



**Entwicklung multi-funktioneller TNFRSF Rezeptor-  
spezifischer Antikörper-Fusionsproteine mit  
FcγR-unabhängiger Aktivität**

Development of multi-functional TNFRSF receptor-specific  
antibody fusion proteins with FcγR-independent activity

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

**Johannes Nelke**

geboren in Kassel

Würzburg, 2020





Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons  
Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
4.0 International (CC BY-SA) Lizenz.

This work is licenced under an Creative Commons Attribution-  
ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA) licence.

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Bürostempel

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzende/r:

1. Betreuer: Prof. Dr. Harald Wajant
2. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack
3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_





# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>V</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>16</b>
1.1 Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie .....	16
1.1.1 Rezeptoren der TNFRSF .....	17
1.1.2 Liganden der TNFSF .....	17
1.1.3 TNFSF Ligand/Rezeptor-Interaktionen mit Relevanz für diese Arbeit .....	18
1.1.4 TNFRSF-Rezeptor vermittelte Signalwege.....	21
1.2 Antikörper und therapeutische Einsatzmöglichkeiten bei TNFRSF- assoziierten Erkrankungen.....	25
1.2.1 Rolle und Funktion von Antikörpern im Immunsystem .....	25
1.2.2 Immunologische Eigenschaften von IgG Antikörpern.....	26
1.2.3 Entwicklung von Antikörper-Therapeutika .....	29
1.2.4 Antikörper-basierte Behandlung von TNFRSF-assoziierten Erkrankungen .....	30
1.2.5 Bispezifische Antikörperformate.....	36
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit .....	39
<b>2 Material.....</b>	<b>40</b>
2.1 Laborausstattung .....	40
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	40
2.3 Labormaterialien.....	41
2.4 Gebrauchsfertige Chemikalien und Lösungen.....	41
2.5 Angesetzte Medien und Lösungen .....	42
2.6 Kommerzielle Kits .....	45

2.7	Antibiotika .....	45
2.8	Antikörper .....	46
2.9	Biologisches Material .....	46
2.9.1	Prokaryotische Zellen.....	46
2.9.2	Eukaryotische Zelllinien .....	46
2.10	Plasmide und rekombinante Fusionsproteine .....	48
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>50</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	50
3.1.1	Klonierung Fusionsprotein-kodierender Expressionsvektoren ...	50
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	50
3.1.3	Trennung der DNA-Fragmente mittels horizontaler Gelelektrophorese .....	51
3.1.4	Aufreinigung der PCR-Fragmente .....	51
3.1.5	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	51
3.1.6	Ligation der verdauten DNA-Fragmente .....	52
3.1.7	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	52
3.1.8	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	52
3.1.9	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	53
3.1.10	Vorbereitung der Sequenzierungsansätze.....	53
3.2	Zellkultur Methoden .....	54
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien .....	54
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	54
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl.....	54
3.2.4	Durchflusszytometrie zur Detektion der Rezeptor-Expression ...	55
3.3	Makromolekulare Methoden.....	55
3.3.1	Produktion der Liganden, Antikörper und Antikörper- Fusionsproteine .....	55
3.3.2	Aufreinigung der Antikörpervarianten aus Zellkulturüberstand mittels Anti-Flag M2 Affinitätsgel .....	56
3.4	Protein-Biochemische Methoden .....	56
3.4.1	Trennung der Proteinfragmente mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56

---

3.4.2	Größenausschluss-Chromatographie (SEC-HPLC) .....	57
3.5	Methoden zur <i>in vitro</i> Testung der Bindungseigenschaften und der funktionellen Aktivität .....	58
3.5.1	Gleichgewichtsbindungsstudien mittels GpL-Fusionsproteinen .	58
3.5.2	Interleukin 8 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays</i> (IL8 ELISA)	58
3.5.3	Zytotoxizitäts-Assays .....	59
3.5.4	Ko-Kultur Experimente .....	60
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
4.1	Evaluierung unterschiedlicher Verankerungsdomänen an CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen .....	61
4.2	Analyse der Rezeptorbindung von N- und C-terminaler Bindedomäne der Antikörper-Fusionsproteine und Vergleich mit den ursprünglichen Antikörpern oder Liganden.....	63
4.3	Identifizierung der geeigneten Zelllinien und Kultivierungsbedingungen für die funktionelle Analyse der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine.....	67
4.3.1	Bestimmung der Oberflächenexpression von CD40, CD95 sowie BaffR, BCMA und TACI auf unterschiedlichen Tumor-Zelllinien .	67
4.3.2	Ermittlung der für die Analyse der Ziel-Rezeptoraktivierung geeigneten Zelllinien .....	69
4.3.3	Bestimmung der geeigneten Kultivierungsbedingungen für Experimente mit CD95-spezifischen Antikörpern und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine .....	71
4.4	Evaluation der FcγR-abhängigen und –unabhängigen Rezeptoraktivierung unterschiedlicher Varianten der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine .....	71
4.5	Bewertung der Produktionseffizienz und des Aggregationsgrades der Antikörper und Antikörper-scBaff-Fusionsproteine .....	74
4.5.1	Bestimmung der Produktionseffizienz und Aufreinigung der CD40-/CD95-Antikörper und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine .....	74
4.5.2	Analyse der Aggregation der CD40-/CD95-Antikörper und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC-HPLC).....	76

4.5.3	Vergleich der Funktionalität von unaufgereinigten Zellkulturüberständen und aufgereinigten Antikörper-Konstrukten.....	78
4.6	Untersuchung der Rezeptor-aktivierenden Eigenschaften von CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen in Abhängigkeit unterschiedlicher BaffR-/BCMA-/TACI-exprimierender Zellen.....	78
4.6.1	Analyse der CD40- und CD95-Aktivierung durch Antikörper-scBaff-Fusionsproteine in Experimenten mit Verankerungsrezeptor-überexprimierenden Zellen.....	79
4.6.2	Analyse der CD40- und CD95-Aktivierung durch die Antikörper-scBaff-Fusionsproteine in Experimenten mit endogenen Verankerungsrezeptor-exprimierenden Zellen .....	84
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
5.1	Einordnung der scBaff-Antikörper-Fusionsproteine in den aktuellen Stand der klinischen Forschung .....	94
5.1.1	CD40-spezifische Immuntherapie mittels immunmodulatorischer Antikörper .....	94
5.1.2	CD95-basierte Immuntherapie mit dem Ziel der Apoptose-Induktion von Tumorzellen .....	98
5.1.3	Die Rezeptoren von Baff und APRIL als Ziel therapeutischer Antikörper .....	102
5.2	Verankerungsdomänen-vermittelte Antikörper-Potenzierung im Vergleich zu anderen Antikörper-basierten Therapiekonzepten .....	110
5.3	Optimierungsmöglichkeiten und Ausblick für die vorgestellten Verankerungsdomänen-abhängigen Antikörper-Fusionsproteine .....	112
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung/Affidavit .....</b>	<b>138</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>139</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>141</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>142</b>

## Zusammenfassung

Die Regulation verschiedenster immunologischer Prozesse im menschlichen Körper ist auf zahlreiche Mechanismen angewiesen, darunter auf komplexe Netzwerke aus Hormonen und Zytokinen, die als Liganden für intra- und extrazelluläre Rezeptoren dienen. Der Fokus dieser Arbeit gilt einer Familie solcher wichtiger Signalnetzwerke, die sich aus den Liganden der Tumornekrose-Faktor-Superfamilie (TNFSF) sowie den Rezeptoren der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) zusammensetzt. Diese sind an der Kontrolle der Zellproliferation, der Differenzierung sowie des programmierten Zelltods und des Zellüberlebens innerhalb der Gewebemöostase, von Entwicklungsprozessen und des Immunsystems beteiligt. Mitglieder dieser Liganden-Rezeptor-Familie spielen auch bedeutende, jedoch divergierende Rollen sowohl in der immunologischen Bekämpfung aber auch der Progression verschiedener Tumor-Erkrankungen, u.a. auch dem Multiplen Myelom. Die TNFRSF-Mitglieder BCMA, BaffR und TACI sind beispielsweise sehr restringiert exprimierte und somit therapeutisch attraktive Zielmoleküle auf Myelomzellen, die deren Überleben und überschießende Proliferation unterstützen.

Antikörper-basierte Therapeutika gelten als wichtige Wirkstoffe zur Adressierung solcher Oberflächenantigene und zur Behandlung der assoziierten Erkrankungen. Grundsätzlich ist es in diesem Zusammenhang möglich, auch die antitumorale Wirkung des Immunsystems durch parallele Aktivierung von weiteren Rezeptoren der TNFRSF zu stimulieren. Hierfür bieten sich u.a. der Rezeptor CD40 an, der über die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen immun-stimulierende Effekte induzieren kann, sowie der Rezeptor CD95, über den die Todesrezeptor-verbundene Apoptose von Tumorzellen ausgelöst werden kann. Bivalente IgG-basierte, monoklonale Antikörper sind für die Aktivierung von CD40 oder CD95 allerdings typischerweise auf die Interaktion mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) angewiesen. Grund hierfür ist die durch Fc-vermittelte Fc $\gamma$ R-Bindung erzielte lokale Anreicherung (Konzentration > 10  $\mu$ M) von derart immobilisierten Antikörpern, die nur in solchen Zell-Zell-Kontaktsituationen die notwendige Rezeptoroligomerisierung dieser TNFRSF-Mitglieder induzieren können und so hochpotent agonistisch wirken. Diese Fc $\gamma$ R-abhängige Aktivierung jedoch kann mit einer Reihe von systemischen, Dosis-limitierenden Nebenwirkungen einhergehen, darunter einer unerwünschten, ggf. lebensbedrohlichen Zytokinfreisetzung. Aus diesem Grund werden dringend neue Strategien benötigt, die eine Fc $\gamma$ R-unabhängige und lokale, Tumor-assoziierte Aktivierung von Antikörper-Therapeutika erlauben.

Die Entwicklung, Charakterisierung und Evaluation von derartigen Konstrukten stellte den Fokus der hier vorgelegten Arbeit dar. Es wurden CD40- und CD95-spezifische Antikörper-Fusionsproteine generiert, die über C-terminal an die schweren Ketten fusionierte, BCMA-/BaffR-/TACI-bindende Immobilisierungsdomänen verfügen. Diese Konstrukte wurden im IgG1-, IgG1-N297A- und Fab2-Format kloniert, rekombinant produziert und aufgereinigt. Die Rezeptorbindung von N-terminaler Fab- und C-terminaler Immobilisierungsdomäne wurde *in vitro* mittels Zell-basierten Bindungsstudien mit Luziferase-Fusionsproteinen der genannten Proteine untersucht. Die Affinitäten der Domänen der verschiedenen Antikörper-

Fusionproteine für CD40 bzw. CD95 waren mit denen der Ausgangs-IgG1-Antikörper vergleichbar, was zeigte, dass die Verankerungsdomäne keinen negativen Einfluss auf die N-terminale, Antigen-bindende Domäne hatte. Ebenso behielten auch die Verankerungsdomänen im Fusionsprotein ihre hohe Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich gegenüber den Zielrezeptoren BCMA, TACI und BaffR bei. Die funktionelle Analyse der unterschiedlichen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von zellulären Ko-Kultur-Experimenten, in denen CD40- bzw. CD95-exprimierende Effektorzellen in Kombination mit FcγR-exprimierenden bzw. BCMA-/BaffR-/TACI-positiven Zellen oder entsprechenden Kontrollzellen sowie den unterschiedlichen Konstrukten inkubiert wurden. Die CD40- und CD95-Aktivierung wurde dabei durch Nachweis der induzierten IL8-Produktion mittels ELISA-Assays nachgewiesen sowie im Falle von CD95 zusätzlich mittels Zytotoxizitäts-Experimenten. Hierbei konnte erfolgreich bestätigt werden, dass die FcγR-defizienten Antikörper-Fusionsproteine des IgG1-N297A- und des Fab2-Formats in Ko-Kulturen mit FcγR-positiven Zellen einen deutlich reduzierten bzw. keinen Rezeptor-Agonismus aufweisen. In Ko-Kulturen mit BaffR-exprimierenden Zellen hingegen konnten die Varianten mit einer Baff-Verankerungsdomäne eine starke CD40-/CD95-Aktivierung induzieren, die mindestens genauso wirksam war, wie die FcγR-vermittelte Aktivierung, welche mit den konventionellen IgG1-Antikörpern erzielt wurde. Weitere Ko-Kultur-Experimente mit Effektorzellen und transient BCMA-/TACI-/BaffR-exprimierenden Verankerungszellen bestätigten, dass die CD40- bzw. CD95-Aktivierung hochspezifisch nach Immobilisierung an jedem einzelnen der drei Rezeptoren potenziert werden und dieser Effekt durch einen Überschuss an löslichem Liganden wiederum blockiert werden kann. Um das mögliche klinische Potenzial der Antikörper-Fusionsproteine zu analysieren, wurden weiterführende Experimente mit einer Reihe von Myelom-Zelllinien durchgeführt, welche einen oder mehrere der Rezeptoren BCMA, BaffR oder TACI endogen exprimieren. Auch hierbei konnte ein hohes Maß an Verankerungsdomänen-abhängiger CD40-/CD95-Aktivierung in Effektorzellen nachgewiesen werden sowie im Fall von CD95- und BCMA-/TACI-/BaffR-doppelpositiven Myelomzellen ebenfalls die direkte Apoptose-Induktion dieser Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in dieser Promotionsarbeit vorgestellten und *in vitro* untersuchten CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine mit BCMA-/BaffR-/TACI-spezifischem, FcγR-unabhängigem Rezeptoragonismus eine potente Anwendbarkeit speziell in hämatologischen Erkrankungen ermöglichen. Sie versprechen FcγR-bedingte Einschränkungen und systemische Nebenwirkungen zu überwinden und stellen somit eine vielversprechende Weiterentwicklung zu aktuell vorhandenen Antikörper-Therapeutika sowie eine Ergänzung zu momentanen Kombinationstherapien dar.

## Abstract

The modulation of immunological processes in the human body depends on numerous mechanisms, including complex networks of hormones and cytokines that serve as ligands for intra- and extracellular receptors. The focus of this work is set on a family of such important signalling networks consisting of the ligands of the tumor necrosis factor superfamily (TNFSF) and the receptors of the tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF). These molecules are involved in the control of cell proliferation, differentiation, programmed cell death and cell survival within tissue homeostasis, developmental processes and the immune system. Members of this ligand-receptor family also play important but divergent roles in progression and immunological control of various tumor diseases such as multiple myeloma. For instance, the TNFRSF members BCMA, BaffR and TACI are very restrictively expressed, and thus attractive therapeutic targets on myeloma cells that are involved in tumor cell survival and excessive proliferation. Antibody-based therapeutics are considered as important drugs for addressing such surface antigens and for the treatment of associated diseases. In this context, it is also possible to stimulate the antitumoral effect of the immune system by parallel activation of further TNFRSF receptors. The receptor CD40, which can induce immunostimulatory effects through the activation of antigen-presenting cells, and the receptor CD95, which can induce death receptor-mediated apoptosis of tumor cells, are suitable for this purpose. IgG-based, monoclonal antibodies aimed for CD40 or CD95 activation strongly depend on interaction with Fcγ receptors (FcγRs) to achieve a membrane-bound and thus immobilized state. Only in this way, such antibodies can induce the receptor oligomerisation of these TNFRSF members that is necessary to have a highly potent agonistic effect. However, this necessity for FcγR binding can be associated with a number of systemic, dose-limiting side effects including undesirable, up to life-threatening cytokine release. For this reason, new strategies are urgently needed that primarily ensure the FcγR-independent and strictly local, tumor-associated addressing and activity of antibody therapeutics.

The development, characterisation and evaluation of such constructs was the focus of the herein presented work. CD40- and CD95-specific antibody fusion proteins were generated, which carry BCMA-/BaffR-/TACI-binding immobilization domains C-terminally fused to the heavy chains. Such constructs were cloned, recombinantly produced and purified in IgG1, IgG1-N297A and Fab2 formats. The receptor binding of each the fusion proteins' N- and the C-terminal binding domains was investigated *in vitro* using cell-based binding studies with luciferase variants of the antibody fusion proteins. The affinities of the different antibody fusion proteins to CD40 and CD95 were comparable to those of the parent IgG1 antibodies, indicating that the anchoring domains had no negative effect on the N-terminal antigen-binding domain. Just as well, the fusion proteins' anchoring domains also maintained their high affinities to the target receptors BCMA, TACI and BaffR (low nanomolar range). The functional analysis of the different antibodies and antibody fusion proteins was performed using cellular co-culture experiments in which CD40- or CD95-expressing effector cells were incubated in combination with FcγR-expressing or BCMA-/BaffR-/TACI-positive target cells or corresponding control cells,

together with different concentrations of the antibodies and antibody fusion proteins. CD40 and CD95 activation was measured by ELISA assay detection of the IL8 that is produced in response to receptor activation and additionally, CD95-mediated apoptosis induction was assessed by cytotoxicity experiments. Here, it could be successfully confirmed that the FcγR-deficient antibody fusion proteins of the IgG1-N297A and Fab2 formats showed a significantly reduced or rather no receptor agonism in co-cultures with FcγR-positive cells. In co-cultures with BaffR-expressing cells, however, the Baff-antibody fusion proteins were able to induce a strong CD40/CD95 activation which was at least as effective as the FcγR-mediated activation achieved with the parental IgG1 antibodies. Further co-culture experiments with effector cells and transient BCMA-/TACI-/BaffR-expressing anchoring cells confirmed that CD40- and CD95-activation is potentiated highly specifically after immobilization at each of the three receptors and that this effect can be blocked by an excess of soluble ligand. To explore the potential clinical potential of the antibody fusion proteins, further experiments were performed with a series of myeloma cell lines endogenously expressing one or more of the receptors BCMA, BaffR or TACI. Again, a high degree of CD40/CD95 activation in effector cells could be demonstrated and in the case of CD95 and BCMA/TACI/BaffR double-positive myeloma cells even direct apoptosis induction of these cells could be achieved.

In summary, it can be stated that the CD40- and CD95-specific antibody fusion proteins with BCMA-/BaffR-/TACI-specific, FcγR-independent receptor agonism presented in this thesis and investigated *in vitro* allow a potent applicability especially in haematological diseases. They promise to overcome FcγR-related limitations and systemic side effects and thus represent a promising advancement to currently available antibody therapeutics as well as a supplement to present combination therapies.



## Abkürzungsverzeichnis

Tab. 1: Auflistung von in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und deren ausgeschriebener Bedeutung.

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celcius
μM/mikroM	Mikromolar
A	Aufreinigung
Ab	Antikörper ( <i>antibody</i> )
Abb.	Abbildung
ADC	<i>Antibody drug conjugate</i>
ADCC	Antikörper-abhängige, zelluläre Zytotoxizität
ADCP	Antikörper-abhängige, zelluläre Phagozytose
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APO-1	<i>Apoptosis antigen 1</i>
APRIL	<i>A Proliferation-Inducing Ligand</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Baff	<i>B cell activating factor</i>
BaffR	Baff Rezeptor
BCMA	B-cell maturation antigen
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BiKE	<i>Bispecific killer cell engager</i>
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
bsAbs	Bispezifische Antikörper
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Komplement-anhängige Zytotoxizität
CDR	<i>Complementarity-determining region</i>
CH	Konstantes Fragment der schweren Kette
CHX	Cycloheximid
ciAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>
CL	Konstantes Fragment der leichten Kette
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRD	Cysteinreiche Domänen
CT	C-Terminus
DART	<i>Dual affinity re-targeting</i>
DcRs	Köderrezeptoren ( <i>Decoy receptors</i> )
DCs	Dendritische Zellen
DD	Todesdomäne ( <i>death domain</i> )
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DLBCL	Diffuses, großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	Todesrezeptor ( <i>Death receptor</i> )
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVD	<i>Dual variable domain</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
et al.	<i>et alii/et aliae/et alia</i> , lateinisch: und andere
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas	FS7-assoziiertes Zelloberflächenantigen
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcRn	Neonataler Fc $\gamma$ -Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
Fc $\gamma$ R	Fc-gamma-Rezeptor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i>
Fv	Variables Antikörper-Fragment
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GpL	<i>Gaussia princeps</i> Luziferase
h	Stunde(n)
HC	Schwere Antikörperkette ( <i>heavy chain</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunoglobulin
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
JAK3	Januskinase 3
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KIH	<i>Knob-into-Hole</i>
l	Liter
LC	Leichte Antikörperkette ( <i>light chain</i> )
LV	Leervektor
mA	Milliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAP3K	MAP Kinase Kinase Kinase
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Multiple Myelom
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidefor
mu	Murin
MW	Mittelwert
N297A	Punktmutation der Aminosäure Asparagin an Position 297 zu Alanin
Nec-1	Necrostatin-1
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

Abkürzung	Bedeutung
NIK	NF- $\kappa$ B inducing kinase
NK	Natürliche Killer
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
nM	Nanomolar
NT	N-Terminus
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
per se	lateinisch: von selbst oder aus sich heraus
PG	Protein G
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLAD	<i>Pre-ligand-binding assembly domain</i>
RHD	Rel-Homologiedomäne
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur (circa 24 °C)
s	Sekunde(n)
sc	Einzelkette ( <i>single chain</i> )
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> )
SEC	Größenausschluss-Chromatographie ( <i>size exclusion chromatography</i> )
SLAMF7	<i>Signaling lymphocytic activation molecule family member 7</i>
TACI	<i>Transmembrane Activator and CAML-interactor</i>
TAK	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
THD	TNF-Homologiedomäne
TL1A	<i>TNF-like ligand 1A</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNC	Tenascin-C Trimerisierungsdomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TNFSF	Tumornekrosefaktor-Superfamilie
TRAAFFIAA	<i>TNFRSF receptor-activating antibody fusion proteins with Fc<math>\gamma</math>R-independent agonistic activity</i>
TRADD	<i>TNF receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>
TRAF	TNFR-assoziierter Faktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Ü	Zellkulturüberstand
VH	Variables Fragment der schweren Kette
VL	Variables Fragment der leichten Kette
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
zVAD	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon
Zytotox	Zytotoxizitätsexperiment

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: Schematischer Überblick über die relevanten TNFSF-Liganden und TNFRSF-Rezeptoren dieser Arbeit. ....</b>	<b>18</b>
<b>Abb. 2: Schematischer Überblick über den Apoptose- und den NF-<math>\kappa</math>B Signalweg. ....</b>	<b>22</b>
<b>Abb. 3: Struktur eines IgG1-Antikörpers sowie einzelner Antigen-bindender Fragmente. ....</b>	<b>25</b>
<b>Abb. 4: Ausgewählte bispezifische Antikörper-Formate.....</b>	<b>37</b>
<b>Abb. 5: Nach Analyse unterschiedlicher Verankerungsdomänen fällt die Wahl auf Antikörper-scBaff-Fusionsproteine zur weiteren Charakterisierung. ....</b>	<b>62</b>
<b>Abb. 6: Schemata der mit <i>Gussia princeps</i> Luziferase-Tag konjugierten Antikörper-Fusionsproteine und Liganden.....</b>	<b>64</b>
<b>Abb. 7: Vergleichbare Affinitäten der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine und der Ausgangs-Antikörpern bzw. Liganden an die entsprechenden Rezeptoren. ...</b>	<b>65</b>
<b>Abb. 8: Identifizierung von Tumorzelllinien, die als Konsequenz der CD40-Stimulation IL8 sekretieren bzw. nach CD95-Aktivierung IL8 ausschütten oder Zelltod induzieren.....</b>	<b>70</b>
<b>Abb. 9: Fc<math>\gamma</math>R-unabhängige, agonistische Aktivität der N297A- und Fab2-scBaff-Fusionsproteine.....</b>	<b>73</b>
<b>Abb. 10: Auftrennung der leichten und schweren Antikörper-Ketten der Antikörper und Antikörper-scBaff-Fusionsproteine mittels SDS-Gelelektrophorese vor und nach Aufreinigung. ....</b>	<b>75</b>
<b>Abb. 11: Auftrennung von Aggregaten, Verunreinigungen sowie der Antikörper- und Antikörper-Fusionsprotein-Monomere in den aufgereinigten Konstrukt-Eluaten mittels Größenausschluss-Gelfiltration (SEC-HPLC). ....</b>	<b>77</b>
<b>Abb. 12: Die CD40-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten eine starke CD40-Aktivierung nach Immobilisierung an BaffR, BCMA und TACI.....</b>	<b>80</b>
<b>Abb. 13: Die CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten eine starke CD95-Aktivierung nach Immobilisierung an BaffR, BCMA und TACI.....</b>	<b>83</b>
<b>Abb. 14: Die CD40-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten konzentrationsabhängig eine starke CD40-Aktivierung nach Immobilisierung an endogen BaffR-/ BCMA-/TACI-exprimierende MM.1S, L363 oder BJAB Tumorzelllinien.....</b>	<b>86</b>
<b>Abb. 15: Die CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten konzentrationsabhängig eine starke CD95-Aktivierung nach Immobilisierung an L363 oder BJAB Tumorzelllinien, in Ko-Kulturen mit MM.1S Zellen jedoch nur bedingt. ....</b>	<b>89</b>

---

<b>Abb. 16: Das <math>\alpha</math>CD95-N297A-scBaff-Fusionsprotein induzierte in Monokulturen von Zelllinien, die sowohl CD95- als auch BaffR-/BCMA-/TACI-positiv sind, eine starke, konzentrationsabhängig CD95-Aktivierung. ....</b>	<b>92</b>
<b>Abb. S 1: Durchflusszytometrie der Expression von CD40, CD95, BaffR, TACI und BCMA der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien.....</b>	<b>129</b>
<b>Abb. S 2: Die untersuchten HT1080 Zellen benötigen zur Untersuchung der NF-<math>\kappa</math>B-Aktivierung nach CD95-Stimulation eine Vorbehandlung mit zVAD, während sie für die Analyse der Zelltod-Induktion eine CHX-Vorinkubation benötigen. ....</b>	<b>134</b>
<b>Abb. S 3: Western Blots der produzierten Antikörper- und Antikörper-Fusionsprotein-Zellkulturüberstände. ....</b>	<b>134</b>
<b>Abb. S 4: Die <math>\alpha</math>CD40-Antikörper-Konstrukte zeigten nach Aufreinigung ein optimiertes therapeutisches Fenster, wohingegen die aufgereinigte <math>\alpha</math>CD95-N297A-scBaff-Fusion ein gesteigertes Maß an Quervernetzungs-unabhängiger Aktivität offenbarte. ....</b>	<b>135</b>
<b>Abb. S 5: Ein Großteil der BaffR-/BCMA-/TACI-positiven Tumor-Zelllinien führt nach Kultivierung mit <math>\alpha</math>CD40-/<math>\alpha</math>CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteinen zu einer Verankerungsdomänen-abhängigen Potenzierung der CD40- und/oder CD95-Aktivierung in den Effektorzellen.....</b>	<b>136</b>

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung von in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und deren ausgeschriebener Bedeutung. ....	IX
Tab. 2: Liste der Laborausstattung. ....	40
Tab. 3: Liste der Verbrauchsmaterialien. ....	40
Tab. 4: Liste der Labormaterialien. ....	41
Tab. 5: Liste der gebrauchsfertigen Chemikalien und Lösungen. ....	41
Tab. 6: Liste der Medien und Lösungen für molekularbiologische Methoden. ....	43
Tab. 7: Liste der Medien und Lösungen für die Zellkultur. ....	43
Tab. 8: Liste von Chemikalien und Lösungen für Protein-biochemische Methoden. ....	44
Tab. 9: Liste der Medien und Lösungen für <i>in vitro</i> Testungen. ....	45
Tab. 10: Liste der verwendeten kommerziellen Kits. ....	45
Tab. 11: Liste der eingesetzten Antibiotika. ....	45
Tab. 12: Liste der verwendeten Antikörper. ....	46
Tab. 13: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien. ....	47
Tab. 14: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. ....	48
Tab. 15: Auflistung der HC- und LC-Plasmid-Kombinationen, die zur Ko-Transfektion und für die Produktion der Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine eingesetzt wurden. ....	49
Tab. 16: Gendatenbank-Eintragungsnummern bzw. Patentnummern der verwendeten Antikörper-DNA-Sequenzen, der Verankerungsdomänen und des <i>Gaussia</i> <i>princeps</i> Luziferase-Tags. ....	49
Tab. 17: Übersicht der Affinitäten aller getesteten Antikörper-GpL-Fusionsproteine zu den jeweiligen Zielrezeptoren. ....	66
Tab. 18: Bewertung der mittels Durchflusszytometrie untersuchten Oberflächenexpression der Rezeptoren BaffR, BCMA, TACI, CD40 und CD95 auf verschiedenen Tumorzelllinien. ....	68
Tab. 19: Konzentrationen der in HEK293 produzierten Ausgangs-Antikörper bzw. der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine. ....	76
Tab. 20: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der $\alpha$ CD40:scBaff-AntikörperFusionsproteine in Ko-Kulturen mit mit HEK-LV, -BaffR, -BCMA, oder -TACI-transfizierten Zellen sowie der möglichen therapeutischen Fenster ( $EC_{50}$ -Shifts). ....	81

---

<b>Tab. 21: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der <math>\alpha</math>CD95-scBaff-Fusionsproteine in Ko-Kulturen mit HEK-LV, -BaffR, -BCMA, oder -TACI-transfizierten Zellen sowie der möglichen therapeutischen Fenster (<math>EC_{50}</math>-Shifts) nach Auswertung der ELISA- (A) bzw. Zytotoxizitäts-Experimente (B). .....</b>	<b>84</b>
<b>Tab. 22: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der <math>\alpha</math>CD40-scBaff-Fusionsproteine in Ko-Kulturen von HT1080-CD40 (A) bzw. U2OS (B) mit Jurkat, MM.1S, L363 oder BJAB Tumorzelllinien sowie der möglichen therapeutischen Fenster (<math>EC_{50}</math>-Shifts). .....</b>	<b>87</b>
<b>Tab. 23: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der <math>\alpha</math>CD95-scBaff-Fusionsproteine in Ko-Kulturen mit Jurkat, MM.1S, L363 oder BJAB Tumorzelllinien sowie der möglichen therapeutischen Fenster (<math>EC_{50}</math>-Shifts) nach Auswertung der ELISA- (A) bzw. Zytotoxizitäts-Experimente (B).</b>	<b>90</b>
<b>Tab. 24: Vergleich ausgewählter CD40-spezifischer Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine in der präklinischen und klinischen Entwicklung. ....</b>	<b>96</b>
<b>Tab. 25: Auflistung relevanter CD95-spezifischer Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine in der präklinischen und klinischen Entwicklung. ....</b>	<b>100</b>
<b>Tab. 26: Auflistung ausgewählter BCMA-/BaffR-spezifischer Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine in der präklinischen und klinischen Entwicklung. ....</b>	<b>106</b>
<b>Tab. S 1: Auflistung der detektierten Peakanzahl, der <i>Peak retention time</i> und dem prozentualen Anteil der jeweiligen Peaks an der Protein-Fraktion.....</b>	<b>137</b>
<b>Tab. S 2: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen sowie der möglichen therapeutischen Fenster (<math>EC_{50}</math>-Shifts) der CD40- bzw. CD95-spezifischen N297A-Varianten im Vergleich zu den N297A-scBaff-Varianten vor und nach Aufreinigung sowie mit und ohne Protein G-Quervernetzung. ....</b>	<b>137</b>

## 1 Einleitung

Der menschliche Körper ist aus verschiedenen Geweben und Zelltypen aufgebaut, die miteinander interagieren und kommunizieren, um die fehlerfreie Funktion des Organismus zu regulieren und aufrecht zu erhalten. Hierzu wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben, darunter komplexe Netzwerke aus Hormonen und Zytokinen, die als Liganden für intra- und extrazelluläre Rezeptoren dienen. Das Hauptinteresse dieser Arbeit gilt einer Familie solcher wichtiger Signalnetzwerke, die nach ihrem ersten Liganden, dem sogenannten Tumornekrosefaktor (TNF), benannt sind, der stark entzündlich Reaktionen hervorruft aber auch zytotoxisch auf Tumorzellen wirkt und Tumornekrose induziert (Carswell *et al.* 1975). Mitglieder dieser Liganden-Familie und deren Rezeptoren sind an einer Reihe von immunologischen Prozessen, aber auch an der Entstehung und Progression von verschiedenen Erkrankungen beteiligt (Aggarwal 2003), was innerhalb des ersten Teils dieser Einleitung thematisiert wird (siehe Kapitel 1.1). Antikörper-basierte Therapeutika gelten als eine wichtige Wirkstoffklasse zur Behandlung solcher Erkrankungen. Die Entwicklung, Optimierung und Evaluation von derartigen Konstrukten stellte den Fokus der hier vorgelegten Arbeit dar, sodass der Aufbau, die Funktion, Nutzung und Generierung von Antikörpern im zweiten Teil dieser Einleitung ebenfalls dargestellt wird (siehe Kapitel 1.2).

### 1.1 Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie

Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF) umfasst im Menschen 19 Liganden, die verschiedene Funktionen innerhalb der Gewebemöostase, von Entwicklungsprozessen und des Immunsystems erfüllen (Locksley *et al.* 2001, Bodmer *et al.* 2002). Durch die Interaktion mit den Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) sind diese Liganden an der Kontrolle der Zellproliferation, der Differenzierung sowie des programmierten Zelltods und des Zellüberlebens beteiligt (Smith *et al.* 1994, Heglans und Pfeffer 2005). Bislang wurden 29 Rezeptoren als Mitglieder der TNFRSF beschrieben (Aggarwal 2003, Hayden und Ghosh 2004). Etwa die Hälfte der TNFSF-Liganden kann nur an einen komplementären TNFRSF-Rezeptor binden, während andere Liganden mehrere TNFRSF-Rezeptoren binden können und umgekehrt einige TNFRSF-Rezeptoren von unterschiedlichen TNFSF-Liganden gebunden werden (Bossen *et al.* 2006). Die Rezeptoren und Liganden der TNF- und TNFR-Superfamilie, die von vielen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert werden, sind nicht nur primäre Mediatoren des Immunsystems, sondern auch eng mit bestimmten Pathologien wie Autoimmunerkrankungen oder Krebs verbunden (Wajant *et al.* 2003). Das macht ein umfassendes Verständnis der TNF-Ligand/Rezeptor-System-Interaktionen und der Prozesse, die sie regulieren, für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien wichtig.



### 1.1.1 Rezeptoren der TNFRSF

Die Rezeptoren der TNFRSF sind hauptsächlich Transmembranproteine vom Typ I, was bedeutet, dass sich der N-Terminus der Proteine extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär befindet. Innerhalb der extrazellulären Region dieser Rezeptormoleküle finden sich charakteristische, homologe Sequenzen, die sogenannten cysteinreichen Domänen (CRDs). Eine CRD, die aus etwa 40 Aminosäuren besteht, enthält typischerweise sechs Cysteinreste an definierten Positionen, die Domänen-stabilisierende Disulfidbindungen bilden (Armitage 1994, Naismith und Sprang 1998). Funktionell sind diese CRDs in einigen Fällen für die Prä-Assemblierung inaktiver, Liganden-unabhängiger Rezeptorkomplexe über die so genannte PLAD (*pre-ligand-binding assembly domain*)-Domäne wichtig (Chan *et al.* 2000), aber vor allem sind die CRDs für die Ligandenbindung notwendig (Smith *et al.* 1994, Cabal-Hierro und Lazo 2012). Bindet ein membranständiges TNFSF-Liganden-Trimer seinen entsprechenden TNFRSF-Rezeptor, formieren sich eventuell prä-assemblierte Rezeptorkomplexe um und bilden aktive Rezeptor-Signaltransduktionskomplexe (Chan 2007).

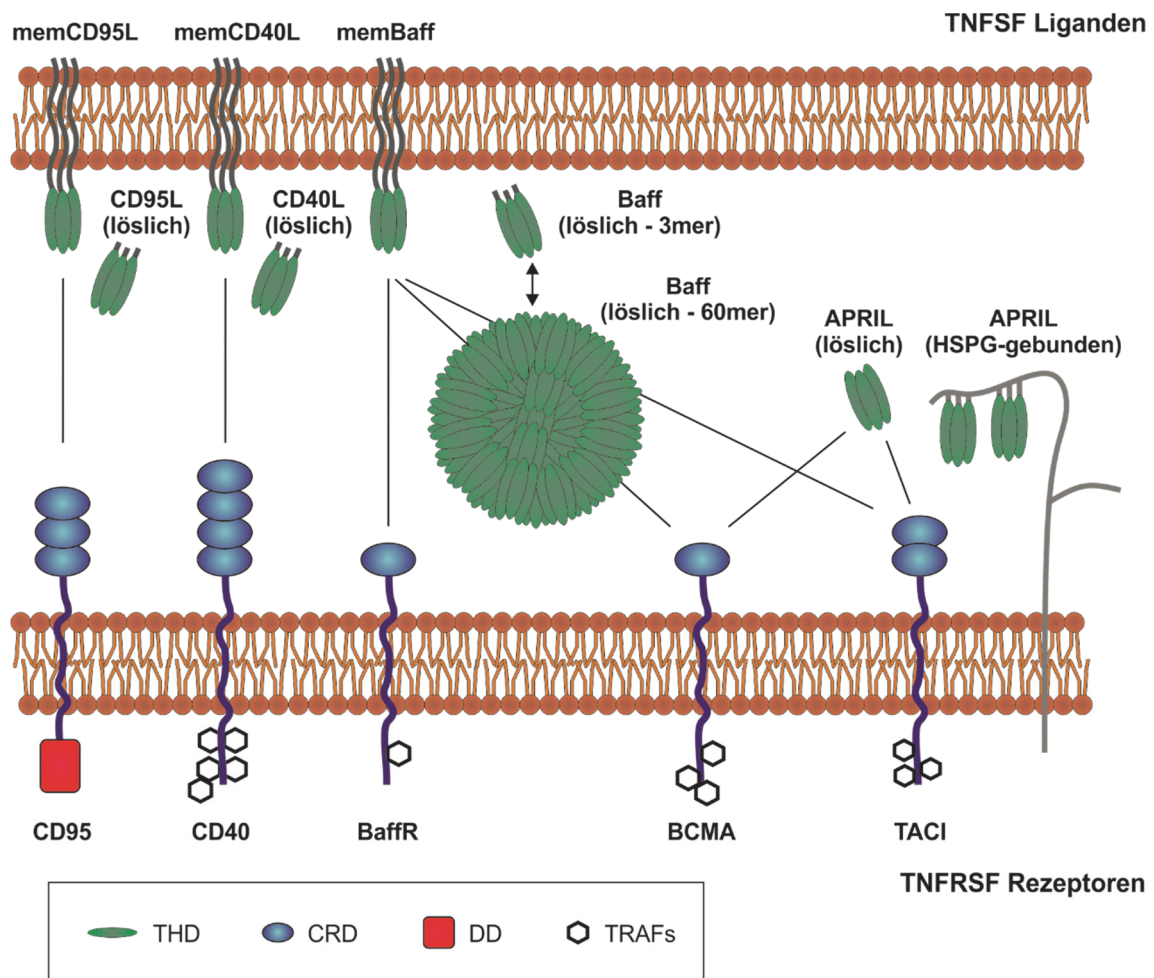
Die TNFRSF-Rezeptoren lassen sich in drei Untergruppen einteilen: Die Todesdomänen-enthaltenden Rezeptoren, kurz Todesrezeptoren (DRs), die Köderrezeptoren (DcRs) und die TRAF (TNFR-assoziierter Faktor)-bindenden Rezeptoren. Charakteristisch für die DRs ist die zytoplasmatische Todesdomäne (DD), die Adapterproteine wie FADD (Fas-assoziertes Todesdomänenprotein) und TRADD (TNFR1-assoziertes Todesdomänenprotein) rekrutiert und dann die Apoptose stimulieren kann (Nagata 1997, Tartaglia *et al.* 1993). Die DcRs sind entweder lösliche Proteine, GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-verankerte Membranproteine oder umfassen eine defekte Todesdomäne (TRAILR4) und haben daher nicht die Fähigkeit, intrazelluläre Signale zu vermitteln. Dadurch regulieren sie die Aktivität anderer TNFRSF-Rezeptoren durch Kompetition der Ligandenbindung (Chan 2007). Charakteristisch für die TRAF-bindenden Rezeptoren sind kurze Motive in ihrer zytoplasmatischen Region, die mit Proteinen der TRAF-Familie interagieren (Lavrik *et al.* 2005). Hierdurch können Rezeptoren der TNFRSF nicht-apoptotische Signale stimulieren, z.B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*)-Familie (Locksley *et al.* 2001). Die Signalwege, die für diese Arbeit von besonderem Interesse sind, werden später näher beschrieben (siehe Kapitel 1.1.4).

### 1.1.2 Liganden der TNFSF

Mit Ausnahme von LTα und TL1A haben alle TNFSF-Liganden einen intrazellulären N-Terminus, eine Transmembrandomäne (TMD) und eine extrazelluläre, C-terminale Domäne, welche die charakteristische TNF-Homologiedomäne (THD) enthält. Die hochkonservierte THD besteht aus ca. 150 Aminosäuren und zeigt eine Sequenzhomologie von 20-30 % zwischen Liganden der TNFSF (Bodmer *et al.* 2002). Funktionell ist die THD für die Trimerisierung der Liganden und die Rezeptorbindung verantwortlich (Bodmer *et al.* 2002, Fesik 2000). Darüber hinaus enthält die so genannte „stalk region“, die sich zwischen THD und TMD befindet, Erkennungssequenzen für verschiedene Arten von Metalloproteinasen, die aus den membrangebundenen Liganden lösliche Varianten freisetzen können (Smith *et al.* 1994, Bodmer *et al.* 2002). Obwohl lösliche als

auch membrangebundene Liganden als trimere Moleküle organisiert sind und beide Formen in der Lage sind, ihre entsprechenden Rezeptoren zu binden, unterscheiden sie sich oft in ihrer Bioaktivität (Wajant *et al.* 2001). Lösliche, trimere Liganden, die in der Lage sind ihren entsprechenden Rezeptor zu binden, ohne ihn aktivieren zu können, können jedoch in ihrem rezeptoraktivierenden Potenzial durch sekundäre Oligomerisierung oder Immobilisierung an Zell- oder zellähnlichen Oberflächen stark verbessert werden (Wyzgol *et al.* 2009). Dies kann unter anderem für therapeutische Anwendungen genutzt werden (Muller *et al.* 2008, Roos *et al.* 2010).

### 1.1.3 TNFSF Ligand/Rezeptor-Interaktionen mit Relevanz für diese Arbeit



**Abb. 1: Schematischer Überblick über die relevanten TNFSF-Liganden und TNFRSF-Rezeptoren dieser Arbeit.** Die trimersierten, transmembranen (mem) sowie löslichen TNFSF-Liganden (oberer Teil) und ihre TNFRSF-Rezeptoren (unterer Teil) sind schematisch dargestellt. Die extrazellulären Teile der TNFSF-Liganden enthalten THDs (TNF-Homologiedomänen), die die Bindung an die CRDs (cysteinreiche Domänen) der TNFRSF-Rezeptoren ermöglichen. Die TNFRSF-Rezeptoren haben eine variable Anzahl von CRDs. CD95 enthält eine intrazelluläre Todesdomäne (DD) und zählt daher zur Gruppe der Todesrezeptoren, während die anderen Rezeptoren CD40, BaffR, BCMA und TACI Nicht-Todesrezeptoren sind und die Signaltransduktion durch die Bindung verschiedener TRAFs (TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren) an entsprechende TRAF-Bindedomänen vermitteln. Die Liganden Baff und APRIL können oligomerisiert (Baff 60mer) oder Heparansulfat-Proteoglycan-gebunden (HSPG-APRIL) vorliegen.

### 1.1.3.1 CD40 und der Ligand CD154

CD40, ein Transmembranrezeptor vom Typ I (Armitage 1994), ist in der Plasmamembran als prä-assemblierter Rezeptorkomplex vorhanden und besitzt vier CRDs (Bodmer *et al.* 2002) (Abb. 1). Nach Bindung von CD40L (CD154), das u.a. auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Armitage *et al.* 1992, van Kooten und Banchereau 2000), wird der Rezeptorkomplex durch Reorganisation aktiviert und vermittelt verschiedene intrazelluläre Signalwege (Rothe *et al.* 1995, Pullen *et al.* 1999). Hierfür besitzt die intrazelluläre Domäne von CD40 Bindungsstellen für die zytoplasmatischen Adaptermoleküle Januskinase 3 (JAK3) und für die TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren (TRAF) 1, 2, 3 und 6 (Van Kooten und Banchereau 1996). Die Interaktion von CD40 mit diesen Proteinen führt unter anderem zur Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweges, der für diese Arbeit von großer Bedeutung ist und die Transkription von immunmodulatorischen und anti-apoptotischen Molekülen reguliert (siehe Kapitel 1.1.4.1).

Die Interaktion zwischen CD40L und seinem Rezeptor CD40 stellt ein immunstimulierendes System von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) dar. So werden CD40-exprimierende dendritische Zellen (DCs), die besonders effizient Antigene prozessieren und präsentieren können, durch CD40L-Stimulation aktiviert und zur Reifung angeregt. Dadurch wird zum einen die Migration in T-Zell-reiche sekundäre, lymphatische Organe, wie die Lymphknoten, sowie die Präsentation von Antigen-basierten Peptiden auf MHC II-Komplexen gegenüber nativen oder Antigen-spezifischen T-Zellen initiiert (Banchereau *et al.* 1994). Zum anderen wird die gesteigerte Produktion von anti-tumoralen Zytokinen wie IL8, TNF $\alpha$  und IL12 induziert, wodurch die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen verstärkt wird (Lee *et al.* 2014). Daraufhin sind aktivierte, zytotoxische T-Zellen in der Lage in unterschiedliche Gewebe zu migrieren und den Zelltod von Antigen-exprimierenden Zellen auszulösen (Weninger *et al.* 2002). Darüber hinaus können Antigen-präsentierende DCs und aktivierte T-Zellen die Proliferation und Differenzierung von rekrutierten B-Zellen induzieren, wodurch sich Keimzentren bilden, welche die klonale Expansion von Antigen-selektierten B-Zellen und die Differenzierung in Gedächtnis-B-Zellen oder in Antikörper-sekretierende Effektor-B-Zellen massiv verstärken (Banchereau *et al.* 1994). CD40 wird außerdem auf einer Reihe weiterer Zelltypen, wie Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten sowie Epithel- und Endothelzellen exprimiert (D. Y. Ma und Clark 2009, Grewal und Flavell 1998). Darüber hinaus wird CD40 auf fast 100 % der malignen B-Zellen und ca. 75 % der epithelialen und soliden Tumore exprimiert (Gordon 1995, Vonderheide 2007), weshalb vorgenannter Rezeptor im Rahmen dieser Arbeit aufgrund seiner potenziellen Auswirkungen auf die Pathogenese und die Immuntherapie bei unterschiedlichen Tumoren von besonderem Interesse ist.

### 1.1.3.2 Das CD95/CD95L-System

CD95, auch FS7-assoziiertes Zelloberflächenantigen (Fas) oder APO-1 genannt, ist ein Mitglied der Todesrezeptoren der TNFRSF. Die Expression von CD95 wurde auf Fibroblasten, Zellen des hämatopoetischen Systems und Epithelzellen gezeigt (Stahnke *et al.* 1998). CD95 ist ein

Transmembranprotein vom Typ I und weist in seiner extrazellulären Domäne drei CRDs auf (Itoh *et al.* 1991), womit es mit seinem homotrimeren Liganden CD95L interagiert (Abb. 1). CD95L existiert entweder als membrangebundene Variante oder nach proteolytischer Spaltung auch als lösliche Form (Kayagaki *et al.* 1995). Es wird von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen produziert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von T- und B-Zellen (Krammer 2000).

Der monomere Rezeptor CD95 kann durch PLAD-PLAD-Interaktionen als voraggregiertes Rezeptordimer oder -trimer auf der Zelloberfläche vorliegen (Papoff *et al.* 1999). Durch die CD95/CD95L-Interaktion formen sich zunächst stabile trimere Rezeptor-Liganden-Komplexe, dann bilden sich supramolekulare Cluster durch sekundäre Aggregation, an denen sich der todesinduzierende Signalkomplex (DISC) bilden kann (Kischkel *et al.* 1995). Dies führt zur Aktivierung des Caspase-8-vermittelten, apoptotischen Signalwegs (siehe Kapitel 1.1.4.2). Die Induktion des programmierten Zelltods ist nicht die einzige zelluläre Reaktion auf die Aktivierung von CD95. CD95L und CD95 können auch nicht-apoptotische, entzündungsfördernde Signalwege wie den NF- $\kappa$ B-Signalweg induzieren und sind daher auch an physiologischen Prozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt (Wajant *et al.* 2003, Park *et al.* 2005).

### 1.1.3.3 Baffr, BCMA und TACI sowie deren Liganden Baff und APRIL

Die beiden TNFSF-Liganden Baff und APRIL werden als Typ II Transmembranprotein in erster Linie von myeloiden Zellen exprimiert, an einer Furin-Protease-Domäne prozessiert und dann somit als lösliche Proteine freigesetzt (Abb. 1). Während Baff zwar ebenfalls membranös gebunden vorliegen kann, wird APRIL direkt im Golgi-Apparat prozessiert und de facto ausschließlich in der löslichen Form sekretiert (Dostert *et al.* 2019). Wie die meisten anderen TNFSF-Mitglieder auch aktivieren Baff und APRIL intrazelluläre Signalwege in Form von Homotrimeren. Allerdings weisen beide Liganden auch alternative Bindungsformate auf. So wurde für Baff die Formierung von Virus-ähnlichen 60-mer Clustern bestehend aus 20 zusammengelagerten Homotrimeren beschrieben (Cachero *et al.* 2006) und für APRIL die sekundäre Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) auf der Plasmamembran, die zu einer lokalen Oligomerisierung und Konzentrationssteigerung auf der Zelloberfläche führt (Kimberley *et al.* 2009)

Beide Liganden binden mit unterschiedlicher Affinität an die TNFRSF Rezeptoren BCMA (*B cell maturation antigen*) und TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*), Baff bindet darüberhinaus zusätzlich an den Baffr (Abb. 1). Sowohl trimeres Baff als auch 60-meres Baff induzieren Signaltransduktion über Baffr, jedoch werden TACI und BCMA lediglich über die hoch-oligomerisierte oder die Membran-gebundene Form aktiviert. Ähnliche Beobachtungen gelten für APRIL, das ebenfalls vernetzt werden muss, um TACI zu aktivieren (Bossen *et al.* 2008). Die Interaktionen dieser TNFSF:TNFRSF-Mitglieder kontrollieren spezialisierte Aufgaben in unterschiedlichen Stadien der B-Zell-Reifung sowie der B-Zell-Homöostase. So wird Baffr noch nicht auf B-Zell-Vorläufer im Knochenmark exprimiert, sondern auf erst unreifen B-Zellen hochreguliert, nachdem sie sich im transitionellen Stadium (T1) befinden und einen funktionellen B-Zell-Rezeptor aufweisen. An dieser Stelle ist die Aktivierung von Baffr

entscheidend für das Überleben und die Reifung der folliculären B-Zellen, Marginalzonen-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen (Rickert *et al.* 2011). TACI dagegen wird erst auf reifen B-Zellen (Marginalzonen-B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen) und Plasmazellen exprimiert und ist beteiligt an T-Zell-unabhängigen Reaktionen, der Förderung des Immunglobulin-Klassenwechsels aber auch in inhibitorischer Funktion an der Negativregulierung von B-Zell-Zellzahlen (Dostert *et al.* 2019). BCMA wird schließlich vorrangig auf reifen B-Zellen und Plasmazellen exprimiert, wo es eine wichtige Rolle im Überleben und der Antikörperproduktion von langlebigen Plasmazellen im Knochenmark spielt (Rickert *et al.* 2011).

Die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch die genannten Rezeptoren wird über TRAF-Moleküle vermittelt und resultiert u.a. in der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege (siehe Kapitel 1.1.4.1), die für die B-Zell-Proliferation und -Differenzierung sowie das Überleben dieser Zellen essenziell sind. Verschiedene Mitglieder der TRAF-Familie, darunter TRAF2 und 3, scheinen mit dem zytosolischen Teil von BCMA und TACI zu interagieren und die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Pfades und von MAP-Kinasen zu regulieren. Die BaffR-Aktivierung vermittelt dagegen über TRAF2/3 und NIK hauptsächlich die nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Die Aktivierung von BaffR und TACI kann über PI3K ebenfalls die Aktivierung des AKT-Signalwegs induzieren (Dostert *et al.* 2019).

#### **1.1.4 TNFRSF-Rezeptor vermittelte Signalwege**

##### **1.1.4.1 Der klassische und der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg**

Die TNFRSF-Rezeptor-vermittelte Initiierung von proinflammatorischen Immunmechanismen basiert im Wesentlichen auf der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B Familie (Luo *et al.* 2005). NF- $\kappa$ B-Moleküle sind dimere Transkriptionsfaktoren, die sich aus Mitgliedern der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie zusammensetzen, die aus NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), cRel, RelA (p65) und RelB besteht. Charakteristisch für diese fünf NF- $\kappa$ B/Rel-Familienmitglieder ist die konservierte Rel-Homologiedomäne (RHD), welche die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die Interaktion mit den Inhibitoren der I $\kappa$ B (Inhibitor von kappa B)-Familie vermittelt und darüber hinaus die Kernlokalisierungssequenz (NLS) der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren enthält (Verma *et al.* 1995). Das NF- $\kappa$ B-System ist in der Lage, verschiedene anti-apoptotische Faktoren zu regulieren und führt zur Transkription von proinflammatorischen Genen, wenn es durch Zytokine (z.B. TNFSF-Liganden), Bakterienprodukte oder Zellstress (UV, *Reactive Oxygen Species* (ROS)) stimuliert wird (Baud und Karin 2001). Die NF- $\kappa$ B-Dimere können über zwei Signalwege aktiviert werden, den klassischen (kanonischen) und den alternativen (nicht-kanonischen) Weg (Abb. 2). In unstimulierten Zellen maskiert das Zusammenspiel von I $\kappa$ B-Proteinen und den dimeren NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren die NLS, so dass diese Komplexe im Zytosol verbleiben. Die I $\kappa$ B-Proteine können von der 26S-Untereinheit des Proteasoms proteolytisch verdaut werden, zum Beispiel als Reaktion auf die Aktivierung von TNFRSF-Mitgliedern. Im klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg gibt es zunächst eine TRAF-vermittelte Aktivierung bestimmter Mitglieder der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase-Kinasen (MAP3K) wie TAK1, mitogen-aktivierte

Proteinkinase/ERK-Kinase-Kinase 1 (MEKK1), MEKK2, MEKK3 und darauf folgend die Stimulation des I $\kappa$ B-Kinase (IKK) Komplexes (Karin 1999). Der aktivierte IKK-Komplex vermittelt die Phosphorylierung von zwei konservierten Serinresten in der N-terminalen Domäne des I $\kappa$ Bs, so dass die I $\kappa$ B-Proteine K48-polyubiquitinyliert werden und durch das Proteasom schnell abgebaut werden können (Palombella *et al.* 1994, Verma *et al.* 1995). Hierdurch wird die NLS zugänglich und nach der Translokation in den Kern induzieren die NF- $\kappa$ B-Dimere die Expression verschiedener Zielgene (z.B. I $\kappa$ B $\alpha$ , A20, TRAF1, cIAP2, IL8, TNF) (Verma *et al.* 1995, F. E. Chen und Ghosh 1999).

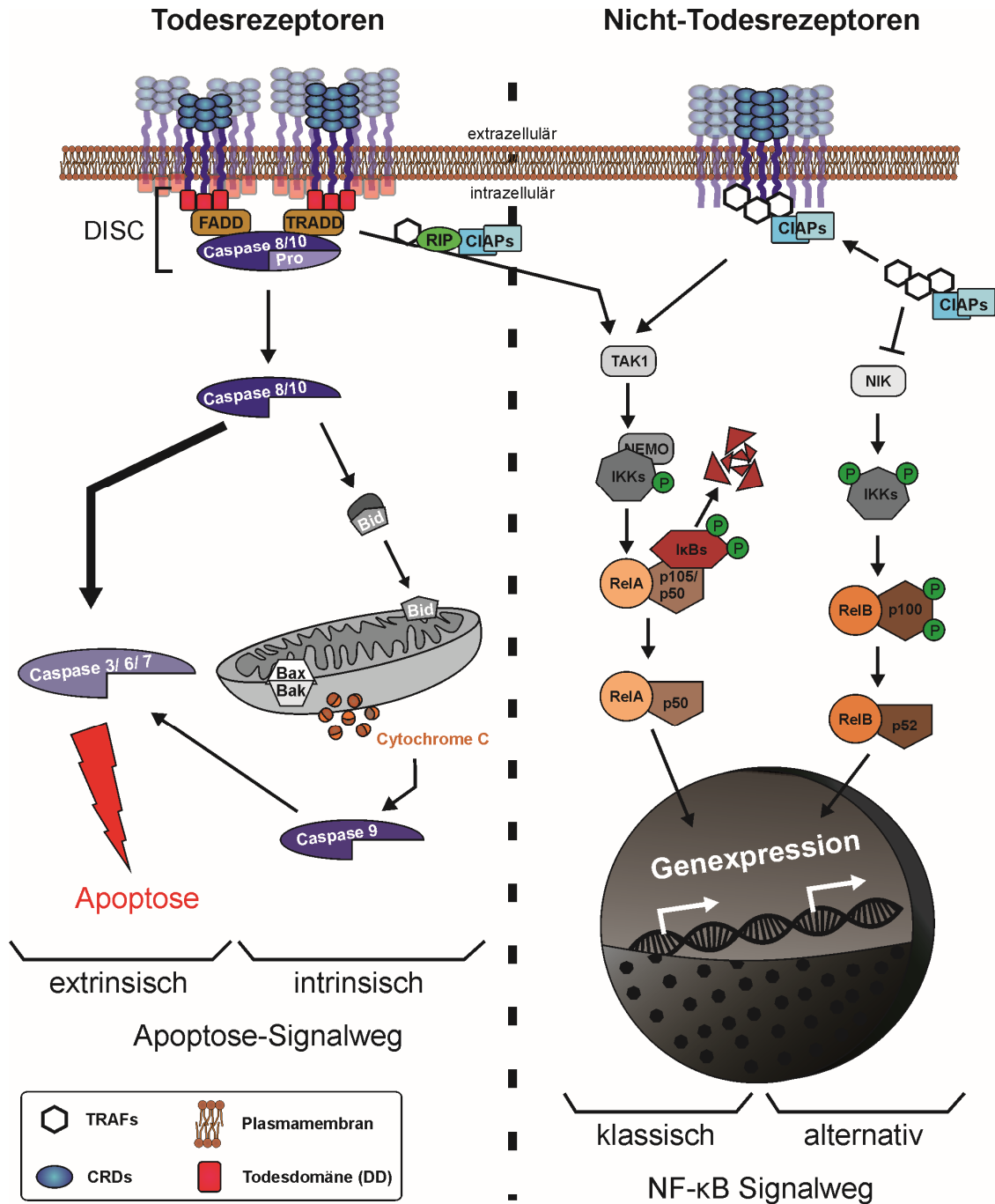


Abb. 2: Schematischer Überblick über den Apoptose- und den NF- $\kappa$ B Signalweg.

