (**Tabelle 1-2**)<sup>286</sup>. Für Monozyten wurde bereits gezeigt, dass der Antikörper MOR208 (XmAb5574), welcher wie 4G7SDIE auf dem Klon 4G7 basiert und dieselbe Fc-Optimierung trägt, keine ADCC über diesen Zelltyp vermittelt<sup>146</sup>. Dies könnte auf die Koexpression des inhibierenden Rezeptors Fc $\gamma$ RIIb begründet sein. Für  $\gamma\delta$ -T Zellen wurde gezeigt, dass CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T Zellen mit therapeutischen Antikörpern wie Rituximab, Trastuzumab und hu14.18 ADCC vermitteln können<sup>270, 287, 288</sup>. Für CD19-Antikörper wurden, neben der Publikation welche im Rahmen dieser Arbeit entstand, bisher keine Studien zur  $\gamma\delta$ -T Zell-vermittelten ADCC durchgeführt<sup>268</sup>.  $\gamma\delta$ -T Zellen sind aufgrund diverser Eigenschaften wie ihre fehlende MHC-Restriktion, ihrem zytotoxischen Potential gegen hämatologische Erkrankungen sowie ihrer Fähigkeit zur ADCC-Vermittlung, vielversprechende Effektorzellen für die BCP-ALL<sup>289-293</sup>. Durch ihre fehlende MHC-Alloreaktivität wird keine GvHD-Induktion durch  $\gamma\delta$ -T Zellen erwartet<sup>294, 295</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften, sowie der vorteilhaften Immunrestitution nach SZT, werden  $\gamma\delta$ -T Zellen im Gegensatz zu MHC-restringierten  $\alpha\beta$ -T Zellen in aktuellen Transplantationsprotokollen nicht mehr aus dem Transplantat depletiert<sup>296-299</sup>. Somit sind  $\gamma\delta$ -T Zellen neben den NK Zellen früh nach SZT in hoher Zahl als Effektorzellen verfügbar<sup>299</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kombination von 4G7SDIE oder N19-C16 mit primären und expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen *in vitro* analysiert.

In CD107a/ICS-Tests konnte eine 4G7SDIE- und N19-C16-vermittelte ADCC mit primären  $\gamma\delta$ -T Zellen gezeigt werden (**Bild 3-14**). In expandierten, isolierten  $\gamma\delta$ -T Zellen wurde eine hohe Grundaktivierung detektiert, so dass der CD107a/ICS-Test nicht geeignet war die 4G7SDIE- und N19-C16-vermittelte ADCC zu analysieren (**Bild 3-16**). Der CD107a/ICS-Test ist somit zur Analyse nicht expandierter  $\gamma\delta$ -T Zellen, welche nicht isoliert werden müssen, aber nicht für expandierte

$\gamma\delta$ -T Zellen geeignet. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Anteil CD16-exprimierender  $\gamma\delta$ -T Zellen unter den  $\gamma\delta$ -T Zellen und der Degranulation und Zytokinproduktion durch 4G7SDIE Stimulation beobachtet (**Bild 3-15B**). Dies deutet darauf hin, dass die CD107a-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -positiven Zellen dem CD16<sup>+</sup>-Kompartiment der  $\gamma\delta$ -T Zellen angehören und die Aktivierung durch 4G7SDIE CD16-abhängig ist. Experimente mit CD16-blockierende Antikörpern oder der selektiven Entfernung der CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T Zellen aus der  $\gamma\delta$ -T Zellpopulation könnten diese Hypothese untermauern. Es wurde gezeigt, dass durch die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-15 und IL-21 der Anteil der CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T Zellen erhöht werden kann<sup>300, 301</sup>. Die Steigerung der CD16-Expression von  $\gamma\delta$ -T Zellen *in vivo* und in Expansionsprotokollen, könnte einen synergistischen Effekt auf die Behandlung mit therapeutischen Antikörpern haben. Zudem haben die Zytokine IL-2, IL-15 und IL-21 einen verstärkenden Effekt auf die NK Zell-vermittelte ADCC<sup>154, 302, 303</sup>, so dass ein klinischer Einsatz dieser Zytokine sowohl die  $\gamma\delta$ -T Zellen als auch die NK Zell-vermittelte ADCC *in vivo* erhöhen könnte.

Da CD107a/ICS-Tests lediglich eine Aussage über die zytolytische Kapazität der Effektorzellen, nicht aber über die tatsächliche Zielzellyse, zulässt und nicht für expandierte  $\gamma\delta$ -T Zellen geeignet ist, wurden Zytotoxizitätstests zum direkten Nachweis der  $\gamma\delta$ -T Zell-vermittelten ADCC gegen Zielzellen etabliert. Primäre, negativ selektionierte  $\gamma\delta$ -T Zellen konnten aufgrund der niedrigen Anteile von  $\gamma\delta$ -T Zellen unter den Lymphozyten sowie der Nichtverfügbarkeit eines Isolationskits zur negativen Selektion von CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T Zellen nicht analysiert werden. Für expandierte und isolierte  $\gamma\delta$ -T Zellen konnte in 2 h EuTDA-Zytotoxizitätstests mit BCP-ALL Blasten keine 4G7SDIE- und N19-C16-vermittelte ADCC nachgewiesen werden wobei der CD19xCD3 bispezifische Kontrollantikörper N19xCU die Lyse der BCP-ALL Blasten deutlich erhöhte (**Bild 3-17**). Der 2 h EuTDA-Zytotoxizitätstests ist somit grundsätzlich zur Analyse der zytolytischen Aktivität expandierter  $\gamma\delta$ -T Zellen geeignet. Eine starke und schnelle Aktivierung der expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen scheint jedoch für diesen zeitlich begrenzten Endpunkttest nötig zu sein. In xCELLigence-Tests mit einem MCF7-CD19-Klon mit ähnlicher CD19-Antigendichte wie BCP-ALL Blasten (**Bild 3-3, Bild 3-1**) wurde mit expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen sowohl eine 4G7SDIE- als auch eine N19-C16-vermittelte ADCC detektiert (**Bild 3-18, Bild 3-19**). Die spontane Zytotoxizität der expandierten  $\gamma\delta$ -T Zellen und die ADCC nahmen im Zeitverlauf zu und der Unterschied zwischen der spontanen Zytotoxizität der  $\gamma\delta$ -T Zellen und der 4G7SDIE- oder N19-C16-vermittelte ADCC war abhängig vom Testzeitpunkt (**Bild 3-19**). Dies unterstreicht den Vorteil längerer Inkubationszeiten sowie der dynamischen Echtzeitbetrachtung der Zielzellyse.

Auch wenn die Fähigkeit von  $\gamma\delta$ -T Zellen zur 4G7SDIE- und N19-C16-vermittelten ADCC *in vitro* gezeigt wurde, sind  $\gamma\delta$ -T Zellen aufgrund ihrer geringer Anteil von 1 % - 5 % der PBMC und dem noch geringeren Anteil an CD16<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T Zellen den NK Zellen, welche 5-15% der zirkulierenden Lymphozyten ausmachen, vermutlich in ihrem Beitrag zur ADCC *in vivo* untergeordnet<sup>304</sup>. In der außergewöhnlichen Situation nach einer SZT, wenn der  $\gamma\delta$ -T Zellanteil sehr hoch ist, könnten  $\gamma\delta$ -T Zellen jedoch einen Einfluss auf die klinische Aktivität von 4G7SDIE haben. Zudem ist eine möglichst frühe Reduktion der MRD nach SZT und somit der Einsatz eines therapeutischen Antikörpers sinnvoll, da der MRD Level früh nach SZT mit dem Überleben negativ korreliert ist<sup>52</sup>. Zudem könnte eine *ex vivo* oder *in vivo* Aktivierung und Expansion von  $\gamma\delta$ -T Zellen kombiniert mit einer 4G7SDIE Therapie synergistische Effekte haben. Die etablierten Tests sind zudem hilfreiche Methoden für ein Patientenmonitoring nach  $\gamma\delta$ -T Zell-aktivierenden Therapien, wie die Verabreichung von Zoledronsäure und IL-2.

#### 4.2.4 Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC

Untersuchungen zu dem Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit verschiedenen therapeutischen Antikörpern kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen (1.2.2.3.1). Während gezeigt werden konnte, dass IgG1 Antikörper eine höhere Affinität für den Fc $\gamma$ RIIIa-158V-Allotyp haben, ist der Einfluss auf das klinische Ansprechen noch nicht eindeutig belegt (**Tabelle 1-3**)<sup>99, 100</sup>. Dies könnte einerseits an einer untergeordneten Relevanz des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus oder der ADCC als Effektormechanismus im Allgemeinen liegen. Andererseits besaßen alle untersuchten Antikörper neben der ADCC weitere Effektormechanismen und wurden in nur wenigen Studien mit dem Antikörper als Monotherapie untersucht, so dass ein Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus verdeckt worden sein könnte (**Tabelle 1-3**). Der Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf den klinischen Erfolg Fc-optimierter oder glykooptimierter Antikörper wurde bisher nicht untersucht.

Ein Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit 4G7SDIE könnte für die Auswahl eines potentiellen Stammzellspenders für einen Patienten, welcher mit 4G7SDIE behandelt werden soll, relevant sein. Um zu bestimmen ob der Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus einen Einfluss auf den Erfolg einer Therapie mit 4G7SDIE haben könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die ADCC mit 4G7SDIE *in vitro* untersucht. Der CD19xCD16 bispezifische Antikörper N19-C16 wurde als Kontrolle eingesetzt, da dieser Antikörper auf dem CD16 Klon 3G8 basiert, für welchen eine höhere Affinität für den Fc $\gamma$ RIIIa-158V-Allotyp beschrieben wurde<sup>102</sup>.

