

**Analyse von Ursachen, die bei der  
klinischen Prüfung des superagonistischen  
anti-CD28 monoklonalen Antikörpers  
TGN1412 zur Induktion schwerer  
Nebenwirkungen führten**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation**

von

Dipl.-Biol. Linda Yasmin Sender  
geboren am 24.03.1981 in Groß-Gerau

2010

Referent:	Prof. Dr. Ulrich Kalinke
Korreferent:	Prof. Dr. Reinhold Förster
Tag der Promotion:	16.09.2010

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „Analyse von Ursachen, die bei der klinischen Prüfung des superagonistischen anti-CD28 monoklonalen Antikörpers TGN1412 zur Induktion schwerer Nebenwirkung führten“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2009 am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, in Langen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Kalinke angefertigt.

Ich erkläre, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich früher keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Darmstadt, April 2010

---

Linda Y. Sender

*Für Sascha*

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin von Herrn Prof. Dr. Ulrich Kalinke in der Abteilung Immunologie am Paul-Ehrlich-Institut in Langen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Kalinke (seit August 2008 Direktor des TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung in Hannover) für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine fachliche und persönliche Unterstützung und für den Freiraum, den er mir für die Bearbeitung des Projekts zuteil werden ließ, sowie Herrn Prof. Dr. Reinhold Förster für das der Arbeit entgegengebrachte Interesse und die Übernahme des Korreferats.

Ich danke ferner meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Burkhardt Schraven (Otto-Guericke Universität Magdeburg), Prof. Dr. Hartmut Hengel (Universitätsklinikum Düsseldorf), PD Dr. Helmut Jonuleit (Universitätsklinikum Mainz), Prof. Dr. Ingo Bechmann (Universität Leipzig) und Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann (Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main) für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen in den unterschiedlichen Projekten.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Kollegen in der Abteilung Immunologie am Paul-Ehrlich-Institut, insbesondere Herrn Dr. Jan Müller-Berghaus, welcher immer mit Rat und Tat zur Seite stand und sich darüber hinaus nicht nur als Blutspender, sondern auch als ständiger Blutabnehmer zur Verfügung stellte, sowie Herrn Dr. Roland Plesker und seinem Team, durch deren Hilfe immer ausreichend Affenblut für Laborversuche zur Verfügung stand. Nur der umfangreichen und fachgerechten Tierpflege und Mauszucht durch Dorothea Kreuz und die Tierpfleger ist es zu verdanken, dass für die Experimente, insbesondere für die Humanisierung, ausreichend gesunde Mäuse zur Verfügung standen, dafür ein großes Dankeschön. Herrn Kay-Martin Hanschmann danke ich vielmals für die statistische Auswertung der Experimente.

Darüber hinaus danke ich meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen Dr. Elisabeth Kamphuis, Dr. Patricia Bach, Dr. Susanne Röderstein, Dr. Martin König, Dr. Claudia Detje sowie Martina Anzaghe, Theresa Frenz und Elea Conrad für deren Unterstützung, meinen ehemaligen Studenten Katrin Gibbert, Elena Grabski und Sabrina Weißmüller, die durch

ihre Diplomarbeiten wertvolle Beiträge zu dieser Dissertation geleistet haben. Ich danke außerdem Stefanie Bauer, Katja Döring, Sven Flindt und Dr. Thomas Hinz für deren Hilfe.

Zum Abschluss ist es mir eine besondere Freude, mich bei meiner ehemaligen Kollegin und Mentorin Dr. Zoe Waibler zu bedanken, ohne deren Sachverstand, Unterstützung und stetigen Ansporn diese Arbeit nicht entstanden wäre. An dieser Stelle nochmals meinen herzlichen Dank!

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern - Ursula und Walter Sender - und bei meinen Geschwistern - Sina und Thorsten - für ihre Kraft, ihre Liebe und ihre uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die letzten Jahre wären nicht dieselben gewesen ohne meinen Partner Dr. Sascha Semmler, der mit seiner Liebe und Geduld immer für mich da war. Danke für alles.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kurzbeschreibung.....	1
1.2 Abstract .....	2
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
2.1 Das Immunsystem .....	4
2.1.1 Die angeborene Immunität.....	4
2.1.2 Die adaptive (erworbene) Immunität .....	5
2.2 Immunglobuline .....	8
2.2.1 Aufbau und Klassen der Antikörper .....	8
2.2.2 Wirkungen von Antikörpern .....	11
2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper .....	12
2.3 Die Fc-Rezeptoren (FcR) .....	16
2.3.1 Aufbau und Struktur von Fc $\gamma$ R .....	16
2.3.2 Antikörper: Fc $\gamma$ R Interaktion .....	18
2.4 Monoklonale Antikörper in der Therapie.....	19
2.5 Der superagonistische mAk TGN1412 .....	22
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1 Material .....	26
3.1.1 Chemikalien .....	26
3.1.2 Puffer, Lösungen, Medien.....	27
3.1.3 Fc $\gamma$ Rezeptor exprimierende Zellen (Fc $\gamma$ R-Transfektanten).....	28
3.1.4 Antikörper .....	28
3.1.5 Kits .....	29
3.1.6 Geräte .....	30

3.1.7 Verbrauchsmaterialien .....	31
3.1.8 PC-Software .....	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken .....	33
3.2.2 Immunologische Arbeitstechniken .....	37
3.2.3 Molekularbiologische und gentechnische Arbeitstechniken.....	44
3.2.4 Statistik.....	46
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
4.1 Ursachenforschung zur speziesspezifischen Wirkweise des superagonistischen anti-CD28 mAk TGN1412 .....	49
4.1.1 Sequenzvergleich der CD28-Domäne von <i>Homo Sapiens</i> , <i>Macaca fascicularis</i> und <i>Macaca mulatta</i> .....	49
4.1.2 CD28-Abdeckung nach TGN1412-Bindung von T-Zellen .....	52
4.2 Aktivierung von T-Zellen nach Behandlung mit dem mAk TGN1412 .....	57
4.2.1 Calcium-Freisetzung nach Aktivierung der T-Zellen durch TGN1412.....	57
4.2.2 Proliferation von mit TGN1412 stimulierten T-Zellen und Sekretion von Zytokinen .....	59
4.2.3 Zytokinexpression von T-Zellen nach Stimulation mit TGN1412 .....	61
4.3 Kreuzvernetzung des Fc-Teils des mAk TGN1412 .....	64
4.3.1 Fc $\gamma$ R-exprimierende Zellen können die Kreuzvernetzung von TGN1412 vermitteln und dadurch Proliferation von T-Zellen und Sekretion von Zytokinen induzieren. ....	64
4.3.2 B-Zellen induzieren durch Kreuzvernetzung mit ihren Fc $\gamma$ R die Proliferation von T-Zellen sowie die Sekretion von Zytokinen. ....	68
4.4 <i>Ex vivo</i> -stimulierte Tonsillenschnitte mit TGN1412.....	74
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>7 Veröffentlichungen .....</b>	<b>101</b>



## Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren

<b>A</b>	Ala	Alanin	<b>M</b>	Met	Methionin
<b>C</b>	Cys	Cystein	<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure	<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure	<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin	<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>G</b>	Gly	Glycin	<b>S</b>	Ser	Serin
<b>H</b>	His	Histidin	<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin	<b>V</b>	Val	Valin
<b>K</b>	Lys	Lysin	<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>L</b>	Leu	Leucin	<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin

### Sonstige Symbole und Abkürzungen

<b><math>\alpha</math></b>	alpha
<b>A</b>	Adenin; Alanin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADCC</b>	<i>Antibody dependent cell cytotoxicity</i>
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i>
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigen präsentierende Zelle); Allophycocyanan
<b>B-CLL</b>	<i>B cell chronic lymphocytic leukemia</i> (chronisch-lymphatische Leukämie des B-Zelltyps)
<b>BCR</b>	<i>B cell receptor</i> (B-Zell Rezeptor)
<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>C</b>	Cystein; Cytosin
<b>ca.</b>	circa

---

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CIA</b>	Collagen-induzierte Arthritis
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i> (Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle)
<b>CDC</b>	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
<b>CDRs</b>	<i>Complementarity determing regions</i>
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
<b>C<sub>H</sub></b>	<i>Constant domain of heavy chain</i>
<b>CHO cell</b>	<i>Chinese hamster ovary cell</i>
<b>C<sub>L</sub></b>	<i>Constant domain of light chain</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>Cy5 / Cy7</b>	Cychrom5 / Cychrom7
<b>δ</b>	delta
<b>Da</b>	Dalton
<b>DC</b>	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonuclein acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b>ε</b>	epsilon
<b>EAE</b>	Experimentelle Autoimmunencephalomyelitis
<b>ECGM</b>	<i>Endothelial cell growth medium</i>
<b>E.coli</b>	Escherichia coli
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
<b>EMEA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>Et alterii</i> (und andere)
<b>F</b>	Phenylalanin
<b>Fab</b>	<i>Fragment antigen binding</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystallisable</i>
<b>Fc<sub>γ</sub></b>	<i>Fragment crystallisable</i> des IgGs
<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
<b>FcR</b>	Fc Rezeptor

---

<b>FcγR</b>	Fc gamma Rezeptor
<b>FcRn</b>	Neonataler Fc Rezeptor
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>FL4/FL5</b>	Fluoreszenz 4 / Fluoreszenz 5
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead box transcription factor 3</i>
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
<b>γ</b>	gamma
<b>g</b>	Gravitation Erdbeschleunigung; Gramm
<b>G</b>	Guanosin
<b>GAP-DH</b>	G-Dehydrogenase
<b>gDNA</b>	Genomische DNA
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen-co-stimulatorischer Faktor
<b>GPI</b>	Glykosylphosphatidylinositol
<b>Gy</b>	Gray
<b>h</b>	Stunde
<b>HLA-DR</b>	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>HUVEC</b>	<i>Human umbilical endothelial cell</i> (Nabelschnur-Endothelzellen)
<b>I</b>	Isoleucin
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IgG</b>	Immunglobulin des Isotyps G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>Iono</b>	Ionomycin
<b>ITAM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
<b>ITIM</b>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
<b>κ</b>	kappa
<b>k</b>	kilo (1000)
<b>K</b>	Lysin
<b>kbp</b>	Kilo-Basenpaare
<b>Kd</b>	Dissoziationskonstante
<b>kDa</b>	kilo-Dalton
<b>Konz.</b>	Konzentration
<b>λ</b>	lambda

---

<b>I</b>	Liter
<b>L</b>	Leucin
<b>LSR II</b>	<i>Life Science Research II</i>
<b>μ</b>	mikro (1/10 <sup>6</sup> )
<b>m</b>	milli (1/1000); Meter
<b>M</b>	<i>Macaca</i> ; Molar; Methionin
<b>-mab</b>	<i>-monoclonal antibody</i>
<b>mAk</b>	monoklonaler Antikörper
<b>MACS</b>	<i>Magnetig cell sorting</i>
<b>MABEL</b>	<i>Minimal anticipated biological level</i>
<b>Max</b>	Maximum
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
<b>min</b>	Minuten
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>MS</b>	Multiple Sklerosis
<b>n</b>	nano
<b>N<sub>2</sub></b>	Stickstoff
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Natriumazid
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NLR</b>	<i>NOD-like receptor</i> (NOD-ähnliche Rezeptor)
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NOAEL</b>	<i>No observed adverse effect level</i>
<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domains</i>
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OKT3</b>	Orthoclone
<b>%</b>	Prozent
<b>p</b>	pico
<b>PAGE</b>	Poly-Acryl-Gel-Elektrophorese
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere Blutzellen)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
<b>PE</b>	Phycoerythrin

---

<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin 2
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	<i>Potentia hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität)
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<b>p-Wert</b>	<i>power</i> -Wert
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RIG-I</b>	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-like receptors</i> (RIG-I-ähnliche Rezeptoren)
<b>RNA</b>	<i>Ribonuclein acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>rpm</b>	<i>round per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<b>RT</b>	Raumtemperatur; Reverse Transkription
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkultur Medium)
<b>s</b>	Sekunde
<b>s.</b>	siehe
<b>S.</b>	Seite
<b>SSC</b>	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
<b>T</b>	Tyrosin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Taq</b>	Thermophilus Aquaticus DNA-Polymerase
<b>TBE</b>	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
<b>T<sub>H</sub>-Zelle</b>	T-Helfer-Zelle
<b>TFP</b>	Tetrafluorophenyl
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
<b>TPA</b>	Tetra-decanoyl-phorbolacetat
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidin
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TRAIL</b>	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>T<sub>reg</sub></b>	Regulatorische T-Zelle
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>U</b>	<i>Units</i>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>usw.</b>	und so weiter

<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Valin; Volt
<b>V<sub>H</sub></b>	<i>Variable domain of heavy chain</i>
<b>V<sub>L</sub></b>	<i>Variable domain of light chain</i>
<b>v/v</b>	Volumenprozent
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>x</b>	-fach/multipliziert
<b>ζ</b>	zeta
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Kurzbeschreibung

Monoklonale Antikörper (mAk) werden als innovative Arzneimittel zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt. Derzeit befinden sich weltweit mehrere hundert neue mAk in der Entwicklung. Wirkungen und Nebenwirkungen therapeutischer mAk werden einerseits durch die spezifische Bindung der variablen Antikörperanteile an das entsprechende Epitop und andererseits durch Interaktionen der konstanten Anteile (Fc) mit spezifischen Rezeptoren vermittelt. Der CD28-spezifische superagonistische mAk TGN1412 wurde zur Behandlung von Autoimmun- und Tumorerkrankungen entwickelt. TGN1412 wurde als Immunglobulin (Ig) der Subklasse 4 (IgG4) exprimiert, da bekannt war, dass humanes IgG4 nur geringe Interaktionen mit Fc-Rezeptoren eingeht und Fc-vermittelte Interaktionen im Fall von TGN1412 vermieden werden sollten. Obwohl in präklinischen Studien TGN1412 vornehmlich regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) aktivierte und in TGN1412-behandelten nicht-humanen Primaten keinerlei Toxizitätssignale beobachtet wurden, induzierte die Applikation von TGN1412 in einer Phase-I Studie in allen sechs Probanden einen lebensbedrohlichen Zytokinsturm. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wieso in präklinischen Untersuchungen die unerwünschten Eigenschaften von TGN1412 nicht im Vorfeld erkannt werden konnten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass die abgeleitete Aminosäuresequenzen der extrazellulären Anteile und der intrazellulären Signaldomäne von CD28 beim Menschen und bei den getesteten nicht-humanen Primaten identisch sind. Weiterhin zeigte TGN1412 eine vergleichbare CD28-spezifische Bindung auf T-Zellen des Menschen und T-Zellen von nicht-humanen Primaten. Dagegen konnten Unterschiede bei der Signalweiterleitung in TGN1412-stimulierten T-Zellen aus den unterschiedlichen Spezies beobachtet werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die TGN1412-Behandlung aufgereinigter T-Zellen alleine nicht zu einer Stimulation der Zellen führte, sondern zusätzlich eine Kreuzvernetzung der Fc-Anteile notwendig war. Um der Frage nachzugehen, welche Fc $\gamma$ -Rezeptor (Fc $\gamma$ R)-exprimierenden Zellen nach TGN1412-Behandlung die Kreuzvernetzung im Menschen herbeigeführt hatten, wurden TGN1412-behandelte T-Zellen mit verschiedenen Zelltypen co-inkubiert. Interessanterweise führte nicht die Zugabe von Monozyten mit hochaffinem Fc $\gamma$ RI, sondern die von B-Zellen mit niederaffinem Fc $\gamma$ RII zu einer massiven T-Zellaktivierung. Durch Zugabe von Transfektanten, die die extrazellulären Anteile der

verschiedenen humanen Fc $\gamma$ R exprimieren, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Weiterhin konnte in Kulturen von humanen Tonsillenschnitten, in denen verschiedene Immunzelltypen ähnlich wie in einem Immunorgan *in vivo* räumlich zueinander angeordnet sind, gezeigt werden, dass allein die Zugabe von TGN1412 bereits zu einer massiven T-Zellaktivierung führte. Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, dass die im Vorfeld der klinischen Prüfung von TGN1412 erhobenen Daten zu einer Fehleinschätzung der Eigenschaften im Menschen geführt haben. Grund dafür ist, dass T-Zellen aus dem Menschen und aus nicht-humanen Primaten eine unterschiedliche Signalweiterleitung zeigen, dass sich isolierte T-Zellen anders verhalten als T-Zellen im natürlichen Verband sekundärer Immunorgane und dass die Interaktionen von IgG4 mit Fc $\gamma$ R bisher falsch eingeschätzt wurden. Die Ergänzung klassischer zellkulturbasierter Methoden durch Tonsillenschnittkulturen könnte den prädiktiven Wert präklinischer Studien in der Zukunft weiter verbessern und so dazu führen, dass klinische Studien sicherer werden.

Schlagerworte: Immunologie, monoklonale Antikörper, TGN1412

## 1.2 Abstract

Monoclonal antibodies (mAb) are more broadly used in therapy of several diseases. Currently, more than one hundred different new mAb are being developed worldwide. Effects and side-effects of mAb are mediated on the one hand by the specific binding of the epitope and on the other hand by the interaction of the constant part (Fc) of the antibody. The CD28-specific, superagonistic mAb TGN1412 was intended for the treatment of autoimmune and tumor diseases. It is known that immunoglobulins (Ig) of the subclass 4 (IgG4) show only minor interactions with receptors that bind the Fc portion of IgGs. For TGN1412, Fc-mediated interactions should be avoided; therefore TGN1412 was expressed as IgG4. Although in preclinical studies TGN1412 activated predominantly regulatory T cells (T<sub>reg</sub>) and no signs of toxicity were observed in TGN1412-treated non-human primates, the application of TGN1412 in a phase I clinical trial induced a life-threatening cytokine storm in all six probands.



Experiments in this thesis show that the deduced amino acid sequence of the extracellular and intracellular signal domain of CD28 was identical in humans and the tested non-human primates. Furthermore, TGN1412 revealed similar binding to human and non-human primate CD28. In contrast, differences in the signal transduction of TGN1412-treated T cells derived of the different species could be observed. Moreover, it was shown that treatment of T cells with TGN1412 alone did not induce stimulation of T cells and that in addition, cross linking of the Fc part was necessary. To answer the question which Fc $\gamma$  receptor (Fc $\gamma$ R)-expressing cell type induced cross linking *in vivo* upon treatment with TGN1412, TGN1412-treated T cells were co-incubated with different cell types. Interestingly, addition of monocytes expressing the high affinity receptor Fc $\gamma$ RI did not induce T cell activation, whereas B cells expressing the intermediate affinity receptor Fc $\gamma$ RII induced massive T cell activation. The usage of transfectants expressing extracellular parts of human Fc $\gamma$ R for cross linking confirmed these results. Furthermore, in culture of human tonsil slices, in which immune cells are arranged comparable to immune organs *in vivo*, the addition of TGN1412 alone induced a massive T cell activation without any exogenously added cross linker. The usage of cell culture tests in combination with human tonsil slice cultures could improve preclinical models in the future.

Keywords: Immunology, monoclonal antibodies, TGN1412

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Immer wieder sind wir zahlreichen Pathogenen ausgesetzt, gegen die unser Immunsystem ankämpfen muss. Diese Abwehr erfolgt durch die intrinsische, die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität. Zusammen wirken diese Komponenten, um uns vor Pathogenen zu schützen (Beutler, 2004; Takeda und Akira, 2005). Darüber hinaus besitzt das Immunsystem die außergewöhnliche Eigenschaft, ein in der Regel lebenslanges Gedächtnis für Infektionen aufrecht zu erhalten, so dass es bei Reinfektionen mit demselben Erreger einer zuvor überstandenen Erkrankung zu keinen oder zu abgemilderten Symptomen kommt.

#### 2.1.1 Die angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem dient der ersten und schnellen Abwehr verschiedenster Pathogene. Allerdings kann das angeborene Immunsystem Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen. Weiterhin ist es nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Zu den Zellen, die wesentlich zu der angeborenen Immunität beitragen, gehören die drei Granulozytenarten Eosinophile, Basophile und Neutrophile, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die dendritischen Zellen (DC) und die Makrophagen. Diese Immunzellen eliminieren unspezifisch Pathogene und infizierte Zellen über Phagozytose oder die Zerstörung infizierter Zellen. Ausgangspunkt einer jeden Immunantwort ist dabei die Erkennung von allgemein vorkommenden Strukturen bestimmter Pathogengruppen durch unveränderliche, keimbahncodierte Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRR) des angeborenen Immunsystems (Janeway, Jr., 1989). Zu den PRRs gehören die sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like-receptors: TLR*) (Medzhitov *et al.*, 1997; Akira *et al.*, 2001), die *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)-ähnlichen Rezeptoren (RLR) (Samuel, 2007), die C-Typ lektin-ähnlichen Rezeptoren (*C-type lectin-like receptors: CLR*s) (Natarajan *et al.*, 2002) sowie die *nucleotide-binding oligomerization domains* (NOD)-ähnlichen Rezeptoren (NLR) (Beutler *et al.*, 2007; Samuel, 2007; Ting *et al.*, 2010). Einige dieser Rezeptoren werden auf der äußeren Zellmembran exprimiert, andere intrazellulär auf endosomalen Membranen oder im Zytoplasma. Die PRRs sind in der Lage, auf die gesamte Bandbreite von Pathogenen zu

reagieren, indem sie spezifische Strukturen erkennen. Solche Strukturen können z.B. DNA- oder RNA-Motive sein und werden als pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*: PAMPs) bezeichnet (Hoebe *et al.*, 2004). Die Erkennung von PAMPs führt über verschiedene Signalwege zu einer Aktivierung der oben genannten Zellen. Dies führt u.a. zu einer erhöhten Expression von co-stimulatorischen Molekülen, einer verstärkten Sekretion von Zytokinen sowie zur verstärkten Expression des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (*major histocompatibility complex*: MHC) (Iwasaki und Medzhitov, 2010; Kawai und Akira, 2006; Takeda und Akira, 2003).

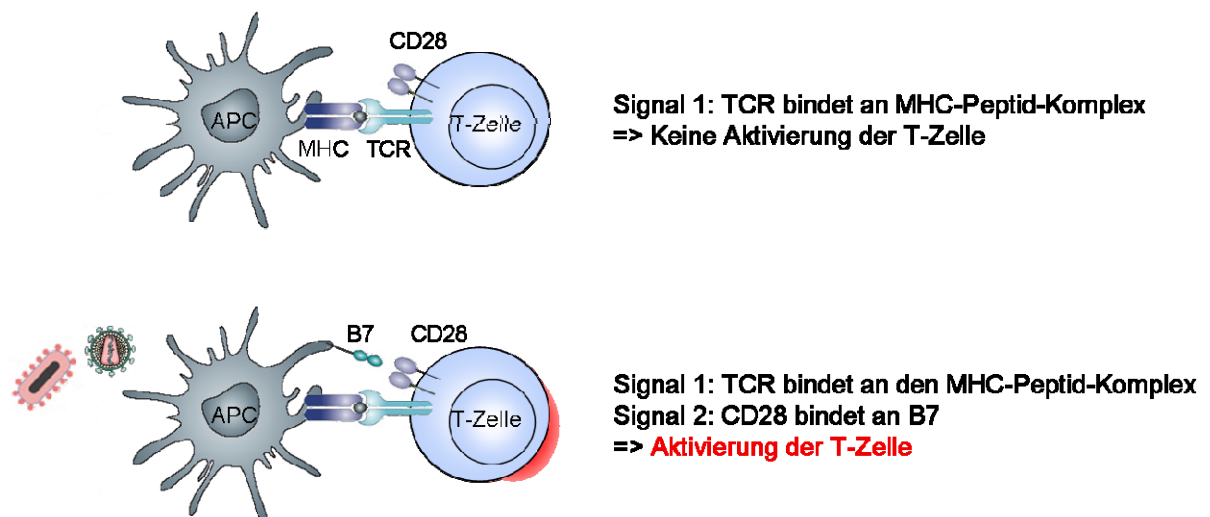
### 2.1.2 Die adaptive (erworbene) Immunität

Einen spezifischen Schutz vor Pathogenen sowie die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses vermittelt das adaptive Immunsystem. Es lässt sich in die zelluläre und die humorale Immunität einteilen. T-Lymphozyten (T-Zellen) oder B-Lymphozyten (B-Zellen) sind in der Lage, über ihre T-Zellrezeptoren (TCR) bzw. B-Zellrezeptoren (BCR) Antigene zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen (Takeda und Akira, 2005). Alle Immunzellen haben gemeinsame hämatopoetische Vorläuferzellen, die im Knochenmark entweder zu myeloiden oder zu lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren sich die T-Zellen und die B-Zellen (Geissmann *et al.*, 2010). T-Vorläuferzellen wandern in den Thymus ein, in dem die Differenzierung zu T-Zellen und das Rearrangement des TCRs stattfinden. Nach positiver und negativer Selektion (Singer und Koretzky, 2002) verlassen reife T-Zellen den Thymus und wandern in die sekundären lymphatischen Organe. So genannte antigenpräsentierende Zellen (APC) wie z.B. dendritische Zellen (DC) sind in der Lage, Pathogene aufzunehmen und Proteinfragmente auf oberflächlich exprimierten MHC Molekülen zu präsentieren (Steinman *et al.*, 1974). Die T-Zelle erkennt mit dem spezifischen TCR diese Proteinfragmente in Kombination mit dem MHC. Zytotoxische T-Zellen mit dem Oberflächenmarker (*cluster of differentiation*) CD8 interagieren mit MHC I, welches auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu binden T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) mit dem Oberflächenmarker CD4 MHC II-Moleküle, die auf APCs exprimiert werden. Zytotoxische T-Zellen setzen nach Kontakt mit einem Antigen Zytokine frei und sind in der Lage, in infizierten Zellen über unterschiedliche Signalwege den programmierten Zelltod auszulösen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen von allen kernhaltigen Zellen auf MHC I-Molekülen präsentiert werden. T<sub>H</sub>-Zellen hingegen

reagieren auf Antigene, die ihnen auf MHC II-Molekülen präsentiert werden, und helfen den B-Zellen bei ihrer Teilung, Differenzierung und Produktion von Antikörpern. Des Weiteren unterstützen T<sub>H</sub>-Zellen sowohl Phagozyten bei der Zerstörung von Pathogenen als auch zytotoxischen T-Zellen. Neben den Co-Rezeptoren CD4 und CD8 existieren noch weitere Co-Rezeptoren wie z.B. CD3, welcher mit dem TCR als Komplex Signale ins Zellinnere weiterleitet (Germain und Margulies, 1993; Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Rudolph *et al.*, 2006; Takeda und Akira, 2005). Innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterscheidet man verschiedene Subtypen, die als T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>9, T folliculäre Helfer (T<sub>fh</sub>)-Zellen und regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) bezeichnet werden. T<sub>H</sub>1-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet, produzieren große Mengen IFN- $\gamma$  und kontrollieren die Eliminierung von intrazellulären Pathogenen. Dagegen exprimieren T<sub>H</sub>2-Zellen den Transkriptionsfaktor GATA-3, sekretieren insbesondere Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-13 und sind für die Beseitigung von extrazellulären Pathogenen verantwortlich (Bettelli *et al.*, 2007; Marks *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010). Erst kürzlich wurden T<sub>H</sub>17-Zellen als ein Subtyp identifiziert, welcher nach Stimulation mit IL-23 große Mengen an IL-17, IL-22 und IL-6 produziert. T<sub>H</sub>17-Zellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren TAT3, ROR $\gamma$ t und ROR $\alpha$  und begünstigen *in vivo* und *in vitro* inflammatorische Prozesse (Bettelli *et al.*, 2007; Korn *et al.*, 2009; Marks *et al.*, 2009; Tato *et al.*, 2006). Dabei unterstützt das Zytokin IL-23 die Proliferation von T<sub>H</sub>17-Zellen. Im Gegensatz dazu induziert die Kombination aus den Zytokinen IL-6 und TGF- $\beta$  die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen aus naiven T-Zellen (Bettelli *et al.*, 2007; Marks *et al.*, 2009). CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche konstitutiv den Oberflächenmarker CD25 und intrazellulär den Transkriptionsfaktor FoxP3 (*forkhead box transcription factor 3*) exprimieren (Feuerer *et al.*, 2009; Sakaguchi, 2005), weisen regulatorische Funktionen auf und werden als T<sub>regs</sub> bezeichnet. T<sub>regs</sub> haben die Funktion, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren und somit die Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu verhindern (Bettelli *et al.*, 2007; Fontenot und Rudensky, 2005; Marks *et al.*, 2009; Shevach, 2000). Es existieren sowohl natürlich vorkommende T<sub>regs</sub>, die direkt aus Vorläuferzellen des Thymus gebildet werden (Sakaguchi, 2005), sowie induzierte T<sub>regs</sub>, Tr1-Zellen und T<sub>H</sub>3-Zellen, deren Differenzierung aus peripheren T<sub>H</sub>-Vorläuferzellen durch ein bestimmtes Zytokinmilieu induziert wird (Bettelli *et al.*, 2007; Faria und Weiner, 2006; Wan und Flavell, 2006). In Gegenwart des Zytokins *transforming growth factors*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wird die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 induziert,

wodurch die Differenzierung von  $T_{\text{regs}}$  unterstützt wird. IL-6 hingegen, welches u.a. von  $T_{\text{H}}17$ -Zellen gebildet wird, inhibiert die TGF- $\beta$ -induzierte Foxp3-Expression und führt somit zur Ausbildung von  $T_{\text{H}}17$ -Zellen (Bettelli *et al.*, 2007; Marks *et al.*, 2009; Sakaguchi, 2005; Zhu *et al.*, 2010). TGF- $\beta$  ist nicht nur ein Schlüsselzytokin, welches die Differenzierung von  $T_{\text{regs}}$  und  $T_{\text{H}}17$ -Zellen bestimmt, sondern ist auch in der Lage, einen weiteren neuen T-Zellsubtyp zu induzieren, der große Mengen an IL-9 produziert und als  $T_{\text{H}}9$ -Zellen bezeichnet wird. Generell wird IL-9 auch von  $T_{\text{H}}2$ -Zellen sekretiert und spielt bei der Unterdrückung von Wurminfektionen und Asthma eine Rolle. TGF- $\beta$  induziert die Abnahme des  $T_{\text{H}}2$  spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 und führt so zur Ausbildung von  $T_{\text{H}}9$ -Zellen (Soroosh und Doherty, 2009; Veldhoen *et al.*, 2008).