Links: Der extrinsische Todesignalweg wird durch Liganden-/Rezeptorbindung, Rezeptortrimerisierung und Multimerisierung aktiviert. Im Folgenden werden FADD und/oder TRADD an die DDs der Rezeptoren rekrutiert. Nach Bindung der Pro-Caspasen 8/10 und bilden diese den DISC. Dabei wird die Caspase 8/10 aktiviert, welche wiederum die Caspasen 3/6/7 aktiviert und die Apoptose auslöst. Das intrinsische Todessignal kann auch durch Caspase 8/10-vermittelte Bid-Aktivierung eingeleitet werden. Dabei wird die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium durch Bax/Bak stimuliert, was zu Caspase 9- und nachfolgender Caspase 3/6/7-Aktivierung führt. Rechts: Todesrezeptoren können auch kanonische NF- $\kappa$ B Signaltransduktion initiieren, wenn TRADD/ FADD Komplexe mit TRAF, RIP und cIAPs interagieren und so die IKK-vermittelte I $\kappa$ B-Depletion induzieren. Dadurch können die NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder RelA und p50 in den Kern translozieren und die Genexpression einleiten. Die nicht-kanonische NF- $\kappa$ B- Signaltransduktion kann durch Mitglieder der Nicht-Todesrezeptoren durch die intrazelluläre Bindung von TRAFs und cIAPs stimuliert werden, was zu einer IKK1-Aktivierung und p100-Prozessierung führt. So können Heterodimere der NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder bestehend aus RelB und p52 in den Kern translozieren und die Genexpression einleiten bzw. inhibieren.

Der alternative NF- $\kappa$ B-Pfad kann u.a. durch BAFFR und CD40 induziert werden. Ohne Rezeptoraktivierung liegen TRAF2-cIAP1- und TRAF2-cIAP2-Komplexe löslich im Zytosol vor und inhibieren die MAP3-Kinase NIK. Durch die Rezeptoraktivierung werden die TRAF2-cIAP1/2-Komplexe an die zytosolische Rezeptordomäne rekrutiert, sodass sie nicht länger für die Inhibition von NIK im Zytoplasma zur Verfügung stehen. Dadurch ist NIK in der Lage IKK $\alpha$  zu aktivieren, das dann NF- $\kappa$ B2/p100 phosphoryliert. Dies ermöglicht die Proteolyse von inhibitorischen Ankyrin-Repeats, sodass sich p52-haltige Dimere, z.B. in Kombination mit RelB zusammenlagern, in den Kern translozieren und dort die Genexpression von Zielgenen induzieren bzw. inhibieren (Scheidereit 2006, Hayden und Ghosh 2008).

#### 1.1.4.2 Die Todesrezeptor-induzierten Signalwege

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist definiert als die kontrollierte Eliminierung von Zellen, ohne eine entzündliche Reaktion hervorzurufen. Während dieses Prozesses schrumpfen die Zellen, wobei die Integrität der Plasmamembran der Zellen erhalten bleibt (Hengartner 2000). Im Rahmen der Apoptose werden Caspasen aktiviert, Cytochrom C wird aus den Mitochondrien freigesetzt und die DNA fragmentiert (Wyllie *et al.* 1984, Kluck *et al.* 1997). Daraufhin werden apoptotische Vesikel gebildet und von Makrophagen aufgenommen (Hengartner 2000). Innerhalb dieses Prozesses lassen sich der extrinsische und der intrinsische Apoptose-Signalweg unterscheiden (Abb. 2): Während extrazelluläre Signale, z.B. durch TNFRSF-Todesrezeptoren, den extrinsischen Weg induzieren, wird der intrinsische Weg der Apoptose durch intrazelluläre Faktoren wie z.B. DNA-Schäden ausgelöst, was zur Cytochrom-C-Freisetzung aus dem Mitochondrium führt (Hongmei 2012).

Die Todesrezeptoren der TNRSF können den extrinsischen Weg der Apoptose durch konservierte Teile ihrer zytoplasmatischen Domäne, die sogenannten Todesdomänen (DD), stimulieren (Itoh und Nagata 1993, Tartaglia *et al.* 1993). Die Induktion der Apoptose erfolgt durch die Rekrutierung von Adapterproteinen und pro-apoptotischen Proteasen: Sobald ein TNFSF-Ligand an seinen entsprechenden TNFRSF-Rezeptor bindet, werden die Untereinheiten des Rezeptors neu organisiert, wobei die Adapterproteine FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne) oder TRADD (TNFR1-assoziiertes Todesdomänenprotein) an die DD rekrutiert werden. Anschließend werden die Initiatoren Caspasen 8 und 10 rekrutiert, die die Bildung eines todesinduzierenden Signalkomplexes (DISC) einleiten (Kischkel *et al.* 1995, Ashkenazi und Dixit

1998). Im Hinblick auf das so genannte "induzierte Annäherungsmodell" ermöglicht die Bildung des DISC die räumliche Nähe von zwei Molekülen der Initiator-Caspase pro-Caspase-8, die dimerisieren und aktiv werden (Salvesen und Dixit 1999). Nach zusätzlicher autoproteolytischer Prozessierung zu großen und kleinen Untereinheiten werden stabile Caspase-8-Heterotetramere in das Cytosol freigesetzt (Boatright und Salvesen 2003). Infolgedessen aktivieren diese Caspase-8-Heterotetramere direkt Effektor-Caspasen wie Caspase-3, -6 und -7 (Stennicke *et al.* 1998), die in der Folge diverse Zellsubstrate spalten. Caspase-3 und Caspase-7 zum Beispiel spalten das Enzym PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase 1), das an DNA-Reparaturmechanismen und der Transkription beteiligt ist. Darüber hinaus führt die Spaltung von Lamininen und Zytokeratinen zur Destabilisierung der Plasmamembran, was letztlich zum eigentlichen Zelltod führt (Walczak *et al.* 1999). In einigen Situationen können extrinsische Todessignale mit dem intrinsischen Apoptoseweg ineinander übergehen, z.B. wenn das pro-apoptotische Protein Bid durch Caspase-8-vermittelte Proteolyse aktiviert wird. Das daraus resultierende truncierte BID (tBID) kann die Permeabilisierung der Mitochondrien und die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom-C in das Zytoplasma induzieren. Cytochrom-C initiiert daraufhin die Bildung des als Apoptosom bezeichneten Multi-Protein-Komplexes, der mittels Caspase-9 die Aktivierung von Effektorcaspasen und somit ebenfalls die Apoptose einleitet (Taylor *et al.* 2008). Die Aktivierung von Caspase-8 kann durch zelluläre Proteine wie FLICE (*FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*) gehemmt werden (Wajant *et al.* 2003), die eine hohe Sequenzhomologie zu den Initiator-Caspasen haben und durch Co-Rekrutierung zum DISC die Bindung und/oder die Prozessierung von Caspase-8 hemmen können (Thome *et al.* 1997, Krueger *et al.* 2001).

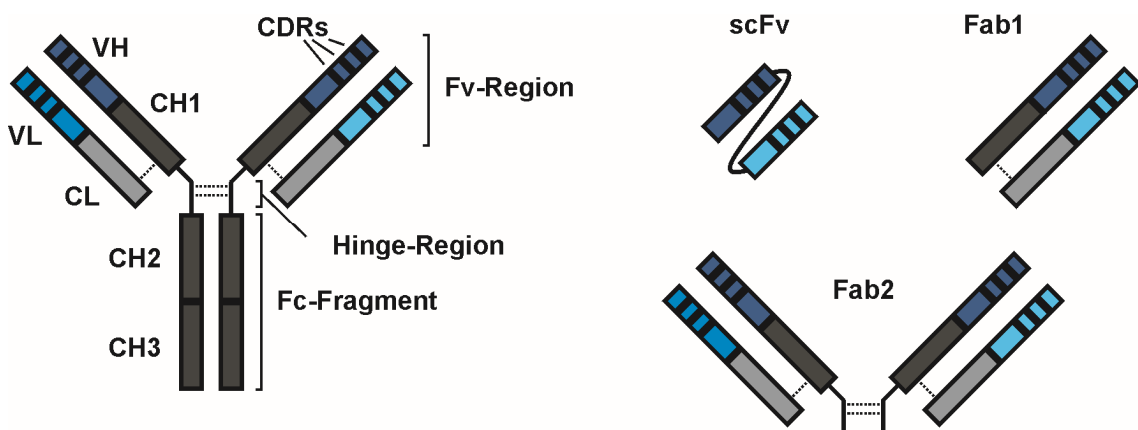
Die Aktivierung von Todesrezeptoren kann nicht nur zu einer Induktion des apoptotischen Signalwegs führen. Zytokine wie TRAIL, CD95L oder TNF sind auch in der Lage, nicht-apoptotische, entzündliche Pfade zu initiieren, zum Beispiel durch die Aktivierung von JNK, p38MAPK oder NF- $\kappa$ B (Wajant *et al.* 2003, Park *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Induktion der Apoptose durch hemmende Rückkopplungsmechanismen miteinander verbunden sind: Bei der Todesrezeptor-assoziierten NF- $\kappa$ B-Stimulation spielen beispielsweise RIP (*receptor interacting protein*), TRADD/FADD und Caspase-8 eine wichtige Rolle, während RIP nicht für die Aktivierung der Caspase-8 verwendet wird (Hu *et al.* 2000, Kreuz *et al.* 2004). Daher hemmt der NF- $\kappa$ B-Signalweg das apoptotische Programm, indem er antiapoptotische Proteine wie c-FLIP oder cIAP hochreguliert (Kreuz *et al.* 2001, Van Antwerp *et al.* 1998). Andererseits wird NF- $\kappa$ B durch die Spaltung von RIP, I $\kappa$ B $\alpha$  und anderen Molekülen durch aktivierte Caspasen gehemmt.



## 1.2 Antikörper und therapeutische Einsatzmöglichkeiten bei TNFRSF-assoziierten Erkrankungen

### 1.2.1 Rolle und Funktion von Antikörpern im Immunsystem

Antikörper sind Proteine, die im Serum sowie in anderen Körper- und Schleimhautflüssigkeiten von Vertebraten vorkommen, spezifisch an Antigene binden und diese für das Immunsystem markieren können. Ein Antigen ist ein Protein oder Polysaccharid, das an entsprechende Rezeptoren auf Lymphozyten oder an Antikörper bindet (Heinrich *et al.* 2014). Das Antigen kann von körpereigenen Proteinen stammen oder fremden Ursprungs sein, weshalb das Immunsystem sorgfältig zwischen harmlosen und pathogenen Substanzen unterscheiden muss. Im Allgemeinen werden extrazelluläre Antigene von APCs wie DCs, Makrophagen oder bestimmten B-Zellen vorrangig durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, unspezifische Makropinozytose oder Phagozytose aufgenommen, prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert (Janeway *et al.* 2001). Nach der Bindung dieser Peptid:MHC-Komplexe durch T-Helferzellen und anschließender Zytokinsekretion werden Antikörper-sezernierende B-Zellen und andere Zellen aktiviert. Außerdem können B-Zellen durch unverarbeitete, native Antigene aktiviert werden. Auf diese Weise können Antikörper produziert werden, die spezifisch an das jeweilige Antigen binden (Elgert 2009). Dabei erkennen die Antikörper nur einen bestimmten Teil des Antigens, das sogenannte Epitop. Der Körper ist in der Lage, sehr große Mengen an Antigen-spezifischen Antikörpern zu produzieren, die strukturell ähnlich und doch einzigartig sind. Über einen Prozess namens V(D)J-Rekombination und Affinitätsreifung ist ihre Aminosäuresequenz sehr variabel, sodass theoretisch Antikörper gegen jede beliebige Peptidsequenz generiert werden können (Janeway *et al.* 2001).



**Abb. 3: Struktur eines IgG1-Antikörpers sowie einzelner Antigen-bindender Fragmente.**

Links: Schema des molekularen Aufbaus eines kompletten IgGs: Der Antikörper besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten die miteinander durch Disulfidbrücken (gepunktete Linien) verknüpft sind. Die variablen Regionen (Fv; *fragment variable*) beinhalten die Antigen-Bindestellen (CDRs; *complementarity determining regions*). Die Fc-Region, bestehend aus den konstanten Abschnitten CH2 und CH3 beider Ketten, ist für die Effektorfunktionen verantwortlich. Rechts: Auf den variablen Regionen basierende Antigen-bindende Fragmente: I) Künstlich erzeugtes scFv-Fragment bestehend aus den Linker-verbundenen variablen Regionen. II) Fab1-Fragment nach Papain-Verdau. III) Fab2-Fragment nach Pepsin-Verdau.

Im Allgemeinen sind Antikörper Y-förmige Moleküle (Abb. 3), die aus zwei schweren (ca. 50 kDa) und zwei leichten (ca. 25 kDa) Ketten bestehen, die durch Disulfidbindungen und nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden sind (Elgert 2009). Enzymatischer Verdau mit Papain produziert ein Fc-Fragment und zwei Fab (*fragment antigen binding*)-Fragmente, während ein Verdau mit Pepsin ein großes Fab2-Fragment erzeugt und den Rest der schweren Ketten abbaut (Abb. 3). Die Fc-Region (kristallisierbares Fragment) eines Antikörpers bindet an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren und Komplementproteine, wodurch verschiedene physiologische Effekte vermittelt werden und das Immunsystem aktiviert wird (Heinrich *et al.* 2014). Die Fab- oder Fab2-Regionen beinhalten jeweils die Bereiche für die Antigenbindung und bestehen aus konstanten (C) und variablen (V)-Bereichen. Die variablen Fv-Regionen bilden dabei die Spitzen der Fab-Regionen und weisen eine erhebliche Varietät der Sequenz von Protein zu Protein auf. Sie bilden eine Tasche, die auf der Oberfläche der Antigenbindungsstelle freiliegt, wobei die Ketten einzigartig geformt sind, um ein bestimmtes Antigenepitop zu binden (Heinrich *et al.* 2014). Innerhalb der Fv-Region jeder Kette gibt es drei hypervariable Regionen oder Komplementarität-bestimmende Regionen (CDRs), genannt CDR1, CDR2, CDR3. Ein einziges Antikörpermolekül bildet insgesamt zwei Antigenbindestellen aus zwölf CDRs, wobei jeweils sechs CDRs komplementär zu den anderen sind (Janeway *et al.* 2001). Auf diese Weise ist ein natürlich produzierter Antikörper in der Lage, zwei identische Antigene bivalent zu binden. Besitzen mehrere Antikörper dieselbe Aminosäuresequenz der variablen CDRs und haben somit die identische Antigenpezifität, so teilen sie den gemeinsamen Idiotyp.

Der Mensch exprimiert fünf Gruppen von Antikörpern, die als Immunglobulin-(Ig) oder Antikörper-Isotypen bezeichnet werden: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Jeder Isotyp unterscheidet sich in seiner Ladung, Größe und Löslichkeit sowie in den serologischen Eigenschaften (Janeway *et al.* 2001, Elgert 2009). Da der Hauptteil dieser Arbeit die Entwicklung von Antikörpern beschreibt, welche sich von IgG Isotypen ableiten, werden deren Eigenschaften im Folgenden erläutert.

### **1.2.2 Immunologische Eigenschaften von IgG Antikörpern**

Immunglobulin G Antikörper (IgG; ~150 kDa) sind die im Blut vorherrschende Antikörper-Hauptklasse und, wie oben definiert, in der typischen Y-Form von Antikörpermonomeren angeordnet. Der humane IgG Isotyp wird in vier Unterklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) eingeteilt (Elgert 2009). Die konstanten Domänen dieser vier Unterklassen weisen dabei eine Identität von 90-95 % auf. Das vorrangige Unterscheidungsmerkmal ist die Anzahl der Disulfidbrücken, die im jeweiligen Scharnierbereich, der so genannten „Hinge-Region“, die beiden schweren Ketten miteinander verbinden. IgG Antikörper werden von Plasma-B-Zellen produziert sowie sekretiert und unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Komplement zu aktivieren, an phagozytische Zellen zu binden oder die Plazenta zu überqueren (Heinrich *et al.* 2014). Mit einem Anteil von 75 % im menschlichen Serum sind IgGs der am häufigsten vorkommende Antikörper-Isotyp, der rasch aus dem Blutkreislauf in extravaskuläre Flüssigkeiten und verschiedene Gewebe diffundieren

kann. Die Halbwertszeit beträgt etwa 25 Tage, so dass sich IgG-Antikörper gut für die passive Immunisierung eignen (Elgert 2009).

Vorwiegend besteht die Funktion von IgGs darin, verschiedene Oberflächenantigene pathogener Zellen zu binden und sie für die verbesserte Aufnahme durch professionelle Phagozyten zu markieren, einen Mechanismus namens Opsonophagozytose (Janeway *et al.* 2001). Für diesen wichtigen Abwehrmechanismus ist die Aktivierung von zusätzlichen Effektorzellen essenziell, die mittels Fc-Rezeptoren spezifisch an die Fc-Region von Antikörpern binden und somit die humorale mit der zellulären Immunantwort verknüpft. Aktuell sind 9 unterschiedliche IgG-bindende Rezeptorvarianten, so genannte Fc-gamma-Rezeptoren (FcγRs), in der Literatur beschrieben, wobei 7 extrazellulär auf der Oberfläche von unterschiedlichen Immunzellen, insbesondere APCs, exprimiert werden: CD64 (FcγRI), CD32A (FcγRIIA), CD32B (FcγRIIB), CD32C (FcγRIIC), CD16A (FcγRIIIA), CD16B (FcγRIIIB) und CD307 (FcRL5) (Gillis *et al.* 2014). Knapp zusammengefasst können diese FcγRs anhand ihrer Affinität zur Fc-Domäne und der Rezeptorfunktionalität unterteilt werden. Der hoch affin im nM-Konzentrationsbereich bindende FcγR CD64 ist zusammen mit FcRn als einziger Rezeptor in der Lage, monomere IgG-Antikörper zu binden, während die anderen FcγRs lediglich mit niedrigerer Affinität (μM-Konzentrationsbereich) mit aggregierten Antikörpern, Immunkomplexen oder opsonierten Partikeln bzw. Zellen interagieren können (Nimmerjahn und Ravetch 2006). Die Hauptvertreter der FcγRs (CD64, CD32A, CD16A) sind aktivierende Rezeptoren, die eine cytoplasmatische ITAM (*immunereceptor tyrosine-based activation motif*)-Domäne aufweisen und darüber stimulatorische Signaltransduktionen in APCs initiieren. Durch die gleichzeitige, selektive Expression des inhibitorischen Fcγ-Rezeptors CD32B, der im Gegensatz eine so genannte ITIM (*immunereceptor tyrosine-based inhibition motif*)-Domäne beinhaltet, kann den Signalkaskaden der aktivierenden Rezeptoren entgegen gewirkt werden. Auf diese Weise ist die gepaarte Expression von aktivierenden und hemmenden FcγRs auf derselben Zelle der Schlüssel für geregelte Aktivierungsschwellen und die Erzeugung einer ausgewogenen Immunantwort (Nimmerjahn und Ravetch 2007, Gillis *et al.* 2014). Darüber hinaus bestimmt neben den Expressionsleveln ebenfalls die Verfügbarkeit der unterschiedlichen FcγRs in den jeweiligen Körperflüssigkeiten und Geweben den IgG-induzierten Immunmechanismus. Die wichtigsten akzessorischen Effektorzellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, natürliche Killer(NK)-Zellen und Granulozyten, können unter den gegebenen Bedingungen eine von zwei Haupteffektor-Mechanismen auslösen: I) Durch Bindung des IgG-Antikörpers an ein Antigen und die folgende, sekundäre Fc:FcγR-Bindung, können die Antigen-exprimierenden Zellen von den Effektorzellen internalisiert, abgebaut und somit neutralisiert werden, was als Antikörper-abhängige, zelluläre Phagozytose (ADCP) bezeichnet wird. Dieser Prozess der Phagozytose kann zunächst von sämtlichen FcγRs, die extrazellulär exprimiert werden, induziert werden, unabhängig davon, ob sie eine ITAM- oder ITIM-Domäne haben. Insbesondere in Makrophagen und dendritischen Zellen sind allerdings hauptsächlich die aktivierenden FcγRs außerdem für die zusätzlich stattfindende Beladung der prozessierten Antigene auf MHC-Molekülen und deren Präsentation verantwortlich. Auf diese Weise werden also neben der ADCP die Zellen selbst aktiviert sowie über die MHC-präsentierten Antigene weiterführende T-Zellantworten reguliert

(Guilliams *et al.* 2014). II) Vorrangig durch die Fc:CD16A-Interaktion auf NK-Zellen kann darüber hinaus der Prozess der Antikörper-abhängigen, zellulären Zytotoxizität (ADCC) induziert werden, wodurch die Ausbildung einer lytischen Synapse zwischen NK- und Zielzelle und die Degranulation von vorgeformten, zytoplasmatischen Vesikeln ausgelöst wird. Die so freigesetzten, zytolytischen Perforine machen die Plasmamembran der Zielzelle durchlässig für zytotoxisch wirkende Granzyme, die als Serinproteasen die Apoptose induzieren (Janeway *et al.* 2001). Anstatt direkt von Phagozyten erkannt zu werden, können IgG-Antikörper als weitere Option zur Bekämpfung von pathogenen Zellen auch die klassische Komplementkaskade aktivieren. Hierbei bindet die globuläre Region der Komplement-Komponente 1 (C1-Komplex) an die Fc-Region des IgGs und induziert die Komplement-anhängige Zytotoxizität (CDC) mittels Bildung des so genannten Membranangriffs-Komplexes, welcher ohne benötigte Effektorzellen direkt die Zytolyse und damit den Zelltod der Zielzelle auslöst (Janeway *et al.* 2001).

Neben dieser Fc-vermittelten Induktion von Immunantworten kann die Antigen-Spezifität von IgG-Antikörpern auch genutzt werden, um Rezeptoren selektiv zu binden und intrazelluläre Signalwege (wie apoptotische oder NF- $\kappa$ B-abhängige Signalkaskaden) direkt zu beeinflussen (F. Li und Ravetch 2012). Bindet ein Antikörper einen Rezeptor an demselben Epitop wie der endogene Ligand und aktiviert damit intrazelluläre Signalkaskaden, so spricht man von einem Agonisten. Je nach Aufbau des Rezeptors kann die Bindung an ein anderes Epitop, das räumlich nah an der Liganden-Bindedomäne liegt, auch zu einem verstärkten oder verminderten Rezeptor-Agonismus führen. In seltenen Fällen besteht zudem die Möglichkeit, dass Antikörper außerhalb der Liganden-Bindedomäne binden, den Rezeptor lediglich teilweise aktivieren, jedoch zusätzlich die Ligandenbindung ermöglichen und somit ebenfalls eine gesteigerte Rezeptor-Aktivierung ermöglichen. Im Gegensatz dazu kann die Bindung eines Antikörpers an ein Epitop in der Nähe der Liganden-Bindedomäne auch dazu führen, dass keine oder nur verminderte Rezeptor-Aktivierung induziert wird und zugleich der Ligand sterisch an der Bindung gehindert wird. Diese blockierenden Antikörper werden auch Antagonisten genannt (Elgert 2009).

Zusätzlich zu diesen immunologischen Eigenschaften, durch die Antikörper auch therapeutisch gegen eine Vielzahl an Zielmolekülen und damit verbundene Erkrankungen nutzbar gemacht oder spezifisch hierfür generiert werden können (siehe 1.2.3), besitzen IgG-Antikörper auch mehrere pharmakologische Eigenschaften, die sie zu idealen Kandidaten für die Entwicklung von Therapeutika machen. Die pharmakokinetischen Vorgänge nach einer intravenösen Antikörperinjektion, der herkömmlichsten Verabreichungsart in der klinischen Anwendung, können vereinfacht in drei Phasen eingeteilt werden: Die Verteilung im Körper, die Interaktion mit Zielzellen und/oder Immunzellen und die Katabolisierung. Die Verteilung von Antikörpern im Körper wird durch den Transport und die Äquilibration im Blut sowie die Extravasion in das Gewebe bestimmt. Dabei sind die Konvektion über diskontinuierliche Endothelien, die Diffusion durch fenestrierte Endothelien und der aktive Transport mittels Transzytose durch Epithel- und Endothelzellschichten die hauptverantwortlichen Mechanismen für die Verteilung im Extravaskulärraum, der Extrazellulärmatrix bzw. der interstitiellen Flüssigkeit und entferntem Gewebe (W. Wang *et al.* 2008, Ryman und Meibohm 2017).

Für große, polare Moleküle wie Antikörper ist der initiale Prozess der Extravasation durch die vaskulären Endothelzellen vergleichsweise langsam, sodass sie mitunter Stunden oder Tage benötigen, um in ausreichender Menge Antigene und entsprechende Zielzellen zu binden und Effekte zu induzieren. Hierbei kommt den Antikörpern zugute, dass sie – sofern sie humanen Ursprungs sind – keine oder nur eine geringe Immunogenität aufweisen und somit nicht wie andere, exogene Moleküle als fremd erkannt werden und so Wirkstoff-blockierende Immunmechanismen auslösen. Darüber hinaus unterscheiden sich Antikörper von anderen Proteinen insofern, als dass ihr Verbleib im Körper durch spezifische Metabolisierungsvorgänge sichergestellt und somit eine lange Serumhalbwertszeit erreicht wird. Antikörper werden entweder durch Ausscheidung oder Katabolismus eliminiert. Im Gegensatz zu kleinen Molekülen sind Antikörper allerdings zu groß, um von den Nieren gefiltert zu werden, weshalb sie in der Regel resorbiert und metabolisiert werden. Auch die Gallenausscheidung macht einen sehr geringen Teil der Eliminierung von IgG-Antikörpern aus. Die Elimination erfolgt daher zumeist durch intrazellulären Katabolismus mittels lysosomalen Abbau im Anschluss an eine Aufnahme in die Zelle entweder durch Makropinozytose, eine unspezifische fluide Endozytose, oder durch rezeptorvermittelte Endozytose (Waldmann und Strober 1969). Genau diesem Abbauprozess steuert der Körper jedoch durch die Expression eines weiteren, intrazellulären FcγRs, dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), entgegen. Ein bedeutender Teil des endozytierten IgGs wird nicht in das Lysosom sortiert, sondern recycelt, indem die Antikörper im sauren Milieu des frühen Endosoms FcRns mit pH-abhängiger Affinität über die Fc-Region binden. Dadurch werden die IgG:FcRn-Komplexe nicht zum Abbau an das Lysosom abgegeben, sondern zur Fusion mit der Zellmembran an die Zelloberfläche weitergeleitet, wo die Antikörper unter physiologischem pH dissoziieren und in extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt werden (W. Wang *et al.* 2008, Ryman und Meibohm 2017).

Aufgrund ihrer immunologischen Spezifität, der hohen Stabilität und langen Halbwertszeit, der geringen Ziel-unabhängigen Zytotoxizität und der vorteilhaften Pharmakokinetik können IgG-Antikörper auch zur Adressierung von TNFRSF-Rezeptoren genutzt werden.

### 1.2.3 Entwicklung von Antikörper-Therapeutika

Durch die Entwicklung von Hybridisierungstechniken ist es heute möglich, große Mengen an spezifischen Antikörpern eines einzigen Idiotyps, sog. monoklonale Antikörper, zu produzieren (Elgert 2009). Darüber hinaus wurden Verfahren entwickelt, um die DNA-Sequenzen monoklonaler Antikörper durch Klonierung in Expressionsplasmide *in vitro* zu erzeugen oder beliebig zu manipulieren und mittels Transfektion in Zellen einzubringen und dort produzieren zu lassen. In diesem Zusammenhang ist die molekulare *in vitro* Konstruktion der nächste konsequente Schritt, um die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften solcher identifizierter Antikörperkandidaten zu modifizieren und sie für die therapeutische Anwendung zu verbessern. Die Optimierung der Eigenschaften und Funktionen monoklonaler Antikörper beinhaltet dabei die Modifikation der Immunogenität der Moleküle, der Bindungseigenschaften

(Affinität/Spezifität für Antigene oder FcγRs), der Effektorfunktionen (z.B. verstärkte ADCC), der biophysikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, Stabilität), der Pharmakokinetik (verlängerte Serumhalbwertszeit) und vielem mehr (Ducancel und Muller 2012). Solche maßgeschneiderten Antikörper können Wirkstoffe mit unterschiedlichen isotypischen Fc-Regionen (IgG, IgM etc.), einzigartige Schwer- und Leichtkettenkombinationen (Bindung von zwei Antigenen) oder Fusionsproteine (teils Antikörper/ teils zusätzliche Binde-/Effektordomäne, Toxin o.ä.) sein. Auf diese Weise können unter anderem bi- und trispezifische Antikörper, die verschiedene Zelltypen, z.B. Tumor- und Immunzellen, miteinander verbinden, generiert werden (Khong *et al.* 2012). Einige relevante Vertreter werden in einem folgenden Kapitel (1.2.5) näher vorgestellt.

#### **1.2.4 Antikörper-basierte Behandlung von TNFRSF-assoziierten Erkrankungen**

Die atypische Expression verschiedener TNFRSF-Mitglieder ist mit einer Vielzahl an Syndromen, wie Muskelatrophie, Atherosklerose und verschiedenen Autoimmunerkrankungen, verbunden. Im Zusammenhang mit solchen Erkrankungen wurde bereits eine Reihe von therapeutischen Antikörpern mit dem vorrangigen Ziel entwickelt, überschießende Immunreaktionen herunterzuregulieren. Während diese antagonistisch bzw. immun-inhibitorisch wirkenden Antikörper allerdings über die Unterdrückung von Entzündungs- und Autoimmunreaktionen wirken, indem sie die Ligand-/Rezeptor-Interaktion blockieren, soll im Rahmen dieser Arbeit jedoch die Entwicklung von agonistisch wirkenden Antikörpern erfolgen.

Im Gegensatz zu diesem ersten beschriebenen Einsatzgebiet ist Krebs, gemessen an der Anzahl an klinischen Studien und in Entwicklung befindlichen Produkten, das wichtigste therapeutische Ziel von TNFRSF-assoziierten, agonistischen Antikörpern. Neben der Operation ist die Hauptstrategie zur Behandlung von Krebs derzeit immer noch die Radio-, die Chemotherapie oder eine Kombination aus beiden. Diese Strategien induzieren DNA-Schäden bei der Replikation oder Teilung von Zellen, was zu apoptotischem Zelltod führt, der im besten Fall mit einer Tumorstase oder -regression verbunden ist (Ashkenazi 2002). Allerdings haben diese Therapieoptionen zwei große Einschränkungen: Erstens sind Radio- und Chemotherapeutika in der Regel nicht in der Lage, bösartige von nicht bösartigen Zellen zu unterscheiden, was auch zu Schäden an gesundem Gewebe führt. Zweitens sind diese beiden Strategien oft nicht in der Lage, die gesamte Tumormasse zu zerstören, was zur Entstehung resistenter Tumorzellen und Rezidiven führt (Ashkenazi 2002). Deshalb haben sich die Bemühungen zur Verbesserung der Krebstherapie auf die Entwicklung von möglichst Tumor-selektiven Wirkstoffen konzentriert. Bisher haben nur wenige, zielgerichtete Therapeutika die Prognose für Krebspatienten signifikant verbessert, was die Notwendigkeit der Weiterentwicklung neuartiger Therapeutika verdeutlicht. Zu diesem Zweck sind auch verschiedene Mitglieder des TNFRSF interessante Ziele, da sie die apoptotische Abtötung von Tumorzellen direkt oder indirekt vermitteln können. Hierbei kann die Aktivierung von TNFRSF-Rezeptoren mit Hilfe von agonistischen Antikörpern ausgelöst werden, die in der Lage sind, die Antigenpräsentation durch APCs wie DCs, B-Zellen oder Makrophagen zu aktivieren und zu erhöhen, was durch die oben genannten Mechanismen (siehe Kapitel 1.1.3.1) zu einer

verbesserten, lang anhaltenden Immunreaktionen und der Induktion von Zytotoxizität führt (C. L. Law und Grewal 2009).

#### **1.2.4.1 Mechanismen Antikörper-vermittelter TNFRSF Rezeptor-Aktivierung**

Natürlicherweise werden Rezeptoren der TNFRSF durch trimerisierte, membranständige oder lösliche Liganden der TNFSF gebunden und wie zuvor beschrieben (siehe 1.1.1) aktiviert. Auch wenn die TNFRSF Rezeptoren durch Liganden-unabhängige, PLAD-vermittelte Aggregation ebenfalls als dimere oder trimere Moleküle vorliegen können, reicht diese niederaffine Selbst-Assemblierung in der Regel nicht aus, um die Mehrzahl der Rezeptor-Monomeren zu oligomerisieren (Chan *et al.* 2000, Papoff *et al.* 1999).

Genauso wie natürliche Liganden können auch TNFRSF Rezeptor-gerichtete Antikörper hochaffin, allerdings lediglich mit zwei Antigenbindestellen, an Rezeptorepitope binden. Aus diesem Grund entstehen nach bivalenter Antikörper-Bindung größtenteils Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexe, die - genauso wie einzelne Liganden<sub>3</sub>-Rezeptor<sub>3</sub>-Komplexe – bei vielen Mitgliedern der TNFRSF nicht in der Lage sind, eine starke Aktivierung der Rezeptor-vermittelten Signalwege zu initiieren (Wajant 2015). Für eine solche Antikörper-vermittelte TNFRSF Rezeptor-Aktivierung besteht somit in den meisten Fällen eine essenzielle Notwendigkeit, dass mehrere initial formierte Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexe miteinander interagieren und transaktivierende, supramolekulare Komplexe bilden (Wajant 2015). Vergleichbar mit löslichen Liganden sind einzelne, lösliche Antikörper durch die begrenzte Ausrichtung und Verweildauer gegenüber der Rezeptoren jedoch nur selten und bei entsprechend hoher Eigenaffinität des gebundenen TNFRSF Mitglieds in der Lage, dieses supramolekulare Clustering zu induzieren. Bislang sind zwei wesentliche Mechanismen beschrieben, um TNFRSF Rezeptor-spezifische Antikörper dennoch zu potenten Rezeptoragonisten werden zu lassen: Zum einen können mehrere Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexe *in vitro* miteinander verknüpft werden, indem die Fc-Domänen mehrerer Antikörper durch Protein A oder Protein G quervernetzt werden (Dhein *et al.* 1992, Wajant 2015). Zum anderen besteht *in vivo* die Möglichkeit, dass die Antikörper an Fc-Rezeptoren binden, wodurch die Antikörper immobilisiert werden können. Durch die so erzielte räumliche Anreicherung und Ausrichtung erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer sekundären Interaktion von mehreren Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexen und die Bildung von Rezeptor-aktivierenden, supramolekularen Komplexen wird ermöglicht (Wajant 2015).

Unter Berücksichtigung dieser TNFRSF-spezifischen Anforderungen an die Antikörper-vermittelte Rezeptoraktivierung, verfügen agonistische Antikörper in Verbindung mit einer Vielzahl an Erkrankungen über ein großes therapeutisches Potenzial (siehe 1.2.4 und 1.2.4.2), zu dessen Nutzbarmachung die Minimierung von bisherigen Nebenwirkungen mithilfe neuartiger Antikörper-basierter Ansätze (siehe 1.2.5) beiträgt.

#### **1.2.4.2 Blutkrebs-Typen und aktuelle Behandlungsansätze**

Aufgrund der Verbindung zu mehreren Vertretern der TNF- und TNFR-Superfamilie wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Entwicklung von potenziellen Antikörper-basierten Wirkstoffen

gegen Untergruppen des so genannten Blutkrebses gelegt. Beim Blutkrebs handelt es sich um einen Sammelbegriff für verschiedene Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Die Hämatopoese ist der Prozess, bei dem sich Blutzellen bilden und reifen, indem verschiedene Zellarten im Knochenmark ausgehend von gemeinsamen, pluripotenten Stammzellen eine Reihe von Entwicklungsschritten hin zu Zellen mit spezifischen Aufgaben im Körper durchlaufen (Janeway *et al.* 2001). Normalerweise werden Blutzellen in geordneter, kontrollierter Weise bedarfsgerecht gebildet und die Proliferation und Differenzierung wird durch eine Vielzahl an immunologischen Mechanismen und Signalwegen reguliert. Durch Mutationen in der DNA kann es jedoch während nahezu sämtlichen Schritten des hämatopoetischen Prozesses zu Fehlern und einem Arrest in der Entwicklung kommen, aufgrund dessen solche abnormalen Blutzellen unkontrolliert proliferieren und sich in großen Mengen replizieren (Janeway *et al.* 2001). Auf Grundlage der Lokalisation, des Phänotyps und der Progression wurde der Blutkrebs in drei Hauptgruppen klassifiziert: I) Bei der Leukämie befinden sich Krebszellen im Blutkreislauf und im Knochenmark. Leukämie kann sowohl aus Lymphozyten als auch Myelozyten entstehen und einen akuten oder chronischen Verlauf aufweisen, wodurch sich weitere Gruppierungen ergeben. II) Bei Lymphomen kann eine Aggregation von lymphozytären Krebszellen in lymphatischen Geweben diagnostiziert werden. III) Das Multiple Myelom ist ein Tumor des Knochenmarks, bei dem Plasmazellen überschießende Mengen an Antikörpern produzieren.

Das Multiple Myelom stellt dabei das Hauptindikationsgebiet der in dieser Arbeit beschriebenen Antikörper dar. Zwar gibt es mittlerweile eine Reihe von Behandlungsverfahren, die zu einer Remission oder Stabilisierung dieser Erkrankung führen können, nach aktuellem Stand der Wissenschaft ist eine Heilung des Multiplen Myeloms jedoch noch nicht möglich. Die Behandlungsmethoden zur Therapie des Multiplen Myeloms umfassen momentan in erster Linie die Chemo- oder Strahlentherapie und die autologe oder allogene Stammzelltransplantation (Gerecke *et al.* 2016). Dazu kommt die Behandlung mit Immunmodulatoren (z.B. Lenalidomid, Thalidomid) oder Proteaseinhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib etc.) in unterschiedlichsten Kombinationen. Die Behandlung mit solchen etablierten Verfahren und Medikamenten ist allerdings oftmals aufwendig (Stammzelltransplantation), verursacht teils schwere Nebenwirkungen (Chemo-/ Strahlentherapie) und hat mitunter hohe Rezidivraten (Gerecke *et al.* 2016, Rollig *et al.* 2015). Nach dem durchschlagenden Erfolg von Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei der Behandlung von Melanomen und verschiedenen Karzinomen haben neuere Forschungen auch zur Entwicklung hochspezifischer monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenmoleküle auf Myelomzellen geführt. Die Zulassung der beiden Immuntherapeutika ELOTUZUMAB und DARATUMUMAB war hierbei ein wichtiger Fortschritt (Faiman und Richards 2014). ELOTUZUMAB bindet spezifisch an das Oberflächenprotein SLAMF7 und aktiviert einerseits natürliche Killerzellen, markiert zudem aber auch Myelomzellen für die Induktion der ADCC. DARATUMUMAB erkennt das auf Myelomzellen überexprimierte Glykoprotein CD38 und induziert die Apoptose der malignen Zellen. Beide Antigene werden jedoch auch auf anderen normalen Geweben einschließlich hämatopoetischer Zelllinien und Immuneffektorzellen exprimiert, was ihre klinische Verwendung einschränken kann (Faiman und Richards 2014, Abramson 2018).



Neue Immuntherapeutika gegen das Multiple Myelom sollten daher zwei Hauptkriterien erfüllen: Erstens sollten sie an Zielmoleküle binden, die möglichst selektiv und in Relation zu normalen Zellen stark auf der Oberfläche von Myelomzellen exprimiert werden. Zweitens sollten sie die Antitumoraktivität von Immuneffektorzellen im Tumor-Mikromilieu wiederherstellen bzw. stimulieren (S. F. Cho *et al.* 2018). Ein im Körper sehr restringiert exprimiertes, attraktives Zielmolekül auf Myelomzellen ist das TNFRSF-Mitglied BCMA, das auf Zellen des Multiplen Myeloms stark überexprimiert vorliegen kann (Sanchez *et al.* 2018, Carpenter *et al.* 2013). In der Tat scheint es sogar ein spezifischerer Marker für das Multiple Myelom zu sein, als SLAMF7 und CD38. Aber auch die weiteren Rezeptoren von Baff und APRIL, BaffR (Shen *et al.* 2011, O'Donnell und Raje 2017) und TACI (Moreaux *et al.* 2007, Moreaux *et al.* 2009) werden verstärkt auf Myelomzellen exprimiert. Alle drei Rezeptoren, insbesondere BCMA, sind an der Aktivierung von Signalwegen beteiligt, die das Überleben und die überschießende Proliferation der Myelomzellen sicherstellen (Novak *et al.* 2004). So führt die Produktion von Baff und APRIL von Osteoklasten, Monozyten und Neutrophilen im Knochenmark vorrangig durch BCMA-Aktivierung zu einer Verstärkung der Proliferation und des Überlebens von Myelomzellen durch Induktion der NF- $\kappa$ B-, PI3K- und MAPK-Signalwege (Abramson 2018). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass BCMA neben anti-apoptotischen Proteinen ebenfalls Gene hochregulieren kann, die mit der Aktivierung von Osteoklasten, der Zelladhäsion und Angiogenese assoziiert sind. Die hohe und nahezu exklusive Expression von BCMA auf Myelomzellen sowie dessen tumorfördernde Eigenschaften machen dieses Oberflächenmolekül - aber auch seine Partnerrezeptoren TACI und BaffR - zu einer idealen Zielstruktur, sodass dementsprechend derzeit ein hohes Interesse an der Entwicklung von biologischen und zellulären Therapien besteht, die spezifisch gegen das Multiple Myelom gerichtet sind (S. F. Cho *et al.* 2018, Abramson 2018).

Zusätzlich zum Multiplen Myelom wurde eine verstärkte BCMA und TACI Expression in Hodgkin-Lymphomen (Chiu *et al.* 2007) nachgewiesen sowie eine Beteiligung der Baff/APRIL:BCMA-Interaktion an der Apoptose-Resistenz in Zellen der akuten myeloischen Leukämie (Bolkun *et al.* 2016). Die Beteiligung von BaffR wurde darüber hinaus mit einer hohen Anzahl an B-Zell-Lymphomkrankungen in Verbindung gebracht (Rodig *et al.* 2005, Takahata *et al.* 2010). So wurde publiziert, dass BaffR in nahezu allen Patientenproben mit Mantelzell-Lymphom und follikulärem Lymphom (Wada *et al.* 2009, Y. J. Li *et al.* 2012) sowie im diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) (Y. Wang *et al.* 2015) und der akuten und chronischen lymphatischen Leukämie (Parameswaran *et al.* 2010, ten Hacken und Burger 2014) an der Progression der entsprechenden Erkrankung eine Rolle spielt.

Grundsätzlich ist es in diesem Zusammenhang möglich, neben der Tumor-spezifischen Addressierung der TNFRSF-Mitglieder BaffR, BCMA und TACI auch die antitumorale Wirkung des Immunsystems durch parallele Aktivierung von weiteren Rezeptoren der TNFRSF zu stimulieren. In diesem Zusammenhang sind im Rahmen dieser Arbeit insbesondere CD40 sowie CD95 von Interesse.

### 1.2.4.3 CD40- und CD95-spezifische Antikörper

Die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen die Rezeptoren CD40 und CD95 wird allgemein als vielversprechende immuntherapeutische Option angesehen, um immunstimulatorische oder apoptotische Anti-Tumor-Effekte zu induzieren (Remer *et al.* 2017, Beatty *et al.* 2017, Papenfuss *et al.* 2008).

Mit dem Ziel, das kostimulatorische Potenzial von CD40 für die Krebsimmuntherapie zu nutzen, wurde G28.5, dessen Patent von 1993 (US5247069A) ausgelaufen ist, auf Grundlage publizierter Vorkenntnisse als der geeignete Kandidat für die in dieser Arbeit vorgestellten  $\alpha$ CD40-Antikörper und –Antikörper-Fusionsproteine ausgewählt. Mittlerweile wurden darüber hinaus einige weitere CD40-spezifische Antikörper beschrieben, die sich ebenfalls in unterschiedlichen Stadien der präklinischen und klinischen Entwicklung befinden (siehe 5.1.1, Tab. 24). Die Behandlung mit monoklonalen  $\alpha$ CD40-Antikörpern zeigte dabei in Maus-Lymphom-Modellen erste Erfolge in der Abtötung der Tumorzellen durch eine schnelle Expansion von zytotoxischen T-Zellen (Tutt *et al.* 2002, van Mierlo *et al.* 2002). Diese Effekte können, wie bereits weiter oben erläutert (siehe 1.1.3.1), auf die CD40-vermittelte Aktivierung von dendritischen Zellen zurückgeführt werden, was verdeutlicht, dass diese Antikörper-basierte Immuntherapie der DC-Stimulation als nützliche Methode zur Behandlung u.a. des Multiplen Myeloms betrachtet werden kann (Nguyen-Pham *et al.* 2012).

Auch die Induktion der CD95-vermittelten Apoptose bietet sich in diesem Zusammenhang als potente Strategie zur Anti-Tumor-Therapie an. Anders als im Fall der CD40-spezifischen Immuntherapie mit einer Vielzahl an aktuell konkurrierenden Produkten, ist das Forschungsfeld an möglichen, therapeutisch einsetzbaren CD95-Agonisten jedoch überschaubar. Dies liegt in erster Linie darin begründet, dass bereits die ersten beschriebenen Antikörper gegen murinen CD95 zu außerordentlich starken Nebenwirkungen geführt haben. So starben in *in vivo* Experimenten Mäuse, die den  $\alpha$ -murin CD95-Antikörper Jo2 verabreicht bekamen, in kürzester Zeit an akuter Hepatitis gefolgt von inneren Blutungen. Mäuse, die mit einem zweiten  $\alpha$ -murin CD95-Antikörper, RK-8, behandelt wurden, zeigten eine schwere Schädigung des Thymus sowie erhebliche Beeinträchtigungen von Milz und Leber, sodass ein Großteil der Thymozyten und Hepatozyten innerhalb eines Tages nach Verabreichung in Apoptose ging (Ogasawara *et al.* 1993, Nishimura *et al.* 1997). Auch in weiteren Studien wurde nach der Stimulation von CD95-Agonisten systemische Toxizität in unterschiedlichen Schweregraden beobachtet, die auch durch  $\alpha$ -human CD95-Antikörper, multimere rekombinante CD95-Liganden oder membranständig CD95L-exprimierende Zellen beobachtet wurde (Timmer *et al.* 2002, Galle *et al.* 1995, Kondo *et al.* 1997). Dennoch wurde eine Reihe weiterer Antikörper mit dem Ziel entwickelt, generelle Mechanismen des CD95/CD95L-Systems und der verbundenen Signalwege zu untersuchen und die prinzipielle Anwendbarkeit einer CD95-Aktivierung für antitumorale Strategien auszuloten (siehe 5.1.2, Tab. 25). Basierend auf veröffentlichten Daten, die auf einen hohen CD95-Agonismus nach Quervernetzung hindeuteten, wurden die Antikörper E09 sowie HFE7A initial getestet und nach positiven

Vorversuchen schließlich E09-IgG1-Antikörpervarianten im Rahmen dieser Arbeit genauer evaluiert.

Bei der Entwicklung von Antikörper-basierten Wirkstoffen gegen Mitglieder der TNFRSF müssen allerdings mehrere kritische Faktoren in das Antikörperdesign einbezogen werden. Wie anhand früher Untersuchungen mit  $\alpha$ CD95-Antikörpern ersichtlich, ist die therapeutische Breite, also das Konzentrationsfenster zwischen der Dosis, die einen positiven Effekt erzeugt und derjenigen, bei der negative Effekte überwiegen, essenziell für die Abwägung einer korrekten, ungefährlichen Dosierung für den Patienten. So wurde z.B. die weitere Entwicklung des CD95-spezifischen Antikörpers R-125224 eingestellt, da die Wirksamkeit *in vivo* in Relation zu den Nebenwirkungen nur unzureichend ausfielen (Saito-Yabe *et al.* 2009, Nakayama *et al.* 2006). Auch zwei  $\alpha$ -CD40-Antikörper, Lucatumumab und Dacetuzumab, wurden zwar in entsprechenden Konzentrationen gut vertragen, erzielten jedoch nur begrenzte Ansprechraten (Castella *et al.* 2018). Zu hohe eingesetzte Dosen an systemisch verabreichten, immunstimulatorischen  $\alpha$ -CD40-Antikörpern sind wiederum assoziiert mit der massiven Freisetzung inflammatorischer Zytokine („*cytokine release syndrome*“) bis hin zum so genannten Zytokinsturm, Lymphozytopenie und Lebertoxizität (Medina-Echeverz *et al.* 2015, Beatty *et al.* 2017), sodass systemische Immunaktivierung durch CD40-Agonisten Dosis-limitierend sein kann. Ein vorrangiger Grund für die überschießenden Immunreaktionen liegt in der Interaktion mit Fc $\gamma$ R-exprimierenden Zellen, die insbesondere für die Funktionalität von TNFRSF-interagierenden Antikörpern eine entscheidende Rolle spielen. Da eine Untergruppe der TNFRSF, darunter auch die Rezeptoren CD40 und CD95, nicht oder nur moderat von dimeren Antikörpern aktiviert werden kann, ist in der Regel eine Oligomerisierung oder Fc $\gamma$ R-Bindung zur Immobilisierung nötig, um das volle agonistische Potenzial dieser Antikörper freizusetzen (Wajant 2015). Im klinischen Einsatz ergibt sich somit das Problem, dass zwar auf der einen Seite die Fc $\gamma$ R-Bindung notwendig für die *in vivo* Aktivität von z.B. agonistischen CD40-Antikörpern ist (Dahan *et al.* 2016), diese Abhängigkeit jedoch auf der anderen Seite unterschiedliche Nachteile bzw. Einschränkungen mit sich bringt: Zunächst kann ein unzureichendes Maß an Fc $\gamma$ R-Bindung die Aktivität der Antikörper stark einschränken, z.B. durch übermäßige Fucosylierung und/oder Galaktosylierung der Fc-Regionen (Thomann *et al.* 2016, Shields *et al.* 2002), aber auch durch die Konkurrenz mit endogenen IgG-Molekülen um die Fc $\gamma$ R-Bindung, unzureichende Mengen an Fc $\gamma$ R-exprimierenden Zellen oder niedrige Fc $\gamma$ R-Expressionslevel pro Zelle im Mikromilieu des gewünschten Wirkortes (Wajant 2019). Darüber hinaus kann auch die Fc $\gamma$ R-Bindung in den exprimierenden Immunzellen Signalwege induzieren, welche der erwarteten Wirkung der Antikörper entgegenwirken, z.B. durch gesteigerte Antikörper-Endozytose oder die Zerstörung von Zellen, die eigentlich gezielt zur Induktion der immun-stimulierenden Wirkung über die TNFRSF-Rezeptoren adressiert werden sollen (Medler *et al.* 2019). Letzlich kann sowohl diese exzessive Stimulation von Fc $\gamma$ R-exprimierenden Immunzellen als auch der TNFRSF-exprimierenden Zielzellen aufgrund der weitverbreiteten Fc $\gamma$ R-positiven Zellen im Körper zu systemischen, Dosis-limitierenden Nebenwirkungen, wie der angesprochenen Zytokinfreisetzung, führen (Medler *et al.* 2019).

Um die Aktivität von Antikörpern zu steigern, wurde außerdem bereits eine Vielzahl an modifizierten Antikörpern beschrieben, die durch so genanntes „Fc-Engineering“ in ihrer Fc-Region optimiert wurden. So konnte zwar z.B. durch alternative Fucosylierung die Affinität von nicht-fucosylierten Antikörpern gegenüber FcγRIIIA oder durch Punktmutationen von spezifischen Aminosäuren des Fc-Teils die Bindung an FcγRIIB erhöht werden, jedoch bieten auch diese IgG-Optimierungen keine Lösung für Probleme, die sich durch die systemische Verteilung dieser Zellen oder durch die niedrige Bioverfügbarkeit am Wirkort ergeben. Aus diesem Grund werden dringend neue Strategien benötigt, die in erster Linie die strikte, lokale Addressierung und FcγR-unabhängige Aktivität von Antikörpern und Antikörper-basierten Wirkstoffen gewährleisten.

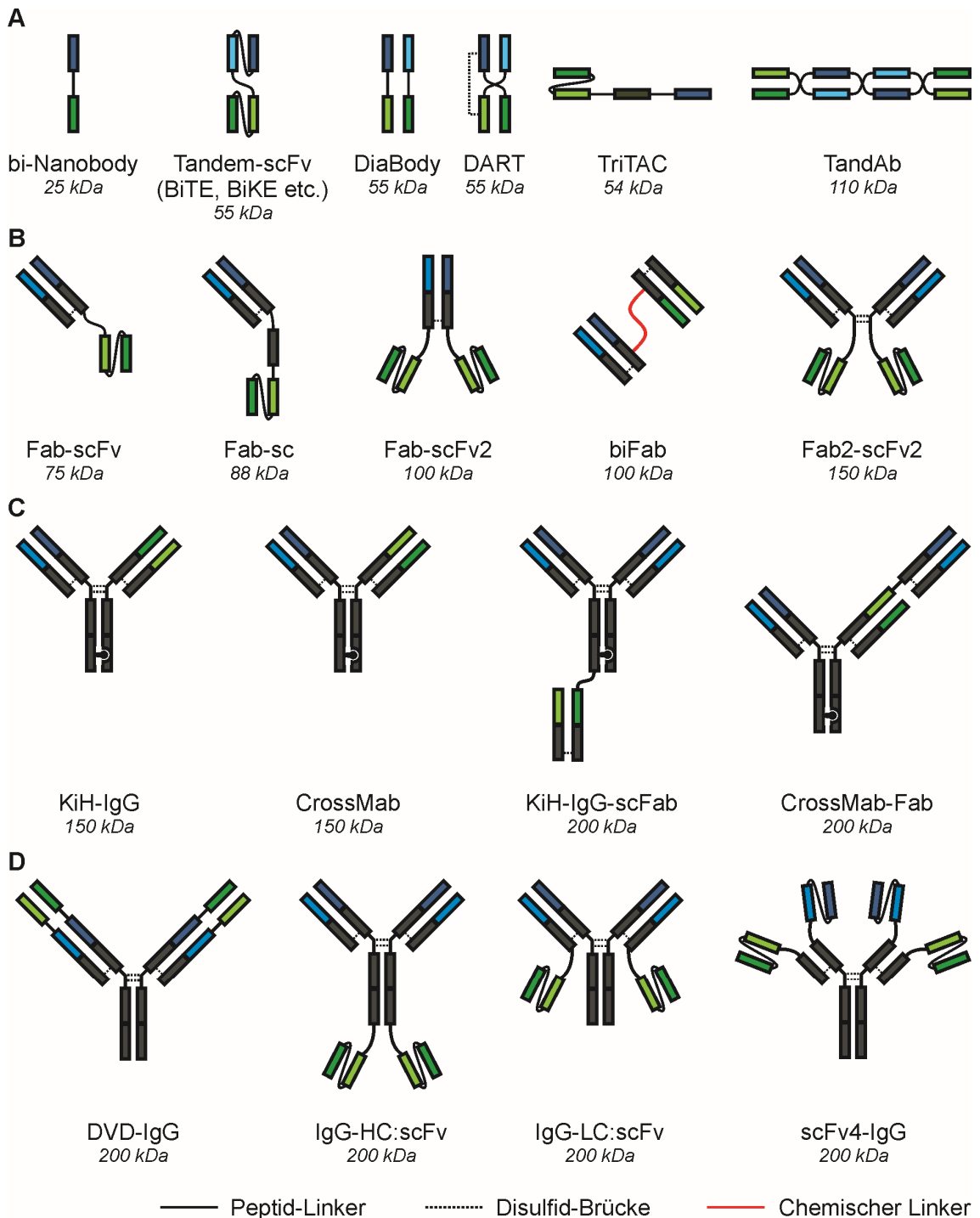
### 1.2.5 Bispezifische Antikörperformate

Ein Hauptansatz der letzten Jahre, um die FcγR-Abhängigkeit von vielen monoklonalen Antikörpern zu umgehen, liegt in der Entwicklung von bispezifischen Antikörpern (bsAbs), die gleichzeitig zwei unterschiedliche Antigene binden. In den meisten Fällen ist hierbei eine Bindestelle des bsAbs gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen gerichtet und die andere Bindestelle sorgt für die Kontaktaufnahme und die Aktivierung von Immun-Effektorzellen, wodurch eine Verbesserung der Wirksamkeit und Selektivität erzielt werden kann (Lum und Davol 2005). Hierzu wurde eine Reihe von rekombinanten Strategien entwickelt, um bispezifische Antikörper und Antikörper-basierte Wirkstoffe mit alternativem Konstruktformat zu synthetisieren. Die sukzessiven konzeptionellen und technischen Innovationen bei der Generierung von bsAbs mit modularer Architektur haben dazu geführt, dass heute eine umfangreiche Sammlung an über hundert bekannten bsAb-Formaten besteht (Brinkmann und Kontermann 2017, Spiess *et al.* 2015), von denen einige, die in dieser Arbeit erwähnt werden, in Abb. 4 dargestellt sind.

Bispezifische, Antikörper-basierte Formate reichen von relativ kleinen Proteinen, die aus nicht mehr als zwei Antigen-bindenden Fragmenten bestehen, bis hin zu großen IgG-ähnlichen Molekülen mit variabler Domänenanordnung oder zusätzlich verknüpften Domänen. Neben dem Molekulargewicht und der damit verbundenen Pharmakokinetik (Serum-Halbwertszeit, Gewebeverteilung etc.) unterscheiden sich die unterschiedlichen Formate in Parametern, wie der Anzahl an Antigen-Bindestellen, der Valenz für jedes Antigen, der räumlichen Beziehung der verschiedenen Bindestellen oder der Fähigkeit, zusätzliche sekundäre Immunfunktionen zu vermitteln (Spiess *et al.* 2015). Grob kann eine Unterteilung in bsAbs mit oder ohne Fc-Domäne und in IgG-abgeleitete Formate mit symmetrischem versus asymmetrischem Aufbau getroffen werden.

Zu den kleinen bsAb-Formaten zählen diverse Moleküle, die aus einkettigen, variablen Fragmenten (scFv) bestehen und über unterschiedliche Linkersequenzen und -positionen miteinander verknüpft sind, darunter Tandem-scFvs, wie BiTEs (bispezifische T-Zell-Engager), Diabodies, DARTs („Dual Affinity Re-Targeting“) und TandAbs („Tandem Diabody“). Dazu kommen Formate mit Fab-Domänen, z.B. „Fabsc“-Moleküle, oder biFabs und Formate, die aus Einzeldomänen-Antikörper-Fragmenten (V<sub>H</sub>Hs) bestehen oder diese enthalten, wie bi-

Nanobodies oder TriTACs („Tri-specific T cell-activating construct“) (Spiess *et al.* 2015, Brinkmann und Kontermann 2017). Bispezifische Antikörper ohne Fc-Domäne verfügen nicht über Fc-vermittelte Effektorfunktionen, wie ADCC, ADCP, CDC oder FcRn-vermitteltes Recycling, dafür jedoch über eine schnelle Bioverfügbarkeit und Gewebeverteilung.



**Abb. 4: Ausgewählte bispezifische Antikörper-Formate.**

Variable Domänen der schweren Ketten sind in dunkelblau und dunkelgrün, variable Domänen der leichten Ketten in hellblau und hellgrün dargestellt. Blau und Grün repräsentieren unterschiedliche Antigen-Spezifitäten. Graue Domänen stellen konstante Regionen (CH1, CH2 und/oder CH3) dar. (A) Fc-Region-lose VHH- bzw. scFv-basierende bsAbs. (B) Fc-Region-lose Fab2-basierende bsAbs. (C) Asymmetrische bsAbs mit und ohne zusätzliche Bindedomänen. (D) Symmetrische bsAbs mit scFv-Bindedomänen unterschiedlicher Positionierung.