Zunächst wurden 41 gesunde Spender auf ihren FcγRIIIa-158V/F-Genotyp typisiert (**Tabelle 3-2**). Während der homozygote FcγRIIIa-158F/F-Genotyp und der heterozygote FcγRIIIa-158V/F-Genotyp fast gleich häufig vertreten waren, besaßen nur 10 % der Spender den homozygoten FcγRIIIa-158V/V-Genotyp. Eine ähnliche Allelfrequenz wurde in mehreren, aber nicht allen, Studien beobachtet <sup>103, 104, 106, 107, 109, 114, 118-120, 122</sup>. Mögliche Ursachen für diese ungleiche Verteilung wurde bisher jedoch nicht beschrieben. In CD107a/ICS-Tests wurde mit PBMC 4 gesunder Spender eines jeden Genotyps kein signifikanter Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Genotyps auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC durch NK Zellen oder γδ-T Zellen beobachtet (**Bild 3-20**). Für den Kontrollantikörper wurde mit denselben Spendern im CD107a/ICS-Test ein signifikanter Einfluss auf die NK-Zelldegranulation sowie die Zytokinexpression beobachtet (**Bild 3-22A**). NK Zellen des FcγRIIIa-158V-Allotyps wurden durch N19-C16 effizienter aktiviert, was mit der beschriebenen höheren Affinität des CD16 Klon 3G8 konform ist <sup>102</sup>. In xCELLigence-Tests mit denselben PBMC-Spendern konnte zunächst kein Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Genotyps weder auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC noch auf die N19-C16-vermittelte ADCC beobachtet werden (**Bild 3-21A, Bild 3-23A**). Wurde die ADCC allerdings auf den Anteil der NK Zellen unter den eingesetzten Effektorzellen normalisiert, war die durch den FcγRIIIa-158F/F-Genotyp 4G7SDIE-vermittelte ADCC stets niedriger als die des FcγRIIIa-158V/V-Genotyps (**Bild 3-21B, Bild 3-23B**). Diese limitierten Daten deuten darauf hin, dass der FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus einen Einfluss auf die N19-C16- als auch 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat, welcher jedoch durch variierende NK-Zellanteile der verschiedenen Spender überdeckt wird. Das Effektor-zu-Zielzellverhältnis scheint auf die Effizienz der N19-C16- als auch 4G7SDIE-vermittelte ADCC einen größeren Einfluss als der FcγRIIIa-158V/F-Genotyps zu haben, wobei dieser bei vergleichbaren Effektor-zu-Zielzellverhältnissen eine Rolle zu spielen scheint. Um den tatsächlichen Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC zu bestimmen, sollten mehr Spender in Tests mit gleichen Effektor-zu-Zielzellverhältnissen sowie den variierenden Effektor-zu-Zielzellverhältnissen analysiert werden. Da die ADCC der einzige Effektormechanismus von 4G7SDIE ist (**Bild 3-8A**), wäre 4G7SDIE für eine Untersuchung des Einflusses des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf das klinische Ansprechen prädestiniert. Im Rahmen einer klinischen Studie mit 4G7SDIE könnte dies analysiert werden und gegebenenfalls als Rationale für eine Stammzellspenderauswahl in Bezug auf den FcγRIIIa-158V/F-Genotyp des Spenders dienen.

## 4.3 Klinische Charakterisierung des CD19-Antikörpers 4G7SDIE

Nachdem in den präklinischen *in vitro* Experimenten eine biologische Aktivität des CD19-Antikörpers 4G7SDIE nachgewiesen werden konnte, wurden 14 MRD-positive BCP-ALL Patienten im Rahmen von Einzelheilversuchen, mit dem Ziel die MRD zu senken oder idealerweise zu eliminieren, mit 4G7SDIE behandelt. Durch die Reduktion beziehungsweise Elimination der MRD sollte die Heilungschance dieser einzelnen Hochrisikopatienten verbessert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden begleitende Untersuchungen, welche zur Vorbereitung einer klinischen Phase I/II Studie beitragen sollten, durchgeführt.

### 4.3.1 Klinisches Ansprechen und Monitoring der 4G7SDIE-behandelten Patienten

In 10 der 14 behandelten BCP-ALL Patienten konnte die MRD um mindestens eine log-Stufe oder das patientenindividuelle Detektionslimit reduziert werden (**Bild 3-24**). Zwei dieser Patienten wurden unter der Behandlung mit 4G7SDIE qualitativ MRD-negativ. Die MRD ist der wichtigste prognostische Faktor der BCP-ALL (1.1.4). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der MRD-Level vor und nach SZT direkt mit der Rezidivrisiko, und somit dem Überleben, korreliert <sup>42-52</sup>. Eine Reduktion der MRD vor SZT, selbst um wenige log-Stufen, könnte das Überleben signifikant verbessern, da gezeigt wurde, dass eine MRD  $> 10^{-3}$  beziehungsweise  $\geq 10^{-4}$  mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, als eine MRD  $< 10^{-4}$  <sup>42</sup>. Das Rezidivrisiko nach SZT ist mit dem Level der MRD-Positivität und dem Zeitpunkt der MRD-Positivität korreliert, so dass eine frühe Reduktion der MRD die Prognose verbessern könnte <sup>52</sup>. Die Reduktion der MRD durch 4G7SDIE vor sowie nach SZT, könnte somit das Überleben dieser Patienten signifikant verbessern. Durch eine klinischen Studie könnte der tatsächliche Einfluss der MRD-Reduktion durch 4G7SDIE auf das Überleben analysiert werden.

Bei 4 der 14 Patienten wurde allerdings zu keinem Therapiezeitpunkt eine MRD-Reduktion erreicht. Die Identifikation der zugrunde liegenden Einflussfaktoren sowie prognostischer Faktoren wäre für eine geplante Studie von Bedeutung. Dies könnte zur Patientenstratifizierung und zur Entwicklung von Strategien zur Verbesserung der klinischen Aktivität von 4G7SDIE beitragen. In Zytotoxizitätstests wurde mit PBMC von 2 der Patienten, welche nicht auf die 4G7SDIE Behandlung angesprochen haben, eine sehr geringe 4G7SDIE-vermittelte ADCC detektiert, wohingegen die PBMC von 3 der Patienten, welche angesprochen hatten, eine deutliche Erhöhung der Zielzellyse mit 4G7SDIE vermittelten (**Bild 3-25**). Die 4G7SDIE-vermittelte ADCC war nicht mit dem Anteil der NK Zellen unter den

Effektorzellen assoziiert (**Bild 3-25, Tabelle 3-3**), so dass vermutlich neben dem Effektor-zu-Zielzellverhältnis andere Faktoren einen Einfluss auf die 4G7SDIE-vermittelte ADCC hatten. Dass das Effektor-zu-Zielzellverhältnis jedoch von großer Bedeutung für die Effizienz der 4G7SDIE-vermittelte ADCC ist, wurde durch Einsatz verschiedener Effektor-zu-Zielzellverhältnisse (**Bild 3-8A**), sowie in Zytotoxizitätstest mit PBMC eines haploidentisch transplantierten Patienten und BCP-ALL Blasten des Patienten zu verschiedenen Testzeitpunkten mit verschiedenen NK-Zellanteilen unter den Effektorzellen gezeigt (**Bild 3-26**). Aufgrund der günstigen Effektor-zu-Zielzellverhältnissen scheint eine MRD-Situation somit der ideale Zeitpunkt für eine Immuntherapie mit 4G7SDIE zu sein. Der Zeitraum früh nach einer SZT erscheint aufgrund des besonders hohen Effektorzellanteils von NK Zellen und  $\gamma\delta$ -T Zellen außerordentlich geeignet zur Reduktion der MRD durch 4G7SDIE. Zudem konnte gezeigt werden, dass 4G7SDIE in einer haploidentischen Situation eine effiziente Lyse der Patientenblasten *in vitro* vermitteln kann (**Bild 3-26**). Die effiziente B-Zelldepletion durch eine 4G7SDIE Therapie unterstreicht die biologische Aktivität von 4G7SDIE *in vivo* (**Bild 3-27**). Die B-Zelldepletion war, durch Wahl des Antigens, ein erwartetes Phänomen und wurde durch Substitution von Immunglobulinen behandelt. Ein erhöhtes Infektionsrisiko wurde für eine Rituximabbehandlung geschrieben <sup>305</sup>, in den 4G7SDIE-behandelten Patienten wurden jedoch keine schwerwiegenden Infektionen beobachtet. Nach Absetzen der 4G7SDIE Behandlung normalisierte sich die B-Zellzahl rasch (**Bild 3-27**), so dass keine dauerhafte Immunsuppression induziert wurde.

Die Serumhalbwertszeit von 4G7SDIE war in zwei Patienten 20 h beziehungsweise 43 h (**Bild 3-28**). Sowohl die verabreichte Dosis als auch die residuale Tumorlast haben vermutlich einen Einfluss auf die Serumhalbwertszeit. In beiden Patienten und einem Patienten in welchem Langzeitserumspiegel analysiert wurden, blieb die Serumkonzentration zwischen den Therapiezyklen von  $\leq 2$  Wochen mit mindestens 20 mg/m<sup>2</sup>, über einer sättigenden Konzentration von  $> 700$  ng/ml 4G7SDIE (**Bild 3-28, Bild 3-29**). Somit sind diese Antikörperdosen ausreichend, um biologisch aktive Serumspiegel von 4G7SDIE zu erzeugen. Zudem wurde keine Verringerung der 4G7SDIE-Serumkonzentration in der Langzeittherapie beobachtet (**Bild 3-29**). Dies deutet darauf hin, dass keine HACAs gebildet wurden. Zudem wurden keine HACAs im Patientenserum detektiert (**Bild 3-30**). Zudem ist eine Bildung von HACAs unter einer 4G7SDIE Therapie aufgrund der B-Zelldepletion unwahrscheinlich. Im Vergleich zu Blinatumomab, welcher aufgrund seines Antikörperformats eine Serumhalbwertszeit von 2 h besitzt <sup>220, 221</sup>, erlaubt die lange Serumhalbwertszeit von 4G7SDIE eine patientenfreundliche Applikation durch Einzelgaben anstatt einer Dauerinfusion. Allerdings wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Entzug von sättigenden Konzentrationen 4G7SDIE die Rekonstitution von CD19 auf Zielzellen

erlaubt (**Bild 3-6**). Somit könnten Applikationszyklen und -dosen, welche eine Phase ohne sättigende 4G7SDIE-Serumspiegel erzeugen, möglicherweise zu der CD19-Rekonstitution auf residualen Blasten und somit zu einer effizienteren Blastenlyse beitragen.