In der Peripherie werden Pathogene von APCs aufgenommen. Dadurch reifen die APCs, exprimieren verstärkt MHC II sowie die co-stimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) und wandern in die dränierenden Lymphknoten. Dort präsentieren die APCs den Lymphozyten das prozessierte Antigen. Antigen-spezifische T-Zellen erkennen in der T-Zellzone des Lymphknotens den von APCs präsentierenden MHC II-Peptidkomplex (Signal 1). Diese Interaktion allein führt zu keiner Aktivierung der T-Zelle (Abb. 2.1, oben).



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Aktivierung von T-Zellen.** Die Aktivierung der T-Zelle erfordert zwei Signale. Die Bindung des MHC-Peptid-Komplexes an den TCR bildet das erste Signal. Durch die Anwesenheit eines Gefahrensignals wie z.B. eines Pathogens kommt es zur Induktion von B7, welches mit CD28 auf der T-Zelle interagiert und so das zweite Signal vermittelt (adaptiert von (Schneider und Kalinke, 2007)).

Zusätzlich zum Signal 1 muss für die vollständige Aktivierung der T-Zelle die Co-Stimulation über das konstitutiv exprimierte Oberflächenmolekül CD28 mit B7-1 und/oder B7-2 (Signal 2) auf der APC erfolgen (Abb. 2.1, unten). Nach Aktivierung proliferieren  $CD4^+$  T-Zellen und differenzieren in  $T_H$ -Zellen, welche mit Antigen-spezifischen B-Zellen in Kontakt treten.

Während T-Zellen die zelluläre Immunität vermitteln, tragen die B-Zellen zur humoralen Immunität bei. Die Bildung und Differenzierung der B-Zellen findet im Knochenmark statt. Reife B-Zellen zirkulieren und wandern in sekundäre lymphatische Organe ein. Die Bindung von Antigen über den BCR aktiviert die B-Zellen, die anschließend zu Plasmazellen und zu Gedächtniszellen differenzieren. Die Plasmazellen wandern ins Knochenmark ein und produzieren dort Antikörper (MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996). Die sekretierten Antikörper besitzen nahezu die gleiche Spezifität wie der BCRs und induzieren meist eine lebenslange Immunität (Harwood und Batista, 2010).

## 2.2 Immunglobuline

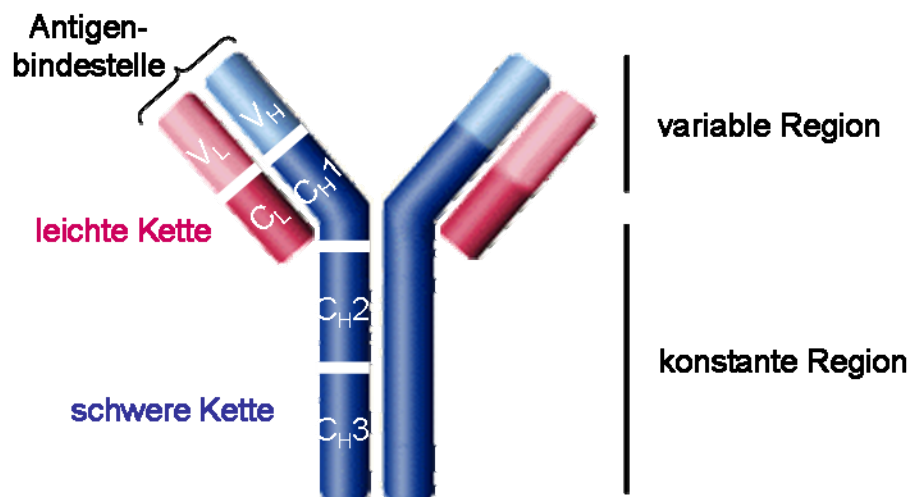
Von B-Zellen gebildete Immunglobuline decken ein breites Spektrum verschiedenster Antigen-spezifitäten ab, wobei jede B-Zelle in der Regel nur eine einzige Spezifität exprimiert. Der Mensch besitzt ein Repertoire von mehr als  $10^{11}$  verschiedenen Antikörpermolekülen (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). Der BCR wird auf B-Zellen als membrangebundenes Immunglobulin (Ig) M und IgD der identischen Spezifität exprimiert. Neben der Antigen-bindenden, membranständigen Komponente ist der BCR weiterhin aus einer  $Ig\alpha/\beta$ -Domäne aufgebaut, welche intrazellulär das Signal weitergibt (Harwood und Batista, 2010). Lösliches IgM zeigt in der Regel eine geringere Affinität als die anderen Ig. Ausdifferenzierte B-Zellen (Plasmazellen) bilden Ig mit fast derselben Spezifität, welche entweder membranständig vorliegen oder als Antikörper sezerniert werden und im flüssigen Bestandteil des Blutes (Plasma) sowie in weiteren extrazellulären Flüssigkeiten vorkommen (Lux *et al.*, 2010).

### 2.2.1 Aufbau und Klassen der Antikörper

Alle Antikörper haben eine ähnliche Grundstruktur, und man fasst sie unter der Bezeichnung Immunglobuline (Ig) zusammen. Sie unterscheiden sich aufgrund ihrer Struktur, ihrer biologischen Aktivität und ihrer Verteilung im Körper. Generell können Antikörper in zwei Bereiche eingeteilt werden: die Fab (*fragment antigen binding*)-

Fragmente, welche spezifisch über die variable Region das Epitop binden, und den Fc (*fragment crystallisable*)-Teil, der wichtig für die Vermittlung von Effektorfunktionen ist (Hansel *et al.*, 2010). Antikörper bilden somit eine Verbindung zwischen der Detektion und Bindung von Pathogenen und der Bindung an Zielzellen, die zur Eliminierung des Pathogens bzw. der infizierten Zelle beitragen.

Alle Antikörper besitzen eine ähnliche Struktur und bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (ca. 50 kDa) und zwei identischen leichten Ketten (ca. 25 kDa). Diese sind über kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft und liegen als Tetramer vor (Abb. 2.2; (Woof und Burton, 2004)). Die beiden schweren Ketten sind bei IgA, IgD und IgG über eine so genannte flexible Gelenk (*hinge*)-Region miteinander verbunden (Arnold *et al.*, 2007). Die leichte Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne ( $V_L$  und  $C_L$ ), die schwere Kette auch aus einer variablen und drei (IgA, IgD und IgG) bzw. vier (IgM und IgE) konstanten Domänen ( $V_H$  und  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  bzw.  $C_{H4}$ ). Die variablen Teile der schweren und der leichten Kette bilden zusammen die Antigenbindestelle, so dass beide Ketten zur Spezifität des Antikörpers beitragen. Es gibt zwei Typen von leichten Ketten, die Lambda ( $\lambda$ )- und Kappa ( $\kappa$ )-Kette, wobei ein Immunglobulin entweder nur  $\lambda$ - oder nur  $\kappa$ -Ketten besitzt (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002).



**Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines Antikörpers** (adaptiert von (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002)). Ein Antikörper besteht aus zwei schweren Ketten (blau) und zwei leichten Ketten (rot). In hell ist die variable Region dargestellt, mit der der Antikörper spezifisch sein Epitop bindet.

Die Klasse und damit Effektorfunktion eines Antikörpers wird durch die schwere Kette festgelegt. Man unterscheidet innerhalb der Gruppe der Immunglobuline fünf verschiedene Klassen (Isotypen): IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Sie bestimmen die funktionelle Aktivität eines Antikörpermoleküls. Die schweren Ketten werden hierbei mit den entsprechenden griechischen Buchstaben bezeichnet:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  und  $\epsilon$ . Der häufigste vorkommende Antikörper ist IgG und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Pathogenen. IgG wird beim Menschen in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 eingeteilt (Edelman, 1972; Lux *et al.*, 2010).

Jede B-Zelle beginnt mit der Expression von IgM und IgD als B-Zellrezeptor und sekretiert diesen als Antikörper bei einer Immunantwort. IgM und IgD werden auf der Oberfläche der B-Zellen co-exprimiert, wobei IgD seltener als die übrigen Ig sekretiert wird. Die Funktion von IgD ist noch nicht vollständig bekannt. Während die meisten Immunglobuline als Monomer vorliegen, kommen im Serum IgM und IgA als Pentamer bzw. Dimer vor.

Die variable Region der schweren Kette ist durch drei unterschiedliche Gensegmente codiert, die man als V (*variable* für variabel)-, D (*diversity* für Vielfalt)- und J (*joining* für verbindend)-Gen-Segmente bezeichnet. Zunächst wird ein D-Gen-Segment mit einem J-Gen-Segment verknüpft. Anschließend lagert sich ein V-Gen-Segment an die DJ-Sequenz an, so dass ein vollständiges Exon für die variable Region der schweren Kette entsteht. Die Verbindung der zusammgebauten V-Region-Sequenz mit dem benachbarten C-Region-Gen erfolgt durch RNA-Spleißen. Die variable Region der leichten Kette wird hingegen nur durch V- und J-Gen-Segmente gebildet. Alle Nachkommen einer B-Zelle exprimieren zunächst dieselben zusammengesetzten V-Gene, da die Exons der variablen Region bereits während der frühen Entwicklungsphase im Knochenmark festgelegt werden. Der konstante Teil der schweren Kette enthält mehrere C-Regionen hintereinander, wobei jede Region einem anderen Isotyp entspricht. Nach Aktivierung reifer, naiver B-Zellen kann ein Ig-Klassenwechsel stattfinden. Dabei wird auf genomischer Ebene die VDJ-Sequenz der schweren Kette über repetitive Sequenzen von einer C-Region zu einer anderen C-Region rekombiniert. Eine Ausnahme bildet hier das  $\delta$ -Gen. Die dazwischenliegende DNA wird deletiert. Dadurch kann dieselbe zusammengesetzte V-Region in verschiedenen Isotypen exprimiert werden. Unterschiede in der Effektorfunktion ergeben sich somit nur über den konstanten Anteil der unterschiedlichen Isotypen. Dieser Klassenwechsel findet nicht während der B-Zell-

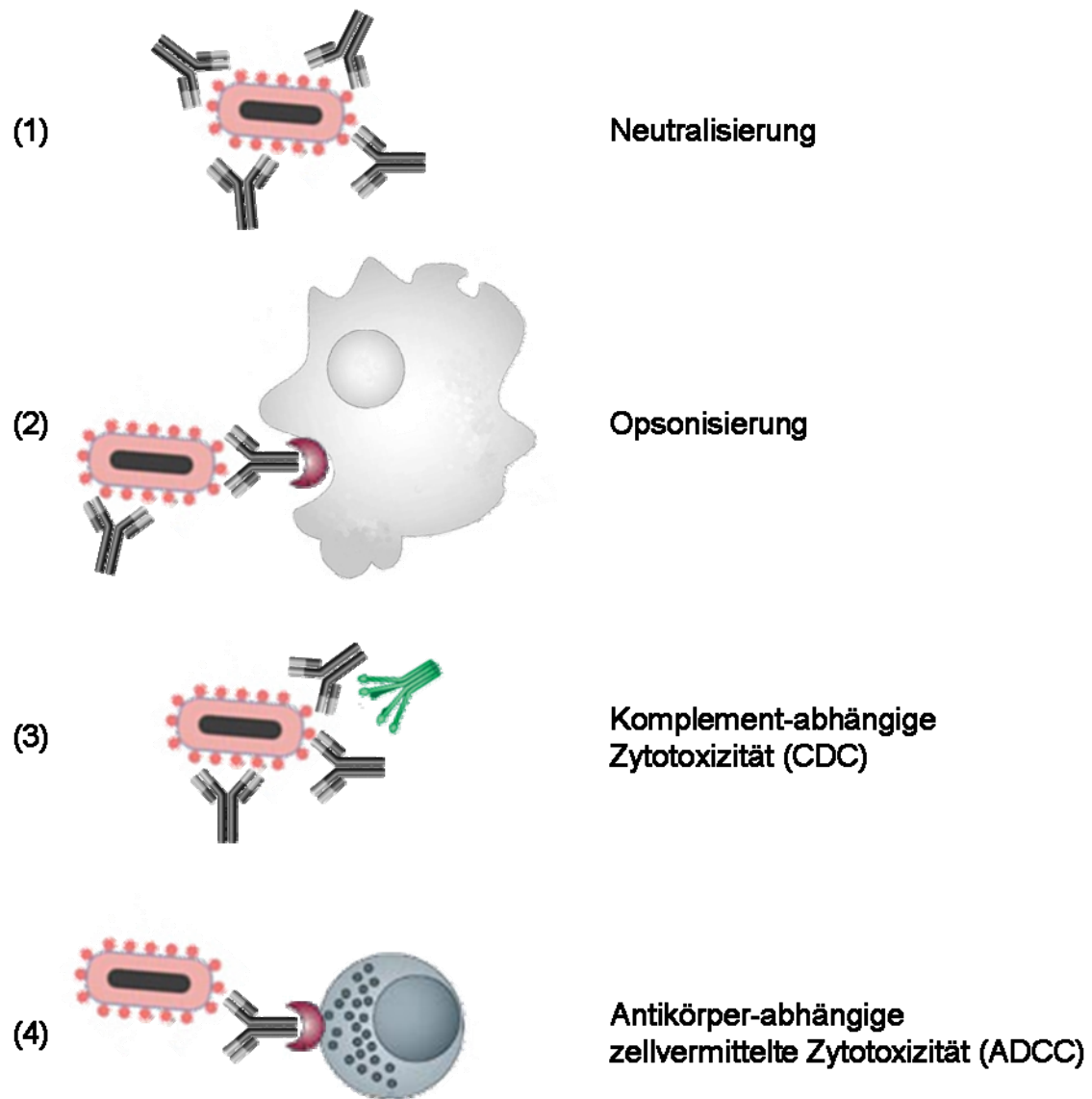


Entwicklung im Knochenmark statt, sondern wird im Verlauf einer Immunantwort durch externe Signale wie z.B. freigesetzte Zytokine von T-Zellen, co-stimulatorische Signale durch CD40:CD40L Interaktionen oder auch durch von Pathogenen stammenden Signalen im Knochenmark reguliert (Holländer GA, 2006).

### **2.2.2 Wirkungen von Antikörpern**

Antikörper sind Effektoren der humoralen Immunantwort. Hierfür müssen sie in der Lage sein, eine stabile Bindung mit dem Antigen einzugehen und weitere Reaktionen des Immunsystems zur Eliminierung des Antigens zu vermitteln. Diese Anforderung spiegelt sich in der Struktur des Antikörpers wider (Abb. 2.2). Mit der variablen Region des Fab-Teils bindet der Antikörper spezifisch das Antigen. Weiterhin kann der Antikörper indirekt über seine konstante Region wirken, indem er festlegt, wie das Antigen mithilfe des Antikörpers beseitigt wird.

Antikörper können auf unterschiedliche Arten an der Immunabwehr beteiligt sein (Abb. 2.3). Der Vorgang der Neutralisation (1) ist die einfachste Reaktion und erfolgt über die direkte Bindung des Pathogens, um dessen Wechselwirkung mit seiner Zielzelle zu blockieren. Eine weitere Aufgabe der Antikörper ist es, Pathogene, die sich außerhalb der Zelle vermehren, für deren Eliminierung detektierbar zu machen. Das Pathogen wird über die variable Region des Antikörpers gebunden. Über die konstante Region des Antikörpers interagieren Phagozyten mit dem Pathogen, können es aufnehmen und abbauen. Dieser Vorgang wird als Opsonisierung (2) bezeichnet. Des Weiteren können Antikörper das Komplementsystem (3) aktivieren, indem sie als Rezeptor für das erste Komplementprotein fungieren und dadurch den klassischen Weg des Komplementsystems einleiten (Komplement-abhängige Zytotoxizität; *complement-dependent cytotoxicity*; CDC). Außerdem können Antikörper über ihren Fc-Teil die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell cytotoxicity*; ADCC) auslösen (Hansel *et al.*, 2010; Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002).



**Abbildung 2.3: Die humorale Immunantwort wird durch Antikörper vermittelt.** In 1-4 sind die verschiedenen Funktionen von Antikörpern dargestellt: (1) Neutralisation, (2) Opsonisierung, (3) Aktivierung des Komplementsystems und (4) Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität.

### 2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) stellt einen Meilenstein in der Immunologie dar und umfasst mehrere Schritte. Zunächst erfolgt eine Immunisierung z.B. einer Maus mit einem Antigen, gegen das der herzustellende mAk gerichtet sein soll, so dass dadurch Antigen-reaktive B-Zellen expandieren und zu Plasmazellen differenzieren. Es werden von den B-Zellen vorwiegend IgM Moleküle sekretiert. Nach erneuter Immunisierung mit dem gleichen Antigen kommt es zur schnellen Produktion von

Antikörpern, allerdings mit einem höheren Gehalt an IgG-Molekülen (1. Schritt). Anschließend werden die B-Zellen aus der Milz entnommen (2. Schritt) und mit unsterblichen Myelomzellen mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) fusioniert (3. Schritt). Die so genannten Hybridome sind eine Verschmelzung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen mit Zellen einer sich unbegrenzt teilenden Myelom-Zelllinie, die nicht in der Lage ist, Antikörper zu produzieren. Des Weiteren besitzt die Myelom-Zelllinie einen Defekt des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT), welches für die Umwandlung von Hypoxanthin in Purin notwendig ist. Durch das Fehlen des HGPRT-Enzyms können nur fusionierte Zellen im Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium überleben. Durch die Verschmelzung entstehen hybride Zellen, die unbegrenzt Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren. Diese Hybridomzellen werden in einem nächsten Schritt aus dem Zellgemisch mit unterschiedlich fusionierten Zellen selektioniert (4. Schritt) und entweder über limitierte Verdünnung (*limited dilution*), über klonale Selektion oder mit Hilfe eines Zellfraktionators kloniert (5. Schritt). Anschließend erfolgt die Großproduktion von mAk z.B. in Bioreaktoren oder früher auch in der Bauchhöhlenflüssigkeit (Ascites) von Mäusen: ein Verfahren, das in Deutschland nicht mehr zugelassen ist (Aigner und Neumann, 1997; Kohler und Milstein, 1975; Marasco und Sui, 2007; Strebhardt und Ullrich, 2008). Gewöhnlich werden die aus der Maus stammenden Igs im Körper der Patienten vom humanen Immunsystem als körperfremd erkannt, und es werden Antikörper gegen sie gebildet. Diese mit der Hybridomtechnik hergestellten mAk weisen somit aufgrund ihrer murinen Anteile eine hohe Immunogenität auf. Um diese Immunogenität zu reduzieren (Nissim und Chernajovsky, 2008; Presta, 2008), wurden zunächst chimäre, später humanisierte sowie humane Antikörper in die Therapie eingeführt (Dubel, 2007; Lonberg, 2005). Der erste hergestellte mAk für die Therapie war ein muriner mAk. Die Humanisierung von murinen Antikörpern stellt die älteste Methode der Generierung von therapeutischen mAk dar. Sie wird dennoch des Öfteren angewandt, insbesondere wenn der murine Antikörper sehr gut charakterisiert ist oder wenn komplett humane mAk schwer zu erhalten sind (Marasco und Sui, 2007). Es gibt hervorragende Maus-Myelom-Zelllinien als Fusionspartner. Entsprechende Human-Myelom-Zelllinien existieren noch nicht, bzw. die Herstellung von Hybridomen von humanen B-Zellen funktioniert bisher nicht (Bessler und Baron, 1988).

Bei chimären Antikörpern besteht der konstante Teil des Antikörpers aus humanen Peptidsequenzen, und der variable Teil der Antigen-bindenden Fragmente enthält murine Peptidsequenzen (Abb. 2.4).



**Abbildung 2.4: Aufbau muriner, chimärer, humanisierter und humaner Antikörper.** Im Gegensatz zu komplett murinen Ak ist bei chimären Ak nur noch die variable Region murinen Ursprungs. Bei humanisierten Ak wurde der murine Anteil auf die Bereiche der Antigenerkennung beschränkt.

Um den murinen Anteil weiter zu verringern, wurde der Mausanteil des Antikörpers auf die Bereiche der Antigenerkennung beschränkt, so dass nur noch die Sequenzen der Antigen-bindenden Region (*complementarity determining regions*; CDRs) murinen Ursprungs sind (humanisierte Ak) (Dubel, 2007; Lonberg, 2005). Komplett humane Antikörper haben den Vorteil, dass die potentielle Immunogenität gegen murine Anteile abwesend ist (Hansel *et al.*, 2010). Allerdings können auch Antikörperantworten gegen humane Ak gebildet werden, da im Menschen u.a. verschiedene Allotypen sowie anti-idiotypische Unterschiede vorliegen (Jefferis und Lefranc, 2009). Die Freihandelsnamen aller therapeutischen monoklonaler Antikörper tragen als Suffix „mab“, was für *monoclonal antibody* steht. In Tabelle 2.1 ist, je nachdem, aus welchen Teilen der Ak besteht, die entsprechende Nomenklatur zusammengefasst.

**Tabelle 2.1: Nomenklatur für monoklonale Antikörper**

Antikörpertyp	Endung
Muriner Antikörper	-omab
Chimärer Antikörper	-ximab
Humanisierter Antikörper	-zumab
Humaner Antikörper	-umab

Die Herstellung von voll humanen mAk kann durch die Phagen-*Display*-Technologie erfolgen. Hiefür wird zunächst aus humanen Plasmazellen RNA isoliert, die für die Antikörpersequenz kodiert, und in cDNA umgeschrieben. Diese wird anschließend in

Bakteriophagen eingebracht, und somit werden Gensegmente, die für die Antigen-bindende variable Domäne kodieren, mit Genen für das Hüllprotein des Bakteriophagen fusioniert. Zur Vermehrung werden Bakterien mit diesen Bakteriophagen infiziert, die das Fusionsprotein enthalten. Die entstehenden Phagenpartikel besitzen nun Hüllen mit dem Fusionsprotein, wobei die Antigen-bindende Domäne nach außen zeigt. Zur Selektion dieser Phagen werden sie spezifisch an immobilisierte Antigene gebunden, die der spätere mAk erkennen soll. Molekularbiologisch wird die DNA weiter vervielfältigt und für die Produktion kompletter humaner Antikörper herangezogen. Für die Produktion komplett humaner Antikörper müssen die entsprechenden menschlichen Gene in die produzierenden Zellen überführt werden. Standard-Wirtsorganismen hierfür sind die bereits oben beschriebenen Hybridomzellen. Auch die eukaryotischen Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (*chinese hamster ovary cell*; CHO-Zellen) sind geeignet für die Produktion von mAk (Aigner und Neumann, 1997). Des Weiteren können die Ziel-Gene in bakterielle Expressionssysteme wie z.B. *E.coli* überführt werden. In diesen unterbleibt allerdings die Glykosilierung der Antikörper (Aigner und Neumann, 1997). Die Glykosilierung von Antikörpern ist essentiell für die Bindung an FcγR (Jefferis und Lund, 2002; Kaneko *et al.*, 2006) und bietet u.a. wichtige Erkennungsstellen z.B. für Lektine und stattet Immunglobuline mit einem großen funktionellen Repertoire aus. Außerdem sind die Kohlenhydratanteile für die Struktur der Antikörper wichtig. Sie erhalten und modulieren Effektorfunktionen, die physiologisch relevant sind. Das Maß der Glykosilierung variiert zwischen den Isotypen (Arnold *et al.*, 2007). Alle IgGs haben an der C<sub>H</sub>2 Domäne je eine N-verlinkte Glykosilierung am Asparagin (Asn297). Zwischen den einzelnen IgG-Molekülen existieren Variationen in der Glykosilierung, und auch innerhalb eines IgG-Moleküls gibt es Modifikationen. Durch Unterschiede der Bindung von Salicylsäure, Galactose, N-Acetylglucosamin oder Fucose gibt es bis zu 32 verschiedene Glykosilierungsmuster (Schroeder, Jr. und Cavacini, 2010). Durch Manipulation der Glykosilierung lassen sich die Eigenschaften von therapeutischen Antikörpern verbessern (Arnold *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung humaner mAk bieten transgene Mäuse, die in ihrem Ig-Gen Locus einen humanen Ig-Gen Locus besitzen. Die Immunantwort in transgenen Mäusen ist jedoch weniger robust im Vergleich zu Mausstämmen, die murine mAk generieren (Marasco und Sui, 2007). Eine weitere Technik beinhaltet den Gebrauch von B-Gedächtniszellen als Quelle für humane mAk. Die B-Gedächtniszellen werden aus

dem Blut von Personen isoliert, die eine Virusinfektion aufgewiesen haben. Diese Zellen werden in der Gegenwart von polyklonalen B-Gedächtniszellen-aktivierenden Agenzien mit Epstein-Barr-Virus (EBV) transformiert. Diese aktivierenden Agenzien können zum einen bestrahlte mononukleare Zellen sein. Da B-Zellen den TLR 9 exprimieren, kann zum anderen CpG als TLR 9 Ligand fungieren, um die Effizienz der Transformierung zu steigern (Marasco und Sui, 2007; Traggiai *et al.*, 2004).

## **2.3 Die Fc-Rezeptoren (FcR)**

Zur Eliminierung von Pathogenen kann sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität beitragen (Abschnitt 2.1.2). Fc-bindende Rezeptoren (FcR) fungieren als Verbindung zwischen diesen beiden Systemen, indem sie an den Fc-Teil von Antikörpern binden. Die FcR lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die erste Gruppe bilden die neonatalen FcR (FcRn), welche den Transport von Ig zwischen dem Epithelium und dem Endothelium vermitteln (Ravetch, 1997). Die zweite Gruppe sind jene, welche auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert werden und spezifisch mit den fünf Immunglobulin-Klassen interagieren: Fc $\mu$ R, Fc $\delta$ R, Fc $\gamma$ R, Fc $\alpha$ R und Fc $\epsilon$ R (Ravetch, 1997). Antikörper der Klasse IgG werden somit über die Fc $\gamma$ R gebunden.