Große bsAbs, die eine Fc-Domäne enthalten, können den Aufbau des IgG-Moleküls beibehalten und dabei zwei unterschiedliche Antigen-Bindestellen in asymmetrischer Anordnung enthalten, die jeweils monovalenten Charakter haben, z.B. „Knob-into-Hole“(KiH)-Abs oder CrossMabs, aber auch zusätzliche Domänen enthalten und somit Moleküle mit einer Masse > 150 kDa und asymmetrischer Struktur darstellen, wie beispielsweise „KiH-IgG-scFabs“ oder CrossMab-Fabs, die bivalent an das erste und monovalent an ein zweites Antigen binden (Abb. 4). Dieses Prinzip hat den Nachteil, dass es zu ungewünschten, zufälligen Fragment-Zusammenlagerungen kommen kann und dadurch die Produktion erschwert ist, allerdings kann sie leicht um weitere Valenzen oder zusätzliche Spezifitäten erweitert werden, um tri- oder multispezifische Moleküle zu generieren (Brinkmann und Kontermann 2017). Diese Möglichkeiten bestehen auch bei symmetrischen bsAbs, der Gruppe mit der größten Vielfalt. Diese IgG-basierenden Moleküle werden generiert, indem Bindedomänen für ein zusätzliches Antigen an die bestehende Struktur der schweren oder leichten Ketten, entweder N- oder C-terminal, gekoppelt werden, wodurch zwei Zielstrukturen mit bivalenter Spezifität gebunden werden können. Die dabei verwendeten Domänen können vielfältiger Struktur sein, wobei zumeiste scFv-, Fab- oder V<sub>H</sub>H-Fragmente Verwendung finden (Kontermann 2012). Beispiele für diese Untergruppe sind DVD-IgGs („Dual Variable Domain“-Antikörper), modulare IgG-scFvs oder scFv<sub>(4)</sub>-IgGs (Abb. 4). Diverse solcher IgG-scFv Antikörper-Fusionsproteine wurden bereits publiziert, wobei eine N- oder C-terminale Kopplung noch die Fusion an der schweren oder leichten Kette die Produktivität sowie die Antigenbindung der Konstrukte beeinträchtigte (Kontermann 2012). Ein wesentlicher Vorteil dieser IgG-scFvs könnte in der Möglichkeit bestehen, dass Zelloberflächen-verankerte Antikörper-Fusionsproteine sogar eine höhere Gesamtaktivität aufweisen können als FcγR-gebundene, konventionelle Antikörper, weil Tumor-assoziierte Antigene im Vergleich zu FcγRs ein viel höheres Expressionsniveau erreichen können (Medler *et al.* 2019).

In den Zusammenhang der zuletzt genannten bsAbs fallen auch die in dieser Arbeit entwickelten und untersuchten Antikörper-Fusionsproteine. Um ein Tumor-spezifisches Antigen mit der einen Domäne und ein Effektorantigen mit der zweiten Domäne zu binden, wurden im Vorfeld einige Anforderungen formuliert, die von dem hier beschriebenen Konstrukt erfüllt werden sollten: I) Zunächst sollten die Antikörper-Fusionsproteine FcγR-unabhängig über zumindest eine agonistische Antigen-Bindedomäne wirken. II) Durch eine möglichst einfache Generierung mittels Standard-Klonierungstechniken sollte eine schnelle Evaluation von unterschiedlichen Kandidaten gegeben sein. III) Die Antikörper-Fusionsproteine sollten eine vergleichbare Pharmakokinetik zu den konventionellen IgG-Antikörpern haben und daher eine Fc-Region vorweisen. IV) Die Konstrukte sollten unkompliziert und in ausreichender Konzentration produzierbar sein. V) Aufgrund der Biologie der TNFRSF sollte für die Rezeptorbindung zur Immobilisierung auf der einen und zur Effektor-Aktivierung auf der anderen Seite die Möglichkeit zu einer gewissen räumlichen Ausrichtung gewährleistet sein, da beide Antigene in den meisten Fällen auf unterschiedlichen Zellen exprimiert werden.

Basierend auf diesen Überlegungen wurde die symmetrische Domänenstruktur des modular generierbaren IgG-scFv-Formats als theoretische Grundlage herangezogen, um

neuartige Antikörper-Fusionsproteine für die gewünschten Zielstrukturen zu entwickeln. Die so entstandenen Konstrukte besitzen N-terminal die beiden TNFRSF-spezifischen Antigen-Bindedomänen mit Effektorfunktion des Ausgangs-Antikörpers und C-terminal zwei gekoppelte Immobilisierungsdomänen, die im Weiteren auch Verankerungsdomänen genannt werden, um die Tumor-spezifische Bindung und Effektor-Aktivität zu gewährleisten. Entsprechend ihrer Wirkungsweise wurden diese Konstrukte TNFRSF Rezeptor-aktivierende Antikörper-Fusionsproteine mit FcγR-unabhängiger agonistischer Aktivität, kurz TRAAFFIAAs (*TNFRSF receptor activating antibody fusion proteins with FcγR-independent agonistic activity*) genannt. Initial wurden daraufhin mehrere TRAAFFIAAs basierend auf TNFR2-, Fn14-, 4-1BB-, CD40- sowie CD95-spezifischen Antikörpern mit unterschiedlichen Verankerungsdomänen entwickelt und erfolgreich getestet (Medler *et al.* 2019).

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie spielen bedeutende, jedoch divergierende Rollen in der Progression aber auch der immunologischen Bekämpfung einiger hämatopoetischer Erkrankungen, wie z.B. dem Multiplen Myelom. Daher sind die Entwicklung und die Charakterisierung potenzieller therapeutischer Antikörper gegen entsprechend ausgewählte Zielmoleküle für die weitere klinische Entwicklung von großem Interesse. Viele derzeitige IgG-basierte, monoklonale Antikörper sind für die Induktion eines effizienten Rezeptor-Agonismus auf die Interaktion mit Fcγ-Rezeptoren angewiesen, was allerdings mit einer Reihe von systemischen Nebenwirkungen assoziiert sein kann. Anhand einiger kürzlich publizierter Antikörper-Fusionsproteine (Medler *et al.* 2019, Brunker *et al.* 2016, Siegemund *et al.* 2018, Shivange *et al.* 2018) konnte erfolgreich gezeigt werden, dass TNFRSF-Rezeptor spezifische Antikörper-Fusionsproteine mit FcγR-unabhängiger Aktivität generiert und funktionell angewendet werden können. Auf Grundlage dieses Konzeptes sollten im Rahmen der hier vorgelegten Promotionsarbeit Antikörper-Fusionsproteine entwickelt und *in vitro* charakterisiert werden, die entweder den immun-stimulatorischen Rezeptor CD40 oder den Todesrezeptor CD95 aktivieren, ohne dabei von der Bindung an Fcγ-Rezeptoren abhängig zu sein. Hierzu sollten zunächst unterschiedliche Verankerungsdomänen-Formate sowie verschiedene Tumor-relevante Zielmoleküle miteinander vergleichend analysiert werden, um einen geeigneten Hauptkandidaten für die systematische Analyse zu identifizieren. Das weitere Ziel bestand darin, die aussichtsreichsten Verankerungsdomänen-Kombinationen in unterschiedlichen FcγR-defizienten Antikörper-Formaten in Bezug auf ihre Rezeptoraffinität und die agonistische Aktivität hin zu charakterisieren und somit das Potenzial dieser neuartigen TRAAFFIAAs als mögliche Therapeutika zu evaluieren.

## 2 Material

### 2.1 Laborausstattung

Tab. 2: Liste der Laborausstattung.

Gerät	Hersteller
Accu-jet® Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Biologische Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
Blotkammer	Peqlab/ VWR International, Erlangen
Zellinkubator: 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Zentrifugen:	
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Multifuge X12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe
Kühlraum, 4 °C	Genheimer, Höchberg
Elektrophorese System (Mini-Protean-Tetra-Cell)	BioRad, München
Gefrierschrank -20 °C: Comfort	Liebherr, Biberach a.d. Riss
Gefrierschrank -80 °C: HFU586 Basic	Heraeus Med, Hanau
Gene Quant Pro RNA/ DNA Calculator	Biochrom Ltd., Cambridge (UK)
Heizblock	Peqlab/ VWR International, Erlangen
Eismaschine AF-80	Scotsman, Mailand (I)
Einhängethermostat für Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Intas Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
LI-COR Odyssey® Infrarot-Bildgebungssystem	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Lichtmikroskop (AMG EVOSxL Digital inverted Microscope)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Luminometer/ ELISA reader (Anthos Lucy 2)	anthos Mikrosysteme, Krefeld
Magnetrührer 720-HPS	VWR, Darmstadt
Mehrkanalpipette plus	Eppendorf, Hamburg
Multistep Pipette	Brand, Wertheim
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Orbitalschüttler	neoLab, Heidelberg
PCR Thermocycler Primus	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen
Stromquelle:	
Power supply EV202	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Power supply EV243	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Rollenmischer	Hartenstein, Würzburg
Gellaufkammer SDS-PAGE	Peqlab/ VWR International, Erlangen
Feinwaage	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen
Vortexer Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe
Wet-Blotkammer	Peqlab/ VWR International, Erlangen

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Liste der Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg



Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zentrifugenröhrchen: 15; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryoröhrchen: 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Dialyseschlauch ("Visking")	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegpipetten: 5; 10; 25; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Autoklavierbeutel	Hartenstein, Würzburg
ELISA Platten (96-well; high binding)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences, Garching
Nitrilhandschuhe	Medline, Kleve
Papiertücher	IGEFA, Ahrensfelde
Parafilm <sup>®</sup> , M	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen: 35,60, 120 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen: 0.5-10; 10-100; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße: 1,5; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, Porengröße: 0,2 µm	Sartorius Stedium Biotech, Göttingen
Zellkulturflaschen: 75, 175 cm <sup>2</sup>	Techno Plastic Products AG, Trasadingen (CH)
Zellkulturplatten: 35, 60, 145 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur-Testplatten: 6-, 12-, 24-, 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Wägeschälchen	Hartenstein, Würzburg
Whatman Filterpapier, 195 g/m <sup>2</sup>	Hartenstein, Würzburg
Frischhaltefolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden

## 2.3 Labormaterialien

Tab. 4: Liste der Labormaterialien.

Labormaterial	Hersteller
Ständer für Zentrifugenröhrchen	neoLab, Heidelberg
Kälteschutzhandschuhe	VWR, Darmstadt
Eppendorf Pipette: 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Trichter	Hartenstein, Würzburg
Glasküvette	Mercateo, Munich
Pasteurpipette (Glas)	Brand, Wertheim
Glaspipette: 5; 10, 25 ml	Brand, Wertheim
Handzähler	neoLab, Heidelberg
Labor Glasflasche: 50; 100; 250; 1000 ml	Schott, Mainz
Magnetrührstäbchen	Hartenstein, Würzburg
Magnetstabentferner	Hartenstein, Würzburg
Schutzbrille	neoLab, Heidelberg
Ständer für Reaktionsgefäße	neoLab, Heidelberg
Löffel und Spatel	Hartenstein, Würzburg
Sprühflasche (Ethanol 70 %)	Hartenstein, Würzburg
Pinzette	Assistent, Sondheim

## 2.4 Gebrauchsfertige Chemikalien und Lösungen

Tab. 5: Liste der gebrauchsfertigen Chemikalien und Lösungen.

Chemikalie/Lösung	Hersteller
1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT)	Serva, Heidelberg
Acrylamid/ Bisacrylamid, 30 % Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe

Chemikalie/Lösung	Hersteller
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
ANTI-FLAG® M2 Agarose	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bromphenolblau, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline)	GE Healthcare Life Sciences, Pasching (AT)
Essigsäure	J.T. Baker, Leipzig
Ethanol 96 %, denaturiert	J.T. Baker, Leipzig
Ethanol, absolut	J.T. Baker, Leipzig
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
FLAG Peptid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fötales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare Life Sciences, Pasching (AT)
Glycerin (86 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kristallviolett (Pulver)	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Midori Green Advance	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
RPMI-1640 Medium	GE Healthcare Life Sciences, Pasching (AT)
Salzsäure (1M)	VWR, Darmstadt
Silver Staining Marker (Low Molecular Weight)	GE Healthcare Life Sciences, Garching
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin 0,5 % 10x	GE Healthcare Life Sciences, Pasching (AT)
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich, Munich
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.5 Angesetzte Medien und Lösungen

Verwendete Lösungen und Puffer wurden in demineralisiertem Wasser hergestellt. Temperaturempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,20 µm) und thermisch stabile Lösungen autoklaviert (20 min bei 120 °C und 105 Pa feuchter Hitze). Um eine Kontamination durch genetisches Material oder Mikroorganismen zu vermeiden, wurden auch die Verbrauchsmaterialien Laborgeräte (z.B. Glaswaren, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße) autoklaviert.

Tab. 6: Liste der Medien und Lösungen für molekularbiologische Methoden.

Medium/Lösung	Zusammensetzung	
LB Agar Medium	1x 1,5 % (w/v)	LB Medium (5x konzentriert) Agar in ddH <sub>2</sub> O
Luria Bertani Medium (LB) (5x konzentriert)	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v)	Trypton Hefeextrakt NaCl in ddH <sub>2</sub> O gelagert bei 4 °C
Puffer I (Plasmid Mini-Präparation)	50 mM 10 mM 0,1 mg/ml	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA, pH 8,0 RNase A
Puffer II (Plasmid Mini-Präparation)	0,2 N 1 % (w/v)	NaOH SDS
Puffer III (Plasmid Mini-Präparation)	3 M	Natriumacetat, pH 4,8
TAE Puffer	2 M 1 M 0,1 M	Tris Essigsäure EDTA pH 8,3

Tab. 7: Liste der Medien und Lösungen für die Zellkultur.

Medium/Lösung	Zusammensetzung	
Einfriermedium für Zellstocks	10 %	DMSO in FCS
HEK293 Zellkultur-Medium: Standardkultur	10 %	FCS in RPMI-1640
während der Proteinproduktion	2 % 1 %	FCS und Pen/Strep in RPMI-1640
HT1080 Zellkultur-Medium: Standardkultur	10 %	FCS in RPMI-1640
für <i>in vitro</i> Testungen	10 % 1 %	FCS und Pen/Strep in RPMI 1640
Trypsin Arbeitslösung	1 x	Trypsin Stock-Lösung (10 x konzentriert) in PBS. gelagert bei 4 °C

Tab. 8: Liste von Chemikalien und Lösungen für Protein-biochemische Methoden.

Chemikalie/Lösung	Zusammensetzung	
Blocking Lösung (Western Blot)	5 % (w/v)	Milchpulver in PBS-T gelagert bei 4 °C
Blotpuffer (10x konzentriert)	25 mM 192 mM 20 % (v/v)	Tris Glycin Methanol pH 8,3 in demineralisiertem Wasser gelagert bei RT
Elektrophorese-Puffer Arbeitslösung	10 % (v/v)	Elektrophorese Puffer (10x konzentriert) in demineralisiertem Wasser gelagert bei RT
Elektrophorese-Puffer (10x konzentriert)	10 g/l (w/v) 30,3 g/l (w/v) 144,1 g/l (w/v)	SDS Tris Glycin in ultrapurem Wasser gelagert bei RT
Laemmli-Puffer (4x konzentriert)	0,2 M 40 % (v/v) 10 % (v/v) 8 % (w/v) 0,04 % (v/v)	Tris-HCl, 1,5 M (pH 6,8) Glycerin β-Mercaptoethanol SDS Bromphenolblau 1 % gelagert bei -20 °C
Sammelgelpuffer (4x konzentriert)	1,5 M 0,4 %	Tris SDS pH 8,8 gelagert bei RT
PBS Stocklösung (10x konzentriert)	0,02 M 0,7 % (w/v)	Natriumphosphat Natriumchlorid pH 7,2
PBS-T	100 ml 5 ml 900 ml	PBS Stocklösung Tween-20 (0,5 % v/v) demineralisiertes Wasser gelagert bei RT.
Laufpuffer (für SDS-PAGE) (10x konzentriert)	0,05 M 0,38 M 0,004 M	Tris Glycerin SDS pH 8,3
TBS Stocklösung (10x konzentriert)	0,02 M 8 % (w/v)	Tris Natriumchlorid pH 7,6
TBS-T	100 ml 5 ml 900 ml	TBS Stocklösung Tween-20 (0,5 % v/v) Demineralisiertes Wasser gelagert bei RT.
Trenngelpuffer (4x konzentriert)	0,5 M 0,4 %	Tris SDS pH 6,8 gelagert bei RT

Tab. 9: Liste der Medien und Lösungen für *in vitro* Testungen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung	
Assay Diluent	1x 10 % (v/v)	PBS FCS
Kristallviolett-Lösung	20 % (v/v) 0,5 % (w/v)	Methanol Kristallviolett
ELISA Coating Puffer	0,1 M	Natriumcarbonat pH 9,5
MTT Lysepuffer	50 % 15 %	Dimethylformamid SDS pH 4,7 (mit Essigsäure eingestellt) in 500 ml demineralisiertem Wasser
MTT Stocklösung (5x konzentriert)	500 mg 10 ml	MTT Pulver DMSO
MTT Arbeitslösung	1:5	MTT Stocklösung in PBS

## 2.6 Kommerzielle Kits

Tab. 10: Liste der verwendeten kommerziellen Kits.

Kit	Hersteller
BioLux <i>Gaussia</i> Luciferase Assay Kit	New England Biolabs, Frankfurt
DNA-Gel Extraction NucleoSpin Extract II Kit	MACHERY-NAGEL, Düren
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck Millipore, Darmstadt
OptEIA IL-8 ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Fermentas, St. Leon-Rot
Pierce Silver Stain Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

## 2.7 Antibiotika

Tab. 11: Liste der eingesetzten Antibiotika.

Antibiotikum	Stockkonz. (mg/ml)	Arbeitskonz. (µg/ml)	Hersteller
Ampicillin (Amp)	100	100	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin (Kan)	100	50	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	100	50	Sigma-Aldrich, Schnellendorf

## 2.8 Antikörper

Tab. 12: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Isotyp/Klon	Katalog-#/Hersteller
Anti-hBaffR-PE	mIgG1κ/11C1	#558097/BD Biosciences, Heidelberg
Anti-hBCMA-PE	mIgG2ακ/19F2	#357504/Biolegend, San Diego (USA)
Anti-hCD40-PE	mIgG1κ /HB14	#130-094-135/Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-hCD95	mIgG1/DX2	#MAB142/R&D Systems, Minneapolis, (USA)
Anti-Flag (M2)	mIgG1/monoklonal	#F3165-5MG/Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Anti-mouse-HRP	Rabbit/polyklonal	#P0260/Dako-Cytomation, Glostrup (DK)
Anti-IL8 (OptEIA ELISA)	OptEIA ELISA Kit/keine Information	#555244/BD Biosciences, Heidelberg
Anti-hTACI-PE	mIgG1/165604	#FAB1741P/R&D Systems, Minneapolis, (USA)
Anti-mIgG1κ-PE	Isotypkontrolle/11711	#IC002P/R&D Systems, Minneapolis, (USA)
Anti-mIgG2a-PE	Isotypkontrolle/20102	#IC003P/R&D Systems, Minneapolis, (USA)
Anti-mIgG2b-PE	Isotypkontrolle/133303	#IC0041P/R&D Systems, Minneapolis, (USA)
Anti-mIgG-PE	Goat/polyklonal	#P9670/ Sigma-Aldrich, Schnelldorf

## 2.9 Biologisches Material

### 2.9.1 Prokaryotische Zellen

Alle Plasmide wurden in kompetente *E. coli* NEB 5-alpha (high efficiency) transformiert, die von New England Biolabs (Frankfurt) erworben wurden.

### 2.9.2 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien sind in Tab. 13 zusammengefasst und stammen aus -80°C Stammkulturen der Abteilung für Molekulare Medizin (MIM) am Universitätsklinikum Würzburg. Alle Zelllinienbestände wurden ursprünglich von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) oder der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas (USA)) bezogen und anschließend nach den Empfehlungen des Lieferanten kultiviert.

Tab. 13: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	DSMZ/ATCC #
786-0	Humane Nierenzell-Adenokarzinomzellen; adhären; Monolayer	CRL-1932
AMO-1	Humane Plasmazytomzellen; Suspension; einzeln	ACC-538
BJAB	Humane Burkitt-Lymphomzellen; Suspension; einzeln oder in Klumpen	ACC-757
HaCaT	Humane Keratinozyten; adhären; Monolayer	CVCL-0038
HCT-116	Humane Colon-Karzinomzellen; adhären; Monolayer	ACC-581
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen; adhären; Monolayer	ACC-305
HeLa	Humane Zervix-Karzinomzellen; adhären; Monolayer	ACC-57
HL-60	Humane akut myeloide Leukämiezellen; Suspension; einzeln	ACC-3
HT1080	Humane Fibrosarkomzellen; adhären; Monolayer	ACC-315
HT-29	Humane Colon-Adenokarzinomzellen; adhären; Monolayer	ACC-299
INA-6	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension; einzeln	CVCL-5209
JEKO-1	Humane B-Zell Lymphomzellen; Suspension; einzeln	ACC-553
JJN-3	Humane Plasmazell-Leukämiezellen; Suspension; einzeln	ACC-541
Jurkat	Humane akut lymphoblastische Leukämie-T-Zellen; Suspension; einzeln oder in Klumpen	ACC-282
KMS-11	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension; einzeln	CVCL-2989
KMS-12-BM	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension; einzeln	ACC-551
Kym-1	Humane alveolare Rhabdomyosarkomzellen; Suspension; einzeln	CVCL-3007
L-363	Humane Plasmazell-Leukämiezellen; Suspension; einzeln	ACC-49
MDA-MB-231	Humane Brustkrebszellen; adhären; Monolayer	ACC-732
Mino	Humane B-Zell Lymphomzellen; Suspension; einzeln	ACC-687
MM.1S	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension oder semi-adhären; einzeln	CRL-2974
OPM-2	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension; einzeln	ACC-50
OVCAR-3	Humane Ovar-Adenokarzinomzellen; adhären; Monolayer	ACC-507
PANC-1	Humane Pankreas-Karzinomzellen; adhären; Monolayer	ACC-783
Raji	Humane Burkitt-Lymphomzellen; Suspension; einzeln oder in Klumpen	ACC-319
Ramos (RA1)	Humane Burkitt-Lymphomzellen; Suspension; einzeln oder in Klumpen	ACC-603
RPMI-8226	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension oder semi-adhären; einzeln	ACC-402
SKOV-3	Humane Ovar-Adenokarzinomzellen; adhären; Monolayer	HTB-77
U2OS	Humane Osteosarkomzellen; adhären; Monolayer	ACC-785
U-266	Humane Multiple Myelomzellen; Suspension; einzeln	ACC-9
U-937	Humane histiozytische Lymphomzellen; Suspension; einzeln	ACC-5

## 2.10 Plasmide und rekombinante Fusionsproteine

Die in Tab. 14 aufgeführten Plasmide wurden wie aufgelistet von folgenden Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin kloniert, transfiziert und getestet: Daniela Weisenberger (DW), Moritz Rothaug (MR), Johannes Nelke (JN).

Tab. 14: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmidname	Plasmid #	Klonierung	Produktion/ Testung
CD40(h)-pCR3	5/511	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-hlgG1-pCR3	7/181	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-hlgG1-scBAFF-pCR3	7/646	JN	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-N297A-pCR3	7/291	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-N297A-scBAFF-pCR3	7/513	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-N297A-scFv-CD20-pCR3	7/414	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-N297A-scFv-anti-CD70(9G2)-pCR3	7/540	MR	MR/JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-N297A-scTNF80(mu)-pCR3	7/384	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-FAB2(1-114)-pCR3	7/475	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VH-FAB2(1-114)-scBAFF-pCR3	7/647	JN	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VL-light-pCR3	7/182	DW	JN
anti-CD40(G28.5)-Flag-VL-light-Gaussia(w/o)-pCR3	7/237	JN	JN
Fas(h)-GPI-pCR3	5/852	DW	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-hlgG1-pCR3	7/288	JN	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-hlgG1-scBAFF-pCR3	7/525	DW	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-N297A-pCR3	7/413	DW	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-N297A-scBAFF-pCR3	7/555	DW/JN	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-N297A-scFv-anti-CD20-pCR3	7/502	DW	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-N297A-scFv-anti-CD70(9G2)-pCR3	7/591	MR	MR/JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-N297A-scTNF80(mu)-pCR3	7/481	DW	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-FAB2(1-114)-pCR3	7/474	DW	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VH-FAB2(1-114)-scBAFF-pCR3	7/648	JN	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VL-light-pCR3	7/289	DW/JN	JN
anti-Fas(E09)-Flag-VL-light-Gaussia(w/o)-pCR3	7/290	DW/JN	JN
BAFF-Flag-TNC-pCR3	6/403	DW	JN
BAFF-Gaussia-Flag-TNC-pCR3	6/650	DW	JN
BAFFR(h)-pCMV-SPORT6	5/672	DW	JN
APRIL(115-250)-Gaussia-Flag-TNC-pCR3	6/609	DW	JN
BCMA(h)-pCR3	5/523	DW	JN
TACI(h)-pCR3	5/526	DW	JN



**Tab. 15: Auflistung der HC- und LC-Plasmid-Kombinationen, die zur Ko-Transfektion und für die Produktion der Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine eingesetzt wurden.**

Antikörper(-Fusionsproteine)	HC-Plasmid	LC-Plasmid
$\alpha$ CD40-hIgG1	7/181	7/182
$\alpha$ CD40-hIgG1-GpL	7/181	7/237
$\alpha$ CD40-hIgG1-scBaff	7/646	7/182
$\alpha$ CD40-hIgG1(N297A)	7/291	7/182
$\alpha$ CD40-hIgG1(N297A)-scBaff	7/513	7/182
$\alpha$ CD40-hIgG1(N297A)-scBaff-GpL	7/513	7/237
$\alpha$ CD40-hIgG1(N297A)-CD20	7/414	7/182
$\alpha$ CD40-hIgG1(N297A)-CD70	7/540	7/182
$\alpha$ CD40-hIgG1(N297A)-sc(mu)TNF80	7/384	7/182
$\alpha$ CD40-Fab2	7/475	7/182
$\alpha$ CD40-Fab2-scBaff	7/647	7/182
$\alpha$ CD40-Fab2-scBaff-GpL	7/647	7/237
$\alpha$ CD95-hIgG1	7/288	7/289
$\alpha$ CD95-hIgG1-GpL	7/288	7/290
$\alpha$ CD95-hIgG1-scBaff	7/525	7/289
$\alpha$ CD95-hIgG1(N297A)	7/413	7/289
$\alpha$ CD95-hIgG1(N297A)-scBaff	7/555	7/289
$\alpha$ CD95-hIgG1(N297A)-scBaff-GpL	7/555	7/290
$\alpha$ CD95-hIgG1(N297A)-CD20	7/502	7/289
$\alpha$ CD95-hIgG1(N297A)-CD70	7/591	7/289
$\alpha$ CD95-hIgG1(N297A)-sc(mu)TNF80	7/481	7/289
$\alpha$ CD95-Fab2	7/474	7/289
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	7/648	7/289
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-GpL	7/648	7/290

**Tab. 16: Gendatenbank-Eintragungsnummern bzw. Patentnummern der verwendeten Antikörper-DNA-Sequenzen, der Verankerungsdomänen und des *Gaussia princeps* Luziferase-Tags.**

GenBank®: NIH genetic sequence database (ncbi.nlm.nih.gov/genbank)/ PDB: Protein Data Bank der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (rcsb.org)

DNA Sequenz	Eintragungs-/Patentnummer	Aminosäuren
G28.5-VH ( $\alpha$ CD40)	AJ853736 (GenBank®)	21-132
G28.5-VL ( $\alpha$ CD40)	AJ853736 (GenBank®)	148-260
E09-VH ( $\alpha$ CD95)	3TJE_H (PDB)	1-125
E09-VL ( $\alpha$ CD95)	3TJE_L (PDB)	1-111
CH-IgG1 (human)	AFR78282.1 (GenBank®)	121-452
CL-IgG1 (human)	AAD29610.1 (GenBank®)	1-106
<i>Gaussia princeps</i> Luziferase	AAG54095.1 (GenBank®)	18-185
sc(mu)TNF80	WO2019129644A1 (Patent)	-
scBaff	WO2019129644A1 (Patent)	-
9G2-scFv ( $\alpha$ CD70)	WO2012123586A1 (Patent)	-
Rituximab-scFv ( $\alpha$ CD20)	2OSL_A + 2OSL_B (PDB)	-

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Klonierung Fusionsprotein-kodierender Expressionsvektoren

Der pCR3-Expressionsvektor (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) wurde für die Klonierung der in dieser Arbeit beschriebenen Liganden-TNC- sowie Antikörper-Fusionsproteine verwendet (siehe 2.10). Das Ursprungs-Plasmid enthält eine Ampicillinresistenzkassette sowie eine Klonierungsstelle, die aus einem T7-Promotor und mehreren Schnittstellen für die Einführung von PCR-Produkten besteht.

Für die eigenständige Klonierung der Antikörper-Fusionsproteine wurden vorhandene  $\alpha$ CD40/ $\alpha$ CD95-Antikörper HC-kodierende Plasmide verwendet, die zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelt worden waren. Diese Plasmide enthielten bereits eine Leader-Sequenz, die Flag-Tag-Sequenz, die Nukleotidsequenzen der V<sub>H</sub>-Fragmente und die zugehörigen Sequenzen der IgG1-C<sub>H</sub>-Fragmente, die jeweils an einzelnen Schnittstellen eingefügt wurden. Über separate Schnittstellen wurden die jeweiligen Verankerungsdomänen-kodierenden DNA-Sequenzen zusammen mit Linker-Sequenzen im Anschluss an die Sequenzen der C<sub>H</sub>-Fragmente angefügt. Hierzu wurden die neuen Antikörper-Fusionsproteine durch Amplifikation der Nukleotidsequenzen der einzelnen Verankerungsdomänen (siehe 3.1.2), anschließendem Verdau dieser PCR-Produkte und des parentalen pCR3-Vektors (siehe 3.1.5) und die abschließende Ligation dieser beiden Produkte (siehe 3.1.6) kloniert.

#### 3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses Verfahren ermöglicht die exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz, die sich zwischen zwei Primern befindet. Das Verfahren besteht aus mehreren Zyklen der DNA-Doppelhelix-Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation spezifischer DNA-Sequenzen. Oligonukleotidprimer wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) im lyophilisierten Zustand bestellt und auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/ $\mu$ l verdünnt.

Reaktionsansatz für die KOD Polymerase:		PCR Cycler Programm:		
5 $\mu$ l	10x HF Puffer	1 Initiale Denaturierung	2 min	95 °C
3 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub>	2 Denaturierung	1 min	95 °C
1,5 $\mu$ l	Primer 1 (forward)	3 Primerhybridisierung	30 s	Y °C
1,5 $\mu$ l	Primer 2 (reverse)	4 Elongation	30 s	70 °C
5 $\mu$ l	20 mM dNTP Mix	5 Finale Elongation	5 min	70 °C
1 $\mu$ l	Template (1000 ng/ $\mu$ l)	6 Abkühlen	$\infty$	4 °C
1 $\mu$ l	KOD Hotstart Polymerase			
mit dH <sub>2</sub> O auf 50 $\mu$ l Endvolumen auffüllen				

Für die Amplifikation aller Sequenzen wurde die KOD Hotstart DNA Polymerase eingesetzt, welche über eine Korrekturlese-Funktion verfügt. Die Primerhybridisierungstemperatur (Y °C) wurde anhand der Schmelztemperatur der Primer bestimmt.

### 3.1.3 Trennung der DNA-Fragmente mittels horizontaler Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese mit Agarosegelen erfolgte in 1-2 % Agarosegelen. Für die Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE verdünnt und dann in der Mikrowelle erwärmt, bis alle Agarosepartikel vollständig gelöst waren. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde der Lösung Midori Green zugesetzt und die Lösung in eine Gelschale mit passendem Kamm gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt, vollständig mit 1x TAE abgedeckt und der Kamm entfernt. Vor dem Einfüllen der Proben in die Kamm-Vertiefungen wurden diese mit 6x DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:10 vorgemischt. Ein DNA-Marker mit Fragmenten bekannter Größe wurde zusätzlich in eines der Kamm-Vertiefungen eingebracht. Die Elektrophorese wurde bei 130 V für die gewünschte Zeit durchgeführt und die DNA anschließend mit Hilfe eines UV-Bildgebungssystems visualisiert und dokumentiert.

### 3.1.4 Aufreinigung der PCR-Fragmente

Um die Polymerase, dNTPs und andere Komponenten der PCR oder Restriktionsenzyme des Verdau zu entfernen, wurde die Reinigung von PCR-Fragmenten mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dieses Kit wurde sowohl für die DNA-Extraktion aus dem Agarosegel als auch für die Reinigung von flüssigen Verdauungspräparaten verwendet. Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Die DNA wurde mit 30-50 µl dH<sub>2</sub>O aus den Säulen eluiert.

### 3.1.5 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

#### 3.1.5.1 Standard DNA Verdau

Für den Verdau der amplifizierten PCR-Fragmente und der parentalen Plasmid-DNA wurden geeignete Restriktionsenzyme verwendet, welche zwei kohäsive Enden an der Restriktionsstelle zur weiteren Ligation der komplementären Enden ermöglichen (siehe 3.1.6). Der Reaktionsansatz wurde für 1-2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden die einzelnen Restriktionsverdau gereinigt, um die Enzyme zu entfernen (siehe 3.1.4).

#### Reaktionsansatz:

5 µl	10x NEB-Puffer
1 µl	jedes Enzyms
5 µl	aufgereinigte DNA
mit dH <sub>2</sub> O auf 50 µl Endvolumen auffüllen	

### 3.1.5.2 Kontrollverdau

Der Verdau des gereinigten Plasmidvektors pCR3 mit einem individuellen Set von Restriktionsenzymen führte zu einem linearen Strang und einer bestimmten Anzahl von Fragmenten mit einzigartiger Größe, wodurch es möglich war, das parentale Plasmid vom neuen Klonierungsprodukt zu unterscheiden. Der Reaktionsansatz wurde für 1-2 h bei 37 °C inkubiert und dann auf ein Agarosegel pipettiert, um die korrekte Größe der DNA-Fragmente zu überprüfen (siehe 3.1.3).

#### Reaktionsansatz:

2 µl	10x NEB-Puffer
0,5 µl	jedes Enzyms
3 µl	aufgereinigte DNA
mit dH <sub>2</sub> O auf 20 µl Endvolumen auffüllen	

### 3.1.6 Ligation der verdauten DNA-Fragmente

Das Rapid DNA Ligation™ Kit (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) wurde für die Ligation von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden verwendet, welche nach Restriktionsverdau (siehe 3.1.5) aus Wildtyp-Plasmiden und synthetisierten DNA-Inserts (siehe 3.1.2) gewonnen wurden. Die Reaktionsansätze wurden nach dem Herstellerprotokoll im Anschluss an die Ligation in kompetente NEB-5 *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 3.1.7).

#### Reaktionsansatz:

4 µl	<i>Rapid Ligation</i> Puffer
1 µl	Plasmid-DNA
3 µl	Insert-DNA
1 µl	T4 Ligase
mit dH <sub>2</sub> O auf 20 µl Endvolumen auffüllen	

### 3.1.7 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Die Transformation von ligierten Plasmiden in kompetente NEB-5 *E. coli*-Zellen wurde zur Amplifikation der Antikörper-Fusionsprotein-kodierenden Expressionsvektoren durchgeführt. Chemisch kompetente NEB-5-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend die DNA aus dem Ligationsmix hinzugefügt. Die Lösung wurde sanft gemischt und dann 30-45 min lang auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen 45 s langen Hitzeschock der Zellen bei 42 °C. Zur Regeneration wurden anschließend 250 µl SOC-Medium (RT) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 100 µl der Zellsuspension auf die geeignete Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.8 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 3.1.8.1 Mini-Präparation von Plasmiden

3 ml LB-Medium wurden mit Zellmaterial einer einzelnen Kolonie von der Transformations-Agarplatte beimpft (siehe 3.1.7) und über Nacht unter antibiotischer Selektion mit Ampicillin bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml dieser Nachtkultur in einer Tischzentrifuge (2 min,

RT, 13.000 rpm) zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer I resuspendiert und anschließend wurde die gleiche Menge Puffer II zugegeben. Nach mehrmaliger Invertierung des Röhrchens wurde das Gemisch 5 min lang bei RT inkubiert, 100 µl Puffer III zugegeben und das Röhrchen erneut drei- bis fünfmal invertiert. Diese Mischung wurde 5 min lang auf Eis gelegt und anschließend zentrifugiert (10 min, RT, 13.000 rpm), um die ausgefallenen Zellstrukturen und Proteine von der Plasmid-DNA zu trennen. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Sammelröhrchen gegeben und der letzte Schritt wiederholt, bis keine Präzipitationen mehr vorhanden waren. Anschließend wurde die Fällung der DNA durch Zugabe von 300 µl eiskaltem 70 %igem Isopropanol durchgeführt, wobei dieses Gemisch vorsichtig invertiert und zentrifugiert wurde (30 min, 4 °C, 13.000 rpm). Der Isopropanolüberstand wurde anschließend abgesaugt und die Plasmid DNA mit 300 µl eiskaltem, 70 %igem Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert (10 min, RT, 13.000 rpm). Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Plasmidpellet luftgetrocknet und anschließend in 30 µl sterilem dH<sub>2</sub>O gelöst. Diese Plasmid-DNA-Proben wurden kurzfristig bei 4 °C oder dauerhaft bei -20 °C gelagert.

#### **3.1.8.2 Midi-Präparation von Plasmiden**

Für eine ausreichende Amplifikation der Fusionsprotein-kodierenden Plasmide zur späteren Zelltransfektion (siehe 3.3.1) wurden 150 ml LB-Medium mit 100 µl Bakterienübernachtskultur beimpft und über Nacht unter antibiotischem Druck bei 37 °C inkubiert. 800 µl der Kultur wurden mit 200 µl Glycerin gemischt und als permanente Sicherung bei -80 °C eingefroren. Der Rest der Übernachtskultur wurde geerntet, in ein Zentrifugationsgefäß mit konischem Boden überführt und 10 min lang bei 5.000 rpm zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand entsorgt und die Plasmide aus dem Zellpellet mit dem PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert. Im letzten Schritt wurden die gereinigten Plasmide in 400 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA bestimmt (siehe 3.1.9) und die Richtigkeit der Nukleotidsequenz durch Sequenzierung überprüft (siehe 3.1.10). Die Plasmid-DNA-Proben wurden kurzfristig bei 4 °C oder dauerhaft bei -20 °C gelagert.

#### **3.1.9 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde durch Messung der optischen Dichte mit einem Photometer bei Absorptionsspektren von 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) bestimmt. Für diese Messungen wurde das Spektrophotometer GeneQuant Pro (Biochrom Ltd., Cambridge (UK)) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

#### **3.1.10 Vorbereitung der Sequenzierungsansätze**

Bakterienkolonien, die nach der Klonierung (siehe 3.1.1) und dem bestätigenden Kontrollverdau (siehe 3.1.5.2) gewachsen waren, wurden durch Sequenzierung des Plasmid aus der

Plasmidpräparation (siehe 3.1.8) analysiert. Zu diesem Zweck wurden 20 µl einer Lösung mit 100 ng/µl Plasmid in dH<sub>2</sub>O hergestellt. Diese Präparate wurden an GATC Biotech (Köln) gesendet und die Sequenzierungsergebnisse wurden mit exPASy und EMBOS Needle analysiert.

## **3.2 Zellkultur Methoden**

### **3.2.1 Kultivierung von Zelllinien**

Alle Zellkulturverfahren wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, in einem Inkubator bei 37 °C, einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % und unter dampfgesättigten Bedingungen kultiviert. Die Standardkultivierung erfolgte im Zell-spezifischem Medium, supplementiert mit 10 % FCS, welches vorab für ca. 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch auf ihre Morphologie, ihr Wachstum und eine mögliche Kontamination untersucht. Je nach Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert: Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-/EDTA-Lösung inkubiert, bis die Zellen ordnungsgemäß vom Boden der Kulturflasche gelöst waren. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für 4 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20-40 ml Medium mit 10 % FCS gelöst und die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 3.2.3). Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert, die schräg gelagert wurden. Zum Passagieren wurde ein Teil der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 4 min lang bei 800 rpm pelletiert und dann nach der gleichen Methode gezählt.

### **3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um die Zellkultur zu starten, wurden die Zellen aufgetaut, sofort in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem, Zell-spezifischem Medium überführt und für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, um das restliche DMSO zu entfernen, das Zellpellet in 10 ml frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt. Aufgetaute Zellen wurden mindestens einmal passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

Um einen Vorrat der Zellen in einer niedrigen Passage zu erhalten, wurden die Zellen in Kryoröhrchen eingefroren. Nach der Expansion wurden die Zellen hierfür durch Trypsinierung aus der Kulturflasche gelöst (siehe 3.2.1). Anschließend wurden die Zellen in Gefriermedium überführt. Diese Zellsuspension wurde auf Kryoröhrchen mit 1 ml pro Röhrchen verteilt und in die Gefrierbox eingesetzt. Dieser Behälter wurde sofort in den -80 °C Gefrierschrank gestellt.

### **3.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsiniert, geerntet und für 5 min bei 1200 rpm (adhärente Zellen) bzw. 800 rpm (Suspensionszellen) zentrifugiert. Anschließend wurden sie in

20-30 ml Medium resuspendiert. 10 µl dieser Mischung wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt und mindestens zwei von vier Quadranten unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl wurde dann wie folgt berechnet werden:

$$\text{Mittelwert}_{LZ} * \text{Kammerfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Lebendzellzahl/ml}$$

Mittelwert<sub>LZ</sub>: Mittelwert der lebenden Zellen / Kammerfaktor: 10<sup>4</sup> / Verdünnungsfaktor: z.B. 1

### 3.2.4 Durchflusszytometrie zur Detektion der Rezeptor-Expression

Um die Oberflächenexpression von Rezeptoren auf transient oder stabil transfizierten Zellen (siehe 3.3.1) oder Tumor-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und zweifach in PBS gewaschen. Nach der Zellzählung wurden mindestens 10<sup>5</sup> vitale Zellen pro Probe in 96-well Rundbodenplatten überführt. Durch Zentrifugation (4 min, 1.200 rpm) wurden die Zellen pelletiert, woraufhin der PBS-Überstand abgesaugt werden konnte und die Zellen mit 50 µl Rezeptor-spezifischen, Fluoreszenz (FITC/PE)-gelabelten Antikörpern bzw. passenden Isotyp-Kontrollen (nach Herstellerangaben verdünnt) inkubiert (45 min, 4 °C) wurden. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Oberflächenexpression der untersuchten Rezeptoren wurde schließlich mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) analysiert. Hierzu wurden die Zellen in Probenröhrchen überführt und die Fluoreszenz der Zell-gebundenen Antikörper über ein FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) detektiert.

## 3.3 Makromolekulare Methoden

### 3.3.1 Produktion der Liganden, Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine

Für die Herstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden die entsprechenden Expressionsplasmide mittels PEI-Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht. Zu diesem Zweck wurden adhärent wachsende HEK293-Zellen in 15 cm Zellkulturplatten gesät und bei 37 °C bis zum Erreichen der Konfluenz

#### Transfektionsmix:

36 µl PEI-Lösung (1 mg/ml)

12 µg Plasmid-DNA

in 2 ml RPMI 1640

inkubiert. Für die Herstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden die entsprechenden Expressionsplasmide mittels PEI-Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht. Zu diesem Zweck wurden adhärent wachsende HEK293-Zellen in 15 cm Zellkulturplatten gesät und bei 37 °C bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert. Der Transfektionsmix wurde bei RT für 10 min vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Zellkulturmedium vorsichtig gegen neues Medium (RPMI 1640, 1 % Pen/Strep) ausgetauscht, ohne die Zellen von den Zellkulturplatten abzulösen. Der Transfektions-mix wurde den Zellen tropfenweise zugegeben, die Platten wurden geschwenkt, um die Lösung gleichmäßig zu verteilen und dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen frisches Medium (RPMI 1640, 2 % FCS, 1 % Pen/Strep) ausgetauscht und die Zellen wurden 6-7 Tage lang ohne weiteren

Medienwechsel inkubiert. Schließlich wurde der Zellüberstand in 50 ml Zentrifugenröhrchen geerntet und 10 min lang bei 4.600 rpm zentrifugiert. Der Zell-freie Überstand wurde in sterile Gewinde-Laborflaschen überführt und entweder bei 4 °C oder bei -20 °C gelagert. Um die Stabilität der rekombinant exprimierten Proteine zu untersuchen und die produzierten Konzentrationen zu bestimmen, wurden Western Blots durchgeführt (siehe 3.4.1).

### **3.3.2 Aufreinigung der Antikörpervarianten aus Zellkulturüberstand mittels Anti-Flag M2 Affinitätsgel**

Proteinüberstände aus transienter Produktion (siehe 3.3.1) wurden mittels Affinitätschromatographie mit Anti-Flag M2 Agarosebeads nach Herstellerangaben aufgereinigt. 1 ml Anti-Flag M2 Affinity Gel Agarosebeads (Sigma, Deisenhofen) wurden für die Reinigung von 600 µg Protein verwendet. Die M2-Agarosebeads wurden auf eine Chromatographiesäule überführt und mit autoklaviertem TBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der proteinhaltige Überstand auf die Säule überführt und mittels Adjustierung der Tropfgeschwindigkeit ein langsamer, gleichmäßiger Fluss über die Beads gewährleistet, um eine Bindung der Flag-markierten Proteine an die Agarosebeads zu ermöglichen. Die Säule wurde bei 4 °C beladen und der Überstandes für maximal 2 Tage über die Säulen laufen gelassen. Der Durchfluss wurde für die spätere Untersuchung auf verbliebenes Protein gesammelt. Nach dem vollständigen Durchlauf wurde die Säule mit ca. 10-20 Säulenvolumen TBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe eines Überschusses an Flag-Peptid (100 µg/ml gelöst in TBS) eluiert. Die Elution wurde in Fraktionen von 0,5 ml in autoklavierten 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen gesammelt. Nach der vollständigen Elution wurden die Agarosebeads mit TBS gewaschen, dann in einer Glycerin/TBS-Lösung (50 % Glycerin in TBS, 0,02 % Natriumazid) gesammelt und bei -20 °C gelagert. Die eluierten Proteine wurden in PBS bei 4 °C über Nacht dialysiert, um überschüssiges Flag-Peptid und die restlichen Salze zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die Proteine steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Der Erfolg der Proteinaufreinigung wurde durch Silberfärbung nachgewiesen (siehe 3.4.1.4).

## **3.4 Protein-Biochemische Methoden**

### **3.4.1 Trennung der Proteinfragmente mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

#### **3.4.1.1 Herstellung des Polyacrylamidgels**

Alle entsprechenden Experimente wurden mit einer SDS-PAGE Polymerisation von 12 % durchgeführt. Nach Zugabe der letzten beiden Substanzen APS und TEMED wurde die Lösung gemischt, in die Gelkammer gefüllt und mit Isopropanol beschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation des SDS-Gels wurde das Isopropanol verworfen, das Sammelgel auf das Trenngel gefüllt und ein Kamm zur Bildung der Ladetaschen hinzugefügt.



Trenngel-Mix (10 ml):		Sammelgel-Mix (7 ml):	
3,9 ml	dH <sub>2</sub> O	3,8 ml	dH <sub>2</sub> O
4,4 ml	Acrylamid (30 %)	1,4 ml	Acrylamid (30 %)
2,75 ml	Trenngelpuffer	1,75 ml	Sammelgelpuffer
187 µl	10 % APS	84 µl	10 % APS
15,4 µl	TEMED	7 µl	TEMED

### 3.4.1.2 Lauf der SDS-PAGE

Die Proteinproben und der Molekulargewichtsstandard (Prestained Protein Marker Wide Range) wurden 5 min lang bei 95 °C gekocht und in die Gel-Taschen gefüllt. Für die Trennung der Proteine im elektrischen Feld wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell System (BioRad, München) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 40 mA und maximaler Spannung für ca. 1 h durchgeführt. Anschließend wurde das SDS-PAGE-Gel mit einer Silberfärbung (siehe 3.4.1.4) gefärbt oder für Western Blot Experimente (siehe 3.4.1.3) verwendet.

### 3.4.1.3 Western Blot

Für die Western Blot-Analyse wurden Proteinproben durch Elektrophorese auf einem 12 %igen SDS-PAGE-Gel getrennt (siehe 3.4.1). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine durch Nasskammer-Western-Blotting bei 1mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT mit 5 % Milchpulver in PBS-Puffer blockiert und über Nacht bei 4 °C in primärer Antikörperlösung auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal mit PBS-T für je 10 min gewaschen, mit der sekundären Antikörperlösung für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert und anschließend erneut dreimal gewaschen. Der Proteinnachweis von Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte mit dem LI-COR Odyssey® System (LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)).

### 3.4.1.4 Silbergelfärbung

Für die Silbergelfärbung wurden 200 ng der gereinigten Proteinproben durch Elektrophorese auf einem 12 %igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt (siehe 3.4.1). Anschließend wurde das Gel mit dem Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) nach dem Herstellerprotokoll gefärbt.

## 3.4.2 Größenausschluss-Chromatographie (SEC-HPLC)

Die Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography* (SEC)) wurde im Anschluss an die Aufreinigung von Antikörpern oder Antikörper-Fusionsproteinen angewendet, um die im Eluat befindlichen Moleküle anhand ihrer Größe aufzutrennen. Die SEC wurde in einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*

(HPLC))-System (Thermo Fisher UltiMate 3000 RS HPLC System) unter Verwendung der Größenausschluss LC-Säule MAbPac SEC-1 (7,8 x 300 mm; Thermo Fisher) durchgeführt. Das System wurde anhand des Standardprotokolls gestartet und equilibriert. Daraufhin wurden 20-50 µl des zu untersuchenden Antikörper-Eluats in eine Applikationsspritze aufgezogen und in den Injektor injiziert. Die Proteinprobe wurde bei einer konstanten Flussrate von 0,76 ml/min durch die Säule aufgetrennt und die Messergebnisse des Detektors bei 280 nm für 20 min aufgezeichnet. Weitere Proben wurden nach Ablauf eines Injektionszyklus nacheinander aufgetragen und nach demselben Prinzip aufgetrennt. Die einzelnen, gemessenen *Peaks* wurden schließlich in der Software Chromeleon ausgewertet.

### **3.5 Methoden zur *in vitro* Testung der Bindungseigenschaften und der funktionellen Aktivität**

#### **3.5.1 Gleichgewichtsbindungsstudien mittels GpL-Fusionsproteinen**

Die Gleichgewichtsbindungsstudien wurden mit transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 10 cm Zellkulturplatten im entsprechenden Medium (RPMI 1640, 10 % FCS) ausgesät und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Zielrezeptoren-kodierenden Plasmiden bzw. Leervektor-Kontrollen entsprechend des Protokolls zur Proteinproduktion transfiziert (siehe 3.3.1). Nach 24 h wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten abgelöst, gezählt und auf die positive Oberflächenexpression der transfizierten Rezeptoren hin gefacst (siehe 3.2.4). Nach Bestätigung der erfolgreichen Transfektion wurden die Zellen in separate Eppendorf-Gefäße (0,5-1x10<sup>6</sup> Zellen/Gefäß) pipettiert. Die Zielrezeptor-positiven bzw. -negativen Zellgruppen wurden daraufhin mit einer Verdünnungsreihe der GpL-getaggten Antikörpervarianten oder Liganden für 1 h bei 37 °C stimuliert. Danach wurden die Zellkulturüberstände abgesaugt und die Zellen zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, um den Überschuss an ungebundenen Antikörpern oder Liganden zu entfernen. Nach der vollständigen Entfernung des PBS wurden die Zellen in 50 µl Medium (RPMI 1640, 0,5 % FCS, 1 % Pen/Strep) resuspendiert und auf eine schwarze 96-Well-Platte übertragen. Um die GpL-Aktivität der Zell-gebundenen Moleküle in den unterschiedlich behandelten Wells zu quantifizieren, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 µl Luziferaselösung (BioLux *Gaussia* luciferase assay Kit) gestartet. Die Lumineszenz der Proben und einer definierten Menge an GpL-Standardlösung wurde gemessen (Anthos Lucy 2 Luminometer). Dadurch war es möglich, die Menge der relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) in die Anzahl der detektierten Moleküle umzurechnen.

#### **3.5.2 Interleukin 8 Enzyme-linked Immunosorbent Assays (IL8 ELISA)**

ELISA-Experimente wurden zur Charakterisierung der Rezeptoraktivierung nach erfolgter Antigen:Antikörper-Bindung durchgeführt. Dazu wurden Effektor-Zellen, welche nach Rezeptoraktivierung NF-κB-Signalwege und die Sekretion von IL8 induzieren, in 96-Well-

Flachbodenplatten ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Well) in einem Volumen von 100  $\mu$ l Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) ausgesät und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen 16-18 h lang mit 100  $\mu$ l der angegebenen Konzentrationen der verschiedenen Antikörpervarianten und/oder der entsprechenden Liganden in Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) behandelt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Proben 30 min vor der eigentlichen Stimulation bei RT oligomerisiert, indem sie entweder mit Flag-spezifischen Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) für die Liganden oder Protein G (1  $\mu$ g/ml) für die Antikörper inkubiert wurden. Im Falle der Behandlung mit potenziell Apoptose-induzierenden Konstrukten, wurden 50  $\mu$ l Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) versetzt mit 2,5  $\mu$ g/ml CHX und 20 mM zVAD 30 min vor der eigentlichen Stimulation auf die Zellen aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen mit 50  $\mu$ l der entsprechenden Konstrukt-Konzentrationen behandelt. Parallel zu dieser Stimulation wurden 96-Well-ELISA-Platten mit humanem anti-IL8-Antikörper (OptEIA ELISA Kit) nach Herstellerangaben über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurde diese ELISA-Platten nach dreimaligem Waschen mit PBS-T mit *Assay Diluent* blockiert und 1 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift mit PBS-T dreimal wiederholt. Die Zellüberstände der Stimulations-Platten wurden daraufhin auf die ELISA-Platten übertragen und für 2 h bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde eine IL8-Standardlösung (2-0,5 ng/ml) auf diese Platten aufgebracht, um eine genaue Bestimmung der IL8-Konzentrationen der Proben zu ermöglichen. Nach fünf weiteren Waschschrritten wurde eine Mischung aus biotinyliertem anti-IL8-Antikörper und Streptavidin-HRP für 1 h auf die Platten aufgebracht. Nach der Bindung und sieben Waschschrritten wurde die Menge an gebundenem IL8 in jeder einzelnen Probe durch Zugabe des HRP-Substrats ABTS nachgewiesen und durch Messung der Wellenlänge bei 405 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

### 3.5.3 Zytotoxizitäts-Assays

#### 3.5.3.1 Zytotoxizitäts-Assay mit adhärenen Zelllinien mittels Kristallviolett

Um die zytotoxische Wirkung der in dieser Arbeit beschriebenen Antikörperkonstrukte und Liganden zu bestimmen, wurde die jeweils genannte, adhärenente Zelllinie in 96-Well-Flachbodenplatten ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Well) in einem Volumen von 100  $\mu$ l Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) ausgesät und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der Reagenzien stimuliert. 30 min vor der eigentlichen Stimulation wurden 2,5  $\mu$ g/ml CHX auf die Zellen aufgetragen. Je nach Ansatz erfolgte eine Oligomerisierung der einzelnen Varianten 30 min vor der eigentlichen Stimulation bei RT mit entweder Flag-spezifischen Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) für die Liganden oder Protein G (1  $\mu$ g/ml) für die Antikörper. Die Zellviabilität der adhärenen Zellen wurde nach 18 h mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Dazu wurden die Zellüberstände verworfen und die Zellen mit 80  $\mu$ l/Well Kristallviolettlösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol) für 20 min bei RT behandelt. Nach dem Entfernen des Überschusses an Kristallviolettlösung wurden die Platten dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und an der Luft getrocknet. Im Folgenden wurde das verbleibende Kristallviolett durch Zugabe von 160  $\mu$ l/Well Methanol und Schütteln für 20 min bei RT gelöst.

Schließlich wurden die Platten bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) gemessen. Der normierte Prozentsatz der überlebenden Zellen wurde unter Berücksichtigung von unbehandelten Kontrollzellen (100 % Zellviabilität) und Zellen, die vollständig durch einen sogenannten "Killer-Mix" (5 µg/ml CHX, 200 ng/ml TRAIL-TNC, 200 ng/ml CD95L-F, 200 ng/ml TNF-F, 1 µg/ml anti-Flag M2) (0 % Zellüberleben) abgetötet wurden, berechnet.

### **3.5.3.2 Zytotoxizitäts-Assay mit Suspensionszellen mittels MTT**

Das Überleben von Suspensionszellen wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. Die Suspensionszelllinien wurden hierzu in einem Volumen von 50 µl Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) in 96-Well-Platten ( $6 \times 10^4$  Zellen pro Well) ausgesät. Daraufhin wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von Antikörpern oder Liganden zu einem Endvolumen von 100 µl über Nacht stimuliert. Je nach Versuchsansatz erfolgte eine Oligomerisierung der einzelnen Varianten 30 min vor der eigentlichen Stimulation bei RT mit entweder Flag-spezifischen Antikörpern (1 µg/ml) für die Liganden oder Protein G (1 µg/ml) für die Antikörper. Am nächsten Tag wurde eine Mischung aus MTT-Lösung (10 µl) und PBS (25 µl) für 2 h bei 37 °C in jedes Well gegeben. Anschließend wurden 90 µl/Well MTT-Lysepuffer zugegeben, die Platten mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Die Messung wurde am nächsten Tag bei 570 nm im ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) durchgeführt und die Zellviabilität wie oben beschrieben bestimmt (siehe 3.5.3.1).

### **3.5.4 Ko-Kultur Experimente**

Um die funktionelle Aktivität von Antikörpern oder Antikörper-Fusionsproteinen in Abhängigkeit zu einer Immobilisierung an FcγRs oder den Rezeptoren BaffR/BCMA/TACI zu bestimmen, wurden Ko-Kultur Experimente mit Effektor- und Verankerungszellen durchgeführt.

CD40- bzw. CD95-exprimierende Effektorzellen wurden in 96-Well-Flachbodenplatten ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Well) in einem Volumen von 100 µl Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die jeweils angegebenen Konzentrationen an Antikörpern bzw. Antikörper-Fusionsproteinen in einem Endvolumen von 100 µl Medium (RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) mit entsprechenden Verankerungszellen bzw. Kontrollzellen gemischt, um eine mögliche Immobilisierung der Konstrukte zu ermöglichen. Nach dem Entfernen des Zellkulturmediums aus den 96-Well-Flachbodenplatten mit den konfluent angewachsenen Effektorzellen, wurden die Konstrukt:Verankerungszell-Suspensionen bzw. die Konstrukt:Kontrollzell-Suspensionen zu den Effektorzellen pipettiert und die so entstandenen Ko-Kulturen für 16-24 h bei 37 °C kultiviert. Je nach verwendetem Konstrukt und dem gewünschten Ausleseparameter (IL8 Sekretion oder Zellvitalität) wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben (siehe 3.5.2 und 3.5.3), vorbehandelt. Am nächsten Tag wurden die Ko-Kultur Experimente je nach Fragestellung entweder mittels IL8 ELISA (siehe 3.5.2) oder Zytotoxizitäts-Assay (siehe 3.5.3.1) analysiert.