#### 4.3.2 CD19-Antigenmodulation und –Rekonstitution auf Blasten 4G7SDIE-behandelter Patienten

Wie bereits in 4.1.2 diskutiert, kann die Antigenmodulation die Effizienz therapeutischer Antikörper negativ beeinflussen. Zudem wurde gezeigt, dass die Antigendichte von CD19 einen direkten Einfluss auf die Effizienz der 4G7SDIE-vermittelte ADCC hat (**Bild 3-4**), und somit der Grad der CD19-Modulation einen Einfluss auf den therapeutischen Erfolg von 4G7SDIE haben könnte. Die CD19-Modulation auf primären BCP-ALL Blasten von 4G7SDIE-behandelten Patienten war in *in vitro* Tests moderat, aber sehr heterogen (**Bild 3-31**). Ein Zusammenhang zwischen der CD19-Modulation auf den primären Blasten eines Patienten *in vitro* und dem klinischen Ansprechen auf 4G7SDIE konnte in dieser geringen Anzahl analysierter Patienten nicht beobachtet werden (**Bild 3-31**).

Ein CD19-Antigenverlust, welcher zu einem Therapieversagen führte, wurde in mehreren Studien mit Blinatumomab und CD19-CAR T Zellen beobachtet<sup>247, 248, 306</sup>. Um die CD19-Expression auf Rezidivblasten von 4G7SDIE-behandelten Patienten zu analysieren wurde eine indirekte Methode etabliert (3.3.8). Die direkte Analyse der CD19-Expression wäre zwar erstrebenswert, es konnte allerdings kein CD19-Antikörper identifiziert werden, welcher ein unabhängiges Epitop von 4G7SDIE erkennt (**Bild 3-12**). Es wurde von einem CD19-Ligand berichtet und für den klinischen Einsatz patentiert<sup>307, 308</sup>. Dieser war allerdings nicht verfügbar um eine Kreuzblockierung mit 4G7SDIE durchzuführen um eine möglichen Einsatz für die CD19-Detektion auf Blasten behandelter Patienten zu evaluieren. Die Analyse von 3 unter 4G7SDIE Therapie rezidivierten Patienten deutete darauf hin, dass CD19 auf Patientenblasten durch 4G7SDIE im Patientenserum weniger maskiert als tatsächlich in seiner Antigendichte moduliert wurde (**Bild 3-32, Bild 3-33, Bild 3-34**). Diese Antigenmodulation war jedoch in allen analysierten Patienten transient und erreichte nach Absetzen der 4G7SDIE Therapie wieder eine hohe CD19-Antigendichte. In 1/1 analysierten Patienten wurde die Ursprungsexpression von CD19 innerhalb von 24 Tage nach der letzten Antikörperinfusion wieder erreicht (**Bild 3-33**). Die Ergebnisse aus den *in vitro* Rekonstitutionsexperimenten mit Zelllinien (**Bild 3-6**) als auch die Daten der CD19-Rekonstitution von Patient #14 (**Bild 3-34**) deuten darauf hin, dass die CD19-Rekonstitution nach dem Absetzen von 4G7SDIE über einen längeren Zeitraum verläuft. Therapiezyklen und Antikörperdosen, welche eine

kontinuierliche Exposition zu sättigenden 4G7SDIE-Konzentrationen vermeiden, könnten die Rekonstitution der CD19-Expression auf residualen Blasten ermöglichen. Durch die rekonstituierte CD19-Expression könnten die verbliebenen leukämischen Blasten in einem folgenden Therapiezyklus somit effizienter durch die 4G7SDIE-vermittelte ADCC eliminiert werden. Die Antigenmodulation beziehungsweise der Antigenverlust sollte unter einer 4G7SDIE Therapie beobachtet werden. Zudem könnte eine Bestimmung der CD19-Modulation *in vitro* als prognostischer Faktor im Rahmen einer klinischen Studie herangezogen werden.

### 4.3.3 Inhibition der Blinatumomab-Aktivität durch residuale Serumspiegel von 4G7SDIE

Es wurde bereits gezeigt, dass geringste Konzentrationen von 4G7SDIE eine T-Zellaktivierung durch Blinatumomab negativ beeinflussen und dadurch die klinische Effizienz von Blinatumomab beeinträchtigen könnten (3.2.7). Da die in dieser Arbeit angewandte Methode zur 4G7SDIE-Serumspiegekonzentrationsbestimmung ein Detektionslimit von etwa 100 ng/ml hat, wurde die Methode zur funktionellen Kreuzblockierung von Blinatumomab durch 4G7SDIE auf die Untersuchung von Patientenserum nach 4G7SDIE Behandlung vor einer geplanten Blinatumomabtherapie angewandt. Bei der Analyse eines Patienten, 20 Tage nach einer 10 mg/m<sup>2</sup> 4G7SDIE, konnte keine Inhibition der T-Zellaktivierung beobachtet werden (**Bild 3-35A**). Bei einem weiteren Patienten wurde durch das Serum von 21 Tagen nach einer 40 mg/m<sup>2</sup> 4G7SDIE eine Inhibition von fast 50 % der durch Blinatumomab maximal aktivierbaren T Zellen detektiert (**Bild 3-35B**). Bei diesem Patienten wäre, trotz eventueller CD19-Rekonstitution auf den residualen leukämischen Blasten, eine Blinatumomabtherapie vermutlich weniger vielversprechend als bei Patienten welche keine residualen 4G7SDIE Serumspiegel haben. Bei einer geplanten Therapie mit Blinatumomab nach vorheriger 4G7SDIE-Behandlung sollte somit darauf geachtet werden, dass idealerweise kein 4G7SDIE mehr im Serum des Patienten vorhanden ist. Durch eine Verringerung der Antikörperdosis von 4G7SDIE würde die Serumkonzentration schneller unter die kritische Grenze fallen. Auf der anderen Seite könnten zu geringe Serumkonzentrationen von 4G7SDIE die klinische Aktivität von 4G7SDIE beeinträchtigen.

## 4.4 Weitere potentielle Zielantigene zur Therapie der BCP-ALL

### 4.4.1 FLT3 (CD135)

FLT3 („*FMS-related tyrosine kinase 3*“, CD135) ist eine Rezeptortyrosinkinase welche auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert ist und eine bedeutende Rolle in der Hämatopoese spielt<sup>309, 310</sup>. FLT3 ist ein vielversprechendes Zielantigen der adulten AML, B-Linien ALL, „*mixed lineage leukemia*“ (MLL) und BCP-ALL zur Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren<sup>311-314</sup>. Zudem wurde FLT3 als vielversprechendes Zelloberflächenantigen zur Immuntherapie der adulten AML mit Antikörpern beschrieben<sup>145</sup>. Eine Zelloberflächenexpression von FLT3 wurde zudem für die adulte und pädiatrische BCP-ALL und chronische myeloische Leukämie (CML) in der Blastenkrise beschrieben<sup>315-318</sup>. Eine klinische Studie mit einem humanisierten FLT3 Antikörper (IMC-EB10) in der adulten AML wurde aufgrund mangelnder klinischer Aktivität abgebrochen<sup>319</sup>. Der Fc-optimierte FLT3 Antikörper 4G8SDIEM wurde in der adulten AML im Rahmen von individuellen Heilversuchen bereits erfolgreich eingesetzt (unpublizierte Daten, G. Jung).

Um FLT3 als Zielantigen zur immuntherapeutischen Behandlung mit Antikörpern für die BCP-ALL zu evaluieren, wurde die absolute Expressionsstärke von FLT3 auf leukämischen Blasten von 3 AML Patienten sowie 24 BCP-ALL Patienten quantifiziert. Die FLT3-Antigendichte betrug auf den AML Blasten reichte von  $1,98 \cdot 10^2$  bis  $1,23 \cdot 10^3$  (**Bild 3-36A**). Eine Analyse von mehr Proben wäre nötig, um FLT3 als Zielantigen für die pädiatrische AML beurteilen zu können. Auf BCP-ALL Blasten war die FLT3-Antigenexpression sehr heterogen, wobei in 50 % der analysierten BCP-ALLs eine Expression von  $5 \cdot 10^2$  bis  $3,42 \cdot 10^3$  Antigenen pro Zelle detektiert wurde (**Bild 3-36B**). Auf adulten AML Blasten wurden Antigendichten von  $3,5 \cdot 10^2$  bis  $4,7 \cdot 10^3$  beschrieben<sup>145</sup>. Somit ist die FLT3-Antigendichte auf 50 % der BCP-ALL Blasten vergleichbar mit der Antigendichte auf adulten AML Blasten<sup>145</sup>. FLT3 scheint somit ein vielversprechendes Zielantigen der BCP-ALL zu sein. Ob 4G8SDIEM auch eine biologische Aktivität gegen BCP-ALL Blasten hat, sollte in *in vitro* Tests evaluiert werden. Bei einem klinischen Einsatz von 4G8SDIEM in der BCP-ALL sollte zudem vor Therapie die FLT3 Antigendichte bestimmt werden da, im Gegensatz zu CD19, nicht alle BCP-ALLs das Antigen exprimieren. Darüber hinaus muss auf eine potentielle Schädigung des Stammzellkompartments durch FLT3 Antikörper geachtet werden, da FLT3 auf normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen und dendritischen Zellen exprimiert wird<sup>145, 320</sup>.

#### 4.4.2 CDCP1 (CD318)

CDCP1 („*CUB domain-containing protein 1*“, CD318) ist ein Glykoprotein dessen Expression in der adulten AML, CML und B-Linien ALL beschrieben wurde<sup>321</sup>. In der Analyse von 20 BCP-ALL Proben wurde in einer Probe eine CDCP1-Expression detektiert (**Bild 3-37**). CDCP1 ist somit kein geeignetes Zielantigen für die Immuntherapie der BCP-ALL.

#### 4.4.3 Endoglin (CD105)

Das Glykoprotein Endoglin (CD105) ist ein Korezeptor von TGF- $\beta$  und als vaskuläres Zielantigen für die Immuntherapie verschiedener solider Tumore beschrieben<sup>322, 323</sup>. In einer Phase I Studien in soliden Tumoren konnte bereits eine klinische Aktivität von Endoglin Antikörpern beobachtet werden<sup>324</sup>. Mehrere Studien in Kombination mit Chemotherapie, VEGF Inhibitoren oder als Einzelagents werden momentan im Ovarialkarzinom, Blasenkrebs, Mammakarzinom und Leberkrebs durchgeführt. Für einen CD105 Antikörper (SN6), welcher durch die Immunisierung mit ALL Blasten generiert wurde, wurde eine selektive Bindung an BCP-ALL und AML Blasten beschrieben<sup>325</sup>.