### **2.3.1 Aufbau und Struktur von Fc $\gamma$ R**

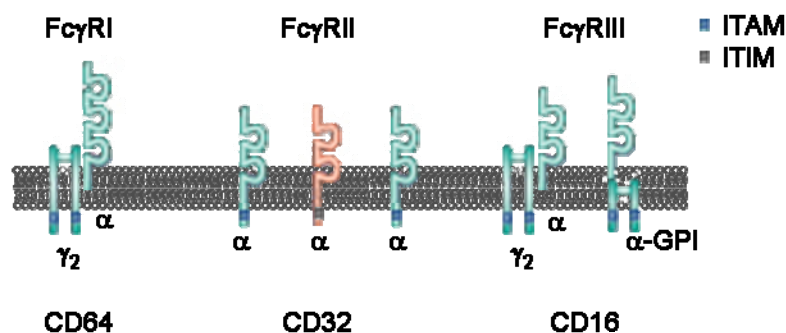
Alle Fc $\gamma$ R gehören zur Ig-Superfamilie. Die humanen Fc $\gamma$ R lassen sich in drei Klassen einteilen: der Fc $\gamma$ RI (CD64), der Fc $\gamma$ RII (CD32) und der Fc $\gamma$ RIII (CD16), welche sich in ihrer IgG-Bindungsaffinität aufgrund ihrer molekularen Struktur unterscheiden. Der hochaffine Fc $\gamma$ RI besitzt im extrazellulären Teil drei Ig-ähnliche Domänen, wohingegen die niederaffinen Fc $\gamma$ RII und III nur zwei Ig-ähnliche Domänen haben (Daeron, 1997). Innerhalb der Klassen II und III existieren verschiedene Isoformen (Tabelle 2.2) und allelische Varianten.

**Tabelle 2.2: Die für IgG spezifischen humanen FcγR und deren Eigenschaften**

Rezeptorname	Affinität	Effekt	Struktur	Motiv
FcγRI (CD64)	Kd~10 <sup>-9</sup> M	aktivierend	α- und γ-Kette	ITAM
FcγRIIA (CD32)	Kd~10 <sup>-7</sup> M	aktivierend	α-Kette	ITAM
FcγRIIB (CD32)	Kd~10 <sup>-7</sup> M	inhibierend	α-Kette	ITIM
FcγRIIC (CD32)	Kd~10 <sup>-7</sup> M	aktivierend	α-Kette	ITAM
FcγRIIA (CD16)	Kd~10 <sup>-6</sup> M	aktivierend	α- und γ-Kette	ITAM
FcγRIIB (CD16)	Kd~10 <sup>-6</sup> M	aktivierend	GPI-gekoppelt	-

Alle FcγR besitzen einen Ligand-bindenden Teil, wobei die Erkennung über die α-Kette erfolgt. Der signalgebende Teil besteht aus mehreren (2-7) Transmembrandomänen sowie im zytoplasmatischen Bereich aus einem *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) oder *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Die letzten beiden Motive übermitteln aktivierende bzw. inhibierende Signale in die Zelle (Amigorena und Bonnerot, 1999).

Wie in Abbildung 2.5 gezeigt, enthalten die meisten FcγR ein ITAM-Motiv, wobei der FcγRIIB (CD32B) mit seinem ITIM-Motiv und der FcγRIII (CD16), der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-gekoppelt ist, eine Ausnahme bilden.



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der humanen Fcγ-Rezeptoren.** Es sind die drei Klassen der humanen FcγR dargestellt. Die spezifische Erkennung des Fc-Teils der Antikörper erfolgt über die α-Kette. Bei den einkettigen FcγRII (A, B und C) erfolgt auch die Signalübertragung über den zytoplasmatischen Teil der α-Kette. Die α-Kette kann entweder ein ITAM-Motiv (blau) oder wie bei dem FcγRIIB ein ITIM-Motiv (grau) enthalten. Bei den anderen FcγR sind für die Signalübertragung die γ-Ketten mit ihren ITAM-Motiven (blau) verantwortlich. Der FcγRIIB ist GPI-verankert (adaptiert von (Nimmerjahn und Ravetch, 2008)).

Das ITAM-Motiv ist in den homodimeren  $\gamma$ -Ketten (Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RIIIA) oder in der  $\alpha$ -Kette (Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIC) lokalisiert. Es besitzt zwei Tyrosinreste, welche durch 9-12 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Diese Tyrosine werden nach Bindung an den Fc $\gamma$ R phosphoryliert, wodurch eine aktivierende Signalkaskade induziert wird (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002).

Nur der Fc $\gamma$ RIIB (CD32B) enthält ein ITIM-Motiv, welches in der  $\alpha$ -Kette lokalisiert ist. Durch Bindung an ihn werden inhibitorische Phosphatasen aktiviert, welche durch Entfernung der Phosphatgruppen die Tyrosinreste wieder dephosphorylieren. Somit wirkt das ITIM-Motiv antagonistisch zum ITAM-Motiv. Die Fc $\gamma$ R werden unterschiedlich auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, so dass auf einem Zelltyp sowohl aktivierende als auch inhibierende Fc $\gamma$ R vorhanden sein können (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Auf Granulozyten und DCs ist der Fc $\gamma$ RI (CD64) exprimiert. Während die Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) und Fc $\gamma$ RIIC (CD32C) auf Makrophagen und Granulozyten zu finden sind, wird der Fc $\gamma$ RIIB (CD32B) bis auf die T-Zellen und die NK-Zellen auf allen Immunzellen exprimiert. Obwohl frühere Daten nahelegen, dass auf T-Zellen Fc $\gamma$ R exprimiert werden, zeigen neuere Arbeiten, dass dies nicht der Fall ist (Anderson und Grey, 1974; Leclerc *et al.*, 1977; Nimmerjahn und Ravetch, 2008; Ravetch, 2003; Stout und Herzenberg, 1975; Takai, 2002). Während auf NK-Zellen der Fc $\gamma$ RIIIA (CD16A) lokalisiert ist, ist der Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B) wiederum auf Granulozyten und Makrophagen zu finden. Die genaue Funktion des Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B) ist noch nicht geklärt (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Lux *et al.*, 2010; Nimmerjahn und Ravetch, 2006; Ravetch, 1997; Schütt C und Bröker B, 2009).

### 2.3.2 Antikörper: Fc $\gamma$ R Interaktion

Die Bindung von IgG an die verschiedenen Klassen der Fc $\gamma$ R ist unterschiedlich stark. Der Fc $\gamma$ RI (CD64) bindet die IgG-Subklassen IgG1 und IgG3 mit einer hohen Affinität von  $10^{-9}$  M. Im Vergleich zu den anderen Fc $\gamma$ R ist die Affinität damit 100-1000fach höher. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt, besitzen die niederaffinen Fc $\gamma$ R nur zwei extrazelluläre Domänen (D1 und D2). Im Vergleich zu diesen besitzt der Fc $\gamma$ RI (CD64) drei Domänen (D1, D2 und D3), wobei die dritte wahrscheinlich für die hohe Affinität verantwortlich ist (Bruhns *et al.*, 2009; Jefferis und Lund, 2002; Nimmerjahn und Ravetch, 2006; Nimmerjahn und Ravetch, 2008; Sautès-Fridman *et al.*, 2003). Generell binden IgG1 und



IgG3 Fc $\gamma$ R besser als IgG2 und IgG4. Die Affinitäten der IgG-Klassen an die Fc $\gamma$ R sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst (Bruhns *et al.*, 2009; Jefferis und Lund, 2002).

**Tabelle 2.3: IgG-Bindungsaffinitäten der humanen Fc $\gamma$ R**

Fc $\gamma$ R	IgG-Bindungsaffinität
Fc $\gamma$ RI (CD64)	IgG3 > IgG1 >> IgG4 >>> IgG2
Fc $\gamma$ RII (CD32)	IgG1 = IgG3 >>> IgG4
Fc $\gamma$ RIII (CD16)	IgG1 = IgG3

Der hochaffine Fc $\gamma$ RI (CD64) ist der einzige Fc $\gamma$ R, der mit monomerem IgG interagiert. Fc $\gamma$ RI (CD64) ist somit auf Zelltypen wie Monozyten, die diesen Rezeptor konstitutiv exprimieren, stets mit IgG besetzt (Lux *et al.*, 2010). Alle anderen Fc $\gamma$ R besitzen eine mittlere bis leichte Affinität für IgG und können nur mit Immunkomplexen interagieren (Lux *et al.*, 2010).

Alle bekannten Affinitäten von Fc $\gamma$ R:IgG-Interaktionen wurden mittels der *BIAcore*-Methode analysiert. Hierfür werden humane Fc $\gamma$ R in der Oberfläche eines polymeren Matrixgels immobilisiert und IgG aus dem Serum in einer Flusskammer darüber gespült. Die Bindung wird mittels der Oberflächen-Plasmonresonanz detektiert (Biacore AB, 1994).

## 2.4 Monoklonale Antikörper in der Therapie

MAk spielen als biologische Arzneimittel und in diagnostischen Bereichen eine zunehmend wichtige Rolle (Reichert *et al.*, 2005; Waldmann, 2003). Neueste Technologien erlauben die Herstellung vollhumaner mAk mit hochaffinen, spezifischen Bindungseigenschaften. Derartige Reagenzien sind äußerst potent und werden vermehrt eingesetzt, um in zentrale zelluläre Regelmechanismen einzugreifen (Hansel *et al.*, 2010). Von den fünf möglichen Subtypen wird aus praktischen und funktionellen Gründen derzeit nur das IgG-Format von Antikörpern als Arzneistoff genutzt (Salfeld, 2007). Innerhalb dieser Klasse werden nur IgG1, IgG2 und IgG4 verwendet. Im Gegensatz dazu werden keine IgG3-Antikörper in der Therapie verwendet, da ihre lange *hinge*-Region (62 Aminosäuren) anfällig für die Proteolyse ist und somit die Halbwertszeit des mAk reduziert ist (Hassan *et al.*, 1991; Salfeld, 2007). Je nach gewünschter Wirkweise des

Antikörpers in der Therapie werden die Isotypen ausgewählt. Wenn das Auftreten einer Zytotoxizität unerwünscht ist, werden z.B. oft IgG4-Antikörper verwendet, da über die Fc-Region des IgG4 geringe ADCC induziert wird (Hansel *et al.*, 2010).

Als erster mAk wurde 1988 der murine Antikörper Muronomab (Orthoclone OKT3; IgG2a) zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen in Folge einer Transplantation zugelassen. Mittlerweile sind insgesamt mehr als 21 mAk als Arzneimittel auf dem Markt erhältlich (Paul-Ehrlich-Institut, 2009). In der Entwicklung bilden mAk die größte Gruppe an biologischen Therapeutika, welche besonders in den Bereichen der Onkologie, der Immunologie und der Transplantationsmedizin Verwendung finden.

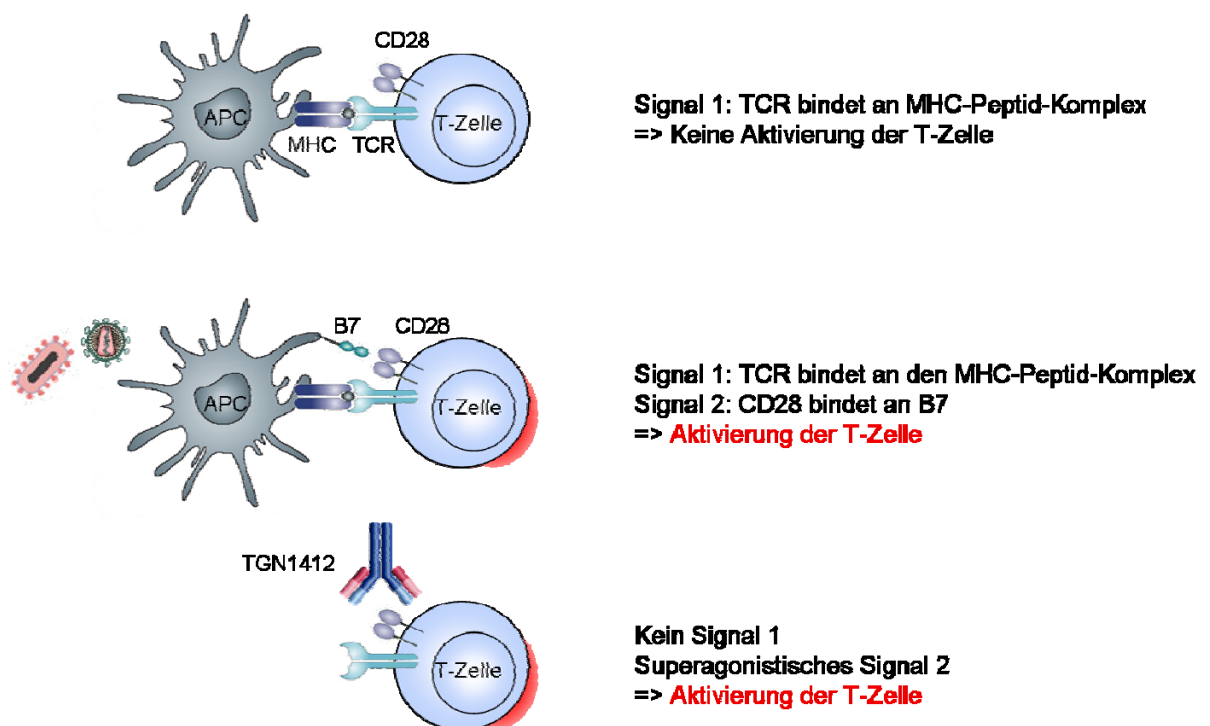
Es existieren vornehmlich immunsupprimierende Antikörper. Zu ihnen zählen u.a. der chimäre mAk Rituximab (Mabthera; IgG1), welcher an CD20 auf unreifen und reifen B-Zellen bindet. Dieser wird zur Behandlung des follikulären Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt, indem er über die Bindung an CD20 CDC auslöst und zur Zerstörung der B-Zellen inklusive der malignen B-Zellen führt (Coiffier *et al.*, 2002). Allerdings wurde für diesen mAk als Nebenwirkung die Sekretion verschiedener Zytokine beschrieben (Neye, 2006; Winkler *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel für einen immunsupprimierenden mAk, für den das Phänomen des Zytokinsturms beschrieben wurde, ist der gegen CD52 gerichtete Antikörper Alemtuzumab (MabCampath; IgG1) (Wing *et al.*, 1995; Wing *et al.*, 1996). Im Jahr 2001 war dies der erste zugelassene humanisierte Antikörper. MabCampath ist ein IgG1 mAk, der zur Behandlung von chronisch-lymphatischer Leukämie des B-Zelltyps (*B cell chronic lymphocytic leukemia*; B-CLL) eingesetzt wird.

Vor allem in der Krebstherapie werden mAk wie Cetuximab (Erbix; IgG1) oder Trastuzumab (Herceptin; IgG1) verwendet, die zur Behandlung von Darmkrebs bzw. von Brustkrebs eingesetzt werden. Auch zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie der Multiplen Sklerose (MS) werden mAk wie Natalizumab (Tysabri; IgG4) eingesetzt (Ransohoff, 2007). Dieser mAk blockiert die  $\alpha$ 4-Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immunzellen, die für den Übertritt der Zellen aus den Blutgefäßen über die Blut-Hirn-Schranke in betroffene Bereiche des Gehirns von Bedeutung sind (Bielekova und Becker, 2010).

Der bereits erwähnte anti-CD3 mAk OKT3 bindet an die  $\epsilon$ -Kette des CD3-TCR-Komplexes und aktiviert zunächst T-Zellen. Anschließend wird der Rezeptor-Komplex internalisiert, und es kommt zur Eliminierung aller CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Loertscher, 2002). Für diesen mAk sind verschiedene Nebenwirkungen wie u.a. die massive Freisetzung von

Zytokinen beschrieben (Abramowicz *et al.*, 1989; Chatenoud *et al.*, 1990; Gaston *et al.*, 1991; Sgro, 1995). Dieser so genannte Zytokinsturm beginnt im Patienten ca. 30-60 Minuten nach Verabreichung des mAk und kann bis zu mehreren Stunden andauern (Janssen-Cilag, 2008). Obwohl der Gebrauch von mAk in der Therapie ein großer Erfolg ist, stehen die Nebenwirkungen dem gegenüber (Neye, 2006). Derzeit befinden sich mehr als 150 mAk in der Phase der klinischen Prüfung (Reichert und Dewitz, 2006). Die Entwicklung von prädiktiven präklinischen Modellen zur funktionellen Testung neuer human-therapeutischer mAk ist angesichts dieser Anzahl von großer Bedeutung (Borchmann *et al.*, 2001; Hunig und Dennehy, 2005; Vaughan *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten mAk, von denen viele ADCC und/oder CDC induzierend, blockierend und/oder supprimierend wirken, wurde eine neue Wirkart von mAk entwickelt, die superagonistisch agieren. Für die klassische Aktivierung von T-Zellen werden zwei Signale benötigt (Abb. 2.6).



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung durch TGN1412.** Während eine klassische Aktivierung von T-Zellen zwei Signale benötigt, ist TGN1412 dazu in der Lage, die T-Zellen allein durch Bindung an CD28 und somit unabhängig des ersten Signals zu aktivieren (adaptiert von (Schneider und Kalinke, 2007)).

Das erste Signal erfolgt über die Bindung des TCRs der T-Zelle an den MHC-Antigen-Komplex auf der Oberfläche der APC. Dieses Signal allein reicht nicht für eine Aktivierung von T-Zellen. Allerdings kommt es hierdurch zur Aufregulierung von co-stimulatorischen Molekülen wie z.B. B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf APCs. Diese co-stimulatorischen Moleküle sind natürliche Liganden für CD28, ein homodimerer Rezeptor auf naiven T-Zellen (Hara *et al.*, 1985; Riley und June, 2005). Erst durch dieses zweite Signal kommt es zur vollständigen Aktivierung einer naiven T-Zelle (Schwartz, 1992; Sharpe und Freeman, 2002; Sharpe und Abbas, 2006). Auch die Bindung an CD28 allein reicht nicht aus für die Aktivierung von T-Zellen (Acuto und Michel, 2003; Rudd und Schneider, 2003).

Auch mAk, welche gegen die extrazelluläre Domäne von CD28 gerichtet sind, können in Kombination mit dem ersten Signal T-Zellen aktivieren. Solche Antikörper binden in der Nähe der Binderegion von natürlich vorkommenden CD28-Liganden. Kürzlich wurde eine neue Gruppe von gegen CD28 gerichteten mAk identifiziert. Diese sind in der Lage, T-Zellen ohne die Beteiligung des T-Zellrezeptor-Komplexes über die alleinige Bindung an CD28 zu aktivieren (Bischof *et al.*, 2000; Rodriguez-Palmero *et al.*, 1999; Tacke *et al.*, 1997). Solche Antikörper werden als superagonistische Antikörper zusammengefasst und können somit unabhängig von der TCR-Spezifität der einzelnen T-Zellen ihre Funktion entfalten.

## 2.5 Der superagonistische mAk TGN1412

Zu den superagonistischen mAk zählt auch der monoklonale humanisierte IgG4-Antikörper TGN1412, welcher spezifisch an CD28 auf humanen T-Zellen bindet (TeGenero, 2005a; TeGenero, 2005b). Im Gegensatz zu klassischen anti-CD28 mAk binden superagonistische anti-CD28 mAk seitlich in der Nähe der Plasmamembran an eine so genannte C'D Schleife (Luhder *et al.*, 2003). In präklinischen *in vivo*-Untersuchungen in Nagern wurde stellvertretend der superagonistische, gegen CD28 gerichtete mAk anti-Ratte JJ316 (Tacke *et al.*, 1997) verwendet, welcher erfolgreich zur Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen der Ratte wie z.B. Collagen-induzierte Arthritis (CIA) oder experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) eingesetzt wurde. Hierbei handelt es sich um Modelle der rheumatoiden Arthritis (RA) und der multiplen Sklerose (MS) des Menschen (Beyersdorf *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2003; Skapenko *et al.*, 2006). In präklinischen Studien in Nagern (Maus und Ratte) wurde gezeigt, dass nach Behandlung

mit superagonistischen anti-CD28 mAk vornehmlich T<sub>regs</sub> aktiviert wurden (Beyersdorf *et al.*, 2006; Hunig und Dennehy, 2005; Lin und Hunig, 2003). Des Weiteren wurden toxikologische Studien in nicht-humanen Primaten (*Macaca mulatta* und *Macaca fascicularis*) durchgeführt. In *Macaca (M.) fascicularis* wurde TGN1412 mit einer Dosis von bis zu 50 mg/kg pro Woche und Mehrfachgabe über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen verabreicht. Es traten keine TGN1412-abhängigen Anzeichen von Toxizität, Hypersensitivität oder unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems auf. Lediglich geringe Anzeichen einer T-Zellaktivierung konnten nach Applikation von TGN1412 beobachtet werden. Des Weiteren wurden keine negativen Auswirkungen auf das cardiovaskuläre System, das respiratorische System oder das zentrale Nervensystem beobachtet (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff*, 2006). Neben TGN1412, welcher ein IgG4-Antikörper ist, wurde auch eine IgG1-Variante entwickelt, TGN1112, die sich in ihrem konstanten Teil in einigen Aminosäuren unterscheidet. Beide Antikörper-Isotypen (TGN1412 und TGN1112) lösten nach Stimulation von PBMCs keine CDC aus. Während TGN1412 keine ADCC induzierte, war TGN1112 dazu imstande (TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a). Auch TGN1112 wurde in nicht-humanen Primaten getestet, wobei keinerlei Anzeichen für eine Toxizität beobachtet wurden (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff*, 2006).

TGN1412 wurde durch den Transfer der CDRs von schwerer und leichter Kette der variablen Region eines monoklonalen Maus anti-human CD28-Ak mit den schweren und leichten Ketten der humanen variablen Region hergestellt. Die humanen variablen Regionen wurden anschließend mit einem humanen Gen, welches für die IgG4 $\gamma$ -Kette sowie einem humanen Gen, welches für die  $\kappa$ -Kette kodiert, rekombiniert. Das Molekül TGN1412 besteht aus zwei leichten Ketten von ca. 24 kDa (214 Aminosäuren) und zwei schweren Ketten von ca. 51 kDa (447 Aminosäuren). Das Protein wurde in CHO-Zellen mit einer molekularen Masse von ca. 148 kDa hergestellt (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff*, 2006). Der humanisierte superagonistisch wirkende anti-CD28 mAk TGN1412 wurde zur Behandlung der chronisch-lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der RA im Menschen entwickelt. In *in vitro*-Tests mit Blutzellen aus B-CLL Patienten konnte gezeigt werden, dass TGN1412 einen Einfluss sowohl auf T- als auch auf B-Zellen hat. TGN1412 induziert eine polyklonale Expansion und Aktivierung von T-Zellen sowie die Expression verschiedener Aktivierungsmarker wie CD25, CD69 oder CD40L auf diesen Zellen. Auf

Tumorzellen wirkt der mAk TGN1412 indirekt, indem er auf T-Zellen CD40L aufreguliert, welches an CD40 auf B-Zellen bindet und somit die Antigen-Präsentation verbessert. Diese verbesserte Antigen-Präsentation von malignen Tumor-B-Zellen resultiert in einer effizienteren Eliminierung von leukämischen B-Zellen *in vitro* (TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Apoptose der leukämischen B-Zellen über CD95 (fas) und die *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Kaskade nach Co-Kultivierung mit TGN1412 induziert wurde (TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a). In Nagern führte die Behandlung mit superagonistischen mAk zur massiven Expansion von T<sub>regs</sub> und zur Produktion von hauptsächlich antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen wie IL-4 und IL-10 (TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a). Zusammenfassend wurde TGN1412 entwickelt, um T<sub>regs</sub> zu aktivieren und dadurch Entzündungsreaktionen bei Autoimmunerkrankungen wie RA oder MS zu mildern sowie das Immunsystem bei der chronisch-lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ zu aktivieren, um so die Tumorzellen zu vernichten (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006; TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a*).

Während einer klinischen Phase-I Studie im März 2006 führte die intravenöse Applikation von 0,1 mg/kg des superagonistischen anti-CD28 mAk TGN1412 in sechs gesunden Probanden innerhalb weniger Stunden zu akut auftretenden Nebenwirkungen. Diese Probanden zeigten eine systemische inflammatorische Immunantwort, die durch die schnelle Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine charakterisiert war. Insbesondere wurden die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sekretiert, die zu schock-ähnlichen Symptomen führten (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006; Suntharalingam et al., 2006*). Des Weiteren litten die Probanden unter Nebenwirkungen wie Kopfscherzen, Muskelschmerzen, Übelkeit, Durchfall und Hautrötungen sowie unter Lungen-, Nieren- und Herzversagen. Es kam zur transienten Lymphopenie, der Erweiterung der Blutgefäße, einer Hypotonie, einer Gerinnungsstörung sowie einem massiven Zytokinsturm (*Cytokine-release-syndrome*) (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006; Suntharalingam et al., 2006*). Innerhalb von vier Stunden wurde vor allem eine verstärkte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (von 2,8 pg/ml (0 h) auf 4676 pg/ml (4 h) bzw. von 7,1 pg/ml (0 h) auf 5000 pg/ml (4 h) (Suntharalingam *et al.*, 2006) nachgewiesen. Dieser Zytokinsturm konnte weder in nicht-humanen Primaten (Hanke, 2006; Schraven und Kalinke, 2008) noch durch *in vitro*-Analysen vorhergesagt werden. Trotz des massiven Zytokinsturms haben alle

sechs Probanden überlebt. Wie in Abschnitt 2.4 gezeigt, wurden solche Nebenwirkungen bereits in abgeschwächter Form für den mAk OKT3 (Plevy *et al.*, 2007), den mAk Rituximab (Winkler *et al.*, 1999) sowie den mAk MabCampath (Wing *et al.*, 1995; Wing *et al.*, 1996) beschrieben. Bisher gab es nur unklare Vorstellungen über mögliche Ursachen für die durch TGN1412 ausgelösten speziesspezifischen Effekte (Hunig, 2007).

Im Gegensatz zur Spezies *Macaca fascicularis*, die auch hohe Konzentrationen des mAk TGN1412 vertragen hat, kam es im Menschen schon bei niedrigeren Konzentrationen TGN1412 zu diesen schweren Nebenwirkungen. Mittlerweile existieren zu *first-in-human*-klinischen Studien mit mAk diverse Richtlinien, welche das Risiko bei der Ersterprobung neuer medizinischer Produkte im Menschen minimieren sollen (European Medicines Agency (EMA), 2007b). Die Festlegung einer Startdosis einer Phase-I Studie ist somit von großer Bedeutung. Für die Dosisfindung einer Phase-I Studie verwendet man gewöhnlich den sogenannten *no observed adverse effect level* (NOAEL) (FDA (U.S. Department of Health Services Food and Drug Administration) *et al.*, 2010). Dieser beinhaltet die höchste, mehrfach anwendbare Dosis, bei welcher in einem relevanten Tiermodell keine toxischen Effekte auftreten. Für den mAk TGN1412 bedeutet das, dass 50 mg/kg dem NOAEL entsprechen. Für die Berechnung des NOAELs wurde nach FDA-Richtlinien sowohl ein Konversionsfaktor von 3,1 für nicht-humane Primaten (16 mg/kg) als auch ein Sicherheitsfaktor von 10 (1,6 mg/kg) mit einbezogen. Zur weiteren Sicherheit setzte TeGenero die Startdosis nochmals um den Faktor 16 herunter, so dass als Startdosis 0,1 mg/kg festgelegt wurde (Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006). Nach der Phase-I Studie mit TGN1412 ist der *minimal anticipated biological level* (MABEL) wieder in den Vordergrund gerückt. Der MABEL ist eine weitere Berechnungsgrundlage zur Dosisfindung. Im Gegensatz zu den Dosis-Berechnungen des NOAELs beruht der MABEL auf pharmakologischen Effekten, welche bei der niedrigsten Konzentration noch sichtbar sind. Dadurch resultieren für den MABEL sehr niedrige Startdosen. Im Falle des mAk TGN1412 hätte dieser 5 µg/kg betragen (Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde zum einen Ursachenforschung zur unterschiedlichen Wirkweise von TGN1412 zwischen dem Menschen und nicht-humanen Primaten untersucht sowie die Validierung der Startdosis genauer analysiert. Des Weiteren sollte zum Verständnis der Wirkweise des mAk TGN1412 beigetragen werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

„*Buffy coat*“ ist die Bezeichnung für ein Lymphozytenkonzentrat, welches man durch Zentrifugieren aus Vollblut erhält. Mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation lassen sich aus dem Lymphozytenkonzentrat die mononuklearen Zellen des peripheren Blutes isolieren, die für weitere Experimente eingesetzt werden können. Der „*Buffy coat*“ wurde frisch vom Blutspendedienst Frankfurt am Main bezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Affen sind Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und Cynomolgusaffen (*Macaca fascicularis*) und werden im Paul-Ehrlich-Institut gehalten. Die Blutentnahme erfolgte unter Narkose durch Veterinärmediziner des Paul-Ehrlich-Instituts.