## 4 Ergebnisse

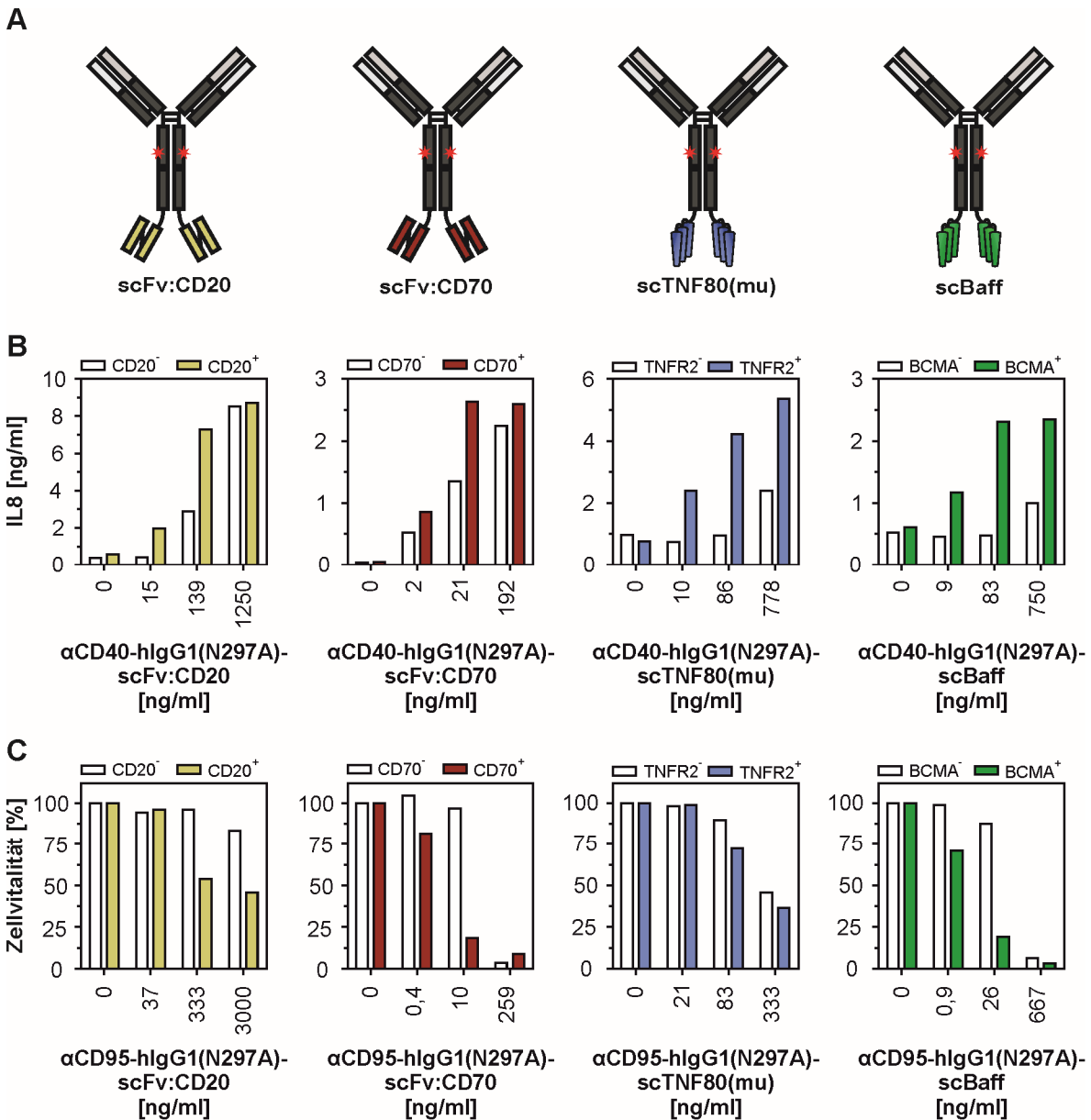
Antikörper gegen eine Vielzahl an TNFRSF Rezeptoren sind für die Induktion einer starken Rezeptoraktivierung auf eine Bindung an FcγRs oder eine sekundäre Quervernetzung angewiesen. Kürzlich konnte jedoch das Prinzip sowie die Funktionalität von FcγR-unabhängig und dafür Verankerungsdomänen-abhängig, agonistisch wirkenden Antikörper-Fusionsproteinen anhand TNFR2- und TRAILR-spezifischer Konstrukte beschrieben werden (Shivange *et al.* 2018, Medler *et al.* 2019, Siegemund *et al.* 2018). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte darauf aufbauend *in vitro* untersucht werden, ob diese vielversprechende Methode auch für andere Mitglieder der TNFRSF genutzt werden kann. Hierzu wurden ein CD40-spezifischer (G28.5) und ein CD95-spezifischer (E09) Antikörper gewählt, um die Effektivität des Prinzips sowohl anhand eines Mitglieds der Zell-aktivierenden Rezeptoren als auch der Todesrezeptoren der TNFRSF zu untersuchen. Anhand dieser beiden Ausgangsantikörper wurde zunächst eine Verankerungsdomäne ausgewählt und daraufhin die Bindungseigenschaften sowie die Rezeptor-aktivierenden Eigenschaften dieser neuen Antikörper-Fusionsproteine – wie in den folgenden Ergebnisabschnitten beschrieben – systematisch *in vitro* analysiert.

### 4.1 Evaluierung unterschiedlicher Verankerungsdomänen an CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen

An die Nukleotidsequenzen des CD40-spezifischen Antikörpers G28.5 (folgend: αCD40) und des CD95-spezifischen Antikörpers E09 (folgend: αCD95) wurden mittels Standardtechniken Sequenzen kloniert, die entweder für ein scFv-Fragment oder ein einzelkettiges Ligandentriemer der TNFSF kodieren. Hierbei erfolgte die Klonierung an die schweren Ketten der FcγR-bindungsdefizienten N297A-Varianten, sodass die scFv- bzw. scTNFSF-Ligand-Verankerungsdomäne innerhalb des Antikörper-Fusionskonstrukts C-terminal positioniert vorlag. Auf diese Weise wurden initial acht Antikörper-Fusionsproteine kloniert und getestet: αCD40-Fusionsproteine, die an hCD20 (scFv:CD20), hCD70 (scFv:CD70), muTNFR2 (sc(mu)TNF80) und die humanen Baff-Rezeptoren BaffR/BCMA/TACI (scBaff) binden, sowie entsprechende αCD95-Fusionsproteine (Abb. 5A). Um zu untersuchen, ob diese neuartigen Antikörper-Fusionsproteine tatsächlich Verankerungsdomänen-abhängig agonistisch wirken, wurde die Aktivierung des CD40-Rezeptors über die IL8-Sekretion und die Aktivierung des CD95-Rezeptors über die Zellvitalität als experimentellen Ausleseparameter analysiert. Hierfür wurden CD40-positive HT1080-CD40- bzw. CD95-positive HT1080-Zellen mit entsprechenden CD20-, CD70-, TNFR2- bzw. BCMA-exprimierenden Verankerungszellen oder passenden Kontrollzellen ko-kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörper-Fusionsproteine stimuliert.

Alle αCD40-Fusionsproteine mit Verankerungsdomänen induzierten konzentrationsabhängig die Sekretion von IL8, wenn sie mit Zellen ko-kultiviert wurden, die das Zielstruktur der Verankerungsdomäne exprimierten (Abb. 5B). Hierbei führten die Varianten αCD40-IgG1(N297A)-scTNF80(mu) und αCD40-IgG1(N297A)-scBaff in Kombination mit Zielstruktur-positiven Verankerungszellen bereits bei Konzentrationen unter 10 ng/ml zu deutlich messbarer

CD40-Aktivierung, wohingegen in Ko-Kultur mit Zielstruktur-negativen Zellen einzig bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 778 ng/ml bzw. 750 ng/ml eine niedrige CD40-Aktivierung festzustellen war. Die Varianten  $\alpha$ CD40-IgG1(N297A)-scFv:CD20 und  $\alpha$ CD40-IgG1(N297A)-scFv:CD70 führten zwar ebenso zu einer konzentrationsabhängigen IL8-Sekretion in Gegenwart von CD20<sup>+</sup> und CD70<sup>+</sup>-Zellen, jedoch konnte mit diesen beiden Konstrukten auch in Ko-Kulturen mit Zielstruktur-negativen Zellen bereits eine deutlich messbare CD40-Aktivierung induziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass diese beiden Varianten aus Gründen, die später diskutiert werden, per se ein nicht zu vernachlässigendes agonistisches Potenzial haben und ein verringertes therapeutisches Fenster in der weiteren Entwicklung zulassen.



**Abb. 5:** Nach Analyse unterschiedlicher Verankerungsdomänen fällt die Wahl auf Antikörper-scBaff-Fusionsproteine zur weiteren Charakterisierung.

(A) Schematischer Aufbau der untersuchten Antikörper-Fusionsproteine mit C-terminaler scFv:CD20-, scFv:CD70-, scTNF80(mu)- oder scBaff-Verankerungsdomäne an der schweren Kette. (B) Funktionelle Analyse der genannten

$\alpha$ CD40-IgG1(N297A)-Fusionsproteine mittels IL8 ELISA. HT1080-CD40 Zellen wurden mit CD20-, CD70-, TNFR2- oder BCMA-positiven bzw. –negativen Zelllinien ko-kultiviert und mit den angegebenen Antikörperkonzentrationen stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die Quantifizierung der IL8-Sekretion. (C) Die Funktionalität der  $\alpha$ CD95-IgG1(N297A)-Fusionsproteine wurde mittels Zytotoxizitätsexperimenten untersucht. Hierzu wurden CD95-positiv HT1080 Zellen mit CD20-, CD70-, TNFR2- oder BCMA-positiven bzw. –negativen Zelllinien ko-kultiviert und mit den angegebenen Antikörperkonzentrationen stimuliert. Die Zellvitalität wurde am nächsten Tag mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

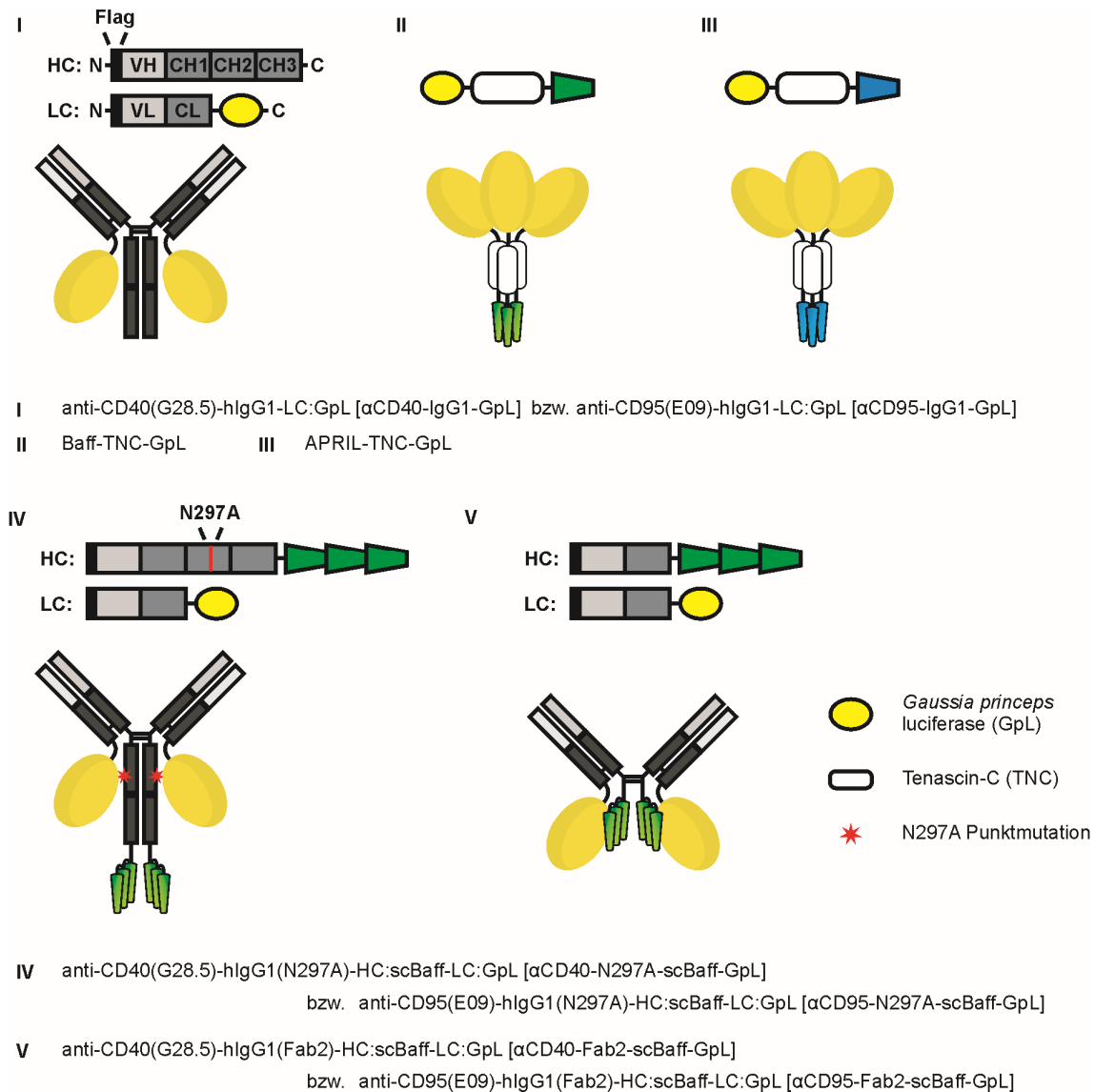
Innerhalb des  $\alpha$ CD95-Fusionsprotein-Panels konnte mit  $\alpha$ CD95-IgG1(N297A)-scTNF80(mu) lediglich ein sehr geringer Verankerungsdomänen-abhängiger Effekt beobachtet werden, während alle drei anderen Konstrukte in Gegenwart von Zielstruktur-positiven Verankerungszellen deutlich stärker den CD95-vermittelten Zelltod induzierten, als in Ko-Kultur mit den Kontrollzellen (Abb. 5C). Hierbei führte  $\alpha$ CD95-IgG1(N297A)-scFv:CD20 bei Konzentrationen über 37 ng/ml zu einer Reduzierung der Zellvitalität, während  $\alpha$ CD95-IgG1(N297A)-scFv:CD70 und  $\alpha$ CD95-IgG1(N297A)-scBaff bereits unter 1 ng/ml CD95-aktivierend wirkten.

Unter Berücksichtigung der funktionellen Eigenschaften aller acht Antikörper-Fusionsproteine, konnte durch Fusion der scBaff-Verankerungsdomäne sowohl an den  $\alpha$ CD40- als auch den  $\alpha$ CD95-Antikörper eine überaus gute Verankerungsdomänen-abhängige Potenzierung der agonistischen Aktivität erzielt werden, weshalb diese Domäne als attraktivster Lead-Kandidat für die weitere, systematische *in vitro* Charakterisierung dieser und weiterer CD40- und CD95-spezifischer Antikörper-Fusionsproteine ausgewählt wurde. Da vorrangig der Fc $\gamma$ R-unabhängige Agonismus der Antikörper-Fusionsproteine untersucht werden sollte, wurden die wesentlichen Experimente mit der Fc $\gamma$ R-defizienten N297A-Variante und der Fc $\gamma$ R-bindungsunwirksamen Fab2-Variante durchgeführt.

## **4.2 Analyse der Rezeptorbindung von N- und C-terminaler Bindedomäne der Antikörper-Fusionsproteine und Vergleich mit den ursprünglichen Antikörpern oder Liganden**

Um die Antikörper-scBaff-Fusionsproteine zu charakterisieren, sollte zunächst untersucht werden, ob die C-terminale Fusion der Verankerungsdomäne an die schweren Ketten einen potenziell negativen Effekt auf die Affinität der N-terminalen Bindedomäne gegenüber CD40 bzw. CD95 ausübt. Darüber hinaus sollte ebenfalls die Bindefähigkeit der scBaff-Verankerungsdomäne an die drei nativen Rezeptoren BaffR, BCMA und TACI analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die erfolgreich etablierte Methodik der zellulären Bindungsstudien mittels *Gaussia princeps* Luziferase (GpL)-getaggten Antikörper-Fusionsproteinen angewandt. Dass der C-terminal an die leichten Ketten gekoppelte GpL-Tag keinen Einfluss auf die Bindefähigkeit von Antikörpern hat, konnte bereits zuvor gezeigt werden (Kums *et al.* 2017). Daher wurden Antikörper-Fusionsproteine der konventionellen CD40- und CD95-Antikörper kloniert ( $\alpha$ CD40-IgG1-LC:GpL bzw.  $\alpha$ CD95-IgG1-LC:GpL), Antikörper-Fusionsproteine mit C-terminal konjugiertem GpL-Tag an den leichten sowie scBaff-Verankerungsdomäne an den schweren Ketten ( $\alpha$ CD40-N297A/Fab2-HC:scBaff-LC:GpL bzw.  $\alpha$ CD95-N297A/Fab2-HC:scBaff-

LC:GpL) und Fusionsproteine der natürlichen Baffr-/BCMA-/TACI-Liganden Baff und April mit interner TNC-Trimerisierungsdomäne (Baff-TNC-GpL/ April-TNC-GpL) (Abb. 6).



**Abb. 6: Schemata der mit *Gaussia princeps* Luziferase-Tag konjugierten Antikörper-Fusionsproteine und Liganden**

Die Bindungsstudien wurden auf HEK293 Zellen durchgeführt, die transient mit den entsprechenden Rezeptoren transfiziert wurden. Wie anhand von FACS-Experimenten gezeigt werden konnte, exprimierten die mit einem Leervektor transfizierten Kontrollzellen keinen der untersuchten Rezeptoren, wohingegen die mit Baffr-, BCMA-, TACI-, CD40- oder CD95-kodierendem Expressionsvektor transfizierten HEK293-Zellen die jeweiligen Rezeptoren allesamt exprimierten (Abb. 7A). Die  $\alpha$ CD40- und die  $\alpha$ CD95-scBaff-GpL-Fusionsproteine haben sowohl in der N297A- als auch der Fab2-Variante mit überaus vergleichbarer Affinität an Baffr gebunden wie trimeres Baff (Abb. 7B). Der trimere Ligand April zeigte dagegen keine Bindung an Baffr, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Bossen und Schneider 2006).



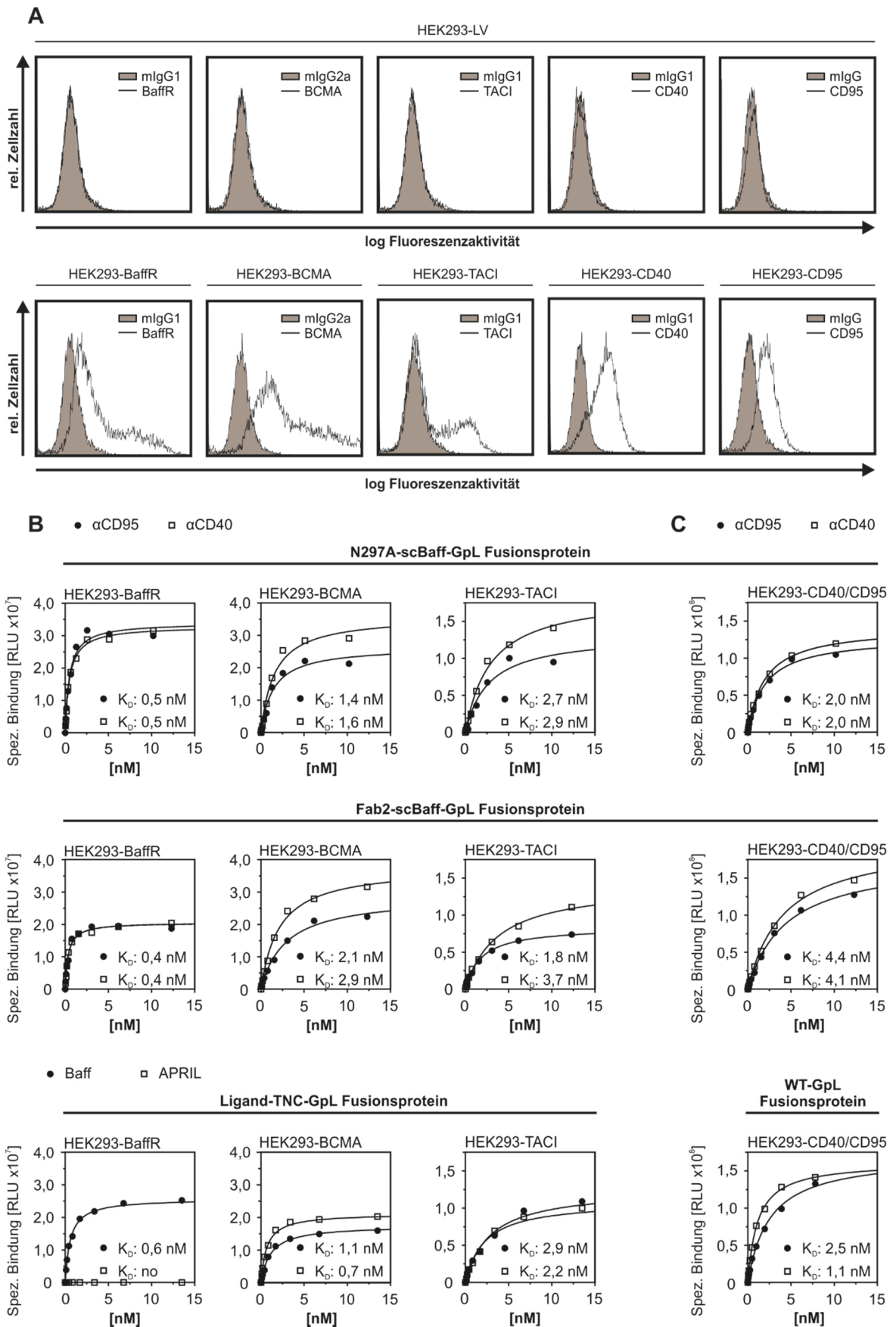


Abb. 7: Vergleichbare Affinitäten der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine und der Ausgangs-Antikörpern bzw. Liganden an die entsprechenden Rezeptoren.

## Ergebnisse

(A) FACS-Analyse von HEK293-Zellen, die transient mit einem Leervektor (LV) oder Expressionsplasmiden transfiziert wurden, die BaffR, BCMA, TACI, CD40 und CD95 kodieren. (B, C) Spezifische Bindung von GpL-getaggten Varianten der CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine. LV-transfizierte Zellen wurden verwendet, um die unspezifische Bindung zu bestimmen, und HEK293-Transfektanten, die den angegebenen TNFRSF-Rezeptor ektopisch exprimieren wurden verwendet, um die Gesamtbindung zu bestimmen. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindungswerte von den entsprechenden Gesamtbindungswerten berechnet. Es werden Daten eines repräsentativen Experiments angezeigt. Die durchschnittlichen  $K_D$ -Werte von 4 unabhängigen Experimenten sind in Tab. 17 aufgeführt.

**Tab. 17: Übersicht der Affinitäten aller getesteten Antikörper-GpL-Fusionsproteine zu den jeweiligen Zielrezeptoren.**

GpL-Fusionsproteine	$K_D$ Einzelwerte (nM)	$K_D$ Mittelwerte (nM)
<b>BaffR</b>		
Baff-TNC	0,6/0,6/0,5/0,5	0,5 ± 0,1
APRIL-TNC	-	-
αCD40-N297A-scBaff	0,5/0,4/0,2/1,3	0,6 ± 0,5
αCD40-Fab2-scBaff	0,4/0,7/0,4/1,3	0,7 ± 0,4
αCD95-N297A-scBaff	0,5/0,5/0,2/1,2	0,6 ± 0,4
αCD95-Fab2-scBaff	0,4/0,6/0,3/0,8	0,5 ± 0,2
<b>BCMA</b>		
Baff-TNC	2,2/4,0/1,1/2,3	2,4 ± 1,2
APRIL-TNC	1,6/2,4/0,7/1,5	1,5 ± 0,7
αCD40-N297A-scBaff	1,6/2,5/3,7/3,6	2,8 ± 1,0
αCD40-Fab2-scBaff	1,9/2,9/2,8/2,1	2,4 ± 0,5
αCD95-N297A-scBaff	1,4/3,6/4,3/1,8	2,8 ± 1,4
αCD95-Fab2-scBaff	1,5/2,1/2,6/1,6	1,9 ± 0,5
<b>TACI</b>		
Baff-TNC	2,9/3,0/2,2/2,1	2,6 ± 0,5
APRIL-TNC	2,2/1,4/1,0/2,0	1,6 ± 0,6
αCD40-N297A-scBaff	1,5/2,0/2,8/2,9	2,3 ± 0,7
αCD40-Fab2-scBaff	3,3/1,6/3,7/2,0	2,6 ± 1,0
αCD95-N297A-scBaff	1,5/1,7/3,0/2,7	2,2 ± 0,7
αCD95-Fab2-scBaff	2,0/1,5/1,8/1,8	1,8 ± 0,2
<b>CD40</b>		
αCD40-WT	1,2/1,3/1,1/1,0	1,1 ± 0,1
αCD40-N297A-scBaff	1,4/1,2/1,7/2,0	1,6 ± 0,3
αCD40-Fab2-scBaff	1,8/2,5/4,1/2,6	2,7 ± 1,0
<b>CD95</b>		
αCD95-WT	1,7/1,9/2,5/3,8	2,5 ± 0,9
αCD95-N297A-scBaff	1,7/2,1/3,0/2,0	2,2 ± 0,5
αCD95-Fab2-scBaff	4,6/4,3/4,9/4,4	4,5 ± 0,3

Die Bindung der beschriebenen Antikörper-Fusionsproteine an BCMA und TACI war ähnlich konsistent, wobei die Affinitäten der αCD40-Varianten in allen Experimenten stets etwas niedriger ausfielen, als die der entsprechenden αCD95-Varianten (Abb. 7B). In vergleichbarer Relation war auch die Bindung von Baff an BCMA und TACI schwächer, als die Bindung von April an diese Rezeptoren. Lediglich die Fab2-Varianten haben im Vergleich zu den Liganden geringfügig schwächer an BCMA und TACI gebunden. Dennoch kann konstatiert werden, dass die scBaff-Verankerungsdomäne gekoppelt an sämtlichen untersuchten Antikörper-Fusionsproteinen an alle drei Baff-bindenden Rezeptoren hoch-affin im niedrigen nanomolaren

Bereich binden konnte. Die gemittelten Affinitäten aus vier unabhängigen Experimenten untermauern diese Feststellung (Tab. 17).

Die N-terminale CD40- bzw. CD95-spezifische Antigen-Bindedomäne der N297A-Antikörper-Fusionsproteine zeigte ebenfalls eine hoch-affine Bindung an CD40-/CD95-positive Zellen. Im Vergleich zu den Ausgangsantikörpern ohne scBaff-Verankerungsdomäne konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 7C, Tab. 17), sodass ein negativer Einfluss der C-terminalen Verankerungsdomänen-Konjugation ausgeschlossen werden konnte. Die Fab2-Antikörper-Fusionsproteine mit scBaff-Verankerungsdomäne zeigten eine leicht schwächere CD40- bzw. CD95-Bindung (Abb. 7C), was auch anhand der gemittelten Affinitätswerte deutlich wurde (Tab. 17). Zwar lag der  $K_D$ -Wert der Fab2-scBaff-Varianten um den Faktor 2,5 (CD40) bzw. 1,8 (CD95) höher, als der  $K_D$ -Wert der Ausgangsantikörper, doch diese geringfügige Abweichung hat erfahrungsgemäß keine negative Auswirkung auf die Rezeptor-aktivierenden Eigenschaften.

Bezogen auf die Rezeptorbindung von N- und C-terminaler Bindedomäne kann festgehalten werden, dass alle untersuchten  $\alpha$ CD40- und  $\alpha$ CD95-scBaff-GpL-Fusionsproteine mit sehr vergleichbaren, hohen Affinitäten an BaffR, BCMA, TACI sowie CD40 bzw. CD95 binden, wie auch die ursprünglichen Bindungspartner und somit auch funktionell keine inhibierenden Wechselwirkungen der unterschiedlichen Bindedomänen untereinander zu erwarten waren.

### **4.3 Identifizierung der geeigneten Zelllinien und Kultivierungsbedingungen für die funktionelle Analyse der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine**

Nachdem erfolgreich nachgewiesen wurde, dass die jeweiligen Verankerungsdomänen der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine an die unterschiedlichen Zielstrukturen binden, sollte im Weiteren die Funktionalität der Konstrukte analysiert werden. Um die Aktivierung von CD40 und CD95 im Rahmen von IL8 ELISA- und Zytotoxizitäts-Experimenten zu untersuchen, mussten zunächst passende Zelllinien identifiziert werden, welche die Rezeptoren CD40 bzw. CD95 exprimieren und diese auch ausreichend aktivieren. Darüber hinaus sollten Ko-Kultur-experimente mit Zellen durchgeführt werden, die einen oder mehrere der Zielproteine der Verankerungsdomäne, also BaffR, BCMA oder TACI, exprimieren. Zu diesem Zweck mussten ebenfalls geeignete Zelllinien identifiziert werden.

#### **4.3.1 Bestimmung der Oberflächenexpression von CD40, CD95 sowie BaffR, BCMA und TACI auf unterschiedlichen Tumor-Zelllinien**

Mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie wurden 32 Tumor-Zelllinien, die zur Kultivierung innerhalb der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen, systematisch auf die Oberflächenexpression von CD40 und CD95 sowie der scBaff-Zielrezeptoren BaffR, BCMA und TACI untersucht. Hierdurch konnten insgesamt 13 Zelllinien identifiziert werden, die einen oder mehrere der scBaff-Zielrezeptoren in unterschiedlichen Graden exprimierten (Tab. 18, Abb. S 1). Diese BaffR-/BCMA-/TACI-positiven Zelllinien waren Amo1 (BCMA<sup>++</sup>), BJAB (BaffR<sup>++</sup>/TACI<sup>(+)</sup>), JEKO-1 (BaffR<sup>+</sup>), KMS11 (BCMA<sup>+</sup>/TACI<sup>(+)</sup>), KMS-12-BM (BCMA<sup>+++</sup>/BaffR<sup>(+)</sup>), L-363 (BCMA<sup>++</sup>/TACI<sup>(+)</sup>),

Mino (Baffr<sup>+</sup>), MM.1S (BCMA<sup>+++</sup>/TACI<sup>(+)</sup>), OPM-2 (BCMA<sup>+++</sup>), Raji (BCMA<sup>(+)</sup>/Baffr<sup>+</sup>), Ramos RA1 (BCMA<sup>+</sup>/Baffr<sup>(+)</sup>), RPMI-8226 (BCMA<sup>++</sup>/Baffr<sup>(+)</sup>) und U-266 (BCMA<sup>+++</sup>).

**Tab. 18: Bewertung der mittels Durchflusszytometrie untersuchten Oberflächenexpression der Rezeptoren Baffr, BCMA, TACI, CD40 und CD95 auf verschiedenen Tumorzelllinien.**

- = <5 % Expression, (+) = 5-10 % Expression, + = 11-40 % Expression, ++ = 41-70 % Expression, +++ = >70 % Expression.

Name	Ursprung	BAFFR	BCMA	TACI	CD40	CD95
Baffr-/BCMA-/TACI-positive Zelllinien						
AMO-1	Multipl. Myelom	-	++	-	-	(+)
BJAB	B-Zell-"Non-Hodgkin"-Lymphom	++	-	(+)	+++	+
JEKO-1	B-Zell-"Non-Hodgkin"-Lymphom	+	-	-	+++	(+)
KMS-11	Multipl. Myelom	-	+	(+)	-	+++
KMS-12-BM	Multipl. Myelom	(+)	+++	-	+++	+++
L-363	Plasmazell-Leukämie	-	++	(+)	-	-
Mino	B-Zell-"Non-Hodgkin"-Lymphom	+	-	-	++	-
MM.1S	Multipl. Myelom	-	+++	(+)	+++	+
OPM-2	Multipl. Myelom	-	+++	-	-	-
Raji	B-Zell-"Non-Hodgkin"-Lymphom	+	(+)	-	+	++
Ramos (RA1)	B-Zell-"Non-Hodgkin"-Lymphom	(+)	+	-	+++	-
RPMI-8226	Multipl. Myelom	(+)	++	-	+	(+)
U-266	Multipl. Myelom	-	+++	-	-	+
Baffr-/BCMA-/TACI-negative Zelllinien						
786-0	Nierenzell-Karzinom	-	-	-	+++	-
HaCaT	Keratinocyten (prim. epidermal)	-	-	-	+	(+)
HCT-116	Kolon-Karzinom	-	-	-	+++	+
HEK-293	Niere (prim. embryonal)	-	-	-	++	(+)
HeLa	Zervix-Karzinom	-	-	-	-	+
HL-60	Leukämie (akut myeloisch)	-	-	-	-	-
HT1080	Fibrosarkom	-	-	-	-	+++
HT1080-CD40	Fibrosarkom	-	-	-	+++	++
HT-29	Kolon-Karzinom	-	-	-	-	(+)
INA-6	Multipl. Myelom	-	-	-	-	-
JJN-3	Plasmazell-Leukämie	-	-	-	-	-
Jurkat	Leukämie (akut lymphoblastisch)	-	-	-	-	+++
Kym-1	Rhabdomyosarkom	-	-	-	-	-
MDA-MB-231	Mamma-Karzinom	-	-	-	+++	-
OVCAR-3	Ovarial-Karzinom	-	-	-	+++	+++
PANC-1	Pankreas-Karzinom	-	-	-	+++	-
SKOV-3	Ovarial-Karzinom	-	-	-	++	-
U2OS	Osteosarkom	-	-	-	+++	+
U-937	Histiozyt-"Non-Hodgkin"-Lymphom	-	-	-	+++	-

Diese Tumor-Zelllinien gehören alle zur Gruppe der B-Zellen und repräsentieren verschiedene Differenzierungsstadien von ausschließlich Baffr-positiven unreifen oder nativen B-Zellen bis hin zu ausdifferenzierten BCMA-/TACI-positiven Plasmazellen. Dagegen konnte auf den restlichen 19 Zelllinien keiner der drei scBaffr-Zielrezeptoren detektiert werden, wodurch ein breites Spektrum an Baffr-/BCMA-/TACI-positiven sowie –negativen Zelllinien für die geplanten Ko-Kultur-Experimente zur Verfügung stand. Die Expression der beiden Rezeptoren CD40 und CD95 konnte über beide Gruppen hinweg in unterschiedlicher Intensität beobachtet werden

(Tab. 18, Abb. S 1). Insgesamt wurden 19 CD40-positive und 18 CD95-positive Zelllinien identifiziert, die potenziell als Effektorzellen für die funktionellen Experimente in Frage kamen.

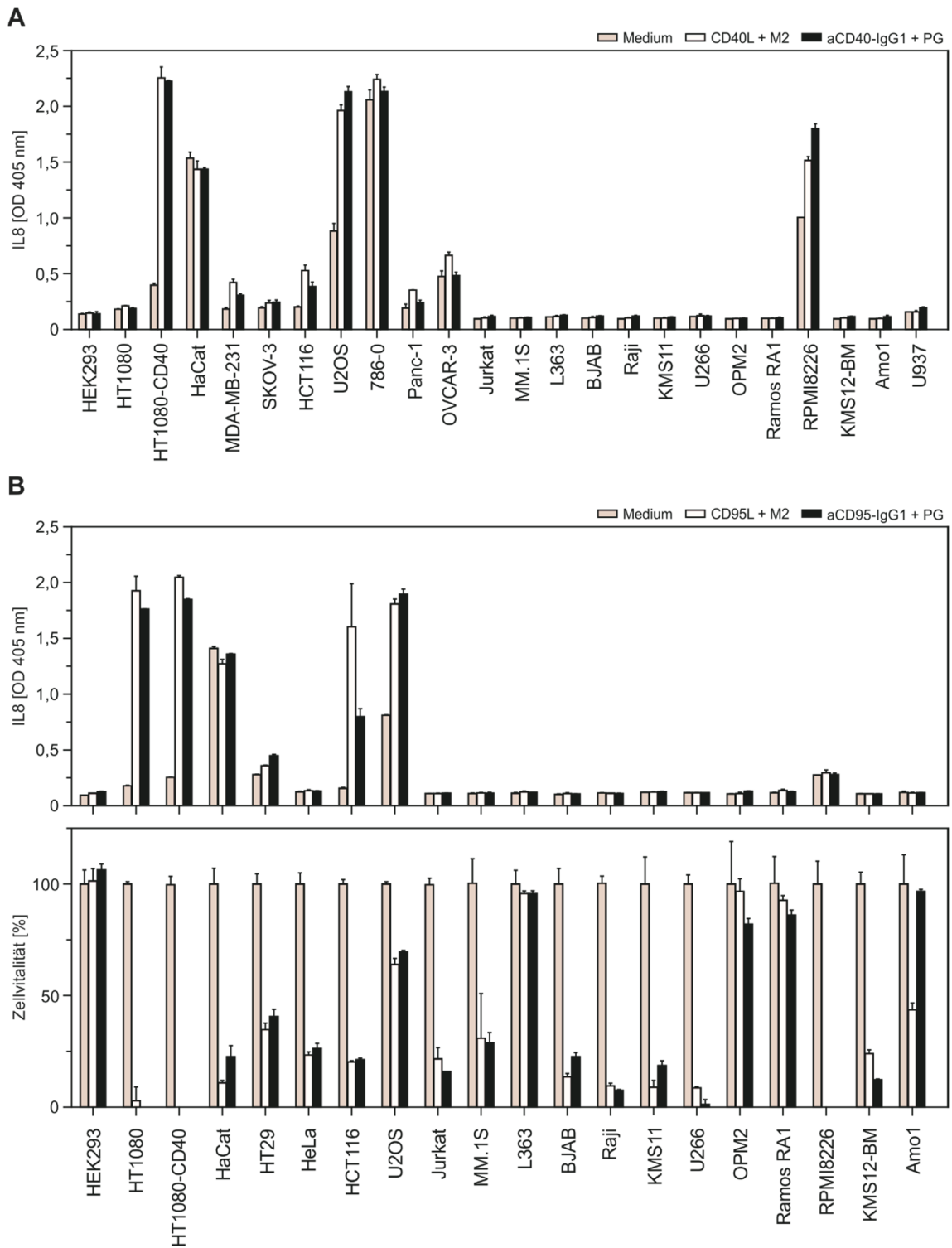
### 4.3.2 Ermittlung der für die Analyse der Ziel-Rezeptoraktivierung geeigneten Zelllinien

Folgend auf die Charakterisierung der exprimierten Rezeptoren wurden potenziell für die Ziel-Rezeptoraktivierung geeignete Zelllinien in einer Vor-Versuchsreihe untersucht. Hierzu wurden die Zellen entweder mit quervernetztem Liganden oder quervernetztem konventionellem Antikörper bzw. Medium als Negativkontrolle inkubiert, um herauszufinden, ob sich die Zellen CD40- bzw. CD95-spezifisch aktivieren lassen. Hierzu wurden 100 ng/ml der entsprechenden Liganden bzw. Antikörper eingesetzt, was Konzentrationen entspricht, die in der Literatur als ausreichend für die Aktivierung von CD40/CD95 beschrieben sind.

In einer ersten Versuchsreihe wurden 24 Zelllinien daraufhin untersucht, ob sie sich mit M2-quervernetztem CD40L oder Protein G-quervernetztem  $\alpha$ CD40-IgG1-Antikörper derartig aktivieren lassen, dass eine erhöhte IL8-Sekretion mittels ELISA messbar ist (Abb. 8A). Der  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 bindet dabei den Flag-getaggten Liganden und Protein G die Fc-Domäne der Antikörper, was in beiden Fällen zu einer Quervernetzung und daraus resultierenden Oligomerisierung der gebundenen Rezeptoren führt. Hierbei konnte bei bereits zuvor etablierten HT1080-CD40 Transfektanten ein deutlicher Anstieg in der IL8-Sekretion nach Stimulation mit sowohl CD40L als auch  $\alpha$ CD40 im Vergleich zu Medium-behandelten Zellen festgestellt werden. Ebenso führten beide Stimulantien bei U2OS Zellen zu einer gesteigerten IL8-Sekretion. Alle weiteren Zelllinien zeigten eine vergleichbar geringe oder gar keine CD40L- oder  $\alpha$ CD40-induzierte IL8-Produktion.

Nach demselben Prinzip wurden auch 20 Zelllinien hinsichtlich der Induktion von IL8-Sekretion oder der Auswirkung auf die Zellvitalität durch CD95L- bzw.  $\alpha$ CD95-Stimulation untersucht (Abb. 8B). Die Zelllinien HT1080 und HT1080-CD40 zeigten beide nach Stimulation durch sowohl CD95L als auch den  $\alpha$ CD95-Antikörper eine deutliche CD95-vermittelte Hochregulierung der IL8-Sekretion sowie eine komplette Inhibition der Zellvitalität. Zwei andere Zelllinien, die CD95-vermittelte Effekte zeigten, waren HCT116 und U2OS. Allerdings war im Fall der U2OS Zellen lediglich eine Verringerung der Zellvitalität auf 75 % festzustellen. In den HCT116 Zellen wiederum ließ sich eine deutliche Verringerung der Zellvitalität induzieren, wohingegen die IL8-Sekretion nach CD95L-Stimulation wesentlich besser induziert werden konnte, als nach  $\alpha$ CD95-Stimulation. Von den restlichen Zelllinien ließ sich zwar in vielen Fällen eine Verringerung der Zellvitalität erzielen, jedoch keine IL8-Induktion.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Versuchsreihen wurden die Zelllinien HT1080-CD40 und U2OS als geeignete Zellen zur Analyse der CD40-Aktivierung und die Zelllinie HT1080 zur Analyse der CD95-Aktivierung ausgewählt. Mit Ausnahme der RPMI-8226 Zellen, die per se in erhöhtem Maß IL8 produzierten, ließen sich bei allen anderen BaffR-/BCMA-/TACI-positiven Zelllinien lediglich geringe IL8-Konzentrationen messen, sodass sie sich als geeignete Zellen für Ko-Kulturexperimente anboten.



**Abb. 8: Identifizierung von Tumorzelllinien, die als Konsequenz der CD40-Stimulation IL8 sekretieren bzw. nach CD95-Aktivierung IL8 ausschütten oder Zelltod induzieren.**

(A) Die angegebenen Zelllinien wurden in Triplikaten mit 100 ng/ml CD40-Ligand, der zuvor mit 1 µg/ml anti-Flag M2 quervernetzt wurde, mit 100 ng/ml αCD40-IgG1-Antikörper, der vorab mit 1 µg/ml Protein G quervernetzt wurde, oder einer Medium-Kontrolle stimuliert. Am nächsten Tag wurde die IL8-Sekretion anhand eines IL8-ELISAs bestimmt.

(B) Die dargestellten Zelllinien wurden in Triplikaten mit 100 ng/ml CD95-Ligand oder 100 ng/ml αCD95-IgG1-Antikörper, die wie zuvor beschrieben quervernetzt wurden, bzw. einer Medium-Kontrolle über Nacht stimuliert. Daraufhin wurden die Induktion der IL8-Sekretion mittels ELISA und die Abnahme der Zellvitalität mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

#### **4.3.3 Bestimmung der geeigneten Kultivierungsbedingungen für Experimente mit CD95-spezifischen Antikörpern und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine**

Ausgehend von mehreren wissenschaftlichen Veröffentlichungen ist im Zusammenhang mit der Aktivierung von Todesrezeptoren die Sensitivierung von Zellen *in vitro* ein akzeptiertes Vorgehen, um zytotoxische Effekte zu verstärken (Fulda *et al.* 2000, Kreuz *et al.* 2001). Dieses Erkenntnis konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie bestätigt werden (siehe Abb. S 2B im Anhang). Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass es sich bei der CD95-vermittelten Verringerung der Zellvitalität in den verwendeten Zellen um Apoptose handelt und dass diese, wie in der Literatur beschrieben, durch den Apoptose-Blocker zVAD inhibiert werden kann (siehe Abb. S 2A im Anhang) (Susin *et al.* 1997, Siegmund *et al.* 2007). Anhand dieser Ergebnisse wurden sämtliche Zytotoxizitäts-Experimente unter CHX-Vorinkubation und alle Zell-aktivierenden Versuche, die mit IL8 als Ausleseparameter erfolgten, unter CHX + zVAD-Vorbehandlung durchgeführt. Zum Zweck der Übersichtlichkeit wird die IL8-Sekretion in den weiteren Ergebnisbeschreibungen gleichgesetzt mit dem Begriff der CD40- bzw. CD95-Aktivierung, auch wenn formal nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch eine Aktivierung dieser Rezeptoren ohne anschließend messbare IL8-Sekretion möglich ist. Des Weiteren wird die CD95-vermittelte Verringerung der Zellvitalität im Folgenden gleichgesetzt mit dem Begriff der Apoptose oder dem kontrollierten Zelltod, kurz Zelltod.

#### **4.4 Evaluation der FcγR-abhängigen und –unabhängigen Rezeptoraktivierung unterschiedlicher Varianten der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine**

Die grundsätzliche Annahme dieser Arbeit ist, dass die FcγR-Abhängigkeit Des Agonismus von  $\alpha$ TNFRSF-Antikörpern durch die neuartige Verwendung von Verankerungsdomänen ersetzt werden kann. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden die konventionellen  $\alpha$ CD40- und  $\alpha$ CD95-Antikörper des IgG1 Isotyps mit entsprechenden Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen im IgG1-, N297A- oder Fab2-Format verglichen, indem die TNFR-aktivierenden Eigenschaften in Ko-Kulturrexperimenten mit FcγR-exprimierenden Zellen bzw. mit Zellen, die die Zielstruktur BaffR der Verankerungsdomäne exprimieren, beurteilt wurden. Um zu berücksichtigen, dass Antikörper über die Fc-Domäne sowohl an stimulatorische als auch an inhibitorische Fcγ-Rezeptoren binden und dadurch unterschiedliche Immunmechanismen verstärken bzw. verringern können, wurde der Vergleich mit jeweils einem Vertreter der aktivierenden Fcγ-Rezeptoren (CD64) und einem der inhibitorischen (CD32B) durchgeführt. CD64 wurde hierbei ausgewählt, da dieser unter den stimulatorischen Fcγ-Rezeptoren die höchste Affinität zu IgG1-Antikörpern aufweist (Nimmerjahn und Ravetch 2008). CD32B wurde ausgewählt, da trotz seiner geringen IgG1-Affinität eine hohe Bedeutung im Zusammenhang mit dem Rezeptoragonismus von therapeutischen CD40-IgG1-Antikörpern für diesen inhibitorischen Fcγ-Rezeptor beschrieben wurde (White *et al.* 2013, F. Li und Ravetch 2013).

Zunächst wurden die unterschiedlichen CD40-spezifischen Antikörper- und Antikörper-Fusionsprotein-Varianten auf HT1080-CD40 Zellen miteinander verglichen (Abb. 9A). Hierbei

konnte in Ko-Kulturen mit Leervektor (LV)- oder BaffR-transfizierten HEK293 Zellen nach Stimulation mit dem konventionellen  $\alpha$ CD40-IgG1-Antikörper erst bei einer Konzentration  $\geq 500$  ng/ml in beiden Ko-Kulturen mäßige IL8-Konzentrationen gemessen werden. Dagegen trat eine CD40-Aktivierung in Ko-Kulturen mit CD64- und CD32B-transfizierten Zellen bereits bei  $\alpha$ CD40-IgG1-Konzentrationen im einstelligen ng/ml-Bereich auf und die IL8-Konzentrationen gingen bereits ab 50 ng/ml in Sättigung. Ein nahezu identisches Ergebnis ließ sich unter Verwendung des  $\alpha$ CD40-IgG1-scBaff-Fusionsproteins in Ko-Kulturen mit HEK-LV, -CD64 und -CD32B Zellen erzielen. Zusätzlich ließ sich in Ko-Kulturen mit BaffR-transfizierten Zellen ein Grad der CD40-Aktivierung erzielen, der im Vergleich zur Fc $\gamma$ R-vermittelten Aktivierung mindestens genauso gut ausfiel. Das  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff-Fusionsprotein führte in Ko-Kultur mit HEK-BaffR mit derselben Effizienz zur CD40-Aktivierung. Allerdings wurde in Ko-Kulturen mit CD32B-transfizierten Zellen nur noch ein minimaler Effekt erzeugt, der vergleichbar mit der Verwendung von LV-transfizierten Zellen ausfiel. Das Maß an CD40-Aktivierung nach Inkubation dieses Konstrukts mit einer Kombination von HT1080-CD40 und HEK-CD64 war außerdem um etwa den Faktor 10 schwächer, als unter Verwendung des IgG1-Formats beobachtet. Das letzte untersuchte Format, die  $\alpha$ CD40-Fab2-scBaff-Variante, führte weder in Ko-Kulturen mit HEK-LV noch mit Fc $\gamma$ R-exprimierenden Zellen zu einer erheblichen CD40-Aktivierung, wobei in Ko-Kulturen mit HEK-BaffR erneut eine vergleichbar starke CD40-Aktivierung erreicht werden konnte, wie nach Stimulation mit den beiden anderen Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen.

Die CD95-spezifischen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine wurden mittels Zytotoxizitätsexperimenten charakterisiert (Abb. 9B). Hier zeigte der  $\alpha$ CD95-IgG1-Antikörper lediglich in Ko-Kultur mit Fc $\gamma$ R-exprimierenden Zellen einen verstärkten TNFR-aktivierenden Effekt (Zelltod, der um den Faktor 10-100 höher lag als in HEK-LV oder HEK-BaffR Ko-Kulturen). In vergleichbarer Relation konnte auch mit den drei Antikörper-Fusionsproteinen  $\alpha$ CD95-IgG1-scBaff,  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff und  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff eine Zelltodinduktion in Ko-Kultur mit HEK-BaffR erzielt werden. Dagegen zeigten alle drei Varianten in Ko-Kultur mit den Fc $\gamma$ R-exprimierenden Zellen lediglich einen geringen ( $\alpha$ CD95-IgG1-scBaff) oder keinen nennenswert besseren Effekt (N297A- und Fab2-scBaff-Varianten) als unter Verwendung der LV-transfizierten Zellen. Aus welchem Grund der  $\alpha$ CD95-IgG1-scBaff Fusionsantikörper nicht ebenfalls im vergleichbaren Maße Fc $\gamma$ R-abhängig CD95 aktiviert, wie der konventionelle  $\alpha$ CD95-IgG1-Antikörper, und ob sich dies in weiteren Experimenten bestätigen lässt, wurde im weiteren Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.



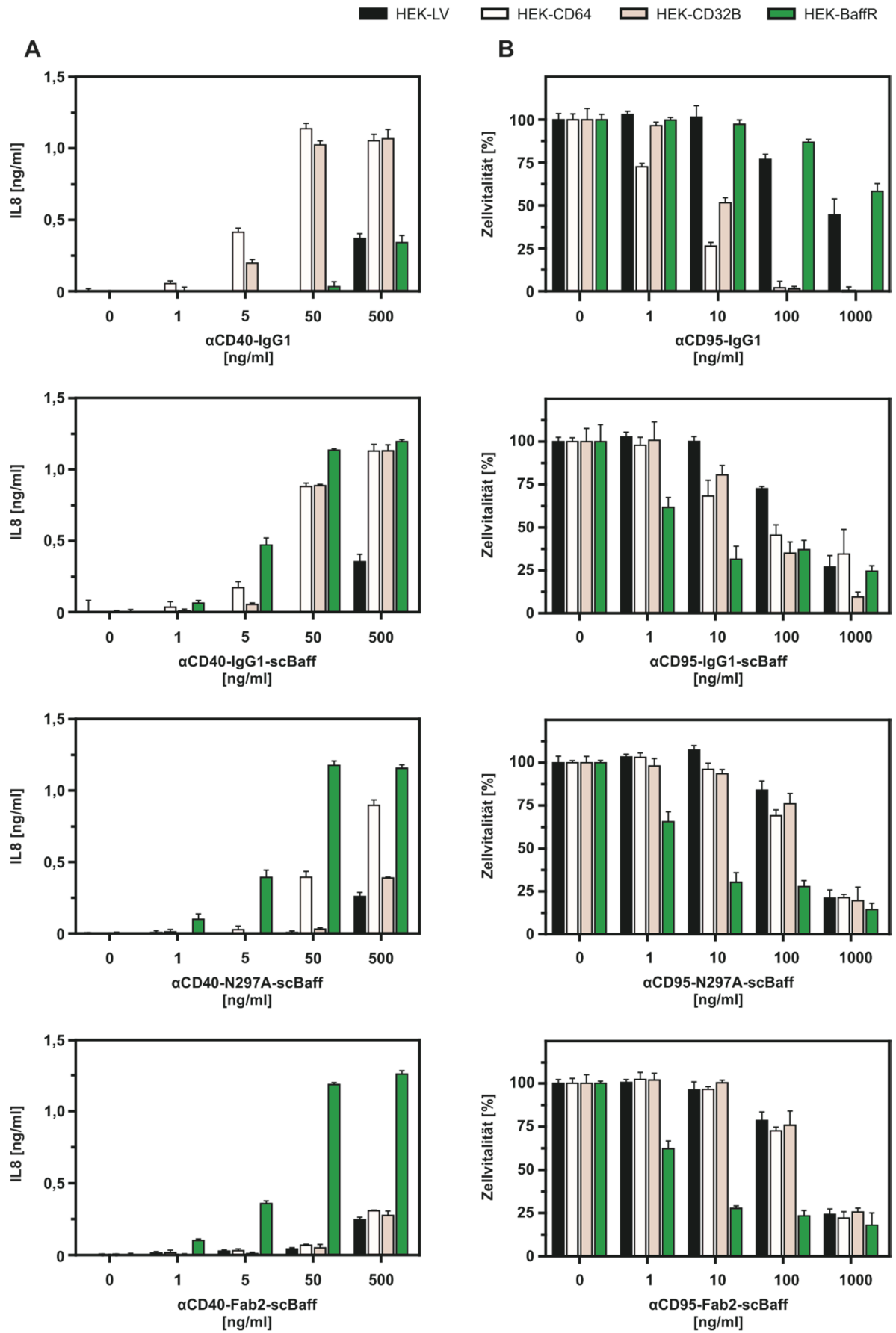


Abb. 9: FcγR-unabhängige, agonistische Aktivität der N297A- und Fab2-scBaff-Fusionsproteine.

HT1080-CD40- (A) oder HT1080-Zellen (B) wurden in 96-Well-Platten gesät und am nächsten Tag mit HEK293-Zellen ko-kultiviert, die transient mit einem Leervektor (LV) oder Expressionsplasmiden transfiziert wurden, die für den stimulierenden Fc $\gamma$ R CD64, den inhibierenden Fc $\gamma$ R CD32B oder BaffR kodieren. Die Ko-Kulturen wurden dann mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen CD40- (A) bzw. CD95-spezifischen (B) Antikörpervarianten stimuliert. Im Falle der CD95-spezifischen Reagenzien wurden 2,5  $\mu$ g/ml CHX zugesetzt, um HT1080-Zellen für die Apoptoseinduktion zu sensibilisieren. Am nächsten Tag wurde die CD40-vermittelte IL8-Induktion durch ELISA (A) und die CD95-induzierte Apoptose durch Kristallviolett-Färbung der überlebenden adhären Zellen (B) quantifiziert.

Da mithilfe dieser Experimente erfolgreich bestätigt werden konnte, dass die N297A-scBaff- sowie die Fab2-scBaff-Fusionsproteine Fc $\gamma$ R-unabhängig dafür jedoch Verankerungsdomänen-vermittelt, BaffR-restringiert die CD40-/CD95-Aktivierung induzieren können, wurde der Fokus in den weiteren Analysen auf diesen beiden Varianten gelegt.

### **4.5 Bewertung der Produktionseffizienz und des Aggregationsgrades der Antikörper und Antikörper-scBaff-Fusionsproteine**

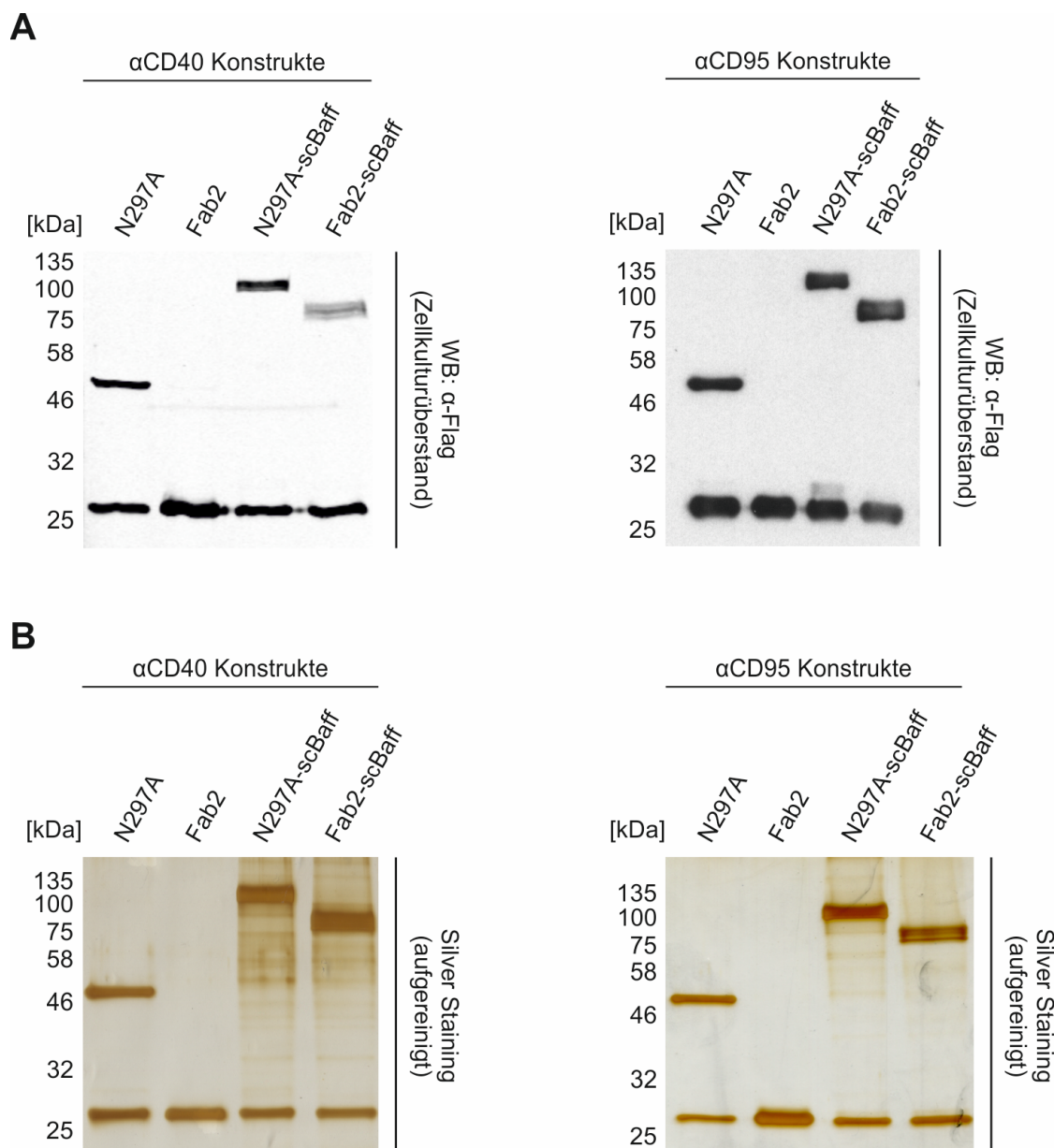
Die bisherigen Versuche wurden mit zellfreien, sonst jedoch unaufgereinigten Zellkulturüberständen durchgeführt. In diesen liegen zwar überwiegend die produzierten Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine vor, jedoch werden stets auch andere Proteine von den Zellen sekretiert, welche die experimentellen Ergebnisse möglicherweise beeinflussen können. Darüber hinaus haben Antikörper unterschiedliche Tendenzen zu Dimeren oder Multimeren zu aggregieren, was für die Einschätzung des therapeutischen Potenzials und eine gleichbleibend sichere Applikation im Menschen problematisch sein kann. Für eine potenzielle Verwendung der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine in *in vivo* Experimenten wird es daher nötig sein, dass die Konstrukte möglichst rein und als Monomere vorliegen. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob sich die verschiedenen Fusionsproteine alle in ausreichend großer Menge produzieren lassen, inwiefern sie aggregieren und ob funktionelle Unterschiede zwischen den unaufgereinigten Zellkulturüberständen und den aufgereinigten Konstrukten auftreten.