Um zu untersuchen, ob CD105 ein geeignetes Zielantigen für die Immuntherapie der pädiatrischen BCP-ALL sein könnte, wurde die absolute Expressionsstärke auf 20 Proben analysiert (**Bild 3-38**). Auf allen BCP-ALLs wurde eine Endoglin-Oberflächenexpression von  $4,08 \cdot 10^3$  bis  $3,92 \cdot 10^4$  CD105 Antigenen pro Zelle detektiert. Die mittlere Antigendichte lag mit  $1,58 \cdot 10^4$  ( $\pm 7,99 \cdot 10^3$ ) CD105 Antigenen pro Zelle in demselben Bereich wie die CD19-Oberflächenexpression auf BCP-ALL Blasten (**Bild 3-1A**). Ob therapeutische Endoglinantikörper auch eine biologische Aktivität gegen BCP-ALL Blasten haben, sollte in *in vitro* Tests evaluiert werden. Laut Literatur bindet der Antikörperklon SN6 nicht an gesunde PBMC<sup>325</sup>. Sollte sich, neben einer biologischen Aktivität von Endoglinantikörpern gegen BCP-ALL Blasten, diese selektive Expression bestätigen, könnte CD105 ein äußerst vielversprechendes Zielantigen der BCP-ALL sein.

## 4.5 Ausblick

Die Prognose für primär refraktäre oder rezidierte BCP-ALL Patienten ist trotz fortschrittlicher Therapien wie der SZT immer noch sehr schlecht. Da das Rezidivrisiko mit dem MRD Level sowohl vor als auch nach SZT signifikant korreliert, könnte eine frühzeitige Reduktion oder Elimination einer residualen MRD die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhen. Zudem erscheinen MRD-Konstellationen aufgrund der vorteilhaften Effektor-zu-Zielzellverhältnisse besonders geeignet für eine immuntherapeutische Intervention. Therapien mit Blinatumomab, Immunkonjugaten oder CAR T Zellen erwiesen sich in der BCP-ALL als sehr vielversprechend, können jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen behaftet sein. Aufgrund des hohen Risikos lebensbedrohlicher Nebenwirkungen wurden diese Therapien in, *de facto* nicht akut lebensbedrohlichen, MRD-Situationen der BCP-ALL bisher nicht in klinischen Studien eingesetzt. Für den Antikörper 4G7SDIE konnten vielversprechende anti-leukämische Effekte mit einem sehr milden Nebenwirkungsprofil gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass 4G7SDIE zur nebenwirkungsarmen Behandlung der residualen MRD der BCP-ALL geeignet ist und zur Rezidivprevention eingesetzt werden könnte. In einer bereits geplanten Phase I/II Studie mit BCP-ALL Hochrisikopatienten wird die Effektivität und das Nebenwirkungsprofil von 4G7SDIE weiter analysiert werden. Sollte eine therapeutische Aktivität von 4G7SDIE in den klinischen Studien nachgewiesen und das vorteilhafte Nebenwirkungsprofil bestätigt werden können, könnte 4G7SDIE zukünftig zur nebenwirkungsarmen Reduktion und Elimination residualer MRD zur Rezidivprävention sowohl vor als auch nach einer SZT in der Standardtherapie eingesetzt werden. Darüber hinaus könnte ein erfolgreicher Einsatz von 4G7SDIE sowie anderen therapeutischen Antikörpern und Immuntherapeutika den Bedarf an Chemotherapien sowie SZTs langfristig reduzieren und dadurch das Risiko von Langzeitschäden verringern. Im Rahmen des Patientenmonitorings in klinischen Studien mit 4G7SDIE sollten potentielle Einflussfaktoren sowie prognostische Faktoren mithilfe der in dieser Arbeit etablierten Methoden weiter analysiert werden. Die Identifikation von Einflussfaktoren und prognostischen Faktoren könnte langfristig zur Verbesserung des Therapieerfolgs und einer therapeutisch und ökonomisch sinnvollen Patientenstratifizierung beitragen. Zudem sollten weitere, möglichst spezifische, Zielantigene der BCP-ALL identifiziert und charakterisiert werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Pui, C.H. & Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 149-165 (2007).
2. Smith, M.A. et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 2625-2634 (2010).
3. <Jahresbericht 2013-2014, Deutsches Kinderkrebsregister.pdf>.
4. Ries LAG, S.M., Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD; 1999).
5. Bene, M.C. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783-1786 (1995).
6. Bene, M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunology letters* **98**, 9-21 (2005).
7. Pui, C.H. et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* **17**, 700-706 (2003).
8. Kalina, T. et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: Summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **87**, 145-156 (2015).
9. van der Velden, V.H. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013-1034 (2003).
10. Bruggemann, M. et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* **24**, 521-535 (2010).
11. Gokbuget, N. et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* **120**, 1868-1876 (2012).
12. Appelbaum, F.R. et al. End points to establish the efficacy of new agents in the treatment of acute leukemia. *Blood* **109**, 1810-1816 (2007).
13. Coustan-Smith, E. et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **351**, 550-554 (1998).
14. Coustan-Smith, E. et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **117**, 6267-6276 (2011).
15. van der Velden, V.H. et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* **21**, 604-611 (2007).
16. Bruggemann, M., Raff, T. & Kneba, M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood* **120**, 4470-4481 (2012).
17. Pui, C.H. & Evans, W.E. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology* **50**, 185-196 (2013).
18. Hunger, S.P. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 1663-1669 (2012).
19. Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S. & Arceci, R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 551-565 (2011).
20. Park, K.D. How do we prepare ourselves for a new paradigm of medicine to advance the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia? *Blood research* **49**, 3-4 (2014).
21. Bailey, L.C., Lange, B.J., Rheingold, S.R. & Bunin, N.J. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet. Oncology* **9**, 873-883 (2008).

22. Locatelli, F., Schrappe, M., Bernardo, M.E. & Rutella, S. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **120**, 2807-2816 (2012).
23. Kolb, E.A. & Steinherz, P.G. A new multidrug reinduction protocol with topotecan, vinorelbine, thiotepea, dexamethasone, and gemcitabine for relapsed or refractory acute leukemia. *Leukemia* **17**, 1967-1972 (2003).
24. Reismuller, B. et al. Outcome of children and adolescents with a second or third relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL): a population-based analysis of the Austrian ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) study group. *Journal of pediatric hematology/oncology* **35**, e200-204 (2013).
25. Oeffinger, K.C. & Hudson, M.M. Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *CA: a cancer journal for clinicians* **54**, 208-236 (2004).
26. Pui, C.H. et al. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* **349**, 640-649 (2003).
27. Mussai, F.J., Yap, C., Mitchell, C. & Kearns, P. Challenges of clinical trial design for targeted agents against pediatric leukemias. *Frontiers in oncology* **4**, 374 (2014).
28. Henze, G., v Stackelberg, A. & Eckert, C. ALL-REZ BFM--the consecutive trials for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Klinische Padiatrie* **225 Suppl 1**, S73-78 (2013).
29. Bernt, K.M. & Hunger, S.P. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in oncology* **4**, 54 (2014).
30. Vedi, A. & Ziegler, D.S. Antibody therapy for pediatric leukemia. *Frontiers in oncology* **4**, 82 (2014).
31. Ramos, C.A., Savoldo, B. & Dotti, G. CD19-CAR trials. *Cancer journal* **20**, 112-118 (2014).
32. van Dongen, J.J. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* **352**, 1731-1738 (1998).
33. Pui, C.H. Childhood leukemias. *The New England journal of medicine* **332**, 1618-1630 (1995).
34. Campana, D. & Pui, C.H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* **85**, 1416-1434 (1995).
35. Biondi, A. et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* **14**, 1939-1943 (2000).
36. Cave, H. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *The New England journal of medicine* **339**, 591-598 (1998).
37. Guo, D.D. et al. [Clinical significance of dynamic monitoring the minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia by multiparameter flow cytometry]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* **20**, 1346-1351 (2012).
38. Van der Velden, V.H. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* **23**, 1073-1079 (2009).
39. Paganin, M. et al. Minimal residual disease is an important predictive factor of outcome in children with relapsed 'high-risk' acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **22**, 2193-2200 (2008).
40. Eckert, C. et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **358**, 1239-1241 (2001).
41. Coustan-Smith, E. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* **18**, 499-504 (2004).
42. Bader, P. et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic

- leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 377-384 (2009).
43. Leung, W. et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood* **120**, 468-472 (2012).
  44. Knechtli, C.J. et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **92**, 4072-4079 (1998).
  45. Bader, P. et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* **16**, 1668-1672 (2002).
  46. Krejci, O. et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone marrow transplantation* **32**, 849-851 (2003).
  47. Elorza, I. et al. Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **95**, 936-941 (2010).
  48. Ruggeri, A. et al. Impact of pretransplant minimal residual disease after cord blood transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in remission: an Eurocord, PDWP-EBMT analysis. *Leukemia* **26**, 2455-2461 (2012).
  49. Knechtli, C.J. et al. Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* **102**, 860-871 (1998).
  50. Uzunel, M., Jaksch, M., Mattsson, J. & Ringden, O. Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* **122**, 788-794 (2003).
  51. Sanchez, J. et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation. *British journal of haematology* **116**, 686-694 (2002).
  52. Bader, P. et al. Monitoring of Minimal Residual Disease After Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Allows for the Identification of Impending Relapse: Results of the ALL-BFM-SCT 2003 Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 1275-1284 (2015).
  53. Conter, V. et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* **115**, 3206-3214 (2010).
  54. Attarbaschi, A. et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 3046-3050 (2008).
  55. Borowitz, M.J. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* **111**, 5477-5485 (2008).
  56. Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2010**, 7-12 (2010).
  57. Campana, D. & Leung, W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *British journal of haematology* **162**, 147-161 (2013).
  58. Campana, D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America* **23**, 1083-1098, vii (2009).