#### 3.1.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle	Bestellnummer
Agarose	Invitrogen	15510-027
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG	L6115
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva	47321
CD14 MicroBeads	Miltenyi	130-091-097
DC-Medium	CellGro	2005
DEPC	Sigma	D-5758
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma	114K2370
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Lösungsmittellabor, PEI	
Ethanol p.A.	Merck	1.00983.5000
Ethidiumbromid	Merck	1.11608.0010
FACS Clean	Becton Dickinson	34-0345
FACS Flow	Becton Dickinson	34-2003
FACS Rinse	Becton Dickinson	34-0346
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	S0155, Lot. 1088G
Ionomycin	Sigma	I9657
Isopropanol p.A.	Merck	1.096345000
Lysetol Desinfektion	Schülke & Mayr	15684-C
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck	6688.0100



<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bestellnummer</b>
Natriumpyruvat	Gibco	1682049
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG	L1825
	Lösungsmittellabor, PEI	
PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Lösungsmittellabor, PEI	
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	1.04005.1000
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
Polyglobin 10 %	Bayer Vital, Leverkusen	
RPMI 1640-Medium	Gibco	31870-025
TBE Puffer 10x	Lösungsmittellabor, PEI	
TPA	Sigma	P8139
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Gibco	15250-061
Zyklodest. Wasser	Lösungsmittellabor, PEI	
X-VIVO 15-Medium	BioWhittaker	04-418Q

Die Medien werden bis zur Verwendung bei 4°C im Dunklen gelagert.

### 3.1.2 Puffer, Lösungen, Medien

<b>Puffer / Zellkulturmedien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
FACS-Puffer	PBS 2 % BSA 20 mM EDTA, pH 8,0 0,2 % Natriumazid
Fixierungslösung FACS	PBS 1 % PFA
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA, pH 8,0
Fc Rezeptor-Block	1 % Polyglobin FACS-Puffer

<b>Puffer / Zellkulturmedien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Medium für Ca <sup>2+</sup> -Messung	RPMI 1640-Medium (Phenolrotfrei) 10 % FCS
FcγR-Transfektanten-Medium	RPMI 1640-Medium 10 % FCS 1 % Penicillin / Streptomycin
T-Zell Medium	X-VIVO-Medium L-Glutamin Gentamycin Phenolrot

### 3.1.3 Fcγ Rezeptor exprimierende Zellen (FcγR-Transfektanten)

<b>Zelltyp</b>	<b>Bezeichnung</b>
BW5147	FcγRI (CD64)
BW5147	FcγRII (CD32)
BW5147	FcγRIII (CD16)

Die Zellen wurden von H. Hengel zur Verfügung gestellt und zur Selektion mit 500 µg/ml Zeocin gehalten (Corrales-Aguilar, 2008).

### 3.1.4 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bestellnummer</b>
α-Human CD3	APC	BD Pharmingen	555335
	PE	BD Pharmingen	555333
α-Affe CD3	PE	BD Pharmingen	556612
α-Human CD4	APC-Cy7	BD Pharmingen	557871
α-Human CD8	PE-Cy7	BD Pharmingen	557746
α-Human CD14	Pacific blue	BD Pharmingen	558121
α-Human CD16	APC-Cy7	BD Pharmingen	557758
	PE	BD Pharmingen	555407

<b>Antikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bestellnummer</b>
$\alpha$ -Human CD19	PE	BD Pharmingen	555413
$\alpha$ -Human CD28	PE	BD Pharmingen	555729
$\alpha$ -Human CD32	APC	BD Pharmingen	559769
	FITC	BD Pharmingen	555448
$\alpha$ -Human CD56	PE-Cy5	BD Pharmingen	555517
$\alpha$ -Human CD64	FITC	BD Pharmingen	555527
TGN1412	-	TeGenero	-

(Dr. Thomas Hanke)

<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
$\alpha$ -Human IgG4	BD Pharmingen	555881

Alle Antikörper wurden bei 4°C gelagert und vor Licht geschützt.

<b>Blocking Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Anti-Human CD16	AbD Serotec	MCA1193EL
Anti-Human CD32	AbD Serotec	MCA1075XZ
Anti-Human CD64	AbD Serotec	MCA756XZ

Alle *Blocking*-Antikörper wurden bei -20°C gelagert und auf Eis aufgetaut.

### 3.1.5 Kits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bestellnummer</b>
Pan T cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotech	130-091-156
Pan T cell Isolation Kit, non-human primates	Miltenyi Biotech	130-091-993
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotech	130-050-201
B cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech	130-091-151
NK cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech	130-092-657
Alexa Fluor488 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Molecular Probes	A20181

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bestellnummer</b>
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma	PKH26-GL
Human Th1/Th2 11 plex Kit	Bender MedSystems	BMS810FF
Basic Kit Human FlowCytomix	Bender MedSystems	BMS8420 FF
Human IFN- $\gamma$ FlowCytomix	Bender MedSystems	BMS8228 FF
Human TNF- $\alpha$ FlowCytomix	Bender MedSystems	BMS8223 FF
Human IL-10 FlowCytomix	Bender MedSystems	BMS8215 FF
Human IL-17A FlowCytomix	Bender MedSystems	BMS82017 FF
Human IL-1 $\beta$ FlowCytomix	Bender MedSystems	BMS8224 FF

Alle Kits wurden bei 4°C gelagert und nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.1.6 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung/Hersteller</b>
Autoklav	KSG
autoMACS Pro Separator	Miltenyi Biotec
CO <sub>2</sub> -Brutschränke	Cytoperm, Heraeus
Durchflusszytometer	LSR II, Becton Dickinson
Einfrierbox	Mr. Frosty, Nunc
Einkanalpipetten 0,5-10 $\mu$ l, 2-20 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l, 150-200 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l	Eppendorf
Elektronische Pipettierhilfe	Pipetboy acu, Integra Bioscience
Elektrophorese-Kammern	Easy Cast TM
ELISA-Plattenlesegerät	Sunrise, Tecan
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Gamma Bestrahlungsanlage (Cäsium-137)	STS Steuerungs- und Strahlenschutz GmbH
Handzähler	Rettberg Laborgeräte
Kühlblock	Isosafe, Eppendorf
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge	HERAEUS Sepatech; Kendro
Laboruhr	neoLab 2-2002
Magnetrührer	Combimag Ret, Janke & Kunkel

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung/Hersteller</b>
Mehrkanalpipette	Socorex, Eppendorf
Mikrowelle	AEG
Multipipette plus	Eppendorf
PCR-Cycler	Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research
Rührfisch	Uvex
Sterilbank	Steril Gard III Advance, The Baker Company
Tiefkühlschränke	New Brunswick Scientific
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf
Vakuumpumpe	Vacunsafe, IBS Integra Biosciences
Vortexer	VF2, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
Waage	Sartorius LP820
Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Heraeus Sepatech
<i>FlowCytomix Vacuum Manifold</i>	Bender MedSystems

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
24-well Platten	Sarstedt
96-well Platten	Sarstedt
Alufolie	
Einfriergefäß Materiallager PEI	Cryotube, Nunc
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Omnifix, Braun
Einweghandschuhe	Manufix Sensitive, Braun
Einwegpipetten	Greiner
Einmal-OP-Mundschutz	Coldex
FACS-Röhrchen (Polystyren)	Becton Dickinson
Glaswaren	Schott
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten	VWR

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Pipettenspitzen	Eppendorf
Schutzbrille	Purisafe, Roma
Sterilfilter 0,2 µm	Millipore
Spritzen	Henke-Sass-Wolf GmbH
Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm; 0,45 µm)	Sartorius
Sterilfilter	Steritop
Zellkulturflaschen (T25; T75; T175)	Greiner, Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, TPP

### 3.1.8 PC-Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
BD FACS DIVA	Becton Dickinson
FlowJo7	TreeStar
Microsoft Office	Microsoft
Photoshop	Adobe
Sequencher	
winlist	Verity Software

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

#### 3.2.1.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden unter einer sterilen Werkbank mit vertikaler Luftströmung durchgeführt. Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte werden vor und nach dem Arbeiten mit Terralin Liquid desinfiziert. Neben sterilen Einwegverbrauchsmaterialien werden nur autoklavierte oder steril filtrierte Lösungen oder Medien verwendet. Alle Medien werden vor Beginn der Arbeit auf 37°C vorgewärmt.

#### 3.2.1.2 Isolierung von mononuklearen Zellen aus peripherem Blut (*Buffy coat*) mit Hilfe eines Dichtegradienten

Die Gewinnung von PBMC (mononukleare Zellen des peripheren Blutes) erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation. Als Lymphozytentrennmedium wurde Ficoll verwendet. Bei der Zentrifugation des Ficollgradienten entstehen vier Phasen: die obere Plasma-Phase, die darunter liegende weißliche Bande, welche die Lymphozyten und Monozyten enthält, das Trennmedium Ficoll und unterhalb des Ficolls eine Ansammlung von Erythrozyten und Granulozyten.

Der frische *Buffy coat*-Beutel (ca. 50 ml) wird bis zur Aufbereitung bei Raumtemperatur gelagert und vor dem Öffnen von außen desinfiziert. Das Blut wird in eine T75 Zellkulturflasche überführt und 1:4 mit warmem PBS verdünnt. Parallel dazu werden acht 50 ml Reaktionsgefäße mit je 15 ml Ficoll-Lösung befüllt. Anschließend wird das Blutgemisch (je 25 ml) langsam über die Ficoll-Lösung geschichtet. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 2100 rpm (900 g) für 20 min bei ausgeschalteter Bremse. Die obere Plasma-Phase inklusive der darin enthaltenen Thrombozyten wird verworfen. In der mittleren weißlichen Schicht, die eine Dichte von 1,077 g/ml besitzt, befinden sich die mononuklearen Zellen, die in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Diese Zellen werden nun zweimal in MACS-Puffer gewaschen und in einem definierten Volumen MACS-Puffer resuspendiert. Die Auszählung erfolgt in einer geeigneten Verdünnung mittels einer Neubauer-Zählkammer. Aus einem *Buffy coat* lassen sich durchschnittlich zwischen  $5 \times 10^8$  und  $2 \times 10^9$  mononukleare Zellen isolieren.

### 3.2.1.3 Isolierung von HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) und deren Kultivierung

Aus Nabelschnüren von Neugeborenen lassen sich aus dem Endothel so genannte HUVECs isolieren. Alle Nabelschnüre wurden aus der Frauenklinik Mannheim bezogen.

Nach dem Säubern und Desinfizieren der Nabelschnur mit 70%igem Ethanol werden die Enden der Nabelschnur mit einem Skalpell glatt abgeschnitten. In die Vene wird ein Drei-Wege-Hahn hineingedreht und mit Hilfe eines Kabelbinders befestigt. Anschließend wird die Vene mit ca. 50 ml warmen PBS gespült, um Blutreste zu entfernen. Mögliche Geweberisse in der Nabelschnur werden mit Hilfe einer Gewebesklemme abgeklemmt. Die Ablösung der Endothelzellen erfolgt mit 10-20 ml warmer 0,1%iger Kollagenase-Lösung in PBS für 40 min. Zur Inkubation wird die Nabelschnur mit heraushängenden Enden in einen mit 37°C warmem Wasser gefüllten Thermobecher für 40 min gehängt. Anschließend werden die Endothelzellen herausgespült und die Nabelschnur mit weiteren 10-20 ml ECG-Medium durchspült. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1200 rpm (300 g) werden die Zellen gezählt und bis zu  $9 \times 10^4$  HUVECs in eine T25 mit 5 ml ECGM, bis zu  $9 \times 10^5$  HUVECs in eine T75 mit 20 ml ECGM und bis zu  $9 \times 10^6$  HUVECs in zwei T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 h erfolgt ein Medienwechsel, um restliche Erythrozyten zu entfernen. Da die HUVECs adhärent sind, kann das Medium direkt abgesaugt und frisches hinzugegeben werden. Im weiteren Verlauf der Zellkultur wird das Medium alle 5-7 Tage gewechselt.

### 3.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer und gibt außerdem Auskunft über den Vitalitätszustand der Zellen. Der Vitalitätstest beruht darauf, dass tote Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen. Farbstoffe, wie zum Beispiel Trypanblau, können die Membran lebender Zellen nicht passieren und gelangen nur in tote Zellen. In einer 96-well Platte wird eine der vorhandenen Zelldichte entsprechende und somit leicht auszählbare Verdünnung der Zellsuspension in Trypanblau erstellt. In einer Neubauer-Zählkammer werden nun vier Großquadrate ausgezählt. Zellen, die auf einer der Linien der angrenzenden Quadrate liegen, sollten nicht doppelt ausgezählt werden.

Jedes Quadrat besitzt eine Fläche von  $0,04 \text{ mm}^2$  und eine Tiefe von 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Volumen von  $0,004 \mu\text{l}$ . Die ermittelte Zellzahl wird daher mit  $1 \times 10^4$  und dem



Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nun nach folgender Formel:

$$C = N \times V \times 10^4$$

C = Zellen pro ml

N = Mittelwert der gezählten Zellen

V = Verdünnungsfaktor

$10^4$  = Volumenrechnungsfaktor

Die totale Zellzahl kann berechnet werden, indem man die Zellen pro ml mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

### **3.2.1.5 Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen**

#### Auftauen

Das im Gefriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein Zellgift und muss daher beim Auftauen so schnell wie möglich entfernt werden, um eine Schädigung der Zelle zu vermeiden. Bevor also die in Medium mit 10 % DMSO eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden können, werden die Zellen zunächst in 5 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und auf ein geeignetes Volumen mit Medium aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

#### Passagieren

Passagieren von konfluenten Zellen: Sobald die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht haben, sollten sie passagiert werden. Das alte Medium wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 5 ml PBS gewaschen. Dies dient dazu, Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die sich im Medium befinden, zu entfernen, da diese bei Zugabe von Trypsin Komplexbildungen vollziehen, wodurch sich die Zellen nicht von der Zellkulturflasche lösen können. Nach dem Entfernen der Ca<sup>2+</sup>-Ionen werden die Zellen mit 1,5 ml 1 % EDTA + 0,25 % Trypsin überschichtet und im Brutschrank für 2-5 min inkubiert. Unter dem Mikroskop lässt sich kontrollieren, ob sich die Zellen abgerundet und von ihrer Unterlage gelöst haben. Um das Trypsin zu inaktivieren, werden 3 ml Medium

hinzugegeben. Die Zellen werden nun 5 min bei 1200 rpm (300 g) zentrifugiert und das Zellpellet in einem geeigneten Medium resuspendiert. Je nach gewünschtem Passagierverhältnis werden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt.

Passagieren von Suspensionszellen: Sind die Suspensionszellen dicht gewachsen, sollten sie passagiert werden. Frisches warmes Medium wird in eine neue Zellkulturflasche vorgelegt. Nach mehrfachem Resuspendieren der Zellen wird ein Teil in einem gewünschten Passagierverhältnis in die neue Zellkulturflasche überführt.

### Einfrieren

Um Zellen in Stickstoff (N<sub>2</sub>) zu lagern, werden diese im jeweiligen Kulturmedium mit 10 % DMSO eingefroren. DMSO wandert durch die Zellmembran und ersetzt das Wasser innerhalb der Zelle. Es sorgt dafür, dass sich keine Eiskristalle beim Einfriervorgang bilden, welche die Zellstruktur zerstören würden.

Zunächst werden die Suspensionszellen oder abgelösten konfluenten Zellen bei 300 g (1200 rpm) zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Zellpellet in dem zuvor angesetzten 10%igem DMSO-Medium (3 ml für 1xT175) resuspendiert und à 1 ml eingefroren. Die Zellen werden in einer Einfrierbox, die ein langsames Absinken der Temperatur von 1°C/Stunde ermöglicht, auf -80°C gelagert und können nach einigen Stunden in flüssigen Stickstoff gegeben werden.

### **3.2.1.6 *In vitro*-Differenzierung humaner dendritischer Zellen aus Monozyten**

Um *in vitro* differenzierte myeloide DCs zu generieren, werden 1x10<sup>6</sup> Monozyten in je 1 ml DC-Medium in einer 24-well Platte ausgesät und mit je 1000 Units GM-CSF sowie 1000 Units IL-4 versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 5 Tagen erhält man unreife myeloide DCs. Für die Generation von reifen DCs benötigt man weitere Zytokine. Die reifen DCs werden nach zwei unterschiedlichen Protokollen hergestellt:

#### A) Maturierung 1 pro 1x10<sup>6</sup> Zellen (Jonuleit *et al.*, 1997)

TNF- $\alpha$	10 ng/ml
IL-1 $\beta$	10 ng/ml
IL-6	1000 U/ml
PGE <sub>2</sub>	1 $\mu$ g/ml

## B) Maturierung 2 pro $1 \times 10^6$ Zellen (Mailliard *et al.*, 2004; Muller-Berghaus *et al.*, 2005)

TNF- $\alpha$	50 ng/ml
IL-1 $\beta$	25 ng/ml
INF- $\gamma$	1000 U/ml
INF- $\alpha$ 2b	3000 U/ml

Die unreifen DCs werden für weitere 3 Tage mit den oben aufgeführten Zytokinen bei 37°C inkubiert (Sender *et al.*, 2010).

### **3.2.1.7 Ernte der stimulierten Zellen und deren Zellkulturüberstände**

Die stimulierten Zellen werden, soweit nicht anders vermerkt, nach 24 h geerntet. Sowohl Zellen als auch Überstände werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände werden vorsichtig abgenommen, in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und bis zur Zytokinbestimmung bei -20°C gelagert. Die Zellen werden zur Analyse am Durchflusszytometer, wie in 3.2.2.2 beschrieben, weiter behandelt.

## **3.2.2 Immunologische Arbeitstechniken**

### **3.2.2.1 Anreicherung spezifischer Zellen mittels magnetischer Markierung**

Die MACS-Methode (*magnetic activated cell sorting*) ermöglicht die Auftrennung und Anreicherung von bestimmten Zellpopulationen aus einem Zellgemisch. Dabei macht man sich bestimmte Oberflächenmoleküle und deren Zelltyp-spezifische Expression zunutze. Kleine magnetische Kügelchen (*MicroBeads*) sind mit monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Zellmarker gekoppelt und binden an die gewünschten Zellen einer Population. In der metallischen Matrix einer Säule in einem Magnetfeld des autoMACS Pro-Separators werden dann die *Beads* mit ihren gebundenen Zellen zurückgehalten, während ungebundene Zellen ungehindert die Säule passieren. Durch diese Methode ergeben sich zwei Möglichkeiten der Auftrennung: zum einen eine Positivselektion, bei der die gewünschte Population mit MACS-*MicroBeads* markiert und von den restlichen Zellpopulationen abgetrennt wird. Zum anderen ergibt sich die Möglichkeit der Depletion, einer Negativselektion, bei der die MACS-*MicroBeads* gekoppelten Zellen in der Säule zurück gehalten werden und die aufzureinigende Population unberührt bleibt und sich im

Durchfluss befindet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende MACS-Selektionen angewendet:

**Tabelle 3.2: Übersicht verwendeter MACS-Selektionen**

<b>Kit</b>	<b>Anzureichernde Zellpopulation</b>	<b>MACS-Selektion</b>
Pan T cell Isolation Kit, human	T-Zellen	Negativselektion
Pan T cell Isolation Kit, non-human primates	T-Zellen	Negativselektion
CD14 MicroBeads	Monozyten	Positivselektion
B cell Isolation Kit II	B-Zellen	Negativselektion
NK cell Isolation Kit	NK-Zellen	Positivselektion

Alle Kits wurden nach dem jeweils beiliegenden Protokoll verwendet.

### 3.2.2.2 FACS (*fluorescent activated cell sorting*)-Analyse

Beim FACS (*fluorescent activated cell sorting*) handelt es sich um eine Methode für den Nachweis und die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen in einer Suspension. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen werden mit monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gerichtet sind, markiert.

Mit Hilfe des LSRII, eines Durchflusszytometers, werden die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl erfasst. Die Ablenkung der Strahlen beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird in zwei Kategorien aufgeteilt. Das Licht, welches die relative Größe der einzelnen Zellen detektiert, wird Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) genannt, und das Licht, das von den Zellen um 90° abgelenkt wird und somit Aussagen über die innere Granularität der Zellen macht, wird Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) genannt. Durch diese erste Darstellung wird bereits eine Unterscheidung lebender Lymphozyten bekannter Größe von Zelltrümmern und toten Zellen ermöglicht. Gewünschte Zellpopulationen lassen sich durch Setzen eines Rahmens (engl.: *gate*) getrennt von anderen Zellen betrachten.

Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei

exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photonendetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Lichtsignale werden proportional zur Lichtstärke in elektronische Signale umgewandelt. Die gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Für jede FACS-Färbung werden je nach verfügbarer Zellzahl zwischen  $2 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern erfolgt in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer pro Färbung für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen an die  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren werden in einigen, dafür gekennzeichneten Versuchen die Zellen in 45  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer sowie 5  $\mu\text{l}$  Polyglobin zur Blockierung unspezifischer Fc-vermittelter Bindungen aufgenommen. Polyglobin ist ein IgG-Gemisch und blockiert die  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren. Das im FACS-Puffer enthaltene Natriumazid wirkt antibakteriell. EDTA verringert die Adhäsion der Zellen aneinander und an die Gefäßwand und BSA das Ausmaß an unspezifischen Antikörperbindungen. Je nach Färbung werden folgende Antikörper verwendet:

**Tabelle 3.3: Die für die FACS-Analyse verwendeten Antikörper**

Antikörper	Nachweis
Anti-CD3	T-Zellen
Anti-CD4	T-Helferzellen
Anti-CD8	Zytotoxische T-Zellen
Anti-CD14	Monozyten
Anti-CD16	$\text{Fc}\gamma\text{RIII}$
Anti-CD19	B-Zellen
Anti-CD32	$\text{Fc}\gamma\text{RII}$
Anti-CD56	NK-Zellen
Anti-CD64	$\text{Fc}\gamma\text{RI}$

Nach der Bindungsreaktion werden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und mit 1%igem PFA fixiert. Bis zur Messung werden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung sollte innerhalb der nächsten 24 h erfolgen.

Sämtliche Messungen wurden am Durchflusszytometer LSRII durchgeführt und mithilfe der FACS-Diva- oder Winlist-*software* ausgewertet.

### 3.2.2.3 Fluoreszenzkonjugation von Antikörpern und FACS-basierte Bestimmung der Rezeptorabdeckung

TGN1412 wurde mit Alexa488 nach Protokoll des *Alexa Fluor 488 Monoclonal Antibody Labeling Kits* konjugiert. Der Alexa488-reaktive Farbstoff enthält einen Tetrafluorophenyl (TFP) Ester-Teil, welcher stark mit Proteinen interagiert und stabile Farbstoff-Protein Konjugate formt. Hierfür werden 100 µg TGN1412 mit 1 M Natrium Bicarbonat (100 µl) versetzt. Diese 100 µl TGN1412-Gemisch werden anschließend zu dem Farbstoff gegeben und unter mehrfachem Invertieren für 1 h bei RT inkubiert. Währenddessen wird eine Säule mit einem Aufreinigungsgranulat (Component C) versetzt und die Säule mit den 100 µl TGN1412-Farbgemisch tropfenweise beladen. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 1100 g für 5 min, so dass TGN1412-Alexa488 aufgereinigt wird. Ungebundener Farbstoff bleibt auf der Säule zurück.

Die CD28-Rezeptorabdeckung wurde basierend auf der FACS-Analyse bestimmt. Humane Blutproben werden mit unterschiedlichen Dosen an TGN1412, welcher vorher mit Alexa488 konjugiert wurde, gefärbt. Parallel dazu werden die Proben mit anti-CD3 gefärbt. Die %-spezifische Bindung wird bestimmt, indem der Median der TGN1412-Färbeintensität (von CD3-positiven Zellen) für jede Konzentration aufgenommen wird.

$$\% \text{ spezifische Bindung} = \frac{\text{Median (Probe)} - \text{Median von CD3}^+ \text{ T - Zellen}}{\text{Max Median} - \text{Median von CD3}^+ \text{ T - Zellen}} \times 100$$

Die maximale Färbung konnte experimentell nicht bestimmt werden und wurde berechnet.

### 3.2.2.4 Zellfärbung mit PKH26 und anschließender T-Zell Proliferationsanalyse

Mit Hilfe der PKH26-Zellfärbung ist es möglich, die Proliferation von T-Zellen zu messen. Hierbei wird der fluoreszierende Farbstoff PKH26 über eine lange aliphatische Kette in die

Lipidregionen von Zellmembranen inkorporiert und kann im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Bei einer Zellteilung wird das aufgenommene PKH26 gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt. Die so stufenweise abnehmende Fluoreszenzintensität des PKH26 und das gleichzeitige Expandieren der gefärbten Population liefert Aufschluss über die Anzahl der Zellteilungen.

Für die Färbung werden  $2 \times 10^7$  T-Zellen in 1 ml Diluent C resuspendiert und mit dem frisch angesetzten Farbstoff versetzt. Nach dem Mischen werden die Zellen 2-5 min mit dem Farbstoff inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml 1%igem BSA wird die Färbung gestoppt und 1 min inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml X-VIVO Medium werden die Zellen für 10 min bei 1200 rpm (300 g) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, und die Zellen werden erneut mindestens drei Mal mit 5 ml X-VIVO Medium gewaschen. Am Ende werden die  $2 \times 10^5$  Zellen pro 200  $\mu$ l Medium im 96-*well* ausgesät. Zur genauen Arbeitsanweisung siehe das dem Kit beiliegende Protokoll.

Zur Stimulation der T-Zellen wurden diese à  $2 \times 10^5/200 \mu$ l X-VIVO Medium ausgesät und mit TGN1412 [0,1; 1; 10  $\mu$ g/ml] teilweise in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper stimuliert. Nach 5 Tagen wurde die T-Zellproliferation durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.2.5 Zytokinbestimmung mittels eines ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*)**

Der ELISA ist eine Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zunutze, die an den nachzuweisenden Stoff binden. Die Proteinkonzentration kann durch Verwendung eines Enzyms als Marker anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. Bei einem wie hier verwendeten *Sandwich*-ELISA sind die monoklonalen Antikörper bereits auf der Mikrotiterplatte gebunden, und die Detektion erfolgt über doppelten Antikörpernachweis. Das in den Zellkulturüberständen vorkommende Protein wird im ersten Schritt über die Antikörper auf der Platte gebunden. Nach Entfernung der ungebundenen Proteine wird ein spezifischer Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper zugegeben, der wiederum an das gebundene Protein auf der Platte bindet. Das Enzym, welches in diesen Tests verwendet wird, ist eine Meerrettich-Peroxidase (HRP). Um das ungebundene Protein nun zu entfernen, erfolgen erneute Waschschrte und eine anschließende Zugabe einer Substratlösung. Als Substrat wirkt hier Tetramethylbenzidin (TMB), welches durch die HRP in ein blau-gefärbtes Produkt umgewandelt wird. Nach

Zugabe der Stopp-Lösung verfärbt sich das Produkt von blau nach gelb. An einem ELISA-Reader kann anschließend die Absorption der Lösung bestimmt werden.

Die Farbkonzentration verhält sich hierbei proportional zur gebundenen Proteinmenge. Über eine Standardkurve, welche in jedem Test mitgeführt wird, lassen sich die genauen Konzentrationswerte der Proteine ermitteln. Die Messung erfolgt mit Hilfe eines ELISA-Readers von Tecan und wird mit dem Programm *Tecan XRead Plus* ausgewertet.

Alle ELISA-Kits werden unter den von den Herstellern angegebenen Bedingungen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen eingesetzt.