#### **4.5.1 Bestimmung der Produktionseffizienz und Aufreinigung der CD40-/CD95-Antikörper und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine**

Alle im Weiteren verwendeten Konstrukte wurden vierfach unabhängig voneinander produziert und die Konzentrationen der Einzelproduktionen durch Detektion des Flag-Tags via Western Blot bestimmt. Die Produktionen ergaben dabei bei reduzierenden Bedingungen für alle Konstrukte ein sehr konstantes Bandenmuster untereinander (Abb. 10A): ~ 26 kDa (leichte Ketten/ schwere Ketten Fab2-Konstrukte), ~ 51 kDa (schwere Ketten N297A-Konstrukte), ~ 103 kDa (schwere Ketten N297A-scBaff-Konstrukte) und ~ 77 kDa (schwere Ketten Fab2-scBaff-Konstrukte). Zudem gab es wenige Abweichungen in den Einzelkonzentrationen der jeweiligen Konstrukte und auch die gemittelten Konzentrationen zeigten, dass alle Antikörper-Varianten mit mindestens 10  $\mu$ g/ml produziert wurden (Tab. 19, Abb. S 3).

Die Zellkulturüberstände der Einzelproduktionen wurden im Folgenden vereint und die jeweiligen Antikörper bzw. Antikörper-scBaff-Fusionsproteine konnten über Affinitäts-

aufreinigung mit  $\alpha$ Flag-konjugierten Agarose-Beads isoliert werden. Die Auftrennung der leichten und schweren Antikörper-Ketten der Antikörper und Antikörper-scBaff-Fusionsproteine mittels SDS-Gelelektrophorese offenbarte ein identisches Bandenmuster der Konstrukte vor und nach der Aufreinigung (Abb. 10B). Durch Silbergel-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels mit den aufgereinigten Proben konnten die Konzentrationen der einzelnen Eluate der  $\alpha$ CD40- und  $\alpha$ CD95-Antikörper und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine anhand zusätzlich aufgetragener Standardproteine bestimmt werden.



**Abb. 10: Auftrennung der leichten und schweren Antikörper-Ketten der Antikörper und Antikörper-scBaff-Fusionsproteine mittels SDS-Gelelektrophorese vor und nach Aufreinigung.**

(A) Die produzierten, nicht gereinigten Zellkulturüberstände der IgG1(N297A)- und Fab2- Varianten der  $\alpha$ CD40 und  $\alpha$ CD95 Antikörper und die entsprechenden Antikörper-scBaff-Fusionsproteine (200 ng je Probe) wurden mittels Anti-Flag Western Blot miteinander verglichen. (B) Die genannten Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine wurden durch Anti-Flag Affinitätschromatographie gereinigt und 200 ng jedes Proteins wurde mittels SDS-PAGE gefolgt von einer Silbergefärbung analysiert.

**Tab. 19: Konzentrationen der in HEK293 produzierten Ausgangs-Antikörper bzw. der Antikörper-scBaff-Fusionsproteine.**

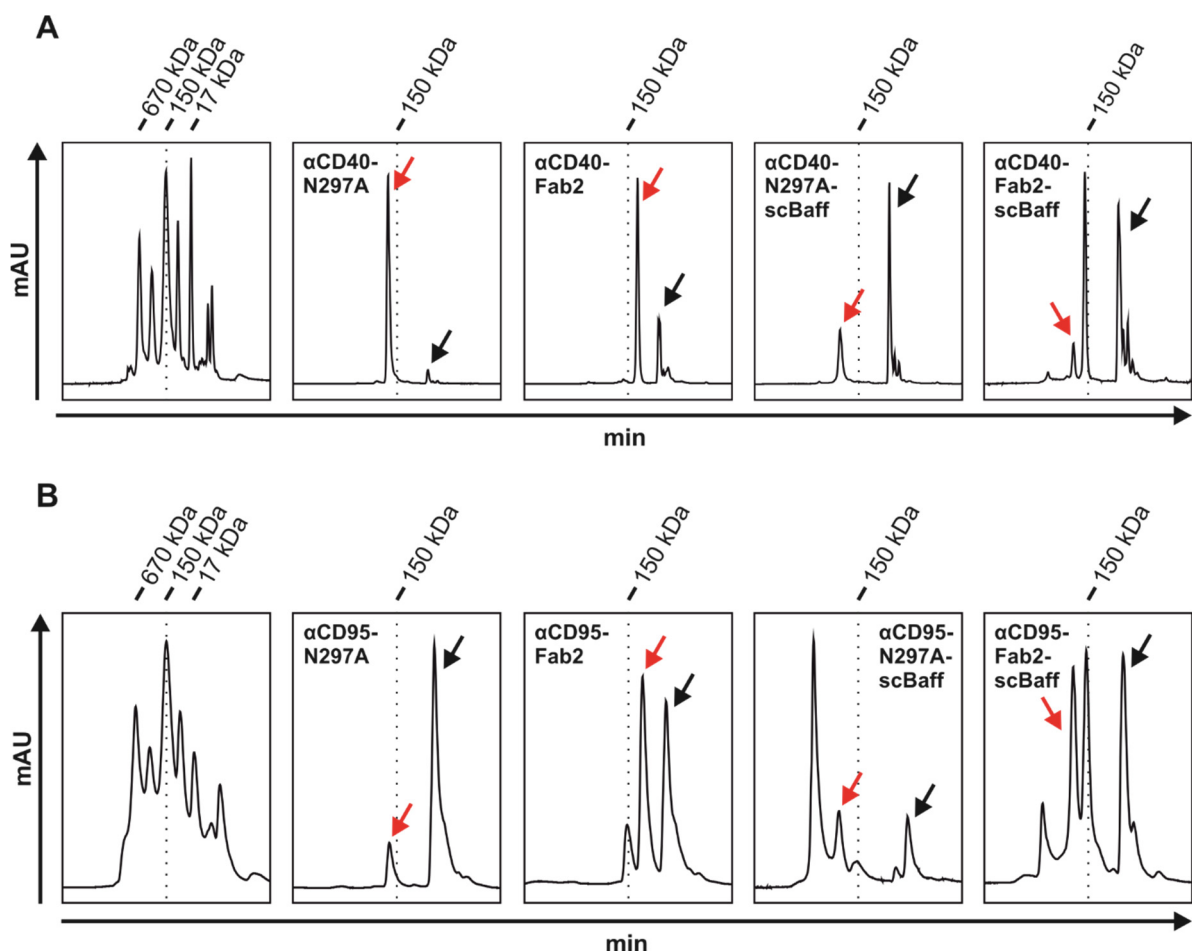
(Fusions)protein	Molekulargewicht (HC/LC/Gesamt) [kDa]	Einzelproduktionen (µg/ml)	Mittelwerte Produktionen (µg/ml)
αCD40-N297A	51/26/154	14/9/15/17	14 ± 3
αCD40-Fab2	26/26/104	8/12/15/14	12 ± 3
αCD40-N297A-scBaff	103/26/258	18/16/17/18	17 ± 1
αCD40-Fab2-scBaff	77/26/206	14/14/5/10	11 ± 4
αCD95-N297A	51/26/154	20/16/17/17	18 ± 2
αCD95-Fab2	26/26/104	10/14/10/9	11 ± 2
αCD95-N297A-scBaff	103/26/258	9/19/10/15	13 ± 5
αCD95-Fab2-scBaff	77/26/206	18/17/20/18	18 ± 1

#### 4.5.2 Analyse der Aggregation der CD40-/CD95-Antikörper und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC-HPLC)

Um die Reinheit und den Aggregationsgrad der aufgereinigten CD40-/CD95-Antikörper und -Antikörper-scBaff-Fusionsproteine zu analysieren, wurden die Proteine der einzelnen Eluate mittels Größenausschluss-Chromatographie separiert. Anhand eines HPLC-SEC-Kalibrierungsstandards mit Polypeptiden definierten Molekulargewichts, konnten die Peaks der einzelnen Konstrukt-Eluate potenziellen Proteinen innerhalb der Proben zugeordnet werden. Da sämtliche Konstrukte per Affinitätsaufreinigung mit αFlag-konjugierten Agarose-Beads aufgereinigt wurden, im Zuge dessen die Elution der Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine mittels eines Überschusses an Flag-Peptid erfolgte, konnten in allen Läufen Peaks detektiert werden, die dem 1 kDa großen Flag-Peptid entsprachen. Weil von diesem kleinen Molekül keine Kreuzreaktionen oder negative Auswirkungen in den durchzuführenden Experimenten zu erwarten waren, wurde diese Verunreinigung toleriert. Daher wurden im Folgenden lediglich die Peaks mit ermittelten Molekulargewichten größer des Flag-Peptid-Peaks zur Beurteilung der Konstrukt-Eluate herangezogen.

Die Eluate des αCD40-N297A- und des αCD40-Fab2-Antikörpers erzielten jeweils einen einzelnen Peak auf Höhe ihres berechneten Molekulargewichts (154 kDa bzw. 104 kDa) (Abb. 11A). Im Eluat des αCD40-N297A-scBaff-Fusionsproteins konnte ebenfalls ein Einzelpeak identifiziert werden, der auf Höhe des berechneten Molekulargewichts des Fusionsprotein-Monomers von 258 kDa lag. Die aufgetragene Probe des αCD40-Fab2-scBaff-Fusionsproteins erzielte nach Größenauftrennung dagegen 3 Peaks bei geschätzten Molekulargewichten von > 670 kDa, ~ 250 kDa und ~ 150 kDa und Anteilen am Eluat von 2 %, 12 % und 86 %. Da das Molekulargewicht des Fab2-scBaff-Fusionsproteinmonomers bei 206 kDa liegt, musste bei diesem Eluat davon ausgegangen werden, dass lediglich 12 % des aufgereinigten Konstrukts als Monomer vorlagen (Abb. 11A, Tab. S 1). Der Großteil des Eluats enthielt folglich ein oder mehrere Proteinvarianten mit einem um ca. 50 kDa geringeren Molekulargewicht. Der Anteil an Aggregaten mit einem vielfachen Molekulargewicht von 206 kDa war dagegen vernachlässigbar gering.

Bei den aufgereinigten  $\alpha$ CD95-Konstrukten erzielte einzig das Eluat des  $\alpha$ CD95-N297A-Antikörpers einen Einzelpeak auf Höhe des berechneten Molekulargewichts von 154 kDa des Monomers (Abb. 11B). Im Konstrukt-Eluat des  $\alpha$ CD95-Fab2-Antikörpers betrug der Anteil des aufgereinigten Monomers 79 %, wie anhand des Peaks bei 104 kDa abzulesen. Allerdings konnte hier ein zweiter Peak bei knapp über 150 kDa detektiert werden, der die restlichen 21 % des betrachteten Eluat-Anteils ausmachte. Auch nach Größenauftrennung des  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Eluats konnten zwei Peaks detektiert werden, von denen der erste, der 81 % des betrachteten Eluat-Anteils einnahm, bei einem Molekulargewicht  $> 670$  kDa verordnet werden konnte und der zweite Peak auf Höhe des Antikörper-Fusionsprotein-Monomers (258 kDa, 19 % Anteil). Dies deutete auf einen erhöhten Aggregationsgrad hin. Das aufgetragene Eluat des  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-Fusionsproteins erzielte nach Größenauftrennung wie das vergleichbare  $\alpha$ CD40-Konstrukt 3 Peaks bei geschätzten Molekulargewichten von  $> 670$  kDa,  $\sim 200$  kDa und  $\sim 150$  kDa. Dabei entfiel auf das  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-Fusionsprotein-Monomer lediglich ein Anteil von 43 %. Mit 14 % lagen vermeintliche Aggregate bzw. Proteinvarianten mit verringertem Molekulargewicht (43 %) zu einem erheblichen Anteil am betrachteten Eluat vor (Tab. S 1).



**Abb. 11: Auftrennung von Aggregaten, Verunreinigungen sowie der Antikörper- und Antikörper-Fusionsprotein-Monomere in den aufgereinigten Konstrukt-Eluaten mittels Größenausschluss-Gelfiltration (SEC-HPLC).**

Die benannten Protein-Eluate sowie der HPLC-SEC-Kalibrierungsstandard wurden bei  $760 \mu\text{l}/\text{min}$  Fließgeschwindigkeit über eine MabPac Sec-1 Größenausschluss-Chromatographie-Säule ( $7,8 \times 300$  mm) in einem Ultimate 3000 HPLC System (Thermo Fisher) aufgetrennt und mittels der Software Chromeleon analysiert.

Der HPLC-SEC-Kalibrierungsstandard (Phenomenex ALO-3042) besteht aus folgenden Komponenten: Bovines Thyroglobin (670 kDa), IgA (300 kDa), IgG (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Uridin (244 Da). Rote Pfeile: Peaks der erwarteten Antikörper- bzw. Antikörper-Fusionsprotein-Monomere. Schwarze Pfeile: Peaks des Flag-Peptides (1 kDa). (A) zeigt die analysierten  $\alpha$ CD40-Fusionsproteine, (B) die  $\alpha$ CD95-Fusionsproteine.

### **4.5.3 Vergleich der Funktionalität von unaufgereinigten Zellkulturüberständen und aufgereinigten Antikörper-Konstrukten**

Die Analyse der Eluate mittels Gelfiltration wies darauf hin, dass in einigen aufgereinigten Proben zusätzlich zu den Antikörper-Monomeren noch weitere Produkte mit höherem oder niedrigerem Molekulargewicht in unterschiedlichen Anteilen vorlagen. Aus diesem Grund wurde die Funktionalität der CD40- und CD95-spezifischen Antikörper und Antikörper-scBaff-Fusionsproteine vor und nach Aufreinigung miteinander verglichen, indem das agonistische Potenzial der N297A-Varianten mit und ohne vorherige Quervernetzung mittels Protein G bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass sowohl die unaufgereinigten als auch die aufgereinigten  $\alpha$ CD40-N297A-Antikörper sowie die  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff-Fusionsproteine nach Quervernetzung eine vergleichbare Aktivität aufwiesen. Allerdings induzierten die Varianten der Zellkulturüberstände im Gegensatz zu den aufgereinigten Proteinen bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ebenfalls eine CD40-Aktivierung (Abb. S 4 im Anhang). Da die Aufreinigung bei diesen beiden  $\alpha$ CD40-Varianten demnach zu verbesserten  $EC_{50}$ -Shifts und somit breiteren, therapeutischen Fenstern führte (Tab. S 2 im Anhang), wurden alle weiteren Versuche mit den aufgereinigten  $\alpha$ CD40-Antikörpern und  $\alpha$ CD40-Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen durchgeführt. Die funktionelle Analyse der  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusionsproteine resultierte dagegen in einem entgegengesetzten Ergebnis (siehe Abb. S 4 und Tab. S 2 im Anhang). So waren die  $EC_{50}$ -Werte der Zytotoxizitätsstudien bzw. der ELISAs der unaufgereinigten sowie aufgereinigten Produkte erneut vergleichbar, dagegen führte jedoch auch eine Stimulation mit der aufgereinigten Variante ohne vorherige Quervernetzung zu einer nicht unerheblichen CD95-Aktivierung. Da sich durch die Aufreinigung der  $EC_{50}$ -Shift des  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusionsproteins deutlich verringerte, diese Variante im funktionellen Vergleich gegenüber dem Zellkulturüberstand schlechter abschnitt und auch das  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-Fusionsprotein nach Aufreinigung laut Gelfiltration nicht in optimaler Reinheit vorlag, wurden im Folgenden die CD95-spezifischen Experimente weiter mit Zellkulturüberstand durchgeführt.

### **4.6 Untersuchung der Rezeptor-aktivierenden Eigenschaften von CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen in Abhängigkeit unterschiedlicher BaffR-/BCMA-/TACI-exprimierender Zellen**

Bislang konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die dargestellten Antikörper-scBaff-Fusionsproteine uneingeschränkt an all ihre zellulären Zielmoleküle binden können und dass die N297A- und Fab2-Varianten in der Lage sind, Fc $\gamma$ R-unabhängig einen starken CD40- und CD95-spezifischen Agonismus zu induzieren. Dies wurde im bisherigen Verlauf allerdings lediglich beispielhaft und als Machbarkeitsnachweis anhand von BaffR-transfizierten HEK293 Zellen

nachgewiesen. Da die scBaff-Verankerungsdomäne jedoch neben BaffR auch hoch affin an die Rezeptoren BCMA und TACI gebunden hat (siehe 4.2), sollte im Folgenden systematisch untersucht werden, ob eine CD40- und CD95-Aktivierung durch Bindung an alle drei Rezeptoren induziert werden kann. Des Weiteren wurden mehrere native Tumor-Zelllinien identifiziert, die einen oder mehreren der Verankerungsdomänen-relevanten Rezeptoren exprimieren. Da diese Zelllinien Expressionslevel aufweisen, die voraussichtlich besser vergleichbar mit den Zellen sind, die bei einer therapeutischen Anwendung *in vivo* vorhanden sind, wurde auch eine Auswahl dieser Zelllinien in Ko-Kultur-Experimenten verwendet.

#### **4.6.1 Analyse der CD40- und CD95-Aktivierung durch Antikörper-scBaff-Fusionsproteine in Experimenten mit Verankerungsrezeptor-überexprimierenden Zellen**

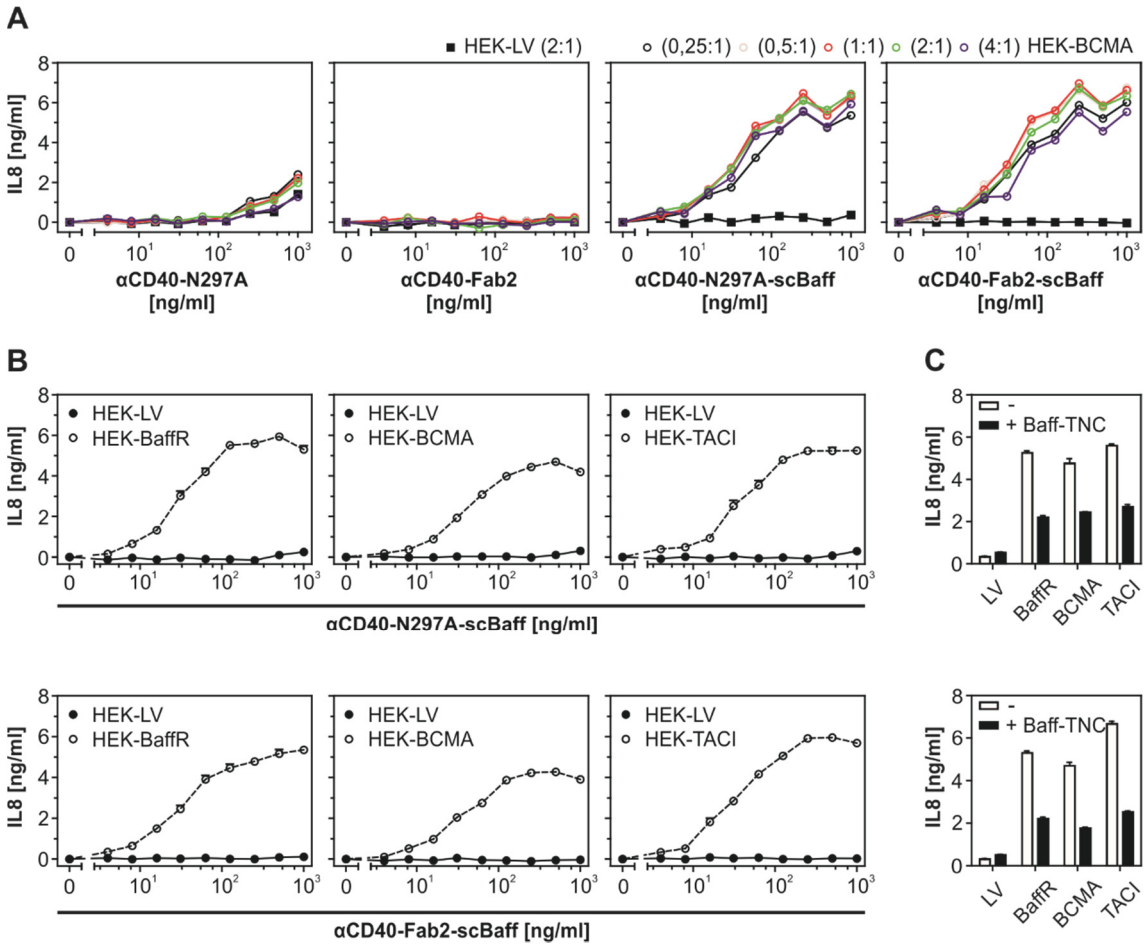
In den beschriebenen Bindungsstudien (Abb. 7) konnte gezeigt werden, dass die scBaff-Verankerungsdomäne hoch affin an drei Zielrezeptoren, BaffR, BCMA und TACI, binden konnte. Daher wurde untersucht, ob durch die Bindung an jeden einzelnen Rezeptor auch eine Potenzierung der CD40- bzw. CD95-Aktivierung erzielt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Ko-Kultur-Experimente mit HEK293-Zellen durchgeführt, die transient mit BaffR, BCMA oder TACI transfiziert wurden.

##### **4.6.1.1 Die CD40-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzieren konzentrationsabhängig eine starke CD40-Aktivierung nach Immobilisierung an BaffR, BCMA oder TACI**

Zunächst sollte anhand der CD40-spezifischen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine charakterisiert werden, in welchem Anteilsverhältnis die einzelnen Ko-Kulturzellen zueinander vorliegen müssen, um ein optimales Maß an Antikörper-Immobilisierung auf der einen und CD40-Aktivierung auf der anderen Seite zu erzielen. Hierfür wurden die Konstrukte mit  $2 \times 10^4$  CD40-exprimierenden HT1080-CD40 Zellen und mit einer Anzahl von  $0,5-8 \times 10^4$  HEK-BCMA-Transfektanten inkubiert, was einem Ko-Kulturverhältnis von 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 und 4:1 (HEK293:HT1080-CD40) entsprach. Die Leervektor-transfizierten HEK293 Zellen dienten als Negativkontrolle und wurden lediglich im Verhältnis 2:1 ko-kultiviert (Abb. 12A).

Die  $\alpha$ CD40-Fab2-Antikörper ohne Verankerungsdomäne konnten in keiner Ko-Kultur eine CD40-Aktivierung induzieren und die entsprechende N297A-Variante nur in einem geringen Grad bei Konzentrationen  $> 100$  ng/ml unabhängig von der HEK293-Transfektante. Die  $\alpha$ CD40-scBaff-Fusionsproteine dagegen induzierten in Ko-Kulturen mit BCMA-exprimierenden Zellen bereits bei Konzentrationen ab ca. 5 ng/ml eine hohe IL8-Sekretion unabhängig von der Anzahl an eingesetzten HEK293-Transfektanten, wohingegen keine CD40-Aktivierung in Ko-Kulturen mit HEK-LV Zellen zu beobachten war. Auch wenn unter allen getesteten Ko-Kulturbedingungen mit BCMA-transfizierten Zellen eine starke CD40-Aktivierung erzielt werden konnte, so fallen dennoch die  $EC_{50}$ -Werte in Ko-Kulturen mit 0,25:1 und 4:1 HEK-BCMA Zellen im Verhältnis zu

HT1080-CD40 leicht höher aus und die maximal erzielten IL8-Konzentrationen fallen niedriger aus, als bei den restlichen Ansätzen. So lagen die EC<sub>50</sub>-Werte bei dem N297A-scBaff-Fusionsprotein bei 50 ng/ml (0,25:1), 40 ng/ml (4:1) sowie 35 ng/ml (0,5:1, 1:1 und 2:1). Bei dem Fab2-scBaff-Fusionsprotein konnte eine ähnliche Tendenz erzielt werden mit EC<sub>50</sub>-Werten von 50 ng/ml (4:1), 43 ng/ml (0,25:1), 40 ng/ml (2:1) sowie 35 ng/ml (0,5:1, 1:1). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden sämtlichen weiteren Ko-Kulturversuche mit HEK-Transfektanten in einem Zellverhältnis von 1:1 und Experimente mit Suspensionszellen aufgrund der geringeren Zelloberfläche im Verhältnis 2:1 durchgeführt.



**Abb. 12:** Die CD40-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten eine starke CD40-Aktivierung nach Immobilisierung an Baffr, BCMA und TACI.

(A,B) HT1080-CD40 wurden mit HEK293-Zellen ko-kultiviert, die transient mit einem Leervektor (LV) oder Baffr-/BCMA-/TACI-Expressionsplasmiden transfiziert wurden, und daraufhin mit steigenden Konzentrationen von αCD40-N297A, αCD40-Fab2 bzw. den entsprechenden -scBaff-Fusionsproteinen stimuliert. Am nächsten Tag wurde die CD40-Aktivierung durch die Analyse der IL8-Produktion mittels IL8-ELISA bewertet. (A) Die Stimulation erfolgte in Ko-Kultur von  $2 \times 10^4$  HT1080-CD40 Zellen und einer Anzahl von  $2 \times 10^4$  HEK-LV bzw.  $0,5-8 \times 10^4$  HEK-BCMA-Transfektanten, was einem Ko-Kulturverhältnis von 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 und 4:1 (HEK293:HT1080-CD40) entspricht. (B) Die Stimulation erfolgte in Ko-Kulturen von  $2 \times 10^4$  HT1080-CD40 und  $2 \times 10^4$  HEK-Transfektanten. (C) Ko-Kulturen wie unter "B" beschrieben wurden für 30 min mit 5 µg/ml Baff-TNC vorbehandelt und dann mit 200 ng/ml αCD40-N297A-scBaff oder αCD40-Fab2-scBaff stimuliert, bevor die IL8-Produktion am nächsten Tag durch ELISA ausgewertet wurde.



**Tab. 20: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der  $\alpha$ CD40:scBaff-Antikörper-Fusionsproteine in Ko-Kulturen mit mit HEK-LV, -BaffR, -BCMA, oder -TACI-transfizierten Zellen sowie der möglichen therapeutischen Fenster (EC<sub>50</sub>-Shifts).**

	Ko-Kultur HT1080-CD40 +				
	BaffR-/BCMA-/TACI-neg.:		BaffR-/BCMA-/TACI-pos.:		LV:BaffR EC50-Shift
	HEK-LV Einzel-EC50	MW EC50	HEK-BaffR Einzel-EC50	MW EC50	
$\alpha$ CD40-N297A-scBaff	>250 / >750 / >1000 / >1000	> 750	48,5 / 60,5 / 23 /29	40,3	> 18
$\alpha$ CD40-Fab2-scBaff	>250 / >750 / >1000 / >1000	> 750	21,5 / 32,5 / 21 / 34	27,3	> 27
	HEK-LV		HEK-BCMA		LV:BCMA EC50-Shift
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50	
	$\alpha$ CD40-N297A-scBaff	>250 / >750 / >1000 / >1000	> 750	58 / 69,5 / 33,5 / 36,5	49,4
$\alpha$ CD40-Fab2-scBaff	>250 / >750 / >1000 / >1000	> 750	28 / 32 / 33 /31	31	> 24
	HEK-LV		HEK-TACI		LV:TACI EC50-Shift
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50	
	$\alpha$ CD40-N297A-scBaff	>250 / >750 / >1000 / >1000	> 750	50 / 65 / 88,5 /33	59,1
$\alpha$ CD40-Fab2-scBaff	>250 / >750 / >1000 / >1000	> 750	19,5 / 25 /33 / 30,5	27	> 27,5

In den folgenden Ko-Kulturversuchen mit HT1080-CD40 Zellen und transient mit BaffR, BCMA, TACI oder einem Leervektor transfizierten HEK293 Zellen zeigte sich, dass sowohl das  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff- als auch das  $\alpha$ CD40-Fab2-scBaff-Antikörper-Fusionsprotein hoch spezifisch wirkten (Abb. 12B). Beide Konstrukte induzierten eine CD40-Aktivierung in Ko-Kulturen mit BaffR-/BCMA-/TACI-positiven Zellen mit vergleichbaren EC<sub>50</sub>-Werten zwischen ca. 30-60 ng/ml, wohingegen in Ko-Kulturen mit BaffR-/BCMA-/TACI-negativen HEK-LV Zellen selbst bei Konzentrationen über 750 ng/ml keine erhebliche IL8 Sekretion auftrat (Abb. 12, Tab. 20). Hieraus ergaben sich EC<sub>50</sub>-Shifts zwischen > 12,5- bis > 27,5-fach, wobei die tatsächliche therapeutische Breite deutlich höher ausfallen könnte, da die CD40-Aktivierung in Ko-Kulturen mit HEK-LV Zellen auch beim höchsten untersuchten Wert von 1000 ng/ml noch deutlich von einer möglichen Sättigung entfernt war und somit kein genauer EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt wurde.

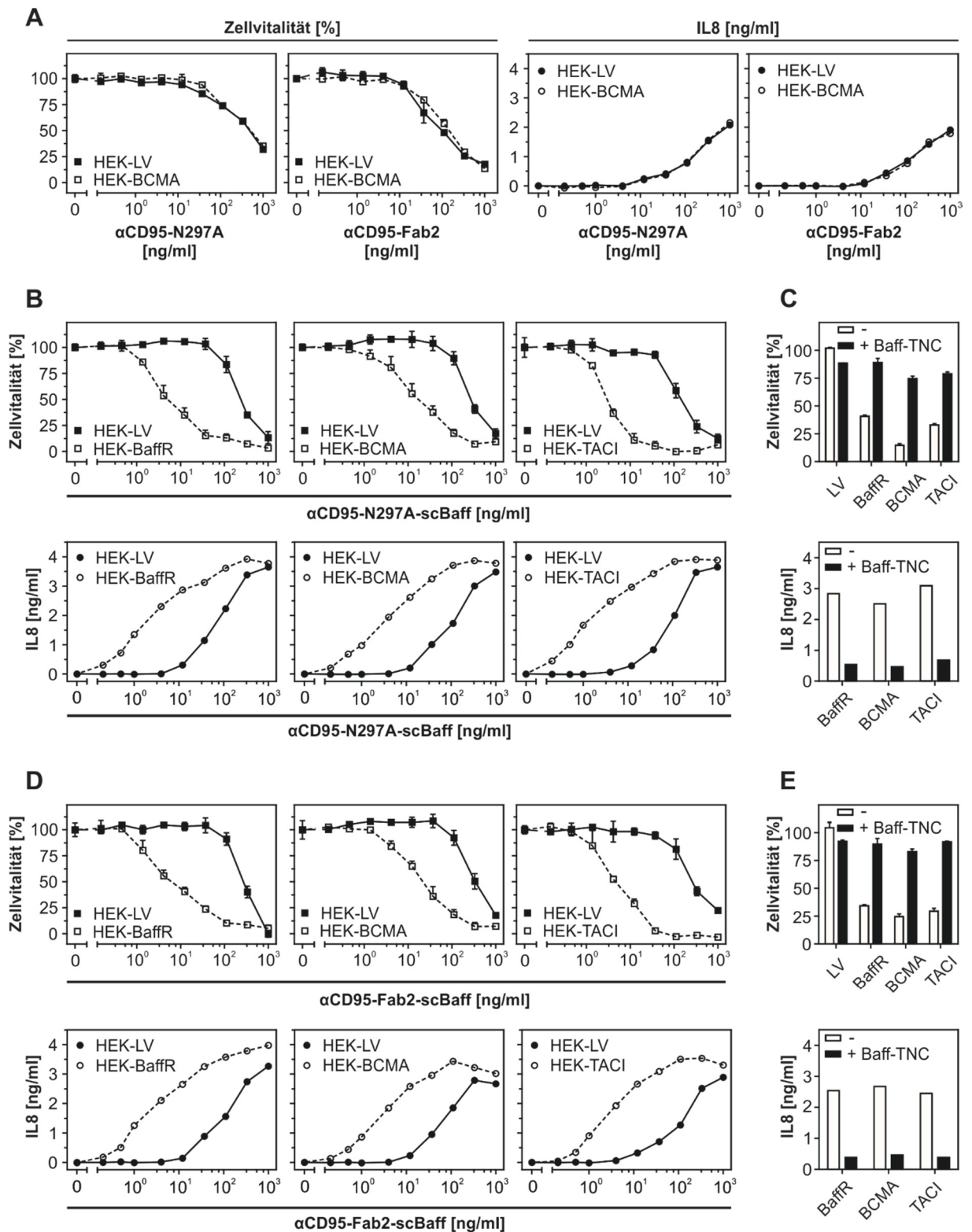
Um zu bestätigen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Immobilisierung der Antikörper-Fusionsproteine über die scBaff-Verankerungsdomäne zurückzuführen waren, wurde die Bindung der Verankerungsdomäne an die Rezeptoren BaffR, BCMA und TACI blockiert (Abb. 12C). Hierzu wurden die HEK293-Transfektanten mit einem Überschuss des löslichen Liganden Baff-TNC vorinkubiert. Wie bereits in den Titrationskurven gezeigt, hatte eine Ko-Kultivierung von HT1080-CD40 Zellen und Leervektor-transfizierten HEK293 Zellen sowohl mit der N297A- als auch der Fab2-Variante der  $\alpha$ CD40-scBaff-Fusionsproteine keine CD40-Aktivierung zur Folge, weshalb auch eine Vorinkubation mit Baff-TNC keinen Einfluss auf das Ergebnis nahm. Wurden die Ko-Kulturen aus HT1080-CD40 und HEK-BaffR, -BCMA oder -TACI dagegen mit Baff-TNC vorbehandelt, so konnte bei beiden Antikörper-Fusionsproteinen eine deutlich verringerte IL8-Sekretion im Vergleich zu den unbehandelten Ko-Kulturen festgestellt werden.

#### 4.6.1.2 Immobilisierung an BaffR, BCMA und TACI potenziert die CD95-Aktivierung der CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine

Ko-Kulturrexperimente mit BaffR-, BCMA- und TACI- bzw. LV-transfizierten HEK293-Zellen wurden ebenfalls mit den  $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteinen durchgeführt, wobei sowohl die Apoptose-Induktion als auch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs als Parameter der Antikörper-vermittelten CD95-Aktivierung analysiert wurden. Zunächst wurde auch hier untersucht, inwiefern eine CD95-Aktivierung mit den Antikörper-Varianten N297A und Fab2, die über keine scBaff-Verankerungsdomäne verfügen, in Ko-Kulturen mit BCMA-positiven im Vergleich zu BCMA-negativen Zellen induziert werden konnte. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten konnte mit beiden Antikörper-Varianten ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Zell-Apoptose und der IL8-Sekretion unabhängig von den eingesetzten HEK293-Transfektanten erzielt werden (Abb. 13A). Diese basale CD95-Aktivierung in HEK293 Ko-Kulturen entspricht dabei dem Grad an Rezeptorstimulation, der bereits in Abb. **4** durch das N297A-Konstrukt ohne sekundäre Quervernetzung in HT1080 Mono-Kulturen festgestellt wurde. Dementsprechend haben weder HEK293-LV noch -BCMA Zellen einen additiven Effekt auf die CD95-Aktivierung.

In den Ko-Kulturversuchen, die jedoch mit den entsprechenden Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen durchgeführt wurden, konnte ein vergleichbares Maß an CD95-Aktivierung erzielt werden, wie nach der Oligomerisierung des N297A-Antikörpers mit Protein G (Abb. **13B,D**). So induzierte das  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Antikörper-Fusionsprotein den CD95-vermittelten Zelltod in Ko-Kulturen mit BaffR-, BCMA- oder TACI-exprimierenden HEK293-Transfektanten bei deutlich geringeren Konzentrationen, als in Ko-Kulturen mit LV-transfizierten HEK293-Zellen (Tab. 21B). Vergleichbare Resultate konnten nach Analyse der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs mittels IL8-ELISA ermittelt werden (Tab. 21A). Somit ergaben sich über beide Ausleseparameter hinweg  $EC_{50}$ -Shifts zwischen 23- bis 61-fach. Das  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-Antikörper-Fusionsprotein zeigte in Ko-Kulturen mit BaffR-/BCMA-/TACI-positiven HEK293-Zellen weitestgehend kongruente CD95-aktivierende Eigenschaften und führte ebenfalls bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen zur Zelltod- bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung, als in Ko-Kulturen mit BaffR-/BCMA-/TACI-negativen HEK293-Zellen (Tab. 21A,B).

Darüber hinaus konnte auch mit den  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff- und  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-Fusionsproteinen in Blockierungsversuchen nachgewiesen werden, dass sich sowohl die Apoptoseinduktion als auch die induzierte IL8-Sekretion durch Rezeptorblockade der BaffR-, BCMA- oder TACI-exprimierenden HEK293-Zellen mittels Baff-TNC in allen Fällen effizient inhibieren ließen (Abb. 13C,E).



**Abb. 13:** Die CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten eine starke CD95-Aktivierung nach Immobilisierung an BaffR, BCMA und TACI.

(A-E) HT1080 Zellen wurden ausgesät und nach Adhäsion entweder mit 2,5 µg/ml CHX (Zytotoxizitätsversuche) oder 2,5 µg/ml CHX und 20 µM zVAD (IL8-ELISA) vorinkubiert. (A,B,D) Ko-Kulturen aus 2x10<sup>4</sup> HT1080 Effektorzellen und 2x10<sup>4</sup> Leervektor- bzw. BaffR-/BCMA-/TACI-transfizierten HEK293-Verankerungszellen wurden mit steigenden Konzentrationen an αCD95-N297A bzw. αCD95-Fab2 ohne Verankerungsdomäne (A), mit αCD95-N297A-scBaff (B) oder mit αCD95-Fab2-scBaff (D) stimuliert. Am nächsten Tag wurde die CD95-Aktivierung anhand der induzierten Apoptose via Kristallviolett-Färbung und der induzierten IL8-Sekretion mittels IL8-ELISA analysiert. (C,E) Die beschriebenen Ko-Kulturen wurden mit 5 µg/ml Baff-TNC vorbehandelt und dann mit 20 ng/ml αCD95-N297A-scBaff

(C) oder  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff (E) stimuliert, bevor die Apoptose-Induktion bzw. IL8-Produktion am nächsten Tag durch Kristallviolett-Färbung bzw. ELISA ausgewertet wurde.

**Tab. 21: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der  $\alpha$ CD95-scBaff-Fusionsproteine in Ko-Kulturen mit HEK-LV, -BaffR, -BCMA, oder -TACI-transfizierten Zellen sowie der möglichen therapeutischen Fenster (EC<sub>50</sub>-Shifts) nach Auswertung der ELISA- (A) bzw. Zytotoxizitäts-Experimente (B).**

**A**

	Ko-Kultur HT1080 +					
	BaffR-/BCMA-/TACI-neg.:		BaffR-/BCMA-/TACI-pos.:		LV:BaffR EC50-Shift	
	HEK-LV Einzel-EC50	MW EC50	HEK-BaffR Einzel-EC50	MW EC50		
$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	268 / 82 / 109	153	2,7 / 2,3 / 2,9	2,6	59	
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	475 / 155 / 145	258	1,6 / 3 / 4,3	3	86	
	HEK-LV		HEK-BCMA		LV:BCMA EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	187 / 131 / 121	146	1,8 / 4 / 2,7	2,8	52
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	>1000 / 78,5 / 126	402	2,7 / 2,6 / 4,0	3,1	130	
	HEK-LV		HEK-TACI		LV:TACI EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	216 / 102 / 85	134	2,5 / 1,7 / 2,4	2,2	61
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	529 / 156 / 135	273	3,9 / 2,9 / 4,5	3,8	72	

**B**

	Ko-Kultur HT1080 +					
	BaffR-/BCMA-/TACI-neg.:		BaffR-/BCMA-/TACI-pos.:		LV:BaffR EC50-Shift	
	HEK-LV Einzel-EC50	MW EC50	HEK-BaffR Einzel-EC50	MW EC50		
$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	73,5 / 217 / 257	183	1,3 / 4,3 / 4,9	3,5	52	
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	434 / 276 / 220	310	9,6 / 6,1 / 4,0	6,6	47	
	HEK-LV		HEK-BCMA		LV:BCMA EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	110 / 145 / 268 / 177	175	3,5 / 6,1 / 14 / 6,3	7,5	23
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	321 / 104 / 228	218	23 / 3,5 / 7,7	11,4	19	
	HEK-LV		HEK-TACI		LV:TACI EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	110 / 85,5 / 143 / 126	116	3 / 2,5 / 3 / 2,9	2,9	40
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	565 / 256 / 189	337	16,3 / 4,5 / 3,0	8	42	

#### 4.6.2 Analyse der CD40- und CD95-Aktivierung durch die Antikörper-scBaff-Fusionsproteine in Experimenten mit endogen Verankerungsrezeptor-exprimierenden Zellen

In den vorherigen Experimenten wurde erfolgreich bestätigt, dass sich die Aktivierung der Rezeptoren CD40 und CD95 durch Antikörper potenzieren lässt, sobald eine Immobilisierung der Antikörper Fc $\gamma$ R-unabhängig durch eine Verankerungsdomäne werden kann. Dies wurde in den bisherigen Experimenten anhand von Ko-Kulturversuchen mit Transfektanten bewiesen, bei denen mindestens einer der ausschlaggebenden Rezeptoren durch künstliches Einbringen zusätzlicher Plasmid-DNA und gesteigerte Transkription überexprimiert wurde. Um die beobachteten Effekte möglichst gut in den klinischen Zustand einzuordnen, wurde außerdem überprüft, ob sich analoge Ergebnisse auch mit Tumor-Zelllinien erzielen lassen, welche die

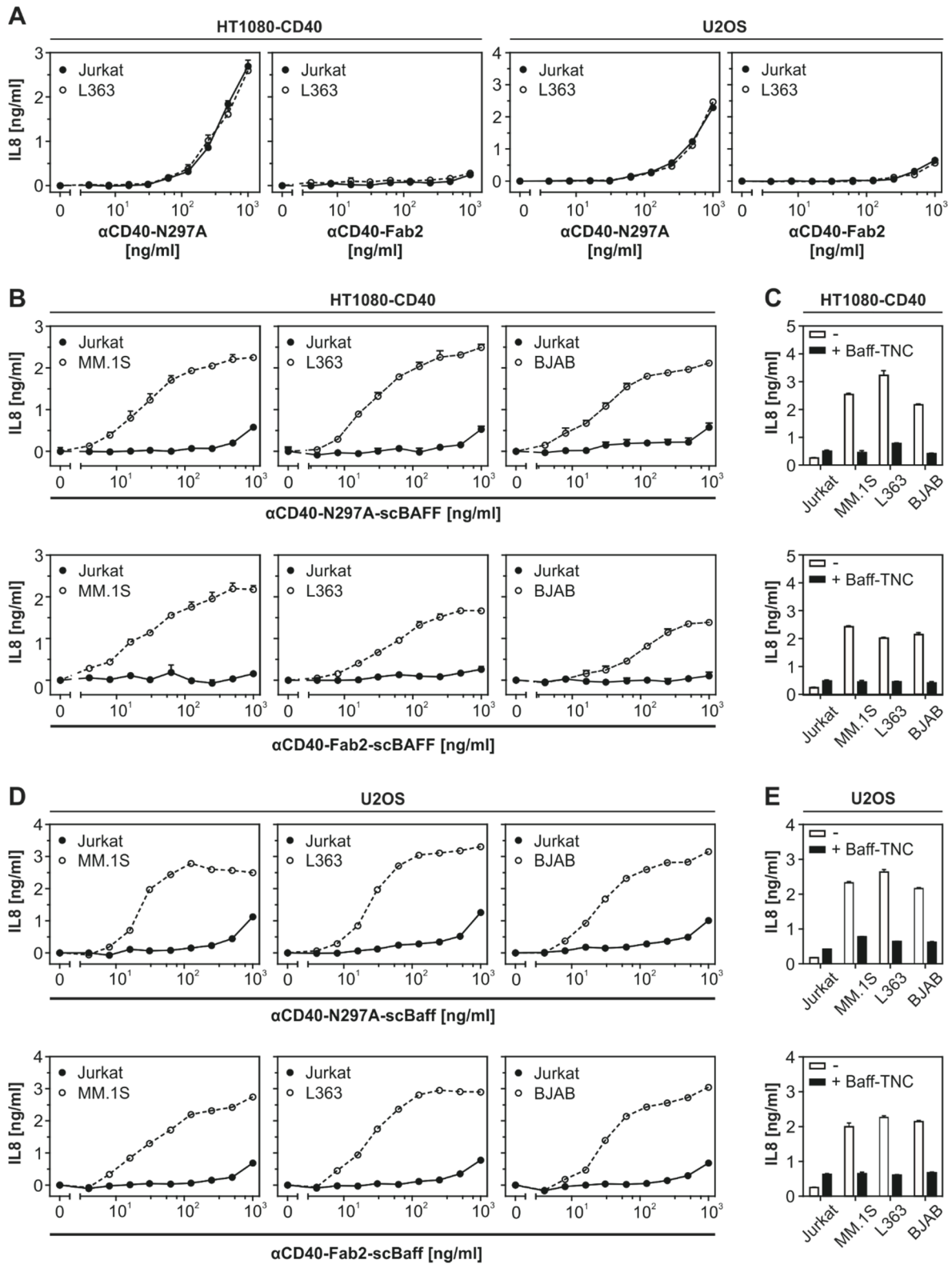
entscheidenden Rezeptoren endogen (über)exprimieren. Hierzu wurden 11 Tumor-Zelllinien, die laut vorheriger FACS-Analyse (Tab. 18, Abb. S 1) einen oder mehrere der Rezeptoren BaffR, BCMA oder TACI endogen exprimierten, sowie Jurkat als BaffR-/BCMA-/TACI-negative Kontroll-Zelllinie in Ko-Kulturen mit CD40- und CD95-exprimierenden Zellen verwendet, um nach Inkubation mit den Antikörper-scBaff-Fusionsproteinen erfolgsversprechende Zellen für die weitere Charakterisierung zu identifizieren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse (Abb. S 5) wurden die drei Tumorzelllinien MM.1S (Multiples Myelom), L363 (Plasmazell-Leukämie) und BJAB (Burkitt-Lymphom) als Vertreter der drei Hauptklassen des Blutkrebses für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

#### **4.6.2.1 Die CD40-Aktivierung durch CD40-spezifische Antikörper-scBaff-Fusionsproteine kann in Ko-Kulturrexperimenten mit endogen BaffR-, BCMA- oder TACI-exprimierenden Zelllinien effizient gesteigert werden**

Analog zur Durchführung der Experimente mit transient BaffR-/BCMA-/TACI-überexprimierenden Ko-Kulturzellen wurden auch die Versuche mit endogen BaffR-/BCMA-/TACI-exprimierenden Tumorzelllinien durchgeführt. Als Effektorzellen wurden die bereits etablierten HT1080-CD40 Transfektanten sowie endogen CD40-exprimierende U2OS Zellen verwendet.

Zunächst wurden auch in diesen Versuchsreihen die Antikörper-Varianten ohne Verankerungsdomäne,  $\alpha$ CD40-N297A sowie  $\alpha$ CD40-Fab2, auf mögliche CD40-stimulierende Eigenschaften in Ko-Kulturen mit den verwendeten Tumorzelllinien untersucht (Abb. 14A). Das  $\alpha$ CD40-N297A-Konstrukt induziert bei Konzentrationen  $> 50$  ng/ml in steigendem Maß die IL8-Sekretion in HT1080-CD40 und U2OS Zellen unabhängig von den ko-kultivierten Jurkat bzw. L363 Zellen. Dieser Grad an CD40-Aktivierung konnte bereits in den vorangegangenen Versuchen mit HT1080-CD40 Monokulturen beobachtet werden (Abb. S 4) und entspricht nicht der vollen Aktivierung, wie sie nach Protein G-Quervernetzung erzielt werden konnte, sodass davon auszugehen ist, dass Jurkat und L363 Zellen allein keinen additiven Effekt auf die CD40-Aktivierung haben. Das  $\alpha$ CD40-Fab2-Konstrukt war dagegen weder in Ko-Kulturen aus Jurkat/L363 und den Effektorzellen HT1080-CD40 oder U2OS in der Lage, eine deutliche CD40-Aktivierung auszulösen.

Das  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff- und das  $\alpha$ CD40-Fab2-scBaff-Antikörper-Fusionsprotein induzierten eine CD40-Aktivierung in Ko-Kulturen von HT1080-CD40 und BaffR-/BCMA-/TACI-negativen Jurkat Zellen lediglich bei hohen Konzentrationen  $> 250$  ng/ml bzw. überhaupt nicht. Dagegen konnte in Ko-Kulturen mit BaffR-/BCMA-/TACI-positiven MM.1S, L363 oder BJAB Zellen mit beiden Antikörper-Fusionsproteine eine starke, Konzentrations-abhängige IL8-Sekretion gemessen werden (Abb. 14B). Die erzielten  $EC_{50}$ -Shifts lagen dabei für das N297A-scBaff-Fusionsprotein bei Faktoren zwischen 32-48 und in Bezug auf das Fab2-scBaff-Konstrukt zwischen 17-28 (Tab. 22A).



**Abb. 14:** Die CD40-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten konzentrationsabhängig eine starke CD40-Aktivierung nach Immobilisierung an endogen Baffr-/ BCMA-/TACI-exprimierende MM.1S, L363 oder BJAB Tumorzelllinien.

(A,B,D) Ko-Kulturen aus HT1080-CD40 oder U2OS Effektorzellen und Baffr-/BCMA-/TACI-negativen bzw. -positiven Verankerungszellen (Jurkat bzw. MM.1S/ L363/ BJAB) wurden mit steigenden Konzentrationen an  $\alpha$ CD40-N297A bzw.  $\alpha$ CD40-Fab2 (A), sowie  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff oder  $\alpha$ CD40-Fab2-scBaff (B,D) stimuliert. Am nächsten Tag wurde die CD40-Aktivierung anhand der induzierten IL8-Sekretion mittels IL8-ELISA analysiert.

(C,E) Die beschriebenen Ko-Kulturen wurden mit 5 µg/ml Baffr-TNC vorbehandelt und dann mit 200 ng/ml αCD40-N297A-scBaff oder αCD95-Fab2-scBaff stimuliert, bevor die IL8-Produktion am nächsten Tag durch ELISA ausgewertet wurde.

**Tab. 22: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der αCD40-scBaff-Fusionsproteine in Ko-Kulturen von HT1080-CD40 (A) bzw. U2OS (B) mit Jurkat, MM.1S, L363 oder BJAB Tumorzelllinien sowie der möglichen therapeutischen Fenster (EC<sub>50</sub>-Shifts).**

		Ko-Kultur HT1080-CD40 +				
		Baffr-/BCMA-/TACI-neg.:		Baffr-/BCMA-/TACI-pos.:		Jurkat:MM.1S EC50-Shift
	Jurkat		MM.1S			
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
αCD40-N297A-scBaff	>1000 / >1000 / >1000 / >1000	>1000	57,5 / 26 / 21 / 18	31	32	
αCD40-Fab2-scBaff	>1000 / >1000 / >1000 / >1000	>1000	150/ 28,5 / 37 / 26	60	17	
		L363		Jurkat:L363 EC50-Shift		
	Jurkat		Einzel-EC50	MW EC50		
αCD40-N297A-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	34 / 25 / 16	25	40	
αCD40-Fab2-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	32 / 47,5 / 27,5	36	28	
		BJAB		Jurkat:BJAB EC50-Shift		
	Jurkat		Einzel-EC50	MW EC50		
αCD40-N297A-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	9,5 / 30,5 / 23,5	21	48	
αCD40-Fab2-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	40 / 52,5 / 15,5	36	28	
		Ko-Kultur U-2 OS +				
		Baffr-/BCMA-/TACI-neg.:		Baffr-/BCMA-/TACI-pos.:		Jurkat:MM.1S EC50-Shift
	Jurkat		MM.1S			
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
αCD40-N297A-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	22,5 / 21 / 23	22	45	
αCD40-Fab2-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	32,5 / 30 / 38,5	34	29	
		L363		Jurkat:L363 EC50-Shift		
	Jurkat		Einzel-EC50	MW EC50		
αCD40-N297A-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	23 / 25 / 26,5	25	40	
αCD40-Fab2-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	22,5 / 24 / 33,5	27	37	
		BJAB		Jurkat:BJAB EC50-Shift		
	Jurkat		Einzel-EC50	MW EC50		
αCD40-N297A-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	18 / 26,5 / 23,5	23	43	
αCD40-Fab2-scBaff	>1000 / >1000 / >1000	>1000	27 / 32,5 / 37,5	32	31	

Die bei 200 ng/ml von beiden Konstrukten induzierte CD40-Aktivierung konnte darüber hinaus in sämtlichen Ko-Kulturen mit Baffr-/BCMA-/TACI-positiven MM.1S, L363 oder BJAB Zellen effizient durch Vorinkubation mit Baff-TNC blockiert werden (Abb. 14C). Nahezu identische Ergebnisse wie in Ko-Kulturen mit HT1080-CD40 Transfektanten konnten auch durch Verwendung der endogen CD40-exprimierenden U2OS Zellen erzielt werden (Abb. 14D). Wiederum führten in Ko-Kulturen mit den Baffr-/BCMA-/TACI-negativen Jurkat Kontrollzellen lediglich hohe Konzentrationen an αCD40-N297A-scBaff oder αCD40-Fab2-scBaff zu einer niedrigen CD40-Aktivierung. Wurden dieselben Konstrukte jedoch zu Ko-Kulturen aus U2OS Zellen und MM.1S/L363/ BJAB Zellen gegeben, so ließ sich erneut in sämtlichen Fällen eine starke CD40-Aktivierung mit vergleichbaren EC<sub>50</sub>-Werten, wie in Ko-Kulturen mit HT1080-CD40 Zellen, induzieren (Tab. 22B). In den beschriebenen Ko-Kulturen lag der EC<sub>50</sub>-Shift zwischen

Jurkat auf der einen und MM.1S, L363 oder BJAB Zellen auf der anderen Seite bei mindestens Faktor 29. Diese Rezeptoraktivierung ließ sich auch bei Verwendung der U2OS Zellen wieder sehr effizient mit Baff-TNC blockieren (Abb. 14E).

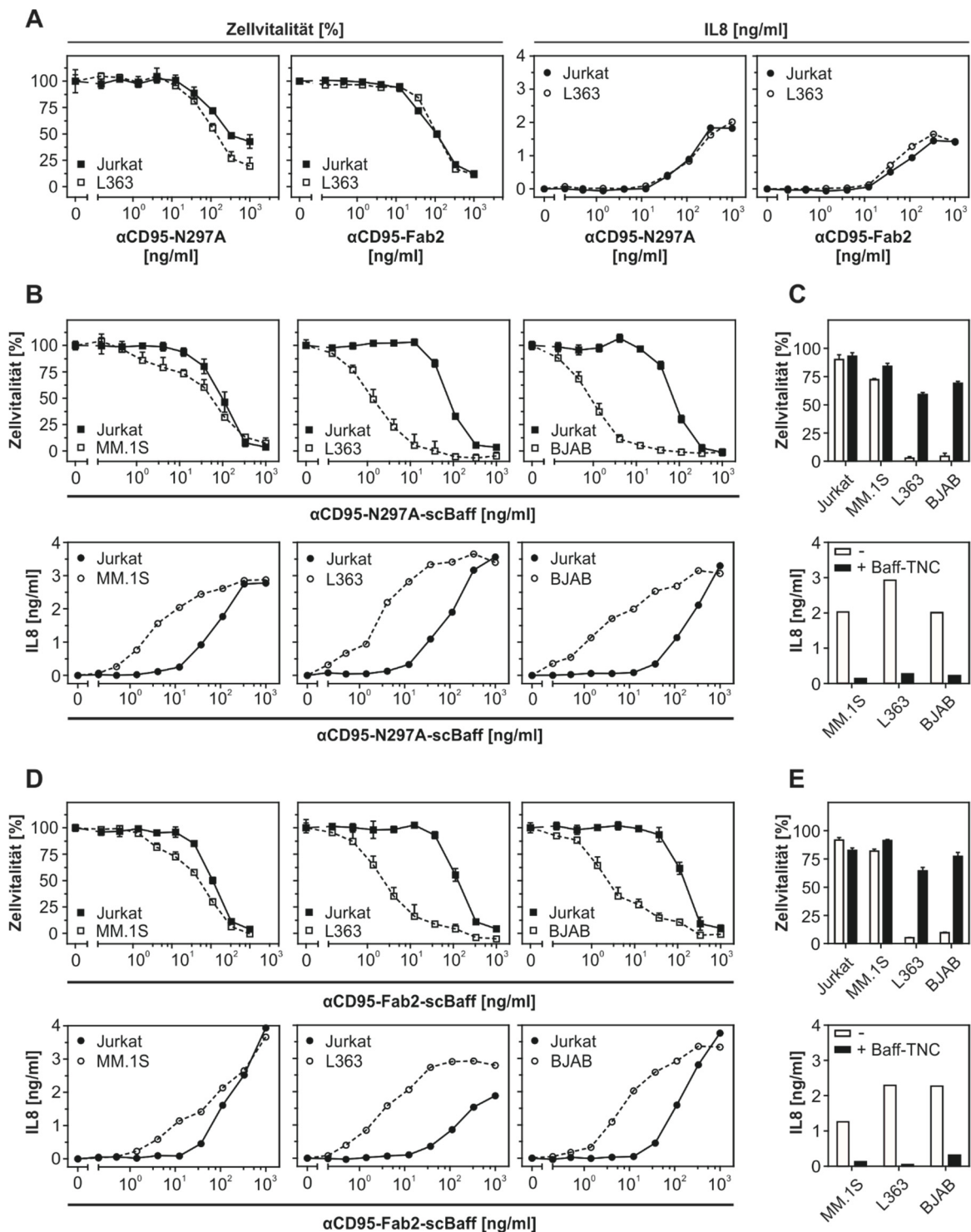
#### **4.6.2.2 Die durch $\alpha$ CD95-scBaff-Fusionsproteine induzierte CD95-Aktivierung kann in Ko-Kulturrexperimenten mit endogenen BaffR-, BCMA- oder TACI-exprimierenden Zelllinien effizient potenziert werden**

Auch im Fall der  $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine konnte erneut bestätigt werden, dass die konventionellen Antikörper-Varianten ohne Verankerungsdomäne,  $\alpha$ CD95-N297A und  $\alpha$ CD95-Fab2, weder in Zytotoxizitäts-Experimenten noch bei Evaluation des NF- $\kappa$ B-Signalwegs eine CD95-Aktivierung induzierten (Abb. 15A), die mit der Potenzierung des Rezeptoragonismus nach Antikörper-Oligomerisierung (Abb. S 4) vergleichbar ist. Die CD95-Aktivierung, die unabhängig von den Jurkat bzw. L363 Zellen bei Konzentrationen > 20 ng/ml beobachtet werden konnte, spiegelt denselben Aktivierungsgrad wider, der unabhängig von einer sekundären Quervernetzung bereits in allen anderen Experimenten mit diesen Antikörper-Varianten erzielt wurde.