59. Stow, P. et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 4657-4663 (2010).
60. 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).
61. Harris, L.J., Skaletsky, E. & McPherson, A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of molecular biology* **275**, 861-872 (1998).
62. 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. *The Journal of experimental medicine* **132**, 211-250 (1970).
63. Scott, A.M., Wolchok, J.D. & Old, L.J. Antibody therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer* **12**, 278-287 (2012).
64. Hunig, T. The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nature reviews. Immunology* **12**, 317-318 (2012).
65. Mossner, E. et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* **115**, 4393-4402 (2010).
66. Loke, J., Khan, J.N., Wilson, J.S., Craddock, C. & Wheatley, K. Mylotarg has potent anti-leukaemic effect: a systematic review and meta-analysis of anti-CD33 antibody treatment in acute myeloid leukaemia. *Annals of hematology* **94**, 361-373 (2015).
67. Sharma, P. & Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56-61 (2015).
68. Walunas, T.L. et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405-413 (1994).
69. Krummel, M.F. & Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* **182**, 459-465 (1995).
70. Suttmoller, R.P. et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine* **194**, 823-832 (2001).
71. Read, S. et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *Journal of immunology* **177**, 4376-4383 (2006).
72. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* **26**, 677-704 (2008).
73. Hodi, F.S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* **363**, 711-723 (2010).
74. Robert, C. et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* **364**, 2517-2526 (2011).
75. Weber, J.S. et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **16**, 375-384 (2015).
76. Postow, M.A. et al. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine* (2015).
77. Robert, C. et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* **384**, 1109-1117 (2014).
78. Robert, C. et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine* **372**, 320-330 (2015).
79. Gettinger, S.N. et al. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (2015).
80. McDermott, D.F. et al. Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (2015).

81. Harshman, L.C., Drake, C.G., Wargo, J.A., Sharma, P. & Bhardwaj, N. Cancer Immunotherapy Highlights from the 2014 ASCO Meeting. *Cancer immunology research* **2**, 714-719 (2014).
82. FDA Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. **35th edition, December 31, 2014** (2015).
83. Dhillon, S. Dinutuximab: First Global Approval. *Drugs* (2015).
84. EMA European public assessment reports (EPAR) for human medicines. *European Medicines Agency* (2015).
85. Pincetic, A. et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature immunology* **15**, 707-716 (2014).
86. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology* **8**, 34-47 (2008).
87. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*. (Garland Science, New York; 2012).
88. Bhakdi, S. & Tranum-Jensen, J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunology today* **12**, 318-320; discussion 321 (1991).
89. Chan, W.K. et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity overcomes NK cell resistance in MLL-rearranged leukemia expressing inhibitory KIR ligands but not activating ligands. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 6296-6305 (2012).
90. Seidel, U.J., Schlegel, P. & Lang, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in immunology* **4**, 76 (2013).
91. Moretta, A. et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* **19**, 197-223 (2001).
92. Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G. & Long, E.O. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* **107**, 159-166 (2006).
93. Lanier, L.L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* **9**, 495-502 (2008).
94. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G. & Ravetch, J.V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* **6**, 443-446 (2000).
95. Hubert, P. et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer research* **71**, 5134-5143 (2011).
96. Imai, M., Landen, C., Ohta, R., Cheung, N.K. & Tomlinson, S. Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer research* **65**, 10562-10568 (2005).
97. Musolino, A. et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 1789-1796 (2008).
98. Woyach, J.A. et al. A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL. *Blood* **124**, 3553-3560 (2014).
99. Koene, H.R. et al. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* **90**, 1109-1114 (1997).
100. Wu, J. et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *The Journal of clinical investigation* **100**, 1059-1070 (1997).
101. Dall'Ozzo, S. et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer research* **64**, 4664-4669 (2004).
102. Congy-Jolivet, N. et al. Fc gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype. *Cancer research* **68**, 976-980 (2008).

103. Cartron, G. et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* **99**, 754-758 (2002).
104. Weng, W.K. & Levy, R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 3940-3947 (2003).
105. Ghilmini, M. et al. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **16**, 1675-1682 (2005).
106. Prochazka, V. et al. FcgammaRIIIA receptor genotype does not influence an outcome in patients with follicular lymphoma treated with risk-adapted immunochemotherapy. *Neoplasma* **58**, 263-270 (2011).
107. Dornan, D. et al. Effect of FCGR2A and FCGR3A variants on CLL outcome. *Blood* **116**, 4212-4222 (2010).
108. Kim, D.H. et al. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **108**, 2720-2725 (2006).
109. Carlotti, E. et al. FcgammaRIIIA and FcgammaRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab. *Haematologica* **92**, 1127-1130 (2007).
110. Mitrovic, Z. et al. FCgammaRIIIA and FCgammaRIIA polymorphisms are not associated with response to rituximab and CHOP in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* **92**, 998-999 (2007).
111. Varoczy, L. et al. Fc-gamma-receptor IIIa polymorphism and gene expression profile do not predict the prognosis in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP protocol. *Pathology oncology research : POR* **18**, 43-48 (2012).
112. Liu, F. et al. FCGR3A 158V/F polymorphism and response to frontline R-CHOP therapy in diffuse large B-cell lymphoma. *DNA and cell biology* **33**, 616-623 (2014).
113. Lin, T.S. et al. FCGR3A and FCGR2A polymorphisms may not correlate with response to alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **105**, 289-291 (2005).
114. Tamura, K. et al. FcgammaR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **22**, 1302-1307 (2011).
115. Hurvitz, S.A. et al. Analysis of Fcgamma receptor IIIa and IIa polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 3478-3486 (2012).
116. Norton, N. et al. Association studies of Fcgamma receptor polymorphisms with outcome in HER2+ breast cancer patients treated with trastuzumab in NCCTG (Alliance) Trial N9831. *Cancer immunology research* **2**, 962-969 (2014).
117. Bibeau, F. et al. Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 1122-1129 (2009).
118. Zhang, W. et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 3712-3718 (2007).
119. Dahan, L. et al. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *BMC cancer* **11**, 496 (2011).
120. Park, S.J. et al. Genetic polymorphisms of FcgammaRIIIa and FcgammaRIIIa are not predictive of clinical outcomes after cetuximab plus irinotecan chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncology* **82**, 83-89 (2012).

121. Calemma, R. et al. Fc gamma receptor IIIa polymorphisms in advanced colorectal cancer patients correlated with response to anti-EGFR antibodies and clinical outcome. *Journal of translational medicine* **10**, 232 (2012).
122. Kjersem, J.B. et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms and clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line 5-fluorouracil/foinic acid and oxaliplatin +/- cetuximab. *BMC cancer* **14**, 340 (2014).
123. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
124. Boulianne, G.L., Hozumi, N. & Shulman, M.J. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312**, 643-646 (1984).
125. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 6851-6855 (1984).
126. Lazar, G.A. et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4005-4010 (2006).
127. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology* **157**, 220-233 (2009).
128. 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).
129. Marks, J.D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology* **222**, 581-597 (1991).
130. Brekke, O.H. & Thommesen, J.E. Tailoring natural effector functions. Antibody engineering beyond humanization. *Methods in molecular biology* **207**, 383-391 (2003).
131. Duncan, A.R. & Winter, G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 738-740 (1988).
132. Sarmay, G., Lund, J., Rozsnyay, Z., Gergely, J. & Jefferis, R. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc gamma receptor. *Molecular immunology* **29**, 633-639 (1992).
133. Redpath, S., Michaelsen, T.E., Sandlie, I. & Clark, M.R. The influence of the hinge region length in binding of human IgG to human Fc gamma receptors. *Human immunology* **59**, 720-727 (1998).
134. 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. *The Journal of biological chemistry* **276**, 6591-6604 (2001).
135. Stavenhagen, J.B. et al. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fc gamma receptors. *Cancer research* **67**, 8882-8890 (2007).
136. Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. & Bailey, J.E. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nature biotechnology* **17**, 176-180 (1999).
137. Davies, J. et al. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnology and bioengineering* **74**, 288-294 (2001).
138. 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. *The Journal of biological chemistry* **277**, 26733-26740 (2002).
139. Shinkawa, T. et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* **278**, 3466-3473 (2003).

140. Zalevsky, J. et al. The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood* **113**, 3735-3743 (2009).
141. Awan, F.T. et al. CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fc-domain-engineered monoclonal antibody. *Blood* **115**, 1204-1213 (2010).
142. Foyil, K.V. & Bartlett, N.L. Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma. *Current hematologic malignancy reports* **5**, 140-147 (2010).
143. Horton, H.M. et al. Fc-engineered anti-CD40 antibody enhances multiple effector functions and exhibits potent in vitro and in vivo antitumor activity against hematologic malignancies. *Blood* **116**, 3004-3012 (2010).
144. Le Garff-Tavernier, M. et al. Analysis of CD16+CD56dim NK cells from CLL patients: evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia* **25**, 101-109 (2011).
145. Hofmann, M. et al. Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 1228-1237 (2012).
146. Kellner, C. et al. The Fc-engineered CD19 antibody MOR208 (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients. *Leukemia* **27**, 1595-1598 (2013).
147. Sorkin, L.S. et al. Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain* **149**, 135-142 (2010).
148. Bowles, J.A. et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood* **108**, 2648-2654 (2006).
149. Nordstrom, J.L. et al. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. *Breast cancer research : BCR* **13**, R123 (2011).
150. Forero-Torres, A. et al. Results of a phase 1 study of AME-133v (LY2469298), an Fc-engineered humanized monoclonal anti-CD20 antibody, in FcγRIIIa-genotyped patients with previously treated follicular lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 1395-1403 (2012).
151. Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M. & Jones, A.J. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* **10**, 477-486 (2000).
152. Lifely, M.R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M.J. & Phillips, J. Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology* **5**, 813-822 (1995).
153. Yamane-Ohnuki, N. et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnology and bioengineering* **87**, 614-622 (2004).
154. Lang, P. et al. Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts. *Blood* **103**, 3982-3985 (2004).
155. Barbin, K. et al. Influence of variable N-glycosylation on the cytolytic potential of chimeric CD19 antibodies. *Journal of immunotherapy* **29**, 122-133 (2006).
156. Robak, T. GA-101, a third-generation, humanized and glyco-engineered anti-CD20 mAb for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *Current opinion in investigational drugs* **10**, 588-596 (2009).
157. Paz-Ares, L.G. et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-escalation study of RG7160 (GA201), the first glycoengineered monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 3783-3790 (2011).
158. Ward, E. et al. A glycoengineered anti-CD19 antibody with potent antibody-dependent cellular cytotoxicity activity in vitro and lymphoma growth inhibition in vivo. *British journal of haematology* **155**, 426-437 (2011).