### **3.2.2.6 Zytokinbestimmung mittels *FlowCytomix Bead array***

Der *FlowCytomix Bead array* ist eine Methode zum Nachweis mehrerer Proteine aus einem Zellkulturüberstand. Wie bei einem ELISA macht man sich Eigenschaft spezifischer Antikörper zunutze, die an den nachzuweisenden Stoff binden. Für die Messung mehrerer Zytokine in einem Ansatz wurde entweder das *FlowCytomix Human T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 11plex* oder das *Basic FlowCytomix Kit plus* einzelne Zytokine verwendet. Dieses Kit ermöglicht die Messung von mehreren Zytokinen gleichzeitig. Die Messung erfolgt nach dem Prinzip eines *Sandwich-Immunoassays*. Das Verfahren dieses Kits beruht auf Kügelchen, die mit Antikörpern dekoriert sind. Die verschiedenen Kügelchen unterscheiden sich zum einen in der Größe und zum anderen in der internen Fluoreszenzintensität. Ein Gemisch der verwendeten Kügelchen wird mit der Probe inkubiert. Anschließend wird ein Biotin-gebundener Zweitantikörper hinzugegeben. Zur Detektion wird Streptavidin-Phycoerythrin benutzt. Die Proben werden durchflusszytometrisch analysiert, wobei man die unterschiedlichen Zytokine anhand der Größe und der internen Fluoreszenz der Kügelchen voneinander trennen kann und die Zytokinmenge der Probe durch die Intensität des Phycoerythrin (PE) bestimmt wird. Zur genauen Arbeitsanweisung siehe dem Kit beiliegendes Protokoll.

### **3.2.2.7 Intrazelluläre Calcium-Messung**

Die intrazelluläre Calcium-Messung wurde am FACS gemessen. Hierfür kann man die sogenannten Calcium-sensitiven Farbstoffe wie Indo-1 verwenden. Indo-1 wirkt als Chelator, der intrazelluläres Calcium bindet, wobei eine Calcium-induzierte Verschiebung des Emissionsspektrums auftritt. In inaktivierten T-Zellen liegt Calcium im glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle vor. Nach Aktivierung der T-Zellen kommt



es zur Freisetzung des Calciums ins Cytosol, in dem es als wichtiger sekundärer Botenstoff fungiert. In Abhängigkeit davon, ob ein Calcium-Indo-1 Komplex vorliegt oder ob Indo-1 ungebunden ist, verschiebt sich die Emission von 525 nm (freies Indo-1) nach 405 nm (gebundener Calcium-Indo-1-Komplex). Das Verhältnis von freiem (inaktive T-Zelle) zu gebundenem Calcium (aktivierte T-Zelle) kann mit Hilfe des FACS bestimmt werden. Hierfür wurden  $2 \times 10^7$  T-Zellen in Phenolrot-freiem RPMI-Medium mit 10 % FCS mit 5 µg/ml Indo-1-AM für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die T-Zellen für weitere 45 min in frischem Phenolrot-freiem RPMI-Medium bei 37°C inkubiert. Ionomycin wurde als Positiv-Kontrolle zur Überprüfung des Beladens der T-Zellen mit Indo-1-AM sowie des maximalen Calcium-Flusses verwendet. Die Kinetik wurde mit *FlowJo Software* analysiert.

### 3.2.2.8 Herstellung von Tonsillenschnitten und deren Stimulation

Die Tonsillen wurden aus Patienten isoliert und in 6%igen Agar eingebettet. Anschließend wurden die Tonsillen am Vibratom in ca. 300 µm große Schnitte geschnitten. Pro Tonsille lassen sich 4-5 Schnitte anfertigen. Für die Stimulation der Tonsillenschnitte wurden diese in 1 ml X-VIVO Medium in ein *Insert* (Einsatz) einer 6-well Platte gegeben. Nach 24 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel (entspricht dem Nullwert), und die Schnitte wurden durch lösliche Zugabe auf die Tonsille mit TGN1412 stimuliert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden 50 µl Medium zur Zytokinbestimmung entnommen.

### 3.2.2.9 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann z.B. von *in vitro* kultivierten Geweben die Lokalisierung von Zellen analysiert werden. Die wie in Abschnitt 3.2.2.8 stimulierten Tonsillenschnitte wurden über Nacht mit 4 % PFA fixiert und mit PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden auf einem Schüttler bei 90 rpm durchgeführt. Die Schnitte wurden in 0,3 % PBS/Triton für 3 h vorbehandelt und anschließend mit PBS/Triton und Ziegen Serum (*normal goat serum*) für 2 h geblockt. Über Nacht wurde mit einem 1. Antikörper in PBS/Triton mit 0,5 % BSA gefärbt. Es erfolgten 3 Waschschriffe mit PBS für je 20 min. Die Tonsillenschnitte wurden mit einem 2. Antikörper für 2 h inkubiert, und anschließend erfolgten wieder 3 Waschschriffe à 20 min mit PBS. Anschließend wurde mit Hoechst (10 min) oder DAPI (1 min) gegengefärbt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern

ausgebreitet und mit *Dako Immunfluorescence Mounting Medium* oder Mowiol eingedeckelt. Alle Schnitte wurden kühl und lichtgeschützt gelagert.

Folgende Antikörper-Verdünnungen wurden verwendet:

1. Ak: rabbit anti-human CD3 (1:100) von Dako # M3074
2. Ak: anti-rabbit Alexa488, Alexa 568 oder Alexa633

1. Ak: mouse anti-human KI67 (1:100) von BD # 610969
2. Ak: goat anti-mouse Alexa488, Alexa 568 oder Alexa633

### **3.2.3 Molekularbiologische und gentechnische Arbeitstechniken**

#### **3.2.3.1 Sequenzierung**

Die Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Z. Waibler durchgeführt. Für die Sequenzierung des Oberflächenmoleküls CD28 wurde Blut von 14 *M. mulatta* (Rhesusaffen) und 11 *M. fascicularis* (Cynomolgusaffen) entnommen.

#### RNA Isolation

Aus dem Blut wird die RNA mittels *Paxgene RNA Blood Kit* (Qiagen) in Kombination mit *Paxgene Blood RNA tubes* (Preanalytix) nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### Reverse Transkription (RT)

Um genomische DNA zu entfernen, werden 3 µl der isolierten RNA mit 1 µl DNase I (RNase-frei) und 6 µl DEPC-Wasser behandelt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgt nach folgendem Protokoll:

- 7 µl DNase behandelte RNA
- 1 µl Oligo dT Primer
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 4 µl DEPC-Wasser

Die Inkubationsdauer beträgt 5 min bei 65°C. Anschließend wird die Probe auf Eis gestellt.

4 µl 5fach *first-strand-buffer*

2 µl DTT (0,1 M)

Die Probe wird für 2 min bei 42°C inkubiert.

Mit 1 µl Superskript II (Invitrogen) wird die cDNA bei einem Inkubationsschritt von 50 min bei 42°C sowie 15 min bei 70°C generiert.

Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wird außerdem DNase-behandelte RNA als Matrizenstrang für die Amplifikation von GAPDH verwendet.

### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich definierte Nukleinsäure-Bereiche amplifizieren. Für die Reaktion werden hitzebeständige Polymerasen eingesetzt. Als DNA-Polymerase wurde die HotStarTaq verwendet, welche zu Beginn durch Inkubation von 15 min bei 94°C aktiviert wird. Für einen Reaktionsansatz mit 50 µl Gesamtvolumen werden die folgenden Zusammensetzungen verwendet:

5 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen)

5 µl 5'-Primer (5 pm/µl)

5 µl 3'-Primer (5 pm/µl)

2 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

0,2 µl Taq (5 U/µl)

27,8 µl Aqua dest.

2 µl DNA

Das PCR-Reaktionsgemisch wird 15 min bei 94°C inkubiert und durchläuft daraufhin 35-40x den folgenden Zyklus im Thermocycler:

Denaturierung: 94°C 30 s

Hybridisierung der Oligonukleotide: 58°C GAP-DH 30 s

Polymerasereaktion: 72°C 60 s

Anschließend wird der Ansatz für weitere 10 min bei 72°C inkubiert und dann auf 4°C gekühlt. Das Amplifikat wurde durch Auftragen eines Aliquots auf ein Agarosegel

nachgewiesen. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wird außerdem DNase-behandelte RNA als Matrizenstrang für die Amplifikation von GAPDH verwendet.

Die Primer für die Amplifikation sind folgende (Sequenz aufgeführt in 5' nach 3' Orientierung):

GAPDH: ACCACAGTCCATGCCATCAC und TCCACCACCCTGTTGCTGTA

CD28: CTCACACTTCGGGTTCTCG und GGTCATTTCTATCCAGAGC

Auftretende Punktmutationen in der Nukleotidsequenz der unterschiedlichen Spezies waren still, da sie zu keinem Aminosäureaustausch führten.

### Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mit Hilfe eines Agarosegels entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch die negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Kleinere DNA-Fragmente können im elektrischen Feld im Vergleich zu größeren die Gelmatrix schneller durchlaufen. Diese Eigenschaft wird zur Auftrennung nach Größe genutzt. Für den Nachweis und die Auftrennung von DNA werden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierfür wird die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer (50x TBE-Puffer: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0), ad 1 l) unter Erwärmung gelöst und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Vor dem Auftragen werden die DNA-Lösungen mit DNA-Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer enthält Glycerin, welches die DNA-Lösung beschwert, die dadurch zum Taschenboden sinkt und ihre Diffusion aus den Taschen verhindert. An die Elektrophoresekammer wird eine Spannung von etwa 80 Volt angelegt, und nach etwa 60 min wird das Agarosegel unter UV-Licht fotografiert. Aufgrund der Interkalierung des fluoreszierenden Ethidiumbromids erscheint im UV-Licht an der Stelle der DNA eine leuchtende Bande. Mit dem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandard ist eine Zuordnung der Bande zu einer bestimmten Größe möglich.

### **3.2.4 Statistik**

Alle statistischen Analysen wurden von K.-M. Hanschmann durchgeführt. Für die Signifikanz-Berechnung der Proliferationsdaten wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) für multiple Vergleiche nach der Bonferroni-Methode adjustiert. Für die Signifikanz-

Berechnung der Zytokindaten wurden alle Werte vorher logarithmiert. Abgesehen von Abbildung 4.11, in der ein t-Test Anwendung fand, wurde anschließend eine 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und die p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) wiederum nach der Bonferroni-Methode adjustiert.

## 4 Ergebnisse

Immunregulatorische Antikörper werden zunehmend für therapeutische Ansätze genutzt (Scolnik, 2009). Der superagonistische CD28-spezifische monoklonale Antikörper (mAk) TGN1412 besitzt als schwere Kette die  $\gamma$ -Kette und gehört der IgG4-Antikörperklasse an. Der humanisierte mAk TGN1412 wurde gentechnisch aus dem Maus anti-human CD28-spezifischen superagonistischen mAk 5.11A1 (TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a) generiert. Die CDRs (*Complementarity determining regions*) der variablen Region ( $V_H$  und  $V_L$ ) von TGN1412 wurden mit den konstanten Anteilen der  $\kappa$ -Kette und der IgG4-Kette des Menschen kombiniert. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass in humanen Blutproben aus B-CLL Patienten vornehmlich regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) aktiviert wurden. Weiterhin konnte in Nagern gezeigt werden, dass mit TGN1412 vergleichbare, Nager-spezifische anti-CD28 superagonistische mAk zur Prophylaxe und zur Behandlung von Autoimmunerkrankheiten effektiv waren (Beyersdorf *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2003). In nicht-humanen Primaten wurden *in vivo* Toxizitätsstudien mit TGN1412 durchgeführt. Dabei traten keine TGN1412-abhängigen Zeichen von Toxizität, Hypersensitivität oder massiver Aktivierung des Immunsystems auf. In einer Phase-I Studie verursachte TGN1412 jedoch eine massive Aktivierung von Immunzellen, was einen Zytokinsturm zur Folge hatte.

Jeder Antikörper besteht aus zwei Fab-Teilen, über die spezifisch ein Antigen gebunden wird, und einem Fc-Teil, über dessen Bindung andere Zellen und Moleküle aktiviert werden. Das F(ab)<sub>2</sub>-Fragment von TGN1112, einer IgG1-Variante von TGN1412, war in präklinischen Tests nicht in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (Hanke *et al.*, 2006), wodurch klar wurde, dass für die vollständige Funktion von TGN1412 der Fc-Teil eine große Rolle spielt. Da im Falle von TGN1412 Fc-vermittelte Interaktionen über Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) vermieden werden sollten und IgG4-Antikörper generell geringe Bindungen mit Fc $\gamma$ R eingehen, wurde TGN1412 als ein IgG4-Antikörper entwickelt.

Nach intravenöser Applikation eines Antikörpers sind Endothel- und Blutzellen die ersten Zellpopulationen, die mit den Antikörpern in Kontakt treten. Da diese Zelltypen u.a. Fc $\gamma$ R auf ihrer Oberfläche exprimieren, könnten diese Zellen über die Interaktion ihrer Fc $\gamma$ R mit den TGN1412-gebundenen T-Zellen somit für die frühen Nebenwirkungen verantwortlich sein. Dennoch traten in präklinischen Studien nach Applikation von TGN1412 in Makaken

keinerlei Nebenwirkungen auf. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob TGN1412 speziesspezifische Unterschiede zwischen dem Menschen und nicht-humanen Primaten in der Bindung an das Zielantigen, der Rezeptorabdeckung und der DNA-Sequenz von CD28 aufweist. Es wurde untersucht, ob darüber hinaus TGN1412 nur an CD28 auf T-Zellen bindet, und ob Interaktionen über FcγR auf weiteren Zelltypen bestehen.

#### **4.1 Ursachenforschung zur speziesspezifischen Wirkweise des superagonistischen anti-CD28 mAk TGN1412**

Bislang gibt es nur unklare Vorstellungen über mögliche Ursachen für die durch TGN1412 ausgelösten Nebenwirkungen im Menschen. Es stellte sich daher die Frage, ob ggf. speziesspezifische Unterschiede in der Sequenz des Zielantigens sowie in der Signaltransduktion im Zusammenhang mit den schweren Nebenwirkungen in der Phase-I Studie stehen. Daher wurde zwischen dem Menschen und nicht-humanen Primaten ein Sequenzvergleich des Oberflächenmoleküls CD28 durchgeführt. Des Weiteren wurden die Expressionsmenge an CD28 und die Signaltransduktion zwischen den Primaten *M. mulatta* und *M. fascicularis* und dem Menschen analysiert.

##### **4.1.1 Sequenzvergleich der CD28-Domäne von *Homo Sapiens*, *Macaca fascicularis* und *Macaca mulatta***

Die *European Medicines Agency* (EMA) schreibt in ihrer Anleitung für „*preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals*“ vor, dass zur Testung von mAk relevante Spezies herangezogen werden sollen. Die Richtlinie (*European Medicines Agency* (EMA), 1998a) definiert, dass solche Spezies als relevant zu klassifizieren sind, in denen der Rezeptor oder das Epitop analog ist, so dass das zu untersuchende Testmaterial pharmakologisch vergleichbar aktiv ist. Makaken besitzen das gleiche Epitop für TGN1412 wie der Mensch. Nager besitzen ein entsprechendes Epitop zu dem orthologen TGN1412-Antikörper. Laut Definition sind somit sowohl Makaken als auch Nager als prädiktives Modell für die Testung von TGN1412 zulässig. Nach den akut auftretenden Nebenwirkungen in der Phase-I Studie wurde in der Literatur die Relevanz der in der Präklinik untersuchten Testspezies kontrovers diskutiert. In diesem Zusammenhang wurden auch Daten zur Expression des Rezeptors CD28 und des Bindungsepitops von TGN1412 an CD28 debattiert. Während in der *Investigator's brochure* von TeGenero eine 100%ige Homologie zwischen der humanen und der nicht-

humanen-Primaten CD28-Binderegion beschrieben ist, zeigen Kenter *et al.* Aminosäurenunterschiede in der Bindedomäne von CD28 (Kenter und Cohen, 2006). Diese Diskrepanz ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1: Übersicht der publizierten CD28-Sequenzen (mRNA) von Makaken**

Datum der Veröffentlichung	Gen-Informations-Nummer	Autor	Anzahl der Aminosäureunterschiede in der Sequenz von CD28 zw. Makaken und Mensch
2001	13650007	Villinger	9
2001	111074557	Villinger	9
Sommer 2006	111144662	Feild	4
Februar 2007	112817616 ersetzt 111074557	Villinger	4

Wie in Tabelle 4.1 zu sehen ist, wurde 2001 von Villinger *et al.* die Sequenz von CD28 von *M. mulatta* im *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mit der Gen-Information (GI)-Nummer 13650007 und der GI-Nummer 111074557 publiziert. Diese beiden Sequenzen unterscheiden sich im Vergleich zu der humanen in neun Aminosäuren. Des Weiteren wurde 2006 von Feild *et al.* die CD28-Sequenz von *M. mulatta* mit der GI-Nummer 111144662 publiziert, welche im Vergleich zu der humanen Sequenz nur vier der neun beschriebenen Aminosäureunterschiede aufweist. 2007 wurde anschließend von Villinger *et al.* die CD28-Sequenz mit der GI-Nummer 111074557 durch die CD28-Sequenz mit der GI-Nummer 112817616 ersetzt, welche auch nur vier Aminosäureunterschiede aufweist. Bei den Aminosäureunterschieden liegt eine der vier Aminosäuren im Signalpeptid und drei Aminosäuren in der Transmembrandomäne. Um Klarheit zu schaffen, ob bzw. wie viele Unterschiede in der Sequenz von CD28 zwischen Makaken und dem Menschen vorhanden sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die cDNA von CD28 von 14 *M. mulatta* und 11 *M. fascicularis* Individuen sequenziert und mit der humanen Sequenz (NM\_006139, BC112085, BC093698) verglichen. Hierfür wurden Makaken unterschiedlichen Ursprungs verwendet, so dass allelische Unterschiede in der Sequenz von CD28 berücksichtigt wurden. Für die Sequenzierung von CD28 wurde aus dem Blut von *M. mulatta* und *M. fascicularis* jeweils die RNA isoliert, die cDNA generiert und die Sequenz des Oberflächenmoleküls CD28 amplifiziert. Nach der Sequenzierung



durch die Firma MWG wurden die Sequenzen von CD28 der drei Spezies miteinander verglichen (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1: Die primäre Aminosäuresequenz der extra- und intrazellulären Domäne von CD28 ist in humanen und nicht-humanen Primaten identisch.**

Aus Immunzellen der oben genannten Primatenspezies wurde RNA isoliert, die in cDNA umgeschrieben wurde, und mit der CD28-Sequenz des Menschen verglichen. Die cDNA wurde mittels PCR amplifiziert, und die PCR-Produkte wurden sequenziert. Die DNA-Sequenz von 11 Individuen der Spezies *M. fascicularis* und 14 Individuen der Spezies *M. mulatta* wurde mit der Sequenz von *H. sapiens* (accession NM\_006139, BC112085 oder BC093698) verglichen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist gezeigt. Die roten Boxen markieren zum einen die Signalsequenz des 5'-Bereichs und zum anderen die Transmembranregion. Die erste Aminosäure der Transmembranregion wird in verschiedenen Berichten als Lysin (K) in Position 151 oder als Phenylalanin (F) in Position 153 angegeben. Grau hinterlegte Aminosäuren der Transmembranregion zeigen die Bindestelle des monoklonalen Antikörpers TGN1412 (Evans *et al.*, 2005).

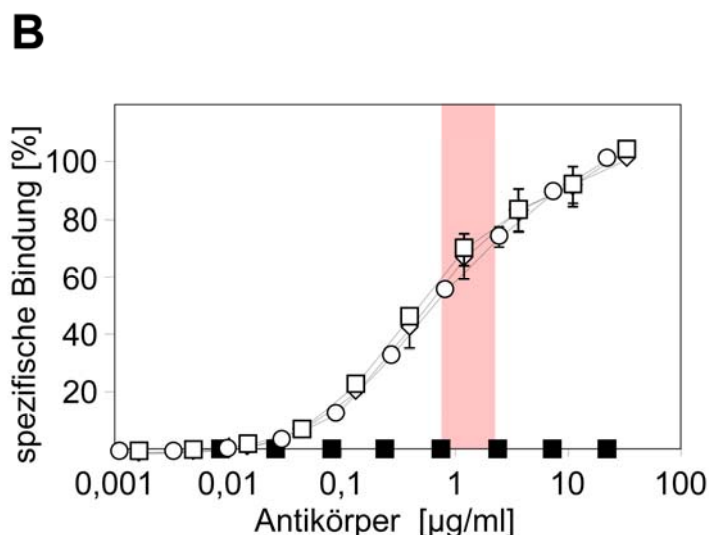
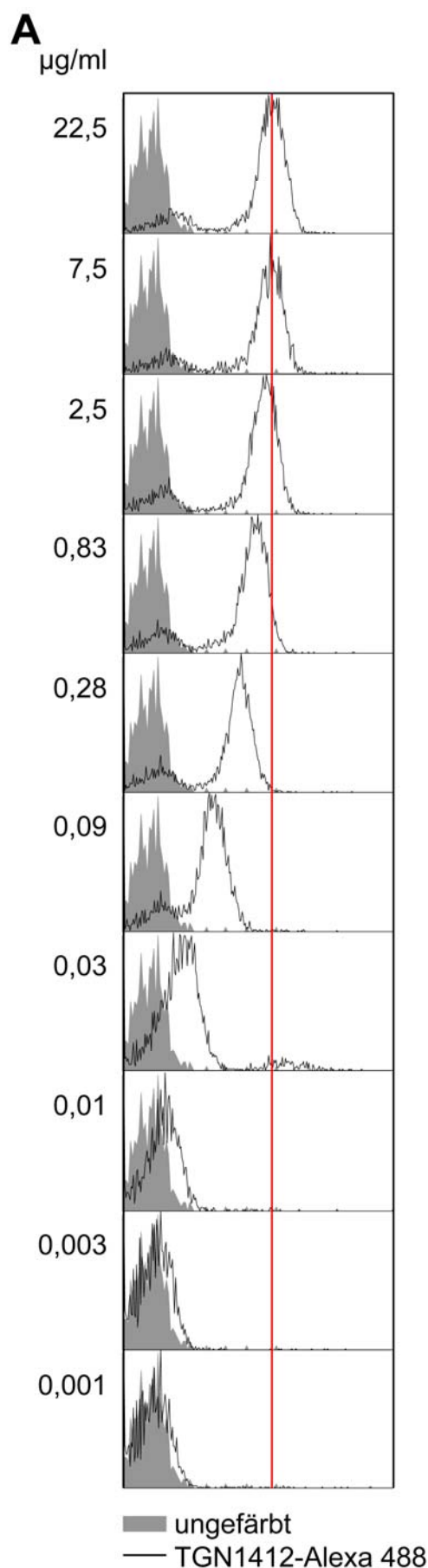
In Abbildung 4.1 ist die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des CD28-Rezeptors von *H. sapiens* sowie der beiden in der Präklinik verwendeten Makaken-Spezies *M. fascicularis* und *M. mulatta* abgebildet. Die Aminosäuresequenz aller Affen-Individuen ist identisch. In der Signalsequenz (*Leader*) ist ein nicht-konservierter Aminosäureunterschied (Phenylalanin (F) → Leucin (L)), und in der Transmembrandomäne sind drei nicht-konservierte Aminosäureunterschiede (Valin (V) → Alanin (A); Isoleucin (I) → Cystein (C); Valin (V) → Methionin (M)) in der humanen und

der makaken Sequenz zu identifizieren. Sowohl die extrazelluläre Domäne als auch der cytoplasmatische Teil sind zwischen den Spezies vollständig konserviert.

Es konnte gezeigt werden, dass der komplette extrazelluläre Bereich und insbesondere die Bindestelle für TGN1412 (in grau) zwischen Mensch und Makaken konserviert ist und somit nicht für die unterschiedlichen Wirkungen des Antikörpers TGN1412 in nicht-humanen Primaten und dem Menschen verantwortlich zu sein scheint.

#### **4.1.2 CD28-Abdeckung nach TGN1412-Bindung von T-Zellen**

Für die Dosisfindung von Antikörper-basierten Phase-I Studien im Menschen stellt die Rezeptorabdeckung ein wichtiges Kriterium dar. Um nach dem TGN1412-Zwischenfall die Rezeptorabdeckung zu bestimmen und somit in Zukunft Risiken zu minimieren, hat eine Expertengruppe in Großbritannien Berechnungen zur Rezeptorabdeckung von CD28 vorgenommen (*Expert Group on Phase One Clinical Trials: Chairman Duff, 2006*). Diese Berechnungen beruhen auf Daten, die mittels der *BIAcore* Methode erhoben wurden. Hierfür wird ein Ligand an der Oberfläche eines polymeren Matrixgels immobilisiert, ein Analyt in einer Flusskammer dazu gegeben und über Assoziations- und Dissoziationskonstanten die Affinität bestimmt. Zur Kalkulation der Rezeptorabdeckung ist es jedoch wünschenswert, anstelle von Daten aus der *BIAcore*-Analyse Daten zur Verfügung zu haben, die die tatsächlichen Bedingungen *in vivo* (prozentualer Anteil von CD28-positiven Zellen im Blut, Anzahl von CD28-Molekülen pro Zelle, Zugänglichkeit des Epitops in nativer Faltung etc.) widerspiegeln. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine einfache FACS-basierte Methode entwickelt, um die Rezeptorabdeckung mit Hilfe primärer humaner T-Zellen zu bestimmen (Abb. 4.2).



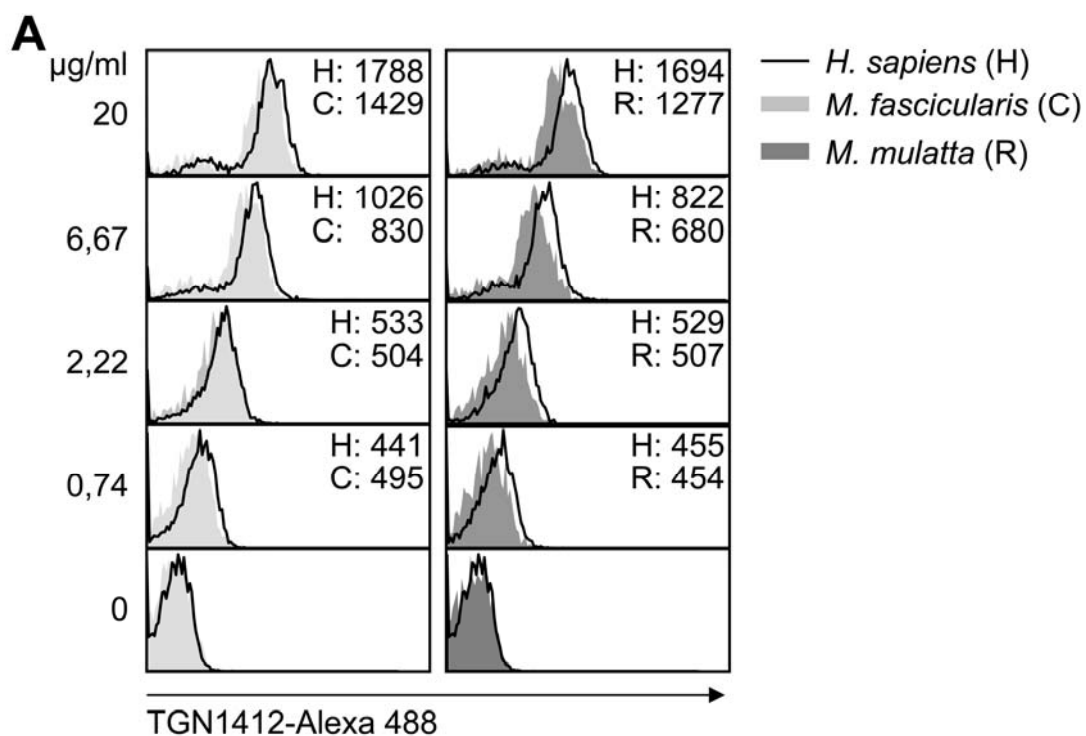
**Abbildung 4.2: FACS-basierte Bestimmung der Rezeptorabdeckung.**

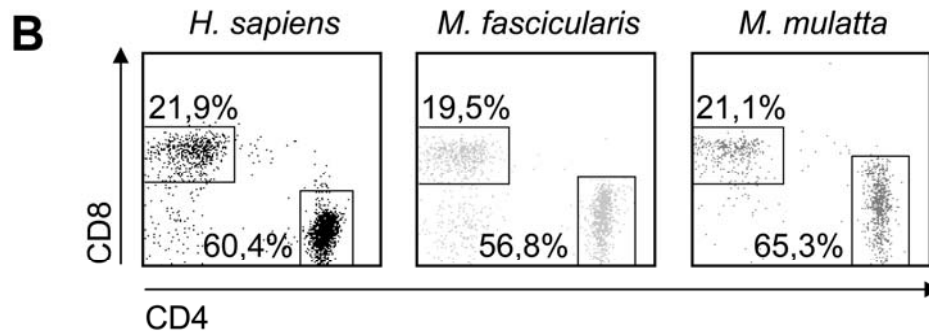
(A) Humane Blutproben wurden mit TGN1412-Alexa488 in den angegebenen Konzentrationen [µg/ml] und anti-human CD3 in einem Volumen von 50 µl gefärbt. FACS-Analysen zeigen CD3<sup>+</sup> TGN1412-Alexa488-gefärbte T-Zellen (schwarze Kurve). Als Negativ-Kontrolle dienten CD3 einfach gefärbte Proben (grau hinterlegte Kurve). Die rote Linie kennzeichnet das Maximum an spezifischer Färbung bei höchster TGN1412-Konzentration. (B) Der Median von CD3<sup>+</sup> TGN1412-Alexa488-gefärbten T-Zellen wurde von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten bestimmt. Die %-spezifische Bindung wurde mit folgender Formel berechnet: %-spezifische Bindung = (Median der Probe – Median der CD3<sup>+</sup> Einzelfärbung) / (Median Max – Median der CD3<sup>+</sup> Einzelfärbung) X 100. Die Ergebnisse von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind durch □, ○ und ◇ dargestellt. □ und ○ zeigen 2 separat durchgeführte Experimente mit identischem Lot von TGN1412-Alexa488. ◇ zeigt 1 Experiment, welches mit einem weiteren Lot an TGN1412-Alexa488 durchgeführt wurde. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen von 2-3 Spendern. Es sind 3 von 8 Experimenten dargestellt. Als Negativ-Kontrolle wurden CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab-Alexa488 (■, CD20 wird nicht auf T-Zellen exprimiert) gefärbt. Der rote Balken repräsentiert den Bereich der TGN1412 Konzentration, die theoretisch in einer Person (70 kg) mit einem Plasma-Volumen zwischen 2,5 und 3,99 l bei einer Dosis von 0,1 mg/kg TGN1412 vorhanden war. Folglich hat eine vermeintliche Rezeptorabdeckung zwischen 45 % - 80 % in den Probanden vorgelegen (Waibler *et al.*, 2008).