Die Antikörper-Fusionsproteine  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff und  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff induzierten in Ko-Kulturen von HT1080 und BaffR-/BCMA-/TACI-negativen Jurkat Zellen eine CD95-Aktivierung in vergleichbarem Maß, wie auch die Antikörper-Varianten ohne Verankerungsdomäne (Abb. 15B,D). In Ko-Kulturen mit BaffR-/BCMA-/TACI-positiven MM.1S, L363 oder BJAB Zellen war dagegen bei beiden Antikörper-Fusionsproteinen eine Potenzierung der agonistischen Funktionalität zu erkennen. In Zytotoxizitätsexperimenten wurde die CD95-Aktivierung in Ko-Kulturen mit L363 oder BJAB Zellen jedoch bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ausgelöst, als in Ko-Kulturen mit MM.1S Zellen (Tab. 23B). Auch wenn in zVAD-behandelten Ko-Kulturen zwar in Kombination mit den MM.1S Zellen eine deutliche verbesserte Potenzierung der CD95-Aktivierung zu erkennen war, so wurden dennoch in Ko-Kulturen mit L363 oder BJAB Zellen nochmals verbesserte EC<sub>50</sub>-Shift erzielt (Tab. 23A). Die Verankerungsdomänen-abhängige IL8-Sekretion konnte dementsprechend durch Baff-TNC-bedingte Rezeptorblockierung in Ko-Kulturen mit MM.1S, L363 oder BJAB Zellen inhibiert werden, wohingegen die Apoptose-Induktion lediglich in Ko-Kulturen mit L363 und BJAB Zellen deutlich inhibiert wurde (Abb. 15C).

Das  $\alpha$ CD95-Fab2-scBaff-Fusionsprotein induzierte Verankerungsdomänen-abhängige Apoptose und IL8-Sekretion in Ko-Kulturen mit L363 oder BJAB Zellen erneut stärker, als in Ko-Kulturen mit MM1S Zellen, jedoch geringfügig schwächer, als die N297A-scBaff-Variante (Abb. 15D, Tab. 23A,B). Abermals konnte durch Vorinkubation dieser Ko-Kulturen mit Baff-TNC und die dadurch erzielte Inhibition der Verankerungsdomänen-vermittelten Immobilisierung bestätigt werden, dass die beschriebene Potenzierung der CD95-Aktivierung scBaff-abhängig erfolgte (Abb. 15E).





**Abb. 15:** Die CD95-spezifischen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine induzierten konzentrationsabhängig eine starke CD95-Aktivierung nach Immobilisierung an L363 oder BJAB Tumorzelllinien, in Ko-Kulturen mit MM.1S Zellen jedoch nur bedingt.

(A-E) HT1080 Zellen wurden ausgesät und nach Adhäsion entweder mit 2,5 µg/ml CHX (Zytotoxizitätsversuche) bzw. 2,5 µg/ml CHX und 20 µM zVAD (IL8-ELISA) vorinkubiert. (A,B,D) Ko-Kulturen aus HT1080 Effektorzellen und endogenen BaffR-/BCMA-/TACI-positiven MM.1S, L363 oder BJAB Verankerungszellen bzw. BaffR-/BCMA-/TACI-negativen Jurkat Kontrollzellen wurden mit steigenden Konzentrationen an αCD95-N297A bzw. αCD95-Fab2 ohne Verankerungsdomäne (A), mit αCD95-N297A-scBaff (B) oder mit αCD95-Fab2-scBaff (D) stimuliert. Am nächsten Tag wurde die CD95-Aktivierung anhand der induzierten Apoptose via Kristallviolett färbung und der induzierten IL8-Sekretion mittels IL8-ELISA analysiert.

(C,E) Die beschriebenen Ko-Kulturen wurden mit 5 µg/ml Baff-TNC vorbehandelt und dann mit 20 ng/ml αCD95-N297A-scBaff (C) oder αCD95-Fab2-scBaff (E) stimuliert, bevor die Apoptose-Induktion bzw. IL8-Produktion am nächsten Tag durch Kristallviolett-Färbung bzw. ELISA ausgewertet wurde.

**Tab. 23: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen der αCD95-scBaff-Fusionsproteine in Ko-Kulturen mit Jurkat, MM.1S, L363 oder BJAB Tumorzelllinien sowie der möglichen therapeutischen Fenster (EC<sub>50</sub>-Shifts) nach Auswertung der ELISA- (A) bzw. Zytotoxizitäts-Experimente (B).**

**A**

	Ko-Kultur HT1080 +					
	Baffr-/BCMA-/TACI-neg.:			Baffr-/BCMA-/TACI-pos.:		
	Jurkat		MW EC50	MM.1S		Jurkat:MM.1S EC50-Shift
Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50		MW EC50		
αCD95-N297A-scBaff	425 / 309 / 433	389	38,5 / 21,5 / 3,5	21,2	18,3	
αCD95-Fab2-scBaff	120 / 127 / 145	130,7	117 / 92 / 71	93,3	1,4	
	Jurkat		L363		Jurkat:L363 EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	αCD95-N297A-scBaff	232 / 135 / 91	152,7	4,5 / 2 / 3	3,2	47,7
αCD95-Fab2-scBaff	94,5 / 278 / 122	164,8	1,6 / 3,5 / 3,1	2,7	61	
	Jurkat		BJAB		Jurkat:BJAB EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	αCD95-N297A-scBaff	333 / 174 / 76 / 82	166,3	3,6 / 3 / 2,8 / 4,5	3,5	47,5
αCD95-Fab2-scBaff	126 / 88 / 145 / 122	120,3	5,3 / 13 / 2,8 / 8,5	7,4	16,3	

**B**

	Ko-Kultur HT1080 +					
	Baffr-/BCMA-/TACI-neg.:			Baffr-/BCMA-/TACI-pos.:		
	Jurkat		MW EC50	MM.1S		Jurkat:MM.1S EC50-Shift
Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50		MW EC50		
αCD95-N297A-scBaff	33,3 / 99,5	83	6 / 56,5	31,3	2,65	
αCD95-Fab2-scBaff	103 / 125	114	46,5 / 116	81,3	1,4	
	Jurkat		L363		Jurkat:L363 EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	αCD95-N297A-scBaff	60 / 67,7 / 55	61	0,8 / 1,2 / 0,5	0,8	76
αCD95-Fab2-scBaff	135 / 73,5 / 118	109	2,5 / 1,4 / 1,3	1,7	64	
	Jurkat		BJAB		Jurkat:BJAB EC50-Shift	
	Einzel-EC50	MW EC50	Einzel-EC50	MW EC50		
	αCD95-N297A-scBaff	73,5 / 57 / 130	87	0,8 / 1,2 / 0,8	0,9	97
αCD95-Fab2-scBaff	120 / 80 / 172	124	2,3 / 2,7 / 2,2	2,4	52	

**4.6.2.3 Das CD95-spezifische N297A-scBaff-Antikörper-Fusionsprotein induziert effizient Apoptose in Monokulturen von Zelllinien, die sowohl den Zielrezeptor CD95 als auch die Verankerungsrezeptoren Baffr, BCMA oder TACI exprimieren**

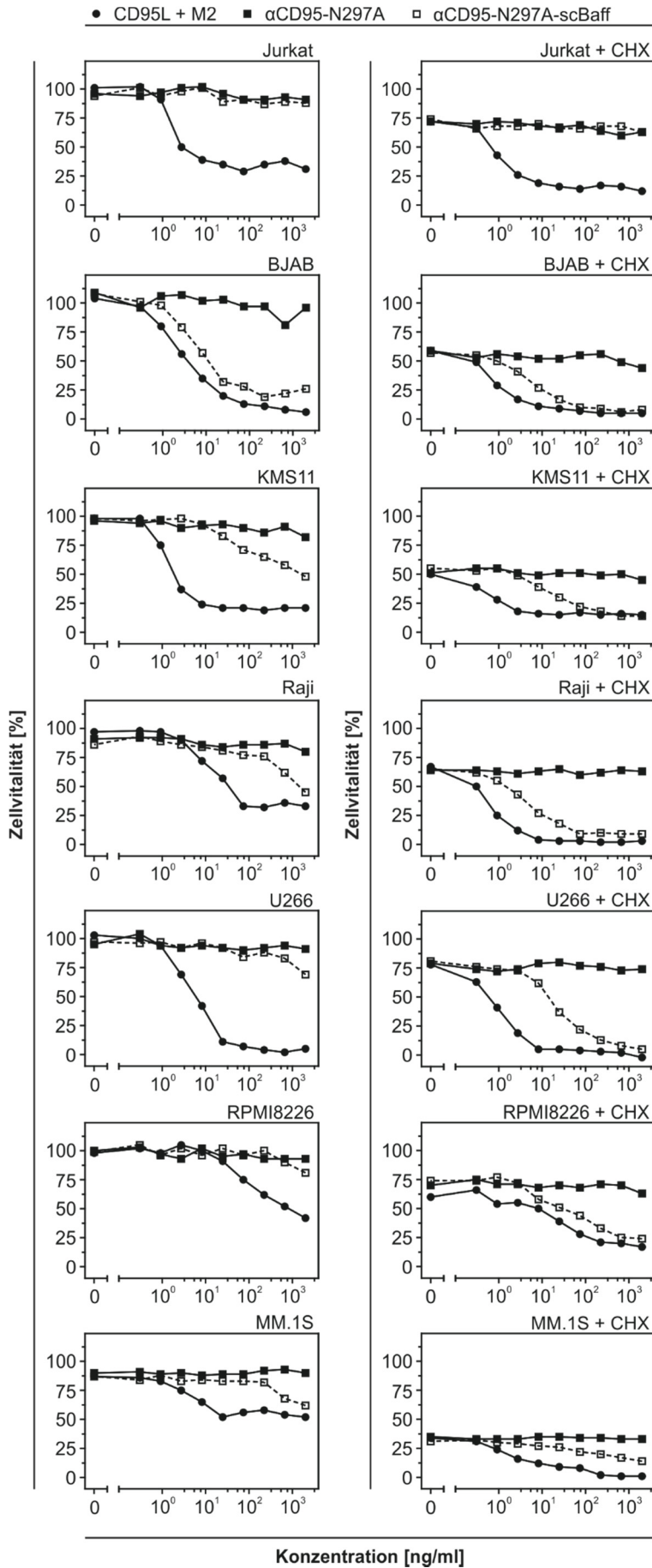
In den vorangegangenen FACS-Analysen wurden unter anderem auch Tumor-Zelllinien identifiziert, die sowohl CD95 als auch einen oder mehrere der Rezeptoren Baffr, BCMA oder TACI simultan exprimieren (Tab. 18, Abb. S 1). Dies eröffnet die Möglichkeit, Monokulturen dieser Tumorzellen zielgerichtet zu binden und apoptotische Effekte direkt ohne Beteiligung zusätzlicher (Immun-)Zellen zu induzieren. Diese Möglichkeit sollte in abschließenden Experimenten als weitere, vielversprechende Anwendungs- und Funktionsweise der hier neu

beschriebenen Antikörper-Fusionsproteine beispielhaft anhand der  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Variante untersucht werden.

Anhand sechs BaffR-/BCMA-/TACI- und CD95-doppelpositiver Tumor-Zelllinien (BJAB, KMS11, Raji, U266, RPMI 8226 und MM.1S) und der BaffR-/BCMA-/TACI-negativen, CD95-positiven Kontrollzelllinie Jurkat wurde zunächst nachgewiesen, dass die CD95-spezifische Apoptose induziert werden kann. Hierzu wurden die Zelllinien mit quervernetztem CD95-Ligand als Positivkontrolle stimuliert, der dabei in sämtlichen Zelllinien ohne CHX-Vorbehandlung die konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität induzierte (Abb. 16 links). Dies geschah mit mittleren effektiven Konzentrationen zwischen 1,5-13 ng/ml. Lediglich die Zelllinie RPMI 8226 wurde erst bei weitaus höheren Konzentrationen ( $EC_{50}$ -Wert von 750 ng/ml) getötet. In CHX-sensitivierten Monokulturen wurde die Apoptose vergleichbar effektiv ausgelöst, wobei wiederum die RPMI 8226 Zellen schwächer reagierten ( $EC_{50}$ : 25 ng/ml), als die anderen Zelllinien ( $EC_{50}$ -Werte zwischen 0,6-2 ng/ml) (Abb. 16 rechts). Im Vergleich zwischen CHX-unbehandelten und -vorbehandelten Zellkulturen ist in jedem Fall festzustellen, dass alle Zelllinien unabhängig von der CD95L-Stimulation in unterschiedlich starker Weise auf die Inhibition der Proteinbiosynthese durch CHX-Behandlung reagierten.

Folglich fielen auch die Effekte, die nach Inkubation mit dem  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusionsprotein beobachtet werden konnten, in den jeweiligen Monokulturen sehr unterschiedlich aus. Keine Verringerung der Zellvitalität war in den BaffR-/BCMA-/TACI-negativen Jurkat Zellen festzustellen, wohingegen in allen anderen Monokulturen nach Stimulation mit  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff die BaffR-/BCMA-/TACI-spezifische Apoptose in unterschiedlichem Ausmaß induziert werden konnte. BJAB Zellen reagierten bereits ohne CHX-Vorinkubation äußerst effizient auf die Stimulation mit  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff ( $EC_{50}$ -Wert von 5 ng/ml) (Abb. 16 links). In KMS11 Monokulturen war zwar ab Konzentrationen > 10 ng/ml eine Apoptose-Induktion festzustellen, diese konnte allerdings keine maximalen Effekte, wie nach CD95L-Stimulation, erreichen. Die restlichen Zelllinien zeigten ohne CHX-Vorbehandlung lediglich bei erhöhten Konzentrationen > 250 ng/ml (Raji, U266, RPMI 8226, MM.1S) eine Verringerung der Zellvitalität (Abb. 16 links). In Experimenten mit vorhergehender CHX-Sensitivierung konnten dagegen optimierte Effekte erzielt werden. Neben den BJAB Zellen ( $EC_{50}$ -Wert von 5 ng/ml) konnte nun mit dem  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusionsprotein auch in vier der anderen Zelllinien die Apoptose verstärkt bis hin zur Sättigung induziert werden (Abb. 16 rechts). Die dabei benötigten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen lagen bei 4 ng/ml (Raji), 14 ng/ml (KMS11), 18 ng/ml (U266) bzw. 30 ng/ml (RPMI 8226). Zwar ließ sich auch in MM.1S Monokulturen eine  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-spezifische Apoptose induzieren, jedoch war diese im Vergleich zu den anderen BaffR-/BCMA-/TACI-positiven Monokulturen am schwächsten ausgeprägt. Die Stimulation mit  $\alpha$ CD95-N297A hatte in allen sieben Tumorzelllinien unabhängig von einer vorangehenden CHX-Sensitivierung keine Auswirkungen auf die Zellvitalität oder verursachte erst bei Konzentrationen > 500 ng/ml in einigen Zelllinien eine leichte Verringerung der Zellvitalität. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die apoptotische Wirkung des  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusionsproteins wiederum Verankerungsdomänen-abhängig war.

Ergebnisse



**Abb. 16:** Das  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusionsprotein induzierte in Monokulturen von Zelllinien, die sowohl CD95- als auch BaffR-/BCMA-/TACI-positiv sind, eine starke, konzentrationsabhängig CD95-Aktivierung.

(Links) Die genannten Tumorzelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen an löslichem CD95-Ligand (schwarze Punkte), der als Positivkontrolle zuvor mit 1  $\mu$ g/ml anti-Flag M2-Antikörper quervernetzt wurde, mit  $\alpha$ CD95-N297A (schwarze Quadrate) oder  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff (weiße Quadrate) stimuliert. Nach einem Tag wurde die Zellvitalität mittels MTT-Färbung quantifiziert. (Rechts) Die beschriebenen Tumorzelllinien wurden zunächst mit 2,5  $\mu$ g/ml CHX vorinkubiert und anschließend wie unter "Links" beschrieben stimuliert und analysiert.

Auch wenn die mittels  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff induzierten Effekte erst bei höheren Konzentrationen ausgelöst wurden als nach CD95L-Stimulation, zeigen diese Ergebnisse in jedem Fall, dass das vorgestellte Konstrukt im Gegensatz zum natürlichen Liganden und der Variante ohne Verankerungsdomäne Zell- bzw. Tumor-spezifisch funktioniert und die vorgestellten Antikörper-Fusionsproteine über ein hohes Potenzial verfügen, auch direkt und unabhängig von anderen Immunzellen anti-tumoral zu wirken.

## 5 Diskussion

Immuntherapeutische Antikörper gegen Rezeptoren der TNFRSF stellen attraktive Wirkstoffe zur Behandlung einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, von soliden bis hin zu hämatologischen oder lymphatischen Malignomen, dar. Dementsprechend befindet sich eine Vielzahl möglicher Therapiekandidaten in unterschiedlichen Phasen aktueller präklinischer und klinischer Forschung. Im Zusammenhang mit solchen Antikörper-basierten Ansätzen können tendenziell zwei Kategorien von untersuchten Antikörper-Formaten unterschieden werden: Zum einen sind dies monospezifische, konventionelle Antikörper, die ein einzelnes, spezifisches Antigen binden, um entweder direkt agonistisch bzw. antagonistisch zu wirken oder nach Bindung Fc-vermittelte Effektorfunktionen zu induzieren. Zum anderen wurden diverse bi- oder tri-spezifische Antikörper-Formate entwickelt, die mehrere Zielmoleküle parallel binden und somit z.B. die Interaktion verschiedener Zellen miteinander forcieren oder unterschiedliche immunmodulatorische Effekte gleichzeitig initiieren.

Die in dieser Arbeit entwickelten und evaluierten CD40-/CD95-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine mit BaffR-/BCMA-/TACI-gerichteter Verankerungsdomäne stellen ein bispezifisches Format dar, das bislang nicht im Zusammenhang mit diesen Mitgliedern der TNFRSF analysiert wurde. Wie in den Ergebnissen dargestellt, ließ sich mit den CD40- und CD95-spezifischen Antikörper-Varianten erfolgreich demonstrieren, dass die Bindung der N-terminalen Antigenbindedomäne an die Effektor-Rezeptoren CD40 bzw. CD95 im niedrigen nanomolaren Bereich erhalten blieb und die C-terminale scBaff-Verankerungsdomäne ebenfalls hoch affin an alle drei Rezeptoren BaffR, BCMA und TACI binden konnte. Da Antikörper gegen diese beiden TNFRSF Rezeptoren bislang entscheidend auf eine Immobilisierung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren angewiesen sind, um eine effektive Rezeptoraktivierung zu initiieren, konnte gezeigt werden, dass die scBaff-Verankerungsdomäne diese Funktion alternativ und zielgerichtet übernehmen kann, sodass die beschriebenen Antikörper-scBaff-Fusionsproteine auch Fc $\gamma$ R-unabhängig in der Lage waren, Tumorantigen-spezifischen CD40/CD95-Agonismus zu potenzieren bzw. zu induzieren.

Um zu beurteilen, ob die erzielten Daten eine weitere präklinische Evaluierung der vorgestellten Antikörper-scBaff-Fusionsproteine nahelegen, muss diskutiert werden, wie diese Konstrukte im Vergleich zu anderen Antikörpern mit vergleichbarem therapeutischem Ziel einzuschätzen sind. Zu diesem Zweck werden die TRAAFFIAA im Folgenden den aussichtsreichsten, derzeit in präklinischer und klinischer Erprobung befindlichen Antikörper-Therapeutika gegenüber gestellt, das Konzept einer C-terminalen Verankerungsdomäne im Kontext weiterer bi- und tri-spezifischen Antikörperformaten betrachtet, die Relevanz etwaig aufgetretener experimenteller Probleme angesprochen und abschließend ein Ausblick für mögliche Optimierungen und weitere, notwendige Entwicklungsschritte gegeben.

## 5.1 Einordnung der scBaff-Antikörper-Fusionsproteine in den aktuellen Stand der klinischen Forschung

Derzeit befinden sich eine Vielzahl an möglichen neuen Antikörper-Immuntherapeutika gegen die Zielmoleküle CD40, CD95 oder BaffR/BCMA/TACI in unterschiedlichen Phasen der präklinischen Entwicklung oder klinischen Erprobung. Dabei gibt es allerdings keine Kandidaten im bi- oder trispezifischen Format, die eine simultane Adressierung dieser Rezeptoren verfolgen. Da somit direkte Vergleichspartner zu den präsentierten TRAAFFIAAs fehlen, werden zunächst die einzelnen Bindedomänen der CD40- bzw. CD95-spezifischen scBaff-Antikörper-Fusionsproteine getrennt voneinander betrachtet und deren Effektivität mit verfügbaren Daten anderer therapeutischer Kandidaten verglichen.

### 5.1.1 CD40-spezifische Immuntherapie mittels immun-modulatorischer Antikörper

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde der CD40-spezifische Antikörper G28.5 als geeigneter Kandidat für die in dieser Arbeit vorgestellten  $\alpha$ CD40-Antikörper und –Antikörper-Fusionsproteine ausgewählt. In der Gegenüberstellung zu den veröffentlichten Daten des G28.5-Ausgangsantikörpers liegen sowohl die Affinitäten als auch die effektiven Wirkkonzentrationen der hier untersuchten Konstrukte in einem vergleichbaren Bereich (Tab. 24)(Ledbetter *et al.* 1997, Francisco *et al.* 1997). Somit wurde bestätigt, dass die hier beschriebenen und getesteten  $\alpha$ CD40-Antikörper in ihren grundlegenden Eigenschaften mit den Literaturangaben übereinstimmen und die scBaff-Verankerungsdomäne diese Attribute innerhalb der weiterentwickelten Fusionsproteine nicht negativ beeinflusst hat.

Mittlerweile wird eine Vielzahl weiterer, monoklonaler  $\alpha$ CD40-Antikörper präklinisch und klinisch untersucht (Tab. 24). Der Großteil dieser Therapiekandidaten im IgG1-Format, wie ChiLob 7/4, Vanalimab, Dacetuzumab oder APX005M, wirkt bei ähnlichen effektiven Wirkkonzentrationen, wie die CD40-spezifischen TRAAFFIAAs (Chowdhury *et al.* 2014, Mangsbo *et al.* 2015, C. L. Law *et al.* 2005, Björck *et al.* 2016). Zu den weiteren Antikörpern ABBV-927, SEA-CD40 und CD40-GEX sind bislang keine funktionellen Daten veröffentlicht (Grilley-Olson *et al.* 2018, Schiele *et al.* 2018, NCT03893955). Einzig 2141-V11 zeigt bessere effektive Wirkkonzentrationen, als die hier untersuchten  $\alpha$ CD40-Antikörper und –Fusionsproteine (Knorr *et al.* 2018). Allerdings sind dabei alle genannten IgG1-Formate stark abhängig von der Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren, wirken daher nicht Tumor-spezifisch und bringen somit die Nachteile möglicher systemischer Nebenwirkungen mit sich. Die beiden einzigen Antikörper, die bislang Fc $\gamma$ R-unabhängige Wirkung zeigen, sind die IgG2-Antikörper Selicrelumab und CDX-1140, die jedoch ebenfalls nicht den Vorteil einer Tumorspezifität bieten (Gladue *et al.* 2011, Vitale *et al.* 2019).

Anhand dieses Vergleichs kann geschlussfolgert werden, dass die in dieser Arbeit präsentierten  $\alpha$ CD40(G28.5)-Antikörper-Fusionsproteine in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich wirken, wie eine Vielzahl anderer derzeit in klinischer Erprobung befindlichen Produkte, jedoch den Vorteil bieten, hoch-affin Tumor-spezifisch und dabei

unabhängig von niedrig-affiner und systemischer FcγR-Bindung zu wirken. Hierbei handelt es sich aktuell um eines der wenigen bispezifischen CD40-gerichteten Antikörper-Formate, die bislang beschrieben wurden. Während das bispezifische Konstrukt ABBV-428 für Mesothelin-exprimierende solide Tumore und somit ein anderes Anwendungsgebiet indiziert ist, ist ein zweites Produkt im DuoBody-Format mit dem Ziel entwickelt worden, bispezifisch CD40 und 4-1BB zu aktivieren und somit eine zweifache Immunantwort auszulösen (Ye *et al.* 2019, Muik *et al.* 2018). Dabei ist jedoch nicht sichergestellt, dass diese agonistische Aktivität Tumorzell- bzw. Gewebe-spezifisch stattfindet. Somit haben die vorgestellten αCD40-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine zum jetzigen Stand ein Alleinstellungsmerkmal, das sich im Vergleich zu allen bisherigen CD40-spezifischen Antikörpern potenziell überlegen abheben kann.

Tab. 24: Vergleich ausgewählter CD40-spezifischer Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine in der präklinischen und klinischen Entwicklung.

$\alpha$ CD40 mAb Name (Klon)	Format	Haupt-Wirkmechanismus	K <sub>D</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [ng/ml]	Entwicklungsstand	CD40/CD40L Block	Fc $\gamma$ R-Abhängigkeit	Referenz	Eigentum
G28.5	scFv	CD40-Agonismus	2,2-3	20-70 <sup>a</sup>	präklinisch (eingestellt)	nein	ja	(Francisco <i>et al.</i> 1997, Ledbetter <i>et al.</i> 1997)	frei
	IgG1	CD40-Agonismus und -Antagonismus	1,1	75 <sup>a</sup> (N297A-Variante)	präklinisch	ja	ja	Eigene Daten	frei
G28.5-scBaff	IgG1-N297A	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung	1,6	83 <sup>a</sup> / 21-60 <sup>b</sup>	präklinisch	ja	nein	Eigene Daten	Universität Würzburg
	Fab2		2,7	27-60 <sup>b</sup>					
ChiLob 7/4	IgG1	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung; ADCC und CDC	0,2	1000-5000* <sup>a</sup>	Phase I	unbekannt	ja	(Chowdhury <i>et al.</i> 2014)	University of Southampton
Vanalimab/ADC-1013 (JNJ-64457107)	IgG1	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung; ADCC; direkte Apoptose	0,01	76-150 <sup>a</sup>	Phase I	ja	ja	(Mangsbo <i>et al.</i> 2015)	Alligator Biosciences/Janssen
Selicrelumab (RG7876)CP-870,893	IgG2	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung; ADCC	0,4	5-50	Phase I	nein	nein	(Gladue <i>et al.</i> 2011)	Pfizer/Roche
2141-V11	IgG1	hIgG1 (Fc $\gamma$ RIIB-optimiert); CP-870,893-Variante	27,3	3* <sup>**a</sup>	präklinisch	nein	ja	(Knorr <i>et al.</i> 2018)	Rockefeller University, New York
CDX-1140	IgG2	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung; ADCC; direkte Apoptose	0,01	44-73* <sup>***</sup>	Phase I	nein	nein	(Vitale <i>et al.</i> 2019)	Celldex Therapeutics
APX005M	IgG1	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung; ADCC; direkte Apoptose	0,12	72* <sup>****a</sup>	Phase I/II	ja	ja	(Björck <i>et al.</i> 2016)	Apexigen



<b>αCD40 mAb Name (Klon)</b>	<b>Format</b>	<b>Haupt-Wirkmechanismus</b>	<b>K<sub>D</sub> [nM]</b>	<b>EC<sub>50</sub> [ng/ml]</b>	<b>Entwicklungsstand</b>	<b>CD40/CD40L Block</b>	<b>FcγR-Abhängigkeit</b>	<b>Referenz</b>	<b>Eigentum</b>
ABBV-927	unbekannt	CD40-Agonismus; APC-Aktivierung; ADCC unbekannt Phase I				unbekannt		NCT03893955	AbbVie
Dacetuzumab (SGN-40)	IgG1	CD40-Agonismus; direkte Apoptose; ADCC, ADCP und CDC	1	10-100 <sup>a</sup>	Phase II	nein	ja	(C. L. Law <i>et al.</i> 2005)	Seattle Genetics
SEA-CD40	IgG1	Unfucosyliert (FcγRIIIa-optimiert); SGN-40-Variante			Phase I	nein	ja	(Grilley-Olson <i>et al.</i> 2018)	Seattle Genetics
CD40-GEX	IgG1/IgG2	hIgG2 and hIgG1 (FcγRIIIa-optimiert); SGN-40-Varianten			präklinisch	unbekannt	Ja/ nein	(Schiele <i>et al.</i> 2018)	Glycotope
Lucatumumab (HCD122; CHIR-12.12)	IgG1	CD40-Antagonismus; ADCC	0,5	2***** <sup>a</sup>	Phase II (eingestellt)	ja	ja	(Luqman <i>et al.</i> 2008)	Novartis
ABBV-428	bispezifisch	Mesothelin (MSLN)-abhängiger CD40-Agonismus	unbekannt		Phase I	unbekannt		(Ye <i>et al.</i> 2019)	AbbVie
DuoBody-CD40x4-1BB	bispezifisch	4-1BB-Agonismus; CD40-Agonismus	unbekannt		präklinisch	unbekannt		(Muik <i>et al.</i> 2018)	BioNTech/ Genmab

\* Keine direkte Angabe: Geschätzt aus DC-Stimulations-Experiment

\*\* Keine direkte Angabe: Geschätzt aus DC-Stimulations-Experiment

\*\*\* berechnet aus 0,3-0,5 nM IgG2 (146 kDa), Keine direkte Angabe: Geschätzt aus NF-κB-Aktivierung und B-Zell Proliferations-Experiment

\*\*\*\* berechnet aus 0,49 nM IgG1 (146 kDa)

\*\*\*\*\* berechnet aus 14 pM IgG1 (146 kDa)

<sup>a</sup> nach sekundärer Quervernetzung/FcγR-Immobilisierung

<sup>b</sup> nach BaffR-/BCMA-/TACI-Immobilisierung

### 5.1.2 CD95-basierte Immuntherapie mit dem Ziel der Apoptose-Induktion von Tumorzellen

Anders als im Fall der CD40-spezifischen Immuntherapie mit einer Vielzahl an aktuell konkurrierenden Produkten, ist das Forschungsfeld an möglichen, therapeutisch einsetzbaren CD95-Agonisten überschaubar. Die beiden ältesten, agonistischen Antikörper „Anti-APO-1“ (IgG3) und CH11 (IgM) sowie der etwas später entwickelte Antikörper 2R2 (IgG3) wiesen alle eine hohe Affinität und eine überaus effektive Apoptose-Induktion auf (Tab. 25)(Coney *et al.* 1994, Yonehara *et al.* 1989, Ferrari *et al.* 1998). Aufgrund des erhöhten Grades an Autoaggregation des IgG3-Isotyps bzw. der pentameren Struktur von IgM sind diese drei Antikörper dabei zwar auf keine sekundäre Quervernetzung bzw. FcγR-abhängige Antikörper-Immobilisierung angewiesen, kamen durch die angesprochene Hepatotoxizität (siehe 1.2.4.3) jedoch nicht für therapeutische Anwendungen in Frage. Dagegen wurden vier αCD95-Antikörper beschrieben, die alleine nicht oder lediglich gering CD95-aktivierend wirken und somit einen größeren Spielraum für die Entwicklung von weniger hepatotoxischen Varianten bieten: E09, HFE7A und DX2 (alle IgG1) und SM1/1 (IgG2a) (Tab. 25)(Chodorge *et al.* 2012, Haruyama *et al.* 2002, Cifone *et al.* 1994, Ruckert *et al.* 2000). SM1/1 ist lediglich in einem hohen Konzentrationsbereich in der Lage, Apoptose in CD95-positiven Zellen zu induzieren und bietet daher wenig therapeutisches Potenzial. Die beiden aussichtsreichsten Kandidaten zur weiteren Entwicklung stellen E09 und HFE7A dar. HFE7A wurde dabei als Antikörper beschrieben, der CD95 mit hoher Affinität bindet, ohne Quervernetzung oder FcγR-Bindung bis in einen hohen Konzentrationsbereich keine CD95-Aktivierung induziert, nach Quervernetzung jedoch potent wirkt. HFE7A stellte somit auch im Zusammenhang mit dem hier beschriebenen Konzept von Verankerungsdomänen-gekoppelten Antikörpern einen interessanten Kandidaten dar. Allerdings konnten die publizierten Ergebnisse im Rahmen von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) nicht reproduziert werden. Der von uns klonierte HFE7A-IgG1-Antikörper hat zwar ebenfalls an CD95-positive Zellen gebunden, jedoch im Vergleich zum ebenfalls getesteten E09-IgG1-Antikörper mit wesentlich geringerer Affinität. Darüber hinaus konnte auch nach Quervernetzung mit Protein G lediglich in einem hohen Konzentrationsbereich > 1µg/ml eine vergleichsweise geringe Zytotoxizität induziert werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Veröffentlichung eines weiteren HFE7A-basierten, humanisierten Antikörpers, R-125224 (Nakayama *et al.* 2006), der ebenfalls einen Quervernetzungs-induzierten CD95-Agonismus lediglich in wenigen Zelllinien und bei hohen Konzentrationen reproduzieren konnte. Nachdem R-125224 in Tierversuchen mit Langschwanzmakaken bereits nach einmaliger Injektion ein erhebliches Maß an anti-R-125224-Antikörpern gegen die murinen CDR-Regionen hervorrief und somit ein hohes Risiko für eine Immunogenität von R-125224 bestand, wurde die weitere Entwicklung dieses Produkts eingestellt (Saito-Yabe *et al.* 2009).

Basierend auf den veröffentlichten Daten von E09, die auf einen hohen CD95-Agonismus nach Quervernetzung hindeuten, und den positiven Vorversuchen mit selbst kloniertem E09-IgG1-Antikörper, wurden schließlich unterschiedliche E09-Antikörper-Varianten im Rahmen

dieser Arbeit genauer evaluiert. Für den hier untersuchten E09-IgG1-Antikörper konnte eine CD95-Affinität von 2,5 nM gemessen werden, was deutlich unter dem publizierten  $K_D$ -Wert von 17 nM liegt (Tab. 25). Ein Grund hierfür kann in den unterschiedlichen Messmethoden, zum einen Zell-basiert und zum anderen via SPR, bestehen. Ein weiterer Grund kann die Verwendung des GpL-getaggtten Konstruktes im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich zum nativen Antikörper sein. Eine ähnlich große Differenz zwischen diesen zwei Varianten konnte bereits in einer früheren Publikation gezeigt werden (Kums *et al.* 2017), die jedoch keinen funktionellen Unterschied offenbarte. Genauso verhält es sich auch bei den hier verglichenen E09-Antikörpern. Sowohl der publizierte IgG1-Antikörper als auch der in dieser Arbeit untersuchte N297A-Antikörper induzieren *per se* eine CD95-Aktivierung bei mittleren effektiven Wirkkonzentrationen von 121 ng/ml bzw. 120-400 ng/ml. Dieser Rezeptoragonismus lässt sich in beiden Fällen durch sekundäre Quervernetzung deutlich potenzieren (15 ng/ml bzw. 3 ng/ml). Dass die  $EC_{50}$ -Werte etwas variieren, lässt sich sicherlich dadurch erklären, dass die Zytotoxizitätsexperimente in der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und variierender Konzentrationen an CHX leicht voneinander abwichen. E09-RGY, ein weiterer Antikörper, der sich momentan in der präklinischen Erprobung befindet (WO2017093447A1), hat wiederum einen  $EC_{50}$ -Wert von 10 ng/ml, der ohne sekundäre Quervernetzung, dafür jedoch durch Hexamerisierungs-fördernde Mutationen in der Fc-Domäne des Antikörpers erzielt wird. Somit lässt sich festhalten, dass die mittlere effektive Wirkkonzentration des von uns produzierten E09-N297A-Antikörpers vergleichbar mit den entsprechenden Werten aus unabhängigen Publikationen ist. Diese funktionellen Eigenschaften blieben in den hier neu beschriebenen  $\alpha$ CD95(E09)-scBaff-Fusionsproteinen erhalten. Durch die Tumor-spezifische Verankerungsdomäne haben diese Konstrukte jedoch ein großes Potenzial für ein optimiertes Wirkprofil mit verringerten Nebenwirkungen. Auch weitere Ansätze zielen auf eine solche bispezifische Addressierung von CD95 und eines Tumorantigens ab (Tab. 25): Novotarg, der auf DX2 basiert, soll die Apoptose von malignen, CD20-positiven B-Zellen induzieren und ist somit für dasselbe Therapiefeld indiziert wie die hier präsentierten scBaff-Antikörper-Fusionsproteine (G. Jung *et al.* 2001). Bislang sind noch keine präklinischen Ergebnisse zu Novotarg veröffentlicht, sodass kein Vergleich gezogen werden kann. Die Addressierung der Rezeptoren Baff, BCMA und TACI bietet jedoch, wie bereits in der Einleitung erörtert, den Vorteil, eine verbesserte Tumorspezifität aufzuweisen. Auch zu einem zweiten, bispezifischen Konstrukt, das von Roche Glycart zum Patent angemeldet wurde, sind bislang keine weiteren Entwicklungsstände und funktionellen Daten vorhanden (WO2011039126A1). Dieses Antikörper-Format basiert auf dem CD95-spezifischen HFE7A-Antikörper sowie einer Domäne, die gegen das CRIPTO-Tumorantigen gerichtet ist, das in malignen Zellen des Kolonkarzinoms oder in Lebermetastasen überexprimiert wird und somit eine andere Indikation hat, als die vorgestellten  $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine. Dennoch zeigen diese beiden Ansätze, dass neuartige, Tumorantigen-spezifische Antikörper-Formate durchaus das Versprechen bieten, die Gefahren von Hepatotoxizität nach CD95-Aktivierung zu umgehen. Daher haben entsprechende  $\alpha$ CD95-Antikörper sowie andere Apoptose-induzierende Rezeptoren der TNFRSF, wie z.B. DR5, durchaus das Potenzial neue Therapiealternativen zu ermöglichen.

Tab. 25: Auflistung relevanter CD95-spezifischer Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine in der präklinischen und klinischen Entwicklung.

$\alpha$ CD95 mAb Name (Klon)	Format	Haupt-Wirkmechanismus	KD [nM]	EC <sub>50</sub> [ng/ml]	Entwicklungsstand	CD95/CD95L Block	Fc $\gamma$ R-Abhängigkeit	Referenz	Eigentum
E09	IgG1	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	17	121 <sup>a</sup> / 15 <sup>b</sup> *	präklinisch	ja	Ja, zur Potenzierung	(Chodorge <i>et al.</i> 2012)	frei
	IgG1		2,5	120-400 <sup>a</sup> / 3 <sup>b</sup> (N297A-Variante)	präklinisch	ja	Ja, zur Potenzierung	Eigene Daten	frei
E09-RGY	IgG1	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion; CDC	unbekannt	10 <sup>c</sup>	präklinisch	ja	nein	WO2017093447 A1	Genmab
E09-scBaff	IgG1-N297A	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	2,2	122 <sup>a</sup> / 3 <sup>b</sup> / 4 <sup>d</sup>	präklinisch	ja	nein	Eigene Daten	Universität Würzburg
	Fab2		4,5	256 <sup>a</sup> / 7 <sup>d</sup>					
„Anti-APO-1“	IgG3	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	0,2 - 1,1	8	präklinisch (eingestellt)	unbekannt	Nein, aber IgG3 Autoaggregation	(Coney <i>et al.</i> 1994, Dhein <i>et al.</i> 1992)	frei
2R2	IgG3	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	unbekannt	2	präklinisch (eingestellt)	unbekannt	Nein, aber IgG3 Autoaggregation	(Wesselborg <i>et al.</i> 1999, Ferrari <i>et al.</i> 1998)	frei
CH11	IgM	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	unbekannt	3,2-10 <sup>a</sup>	präklinisch	ja	nein	(Yonehara <i>et al.</i> 1989, Whitekus <i>et al.</i> 1999)	frei
HFE7A	IgG1	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	1,6	>1000 <sup>a</sup> / 10 <sup>b</sup>	präklinisch	unbekannt	Ja	(Yoshida <i>et al.</i> 2010, Haruyama <i>et al.</i> 2002)	frei

$\alpha$ CD95 mAb Name (Klon)	Format	Haupt-Wirkmechanismus	KD [nM]	EC <sub>50</sub> [ng/ml]	Entwicklungsstand	CD95/CD95L Block	Fc $\gamma$ R-Abhängigkeit	Referenz	Eigentum
R-125224	IgG1	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	2,4-4,3	> 1000 <sup>a</sup> / 500-1000 <sup>b</sup>	präklinisch (eingestellt)	unbekannt	Ja	(Nakayama <i>et al.</i> 2006)	Daiichi Sankyo
DX2	IgG1	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	7,3	204 <sup>***</sup> /5-15 <sup>****</sup>	präklinisch	nein	ja	(Chodorge <i>et al.</i> 2012, Cifone <i>et al.</i> 1994)	frei
SM1/1 (BMS 138)	IgG2a	CD95-Agonismus; Apoptose-Induktion	5,2	584 <sup>*****</sup> /100-500 <sup>b</sup>	präklinisch	nein	ja	(Ruckert <i>et al.</i> 2000)	frei
Novotarg (BS9520)	bispezifischer Fabsc <sup>1</sup>	CD20-abhängiger CD95-Agonismus	unbekannt		präklinisch	unbekannt	nein	(Nalivaiko <i>et al.</i> 2016, G. Jung <i>et al.</i> 2001)	Baliopharm
FAS-CRIPTO	bispezifisch	Tumorantigen-abhängiger CD95-Agonismus	unbekannt		präklinisch	unbekannt		WO2011039126 A1	Roche Glycart

\* berechnet aus 0,83 nM<sup>a</sup> bzw. 0,1 nM<sup>b</sup> IgG1 (146 kDa)

\*\* berechnet auf 1,4 nM IgG1 (146 kDa)

\*\*\* <http://www.amsbio.com/datasheets/2343-MC-250.pdf>

\*\*\*\* berechnet aus 4 nM IgG2a (146kDa)

<sup>a</sup> ohne sekundärer Quervernetzung/ohne Fc $\gamma$ R-Immobilisierung

<sup>b</sup> nach sekundärer Quervernetzung/nach Fc $\gamma$ R-Immobilisierung

<sup>c</sup> nach Antikörper-Hexamersierung

<sup>d</sup> nach BaffR-/BCMA-/TACI-Immobilisierung

<sup>1</sup> **Fabsc**: Fab<sub>(1)</sub>(Antigen 1)-CH2-scFv(Antigen 2)

### 5.1.3 Die Rezeptoren von Baff und APRIL als Ziel therapeutischer Antikörper

Da die übermäßige Expression der TNFRSF-Mitglieder BaffR, BCMA und TACI auf unterschiedlichen B-Zelltypen stark mit der Progression einer Reihe hämatologischer Tumore assoziiert ist, liegt derzeit ein großer Fokus auf der Entwicklung BCMA-spezifischer Antikörpertherapeutika mit Indikation gegen das Multiple Myelom. Daneben gibt es auch Bemühungen in Richtung der Behandlung diverser anderer Erkrankungen mittels BaffR-spezifischer Antikörper. Generell können all diese unterschiedlichen Antikörper-basierten Wirkstoffvarianten in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: Zum einen werden monospezifische Antikörper oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) mit dem Ziel entwickelt, Tumor-spezifisch zytotoxisch zu wirken und so die malignen Zellen direkt zu zerstören. In diesen Zusammenhang können auch die hier beschriebenen  $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine eingeordnet werden. Die andere Antikörpergruppe ist so konzipiert, dass sie die Tumorzellen bindet und daraufhin unterschiedliche Bestandteile des Immunsystems aktiviert, um dadurch den Tumor indirekt, dafür jedoch unter Einbeziehung langfristigerer Mechanismen anzugreifen, was auch auf die beschriebenen  $\alpha$ CD40-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine zutrifft.

Monospezifische Antikörper sind mit zwei Kandidaten gegen BCMA, SEA-BCMA und J22.9-xi, sowie einem gegen BaffR, Ianalumab, recht überschaubar vertreten (Tab. 26) (WO2017143069A1, Oden *et al.* 2015, McWilliams *et al.* 2019). Alle drei Konstrukte binden bivalent an die jeweiligen Rezeptoren und antagonisieren so zum einen die Bindung von Baff/APRIL und induzieren zum anderen Fc-vermittelt ADCC und/ oder CDC. Aber dennoch verursachen alle drei Antikörper durch ihre hauptsächlich Fc $\gamma$ R-abhängige Wirkung auch die bereits angesprochenen Nebenwirkungen. Die Gruppe der ADCs zeichnet aus, dass sie allesamt auch mit konjugiertem Wirkstoff ein Molekulargewicht zwischen 150-155 kDa haben, somit nicht viel größer sind als natürlich vorkommende IgG-Antikörper und eine vergleichbar gute Serumhalbwertszeit aufweisen. Derzeit befinden sich sieben unterschiedliche  $\alpha$ BCMA-ADCs in der präklinischen oder klinischen Erprobung, wobei Belantamab mafodotin sowie MEDI2228 den weitesten Entwicklungsstand haben (WO2017093942A1, Tai *et al.* 2019). Alle ADCs binden hoch affin an BCMA. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die ADCs bivalent an zwei BCMA-Rezeptormoleküle binden, während die scBaff-Antikörper-Fusionsproteine hexavalent binden und somit eine höhere Avidität aufweisen. Dies kann dazu führen, dass sich die zeitliche Dauer der Bindung des Gesamtkomplexes stark erhöht, denn wenn drei Baff-Moleküle in Kontakt mit einem vorgeformten Rezeptor-Trimer kommen, steigt nach Bildung einer ersten Ligand:Rezeptor-Bindung zugleich die Wahrscheinlichkeit, dass es auch zu einer zweiten und dritten Paarung kommt. Wenn eines dieser Ligand:Rezeptor-Paare dissoziiert, müssen die Partner dennoch in einer erzwungenen Nähe zueinander bleiben („forced proximity“), solange noch eine weitere Paarung Bestand hat, was die Chance auf eine wiederholte Rückbindung erhöht (Vauquelin und Charlton 2013). Durch diese anzunehmende festere Bindung der  $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine wird auch die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine CD95-

Bindung und -Aktivierung stattfindet und eine robuste Zellzytotoxizität induziert werden kann. Ein weiterer Punkt in der Funktionsweise der ADCs besteht darin, dass sie auf eine Internalisierung durch Endozytose angewiesen sind, da sämtliche konjugierte Wirkstoffe der dargestellten ADC-Varianten erst zytosolisch oder nach Abspaltung im Zellkern funktionieren. Somit sind diese ADCs nach der BCMA-Bindung noch von einer Reihe weiterer, zellulärer Prozesse abhängig, bevor eine intrinsische, apoptotische Signaltransduktion induziert wird, wohingegen die  $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteine die Apoptose direkt CD95-vermittelt extrinsisch und intrinsisch induzieren können. Darüber hinaus besteht für die genannten TRAAFFIAs die Möglichkeit, nach Lösung der Rezeptorbindung ohne Umwege erneut an andere Zellen zu binden und somit potenziell mehrere Tumorzellen nacheinander, statt nur einer zu töten. In diesem Zusammenhang ist es jedoch sicherlich nötig ebenfalls zu untersuchen, inwiefern auch die TRAAFFIAs internalisiert werden und nach einem Recycling noch funktionell aktiv sind.

Auch die Gruppe der immun-stimulatorischen Antikörper umfasst ein Feld unterschiedlichster Konstruktformate. Nach der Zulassung des ersten T-Zell-spezifischen Wirkstoffs im BiTE-Format (Blincyto) und dessen erfolgreicher Verwendung bei ALL (Bargou *et al.* 2008), ist die Adressierung des T-Zell-aktivierenden CD3-Rezeptors auch im Zusammenhang mit dem Multiplen Myelom in den Fokus der klinischen Forschung gerückt. Dementsprechend befinden sich derzeit neun bispezifische, Antikörper-basierte Konstrukte sowie ein trispezifisches in der Entwicklung (Tab. 26), die durch die Zell-spezifische Bindung an BCMA eine CD3-vermittelte Tumorlyse durch zytotoxische T-Zellen erzielen sollen. Die verglichenen Konstrukte unterscheidet zum einen, dass sie entweder ein klassisches IgG-Format haben, deren Fc-Region aber in den meisten Fällen derart modifiziert wurde, dass sie Fc-Effektor-defizient sind, oder dass sie gar keine Fc-Domäne besitzen. Zum anderen binden die meisten Konstrukte monovalent an BCMA und CD3, wohingegen einige Format (EM801/901, TNB-383B/384B) bivalent an BCMA binden (Seckinger *et al.* 2017, WO2018083204A1, WO2019133761A1). Diese Konstrukte sowie PF-06863135 (NCT03269136) wurden zusätzlich so entwickelt, dass sie mit einer höheren Affinität an BCMA binden als an CD3, z.B.  $K_D$ -Werte BCMA/CD3 von 10 nM/70 nM (EM801) oder 20 pM/40 nM (PF-06863135). Dies zielt, wie die vorgestellten TRAAFFIAA-Antikörper mit hexavalenter BCMA-Bindung, darauf ab, dass Tumor-spezifische Bindung präferenziert vorliegen soll, bevor ein immunstimulatorischer Stimulus örtlich begrenzt induziert wird. Ob sich dieser Ansatz auch klinisch als vorteilhaft erweist, muss noch bestätigt werden, zeigt jedoch, dass die von uns entwickelten Antikörper auf ein optimiertes Bindungsverhältnis zwischen Tumorzellen und Immunzellen abzielen, das lediglich von wenigen anderen Konstrukten berücksichtigt wird. Ein offensichtlicher Unterschied aller aufgelisteten Konstrukte zu den scBaff-TRAAFFIAs besteht allerdings in der Wahl der Effektordomäne. T-Zell-basierte Therapieansätze stellen, vor allem nach dem Erfolg von CD19/CD3-kombinierenden BiTEs, eine wichtige Strategie zur Behandlung des Multiplen Myeloms dar. Allerdings wird deren Erfolg oftmals auch durch diverse Fluchtmechanismen der Tumorzellen vor Immunmechanismen behindert. So wurde bereits publiziert, dass zytotoxische, CD8-positive T-Zellen in der Tumorumgebung nicht mehr ausreichend in der Lage waren zu proliferieren, IFN $\gamma$  und

andere Zytokine zu produzieren, eine verminderte Fähigkeit zur Degranulierung aufwiesen und einen deutlichen Phänotyp von Erschöpfung und Seneszenz zeigten (Zelle-Rieser *et al.* 2016). Besonders wichtig war in diesem Zusammenhang die Feststellung, dass durch oxidativen Stress auf die T-Zellen eine verringerte Expression der CD3 $\zeta$ -Kette, strukturelle Veränderungen auch in den CD3 $\gamma\delta\epsilon$ -Ketten und somit eine gestörte Assemblierung des CD3/T-Zell-Rezeptorkomplexes sowie folglich eine verminderte T-Zell Signaltransduktion festzustellen war (de Aquino *et al.* 2015). Zudem wiesen sowohl CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> als auch CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine erhöhte Expression von PD-1 und anderer Checkpoint-Moleküle auf, wodurch sie durch PD-L1-exprimierende Tumorzellen funktionell gehemmt oder durch ein Tryptophan-entziehendes Mikromilieu sogar getötet werden können (Zelle-Rieser *et al.* 2016, Friberg *et al.* 2002). Durch all diese Veränderungen in den T-Zellen ist deren immunologische Tumorantwort und die zytotoxische Funktionalität erheblich gestört, sodass CD3-gerichtete Therapeutika im Multiplen Myelom eventuell nur suboptimal funktionieren können und eine Tumorevasion stattfindet.

Aus diesem Grund zielt ein anderer Entwicklungsansatz auf die Aktivierung von NK-Zellen ab, die durch das bispezifische und bivalente Konstrukt AFM 26 und das trispezifische aTriFlex-Molekül induziert werden soll (Tab. 26)(WO2018158350A1, Gantke *et al.* 2017). Trotz ähnlicher Mechanismen der Zielzellyse ist die Aktivierung von NK-Zellen nicht mit einer überschießenden, systemischen Zytokinfreisetzung verbunden, wie sie bei direktem T-Zell-Einsatz beobachtet werden kann. Daher scheint die Umleitung der NK-Zell-Zytotoxizität auf bösartige Plasmazellen ein geeigneter Therapieansatz mit reduzierter Toxizität und einem gut kontrollierbaren Sicherheitsprofil für das Multiple Myelom zu sein (Gantke *et al.* 2017). Allerdings stellt die Anergieinduktion von Tumorzellen auch in der Behandlung mit NK-basierten Therapeutika ein großes Hindernis dar. So nutzen Myelomzellen verschiedene Mechanismen, um der immunvermittelten Zerstörung durch NK-Zellen zu entkommen. Auf der Ebene der Zell-Zell-Interaktion können sie die Expression der HLA-Klasse-I-Moleküle heraufregulieren und dadurch die Empfindlichkeit der NK-Zellen reduzieren (Hoteit *et al.* 2014). Im späteren Stadium können Myelomzellen den Liganden NKG2DL abspalten, was zu einer Resistenz gegen NKG2D-vermittelte Zelltötung führt (Fionda *et al.* 2015). Darüber wurde, wie auch im Zusammenhang mit den T-Zellen, von einer PD-1-Überexpression in NK-Zellen berichtet, was ebenfalls die Antitumorreaktion der Immunzellen verhindert (Benson *et al.* 2010). Abgesehen von den Rezeptor-/Liganden-vermittelten Ausweichmöglichkeiten haben auch Zytokine und Chemokine entscheidende Auswirkungen auf die Immunsuppression. Myelomzellen produzieren verschiedene Zytokine, wie IL-6 und IL-10, um die Amplifikation und Funktion von NK-Zellen zu unterdrücken. Plasmazellen und regulatorische T-Zellen von Patienten mit MM sezernieren außerdem hohe Konzentrationen an TGF- $\beta$ , einem potenten immunsuppressiven Zytokin, das dafür bekannt ist, mehrere NK-aktivierende Rezeptoren herunterzuregulieren und die Zytotoxizität der NK-Zellen zu beeinträchtigen. Außerdem verändern Myelomzellen die Chemokin-Mikroumgebung, wie z.B. durch die hochregulierte Expression von CXCR3-Liganden und die Herunterregulierung der Expression von CXCL12, um die Migration von Effektor-NK-Zellen aus dem Knochenmark heraus zu fördern (Liu *et al.* 2018, Pittari *et al.* 2017). In weiteren Publikationen wurde berichtet, dass Myelomzellen, die CD200 überexprimieren, der NK-



vermittelten Immunantwort entkommen, indem sie die zytolytischen Fähigkeiten und die Expression des NKp44/NKp46-Rezeptors in NK-Zellen schwächen (Coles *et al.* 2011). In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung des gleichzeitig BCMA- und CD200-blockierenden, CD16A-vermittelt NK-aktivierenden aTriFlex-Konstruktes sicherlich eine logische Weiterentwicklung. Allerdings müssen auch hier zunächst weitere Versuche die Wirksamkeit dieses Produktes über die genannten Tumor- Evasionsstrategien hinweg bestätigen, auch vor dem Hintergrund, dass möglicherweise nicht die stark CD16-positiven, sondern vielmehr die niedrig CD16-exprimierenden NK-Zellen eine verstärkte zytolytische Aktivität gegen Myelomzellen aufweisen (Vulpis *et al.* 2018).

Dennoch verdeutlichen insbesondere das zuletzt genannte aTriFlex-Konstrukt sowie weitere Patentanmeldungen zu trispezifischen Antikörperformaten von z.B. Sanofi (WO2017180913A9) oder Xencor (WO2016105450A2), dass die Weiterentwicklungen in eine Richtung voranschreiten, bei der es darum geht, die Produkte in ihrer Valenz und der Spezifität gegenüber mehreren unterschiedlichen Bindungspartnern zu optimieren, um eine bestmöglich Ziel-spezifische, antitumorale Reaktion auszulösen. In diesem Zusammenhang ist das vorgestellte TRAAFFIAA-Konzept, das ebenfalls mehrere Tumorantigene parallel adressieren kann, eine innovative Alternative zu bislang entwickelten Antikörper-Therapeutika gegen das Multiple Myelom. Unter Berücksichtigung der erläuterten Tumorevasionsstrategien in Bezug auf T- und NK-Zellen, kann die nun Tumorzell-spezifische, direkte Apoptose-Induktion mittels CD95 bzw. die indirekte, CD40-vermittelte Immunstimulation über Antigen-präsentierende Zellen sowie das Priming frischer T-Zellen im Lymphknoten durch die scBaff-Antikörper-Fusionsproteine dieser Arbeit eine sinnvolle und aussichtsreiche Verbesserung bestehender Therapieansätze darstellen.