159. Navid, F., Santana, V.M. & Barfield, R.C. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Current cancer drug targets* **10**, 200-209 (2010).
160. Tanday, S. Mogamulizumab benefits seen in cutaneous T-cell lymphoma. *The Lancet. Oncology* **16**, e200 (2015).
161. Jenq, R.R. & van den Brink, M.R. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer* **10**, 213-221 (2010).
162. Wu, C.J. & Ritz, J. Induction of tumor immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Advances in immunology* **90**, 133-173 (2006).
163. Merchant, M.S. et al. Phase I trial and pharmacokinetic study of lexatumumab in pediatric patients with solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 4141-4147 (2012).
164. Dunleavy, K. et al. Dose-adjusted EPOCH-rituximab therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **368**, 1408-1416 (2013).
165. Cartron, G. et al. Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood* **124**, 2196-2202 (2014).
166. Leah, E. Therapy: Rituximab for refractory SLE--patients reach lasting remission with short-term regimen. *Nature reviews. Rheumatology* **7**, 312 (2011).
167. Goede, V. et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England journal of medicine* **370**, 1101-1110 (2014).
168. Samochatova, E.V. et al. Therapy of advanced-stage mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents with rituximab and reduced intensity induction chemotherapy (B-NHL 2004M protocol): the results of a multicenter study. *Journal of pediatric hematology/oncology* **36**, 395-401 (2014).
169. Dworzak, M.N. et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood* **112**, 3982-3988 (2008).
170. Jeha, S. et al. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **108**, 3302-3304 (2006).
171. Gudowius, S. et al. Identification of candidate target antigens for antibody-based immunotherapy in childhood B-cell precursor ALL. *Klinische Padiatrie* **218**, 327-333 (2006).
172. Campana, D. et al. Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue. *Journal of immunology* **134**, 1524-1530 (1985).
173. Raetz, E.A. et al. Reinduction platform for children with first marrow relapse of acute lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study[corrected]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 3971-3978 (2008).
174. Chan, C.H., Wang, J., French, R.R. & Glennie, M.J. Internalization of the lymphocytic surface protein CD22 is controlled by a novel membrane proximal cytoplasmic motif. *The Journal of biological chemistry* **273**, 27809-27815 (1998).
175. Kantarjian, H. et al. Inotuzumab ozogamicin, an anti-CD22-calecheamicin conjugate, for refractory and relapsed acute lymphocytic leukaemia: a phase 2 study. *The Lancet. Oncology* **13**, 403-411 (2012).
176. Wayne, A.S. et al. Anti-CD22 immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) for CD22-positive hematologic malignancies of childhood: preclinical studies and phase I clinical trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 1894-1903 (2010).
177. Angiolillo, A.L. et al. A phase II study of Campath-1H in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group report. *Pediatric blood & cancer* **53**, 978-983 (2009).
178. Laurenti, L. et al. Cytomegalovirus reactivation during alemtuzumab therapy for chronic lymphocytic leukemia: incidence and treatment with oral ganciclovir. *Haematologica* **89**, 1248-1252 (2004).

179. Tang, S.C., Hewitt, K., Reis, M.D. & Berinstein, N.L. Immunosuppressive toxicity of CAMPATH1H monoclonal antibody in the treatment of patients with recurrent low grade lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **24**, 93-101 (1996).
180. Carter, R.H., Wang, Y. & Brooks, S. Role of CD19 signal transduction in B cell biology. *Immunologic research* **26**, 45-54 (2002).
181. Wang, K., Wei, G. & Liu, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental hematology & oncology* **1**, 36 (2012).
182. Scheuermann, R.H. & Racila, E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leukemia & lymphoma* **18**, 385-397 (1995).
183. Carter, R.H. & Fearon, D.T. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* **256**, 105-107 (1992).
184. Nadler, L.M. et al. B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *The Journal of clinical investigation* **74**, 332-340 (1984).
185. Nadler, L.M. et al. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *Journal of immunology* **131**, 244-250 (1983).
186. Du, X., Beers, R., Fitzgerald, D.J. & Pastan, I. Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity. *Cancer research* **68**, 6300-6305 (2008).
187. Matlawska-Wasowska, K. et al. Macrophage and NK-mediated killing of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells targeted with a-fucosylated anti-CD19 humanized antibodies. *Leukemia* **27**, 1263-1274 (2013).
188. ClinicalTrials.gov NCT01861340, Lenalidomide, Dexamethasone and MEDI-551 in Untreated Multiple Myeloma. *U.S. National Institutes of Health* (2013).
189. ClinicalTrials.gov NCT01957579, A Phase 1, Dose-escalation Study of MEDI-551 in Japanese Adult Patients With Relapsed or Refractory Advanced B-cell Malignancies. *U.S. National Institutes of Health* (2013).
190. ClinicalTrials.gov NCT02271945, Safety/Efficacy of MEDI-551 in Combination With Immunomodulating Therapies in Subjects With Aggressive B-cell Lymphomas. *U.S. National Institutes of Health* (2014).
191. ClinicalTrials.gov NCT01466153, A Phase 2, Multicenter, Open-label Study of MEDI-551 in Adults With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *U.S. National Institutes of Health* (2011).
192. ClinicalTrials.gov NCT00983619, A Clinical Study Using MEDI-551 in Adult Subjects With Relapsed or Refractory Advanced B-Cell Malignancies. *U.S. National Institutes of Health* (2009).
193. ClinicalTrials.gov NCT01453205, A Phase 2, Multicenter, Randomized, Open-label Study of MEDI-551 in Adults With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). *U.S. National Institutes of Health* (2011).
194. Cardarelli, P.M. et al. A nonfucosylated human antibody to CD19 with potent B-cell depletive activity for therapy of B-cell malignancies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **59**, 257-265 (2010).
195. ClinicalTrials.gov NCT00593944, Study of MDX-1342 in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) (MDX1342-02). *U.S. National Institutes of Health* (2008).
196. Breton, C.S. et al. A novel anti-CD19 monoclonal antibody (GBR 401) with high killing activity against B cell malignancies. *Journal of hematology & oncology* **7**, 33 (2014).
197. ClinicalTrials.gov NCT01685021, Study of Fc-Optimized Anti-CD19 Antibody (MOR00208) to Treat B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia(B-ALL). *U.S. National Institutes of Health* (2012).
198. ClinicalTrials.gov NCT01685008, Study of Fc-Optimized Anti-CD19 Antibody (MOR00208) to Treat Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). *U.S. National Institutes of Health* (2012).
199. ClinicalTrials.gov NCT02399085, A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Lenalidomide With MOR00208 in Patients With R-R DLBCL. *U.S. National Institutes of Health* (2015).

200. ClinicalTrials.gov NCT02005289, Phase II MOR00208 in Combination With Lenalidomide for Patients With Relapsed or Refractory CLL, SLL or PLL or Older Patients With Untreated CLL, SLL or PLL. *U.S. National Institutes of Health* (2013).
201. Stone, M.J. et al. A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood* **88**, 1188-1197 (1996).
202. Furman, R.R. et al. A phase III study of anti-B4-blocked ricin as adjuvant therapy post-autologous bone marrow transplant: CALGB 9254. *Leukemia & lymphoma* **52**, 587-596 (2011).
203. Tsimberidou, A.M., Giles, F.J., Kantarjian, H.M., Keating, M.J. & O'Brien, S.M. Anti-B4 blocked ricin post chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia--long-term follow-up of a monoclonal antibody-based approach to residual disease. *Leukemia & lymphoma* **44**, 1719-1725 (2003).
204. Sztatowski, T.P. et al. Lineage specific treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia in first remission with anti-B4-blocked ricin or high-dose cytarabine: Cancer and Leukemia Group B Study 9311. *Cancer* **97**, 1471-1480 (2003).
205. Multani, P.S., O'Day, S., Nadler, L.M. & Grossbard, M.L. Phase II clinical trial of bolus infusion anti-B4 blocked ricin immunoconjugate in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **4**, 2599-2604 (1998).
206. Grossbard, M.L. et al. Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 726-737 (1993).
207. Grossbard, M.L. et al. Anti-B4-blocked ricin: a phase II trial of 7 day continuous infusion in patients with multiple myeloma. *British journal of haematology* **102**, 509-515 (1998).
208. Schwemmler, M. et al. A CD19-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of B-lineage leukemic cells. *Leukemia* **21**, 1405-1412 (2007).
209. Carol, H. et al. The anti-CD19 antibody-drug conjugate SAR3419 prevents hematolymphoid relapse postinduction therapy in preclinical models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1795-1805 (2013).
210. ClinicalTrials.gov NCT01440179, SAR3419 in Acute Lymphoblastic Leukemia (MYRALL). *U.S. National Institutes of Health* (2011).
211. ClinicalTrials.gov NCT01786096, A Safety Study of SGN-CD19A for Leukemia and Lymphoma. *U.S. National Institutes of Health* (2013).
212. Herrera, L. et al. A phase 1 study of Combotox in pediatric patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology* **31**, 936-941 (2009).
213. ClinicalTrials.gov NCT00889408, DT2219ARL for Relapsed or Refractory CD19 (+), CD 22 (+) B-Lineage Leukemia Or Lymphoma. *U.S. National Institutes of Health* (2009).
214. Vallera, D.A., Chen, H., Sicheneder, A.R., Panoskaltsis-Mortari, A. & Taras, E.P. Genetic alteration of a bispecific ligand-directed toxin targeting human CD19 and CD22 receptors resulting in improved efficacy against systemic B cell malignancy. *Leukemia research* **33**, 1233-1242 (2009).
215. Bruenke, J. et al. Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcγRIII (CD16). *British journal of haematology* **130**, 218-228 (2005).
216. Kellner, C. et al. A novel CD19-directed recombinant bispecific antibody derivative with enhanced immune effector functions for human leukemic cells. *Journal of immunotherapy* **31**, 871-884 (2008).
217. Reusch, U. et al. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19(+) tumor cells. *mAbs* **7**, 584-604 (2015).
218. Moore, P.A. et al. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *Blood* **117**, 4542-4551 (2011).