Die Bestimmung der CD28-Rezeptorabdeckung nach TGN1412 Stimulation wurde mittels eines FACS-basierten Tests durchgeführt. Hierfür wurde TGN1412 direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert und humanes peripheres Blut mit abnehmenden Konzentrationen dieses Antikörpers und einem anti-CD3-Antikörper co-gefärbt (Abb. 4.2 A; ein repräsentativer Spender ist gezeigt). Erwartungsgemäß fand bei hohen Antikörperkonzentrationen eine stärkere CD28-Färbung statt als bei geringeren Konzentrationen. Aus den FACS-Daten (Abb. 4.2 A) wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität bestimmt, um die %-spezifische Bindung zu berechnen. Zur Berechnung der Rezeptorabdeckung geht man davon aus, dass eine 70 kg schwere Person ein Plasma-Volumen zwischen 2,5 und 3,99 l besitzt (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006*). Die %-spezifische Bindung wurde aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten (weiße Symbole) mit jeweils 2-3 Spendern pro Experiment berechnet (Abb. 4.2 B). Erwartungsgemäß war die Rezeptorabdeckung bei niedrigen Konzentrationen (0,1 µg/ml) an mAk TGN1412 im Experiment geringer als bei höheren Konzentrationen (10 µg/ml) (Abb. 4.2 B). Der rote Balken kennzeichnet den Bereich mit der Konzentration an TGN1412, die (bei oben beschriebenen Parametern und dem Blut als einzigem Verteilungskompartiment) im Blut der Probanden bei einer Dosierung von 0,1 mg/kg vorgelegen hatte. Bei der Dosierung von 0,1 mg/kg, die bei der Ersterprobung von TGN1412 in den Probanden eingesetzt worden ist, lag somit die Rezeptorabdeckung zwischen 45 % und 80 % (roter Balken; Abb. 4.2 B). Als Negativ-Kontrolle wurde der mAk Rituximab, der an CD20 auf B-Zellen bindet, fluoreszenzmarkiert und humanes peripheres Blut mit abnehmenden Konzentrationen dieses Antikörpers in Kombination mit einem anti-CD3-Antikörper gefärbt (schwarze Kästen). Als weitere Kontrolle wurden CD3<sup>+</sup> T-Zellen direkt mit TGN1412 und einem fluoreszierenden Zweitantikörper gegen den konstanten Anteil von TGN1412 gefärbt. Diese Färbung mit unmarkiertem TGN1412 in Kombination mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper war vergleichbar zu der Färbung mit direkt fluoreszenzmarkiertem TGN1412 (Daten nicht gezeigt). Auch die Zugabe von bis zu 90 % unmarkiertem TGN1412 zu TGN1412-Alexa488 reduzierte zwar die Fluoreszenzintensität, aber die prozentuale Rezeptorabdeckung blieb unverändert (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich erstmals Berechnungen für die Rezeptorabdeckung durchführen ließen, die auf direkter experimentell bestimmter Bindung basieren. Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Berechnungen einer Expertengruppe, die auf

eine theoretische Abdeckung von 86 % bis 90 % (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006*) gekommen ist.

In Makaken (*M. fascicularis*) kam es nach Applikation des mAk TGN1412 während einer Toxizitätsstudie zu keinen Nebenwirkungen. Um auszuschließen, dass die Bindung von TGN1412 an CD28 unterschiedlich auf humanen und makaken T-Zellen ist, wurde der oben beschriebene Test zur experimentellen Bestimmung der Rezeptorabdeckung in abgewandelter Form eingesetzt. Dazu wurden CD3<sup>+</sup> T-Zellen von *M. fascicularis* (Abb. 4.3 A, links) oder *M. mulatta* (Abb. 4.3 A, rechts) mit CD3-PE gefärbt und im Verhältnis 1:1 mit humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen (gefärbt mit CD3-APC) gemischt. Das T-Zell-Gemisch wurde anschließend mit steigender Konzentration TGN1412-Alexa488 gefärbt und die Intensität der gefärbten T-Zellen durchflusszytometrisch miteinander verglichen. In allen getesteten Konzentrationen war die Intensität von TGN1412-Alexa488 auf humanen T-Zellen (schwarze Linie) mit T-Zellen von *M. fascicularis* (hellgrau) bzw. T-Zellen von *M. mulatta* (dunkelgrau) vergleichbar. Eine gleich starke Färbung von T-Zellen beider Spezies bedeutet eine vergleichbare Bindung von TGN1412 an humanes CD28 und CD28 von nicht-humanen Primaten.





**Abbildung 4.3: Die Bindung von TGN1412 an T-Zellen sowie die Verteilung von T-Zellen im Blut ist zwischen nicht-humanen Primaten und dem Menschen vergleichbar.**

(A) Isolierte CD3<sup>+</sup> humane T-Zellen wurden mit einem anti-CD3-APC Antikörper und CD3<sup>+</sup> makaken T-Zellen mit einem anti-CD3-PE Antikörper gefärbt. Die T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit steigender Konzentration TGN1412-Alexa488 gefärbt. FACS-Analysen zeigen die Bindung von TGN1412 an CD3<sup>+</sup> (APC) humane T-Zellen (schwarz) sowie die Bindung an CD3<sup>+</sup> (PE) T-Zellen von *M. fascicularis* (grau; links) bzw. von *M. mulatta* (grau; rechts). Zahlenwerte geben die *Mean*-Fluoreszenzintensität der Proben an. (B) Das Verhältnis von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> zu CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in humanen und makaken Blutproben wurde durchflusszytometrisch untersucht (Sender *et al.*, 2008).

Da die Bindung von TGN1412 an T-Zellen zwischen den drei getesteten Spezies vergleichbar war, stellte sich die Frage, ob Unterschiede in der Zellverteilung im Blut vorliegen. Aus diesem Grund wurde die prozentuale Verteilung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von allen 3 Spezies untersucht (Abb. 4.3 B). Hierfür wurden Blutzellen mit einem anti-CD3- und anti-CD4- bzw. anti-CD3- und anti-CD8-Antikörper gefärbt. Anschließend wurde die prozentuale Verteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. FACS-Analysen in Abbildung 4.3 B zeigen das gleiche Verhältnis von CD4<sup>+</sup> (80 %) zu CD8<sup>+</sup> (20 %) T-Zellen in Blutproben humanen und makaken Ursprungs.

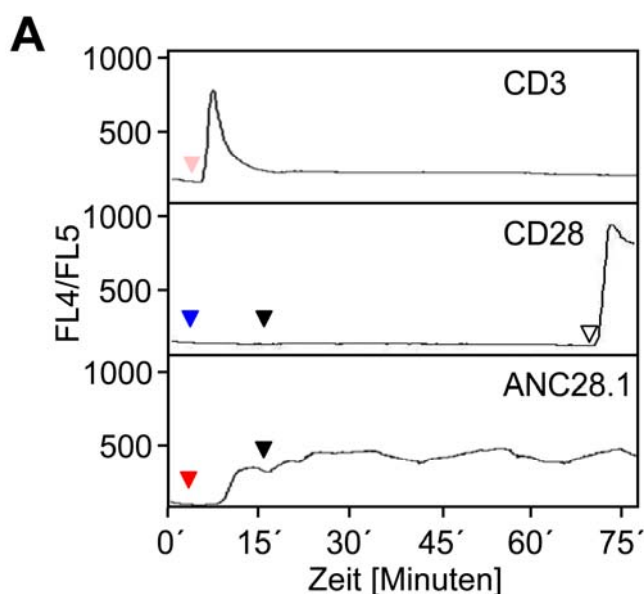
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die extrazelluläre Domäne von CD28, sowie die Bindung von TGN1412 als auch die prozentuale Verteilung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut in den drei Spezies *M. mulatta*, *M. fascicularis* und dem Menschen vergleichbar ist.

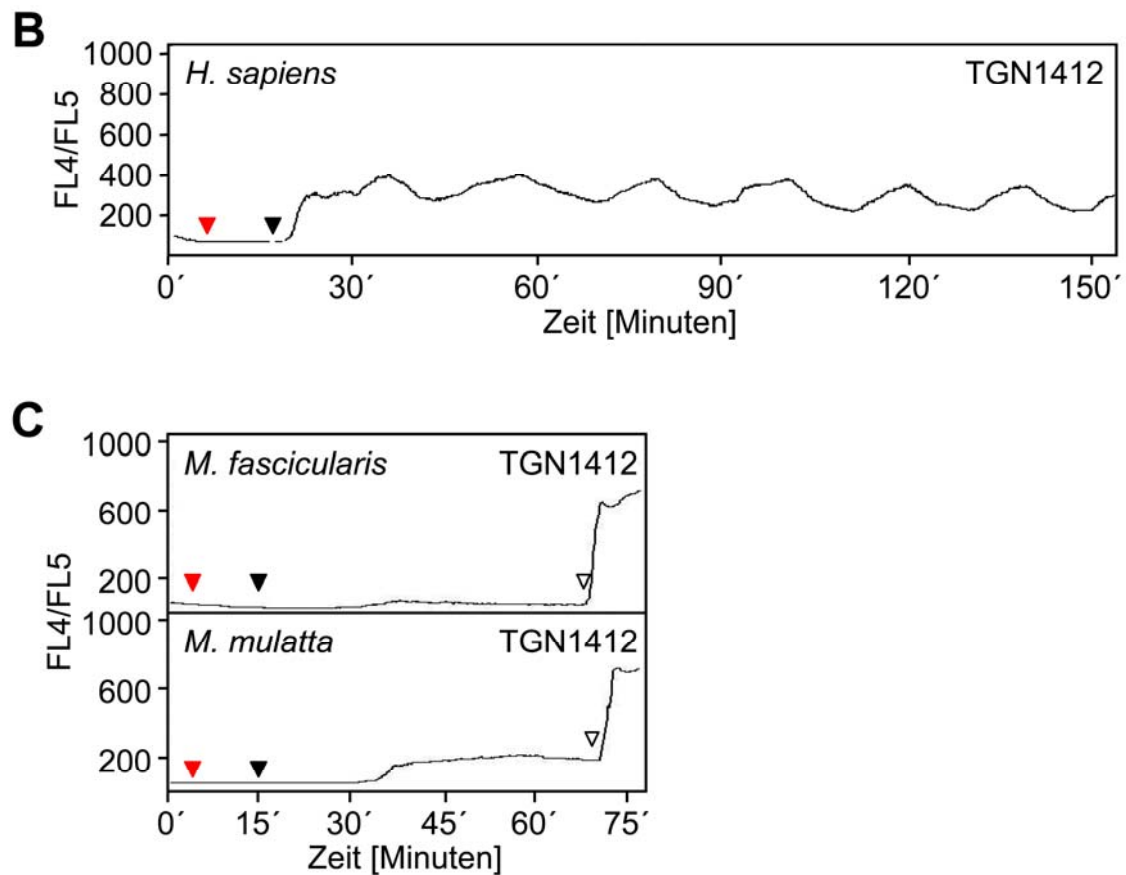
## 4.2 Aktivierung von T-Zellen nach Behandlung mit dem mAk TGN1412

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über zwei Signale. Das erste Signal bildet die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an den MHC-Antigen-Komplex einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC). Die Bindung von B7, welches sich auf der APC befindet, an CD28 auf der T-Zelle fungiert als zweites Signal. Jeder TCR ist mit einem CD3-Oberflächenmolekül assoziiert. Durch die Bindung des Komplexes leitet dieser das Aktivierungssignal über die  $\zeta$ -Kette ins Zellinnere. Ist eine T-Zelle aktiviert, kommt es u.a. zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER ins Cytosol, zur Proliferation von T-Zellen und zur Sekretion von Zytokinen. Im Gegensatz zur konventionellen Aktivierung von T-Zellen, die beide Signale beinhaltet, sind superagonistische Antikörper in der Lage, ohne die Bindung des TCRs T-Zellen zu aktivieren.

### 4.2.1 Calcium-Freisetzung nach Aktivierung der T-Zellen durch TGN1412

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von T-Zellen durch TGN1412 die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytosol beinhaltet, wurden T-Zellen mit dem Farbstoff Indo-1 gefärbt, welcher nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  ein verändertes Emmissionsspektrum aufweist. Das Verhältnis (FL4/FL5) von freiem (im ER) und gebundenem  $\text{Ca}^{2+}$  (im Cytosol) wurde mittels FACS analysiert (Abb. 4.4).





**Abbildung 4.4:** Im Vergleich zur anhaltenden Calcium-Freisetzung von humanen T-Zellen nach TGN1412-Behandlung zeigen makaken T-Zellen nach TGN1412 Stimulation eine reduzierte Calcium-Freisetzung.

(A)  $1 \times 10^6$  isolierte Indo-1 gefärbte humane T-Zellen wurden mit 1:50 v/v verdünnter Ascitesflüssigkeit des anti-CD3 mAk MEM92 (rosa Dreieck), mit  $10 \mu\text{g/ml}$  konventionellem CD28 mAk (CD28.2; blaues Dreieck) und  $20 \mu\text{g/ml}$  polyklonalem Maus-Serum (schwarzes Dreieck) oder mit  $10 \mu\text{g/ml}$  des superagonistischen CD28-spezifischen mAk ANC28.1 (rotes Dreieck) und  $20 \mu\text{g/ml}$  polyklonalem Maus-Serum (schwarzes Dreieck) stimuliert. (B)  $1 \times 10^6$  isolierte Indo-1 gefärbte T-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  des superagonistischen CD28-spezifischen mAk TGN1412 stimuliert (rotes Dreieck). Zur Kreuzvernetzung wurde ein monoklonaler anti-human IgG4-Antikörper verwendet (schwarzes Dreieck). (C)  $1 \times 10^6$  isolierte makaken T-Zellen wurden mit dem Farbstoff Indo-1 gefärbt und mit  $10 \mu\text{g/ml}$  TGN1412 (rotes Dreieck) behandelt. Zur Kreuzvernetzung wurden  $20 \mu\text{g/ml}$  anti-IgG4 (schwarzes Dreieck) hinzugegeben. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde durchflusszytometrisch für 75-150 min analysiert. Zur Kontrolle der Viabilität und der korrekten Färbung mit Indo-1 wurde Ionomycin ( $10 \mu\text{g/ml}$ ; weißes Dreieck) am Ende des Experiments hinzugegeben (Sender *et al.*, 2008).

Nach Gabe des mAk anti-CD3 MEM92 zu den humanen mit Indo-1 gefärbten T-Zellen (rosa Dreieck) kam es direkt zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytosol, was an einem veränderten Verhältnis der beiden Fluoreszenzen FL4/FL5 zu erkennen ist. Die



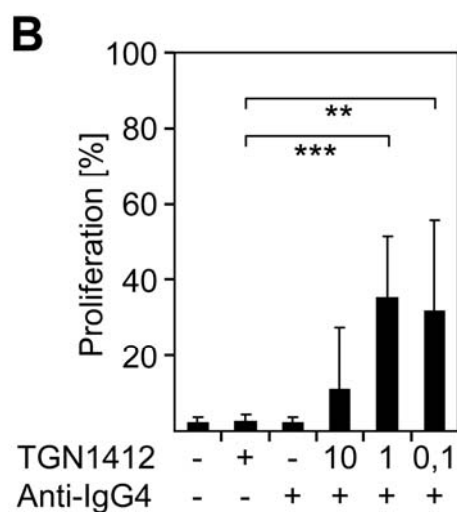
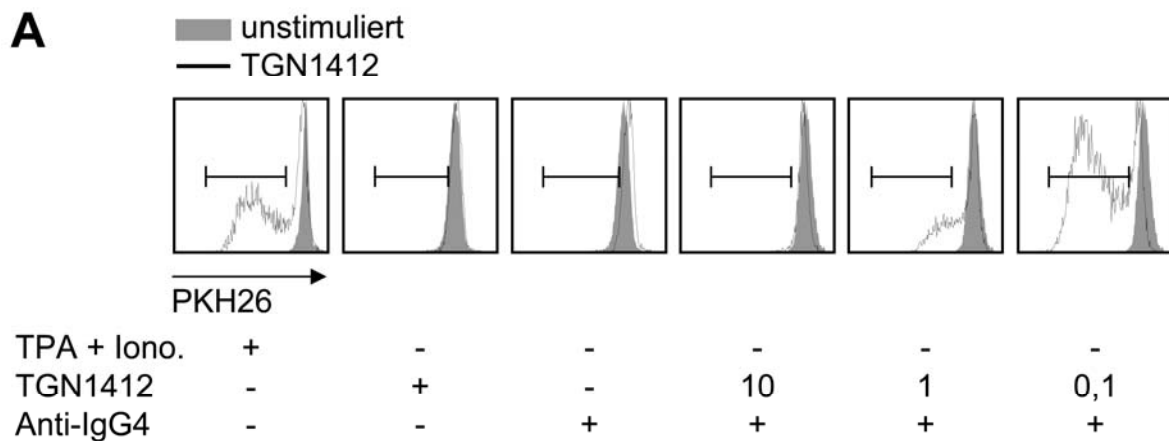
Stimulation mit einem nicht superagonistischen anti-CD28 mAk (blaues Dreieck) führte hingegen zu keiner Sekretion von  $\text{Ca}^{2+}$ . Auch nach Kreuzvernetzung dieses Antikörpers durch Zugabe von polyklonalem Maus-Serum (schwarzes Dreieck) wurde keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induziert. Als Kontrolle der Viabilität der T-Zellen wurde am Ende des Experiments zur Aktivierung der T-Zellen Ionomycin (weißes Dreieck) hinzugegeben. Nach Stimulation mit einem superagonistischen CD28 mAk (rotes Dreieck) wurde  $\text{Ca}^{2+}$  in geringem Maße freigesetzt, wohingegen nach weiterer Zugabe von polyklonalem Maus-Serum ein lang anhaltender  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstoß ins Cytosol induziert wurde (Abb. 4.4. A). In Abbildung 4.4 B wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung von humanen T-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Zugabe des superagonistischen CD28-spezifischen mAk TGN1412 zu humanen T-Zellen kein  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzt. Erst nach weiterer Zugabe eines anti-humanen IgG4 mAk, der gegen die konstanten Anteile von TGN1412 gerichtet ist, kam es zu einer lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. In Abbildung 4.4 C wurden T-Zellen von *M. fascicularis* und *M. mulatta* mit Indo-1 gefärbt und mit dem superagonistischen mAk TGN1412 (rotes Dreieck) stimuliert. Selbst nach weiterer Gabe des anti-humanen IgG4-mAk war nur eine schwache oder keine Verschiebung im Verhältnis FL4/FL5 detektierbar, d.h. es wurde kein bzw. nur wenig  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass nach Behandlung mit TGN1412 und anschließender Zugabe eines anti-IgG4-Antikörper in humanen T-Zellen ein massiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstoß als Maß für die T-Zellaktivierung induziert wurde, während in T-Zellen aus *M. fascicularis* oder *M. mulatta* nach gleicher Behandlung kein oder nur ein sehr schwacher  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstoß induziert wurde. Eine Erklärung, warum in präklinischen Tests in nicht-humanen Primaten nach Behandlung mit TGN1412 keinerlei Toxizitätssignale gefunden wurden, während bei der Erstbehandlung von Menschen ein lebensbedrohlicher Zytokinsturm induziert wurde, könnte somit in einer unterschiedlichen Signalweiterleitung in TGN1412 stimulierten T-Zellen des Menschen gegenüber der in nicht-humanen Primaten bestehen.

#### **4.2.2 Proliferation von mit TGN1412 stimulierten T-Zellen und Sekretion von Zytokinen**

Eine Antigen-abhängige Aktivierung von T-Zellen führt u.a. zur T-Zellproliferation. Dieser Parameter, der den Aktivierungszustand von T-Zellen demonstriert, wurde im Folgenden untersucht. Um Bedingungen zu untersuchen, unter denen eine

superagonistische anti-CD28-Stimulation mit TGN1412 zur T-Zellproliferation führt, wurden humane T-Zellen mit dem Farbstoff PKH26 gefärbt. Danach wurde TGN1412 alleine oder in Kombination mit einem gegen die konstanten Anteile von TGN1412 gerichteten anti-IgG4-Antikörper, der löslich hinzugegeben wurde, für fünf Tage stimuliert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4.5).



**Abbildung 4.5: An T-Zellen gebundenes TGN1412 muss mit anti-IgG4 kreuzvernetzt werden, um die Proliferation von T-Zellen zu induzieren.**

(A) Aus einem *Buffy coat* wurden T-Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert. Je  $2 \times 10^5$  PKH26-gefärbte T-Zellen wurden in 200  $\mu$ l X-VIVO Medium ausgesät. Zur Stimulation wurde TGN1412 (schwarze Linie) in den angegebenen Konzentrationen [0,1; 1 oder 10  $\mu$ g/ml] eingesetzt und jeweils mit der doppelten Konzentration [0,2; 2 bzw. 20  $\mu$ g/ml] anti-IgG4 versetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden T-Zellen mit Tetradeconoyl-Phorbolacetat (TPA; 10  $\mu$ g/ml) und Ionomycin (Iono.; 5 mg/ml)

behandelt. In grau sind unstimulierte T-Zellen dargestellt. Die PKH26-gefärbten T-Zellen wurden mit dem Antikörper anti-CD3-APC gegengefärbt. Die T-Zellproliferation wurde an Tag 5 durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus Experimenten mit insgesamt 8-15 Spendern. (B) T-Zellen wurden wie in (A) isoliert und stimuliert. Die Prozente der proliferierenden Zellpopulation wurden anhand der gesetzten Grenzen in (A) bestimmt. Die Proliferation von CD3<sup>+</sup> T-Zellen ist an Tag 5 von 8-15 Spendern prozentual dargestellt. Für die statistische Analyse wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und die p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) mit der Bonferroni-Methode adjustiert.

In Abbildung 4.5 A ist die T-Zellproliferation eines repräsentativen Spenders an Tag fünf dargestellt. Wie in (Truneh *et al.*, 1985) beschrieben, induziert die Stimulation mit Tetradecanoyl-Phorbolacetat (TPA) in Kombination mit Ionomycin eine Proliferation von T-Zellen. Weder die alleinige Zugabe des mAk TGN1412 noch die alleinige Zugabe des anti-humanen IgG4 mAk regte die T-Zellen zur Proliferation an. Die Stimulation der T-Zellen mit dem mAk TGN1412 in Kombination mit einem anti-human IgG4 mAk in unterschiedlichen Konzentrationen zeigt eine dosisabhängige Proliferation. Während bei einer Konzentration von 10 µg/ml TGN1412 in den gezeigten Experimenten mit T-Zellen eines Spenders keine Proliferation auftritt, wird durch Zugabe von 1 µg/ml TGN1412 eine moderate Proliferation induziert, wohingegen mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml stimulierte T-Zellen die stärkste Proliferation aufweisen. Auch die Zugabe von T-Zellen in Zellkulturplatten, die mit TGN1412 beschichtet wurden (*coating*), induzierte Proliferation von T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Während die Dosisabhängigkeit der TGN1412-vermittelten T-Zellproliferation in Experimenten mit T-Zellen aus verschiedenen Spendern vergleichbar war, variierte die Proliferationsstärke in den verschiedenen Experimenten (siehe Standardabweichung).

In Abbildung 4.5 B sind die Proliferationsdaten an Tag fünf mit T-Zellen von 5-18 Spendern zusammenfassend gezeigt. Hierfür wurden die Prozente der proliferierten T-Zellen bestimmt (siehe ausgewählte Zellpopulation in Abb. 4.5 A) und die Mittelwerte von T-Zellen nach Stimulation mit TGN1412 allein oder in Kombination mit einem anti-human IgG4 mAk dargestellt (Abb. 4.5 B). Es ist zu sehen, dass die lösliche Zugabe von TGN1412 allein in keiner der getesteten Konzentrationen (Abb. 4.5: 1 µg/ml TGN1412; 0,1 und 10 µg/ml TGN1412 nicht gezeigt) T-Zellen zur Proliferation induzierten. In Kombination mit einem anti-human IgG4 hingegen proliferieren 11 % der T-Zellen nach Stimulation mit 10 µg/ml, 35 % nach Stimulation mit 1 µg/ml und 32 % nach Stimulation mit 0,1 µg/ml TGN1412.

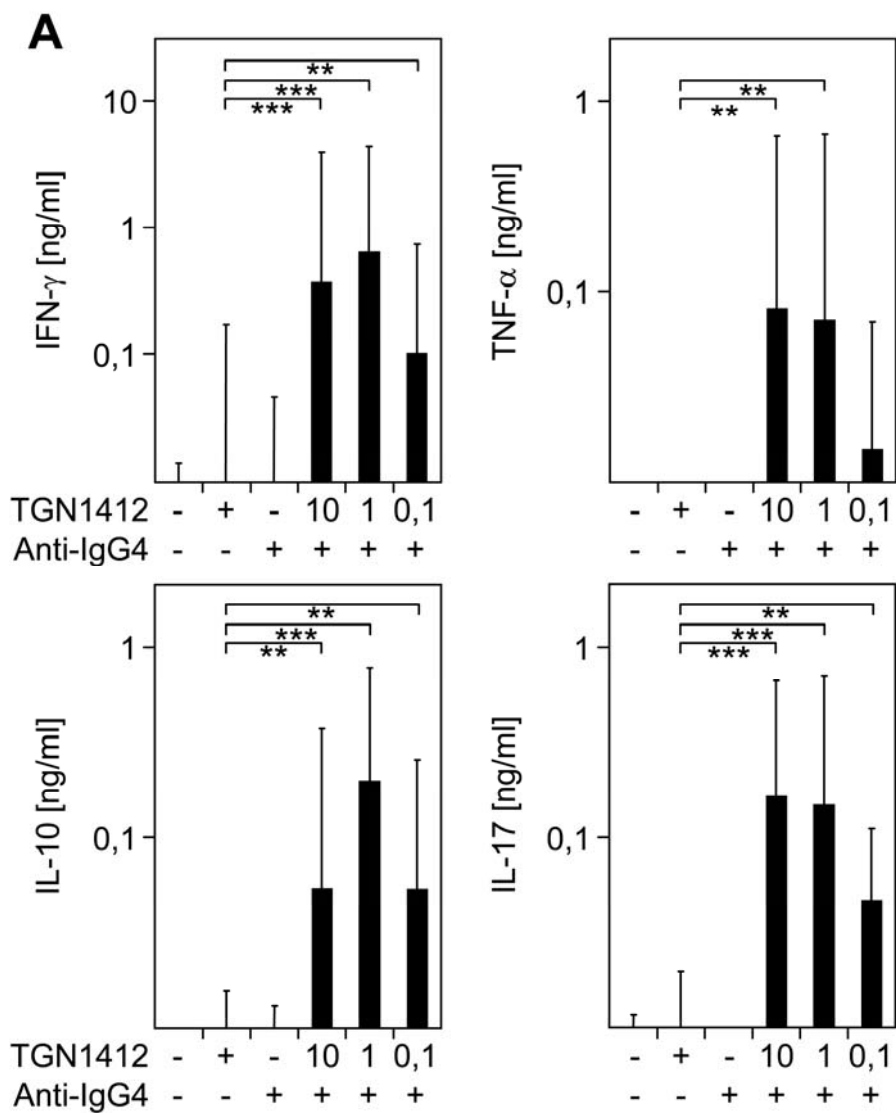
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine TGN1412-vermittelte Proliferation von T-Zellen nur induziert wird, wenn TGN1412 kreuzvernetzt wird.