**Tab. 26: Auflistung ausgewählter BCMA-/BaffR-spezifischer Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine in der präklinischen und klinischen Entwicklung.**

Produktname	Zielmolekül(e)	Format	Charakteristik	Entwicklung/ Indikation	Entwickler / Referenz
<b>Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs)</b>					
Belantamab mafodotin/ GSK2857916	BCMA	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell-spezifische Zytotoxizität durch MMAF<sup>1</sup>-Konjugat</li> <li>• FcγRIII-optimiert für verstärkte ADCC</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 152 kDa</li> </ul>	Phase I/II / MM	Seattle Genetics/ GlaxoSmithKline (WO2017093942A1)
MEDI2228	BCMA	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell -spezifische Zytotoxizität durch PBD<sup>2</sup>-Konjugat</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 151 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	MedImmune / Astra Zeneca (Tai <i>et al.</i> 2019)
AMG 224	BCMA	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell -spezifische Zytotoxizität durch DM1<sup>4</sup>-Konjugat</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 152 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	Amgen (NCT02561962)
HDP-101	BCMA	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell -spezifische Zytotoxizität durch Amanitin<sup>3</sup>-Konjugat</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 152 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM + B-NHL	Heidelberg Pharma (Pahl <i>et al.</i> 2018)
CC-99712	BCMA	unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell -spezifische Zytotoxizität durch ein nicht veröffentlichtes Konjugat</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 150-155 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	Sutro Biopharma/ Celgene (NCT04036461)
ABL201	BCMA	unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell -spezifische Zytotoxizität durch MMAF<sup>1</sup>-Konjugat</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 150-155 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	ABL Bio (J. Jung 2018)

Produktname	Zielmolekül(e)	Format	Charakteristik	Entwicklung/ Indikation	Entwickler / Referenz
AVG-A11	BCMA	unbekannt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorzell -spezifische Zytotoxizität durch MMAF<sup>1</sup>-Konjugat</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 150-155 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	AvantGen (Wuxiang <i>et al.</i> 2018)
<b>Monospezifische Antikörper</b>					
SEA-BCMA	BCMA	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BCMA-Antagonist</li> <li>• FcγRIII-optimiert für verstärkte ADCC</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 150 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	Seattle Genetics (WO2017143069A1)
J22.9-xi	BCMA	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BCMA-Antagonist</li> <li>• Fc-vermittelte ADCC und CDC</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 150 kDa</li> </ul>	präklinisch	Max-Delbrück-Center of Molecular Medicine (MDC) (Oden <i>et al.</i> 2015)
Ianalumab/ VAY-736	BaffR	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BaffR-Antagonist</li> <li>• FcγRIII-optimiert für verstärkte ADCC</li> <li>• Monospezifisch, bivalent</li> <li>• ~ 150 kDa</li> </ul>	Phase I / CLL Phase II-III / Autoimmune Diseases	Morphosys/ Novartis (McWilliams <i>et al.</i> 2019)
<b>Bispezifische Antikörper</b>					
AMG 420 / BI 836909	BCMA / CD3	BiTE <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Bispezifisch, monovalent</li> <li>• ~ 55 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	Amgen (Hipp <i>et al.</i> 2017)
BiFab-BCMA	BCMA / CD3	bi-Fab <sup>d</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Bispezifisch, monovalent</li> <li>• ~ 100 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	Calibr (Scribbs Research) (Ramadoss <i>et al.</i> 2015)

Produktname	Zielmolekül(e)	Format	Charakteristik	Entwicklung/ Indikation	Entwickler / Referenz
AMG 701	BCMA / CD3	BiTE <sup>b</sup> -Fc	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Fc-Domäne zur Verlängerung der Serum-Halbwertszeit</li> <li>• Bispezifisch, monovalent</li> <li>• ~ 105 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	Amgen (S.-F. Cho <i>et al.</i> 2019)
TNB383B/TNB-384B	BCMA / CD3	IgG4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Fc-Effektor defizient</li> <li>• Bispezifisch, monovalent CD3, bivalent BCMA</li> <li>• ~ 125 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	TeneoBio/ AbbVie (WO2019133761A1)
JNJ-64007957 / AB-957	BCMA / CD3	DuoBody <sup>a</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Bispezifisch, monovalent</li> <li>• ~ 150 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	Janssen/ Genmab (Pillariseti <i>et al.</i> 2016)
PF-06863135	BCMA / CD3	IgG2a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Fc-Effektor defizient</li> <li>• Bispezifisch, monovalent</li> <li>• ~ 150 kDa</li> </ul>	Phase I / MM	ALX Oncology/ Pfizer (NCT03269136)
REGN5458	BCMA / CD3	IgG1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• Bispezifisch, monovalent</li> <li>• ~ 150 kDa</li> </ul>	Phase I/II / MM	Regeneron Pharmaceuticals/ Sanofi (US20200024356A1)
EM801	BCMA / CD3	2:1 TCB <sup>c</sup> (CrossMab-Fab)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• FcγR-Bindungs-defizient</li> <li>• Bispezifisch, monovalent CD3, bivalent BCMA</li> <li>• ~ 200 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	EngMab / Celgene (Seckinger <i>et al.</i> 2017)
EM901 / CC-93269	BCMA / CD3	2:1 TCB <sup>c</sup> (CrossMab-Fab)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>• FcγR-Bindungs-defizient</li> <li>• Bispezifisch, monovalent CD3, bivalent BCMA</li> <li>• ~ 200 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	Sutro Biopharma/ EngMab AG/ Celgene (WO2018083204A1)

Produktname	Zielmolekül(e)	Format	Charakteristik	Entwicklung/ Indikation	Entwickler / Referenz
AFM26	BCMA / CD16A	TandAb <sup>e</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NK-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>Bispezifisch, bivalent</li> <li>~ 105 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	Affimed (WO2018158350A1)
aCD40-scBaff	CD40 / BaffR+BCMA+ TACI	TRAAFFIAA <sup>h</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Direkte (CD95) oder indirekte (CD40) Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>Mit (IgG1) oder ohne (N297A / Fab2) Fc-Effektorfunktion</li> <li>Multispezifisch, bivalent CD40/ CD95, hexavalent BaffR/BCMA/TACI</li> <li>~ 258 kDa (IgG1/N297A) /~ 206 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM + CLL + B-NHL	Universitätsklinikum Würzburg (WO2019129644A1)
aCD95-scBaff	CD95 / BaffR+BCMA+ TACI				
<b>Trispezifische Antikörper</b>					
HPN217	BCMA / Albumin / CD3	TriTAC <sup>g</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>T-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>Albumin-Bindedomäne zur Verlängerung der Serum-Halbwertszeit</li> <li>Trispezifisch, monovalent</li> <li>~ 54 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	Harpoon Therapeutics (C.-L. Law <i>et al.</i> 2018)
aTriFlex	BCMA / CD16A / CD200	Flexibody <sup>f</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NK-Zell-vermittelte, Tumorzell-spezifische Zytotoxizität</li> <li>Trispezifisch, monovalent BCMA, monovalent CD200, bivalent FcγRIIIa</li> <li>~ 105 kDa</li> </ul>	Präklinisch / MM	Affimed (Gantke <i>et al.</i> 2017)

<sup>1</sup> **MMAF**: Monomethyl Auristatin F (Tubulin Inhibitor) <sup>2</sup> **PBD**: pyrrolbenzodiazepine (Zellzyklus-unabhängiger Transkriptions-Inhibitor) <sup>3</sup> **Amanitin**: Zellzyklus-unabhängiger Transkriptions-Inhibitor <sup>4</sup> **DM1**: Mertansine (Tubulin Inhibitor)

<sup>a</sup>**Duobody**: VH<sub>1</sub>/VL<sub>1</sub>-CH<sub>1/2/3</sub>(Antigen 1)-Hinge-VH<sub>1</sub>/VL<sub>1</sub>-CH<sub>1/2/3</sub>(Antigen 2) <sup>b</sup>**BiTE**: scFv(Antigen 1)-linker-scFv(Antigen 2) <sup>c</sup>**2:1 TCB**: VH<sub>1</sub>/VL<sub>1</sub>-CH<sub>1/2/3</sub>(Antigen 1)-Hinge-VH<sub>1</sub>/VL<sub>1</sub>-CH<sub>1</sub>(Antigen1)-linker-VH<sub>1</sub>/VL<sub>1</sub>-CH<sub>1/2/3</sub>(Antigen 2) <sup>d</sup>**biFab**: Fab<sub>(1)</sub>(Antigen 1)-linker-Fab<sub>(1)</sub>(Antigen 1) <sup>e</sup>**TandAb**: scFv(Antigen 1)-linker-scFv(Antigen 2)-linker-scFv(Antigen 2)-linker-scFv(Antigen 1) <sup>f</sup>**Flexibody**: scFv(Antigen 1)-linker-scFv(Antigen 2)-linker-scFv(Antigen 2)-linker-scFv(Antigen 3) <sup>g</sup>**TriTAC**: V<sub>H</sub>H(Antigen 1)-linker-V<sub>H</sub>H(Antigen 2)-linker-scFv(Antigen 3) <sup>h</sup>**TRAAFFIAA**: IgG1(Antigen1)-linker(C-terminus)-scLigand(Antigen2/3/4)

## 5.2 Verankerungsdomänen-vermittelte Antikörper-Potenzierung im Vergleich zu anderen Antikörper-basierten Therapiekonzepten

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt festgestellt wurde, dass die beschriebenen BaffR-/BCMA-/TACI-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine eine neuartige, vielversprechende Kombination aus Tumorantigen-Adressierung und Immuneffektorfunktionalität bieten, soll im Folgenden auch das Format der scBaff-Antikörper-Fusionsproteine in eine weiterführende Entwicklungsbeurteilung mit einbezogen werden, da sich viele der bereits angesprochenen Produkte grundsätzlich in entscheidenden Parametern, wie dem molekularen Aufbau und der Pharmakokinetik, unterscheiden.

Wie in Abb. 4 und Tab. 26 aufgelistet, wurde eine Reihe von alternativen Antikörperformaten für eine bi- oder tri-spezifische Adressierung entwickelt, einschließlich BiTEs, bi-Fabs und DuoBody-, Flexibody-, TandAb-Formaten und anderen (Spiess *et al.* 2015, Brinkmann und Kontermann 2017). Nach der erfolgreichen Zulassung von Blincyto war es eine logische Konsequenz von Amgen, das Konzept auch auf andere B-Zell-Erkrankungen auszuweiten und mit AMG 420 einen BCMA-spezifischen BiTE zur Behandlung des Multiplen Myeloms zu entwickeln (Hipp *et al.* 2017). Dabei haben BiTEs zwar durch ihre geringe Größe (~50-55 kDa) einige Vorteile, z.B. die gute Tumor- und Gewebepenetration und die Möglichkeit, Ziel- und Effektorzellen in enge räumliche Nähe zu bringen, sodass sich eine zytolytische Synapse bilden kann. Dennoch ist eben jene geringe Größe auch eine große Schwachstelle dieses Formats, da BiTEs sowie auch andere Antikörper-Formate wie Diabodies und DARTs mit einer Größe unter 60-65 kDa nach der Injektion schnell katabolisiert und über die Nieren ausgeschieden werden. So ist belegt, dass solche Moleküle zwar eine schnelle Tumorpeneetration und -akkumulation aufweisen, jedoch durch die schnelle Ausscheidung insgesamt eine mehr als 2-fach geringere Anreicherung im Tumorgewebe als vergleichbare IgG-Antikörper bieten (Kim *et al.* 2008). Dadurch, dass sie mit einer Serumhalbwertszeit von unter 2 Stunden nur wenige Zeit haben, an ihre Zielmoleküle zu binden und Ziel- und Effektorzellen zusammen zu bringen, ist die gängige Verabreichungsform dieser kleinen, bispezifischen Moleküle eine kontinuierlich, intravenöse Infusion, die über mehrere Wochen wiederholt durchgeführt werden muss. Das verursacht sowohl eine unangenehme Therapie für die Patienten als auch eine zeit- und kostenintensive Behandlung von Seiten der behandelnden Kliniken. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurden bereits optimierte Formate entwickelt, welche die Serum-Halbwertszeit durch die Fusion einer Fc-Domäne (z.B. AMG 701) oder anderer Domänen (z.B. Albumin in HPN217) erhöhen (S.-F. Cho *et al.* 2019, C.-L. Law *et al.* 2018).

Aber auch die Wahl der Antigen-bindenden Domänenstruktur kann neben der Molekülgröße je nach Zielmolekül einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit haben. So ist ein Nachteil von Formaten, die aus Fv- oder scFv-Einheiten bestehen, dass diese aufgrund der fehlenden, nativen Interaktionen mit konstanten Ketten weniger stabil sind und dazu tendieren, sich zu entfalten und zu aggregieren, weshalb sie schwer löslich oder sogar irreversibel inaktiv sein können (Rothlisberger *et al.* 2005, H. Ma *et al.* 2019, Worn und Pluckthun 1999). Selbst nach

korrekter Assemblierung und ausreichender Stabilität können scFv-Formate eine deutlich reduzierte Affinität und Aktivität im Vergleich zu Fab-Fragmenten oder kompletten Antikörpern aufweisen (Monnier *et al.* 2013, Wu *et al.* 2015, Ahmad *et al.* 2012). Gründe hierfür liegen hauptsächlich in störenden Interaktionen zwischen den Antigen-Bindestellen und den Peptid-Linkern, sodass die Wahl und Kombination aus optimaler Länge, Komposition und Positionierung des Linkers bzw. der Linker einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität von scFv-Formaten hat (Zhang *et al.* 2009, Klement *et al.* 2015, Kipriyanov *et al.* 2003). Infolgedessen stellt der komplexe Produktionsprozess eine weitere Hürde dar, da sich je nach Format nicht funktionelle Dimere nach unkorrekter Paarung der variablen Domänen bilden können.

Aus diesen Gründen besteht ein anderer Ansatz in der Verwendung von kompletten Antikörpern oder Antikörper-ähnlichen Strukturen, bei denen einzelne Fragmente hinzugefügt oder ausgetauscht werden. Bedingt durch die konstanten Ketten und den nativeren Aufbau, besitzen diese Konstrukte in der Regel eine höhere Stabilität und da sie wesentlich größer sind, erfolgt ihre Ausscheidung vorrangig nicht über die renale Filtration, sondern über Endozytose und proteolytische Degradation. Durch die Fc-Region haben diese Formate die Möglichkeit, an diverse Fc-Rezeptoren (z.B. neonatale Fc-Rezeptoren) zu binden, dadurch recycled zu werden und daher eine wesentlich längere Serumhalbwertszeit aufzuweisen, was optimierte Dosierungsintervalle und einen verstärkten Therapieeffekt ermöglichen kann. Darüber hinaus versprechen Antikörper und Antikörper-ähnliche Moleküle durch etablierte Produktions- und Aufreinigungsprozesse eine beschleunigte Anwendbarkeit. Unter diesen Gesichtspunkten wurde auch das TRAAFFIAA-Format präferenziert.

Im Vergleich zu anderen bi- und trispezifischen Antikörper-Formaten gehören die scBaff-TRAAFFIAA sicherlich zu den strukturell größten Konstrukten. Dass die Größe dieser Antikörper-Fusionsproteine jedoch voraussichtlich kein Hindernis für die Lokalisierung gut zugänglicher Tumore darstellt, ist an vorläufigen Ergebnissen von anderen, ähnlich großen Antikörper-Formaten abzulesen, die eine vergleichbare Domänenstruktur aufweisen. Dabei stellen Kandidaten mit Fusionen von scFv-Fragmenten am N- oder C-Terminus der schweren Ketten oder am C-Terminus der leichten Ketten die größte Gruppe aktueller Entwicklungen dar. Von diesen IgG-scFvs befinden sich derzeit 6 Konstrukte in klinischer Erprobung, davon einer, Istiratumab, in Phase II, wobei all diese Kandidaten abweichende Zielmoleküle und Indikationen adressieren, als die scBaff-TRAAFFIAAs (Strohl 2018, Brinkmann und Kontermann 2017). Lediglich wenige präklinische Kandidaten haben ein vergleichbares Anwendungsfeld: ATOR-1015 (CTLA-4/OX-40) und ATOR-1144 (CTLA-4/GITR), beide im Format  $\alpha$ CTLA-4-LC<sub>CT</sub>:scFv, PC101 ( $\alpha$ PD-1-HC<sub>NT</sub>:scFv:CTLA-4) und patentierte Antikörper von Xencor (WO2016105450A2) im Format  $\alpha$ Tumorantigen-HC1<sub>CT</sub>:scFv:CD8-HC2<sub>CT</sub>:scFv:CD3 (Kvarnhammar *et al.* 2019, Fritzell *et al.* 2019, Genscript, WO2016105450A2). Zwei zusätzliche, TRAAFFIAA-ähnliche Konstrukte sind ebenfalls gegen eines oder mehrere Mitglieder der TNFRSF gerichtet, aDR5xLT $\beta$ R ( $\alpha$ DR5-HC<sub>NT/CT</sub>:scFv:LT $\beta$ R) (Michaelson *et al.* 2009) und BaCa-1 ( $\alpha$ FOLR1-HC<sub>CT</sub>:scFv:DR5) (Shivange *et al.* 2018), jedoch mit anderer Indikation. Einzig ein anderes, veröffentlichtes Antikörper-Format ist in den Hauptpunkten vergleichbar mit den hier vorgestellten scBaff-TRAAFFIAAs, ist jedoch für andere Tumorerkrankungen konzipiert (Siegemund *et al.* 2018). Dieses Format kombiniert

EGFR-gerichtete Antikörper mit scTRAIL-Domänen an den leichten, den schweren oder beiden Ketten ( $\alpha$ EGFR-HC<sub>NT</sub>:scTRAIL; -LC<sub>NT</sub>:scTRAIL; -HC+LC<sub>NT</sub>:scTRAIL) und ist somit in der Molekülgröße nahezu identisch (261 kDa im hexavalenten Format) oder sogar größer (375 kDa im dodekavalenten Format). Die hexavalenten IgG-scTRAIL-Antikörper ließen sich mit ca. 7-10  $\mu$ g/ml in vergleichbarer Konzentration produzieren, wie die hier präsentierten scBaff-TRAAFFIIAs. Lediglich das dodekavalente Konstrukt erzielte deutlich geringere Produktionsausbeuten (ca. 2  $\mu$ g/ml). Die HC-scTRAIL-Variante wies dabei eine gute *in vitro*- und Plasmastabilität auf sowie mit einer Serumhalbwertszeit von etwa 16 Stunden gute pharmakokinetische Eigenschaften (Siegemund *et al.* 2018). Genauso wie im Rahmen dieser Arbeit für die scBaff-Antikörper-Fusionsproteine beschrieben, blieben die Rezeptorbindung sowie die funktionellen Eigenschaften sowohl der N-terminalen EGFR-Bindedomäne als auch der C-terminale scTRAIL-Effektordomäne ohne gegenseitige inhibitorische Wechselwirkungen erhalten. Auch eine weitere Veröffentlichung, die sich mit der Produzierbarkeit, Stabilität und dem Erhalt der Funktionsfähigkeit von vergleichbar großen Antikörper-Formaten befasst hat, lässt auf eine gute Anwendbarkeit schließen (Dimasi *et al.* 2009). Somit ist davon auszugehen, dass die scBaff-TRAAFFIIAs ebenfalls über eine vergleichbare Pharmakokinetik und Stabilität verfügen und die Molekülgröße auch *in vivo* keine Probleme verursachen sollte.

### 5.3 Optimierungsmöglichkeiten und Ausblick für die vorgestellten

#### Verankerungsdomänen-abhängigen Antikörper-Fusionsproteine

Während die Bindung der hier vorgestellten Antikörper-Fusionsproteine an die jeweiligen Zielmoleküle sowie deren Funktionalität in allen grundlegenden Experimenten bestätigt werden konnte, lieferten einige Versuche Ergebnisse, die im Folgenden einer Erörterung bedürfen. Im Zusammenhang mit den  $\alpha$ CD40-Antikörpern konnte beobachtet werden, dass die N297A- und die N297A-scBaff-Variante in unaufgereinigter Form bereits ein gewisses Maß an CD40-Aktivierung auch ohne zusätzliche Quervernetzung induzierten, während die aufgereinigten Produkte einen geringeren Grad an Agonismus ohne Potein G-Vorinkubation aufwiesen. Dementsprechend konnten nach der Aufreinigung mittels Gelfiltration Einzelpeaks für die N297A, Fab2 und N297A-scBaff Konstrukte auf Höhe der entsprechenden Molekülgrößen detektiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die  $\alpha$ CD40-Antikörper und – Antikörper-Fusionsproteine entweder bereits während der Produktion zu einem gewissen Grad Dimere oder Oligomere bilden, die eine Quervernetzungs- bzw. Immobilisierungs-unabhängige Rezeptoraktivierung ermöglichen, oder dass diese Aggregation aufgrund von nicht optimalen Lagerungsbedingungen bei 4 °C zeitlich bedingt auftreten. Diese Tendenz der Autoaggregation des G28.5-Antikörpers wurde bereits in anderen Publikationen beschrieben (Francisco *et al.* 1995, El-Mesery *et al.* 2013) und ist vernachlässigbar, da die Konstrukte nach Aufreinigung als funktionsfähige Monomere vorlagen. Lediglich das Fab2-scBaff-Konstrukt wies auch nach Aufreinigung ein gewisses Maß an Dimeren auf, die jedoch in den funktionellen Studien nicht zu einer gesteigerten CD40-Aktivierung führten. Im Vergleich dazu ist auffällig, dass sich die  $\alpha$ CD95-Antikörper-Fusionsproteine größtenteils gegensätzlich verhielten und der Grad an Aggregation



nach der Aufreinigung gesteigert war. So war ein deutlich höheres Maß an Quervernetzungs- bzw. Immobilisierungs-unabhängiger Rezeptoraktivierung mittels des N297A-scBaff-Konstrukts nach der Aufreinigung zu beobachten und auch die Fab2- und Fab2-scBaff-Konstrukte zeigten in der Gelfiltration einen überaus hohen Anteil an dimeren oder oligomeren Aggregaten. Da die CD40- und CD95-spezifischen Antikörper in dasselbe IgG-Gerüst kloniert wurden, können voraussichtlich lediglich die variablen Regionen zu dem beobachteten, unterschiedlichen Aggregationsverhalten geführt haben. Daher könnte die Evaluation von alternativen Antikörper-Sequenzen in Betracht gezogen werden. So könnten durch Phagen-Bibliotheken gänzlich neue Antikörper-Klone mit verbesserten Eigenschaften identifiziert und getestet werden oder alternativ die Funktionalität des bereits vorhandenen HFE7A-CD95-Antikörpers, der *per se* ein breiteres therapeutisches Fenster als E09 aufweist, erneut im TRAAFFIAA-Format analysiert werden.

Andere Möglichkeiten, um die beschriebenen scBaff-Antikörper-Fusionsproteine eventuell weiter zu optimieren, betreffen zum einen die Fc-Region und zum anderen das Format der Verankerungsdomäne. In dieser Arbeit sollte vorrangig die Fragestellung untersucht werden, ob sich Fc $\gamma$ R-unabhängige Antikörper mit Tumorantigen-Spezifität entwickeln lassen und ob die gewählte scBaff-Verankerungsdomäne eine ausreichende Immobilisierung ermöglicht. Daher wurde zum Zweck des Machbarkeitsnachweises der IgG-Isotyp wenig berücksichtigt, um den Fokus auf die Fc $\gamma$ R-Unabhängigkeit der Fusionsproteine zu legen. Nachdem dieser Nachweis erfolgreich erbracht werden konnte, kann die Weiterentwicklung des Formats in zwei Richtungen vorangetrieben werden. Zum einen bieten die Antikörper-Fusionsproteine im Fab2-Format den Vorteil, dass sie in jedem Fall unabhängig von jeglicher Fc-Rezeptorbindung funktionieren können und somit kein Risiko von systemischen Nebenwirkungen oder immunhemmenden Effekten durch die Bindung an inhibitorische Fc $\gamma$ -Rezeptoren hervorrufen. Somit ist das hier beschriebene Fab2-TRAAFFIAA-Format eines der wenigen publizierten Moleküle, das eine starke agonistische Wirkung auch ohne Fc-Domäne hat, dabei die Stabilität des nativen Antikörperaufbaus weitgehend beibehält und groß genug ist, um eine verbesserte Serumhalbwertszeit aufzuweisen. Auf der anderen Seite besteht nun natürlich die Möglichkeit, aufbauend auf das ursprüngliche IgG-Format eine zusätzliche Effektorfunktion zu ermöglichen, indem die Fc-Domäne, wie in anderen hier besprochenen Beispielen gezeigt, ebenfalls hinsichtlich seiner Bindung an Fc $\gamma$ Rs optimiert wird. So ist hinsichtlich des CD95-spezifischen Antikörpers eine zusätzliche, gesteigerte Bindung an Fc $\gamma$ RIIIA denkbar, um zusätzlich ADCC zu verstärken. Somit bleibt nicht nur das Antikörper-Recycling über neonatale Fc-Rezeptoren erhalten, sondern das bestehende TRAAFFIAA-Format wird ohne große strukturelle Veränderungen durch wenige, bereits publizierte Mutationen zu einem trispezifischen Molekül ausgebaut. Weitere Möglichkeiten, um die Potenz oder Valenz der TRAAFFIAAs zu steigern, liegen im einfach erweiterbaren Grundaufbau begründet. Durch die zusätzliche Fusion von scBaff-Trimeren an das C-terminale Ende der leichten Ketten, könnte die Valenz von einer hexameren Bindung hin zu einer dodekavalenten Bindung erhöht werden, wie es bereits für die zuvor genannten scTRAIL-Konstrukte erfolgreich angewendet wurde (Siegemund *et al.* 2018). Darüber hinaus ist es natürlich denkbar, an die C-Termini der schweren

und leichten Ketten unterschiedliche Verankerungsdomänen zu fusionieren, um zusätzliche Tumorantigene gleichzeitig zu binden und somit möglichen Evasionsstrategien der Tumorzellen entgegenzuwirken. Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass das Baff-Homotrimer der Verankerungsdomäne wie der native Ligand an alle drei Rezeptoren BaffR, BCMA und TACI bindet, kann in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob im spezifischen Anwendungsfall des Multiplen Myeloms, bei dem eine BaffR-Expression nur selten auf den Myelomzellen festgestellt werden kann, eine affinere BCMA-Addressierung mit dem Verzicht auf eine gleichzeitige BaffR-Bindung nicht unter Verwendung von scAPRIL möglich ist. Darüber hinaus besteht die Intention der BaffR-/BCMA-bindenden Verankerungsdomäne natürlich in erster Linie in der Tumor-spezifischen Bindung und Antikörper-Immobilisierung. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, inwiefern die scBaff-Homotrimere neben der Bindung auch zu einer Rezeptoraktivierung führen und damit potenziell ungewollte, proliferatorische Signale in den Tumorzellen induzieren. Um dies zu umgehen, besteht zum einen die Möglichkeit, heterotrimere Liganden (z.B. APRIL-Baff-Baff oder Baff-APRIL-APRIL), die abweichende Rezeptoraktivitäten zu den Homotrimeren aufweisen und die natürliche Baff-Aktivität herunterregulieren könnten (Schuepbach-Mallepell *et al.* 2015), als Verankerungsdomäne zu verwenden. Zum anderen wäre eine weitere logische Möglichkeit in der Evaluation von BaffR- bzw. BCMA- antagonistischen scFv-Domänen, wie sie bereits zu Beginn dieser Arbeit im Zusammenhang mit anderen Zielstrukturen untersucht wurden. Neben der Blockierung von Tumorzell-aktivierenden BaffR-Signalwegen könnte ein weiterer Vorteil von Antikörperfragment-basierten Verankerungsdomänen darin bestehen, zwischen unterschiedlichen BaffR-/BCMA-Formen zu differenzieren. So wurde davon berichtet, dass manche Tumore Resistenzen gegen BCMA-gerichtete Antikörpertherapeutika entwickeln können, indem sie in erhöhtem Maße lösliches BCMA (sBCMA) sezernieren und damit die Antikörperwirkung neutralisieren. Ein Ansatz gegen diesen Mechanismus besteht darin, Antikörper-Fragmente mit niedriger Affinität zu monomeren, löslichen Liganden und dafür hoher Affinität zu membrangebundenen Liganden zu selektionieren (Kinneer *et al.* 2017). Allerdings können scFv-Verankerungsdomänen ebenfalls zuvor bereits angesprochene Nachteile mit sich bringen und zu vermehrter Aggregation tendieren, was auch ein Indiz für die schlechtere Effizienz solcher Formate im Zusammenhang mit dem ersten Experiment dieser Arbeit darstellen könnte. Aus diesem Grund wurden etliche Verbesserungsmöglichkeiten für die Generierung von scFv-Fragmenten beschrieben, welche u.a. die Optimierung der Linker-Sequenzen und -Anordnung (X. Chen *et al.* 2013, Arimori *et al.* 2017) oder den Einbau zusätzlich stabilisierender Disulfidbrücken berücksichtigen (Schanzer *et al.* 2011). Desweiteren könnten alternativ Fab-Fragmente (Wu *et al.* 2015, Brunker *et al.* 2016), scAntikörper-Fragmente (H. Ma *et al.* 2019) oder V<sub>H</sub>H-Fragmente (Kvarnhammar *et al.* 2019) den scFv-Fragmenten funktionell überlegen sein.

Da die systematische Untersuchung alternativer Verankerungsdomänen-Formate weitere Zeit-intensive *in vitro* Evaluation voraussetzt, die scBaff-konjugierten Domänen bereits vielversprechende Effektivität liefern und zudem den Vorteil der hexavalenten Tumorantigen-Bindung besitzen, sollten zu den in dieser Arbeit untersuchten Antikörper-Fusionsproteinen

weiterführende Experimente angeschlossen werden, um über eine weitere Translation der Forschungsergebnisse in eine konkrete Anwendung am Patienten zu entscheiden. Hierfür müssen im nächsten Schritt die beschriebenen scBaff-TRAAFFIAs und ggf. leicht optimierte Varianten in weiterführenden *in vitro* Experimenten mit primären Tumorzellen und entsprechenden, isolierten Immunzellen getestet werden, das Konzept von humanen auf murine Antikörper übertragen sowie deren Funktionalität in murinen Myelom-Modellen *in vivo* bestätigt werden. Hierzu müssen zunächst die entsprechenden Antikörper-Fusionsproteine mit Sequenzen, welche die murinen Rezeptoren CD40 und CD95 erkennen, sowie mit der Einzelketten-Variante für murines Baff neu kloniert und produziert werden. Sollte sich die sc(mu)Baff-Domäne unerwarteterweise als problematisch erweisen, kann auch die bislang verwendete human/murin kreuzreaktive scBaff-Domäne, deren sehr gute Verwendbarkeit für Mauszellen bereits in Vorversuchen gezeigt wurde (nicht gezeigte Daten), als Verankerungsdomäne verwendet werden. Parallel zur Produktion und Reinigung der für die Tierversuche benötigten Antikörpermengen sollten zunächst erneut eine Analyse dieser Konstrukte zum einen bezüglich des Verankerungs-abhängigen Agonismus in *in vitro* Modellsystemen mit murinen BCMA-/TACI-/BaffR-Transfektanten und murinen CD40/CD95-responsiblen Transfektanten bzw. Tumorzelllinien erfolgen, zum anderen auch in primären Lymphozyten-Kulturen und mit geeigneten Antigen-präsentierenden Zellen. Nach erfolgreicher Evaluation dieser murinen scBaff-TRAAFFIAs kann die Wirkung der Konstrukte auf das Wachstum von Knochenmarks-assoziierten, syngenen Myelomzellen *in vivo* in BALB/c-Mäusen untersucht werden. Hierzu kann eine Luciferase-exprimierende Variante von MOPC-315.BM-Myelomzellen verwendet werden, die ein zuverlässiges und empfindliches Verfolgen der Myelomzellen *in vivo* durch Ganzkörper-Biolumineszenz-Bildgebung ermöglicht und bereits zuvor im Rahmen einer Kooperation erfolgreich eingesetzt wurde (Riedel *et al.* 2012). Zu untersuchende Parameter als Maß der therapeutischen Effizienz der Antikörper-Fusionsproteine in einem derartigen Mausmodell können neben dem Tumorwachstum und der Überlebensrate auch die Analyse der zellulären Zusammensetzung sowie die Aktivität der Tumor-Mikroumgebung des Multiplen Myeloms sein.

Zusammengefasst stellen die in dieser Arbeit beschriebenen BaffR-/BCMA-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine eine vielversprechende Weiterentwicklung bzw. Ergänzung zu aktuellen Antikörper-Therapeutika dar. Die weitere Erprobung dieser Konstrukte kann nicht nur im Hinblick auf die Tatsache, dass es vergleichbare Kombinationen molekularer Zielmoleküle bislang nicht gibt, sondern auch auf das verwendete Format, das im hohen Maß weiterführende Kombinationsmöglichkeiten ermöglicht, stark empfohlen werden.

## Literaturverzeichnis

- Abramson, H. N. (2018). "Monoclonal Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma: An Update." Int J Mol Sci **19**(12).
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. and Hamid, M. (2012). "scFv antibody: principles and clinical application." Clin Dev Immunol **2012**: 980250.
- Arimori, T., Kitago, Y., Umitsu, M., Fujii, Y., Asaki, R., Tamura-Kawakami, K. and Takagi, J. (2017). "Fv-clasp: An Artificially Designed Small Antibody Fragment with Improved Production Compatibility, Stability, and Crystallizability." Structure **25**(10): 1611-1622.e1614.
- Armitage, R. J. (1994). "Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands." Curr Opin Immunol **6**(3): 407-413.
- Armitage, R. J., Sato, T. A., Macduff, B. M., Clifford, K. N., Alpert, A. R., Smith, C. A. and Fanslow, W. C. (1992). "Identification of a source of biologically active CD40 ligand." Eur J Immunol **22**(8): 2071-2076.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-430.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. and Saeland, S. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." Annu Rev Immunol **12**: 881-922.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A. and Kufer, P. (2008). "Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody." Science **321**(5891): 974-977.
- Baud, V. and Karin, M. (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-377.
- Beatty, G. L., Li, Y. and Long, K. B. (2017). "Cancer immunotherapy: activating innate and adaptive immunity through CD40 agonists." Expert Rev Anticancer Ther **17**(2): 175-186.
- Benson, D. M., Jr., Bakan, C. E., Mishra, A., Hofmeister, C. C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R. A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M. K., Greenfield, C. N., Porcu, P., Devine, S. M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J. C. and Caligiuri, M. A. (2010). "The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody." Blood **116**(13): 2286-2294.
- Björck, P., Filbert, E., Yang, X. and Trifan, O. C. (2016). APX005M, a humanized anti-CD40 antibody with strong immune-modulatory activities capable of tumor eradication in vivo. 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. New Orleans, LA, AACR; Cancer Res 2016;76(14 Suppl):Abstract nr 5004.
- Boatright, K. M. and Salvesen, G. S. (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-731.
- Bodmer, J. L., Schneider, P. and Tschopp, J. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Bolkun, L., Grubczak, K., Schneider, G., Zembko, P., Radzikowska, U., Singh, P., Kloczko, J., Ratajczak, M. Z., Moniuszko, M. and Eljaszewicz, A. (2016). "Involvement of BAFF and APRIL in Resistance to Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia." J Cancer **7**(14): 1979-1983.
- Bossen, C., Cachero, T. G., Tardivel, A., Ingold, K., Willen, L., Dobles, M., Scott, M. L., Maquelin, A., Belnoue, E., Siegrist, C. A., Chevrier, S., Acha-Orbea, H., Leung, H., Mackay, F., Tschopp, J. and Schneider, P. (2008).

- "TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts." *Blood* **111**(3): 1004-1012.
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J. and Schneider, P. (2006). "Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human." *J Biol Chem* **281**(20): 13964-13971.
- Bossen, C. and Schneider, P. (2006). "BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling." *Semin Immunol* **18**(5): 263-275.
- Brinkmann, U. and Kontermann, R. E. (2017). "The making of bispecific antibodies." *MAbs* **9**(2): 182-212.
- Brunker, P., Wartha, K., Friess, T., Grau-Richards, S., Waldhauer, I., Koller, C. F., Weiser, B., Majety, M., Runza, V., Niu, H., Packman, K., Feng, N., Daouti, S., Hosse, R. J., Mossner, E., Weber, T. G., Herting, F., Scheuer, W., Sade, H., Shao, C., Liu, B., Wang, P., Xu, G., Vega-Harrington, S., Klein, C., Bosslet, K. and Umana, P. (2016). "RG7386, a Novel Tetravalent FAP-DR5 Antibody, Effectively Triggers FAP-Dependent, Avidity-Driven DR5 Hyperclustering and Tumor Cell Apoptosis." *Mol Cancer Ther* **15**(5): 946-957.
- Cabal-Hierro, L. and Lazo, P. S. (2012). "Signal transduction by tumor necrosis factor receptors." *Cell Signal* **24**(6): 1297-1305.
- Cachero, T. G., Schwartz, I. M., Qian, F., Day, E. S., Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Krushinskie, D., Eldredge, J., Silvian, L., Lugovskoy, A., Farrington, G. K., Strauch, K., Schneider, P. and Whitty, A. (2006). "Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor)." *Biochemistry* **45**(7): 2006-2013.
- Carpenter, R. O., Evbuomwan, M. O., Pittaluga, S., Rose, J. J., Raffeld, M., Yang, S., Gress, R. E., Hakim, F. T. and Kochenderfer, J. N. (2013). "B-cell Maturation Antigen Is a Promising Target for Adoptive T-cell Therapy of Multiple Myeloma." *Clinical Cancer Research* **19**(8): 2048-2060.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3666-3670.
- Castella, M., Fernandez de Larrea, C. and Martin-Antonio, B. (2018). "Immunotherapy: A Novel Era of Promising Treatments for Multiple Myeloma." *Int J Mol Sci* **19**(11).
- Chan, F. K. (2007). "Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling." *Cytokine* **37**(2): 101-107.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." *Science* **288**(5475): 2351-2354.
- Chen, F. E. and Ghosh, G. (1999). "Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views." *Oncogene* **18**(49): 6845-6852.
- Chen, X., Zaro, J. L. and Shen, W. C. (2013). "Fusion protein linkers: property, design and functionality." *Adv Drug Deliv Rev* **65**(10): 1357-1369.
- Chiu, A., Xu, W., He, B., Dillon, S. R., Gross, J. A., Sievers, E., Qiao, X., Santini, P., Hyjek, E., Lee, J. W., Cesarman, E., Chadburn, A., Knowles, D. M. and Cerutti, A. (2007). "Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL." *Blood* **109**(2): 729-739.
- Cho, S.-F., Lin, L., Xing, L., Wen, K., Yu, T., Wahl, J., Matthes, K., Munshi, N., Anderson, K. C., Arvedson, T. and Tai, Y.-T. (2019). AMG 701, a half-life extended anti-BCMA BiTE, potently induces T cell-redirecated lysis of human multiple myeloma cells and can be combined with IMiDs to overcome the immunosuppressive bone marrow microenvironment. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, Elsevier. **19**: e54.
- Cho, S. F., Anderson, K. C. and Tai, Y. T. (2018). "Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy." *Front Immunol* **9**: 1821.

- Chodorge, M., Zuger, S., Stirnimann, C., Briand, C., Jermutus, L., Grutter, M. G. and Minter, R. R. (2012). "A series of Fas receptor agonist antibodies that demonstrate an inverse correlation between affinity and potency." Cell Death Differ **19**(7): 1187-1195.
- Chowdhury, F., Johnson, P. W., Glennie, M. J. and Williams, A. P. (2014). "Ex vivo assays of dendritic cell activation and cytokine profiles as predictors of in vivo effects in an anti-human CD40 monoclonal antibody ChiLob 7/4 phase I trial." Cancer Immunol Res **2**(3): 229-240.
- Cifone, M. G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M. R., Azuma, M., Lanier, L. L., Santoni, A. and Testi, R. (1994). "Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase." J Exp Med **180**(4): 1547-1552.
- Coles, S. J., Wang, E. C., Man, S., Hills, R. K., Burnett, A. K., Tonks, A. and Darley, R. L. (2011). "CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia." Leukemia **25**(5): 792-799.
- Coney, L. R., Daniel, P. T., Sanborn, D., Dhein, J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Zurawski, V. R., Jr. (1994). "Apoptotic cell death induced by a mouse-human anti-APO-1 chimeric antibody leads to tumor regression." Int J Cancer **58**(4): 562-567.
- Dahan, R., Barnhart, B. C., Li, F., Yamniuk, A. P., Korman, A. J. and Ravetch, J. V. (2016). "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fcγ3 Engagement." Cancer Cell **29**(6): 820-831.
- de Aquino, M. T., Malhotra, A., Mishra, M. K. and Shanker, A. (2015). "Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer." Immunol Lett **166**(2): 117-133.
- Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P. and Krammer, P. H. (1992). "Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens." J Immunol **149**(10): 3166-3173.
- Dimasi, N., Gao, C., Fleming, R., Woods, R. M., Yao, X. T., Shirinian, L., Kiener, P. A. and Wu, H. (2009). "The design and characterization of oligospecific antibodies for simultaneous targeting of multiple disease mediators." J Mol Biol **393**(3): 672-692.
- Dostert, C., Grusdat, M., Letellier, E. and Brenner, D. (2019). "The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond." Physiol Rev **99**(1): 115-160.
- Ducancel, F. and Muller, B. H. (2012). "Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes." MAbs **4**(4): 445-457.
- El-Mesery, M., Trebing, J., Schafer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D. and Wajant, H. (2013). "CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells." Cell Death Dis **4**: e916.
- Elgert, K. (2009). Antibody Structure and Function. Immunology: Understanding The Immune System. John Wiley & Sons. 2: 58-78.
- Faiman, B. and Richards, T. (2014). "Innovative agents in multiple myeloma." J Adv Pract Oncol **5**(3): 193-202.
- Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (1998). "Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis." J Exp Med **188**(5): 979-984.
- Fesik, S. W. (2000). "Insights into programmed cell death through structural biology." Cell **103**(2): 273-282.
- Fionda, C., Soriani, A., Zingoni, A., Santoni, A. and Cippitelli, M. (2015). "NKG2D and DNAM-1 Ligands: Molecular Targets for NK Cell-Mediated Immunotherapeutic Intervention in Multiple Myeloma." Biomed Res Int **2015**: 178698.

- Francisco, J. A., Gilliland, L. K., Stebbins, M. R., Norris, N. A., Ledbetter, J. A. and Siegall, C. B. (1995). "Activity of a single-chain immunotoxin that selectively kills lymphoma and other B-lineage cells expressing the CD40 antigen." *Cancer Res* **55**(14): 3099-3104.
- Francisco, J. A., Schreiber, G. J., Comereski, C. R., Mezza, L. E., Warner, G. L., Davidson, T. J., Ledbetter, J. A. and Siegall, C. B. (1997). "In vivo efficacy and toxicity of a single-chain immunotoxin targeted to CD40." *Blood* **89**(12): 4493-4500.
- Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A. L., Munn, D. H. and Antonia, S. J. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." *Int J Cancer* **101**(2): 151-155.
- Fritzell, S., Levin, M., Åberg, I., Johansson, M., Winnerstam, M., Smith, K. E., Ellmark, P., Furebring, C., Norlén, P. and Kvarnhammar, A. (2019). "Abstract 4077: ATOR-1144 is a tumor-directed CTLA-4 x GITR bispecific antibody that acts by depleting Tregs and activating effector T cells and NK cells." *Cancer Research* **79**(13 Supplement): 4077-4077.
- Fulda, S., Meyer, E. and Debatin, K. M. (2000). "Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression." *Cancer Res* **60**(14): 3947-3956.
- Galle, P. R., Hofmann, W. J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Runkel, L. (1995). "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage." *J Exp Med* **182**(5): 1223-1230.
- Gantke, T., Weichel, M., Herbrecht, C., Reusch, U., Ellwanger, K., Fucek, I., Eser, M., Muller, T., Griep, R., Molkenthin, V., Zhukovsky, E. A. and Treder, M. (2017). "Trispecific antibodies for CD16A-directed NK cell engagement and dual-targeting of tumor cells." *Protein Eng Des Sel* **30**(9): 673-684.
- Genscript. "Case Study: PC101 (mAbPD-1 X sdAbCTLA-4)." from <https://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/GenScript-Bispecific-Ab-Webinar-Jul-11-2018-for-distribution.pdf?2125951997>.
- Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H. and Knop, S. (2016). "The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma." *Dtsch Arztebl Int* **113**(27-28): 470-476.
- Gillis, C., Gouel-Cheron, A., Jonsson, F. and Bruhns, P. (2014). "Contribution of Human FcγR3 to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies." *Front Immunol* **5**: 254.
- Gladue, R. P., Paradis, T., Cole, S. H., Donovan, C., Nelson, R., Alpert, R., Gardner, J., Natoli, E., Elliott, E., Shepard, R. and Bedian, V. (2011). "The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice." *Cancer Immunol Immunother* **60**(7): 1009-1017.
- Gordon, J. (1995). "CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation." *Blood Rev* **9**(1): 53-56.
- Grewal, I. S. and Flavell, R. A. (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." *Annu Rev Immunol* **16**: 111-135.
- Grilley-Olson, J. E., Curti, B. D., Smith, D. C., Goel, S., Gajewski, T., Markovic, S., Rixe, O., Bajor, D. L., Gutierrez, M., Kuzel, T., Mehta, A. N., Amore, B., Guerrero, A., Wang, Z. and Coveler, A. L. (2018). "SEA-CD40, a non-fucosylated CD40 agonist: Interim results from a phase 1 study in advanced solid tumors." *Journal of Clinical Oncology* **36**(15\_suppl): 3093-3093.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. and Lambrecht, B. N. (2014). "The function of FcγR3 receptors in dendritic cells and macrophages." *Nat Rev Immunol* **14**(2): 94-108.
- Haruyama, H., Ito, S., Miyadai, K., Takahashi, T., Kawaida, R., Takayama, T., Hanzawa, H., Hata, T., Yamaguchi, J., Yoshida-Kato, H., Ichikawa, K., Ohsumi, J., Yonehara, S. and Serizawa, N. (2002). "Humanization of the mouse anti-Fas antibody HFE7A and crystal structure of the humanized HFE7A Fab fragment." *Biol Pharm Bull* **25**(12): 1537-1545.

- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004). "Signaling to NF-kappaB." *Genes Dev* **18**(18): 2195-2224.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* **132**(3): 344-362.
- Hehlgans, T. and Pfeffer, K. (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." *Immunology* **115**(1): 1-20.
- Heinrich, P. C., Mueller, M. and Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-776.
- Hipp, S., Tai, Y. T., Blanset, D., Deegen, P., Wahl, J., Thomas, O., Rattel, B., Adam, P. J., Anderson, K. C. and Friedrich, M. (2017). "A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo." *Leukemia* **31**(8): 1743-1751.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway. *Apoptosis and Medicine*. T. M. Ntuli, IntechOpen.
- Hoteit, R., Bazarbachi, A., Antar, A., Salem, Z., Shammaa, D. and Mahfouz, R. (2014). "KIR genotype distribution among patients with multiple myeloma: Higher prevalence of KIR 2DS4 and KIR 2DS5 genes." *Meta Gene* **2**: 730-736.
- Hu, W. H., Johnson, H. and Shu, H. B. (2000). "Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8." *J Biol Chem* **275**(15): 10838-10844.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993). "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen." *J Biol Chem* **268**(15): 10932-10937.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." *Cell* **66**(2): 233-243.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology*.
- Jung, G., Grosse-Hovest, L., Krammer, P. H. and Rammensee, H. G. (2001). "Target cell-restricted triggering of the CD95 (APO-1/Fas) death receptor with bispecific antibody fragments." *Cancer Res* **61**(5): 1846-1848.
- Jung, J. (2018). ABL201: A BCMA-Targeting Antibody-Drug Conjugate with NTERM Conjugation for Treating Multiple Myeloma. *World ADC Asia*. Shanghai, China, ABL Bio.
- Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." *Oncogene* **18**(49): 6867-6874.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. and Yagita, H. (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." *J Exp Med* **182**(6): 1777-1783.
- Khong, A., Nelson, D. J., Nowak, A. K., Lake, R. A. and Robinson, B. W. (2012). "The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer." *Int Rev Immunol* **31**(4): 246-266.
- Kim, K. M., McDonagh, C. F., Westendorf, L., Brown, L. L., Sussman, D., Feist, T., Lyon, R., Alley, S. C., Okeley, N. M., Zhang, X., Thompson, M. C., Stone, I., Gerber, H. P. and Carter, P. J. (2008). "Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity." *Mol Cancer Ther* **7**(8): 2486-2497.
- Kimberley, F. C., van Bostelen, L., Cameron, K., Hardenberg, G., Marquart, J. A., Hahne, M. and Medema, J. P. (2009). "The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking." *Faseb j* **23**(5): 1584-1595.
- Kinneer, K., Meekin, J., Varkey, R., Xiao, X., Zhong, H., Breen, S., Hurt, E., Thomas, S., Flynn, M., Hynes, P., Bezabeh, B., Chen, C., Wetzel, L., Chen, R., Tai, Y.-T., Anderson, K. C., Herbst, R. and Tice, D. (2017). "Preclinical Evaluation of MEDI2228, a BCMA-Targeting Pyrrolobenzodiazepine-Linked Antibody Drug Conjugate for the Treatment of Multiple Myeloma." *Blood* **130**(Suppl 1): 3153-3153.



- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Braunagel, M., Reusch, U., Cochlovius, B., Le Gall, F., Kouprianova, O. A., Von der Lieth, C. W. and Little, M. (2003). "Effect of domain order on the activity of bacterially produced bispecific single-chain Fv antibodies." *J Mol Biol* **330**(1): 99-111.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *Embo j* **14**(22): 5579-5588.
- Klement, M., Liu, C., Loo, B. L., Choo, A. B., Ow, D. S. and Lee, D. Y. (2015). "Effect of linker flexibility and length on the functionality of a cytotoxic engineered antibody fragment." *J Biotechnol* **199**: 90-97.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* **275**(5303): 1132-1136.
- Knorr, D. A., Dahan, R. and Ravetch, J. V. (2018). "Toxicity of an Fc-engineered anti-CD40 antibody is abrogated by intratumoral injection and results in durable antitumor immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**(43): 11048-11053.
- Kondo, T., Suda, T., Fukuyama, H., Adachi, M. and Nagata, S. (1997). "Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis." *Nat Med* **3**(4): 409-413.
- Kontermann, R. E. (2012). "Dual targeting strategies with bispecific antibodies." *MAbs* **4**(2): 182-197.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* **407**(6805): 789-795.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J. J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Hacker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P. and Wajant, H. (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." *J Cell Biol* **166**(3): 369-380.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. and Wajant, H. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* **21**(12): 3964-3973.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* **276**(23): 20633-20640.
- Kums, J., Nelke, J., Ruth, B., Schafer, V., Siegmund, D. and Wajant, H. (2017). "Quantitative analysis of cell surface antigen-antibody interaction using Gaussia princeps luciferase antibody fusion proteins." *MAbs* **9**(3): 506-520.
- Kvarnhammar, A. M., Veitonmaki, N., Hagerbrand, K., Dahlman, A., Smith, K. E., Fritzell, S., von Schantz, L., Thagesson, M., Werchau, D., Smedenfors, K., Johansson, M., Rosen, A., Aberg, I., Winnerstam, M., Nyblom, E., Barchan, K., Furebring, C., Norlen, P. and Ellmark, P. (2019). "The CTLA-4 x OX40 bispecific antibody ATOR-1015 induces anti-tumor effects through tumor-directed immune activation." *J Immunother Cancer* **7**(1): 103.
- Lavrik, I., Golks, A. and Krammer, P. H. (2005). "Death receptor signaling." *J Cell Sci* **118**(Pt 2): 265-267.
- Law, C.-L., Aaron, W., Austin, R., Barath, M., Callihan, E., Evans, T., Guerrero, M. G., Hemmati, G., Jones, A., Kwant, K., Lao, L., Lemon, B., Moldt, K., Patnaik, P., Sexton, K., Wesche, H., Xiao, S., Yu, S. and Yu, T. (2018). Preclinical and Nonclinical Characterization of HPN217: A Tri-Specific T Cell-Activating Construct (TriTAC) Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) for the Treatment of Multiple Myeloma. *Abstract 3225 ASH Annual Meeting 2018*.
- Law, C. L., Gordon, K. A., Collier, J., Klussman, K., McEarchern, J. A., Cervený, C. G., Mixan, B. J., Lee, W. P., Lin, Z., Valdez, P., Wahl, A. F. and Grewal, I. S. (2005). "Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-40." *Cancer Res* **65**(18): 8331-8338.
- Law, C. L. and Grewal, I. S. (2009). "Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges." *Adv Exp Med Biol* **647**: 8-36.
- Ledbetter, J. A., Francisco, J. A., Siegall, C. B., Gilliland, L. K., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Siadak, A. W., Mischel-Petty, N., Grosmaire, L. S., Gordon, M. L., Brown, T. J., Moran-Davis, P., Mittler, R. S., Kiener, P. A.

- and Nadler, S. G. (1997). "Agonistic activity of a CD40-specific single-chain Fv constructed from the variable regions of mAb G28-5." Crit Rev Immunol **17**(5-6): 427-435.
- Lee, G. H., Askari, A., Malietzis, G., Bernardo, D., Clark, S. K., Knight, S. C. and Al-Hassi, H. O. (2014). "The role of CD40 expression in dendritic cells in cancer biology; a systematic review." Curr Cancer Drug Targets **14**(7): 610-620.
- Li, F. and Ravetch, J. V. (2012). "Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(27): 10966-10971.
- Li, F. and Ravetch, J. V. (2013). "Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(48): 19501-19506.
- Li, Y. J., Jiang, W. Q., Rao, H. L., Huang, J. J., Xia, Y., Huang, H. Q., Lin, T. Y., Xia, Z. J., Li, S. and Li, Z. M. (2012). "Expression of BAFF and BAFF-R in follicular lymphoma: correlation with clinicopathologic characteristics and survival outcomes." PLoS One **7**(12): e50936.
- Liu, P., Jin, Y., Sattar, H., Liu, H., Xie, W. and Zhou, F. (2018). "Natural killer cell immunotherapy against multiple myeloma: Progress and possibilities." J Leukoc Biol **103**(5): 821-828.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
- Lum, L. G. and Davol, P. A. (2005). "Retargeting T cells and immune effector cells with bispecific antibodies." Cancer Chemother Biol Response Modif **22**: 273-291.
- Luo, J. L., Kamata, H. and Karin, M. (2005). "IKK/NF-κB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy." J Clin Invest **115**(10): 2625-2632.
- Luqman, M., Klabunde, S., Lin, K., Georgakis, G. V., Cherukuri, A., Holash, J., Goldbeck, C., Xu, X., Kadel, E. E., 3rd, Lee, S. H., Aukerman, S. L., Jallal, B., Aziz, N., Weng, W. K., Wierda, W., O'Brien, S. and Younes, A. (2008). "The antileukemia activity of a human anti-CD40 antagonist antibody, HCD122, on human chronic lymphocytic leukemia cells." Blood **112**(3): 711-720.
- Ma, D. Y. and Clark, E. A. (2009). "The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells." Semin Immunol **21**(5): 265-272.
- Ma, H., O'Fagain, C. and O'Kennedy, R. (2019). "Unravelling enhancement of antibody fragment stability - Role of format structure and cysteine modification." J Immunol Methods **464**: 57-63.
- Mangsbo, S. M., Broos, S., Fletcher, E., Veitonmaki, N., Furebring, C., Dahlen, E., Norlen, P., Lindstedt, M., Totterman, T. H. and Ellmark, P. (2015). "The human agonistic CD40 antibody ADC-1013 eradicates bladder tumors and generates T-cell-dependent tumor immunity." Clin Cancer Res **21**(5): 1115-1126.
- McWilliams, E. M., Lucas, C. R., Chen, T., Harrington, B. K., Wasmuth, R., Campbell, A., Rogers, K. A., Cheney, C. M., Mo, X., Andritsos, L. A., Awan, F. T., Woyach, J., Carson, W. E., 3rd, Butchar, J., Tridandapani, S., Hertlein, E., Castro, C. E., Muthusamy, N. and Byrd, J. C. (2019). "Anti-BAFF-R antibody VAY-736 demonstrates promising preclinical activity in CLL and enhances effectiveness of ibrutinib." Blood Adv **3**(3): 447-460.
- Medina-Echeverez, J., Ma, C., Duffy, A. G., Eggert, T., Hawk, N., Kleiner, D. E., Korangy, F. and Greten, T. F. (2015). "Systemic Agonistic Anti-CD40 Treatment of Tumor-Bearing Mice Modulates Hepatic Myeloid-Suppressive Cells and Causes Immune-Mediated Liver Damage." Cancer Immunol Res **3**(5): 557-566.
- Medler, J., Nelke, J., Weisenberger, D., Steinfatt, T., Rothaug, M., Berr, S., Hunig, T., Beilhack, A. and Wajant, H. (2019). "TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcγR-independent agonistic activity." Cell Death Dis **10**(3): 224.
- Michaelson, J. S., Demarest, S. J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W. B., Wu, X., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., Farrington, G. K., Lugovskoy, A., Joseph, I., Bailly, V., Wang, X., Garber, E., Browning, J. and Glaser, S. M. (2009). "Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTβR." MAbs **1**(2): 128-141.

- Monnier, P. P., Vigouroux, R. J. and Tassew, N. G. (2013). "In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments." *Antibodies* **2**(2): 193-208.
- Moreaux, J., Hose, D., Jourdan, M., Reme, T., Hundemer, M., Moos, M., Robert, N., Moine, P., De Vos, J., Goldschmidt, H. and Klein, B. (2007). "TACI expression is associated with a mature bone marrow plasma cell signature and C-MAF overexpression in human myeloma cell lines." *Haematologica* **92**(6): 803-811.
- Moreaux, J., Veyrune, J. L., De Vos, J. and Klein, B. (2009). "APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression." *BMC Cancer* **9**: 83.
- Muik, A., Gieseke, F., Isil, A., Burm, S., Diken, M., Grunwitz, C., Kreiter, S., Satijn, D., Schuurhuis, D., Tureci, O., Sahin, U. and Breij, E. (2018). DuoBody-CD40x41BB conditionally enhances immune activation by crosslinking of CD40- and 4-1BB positive cells (P402). *J Immunother Cancer*. **6**: 115.
- Muller, N., Wyzgol, A., Munkel, S., Pfizenmaier, K. and Wajant, H. (2008). "Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization." *Febs j* **275**(9): 2296-2304.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-365.
- Naismith, J. H. and Sprang, S. R. (1998). "Modularity in the TNF-receptor family." *Trends Biochem Sci* **23**(2): 74-79.
- Nakayama, J., Ogawa, Y., Yoshigae, Y., Onozawa, Y., Yonemura, A., Saito, M., Ichikawa, K., Yamoto, T., Komai, T., Tatsuta, T. and Ohtsuki, M. (2006). "A humanized anti-human Fas antibody, R-125224, induces apoptosis in type I activated lymphocytes but not in type II cells." *Int Immunol* **18**(1): 113-124.
- Nalivaiko, K., Hofmann, M., Kober, K., Teichweyde, N., Krammer, P. H., Rammensee, H. G., Grosse-Hovest, L. and Jung, G. (2016). "A Recombinant Bispecific CD20xCD95 Antibody With Superior Activity Against Normal and Malignant B-cells." *Mol Ther* **24**(2): 298-305.
- NCT03269136. "Phase 1 Study Of PF-06863135, A BCMA-CD3 Bispecific Ab. In Relapse/ Refractory Multiple Myeloma." from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03269136>.
- NCT03893955. "A Study to Determine the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Preliminary Efficacy of ABBV-927 and ABBV-368 With and Without ABBV-181 in Subjects With Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors." from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03893955>.
- Nguyen-Pham, T. N., Lee, Y. K., Kim, H. J. and Lee, J. J. (2012). "Immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma: how to improve?" *Clin Dev Immunol* **2012**: 397648.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2006). "Fcgamma receptors: old friends and new family members." *Immunity* **24**(1): 19-28.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2007). "Fc-receptors as regulators of immunity." *Adv Immunol* **96**: 179-204.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2008). "Fcgamma receptors as regulators of immune responses." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 34-47.
- Nishimura, Y., Hirabayashi, Y., Matsuzaki, Y., Musette, P., Ishii, A., Nakauchi, H., Inoue, T. and Yonehara, S. (1997). "In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver." *Int Immunol* **9**(2): 307-316.
- Novak, A. J., Darce, J. R., Arendt, B. K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J. A., Greipp, P. R. and Jelinek, D. F. (2004). "Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival." *Blood* **103**(2): 689-694.
- O'Donnell, E. K. and Raje, N. S. (2017). "New monoclonal antibodies on the horizon in multiple myeloma." *Ther Adv Hematol* **8**(2): 41-53.
- Oden, F., Marino, S. F., Brand, J., Scheu, S., Kriegel, C., Olal, D., Takvorian, A., Westermann, J., Yilmaz, B., Hinz, M., Daumke, O., Hopken, U. E., Muller, G. and Lipp, M. (2015). "Potent anti-tumor response by targeting B cell maturation antigen (BCMA) in a mouse model of multiple myeloma." *Mol Oncol* **9**(7): 1348-1358.

- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. and Nagata, S. (1993). "Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice." *Nature* **364**(6440): 806-809.
- Pahl, A., Lutz, C. and Hechler, T. (2018). "Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates." *Drug Discov Today Technol* **30**: 85-89.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. and Maniatis, T. (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." *Cell* **78**(5): 773-785.
- Papenfuss, K., Cordier, S. M. and Walczak, H. (2008). "Death receptors as targets for anti-cancer therapy." *J Cell Mol Med* **12**(6b): 2566-2585.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A. and Ruberti, G. (1999). "Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor." *J Biol Chem* **274**(53): 38241-38250.
- Parameswaran, R., Muschen, M., Kim, Y. M., Groffen, J. and Heisterkamp, N. (2010). "A functional receptor for B-cell-activating factor is expressed on human acute lymphoblastic leukemias." *Cancer Res* **70**(11): 4346-4356.
- Park, S. M., Schickel, R. and Peter, M. E. (2005). "Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules." *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 610-616.
- Pillarsetti, K., Baldwin, E., Babich, A., Majewski, N., Barone, L., Li, Y., Zhang, X., Chin, D., Luistro, L., Mendonça, M., Nanjunda, R., Rudnick, S., Bellew, K., Elsayed, Y., Attar, R. M. and Gaudet, F. (2016). "Development of a New BCMAxCD3 Duobody® Antibody for Multiple Myeloma." *Blood* **128**(22): 2116-2116.
- Pittari, G., Vago, L., Festuccia, M., Bonini, C., Mudawi, D., Giaccone, L. and Bruno, B. (2017). "Restoring Natural Killer Cell Immunity against Multiple Myeloma in the Era of New Drugs." *Front Immunol* **8**: 1444.
- Pullen, S. S., Dang, T. T., Crute, J. J. and Kehry, M. R. (1999). "CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs." *J Biol Chem* **274**(20): 14246-14254.
- Ramadoss, N. S., Schulman, A. D., Choi, S. H., Rodgers, D. T., Kazane, S. A., Kim, C. H., Lawson, B. R. and Young, T. S. (2015). "An anti-B cell maturation antigen bispecific antibody for multiple myeloma." *J Am Chem Soc* **137**(16): 5288-5291.
- Remer, M., White, A., Glennie, M., Al-Shamkhani, A. and Johnson, P. (2017). "The Use of Anti-CD40 mAb in Cancer." *Curr Top Microbiol Immunol* **405**: 165-207.
- Rickert, R. C., Jellusova, J. and Miletic, A. V. (2011). "Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease." *Immunol Rev* **244**(1): 115-133.
- Riedel, S. S., Mottok, A., Brede, C., Bauerlein, C. A., Jordan Garrote, A. L., Ritz, M., Mattenheimer, K., Rosenwald, A., Einsele, H., Bogen, B. and Beilhack, A. (2012). "Non-invasive imaging provides spatiotemporal information on disease progression and response to therapy in a murine model of multiple myeloma." *PLoS One* **7**(12): e52398.
- Rodig, S. J., Shahsafaei, A., Li, B., Mackay, C. R. and Dorfman, D. M. (2005). "BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders." *Hum Pathol* **36**(10): 1113-1119.
- Rollig, C., Knop, S. and Bornhauser, M. (2015). "Multiple myeloma." *Lancet* **385**(9983): 2197-2208.
- Roos, C., Wicovsky, A., Muller, N., Salzmann, S., Rosenthal, T., Kalthoff, H., Trauzold, A., Seher, A., Henkler, F., Kneitz, C. and Wajant, H. (2010). "Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway." *J Immunol* **185**(3): 1593-1605.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M. and Goeddel, D. V. (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." *Science* **269**(5229): 1424-1427.

- Rothlisberger, D., Honegger, A. and Pluckthun, A. (2005). "Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability." *J Mol Biol* **347**(4): 773-789.
- Ruckert, R., Asadullah, K., Seifert, M., Budagian, V. M., Arnold, R., Trombotta, C., Paus, R. and Bulfone-Paus, S. (2000). "Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis?" *J Immunol* **165**(4): 2240-2250.
- Ryman, J. T. and Meibohm, B. (2017). "Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies." *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **6**(9): 576-588.
- Saito-Yabe, M., Yoshigae, Y., Takasaki, W., Kurihara, A., Ikeda, T. and Okazaki, O. (2009). "Highly frequent anti-idiotypic antibody in cynomolgus monkeys developed against mouse-derived regions of anti-Fas antibody humanized by complementarity determining region grafting." *Br J Pharmacol* **158**(2): 548-557.
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10964-10967.
- Sanchez, E., Tanenbaum, E. J., Patil, S., Li, M., Soof, C. M., Vidisheva, A., Waterman, G. N., Hekmati, T., Tang, G., Wang, C. S., Chen, H. and Berenson, J. (2018). "The clinical significance of B-cell maturation antigen as a therapeutic target and biomarker." *Expert Rev Mol Diagn* **18**(4): 319-329.
- Schanzer, J., Jekle, A., Nezu, J., Lochner, A., Croasdale, R., Dioszegi, M., Zhang, J., Hoffmann, E., Dormeyer, W., Stracke, J., Schafer, W., Ji, C., Heilek, G., Cammack, N., Brandt, M., Umana, P. and Brinkmann, U. (2011). "Development of tetravalent, bispecific CCR5 antibodies with antiviral activity against CCR5 monoclonal antibody-resistant HIV-1 strains." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(5): 2369-2378.
- Scheidereit, C. (2006). "I $\kappa$ B kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription." *Oncogene* **25**(51): 6685-6705.
- Schiele, P., Baumeister, H., Kehler, P., Rühmann, J. and Danielczyk, A. (2018). Glyco-engineering of an anti-CD40 antibody enhances its agonistic activity. *CIMT - Cancer Immunotherapy*, Glycotope GmbH, Berlin, Germany.
- Schuepbach-Mallepell, S., Das, D., Willen, L., Vigolo, M., Tardivel, A., Lebon, L., Kowalczyk-Quintas, C., Nys, J., Smulski, C., Zheng, T. S., Maskos, K., Lammens, A., Jiang, X., Hess, H., Tan, S. L. and Schneider, P. (2015). "Stoichiometry of Heteromeric BAFF and APRIL Cytokines Dictates Their Receptor Binding and Signaling Properties." *J Biol Chem* **290**(26): 16330-16342.
- Seckinger, A., Delgado, J. A., Moser, S., Moreno, L., Neuber, B., Grab, A., Lipp, S., Merino, J., Prosper, F., Emde, M., Delon, C., Latzko, M., Gianotti, R., Luoend, R., Murr, R., Hosse, R. J., Harnisch, L. J., Bacac, M., Fauti, T., Klein, C., Zabaleta, A., Hillengass, J., Cavalcanti-Adam, E. A., Ho, A. D., Hundemer, M., San Miguel, J. F., Strein, K., Umana, P., Hose, D., Paiva, B. and Vu, M. D. (2017). "Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment." *Cancer Cell* **31**(3): 396-410.
- Shen, X., Zhu, W., Zhang, X., Xu, G. and Ju, S. (2011). "A role of both NF- $\kappa$ B pathways in expression and transcription regulation of BAFF-R gene in multiple myeloma cells." *Mol Cell Biochem* **357**(1-2): 21-30.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. and Presta, L. G. (2002). "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc $\gamma$ RIII and antibody-dependent cellular toxicity." *J Biol Chem* **277**(30): 26733-26740.
- Shivange, G., Urbanek, K., Przanowski, P., Perry, J. S. A., Jones, J., Haggart, R., Kostka, C., Patki, T., Stelow, E., Petrova, Y., Llana, D., Mayo, M., Ravichandran, K. S., Landen, C. N., Bhatnagar, S. and Tushir-Singh, J. (2018). "A Single-Agent Dual-Specificity Targeting of FOLR1 and DR5 as an Effective Strategy for Ovarian Cancer." *Cancer Cell* **34**(2): 331-345.e311.
- Siegemund, M., Schneider, F., Hutt, M., Seifert, O., Müller, I., Kulms, D., Pfizenmaier, K. and Kontermann, R. E. (2018). "IgG-single-chain TRAIL fusion proteins for tumour therapy." *Sci Rep* **8**(1): 7808.

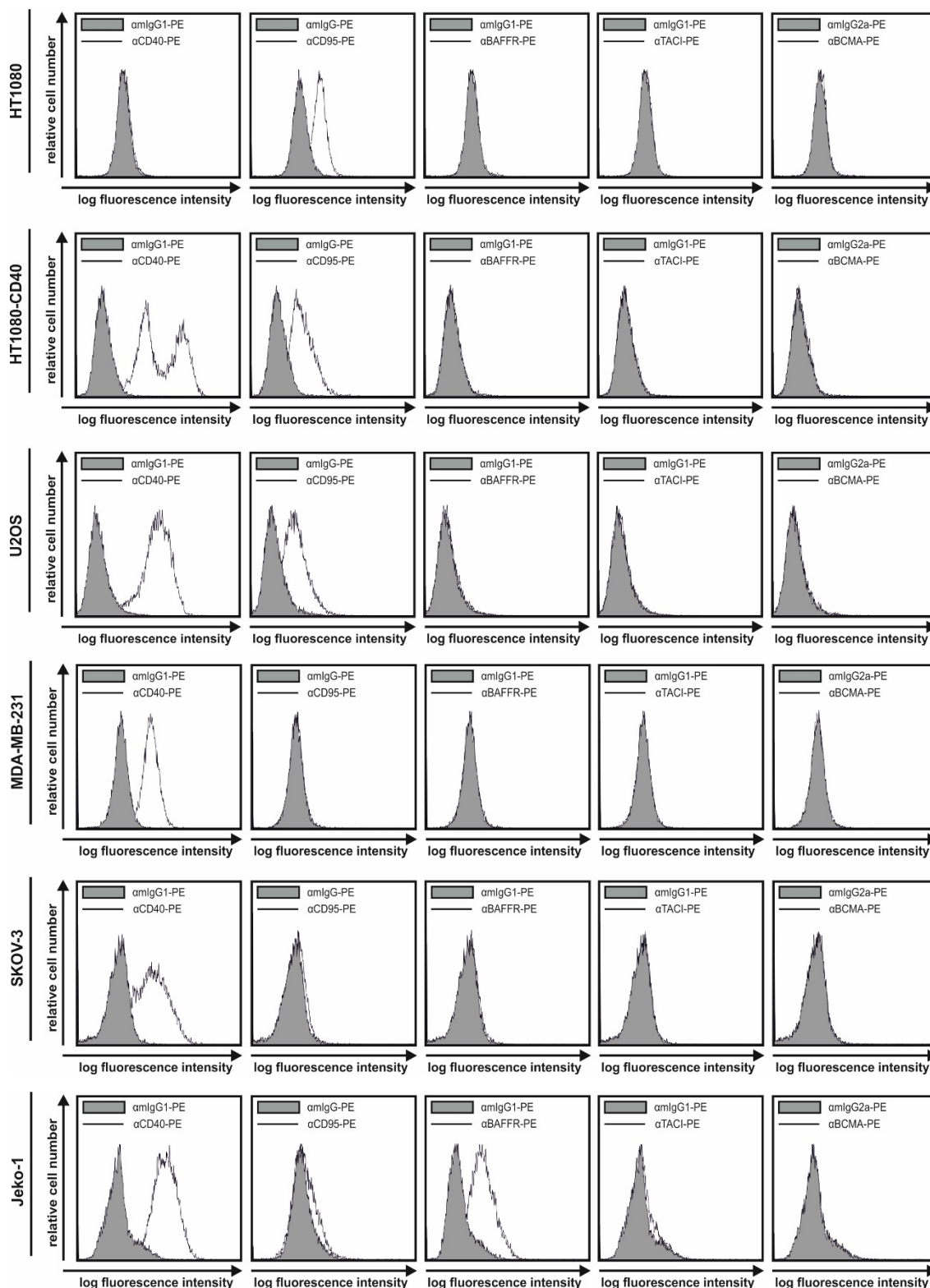
- Siegmund, D., Klose, S., Zhou, D., Baumann, B., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H. and Trauzold, A. (2007). "Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells." Cell Signal **19**(6): 1172-1184.
- Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-962.
- Spiess, C., Zhai, Q. and Carter, P. J. (2015). "Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies." Mol Immunol **67**(2 Pt A): 95-106.
- Stahnke, K., Hecker, S., Kohne, E. and Debatin, K. M. (1998). "CD95 (APO-1/FAS)-mediated apoptosis in cytokine-activated hematopoietic cells." Exp Hematol **26**(9): 844-850.
- Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Green, D. R., Reed, J. C., Froelich, C. J. and Salvesen, G. S. (1998). "Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8." J Biol Chem **273**(42): 27084-27090.
- Strohl, W. R. (2018). "Current progress in innovative engineered antibodies." Protein Cell **9**(1): 86-120.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H. G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J. C. and Kroemer, G. (1997). "The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis." J Exp Med **186**(1): 25-37.
- Tai, Y.-T., Xing, L., Lin, L., Yu, T., Cho, S.-F., Wen, K., Kinneer, K., Munshi, N. and Anderson, K. C. (2019). "MEDI2228, a novel BCMA pyrrolobenzodiazepine antibody drug conjugate, overcomes drug resistance and synergizes with bortezomib and DNA damage response inhibitors in multiple myeloma." Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia **19**(10): e154-e155.
- Takahata, H., Ohara, N., Ichimura, K., Tanaka, T., Sato, Y., Morito, T., Takata, K., Kojima, M., Kobata, T. and Yoshino, T. (2010). "BAFF-R is expressed on B-cell lymphomas depending on their origin, and is related to proliferation index of nodal diffuse large B-cell lymphomas." J Clin Exp Hematol **50**(2): 121-127.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. and Goeddel, D. V. (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." Cell **74**(5): 845-853.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-241.
- ten Hacken, E. and Burger, J. A. (2014). "Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor." Clin Cancer Res **20**(3): 548-556.
- Thomann, M., Reckermann, K., Reusch, D., Prasser, J. and Tejada, M. L. (2016). "Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies." Mol Immunol **73**: 69-75.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Tschopp, J. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**(6624): 517-521.
- Timmer, T., de Vries, E. G. and de Jong, S. (2002). "Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?" J Pathol **196**(2): 125-134.
- Tutt, A. L., O'Brien, L., Hussain, A., Crowther, G. R., French, R. R. and Glennie, M. J. (2002). "T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody." J Immunol **168**(6): 2720-2728.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Verma, I. M. and Green, D. R. (1998). "Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B." Trends Cell Biol **8**(3): 107-111.
- Van Kooten, C. and Banchereau, J. (1996). "CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair." Adv Immunol **61**: 1-77.
- van Kooten, C. and Banchereau, J. (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- van Mierlo, G. J., den Boer, A. T., Medema, J. P., van der Voort, E. I., Fransen, M. F., Offringa, R., Melief, C. J. and Toes, R. E. (2002). "CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5561-5566.

- Vauquelin, G. and Charlton, S. J. (2013). "Exploring avidity: understanding the potential gains in functional affinity and target residence time of bivalent and heterobivalent ligands." *Br J Pharmacol* **168**(8): 1771-1785.
- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D. and Miyamoto, S. (1995). "Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation." *Genes Dev* **9**(22): 2723-2735.
- Vitale, L. A., Thomas, L. J., He, L. Z., O'Neill, T., Widger, J., Crocker, A., Sundarapandiyam, K., Storey, J. R., Forsberg, E. M., Weidlick, J., Baronas, A. R., Gergel, L. E., Boyer, J. M., Sisson, C., Goldstein, J., Marsh, H. C., Jr. and Keler, T. (2019). "Development of CDX-1140, an agonist CD40 antibody for cancer immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **68**(2): 233-245.
- Vonderheide, R. H. (2007). "Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy." *Clin Cancer Res* **13**(4): 1083-1088.
- Wada, K., Maeda, K., Tajima, K., Kato, T., Kobata, T. and Yamakawa, M. (2009). "Expression of BAFF-R and TACI in reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas." *Histopathology* **54**(2): 221-232.
- Wajant, H. (2015). "Principles of antibody-mediated TNF receptor activation." *Cell Death Differ* **22**(11): 1727-1741.
- Wajant, H. (2019). "Molecular Mode of Action of TRAIL Receptor Agonists-Common Principles and Their Translational Exploitation." *Cancers (Basel)* **11**(7).
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P. and Pfizenmaier, K. (2001). "Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative." *Oncogene* **20**(30): 4101-4106.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C. and Lynch, D. H. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* **5**(2): 157-163.
- Waldmann, T. A. and Strober, W. (1969). "Metabolism of immunoglobulins." *Prog Allergy* **13**: 1-110.
- Wang, W., Wang, E. Q. and Balthasar, J. P. (2008). "Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics." *Clin Pharmacol Ther* **84**(5): 548-558.
- Wang, Y., Li, Y. J., Jiang, W. Q., Rao, H. L., Huang, J. J., Xia, Y., Bi, X., Sun, P., Huang, H. Q., Lin, T. Y., Guan, Z. Z. and Li, Z. M. (2015). "Expression of BAFF-R, but not BAFF, is an independent prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP." *Ann Hematol* **94**(11): 1865-1873.
- Weninger, W., Manjunath, N. and von Andrian, U. H. (2002). "Migration and differentiation of CD8+ T cells." *Immunol Rev* **186**: 221-233.
- Wesselborg, S., Engels, I. H., Rossmann, E., Los, M. and Schulze-Osthoff, K. (1999). "Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction." *Blood* **93**(9): 3053-3063.
- White, A. L., Chan, H. T., French, R. R., Beers, S. A., Cragg, M. S., Johnson, P. W. and Glennie, M. J. (2013). "FcgammaRIIa controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs." *Cancer Immunol Immunother* **62**(5): 941-948.
- Whitekus, M. J., Santini, R. P., Rosenspire, A. J. and McCabe, M. J., Jr. (1999). "Protection against CD95-mediated apoptosis by inorganic mercury in Jurkat T cells." *J Immunol* **162**(12): 7162-7170.
- WO2011039126A1. "Bispecific death receptor agonistic antibodies." from <https://patents.google.com/patent/WO2011039126A1>.
- WO2016105450A2. "Trispecific antibodies." from <https://patents.google.com/patent/WO2016105450A2>.

- WO2017093447A1. "Anti-death receptor antibodies and methods of use thereof ", from <https://patents.google.com/patent/WO2017093447A1>.
- WO2017093942A1. "Combination treatments and uses and methods thereof ", from <https://patents.google.com/patent/WO2017093942A1>.
- WO2017143069A1. "Bcma antibodies and use of same to treat cancer and immunological disorders ", from <https://patents.google.com/patent/WO2017143069A1>.
- WO2018083204A1. "Bispecific antibody against bcma and cd3 and an immunological drug for combined use in treating multiple myeloma ", from <https://patents.google.com/patent/WO2018083204A1>.
- WO2018158350A1. "Combination of an anti-cd16a antibody with a cytokine." from <https://patents.google.com/patent/WO2018158350A1>.
- WO2019133761A1. "Cd3-delta/epsilon heterodimer specific antibodies." from <https://patents.google.com/patent/WO2019133761A1>.
- Worn, A. and Pluckthun, A. (1999). "Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering." *Biochemistry* **38**(27): 8739-8750.
- Wu, X., Sereno, A. J., Huang, F., Lewis, S. M., Lieu, R. L., Weldon, C., Torres, C., Fine, C., Batt, M. A., Fitchett, J. R., Glasebrook, A. L., Kuhlman, B. and Demarest, S. J. (2015). "Fab-based bispecific antibody formats with robust biophysical properties and biological activity." *MAbs* **7**(3): 470-482.
- Wuxiang, L., Yip, T., Li, D., Woods, C. and Fan, X. (2018). A Novel Anti-BCMA ADC for the Development of an Effective Multiple Myeloma Therapy. <https://www.avantgen.com/wp-content/uploads/2018/11/AvantGens-anti-BCMA-ADC.pdf>, AvantGen Inc.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. and Dunlop, D. (1984). "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." *J Pathol* **142**(1): 67-77.
- Wyzgol, A., Muller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G. U., Pfizenmaier, K. and Wajant, H. (2009). "Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand." *J Immunol* **183**(3): 1851-1861.
- Ye, S., Cohen, D., Belmar, N. A., Choi, D., Tan, S. S., Sho, M., Akamatsu, Y., Kim, H., Iyer, R., Cabel, J., Lake, M., Song, D., Harlan, J., Zhang, C., Fang, Y., Wahl, A. F., Culp, P., Hollenbaugh, D. and Chao, D. T. (2019). "A Bispecific Molecule Targeting CD40 and Tumor Antigen Mesothelin Enhances Tumor-Specific Immunity." *Cancer Immunol Res* **7**(11): 1864-1875.
- Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. (1989). "A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor." *J Exp Med* **169**(5): 1747-1756.
- Yoshida, H., Watanabe, K., Takahashi, S. and Ichikawa, K. (2010). "Protective effects of HFE7A, mouse anti-human/mouse Fas monoclonal antibody against acute and lethal hepatic injury induced by Jo2." *Cytotechnology* **62**(4): 313-323.
- Zelle-Rieser, C., Thangavadivel, S., Biedermann, R., Brunner, A., Stoitzner, P., Willenbacher, E., Greil, R. and Johrer, K. (2016). "T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site." *J Hematol Oncol* **9**(1): 116.
- Zhang, J., Yun, J., Z., S., Zhang, X. and Pan, B. (2009). "Design and optimization of a linker for fusion protein construction." *Progress in Natural Science* **19**(10).

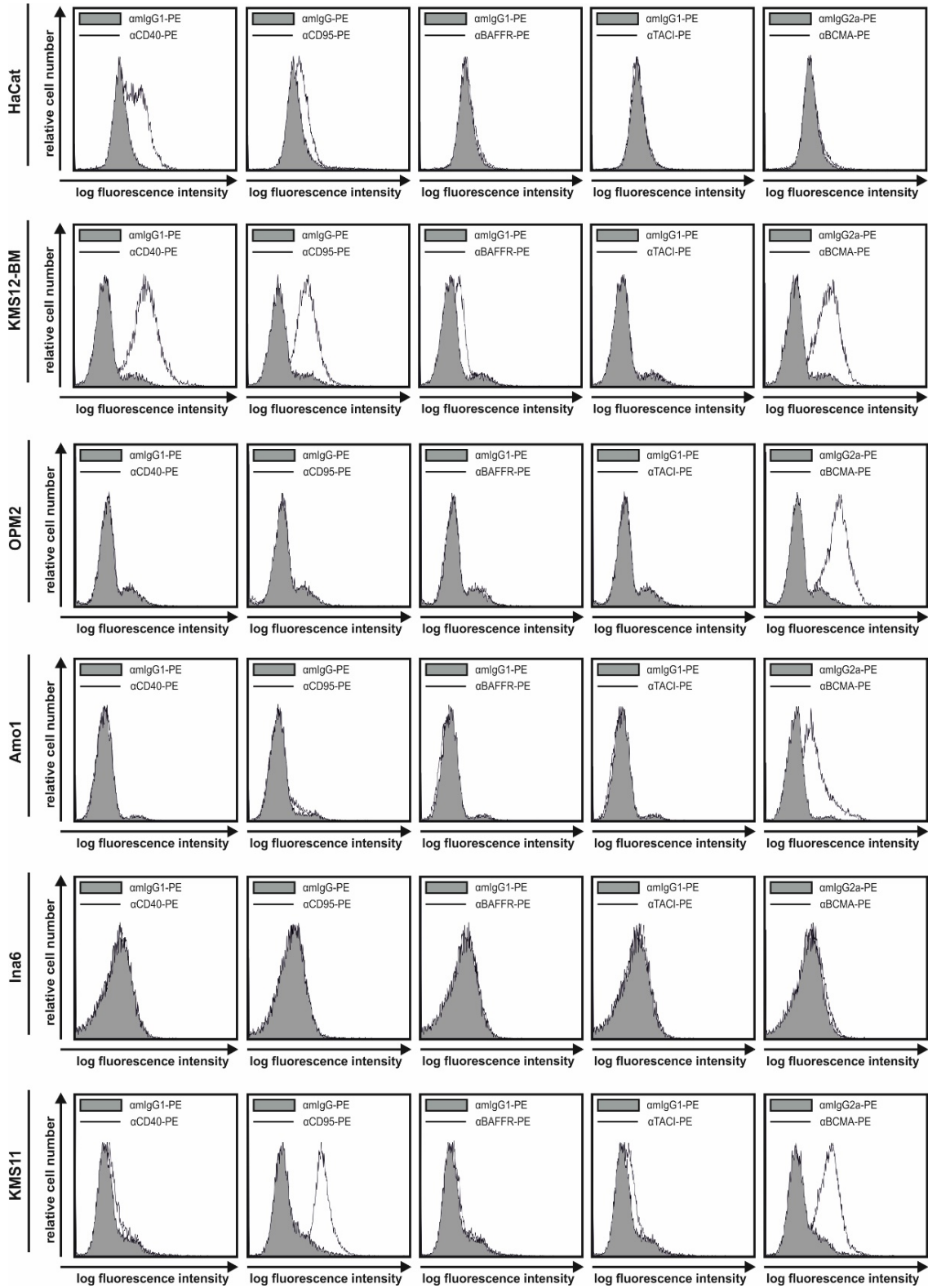


## Anhang

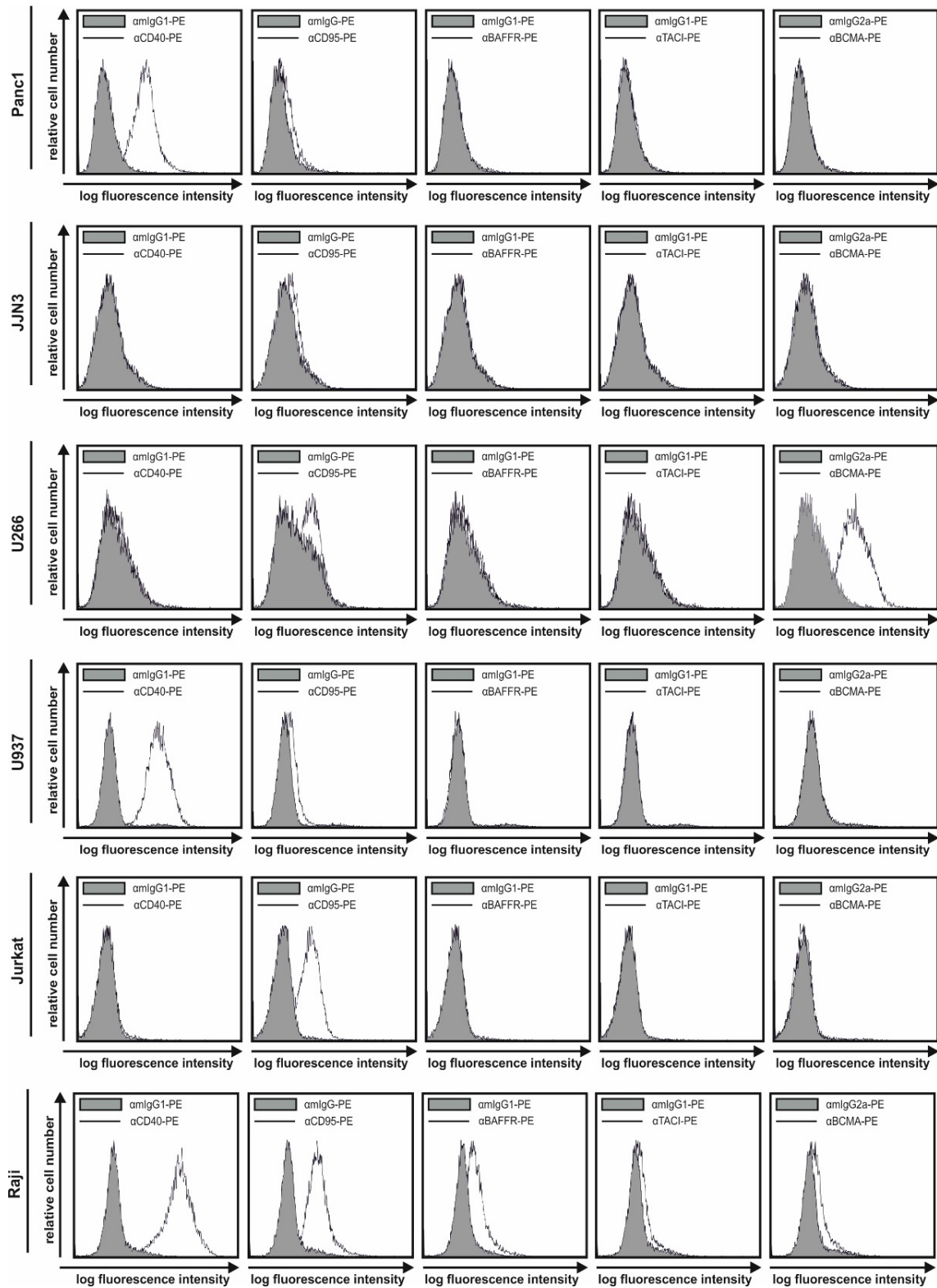


**Abb. S 1: Durchflusszytometrie der Expression von CD40, CD95, Baffr, TACI und BCMA der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien.**

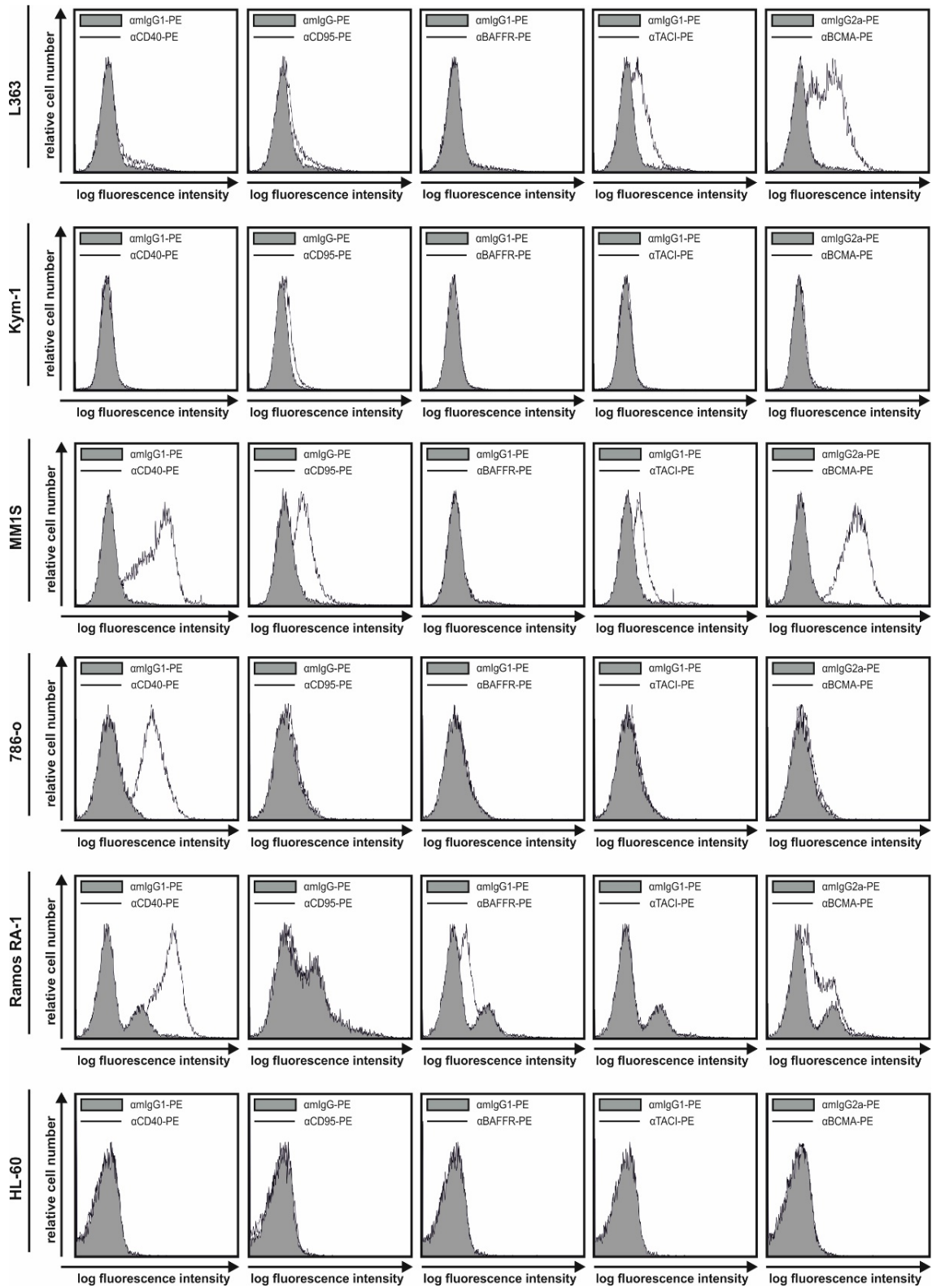
Abbildung wird auf den folgenden Seiten fortgesetzt.



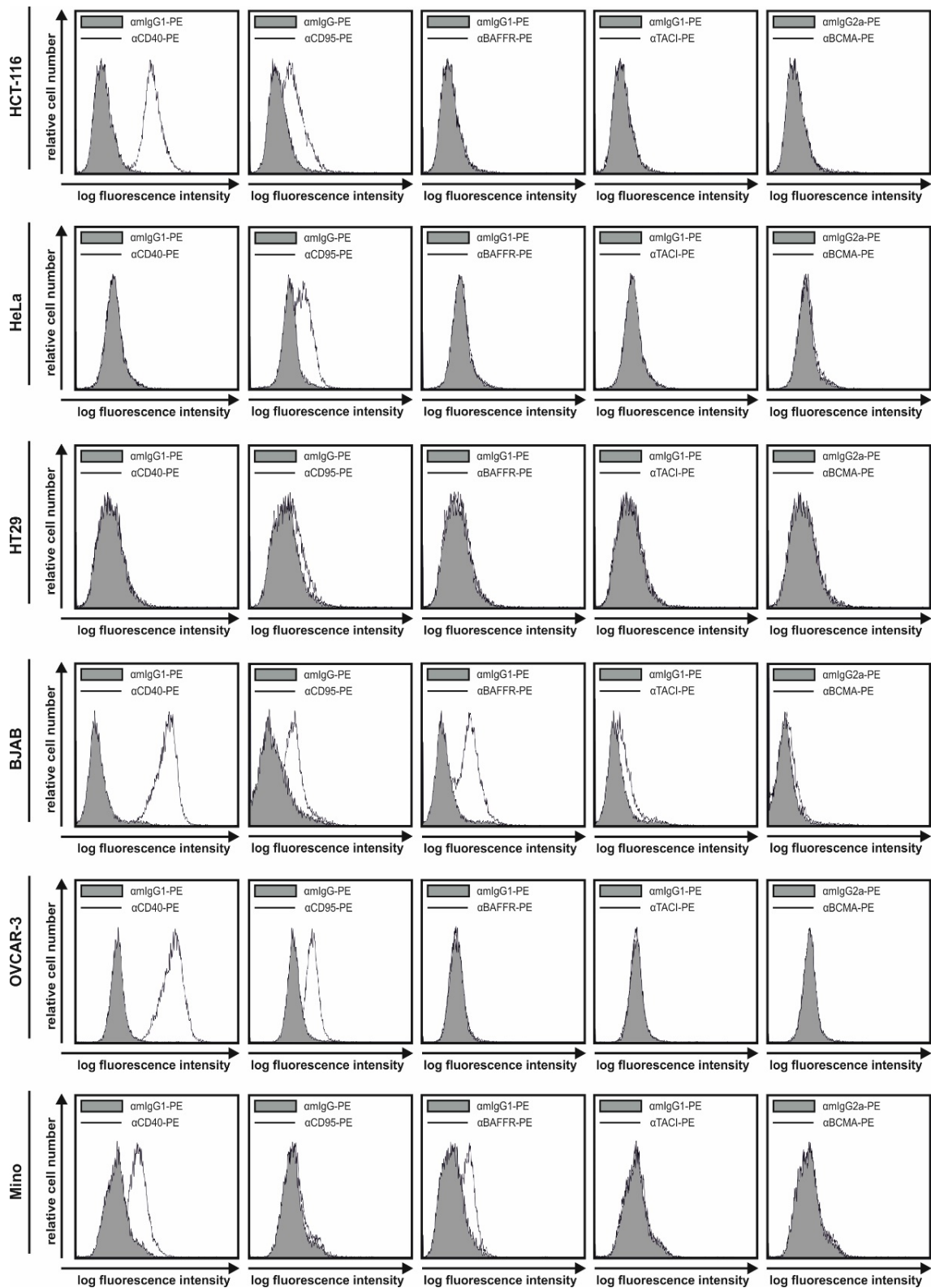
Fortsetzung Abb. S 1.



Fortsetzung Abb. S 1.

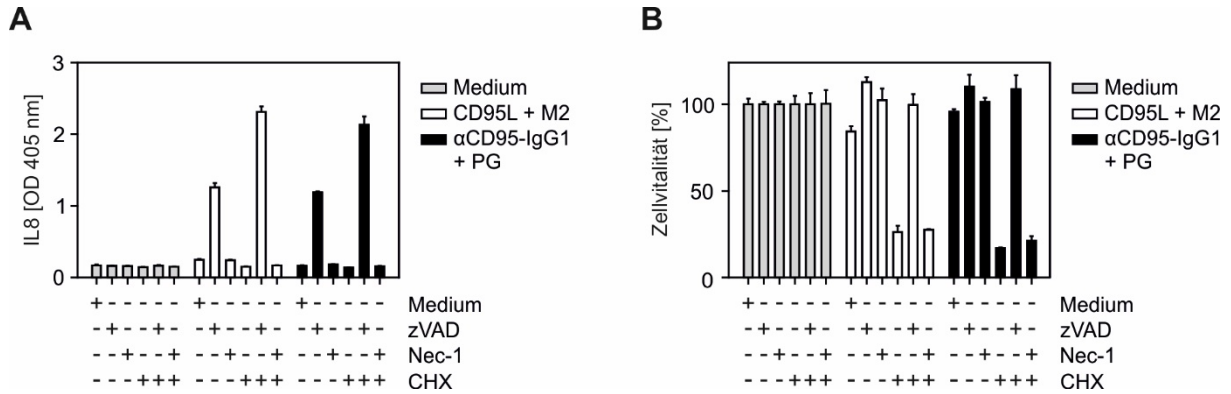


Fortsetzung Abb. S 1.



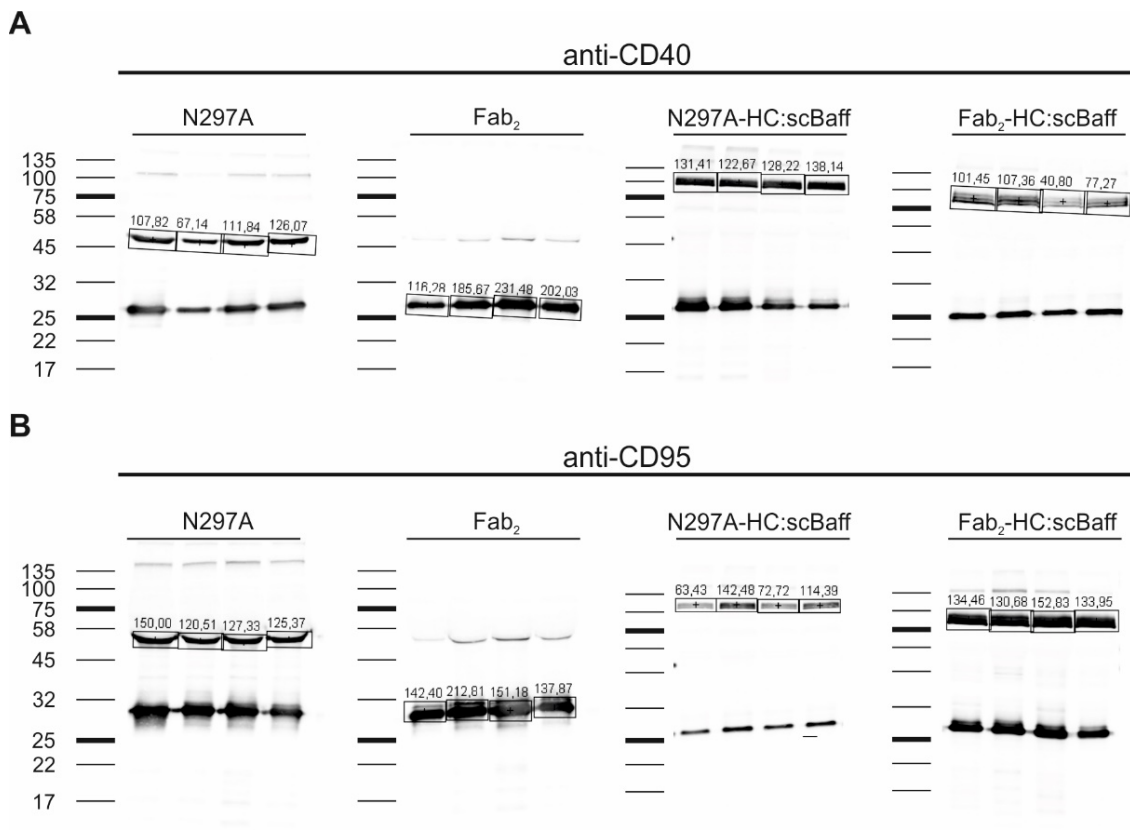
Fortsetzung Abb. S 1.





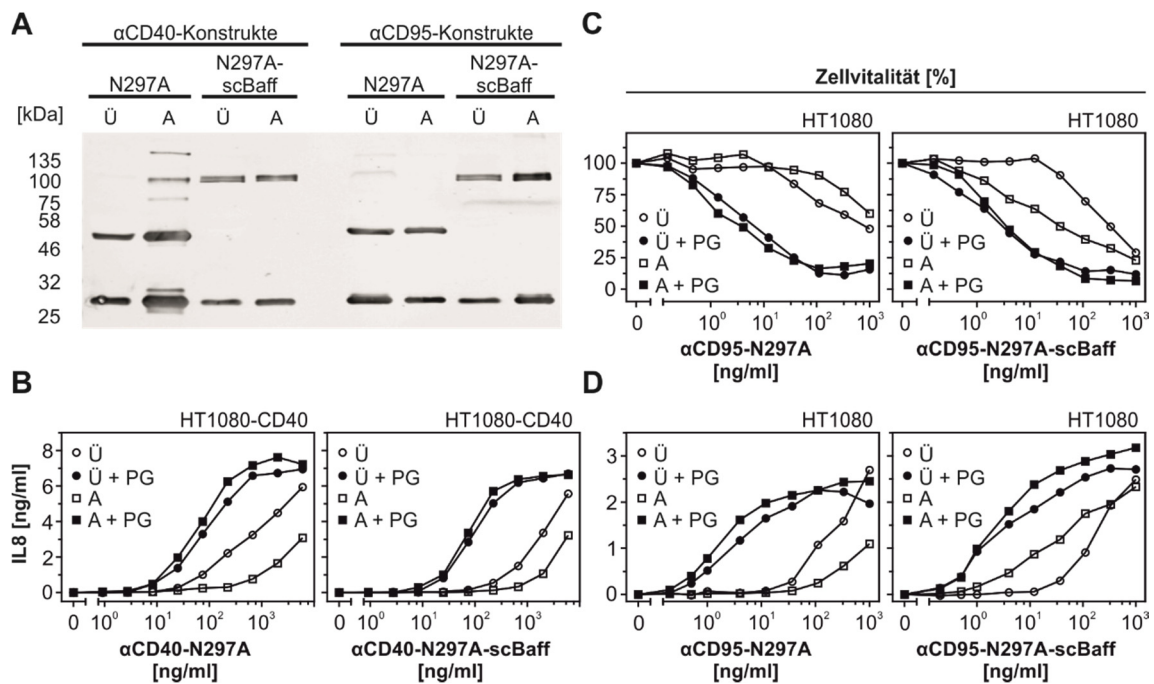
**Abb. S 2:** Die untersuchten HT1080 Zellen benötigen zur Untersuchung der NF-κB-Aktivierung nach CD95-Stimulation eine Vorbehandlung mit zVAD, während sie für die Analyse der Zelltod-induktion eine CHX-Vorinkubation benötigen.

(A, B) HT1080 Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit Medium, 20 μM zVAD, 90 μM Nec-1, 2,5 μg/ml CHX oder einer Kombination aus den angegebenen Konzentrationen von CHX+zVAD bzw. CHX+Nec-1 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml CD95-Ligand, der zuvor mit 1 μg/ml anti-Flag M2 quervernetzt wurde, mit 100 ng/ml αCD95-IgG1-Antikörper, der vorab mit 1 μg/ml Protein G quervernetzt wurde, oder einer Medium-Kontrolle stimuliert. Am nächsten Tag wurde die IL8-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt (A) oder die Zellvitalität anhand einer Kristallviolett-Färbung evaluiert (B).



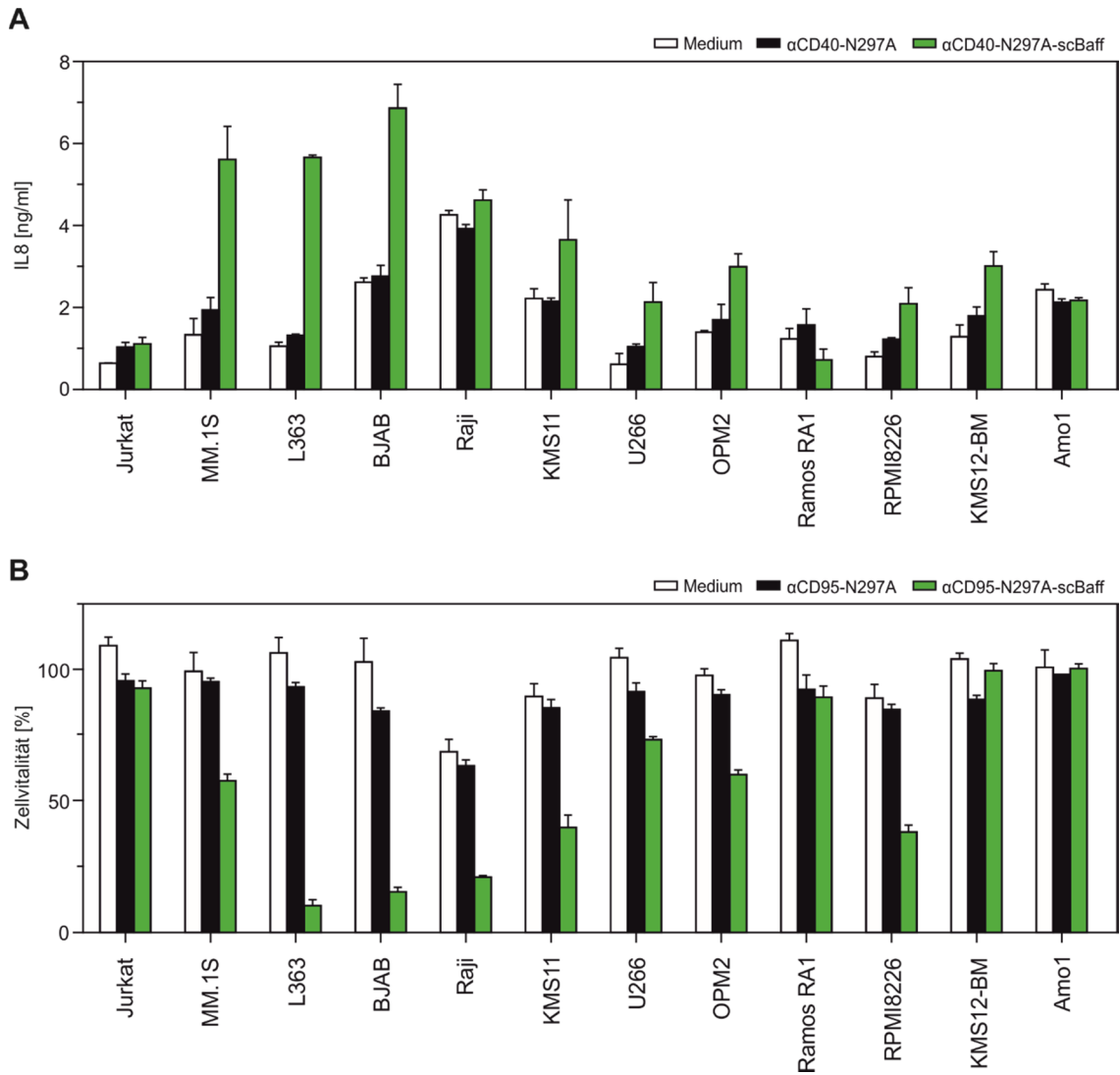
**Abb. S 3:** Western Blots der produzierten Antikörper- und Antikörper-Fusionsprotein- Zellkulturüberstände.

15 μl Überstand der angegebenen Antikörper-Varianten bzw. -Fusionsproteine gemischt mit 5 μl 4x Laemmli-Puffer wurden auf SDS-Gele aufgetragen. Es wurden vier voneinander unabhängig produzierte Überstände analysiert und die Konzentration anhand der ermittelten Bandenintensität gegenüber eines parallel aufgetragenen Proteinstandards ermittelt.



**Abb. S 4:** Die  $\alpha$ CD40-Antikörper-Konstrukte zeigten nach Aufreinigung ein optimiertes therapeutisches Fenster, wohingegen die aufgereinigte  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff-Fusion ein gesteigertes Maß an Quervernetzungs-unabhängiger Aktivität offenbarte.

(A) 200 ng der Zellkulturüberstände bzw. des aufgereinigten Eluats der CD40- bzw. CD95-spezifischen N297A- und N297A-scBaff-Variante wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Konzentration mittels anti-Flag Western Blot verglichen. (B) HT1080-CD40 Zellen wurde mit steigenden Konzentrationen des  $\alpha$ CD40-N297A-Antikörpers sowie des  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff-Antikörper-Fusionsproteins stimuliert. Hierbei wurde das jeweilige Konstrukt aus dem Zellkulturüberstand („Ü“) mit dem entsprechenden Konstrukt nach der Aufreinigung („A“) mit und ohne vorhergehende Quervernetzung mit 1  $\mu$ g/ml Protein G funktionell verglichen, indem die IL8-Sekretion mittels IL8-ELISA quantifiziert wurde. (C,D) HT1080 Zellen wurden mit 2,5  $\mu$ g/ml CHX (C) bzw. 20  $\mu$ M zVAD und 2,5  $\mu$ g/ml CHX (D) vorinkubiert und mit steigenden Konzentrationen an  $\alpha$ CD95-N297A bzw.  $\alpha$ CD95-N297A-scBaff stimuliert. Dabei wurden wie unter „B“ beschrieben die Zellkulturüberstände und die aufgereinigten Produkte mit und ohne Quervernetzung miteinander verglichen. Am nächsten Tag wurde die CD95-Aktivierung über die Abnahme der Zellvitalität via Kristallviolett-Färbung und die sekretierte IL8-Konzentration (D) bestimmt.



**Abb. S 5:** Ein Großteil der Baffr-/BCMA-/TACI-positiven Tumor-Zelllinien führt nach Kultivierung mit  $\alpha$ CD40-/ $\alpha$ CD95-scBaff-Antikörper-Fusionsproteinen zu einer Verankerungsdomänen-abhängigen Potenzierung der CD40- und/oder CD95-Aktivierung in den Effektorzellen.

(A) HT1080-CD40 Zellen wurden in Triplikaten ausgesät, mit der angegebenen Tumor-Zelllinie ko-kultiviert und anschließend mit Medium (weiße Balken), 200 ng/ml  $\alpha$ CD40-N297A (schwarze Balken) oder 200 ng/ml  $\alpha$ CD40-N297A-scBaff (grüne Balken) stimuliert. Am nächsten Tag wurde die IL8-Sekretion mittels ELISA ermittelt. (B) HT1080 Zellen wurden in Triplikaten ausgesät, mit 2,5  $\mu$ g/ml CHX vorinkubiert und anschließend wie unter "A" beschrieben, jedoch mit 20 ng/ml der  $\alpha$ CD95-Varianten, stimuliert. Nach einem Tag wurde die Zellvitalität mittels Kristallviolett-Färbung analysiert.



**Tab. S 1: Auflistung der detektierten Peakanzahl, der *Peak retention time* und dem prozentualen Anteil der jeweiligen Peaks an der Protein-Fraktion.**

Probe	MW [kD]	Peaks [n]	Peaks Retention Time [min]	Anteil Probe 0-11min [%]		
				Peak 1	Peak 2	Peak 3
HPLC Standard	670/ 300/ 150/ 44/ 17/ 0,25	7	6,532/ 7,508/ 8,602/ 9,537/ 10,555/ 11,888/ 12,205			
Flag-Peptid	1	1	11,033			
$\alpha$ CD40-IgG1(N297A)	154	1	7,958	100	-	-
$\alpha$ CD40-Fab2	104	1	9,428	100	-	-
$\alpha$ CD40-IgG1(N297A)-scBaff	258	1	7,218	100	-	-
$\alpha$ CD40-Fab2-scBaff	206	3	5,598/ 7,573/ 8,46	2	12	86

Probe	MW [kD]	Peaks [n]	Peaks [min]	Anteil Probe 0-11min [%]		
				Peak 1	Peak 2	Peak 3
HPLC Standard	670/ 300/ 150/ 44/ 17/ 0,25	7	8,363/ 9,582/ 11,000/ 12,182/ 13,38/ 14,823/ 15,562			
Flag-Peptid	1	1	14,092			
$\alpha$ CD95-IgG1(N297A)	154	1	10,377	100	-	-
$\alpha$ CD95-Fab2	104	2	10,9/ 12,218	21	79	-
$\alpha$ CD95-IgG1(N297A)-scBaff	258	2	7,14/ 9,318	81	19	-
$\alpha$ CD95-Fab2-scBaff	206	3	7,2/ 9,847/ 10,96	14	43	43

**Tab. S 2: Übersicht der ermittelten mittleren effektiven Wirkkonzentrationen sowie der möglichen therapeutischen Fenster ( $EC_{50}$ -Shifts) der CD40- bzw. CD95-spezifischen N297A-Varianten im Vergleich zu den N297A-scBaff-Varianten vor und nach Aufreinigung sowie mit und ohne Protein G-Quervernetzung.**

Fusionsprotein	$EC_{50}$ (ELISA/Zytotoxizität) [ng/ml]		-/+ Protein G Shift (ELISA/Zytotoxizität)
	-	+ Protein G	
<b>Zellkulturüberstände</b>			
$\alpha$ CD40-N297A	806	84	10
$\alpha$ CD40-N297A-scBaff	1821	94	19
$\alpha$ CD95-N297A	120/400	3,5/4	34/100
$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	180/200	3/2	60/100
<b>Aufreinigung</b>			
$\alpha$ CD40-N297A	>6000	65	>92
$\alpha$ CD40-N297A-scBaff	>6000	72,5	>83
$\alpha$ CD95-N297A	>1000/>1000	2,2/1,5	>454/>667
$\alpha$ CD95-N297A-scBaff	72/25	3/3	24/8

## **Eidesstattliche Erklärung/Affidavit**

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung multi-funktioneller TNFRSF Rezeptor-spezifischer Antikörper-Fusionsproteine mit FcγR-unabhängiger Aktivität“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Development of multi-functional TNFRSF-receptor specific antibody fusion proteins with FcγR-independent activity“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

---

Place, Date

---

Signature

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren im Rahmen dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben und damit Anteil an deren Abschluss haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Harald Wajant für die Möglichkeit, diese spannende und herausfordernde Doktorarbeit unter seiner Betreuung in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin am Universitätsklinikum Würzburg durchführen zu dürfen. Seine regelmäßigen Anregungen und die kritische Begleitung sowohl in der experimentellen Labor- also auch während der Schreibphase haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Andreas Beilhack und Prof. Dr. Thomas Dandekar bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie mich stets engagiert als weitere Gutachter dieser Arbeit betreut haben und mich mit zusätzlichen Ideen und Ratschlägen unterstützt haben.

Natürlich möchte ich dem gesamten Team der Abteilung für Molekulare Innere Medizin für die großartige und fröhliche Arbeitsatmosphäre danken. Ihr wart wunderbare Kolleg(inn)en, mit denen ich gut und gerne einen Großteil des Tages verbracht habe. Es gab immer ein offenes Ohr und ein aufmunterndes Wort oder eine helfende Hand.

Meinen großen Dank an diejenigen, die mir das Laborhandwerk gezeigt haben: Daniela Weisenberger und Dr. Daniela Siegmund durch ihre langjährige Erfahrung in der Klonierung bzw. mit diversen Methoden, Tina Rosenthal für die Einarbeitung aus erster Hand durch „Mrs. Western Blot“, für die vielen Gespräche - egal ob wissenschaftlicher oder privater Natur - und ihre aufmunternde und herzliche Art und Dr. Juliane Medler für das Teilen ihres Wissens, ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft und für die vielen lustigen und unterhaltsamen Stunden gemeinsamer Labor- und Schreibtischarbeit. Julie und Tina, ihr beide seid in den letzten Jahren von Kolleginnen zu Freunden geworden, die mich durch diese spezielle Zeit meines Lebens begleitet haben, und diese Freundschaft möchte ich auch in Zukunft nicht missen!

Vielen Dank auch meinen langjährigen Wegbegleitern Dr. Simone Füllsack, Dr. Mohamed Ahmed Mohamed Mohamed Anany ;) und Jennifer Kreckel: Simönchen, danke, für deine (zumeist) unkomplizierte Bench-Partnerschaft und fröhliche Art. Mo, my friend, the chats with you provided the perfect distraction on long working days and always helped to get back to work with a fresh mind. All the best to you and your lovely family! Jenny, du bist zu lieb für diese Welt – bleib bitte so (nur ein bisschen rigoroser)!

Zudem möchte ich mich bei allen Studenten und medizinischen Doktoranden bedanken, die ich während meiner Zeit betreuen durfte. Es hat viel Spaß gemacht, mein Wissen mit euch zu teilen und mit euch zusammenzuarbeiten.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich von ganzem Herzen meiner Familie und meinen Freunden für ihre endlose und uneingeschränkte Unterstützung und den Glauben in mich danken. Ich habe es euch in den letzten Jahren nicht leicht gemacht, aber ihr seid trotzdem immer für mich da gewesen. Es ist toll, euch um mich zu haben. Liebe Schwiegereltern, danke für euren unermüdlichen Einsatz, die vielen Extrawege und -stunden, den warmherzigen Zufluchtsort bei allerlei Widrigkeiten und für euer haarsträubendes, liebgewonnenes Fränggisch. Liebe Eltern, auch jetzt noch gibt es mir viel Kraft, bei euch einen Ort der Geborgenheit vorzufinden, mich eurer Liebe und Unterstützung, eurer Strenge und eures Stolzes sicher zu wissen. Ihr habt mir so viel mehr mit auf den Weg gegeben, als es gewöhnlich zu erwarten gewesen wäre. Dafür kann ich euch nicht dankbar genug sein! Und dann noch meine Mädels: Ihr seid das Wichtigste für mich! Ella, du hast mein Leben jetzt schon so sehr auf den Kopf gestellt, fröhlicher und bunter gemacht... Ich bin so so gespannt wie es weitergeht und freue mich darauf, zu dritt in neue Abenteuer zu starten. Lena... Ohne dich hätte ich mein Leben bis hierhin in vielerlei Sicht nicht geschafft. Wie könnte ich dir für alles, was du für Ella und mich jeden Tag leistest in ein paar schnöden Zeilen danken? Ich finde keine Worte und geb dafür lieber mein Bestes, um es dich wieder und wieder persönlich wissen zu lassen!

## Publikationen

**Nelke J.**, Medler J., Weisenberger D., Beilhack A., Wajant H. (2020) " CD40- and CD95-specific antibody single chain-Baff fusion proteins display BaffR-, TACI- and BCMA-restricted agonism." [Publikation eingereicht](#)

Medler J., **Nelke J.**, Weisenberger D., Steinfatt T., Rothaug M., Berr S., Hünig T., Beilhack A., Wajant H. (2019) "TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcγR-independent agonistic activity." [Cell Death Dis.](#) 4;10(3):224.

Beilhack A., Kums J., **Nelke J.**, Wajant H. (2018) " Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily (TNFRSF) receptor-activating antibody fusion proteins with FcγR-independent agonistic activity (TRAAFFIAA)." [Patent WO2019129644A1.](#)

Kums J., **Nelke J.**, RÜth B., Schäfer V., Siegmund D., Wajant H. (2017). "Quantitative analysis of cell surface antigen-antibody interaction using Gaussia princeps luciferase antibody fusion proteins." [MAbs.](#) 9(3):506-520.

## **Lebenslauf**

**Johannes Nelke**

---

---

---

---

Ort, Datum

---

Unterschrift