219. Loffler, A. et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* **95**, 2098-2103 (2000).
220. Nagorsen, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A. & Bargou, R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacology & therapeutics* **136**, 334-342 (2012).
221. Zugmaier, G., Klinger, M., Schmidt, M. & Subklewe, M. Clinical overview of anti-CD19 BiTE and ex vivo data from anti-CD33 BiTE as examples for retargeting T cells in hematologic malignancies. *Molecular immunology* (2015).
222. U.S. Department of Health and Human Services, F.a.D.A. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/125557lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/125557lbl.pdf).
223. Bargou, R. et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* **321**, 974-977 (2008).
224. Topp, M.S. et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet. Oncology* **16**, 57-66 (2015).
225. Topp, M.S. et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2493-2498 (2011).
226. U.S. Department of Health and Human Services, F.a.D.A. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm425549.htm>.
227. Handgretinger, R. et al. Complete remission after blinatumomab-induced donor T-cell activation in three pediatric patients with post-transplant relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **25**, 181-184 (2011).
228. Schlegel, P. et al. Pediatric posttransplant relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia shows durable remission by therapy with the T-cell engaging bispecific antibody blinatumomab. *Haematologica* **99**, 1212-1219 (2014).
229. ClinicalTrials.gov NCT01471782, Clinical Study With Blinatumomab in Pediatric and Adolescent Patients With Relapsed/Refractory B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *U.S. National Institutes of Health* (2011).
230. ClinicalTrials.gov NCT02187354, Expanded Access Protocol of Blinatumomab in Pediatric and Adolescent Subjects With Relapsed and/or Refractory B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) (RIALTO). *U.S. National Institutes of Health* (2014).
231. Maude, S.L., Barrett, D., Teachey, D.T. & Grupp, S.A. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer journal* **20**, 119-122 (2014).
232. von Stackelberg, A. A Phase 1/2 Study Of Blinatumomab In Pediatric Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **124**, 2292 (2014).
233. Gore, L. Initial Results from a Phase 2 Study of Blinatumomab in Pediatric Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **124**, 3703 (2014).
234. Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B. & Brenner, M.K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological reviews* **257**, 107-126 (2014).
235. Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchtern, J.G., Rooney, C.M. & Brenner, M.K. Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood* **99**, 2009-2016 (2002).
236. Pule, M.A. et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nature medicine* **14**, 1264-1270 (2008).
237. Louis, C.U. et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* **118**, 6050-6056 (2011).

238. Kochenderfer, J.N. & Rosenberg, S.A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature reviews. Clinical oncology* **10**, 267-276 (2013).
239. Hacein-Bey-Abina, S. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3132-3142 (2008).
240. Howe, S.J. et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3143-3150 (2008).
241. Stein, S. et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nature medicine* **16**, 198-204 (2010).
242. Braun, C.J. et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. *Science translational medicine* **6**, 227ra233 (2014).
243. Tey, S.K. Adoptive T-cell therapy: adverse events and safety switches. *Clinical & translational immunology* **3**, e17 (2014).
244. Kochenderfer, J.N. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* **116**, 4099-4102 (2010).
245. Savoldo, B. et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *The Journal of clinical investigation* **121**, 1822-1826 (2011).
246. Brentjens, R.J. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* **5**, 177ra138 (2013).
247. Grupp, S.A. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* **368**, 1509-1518 (2013).
248. Lee, D.W. et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* **385**, 517-528 (2015).
249. ClinicalTrials.gov NCT01860937, Autologous T-Lymphocytes Genetically Targeted to the B-Cell Specific Antigen CD19 in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *U.S. National Institutes of Health* (2013).
250. ClinicalTrials.gov NCT01430390, In Vitro Expanded Allogeneic Epstein-Barr Virus Specific Cytotoxic T-Lymphocytes (EBV-CTLs) Genetically Targeted to the B-Cell Specific Antigen CD19 Positive Residual Or Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation. *U.S. National Institutes of Health* (2011).
251. ClinicalTrials.gov NCT01195480, CD19-CAR Immunotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) (CD19TPALL). *U.S. National Institutes of Health* (2010).
252. ClinicalTrials.gov NCT01853631, Activated T-Cells Expressing 2nd or 3rd Generation CD19-Specific CAR, Advanced B-Cell NHL, ALL, and CLL (SAGAN). *U.S. National Institutes of Health* (2013).
253. ClinicalTrials.gov NCT02028455, A Pediatric and Young Adult Trial of Genetically Modified T Cells Directed Against CD19 for Relapsed/Refractory CD19+ Leukemia. *U.S. National Institutes of Health* (2014).
254. ClinicalTrials.gov NCT01593696, Anti-CD19 White Blood Cells for Children and Young Adults With B Cell Leukemia or Lymphoma. *U.S. National Institutes of Health* (2012).
255. ClinicalTrials.gov NCT00840853, Multi-virus CTLs Expressing CD19 Chimeric Receptors, CD19 Positive Malignancies Post SCT, MULTIPRAT. *U.S. National Institutes of Health* (2009).
256. ClinicalTrials.gov NCT01683279, A Pediatric Trial of Genetically Modified Autologous T Cells Directed Against CD19 for Relapsed CD19+ Acute Lymphoblastic Leukemia. *U.S. National Institutes of Health* (2012).

257. ClinicalTrials.gov NCT02050347, Activated T Lymphocytes Expressing CARs, Relapsed CD19+ Malignancies Post-Allo HSCT(CARPASCIO). *U.S. National Institutes of Health* (2014).
258. ClinicalTrials.gov NCT00586391, CD19 Chimeric Receptor Expressing T Lymphocytes In B-Cell Non Hodgkin's Lymphoma, ALL & CLL (CRETI-NH). *U.S. National Institutes of Health* (2007).
259. ClinicalTrials.gov NCT02456350, Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Transduced T Cell Therapy for Patients With B Cell Malignancies. *U.S. National Institutes of Health* (2015).
260. ClinicalTrials.gov NCT02443831, CARPALL: Immunotherapy With CD19 CAR T-cells for CD19+ Haematological Malignancies. *U.S. National Institutes of Health* (2015).
261. ClinicalTrials.gov NCT01626495, Phase I/IIA Study of CART19 Cells for Patients With Chemotherapy Resistant or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma (Pedi CART-19). *U.S. National Institutes of Health* (2012).
262. Lee, D.W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188-195 (2014).
263. Meeker, T.C. et al. A unique human B lymphocyte antigen defined by a monoclonal antibody. *Hybridoma* **3**, 305-320 (1984).
264. Durben, M. et al. Characterization of a Bispecific FLT3 X CD3 Antibody in an Improved, Recombinant Format for the Treatment of Leukemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* (2015).
265. Mack, M., Riethmuller, G. & Kufer, P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7021-7025 (1995).
266. Chang, C.H., Goldenberg, D.M., Rossi, E.A. & Rossi, D. (Google Patents, 2014).
267. Birnboim, H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology* **100**, 243-255 (1983).
268. Seidel, U.J. et al. gammadelta T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay. *Frontiers in immunology* **5**, 618 (2014).
269. Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J.P. & Favero, J. Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *Journal of immunology* **166**, 7190-7199 (2001).
270. Tokuyama, H. et al. V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **122**, 2526-2534 (2008).
271. Beers, S.A. et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* **115**, 5191-5201 (2010).
272. Feldman, E.J. et al. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 4110-4116 (2005).
273. Press, O.W., Farr, A.G., Borroz, K.I., Anderson, S.K. & Martin, P.J. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer research* **49**, 4906-4912 (1989).
274. Ingle, G.S. et al. High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD19-drug conjugate. *British journal of haematology* **140**, 46-58 (2008).
275. Uckun, F.M. et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood* **71**, 13-29 (1988).
276. Sieber, T., Schoeler, D., Ringel, F., Pascu, M. & Schriever, F. Selective internalization of monoclonal antibodies by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *British journal of haematology* **121**, 458-461 (2003).

277. Lim, S.H. et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* **118**, 2530-2540 (2011).
278. Beers, S. et al. (Google Patents, 2012).
279. Rankin, C.T. et al. CD32B, the human inhibitory Fc-gamma receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood* **108**, 2384-2391 (2006).
280. Orr, M.T. & Lanier, L.L. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* **142**, 847-856 (2010).
281. Nash, W.T., Teoh, J., Wei, H., Gamache, A. & Brown, M.G. Know Thyself: NK-Cell Inhibitory Receptors Prompt Self-Tolerance, Education, and Viral Control. *Frontiers in immunology* **5**, 175 (2014).
282. Velardi, A., Ruggeri, L. & Mancusi, A. Killer-cell immunoglobulin-like receptors reactivity and outcome of stem cell transplant. *Current opinion in hematology* **19**, 319-323 (2012).
283. Delgado, D.C. et al. Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcgamma receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer research* **70**, 9554-9561 (2010).
284. Tarek, N. et al. Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *The Journal of clinical investigation* **122**, 3260-3270 (2012).
285. Ghetie, M.A. et al. Anti-CD19 inhibits the growth of human B-cell tumor lines in vitro and of Daudi cells in SCID mice by inducing cell cycle arrest. *Blood* **83**, 1329-1336 (1994).
286. Angelini, D.F. et al. FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* **104**, 1801-1807 (2004).
287. Capietto, A.H., Martinet, L. & Fournie, J.J. Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *Journal of immunology* **187**, 1031-1038 (2011).
288. Otto, M. et al. Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 8486-8491 (2005).
289. Carding, S.R. & Egan, P.J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 336-345 (2002).
290. Fisher, J.P., Heuveljans, J., Yan, M., Gustafsson, K. & Anderson, J. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology* **3**, e27572 (2014).
291. Gertner-Dardenne, J. et al. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* **113**, 4875-4884 (2009).
292. Braza, M.S., Klein, B., Fiol, G. & Rossi, J.F. gammadelta T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* **96**, 400-407 (2011).
293. Norell, H., Moretta, A., Silva-Santos, B. & Moretta, L. At the Bench: Preclinical rationale for exploiting NK cells and gammadelta T lymphocytes for the treatment of high-risk leukemias. *Journal of leukocyte biology* **94**, 1123-1139 (2013).
294. Godder, K.T. et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* **39**, 751-757 (2007).
295. Drobyski, W.R., Majewski, D. & Hanson, G. Graft-facilitating doses of ex vivo activated gammadelta T cells do not cause lethal murine graft-vs.-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **5**, 222-230 (1999).
296. Chaleff, S. et al. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy* **9**, 746-754 (2007).