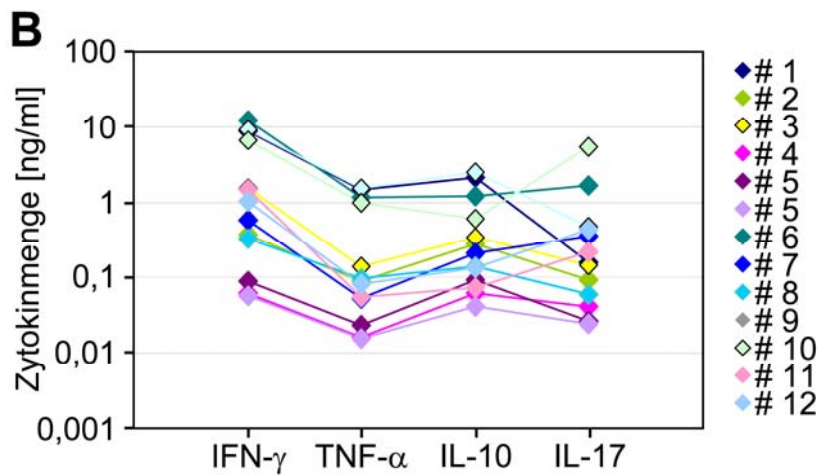
#### **4.2.3 Zytokinexpression von T-Zellen nach Stimulation mit TGN1412**

Die oben präsentierten Daten zeigen, dass die Inkubation von T-Zellen mit löslichem TGN1412 nicht zur Proliferation führt. Für die Induktion der T-Zellproliferation muss TGN1412 kreuzvernetzt werden. Als nächstes stellte sich die Frage, ob und wie TGN1412

in der Lage ist, *in vitro* die Expression von Zytokinen hervorzurufen. Hierfür wurden isolierte T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen TGN1412 alleine oder in Kombination mit einem anti-IgG4 mAk stimuliert.

Die Zellkulturüberstände wurden am Tag fünf mit Hilfe der Multiplex-Zytokinanalyse (*Flow Cytomic Bead array*) analysiert (Abb. 4.6).





**Abbildung 4.6: TGN1412-stimulierte T-Zellen sekretieren Zytokine nur nach Kreuzvernetzung mit einem anti-humanen IgG4-Antikörper.**

(A) Aus einem *Buffy coat* wurden T-Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert. Je  $2 \times 10^5$  isolierte T-Zellen wurden in 200  $\mu$ l X-VIVO Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an löslichem TGN1412 [0,1; 1; 10  $\mu$ g/ml] alleine oder in Kombination mit einem anti-human IgG4-Antikörper [0,2; 2; 20  $\mu$ g/ml] in der doppelten Konzentration stimuliert. An Tag 5 wurden die Überstände abgenommen und mit Hilfe des *Flow Cytomic Bead arrays* untersucht. Die Zytokinmengen sind von 5-18 Spendern dargestellt. (B) Isolierte T-Zellen wurden mit 1  $\mu$ g/ml TGN1412 und 2  $\mu$ g/ml anti-IgG4 für 5 Tage stimuliert. Die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 ist von 12 Spendern einzeln dargestellt. Für die statistische Analyse wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und die p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) mit der Bonferroni-Methode adjustiert.

In Abbildung 4.6 ist die Expression von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 nach Stimulation von T-Zellen mit dem Antikörper TGN1412 dargestellt. Keines der gezeigten Zytokine wird exprimiert, wenn der Antikörper TGN1412 allein löslich zu T-Zellen hinzugegeben wurde (Abb. 4.6 A). Werden T-Zellen dagegen mit einer Kombination aus TGN1412 und einem anti-IgG4-Antikörper, der gegen die konstanten Anteile von TGN1412 gerichtet ist, stimuliert, werden Zytokine sekretiert. Die stärkste Expression von IFN- $\gamma$  findet bei einer TGN1412-Konzentration von 1  $\mu$ g/ml in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper statt. Bei einer Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml bzw. 0,1  $\mu$ g/ml TGN1412 wird vergleichsweise weniger Zytokin gebildet. Für die stärkste Sekretion von TNF- $\alpha$  wurde mit 10  $\mu$ g/ml TGN1412 in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper stimuliert. Mit abnehmender Konzentration wurde die Sekretion schwächer. Parallel zu diesen beiden proinflammatorischen Zytokinen wurde nach Stimulation mit dem Antikörper TGN1412 auch das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 exprimiert. Wie bei der Expression von IFN- $\gamma$  zeigten mit 1  $\mu$ g/ml TGN1412 in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper

stimulierte T-Zellen die stärkste Sekretion von IL-10. Sowohl IL-10 als auch das proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-17 wurde nur nach Stimulation mit TGN1412 in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper sekretiert. Die Sekretion des Zytokins IL-17 war nach Stimulation mit 10 µg/ml TGN1412 am stärksten. Die Zytokine IL-23 und IL-1β wurden unter keinen der getesteten Bedingungen sekretiert (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.6 B ist die individuelle Analyse der Zytokine pro Spender dargestellt. Es ist zu erkennen, dass einige Spender starke und andere geringe Zytokinantworten hervorrufen. Generell variiert die Menge der sekretierten Zytokine stets zwischen den einzelnen Spendern und weniger innerhalb eines Spenders.

Somit zeigen die oben zusammengefassten Ergebnisse, dass T-Zellen nach Stimulation mit TGN1412 nicht in der Lage sind, Zytokine zu sezernieren. Für die Sekretion von Zytokinen muss TGN1412 mit einem anti-IgG4-Antikörper, der gegen die konstanten Anteile von TGN1412 gerichtet ist, kreuzvernetzt werden.

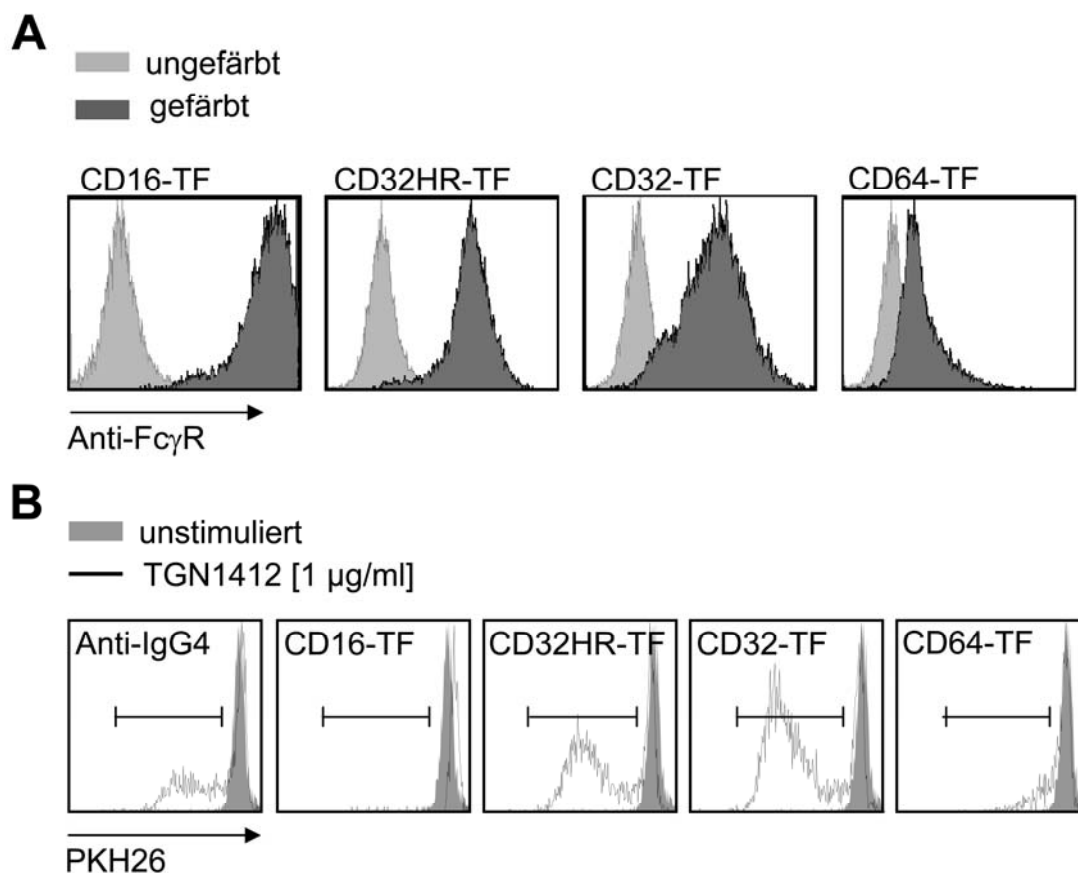
### **4.3 Kreuzvernetzung des Fc-Teils des mAk TGN1412**

#### **4.3.1 FcγR-exprimierende Zellen können die Kreuzvernetzung von TGN1412 vermitteln und dadurch Proliferation von T-Zellen und Sekretion von Zytokinen induzieren.**

Bisher wurde gezeigt, dass eine Quervernetzung von TGN1412 sowohl für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung, für die Proliferation von T-Zellen als auch für die Sekretion von Zytokinen eine Grundvoraussetzung ist. Die Bindung des Fc-Teils von IgG-Antikörpern erfolgt *in vivo* über die Fcγ-Rezeptoren (FcγR). Um zu untersuchen, ob eine Kreuzvernetzung von IgG-Antikörpern über FcγR vermittelt wird, wurden im nächsten Schritt Experimente mit Transfektanten durchgeführt, die humane FcγR exprimieren (FcγR-Transfektanten).

Fc-Rezeptoren (FcR) sind Zelloberflächenglykoproteine, die den Fc-Teil von Immunglobulinen (Ig) binden und dadurch an den Fab-Teil gebundenes Antigen über zellbasierte Effektor-Mechanismen vernetzen können. Die FcR für Ig der Klasse G (IgG) sind die sogenannten FcγR. Im humanen System existieren drei Klassen an FcγR: der hochaffine FcγRI (CD64), der FcγRII (CD32) und der niederaffine FcγRIII (CD16). Darüber hinaus lassen sich diese Klassen weiter unterteilen (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Um zu untersuchen, ob die FcγR bei der Kreuzvernetzung von TGN1412 eine Rolle

spielen, wurden Experimente mit Fc $\gamma$ R-exprimierenden Transfektanten (Corrales-Aguilar, 2008) durchgeführt (Abb. 4.7). Diese murinen BW5147-Zellen exprimieren jeweils nur eine Klasse der Fc $\gamma$ R auf ihrer Oberfläche. Die chimären Rezeptoren, die aus der extrazellulären Domäne der zellulären Fc $\gamma$ R bestehen, welche mit der Transmembrandomäne und intrazellulären Domänen der murinen  $\zeta$ -Kette fusioniert wurden, werden stabil auf den Transfektanten exprimiert. Da die extrazelluläre Domäne des Fc $\gamma$ RII für alle Unterklassen (Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB und Fc $\gamma$ RIIC) identisch ist, wurde zusätzlich nur die Fc $\gamma$ RII allelische Variante HR (*high responder*), welche sich in einer Aminosäure an Position 131 unterscheidet, für die Untersuchung mit einbezogen.



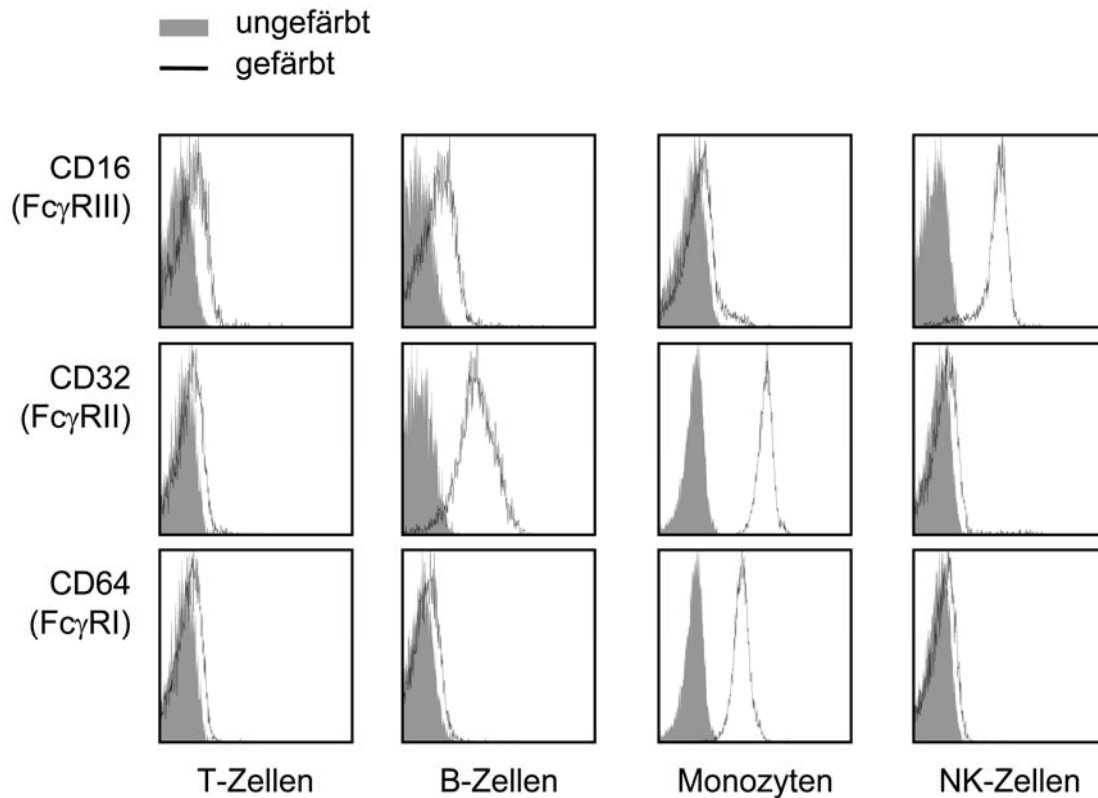
**Abbildung 4.7: Fc $\gamma$ RII-exprimierende Transfektanten sind in der Lage, TGN1412 auf T-Zellen kreuzzuvernetzen und dadurch T-Zellproliferation zu induzieren.**

(A)  $1 \times 10^6$  Fc $\gamma$ R-exprimierende Transfektanten wurden mit den fluoreszierenden Antikörpern anti-CD16, anti-CD32 oder anti-CD64 gegen die Fc $\gamma$ R gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Färbungen. (B) Aus einem *Buffy coat* wurden T-Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert.  $2 \times 10^5$  PKH26-gefärbte T-Zellen wurden mit TGN1412 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zur Kreuzvernetzung wurden mit 30 Gy bestrahlte Fc $\gamma$ R-exprimierende Transfektanten im Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Nach 5 Tagen wurde die T-Zellproliferation durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente repräsentativ.

In Abbildung 4.7 A ist die Expression der Fc $\gamma$ R der einzelnen Transfektanten mittels FACS-Analyse dargestellt. Jede einzelne Transfektante exprimiert ihren spezifischen Fc $\gamma$ R auf ihrer Zelloberfläche. In Abbildung 4.7 B konnte mit Hilfe von Fc $\gamma$ R-exprimierenden Transfektanten gezeigt werden, dass nur bestimmte Fc $\gamma$ R zur Kreuzvernetzung des mAk TGN1412 in der Lage sind. Sowohl die Fc $\gamma$ RIIHR (CD32HR)-exprimierenden Transfektanten als auch die Fc $\gamma$ RII (CD32)-exprimierenden Transfektanten waren dazu in der Lage, die Proliferation von TGN1412-behandelten T-Zellen auszulösen. Die Zugabe von Fc $\gamma$ RI (CD64)- oder Fc $\gamma$ RIII (CD16)-exprimierenden Transfektanten konnte keine Proliferation von TGN1412-behandelten T-Zellen vermitteln. Für die Proliferation von T-Zellen scheint möglicherweise TGN1412 durch die Fc $\gamma$ RII-exprimierenden Transfektanten kreuzvernetzt zu werden.

Nach intravenöser Applikation von therapeutischen Antikörpern kommen diese in der Blutbahn zuerst mit Blut- sowie Endothelzellen in Kontakt. Es stellte sich die Frage, ob möglicherweise auf diesen Zellen exprimierte Fc $\gamma$ R die Kreuzvernetzung von TGN1412 vermitteln können. Hierfür wurden die aus einem *Buffy coat* isolierten Blutzellen mit Antikörpern gegen die zelltypspezifischen Oberflächenmarker sowie die drei Fc $\gamma$ R gefärbt und durchflusszytometrisch am LSRII analysiert (Abb. 4.8).





**Abbildung 4.8: Expression der Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) und Fc $\gamma$ RIII (CD16) auf primären humanen Immunzelltypen.**

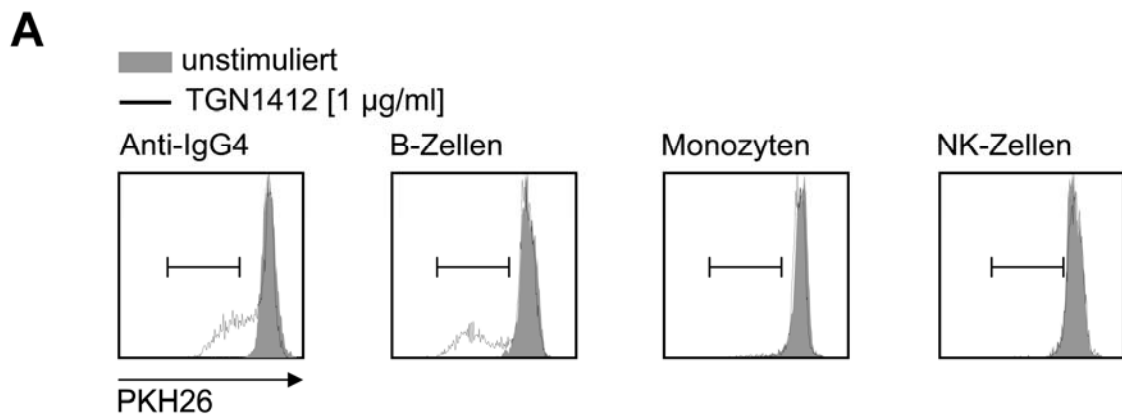
Primäre T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen wurden mittels *magnetic cell sorting* (MACS) aus einem *Buffy coat* isoliert. Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen der angegebenen Zelltypen wurden mit den angegebenen, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern gegen die Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarker CD3, CD19, CD14 und CD56 sowie gegen die Fc $\gamma$ R gefärbt. Alle Färbungen wurden in Gegenwart des polyklonalen IgG-Präparats Polyglobin zur Blockierung der unspezifischen Bindung der Fc $\gamma$ R durchgeführt. Die Daten sind für 3 unabhängige Färbungen mit Zellen aus verschiedenen Spendern repräsentativ.

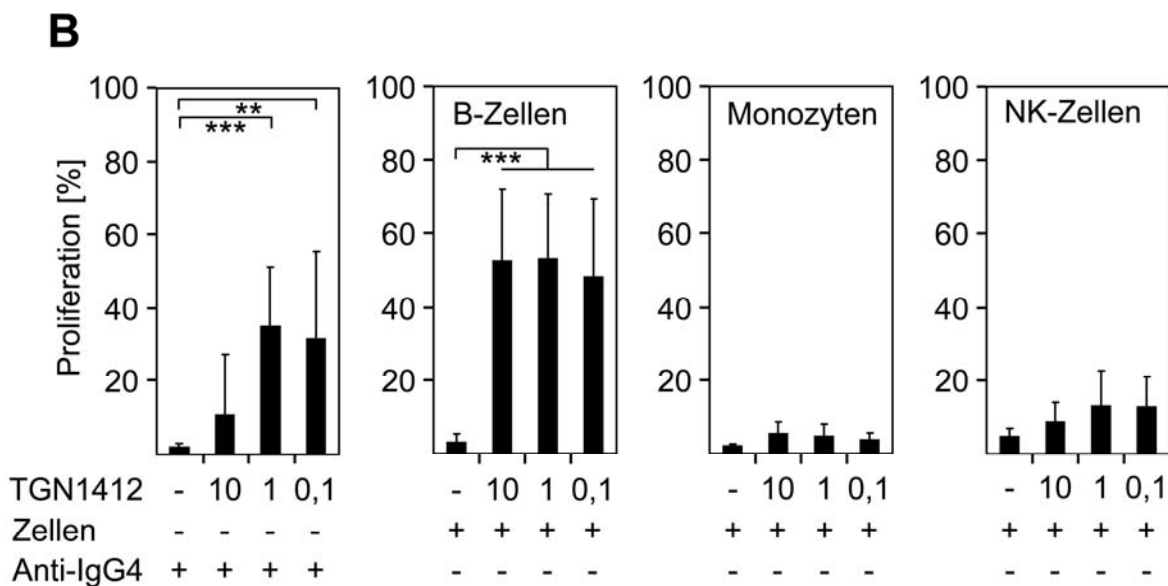
In Abbildung 4.8 wurde die Expression der einzelnen Fc $\gamma$ R auf der jeweiligen Zellpopulation untersucht. Hierfür wurde jede Zellpopulation mit Hilfe des Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarkers ausgewählt und dann auf ihre Fc $\gamma$ R-Expression hin analysiert. T-Zellen exprimieren keinen der Fc $\gamma$ R, wohingegen B-Zellen den Fc $\gamma$ RII (CD32) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass auf T-Zellen keine Fc $\gamma$ R und auf B-Zellen kein Fc $\gamma$ RIII (CD16) exprimiert wird (Woof und Burton, 2004), ist sowohl für T-Zellen als auch für B-Zellen eine schwache Färbung für den Fc $\gamma$ RIII (CD16) zu erkennen. Während Monozyten den Fc $\gamma$ RI (CD64) und den Fc $\gamma$ RII

(CD32) exprimieren, weisen NK-Zellen die Expression von Fc $\gamma$ RIII (CD16) auf. Zusammenfassend konnte die Expression der verschiedenen Fc $\gamma$ R auf unterschiedlichen Blutzellen bestätigt werden (Woof und Burton, 2004).

#### 4.3.2 B-Zellen induzieren durch Kreuzvernetzung mit ihren Fc $\gamma$ R die Proliferation von T-Zellen sowie die Sekretion von Zytokinen.

Wie in den Abbildungen 4.5 - 4.7 gezeigt, können sowohl der gegen den konstanten Anteil von TGN1412 gerichtete anti-IgG4-Antikörper als auch Fc $\gamma$ RII-exprimierende Transfektanten TGN1412 kreuzvernetzen, so dass derart behandelte T-Zellen zur Proliferation sowie zur erhöhten Freisetzung von Zytokinen angeregt werden. Im Folgenden sollte der Einfluss von primären Blutzellen auf die Aktivierung von TGN1412-behandelten T-Zellen untersucht werden. Da die Blutzellen, wie in Abbildung 4.8 gezeigt, verschiedene Fc $\gamma$ R exprimieren, stellte sich die Frage, ob sie den Antikörper TGN1412 auf der Oberfläche von T-Zellen kreuzvernetzen und dadurch zu einer T-Zellproliferation und Freisetzung von Zytokinen führen können. Hierfür wurden PKH26-gefärbte T-Zellen in den angegebenen Konzentrationen mit TGN1412 stimuliert. Im Verhältnis 1:1 wurden bestrahlte B-Zellen, Monozyten oder NK-Zellen hinzugegeben und für fünf Tage co-kultiviert (Abb. 4.9).





**Abbildung 4.9: B-Zellen induzieren durch Co-Kultivierung mit TGN1412-behandelten T-Zellen deren Proliferation.**

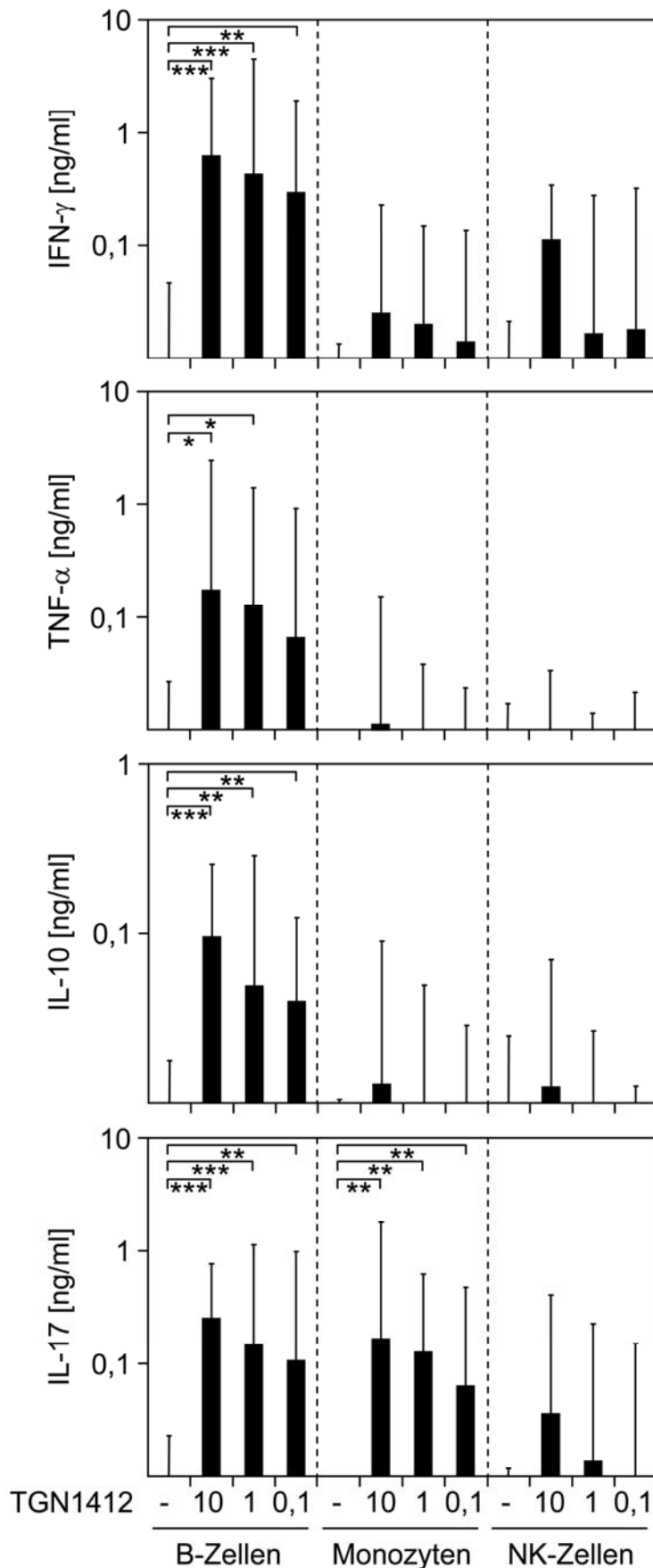
(A) Aus einem *Buffy coat* wurden T-Zellen, B-Zellen, Monozyten sowie NK-Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert.  $2 \times 10^5$  PKH26-gefärbte T-Zellen wurden mit TGN1412 in den angegebenen Konzentration stimuliert. Zur Kreuzvernetzung wurde entweder ein anti-IgG4-Antikörper oder je  $2 \times 10^5$  B-Zellen, Monozyten oder NK-Zellen mit 30 Gy bestrahlt und hinzugegeben. Als Kontrolle wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 ohne Antikörper inkubiert. Ein repräsentativer Spender ist gezeigt. (B) Die Proliferation ist prozentual von 11-12 Spendern an Tag 5 dargestellt. Für die statistische Analyse wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und die p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) mit der Bonferroni-Methode adjustiert.