297. Schumm, M. et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* **15**, 1253-1258 (2013).
298. Handgretinger, R. Negative depletion of CD3(+) and TcRalphabeta(+) T cells. *Current opinion in hematology* **19**, 434-439 (2012).
299. Oevermann, L. et al. Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1266**, 161-170 (2012).
300. Chen, Z. & Freedman, M.S. Correlation of specialized CD16(+) gammadelta T cells with disease course and severity in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* **194**, 147-152 (2008).
301. Eberl, M., Engel, R., Beck, E. & Jomaa, H. Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cellular immunology* **218**, 1-6 (2002).
302. Carson, W.E. et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *The Journal of experimental medicine* **180**, 1395-1403 (1994).
303. Eskelund, C.W. et al. Interleukin-21 and rituximab enhance NK cell functionality in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia research* **35**, 914-920 (2011).
304. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of immunology* **136**, 4480-4486 (1986).
305. Petropoulou, A.D. et al. Increased infection rate after preemptive rituximab treatment for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* **94**, 879-883 (2012).
306. Topp, M.S. et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood* **120**, 5185-5187 (2012).
307. Uckun, F.M., Sun, L., Qazi, S., Ma, H. & Ozer, Z. Recombinant human CD19-ligand protein as a potent anti-leukaemic agent. *British journal of haematology* **153**, 15-23 (2011).
308. Uckun, F.M. (Google Patents, 2012).
309. Mackarechtschian, K. et al. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**, 147-161 (1995).
310. Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532-1542 (2002).
311. Carow, C.E. et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* **87**, 1089-1096 (1996).
312. Birg, F. et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* **80**, 2584-2593 (1992).
313. Armstrong, S.A. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature genetics* **30**, 41-47 (2002).
314. Annesley, C.E. & Brown, P. The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia. *Frontiers in oncology* **4**, 263 (2014).
315. Drexler, H.G. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* **10**, 588-599 (1996).
316. Dehmel, U. et al. Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. *Leukemia* **10**, 261-270 (1996).
317. Rosnet, O. et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* **10**, 238-248 (1996).
318. McKenna, H.J. et al. Effects of flt3 ligand on acute myeloid and lymphocytic leukemic blast cells from children. *Experimental hematology* **24**, 378-385 (1996).
319. ClinicalTrials.gov NCT00887926, Study of EB10 in Patients With Leukemia. *U.S. National Institutes of Health* (2009).
320. Kikushige, Y. et al. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *Journal of immunology* **180**, 7358-7367 (2008).

321. Buhring, H.J. et al. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Stem cells* **22**, 334-343 (2004).
322. Seon, B.K. et al. Endoglin-targeted cancer therapy. *Current drug delivery* **8**, 135-143 (2011).
323. Rosen, L.S., Gordon, M.S., Robert, F. & Matei, D.E. Endoglin for targeted cancer treatment. *Current oncology reports* **16**, 365 (2014).
324. Rosen, L.S. et al. A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 4820-4829 (2012).
325. Haruta, Y. & Seon, B.K. Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 7898-7902 (1986).

## 6 Anhang

### 6.1 Publikationen

#### 6.1.1 Originalpublikationen

**Seidel UJ\***, Schlegel P\*, Lang P\*, Grosse-Hovest, Hoffmann M, Aulwurm S, Pyz E, Witte KE, Schuster FR, Meisel R, Ebinger M, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schwarze CP, Rammensee HG, Jung G, Handgretinger R. **Reduction of minimal residual disease in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia by an Fc-optimized CD19 antibody.** Manuskript in Vorbereitung \*geteilte Erstautoren

Schiller CB\*, Braciak TA\*, Roskopf CC\*, **Seidel UJ\***, Wildenhain S\*, Honegger A, Schubert IA, Schele A, Fey GH, Jacob U, Lang P, Oduncu FS, Hopfner K-P. **Single-chain triplebody SPM-1 with specificity for CD19 recruits NK- and gamma-delta T-cells for an efficient elimination of malignant B-lymphoid cells.** Manuskript in Vorbereitung \*geteilte Erstautoren

Schlegel P, Feuchtinger T, Nitschke-Gérard C, **Seidel UJ**, Lang AM, Kyzirakos C, Teltschik HM, Ebinger M, Schumm M, Koscielniak E, Handgretinger R, Lang P. **Favorable NK cell activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in stage IV relapsed Ewing's sarcoma patients.** Bone Marrow Transplant. 2015 Jun;50 Suppl 2:S72-6

**Seidel UJ**, Vogt F, Grosse-Hovest L, Jung G, Handgretinger R, Lang P.  **$\gamma\delta$  T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay.** Front Immunol. 2014 Dec 2;5:618.

**Seidel UJ**, Schlegel P, Lang P. **Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies.** Front Immunol. 2013 Mar 27;4:76.

**Seidel UJ**, Oliveira CC, Lampen MH, Hall Tv. **A novel category of antigens enabling CTL immunity to tumor escape variants: Cinderella antigens.** Cancer Immunol Immunother. 2012 Jan;61(1):119-25.

#### 6.1.2 Konferenzen

**CIMT 2015, Mainz:** Reduction of minimal residual disease in children with relapsed and refractory ALL by a newly developed, Fc-optimized CD19 antibody (Poster)

**European Bone Marrow Transplantation (EBMT) 2015, Istanbul:** Eradication of Minimal Residual Disease in Children with Relapsed and Refractory ALL by a Newly Developed, Fc-optimized CD19 Antibody. Bone Marrow Transplant; March 2015. Vol. 50, Issue S1 (Vortrag)

**Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) 2014, Hamburg:** From bench to bedside: Reduction of minimal residual disease in children with ALL by a newly developed, Fc-optimized CD19 antibody (Vortrag)

**CIMT 2014, Mainz:** From Bedside to Bench: Molecular Benchmarking of an Fc-Optimized CD19 Antibody Used in Treatment of Relapsed and Refractory Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia (Poster)

**1st xCELLigence User Meeting, München 2014:** Integration of xCELLigence technology in ADCC assays assessing novel therapeutic antibodies (Vortrag)

**American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting 2013, New Orleans:** From Bedside to Bench: Molecular Benchmarking of an Fc-Optimized CD19 Antibody Used in Treatment of Relapsed and Refractory Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *October 21, 2013; 122 (21) Blood* (Poster)

**CIMT 2013, Mainz:** Treatment of children with B-lineage acute lymphoblastic leukaemia with an Fc-optimized CD19 antibody (Poster)

**European Bone Marrow Transplantation (EBMT) 2013, London:** Use of an Fc-optimized CD19 antibody in pre- and post-transplant MRD treatment of paediatric patients with refractory B-lineage ALL. *Bone Marrow Transplantation; Apr 2013. Vol. 48, Issue S2* (Poster)

**International Symposium: Moving forward in immunotherapy 2012, Tübingen:** Monitoring of ADCC with an Fc-optimized CD19 antibody in posttransplant MRD treatment of paediatric patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia (Poster)

**NK 2012, Heidelberg:** Monitoring of ADCC with an Fc-optimized CD19 antibody in posttransplant MRD treatment of paediatric patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia (Poster)

**European Congress of Immunology (ECI) 2012, Glasgow:** Monitoring of ADCC with an Fc-optimized CD19 antibody in post-transplant MRD treatment of paediatric patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *(2012), Poster Sessions. Immunology, 137: 185–772.* (Poster)

#### 6.1.2.1 Travel Grants

##### Abstract Achievement Award

**American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting 2013, New Orleans:** From Bedside to Bench: Molecular Benchmarking of an Fc-Optimized CD19 Antibody Used in Treatment of Relapsed and Refractory Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *October 21, 2013; 122 (21) Blood*

##### Travel Grant ACEA

**1st xCELLigence User Meeting, München 2014:** Integration of xCELLigence technology in ADCC assays assessing novel therapeutic antibodies

## 6.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt...

... Prof. Dr. Peter Lang für die Möglichkeit, dieses spannende Thema bearbeiten zu dürfen sowie die Betreuung meiner Arbeit

.... Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie immer offene Türen und Ohren.

... Prof. Dr. Rupert Handgretinger für die Aufnahme in die Kinderklinik, sein Interesse an meinem Projekt und die Ermöglichung meiner Teilnahme an Kongressen.

... Prof. Dr. Jürgen Frank für meine Aufnahme in und die Organisation des SFB685 und der IRTG sowie die Ermöglichung der Teilnahme an vielen lehrreichen Seminaren, Netzwerktreffen und Kongressen.

... Prof. Dr. Gundram Jung, Dr. Ludger Grosse-Hovest, Dr. Martin Hofmann, Fabian Vogt und den anderen „Jungs“ für die freundliche Wiederaufnahme in den Antikörperclub, Rat und Tat jeglicher Art und anregende Diskussionen, die essentiell für das Gelingen dieser Arbeit waren.

... Heiko Schuster für seine Unterstützung beim Sortieren und die Beantwortung aller erdenklicher Fragen sowie Beate Pömmerl für ihre Hilfe bei der Molekularbiologie.

... den Krankenschwestern und Ärzten der Kinderklinik, den MTAs des KMT-Labors sowie Annie und Rouwen für die Versorgung mit und Analyse von Patientenmaterial.

... Prof. Dr. Reinhild Klein von der Medizinischen Klinik Tübingen für die Analyse von Serum auf HACAs, Kai-Erik Witte für die Analyse von MRD-Proben und Dr. Patrick Schlegel für die Zusammenstellung klinischer Daten.

... Prof. Dr. Arend von Stackelberg von der Charité Berlin, Dr. Oliver Basu von der Kinderklinik Essen sowie Dr. Friedhelm Schuster von der Kinderklinik Düsseldorf für die Versorgung mit Patientenmaterial und Hintergrundinformationen.

... Lena, Marie, Sarah, Sylvia, Roksana, Meli, Armin, Vanessa, Sabine, Barbara, Christina und Manon für eine lustige Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

... der DFG (SFB685), dem Förderverein für krebskranke Kinder Tübingen e.V., der Aktion Erna und der Stefan Morsch Stiftung für die finanzielle Unterstützung.

... meiner Familie und Daniel Kowalewski für Alles.

## **7 Erklärung**

Ich versichere, dass ich die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Von anderen Personen übernommene Daten oder durchgeführte Arbeiten sind als solche gekennzeichnet.

Tübingen, den 20.07.2015