In Abbildung 4.9 A ist die Proliferation eines repräsentativen Spenders dargestellt. Während die Co-Kultivierung von Monozyten oder NK-Zellen nicht dazu führte, dass TGN1412 die Proliferation von T-Zellen induzierte, waren B-Zellen dazu in der Lage. Die Proliferation von TGN1412-behandelten T-Zellen konnte bisher nur über *coating* mit Hilfe eines anti-Fc-Antikörpers oder Fc $\gamma$ RII-exprimierender Zellen induziert werden. In Abbildung 4.9 B ist die Proliferation von T-Zellen von 11-12 Spendern prozentual dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Co-Kultivierung von B-Zellen eine noch effizientere Proliferation von TGN1412-behandelten T-Zellen hervorrufen konnte (ca. 50 %) als die Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper (ca. 30 %). Wie bereits in Abbildung 4.5 gezeigt, induziert die Zugabe des anti-IgG4-Antikörpers eine Dosisabhängigkeit von TGN1412-behandelten T-Zellen. Im Gegensatz zu dieser Dosisabhängigkeit ist die Proliferation von T-Zellen, die mit unterschiedlichen

Konzentrationen TGN1412 stimuliert wurden und mit B-Zellen co-kultiviert wurden, untereinander vergleichbar (Abb. 4.9 B). Sowohl Monozyten als auch NK-Zellen waren nicht in der Lage, durch Co-Kultivierung TGN1412-behandelte T-Zellen zur Proliferation anzuregen (Abb. 4.9 B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass B-Zellen in der Lage sind, die für die durch TGN1412 induzierte Proliferation nötige Kreuzvernetzung des Antikörpers zu vermitteln.

Im Folgenden sollte der Einfluss der primären Immunzellen auf die Zytokinproduktion untersucht werden. Hierfür wurden isolierte T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen TGN1412 stimuliert und mit bestrahlten B-Zellen, Monozyten oder NK-Zellen co-kultiviert. Am Tag fünf wurden die Zellkulturüberstände bezüglich ihrer Zytokinmenge analysiert. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände von unstimulierten T-Zellen, die mit bestrahlten B-Zellen, Monozyten oder NK-Zellen co-kultiviert wurden, untersucht (Abb. 4.10).



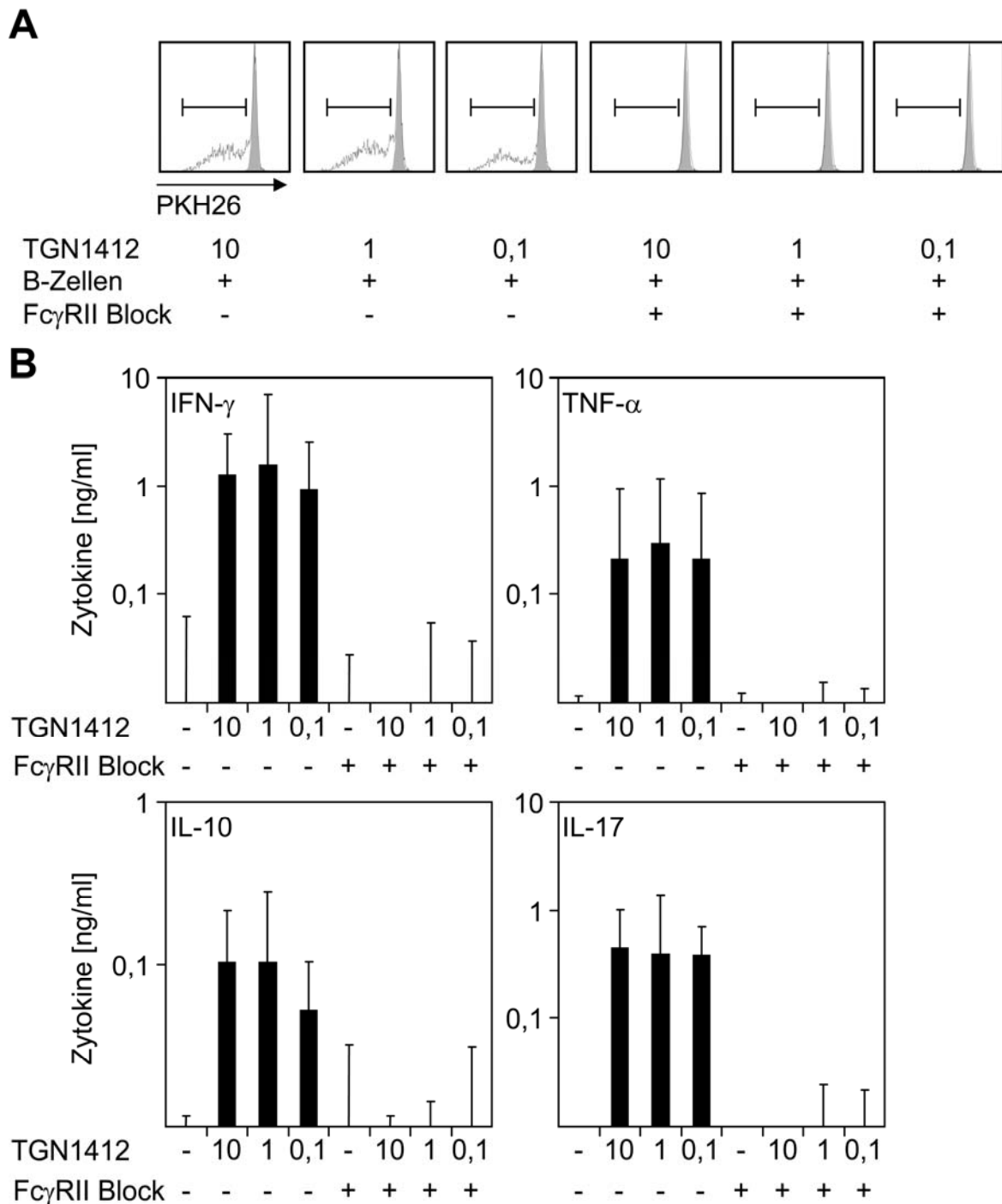
**Abbildung 4.10: B-Zellen sind in der Lage, TGN1412 auf T-Zellen kreuzzuvernetzen, so dass Zytokine sekretiert werden.**

(A) Aus einem *Buffy coat* wurden T-Zellen, B-Zellen, Monozyten sowie NK-Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert.  $2 \times 10^5$  T-Zellen wurden mit TGN1412 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zur Kreuzvernetzung wurden je  $2 \times 10^5$  B-Zellen, Monozyten oder NK-Zellen mit 30 Gy bestrahlt und hinzugegeben. Als Kontrolle wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 ohne die Zugabe von TGN1412 inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden hinsichtlich der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 nach 5 Tagen analysiert. Die Daten sind repräsentativ für 7-10 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Für die statistische Analyse wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und die p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) mit der Bonferroni-Methode adjustiert.

In Abbildung 4.10 ist die Expression der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 dargestellt. Die Co-Kultivierung TGN1412-stimulierter T-Zellen mit B-Zellen induzierte dosisabhängig die Expression von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17. Weder nach der Co-Kultivierung mit Monozyten noch nach der Co-Kultivierung mit NK-Zellen waren die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder IL-10 detektierbar. Interessanterweise wurde das Zytokin IL-17 nach Co-Kultivierung mit Monozyten, nicht jedoch nach Co-Kultivierung mit NK-Zellen exprimiert. Die Zytokine IL-23 und IL-1 $\beta$  wurden zu keinem Zeitpunkt in keiner der getesteten Konzentrationen sekretiert (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass B-Zellen in der Lage sind, durch Co-Kultivierung mit TGN1412-behandelten T-Zellen eine Proliferation der T-Zellen sowie Zytokinexpression zu induzieren. Die Co-Kultivierung von TGN1412-behandelten T-Zellen mit Monozyten induziert lediglich die Expression des Zytokins IL-17, allerdings in einem geringeren Maße als die Co-Kultivierung mit B-Zellen. Durch durchflusszytometrische Analysen konnte bestätigt werden, dass B-Zellen und Monozyten den Fc $\gamma$ R2 (CD32) auf ihrer Oberfläche tragen. NK-Zellen hingegen exprimieren nur den Fc $\gamma$ R1 (CD16). Monozyten tragen zusätzlich zu dem Fc $\gamma$ R2 (CD32) den hochaffinen Fc $\gamma$ R1 (CD64) auf ihrer Oberfläche (Abb. 4.8). Während die Zugabe von NK-Zellen oder Monozyten keine T-Zellproliferation von TGN1412-stimulierten T-Zellen induzierte, konnten B-Zellen diesen Effekt bewirken. Weiterhin konnten nach Co-Kultivierung von TGN1412-stimulierten T-Zellen mit B-Zellen oder Monozyten Zytokine sekretiert werden.

Wie in der Literatur (Nimmerjahn und Ravetch, 2008) und in Abbildung 4.8 beschrieben, tragen humane B-Zellen den Fc $\gamma$ R2B (CD32B) auf ihrer Oberfläche. Um nun zu untersuchen, ob der Fc $\gamma$ R für das Kreuzvernetzen verantwortlich ist oder ob möglicherweise noch andere Rezeptoren auf den B-Zellen für die Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielen, wurde spezifisch mit einem anti-CD32-blockierenden Antikörper der Fc $\gamma$ R2 (CD32) auf B-Zellen inhibiert (Abb. 4.11).



**Abbildung 4.11: Blockierung des Fc $\gamma$ RII auf B-Zellen inhibiert die TGN1412-induzierte T-Zellproliferation und Zytokinsekretion.**

(A) Aus einem *Buffy coat* wurden T-Zellen und B-Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert.  $2 \times 10^5$  PKH26-gefärbte T-Zellen wurden mit 30 Gy bestrahlten B-Zellen im Verhältnis 1:1 co-kultiviert. Nach Blockierung der Fc $\gamma$ R mit 25  $\mu$ g/ml eines anti-human CD32-Antikörpers für 45 min wurde mit TGN1412 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Proliferation wurde nach 5 Tagen durchflusszytometrisch analysiert. (B) T- und B-Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt und die Zellkulturüberstände nach 5 Tagen zur Zytokinbestimmung mittels *FlowCytomix Bead array* geerntet. Die Daten von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten sind gezeigt. Für die statistische Analyse wurde der t-Test verwendet und die p-Werte ( $0,05 \geq p > 0,01$  \*;  $0,01 \geq p > 0,001$  \*\*;  $p \geq 0,001$  \*\*\*) mit der Bonferroni-Methode adjustiert.

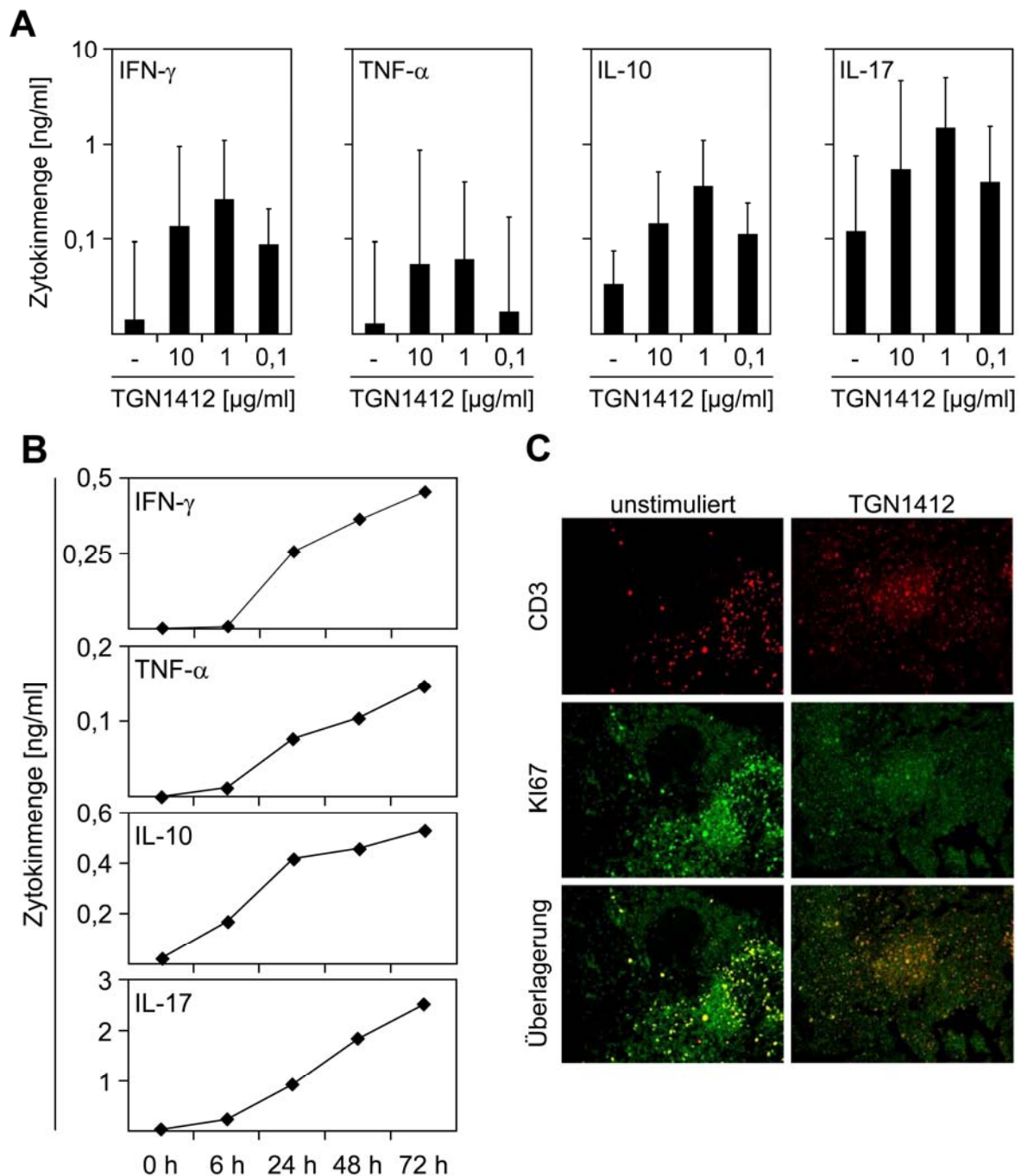
PKH26-gefärbte T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit bestrahlten B-Zellen alleine oder in Kombination mit 25 µg/ml anti-human CD32-blockierendem Antikörper für 45 min inkubiert. Anschließend wurde TGN1412 in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Sowohl die Proliferation der T-Zellen als auch die Sekretion von Zytokinen wurden an Tag fünf analysiert. Während TGN1412-stimulierte T-Zellen nach Co-Kultivierung mit B-Zellen proliferierten, war diese Proliferation nach Blockierung der FcγRII (CD32) komplett aufgehoben (Abb. 4.11 A). In Abbildung 4.11 B ist die Expression der Zytokine dargestellt. Auch die Zytokine IFN-γ, TNF-α, IL-10 und IL-17 konnten nach Inhibition des FcγRII nicht mehr induziert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die B-Zell-vermittelte Kreuzvernetzung von TGN1412 sowie die daraus resultierende T-Zellproliferation durch spezifische Blockierung der FcγR inhibiert wurde.

#### **4.4 *Ex vivo*-stimulierte Tonsillenschnitte mit TGN1412**

Alle oben präsentierten Daten wurden *in vitro* generiert. Um die Wirkung von TGN1412 in einem sekundären lymphatischen Organ zu untersuchen, in dem die unterschiedlichen Immunzellen ähnlich wie im menschlichen Körper angeordnet sind, wurden Tonsillen aus Patienten isoliert und Tonsillenschnitte in Kultur genommen. Humane Tonsillen besitzen sogenannte folliculäre Strukturen, in denen sich die B-Zellen befinden. Um diese Follikel herum liegen die T-Zellen in der T-Zellzone. Die in Kultur genommenen Tonsillenschnitte wurden mit verschiedenen Konzentrationen des mAk TGN1412 stimuliert. Zu den angegebenen Zeitwerten wurden zur Zytokinbestimmung Zellkulturüberstandsproben entnommen. Als Kontrolle für eventuelle Vorstimulationen wurden alle Tonsillen für 24 h unstimuliert in Kultur gehalten und die Zellkulturüberstände auf die Expression von Zytokinen hin untersucht (Abb. 4.12).





**Abbildung 4.12: TGN1412 allein induziert die Sekretion von Zytokinen in Tonsillenschnitten.**

Humane Tonsillenschnitte wurden in X-VIVO-Medium für 24 h inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (-) wurden die Schnitte mit (A) den angegebenen Konzentrationen [0,1; 1; 10  $\mu\text{g/ml}$ ] TGN1412 stimuliert. Nach 3 Tagen wurde der Kulturüberstand abgenommen und hinsichtlich der Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 mittels *FlowCytomix Bead arrays* analysiert. (B) Tonsillenschnitte wurden nach einem Mediumwechsel mit 1  $\mu\text{g/ml}$  TGN1412 stimuliert, und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Medium zur Analyse der Zytokinexpression entnommen. (C) Tonsillenschnitte wurden unstimuliert oder mit 1  $\mu\text{g/ml}$  TGN1412 für 12 h stimuliert. Anschließend wurden die Schnitte zuerst mit einem *goat anti-human* CD3-Antikörper (rot) oder einem *mouse anti-human* KI67 (grün) gefärbt (in Zusammenarbeit mit Prof. I. Bechmann). Die Daten sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In Abbildung 4.12 A ist die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 von TGN1412-behandelten Tonsillenschnitten an Tag drei nach Stimulation dargestellt. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Sekretion der TGN1412-induzierten Zytokine. Für alle Zytokine war die stärkste Expression bei einer Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  TGN1412 zu sehen. Die Menge an Zytokinen nach Stimulation mit dem mAk TGN1412 war in den Überständen der Tonsillenkulturen geringer als nach Stimulation von isolierten T-Zellen und einzelnen Subtypen. In Abbildung 4.12 B ist die Zytokinexpression über die Zeit bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  TGN1412 dargestellt. Bereits nach 6 h waren die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 detektierbar. IFN- $\gamma$  wurde nach 24 h sekretiert. Alle Zytokinmengen stiegen bis zum Zeitpunkt 72 h nach Stimulation an. Zu keinem Zeitpunkt und in keiner der getesteten TGN1412-Konzentration war das Zytokin IL-23 detektierbar (Daten nicht gezeigt). Um eine Voraktivierung der Zellen in Tonsillenschnitten zu bestimmen, wurde von allen Tonsillenschnitten die Menge an IL-1 $\beta$  analysiert, die bereits ohne Stimulation sekretiert wurde. Alle Tonsillen, deren basale Menge an IL-1 $\beta$  im unstimulierten Zustand erhöht ( $> 200 \text{ pg/ml}$ ) war, wurden nicht zur Analyse herangezogen. In Abbildung 4.12 C sind Immunfluoreszenzen von unstimulierten (Abb. 4.12 C, linke Spalte) und TGN1412-stimulierten (Abb. 4.12 C, rechte Spalte) Tonsillenschnitten dargestellt. In den unstimulierten Tonsillenschnitten liegen die CD3<sup>+</sup> T-Zellen (rot) in der T-Zellzone außerhalb des Follikels (schwarz). Einige T-Zellen (grün) proliferieren in der T-Zellzone bereits in unstimulierten Tonsillenschnitten. Nach Stimulation mit dem mAk TGN1412 wandern die CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den Bereich des Follikels (rot), wo sich die B-Zellen befinden, und proliferieren dort (grün). In der Überlagerung beider Färbungen ist deutlich zu sehen, dass sich die proliferierenden T-Zellen im Bereich der B-Zellzone (Follikels) befinden, so dass die B-Zellen TGN1412 auf den T-Zellen kreuzvernetzen können. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der mAk TGN1412 in der Lage ist, in Kulturen von Tonsillenschnitten die Sekretion von Zytokinen ohne die exogene Zugabe eines kreuzvernetzenden Agens zu induzieren.

## 5 Diskussion

Monoklonale Antikörper (mAk) werden immer häufiger in der Therapie eingesetzt. Hierbei werden vielversprechende Behandlungsergebnisse erzielt (Scolnik, 2009). Trotz vielfältiger Erfolge birgt der Einsatz von mAk auch Risiken. Diese können zum einen bei der Behandlung auftreten, und zum anderen können diese mit der klinischen Erprobung von Neuentwicklungen verbunden sein, wie im Jahr 2006 die Applikation des superagonistischen CD28-spezifischen mAk TGN1412 in gesunden Probanden während einer klinischen Phase-I Studie zeigte. Hier kam es innerhalb weniger Stunden nach Behandlung mit dem mAk TGN1412 zu akut auftretenden Nebenwirkungen und einer massiven Freisetzung von Zytokinen (Suntharalingam *et al.*, 2006). Im Nachhinein konnte diese Sekretion von Zytokinen als ein sogenannter Zytokinsturm erklärt werden, der bereits vorher schon nach Gabe anderer mAk wie OKT3 oder Rituximab beobachtet wurde (Hansel *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 1999). Dieser Zytokinsturm konnte weder durch präklinische Studien in nicht-humanen Primaten noch durch *in vitro*-Tests vorhergesagt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Validierung der Startdosis des mAk TGN1412 genauer analysiert sowie die unterschiedliche Reaktion zwischen Makaken und dem Menschen nach Behandlung mit TGN1412 näher untersucht. Des Weiteren konnte zu dem Verständnis der Wirkweise des mAk TGN1412 beigetragen werden.

Für eine klinische Phase-I Studie ist die Startdosis von großer Bedeutung. Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, beruht die „klassische“ Berechnung bislang auf einem Berechnungsansatz, der auf einem Sicherheitsabstand zur toxischen Reaktion im Tier basiert (NOAEL). Nach den Ereignissen bei der Erprobung von TGN1412 wurde von einer Expertengruppe vorgeschlagen, den MABEL-Ansatz zu verwenden. Nach Berechnungen des MABELs ergibt sich eine sehr niedrige Startdosis, da dieser sich nach dem geringsten biologischen noch nachweisbaren Effekt berechnet. Zur Berechnung einer Startdosis stellt die Bestimmung der Rezeptorabdeckung, wie in dieser Arbeit gezeigt, einen wichtigen Teil dar und wird mit folgender Formel berechnet:

$$R_0 = \frac{1}{1 + \frac{nV_m K_d}{D_m}}$$

$R_0$ : Rezeptorabdeckung

$n$ : molare Masse eines Antikörpers

$V_m$ : Verteilungsvolumen pro Körpermasse

$K_d$ : Dissoziationskonstante

$D_m$ : verwendete Startdosis von TGN1412 (0,1 mg/kg)

Eine Expertengruppe hatte nach den Vorfällen bei der Phase-I Studie von TGN1412 die Rezeptorabdeckung von CD28 mit TGN1412 in den Probanden mit 86,2 % - 90,9 % berechnet (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006*). Die Rezeptorabdeckung, die nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methode berechnete wurde, liegt zwischen 45 % - 80 % (Abb. 4.2; (Waibler *et al.*, 2008)). Diese Abweichung in der Rezeptorabdeckung kann mit den Werten der  $K_d$  zusammenhängen, welche ein Parameter zur Bestimmung des MABELs ist. Der  $K_d$ -Wert, den die Expertengruppe mit in ihre Berechnung einbezogen hatte, wurde mit der *BIAcore* Methode bestimmt und beträgt  $1,88 \times 10^{-9}$  mol/l, wohingegen der  $K_d$ -Wert, der experimentell bestimmt wurde, zwischen  $5,27 \times 10^{-9}$  -  $1,03 \times 10^{-8}$  mol/l liegt (Waibler *et al.*, 2008). Beide Methoden zeigen, dass die Rezeptorabdeckung von CD28 mit TGN1412 in der Phase-I Studie größer war, als mit dem MABEL empfohlen wurde. Allerdings berücksichtigen beide Methoden nicht, dass TGN1412 sich nicht in nur einem Kompartiment, dem Blut, sondern auch in weiteren Kompartimenten verteilt. Zudem ist nicht klar, wie viele CD28-Moleküle für eine Aktivierung von T-Zellen besetzt sein müssen. Somit dürfen die Berechnungen zur Rezeptorabdeckung nicht idealisiert werden. Dennoch stellen sie einen weiteren Aspekt zur Sicherheit bei der Berechnung der Startdosis dar.

Weiterhin lässt sich ein Schwellenwert für die Startdosis nicht allgemein definieren, da dieser stark von der jeweiligen Zielstruktur, dem spezifischen Antikörper und seinen spezifischen Eigenschaften abhängt. Diese Charakteristika können von Produkt zu Produkt variieren, sogar wenn verschiedene Antikörper an das gleiche Epitop binden. Mit Hilfe eines prädiktiven Modells lässt sich experimentell individuell für jedes Produkt das Maximum der empfohlenen Startdosis bestimmen. Zusätzlich zu dieser Bestimmung bzw. falls kein prädiktives Modell zur Verfügung steht, trägt der hier etablierte Test dazu bei, eine erste Startdosis zu definieren und somit die Wahrscheinlichkeit von unerwarteten schweren Nebenwirkungen in einer Phase-I klinischen Studie zu reduzieren. Nach den Vorfällen mit TGN1412 wurden abgewandelte Protokolle zu Phase-I Studien insbesondere mit Hoch-Risiko-Produkten vorgeschlagen. Solche Hoch-Risiko-Produkte sind u.a. Antikörper, die einen neuartigen Wirkmechanismus vermitteln, welcher zentrale Schaltstellen der physiologischen Regulation angreift (Liedert *et al.*, 2007). Als wichtiger Punkt in den neuen Protokollen wurde festgehalten, dass Probanden nacheinander unter Einhaltung eines zeitlichen Sicherheitsabstandes in die Studie einzuschließen sind. Weiterhin wurden Empfehlungen zur pharmazeutischen Qualität (*European Medicines Agency (EMA), 2006a; European Medicines Agency (EMA), 2007a*), zur Präklinik

(*European Medicines Agency (EMA)*, 2000; *European Medicines Agency (EMA)*, 2006c) und zur Klinik (*European Medicines Agency (EMA)*, 2006b) in die bestehenden bzw. neuen Richtlinien aufgenommen. Generell empfiehlt eine Expertengruppe die Verwendung des MABEL- anstelle des NOAEL-Ansatzes (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff*, 2006).

Für die prädiktive Risikobewertung eines Arzneimittels ist die Relevanz eines geeigneten Tiermodells oder eines *in vitro*-Modells von großer Bedeutung. Das entsprechende Modell muss mit Sorgfalt ausgesucht werden (*European Medicines Agency (EMA)*, 1998b). Eine relevante Spezies definiert sich, indem das zu untersuchende Testmaterial pharmakologisch in Bezug auf die Expression des *Targets* oder des Epitops aktiv ist (*European Medicines Agency (EMA)*, 1998b). Eine hohe Homologie der *Target*struktur zwischen dem Tiermodell und Menschen ist dabei erforderlich. Die präklinische Testung des mAk TGN1412 bzw. seiner Orthologe wurde sowohl in Nagern (Maus und Ratte) als auch in nicht-humanen Primaten (Makaken) durchgeführt. In beiden dieser Tiermodelle kam es zu keinerlei Nebenwirkungen.

Eine Expertengruppe bestätigte TeGenero eine 100%ige Homologie der Aminosäuren der extrazellulären Domäne von CD28 zwischen dem Menschen und nicht-humanen Primaten (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff*, 2006). In der Literatur wurde jedoch von Kenter *et al.* ein Sequenzunterschied an Position 65 (Gly → Glu) in der Bindedomäne für CD28 zwischen dem Menschen und *M. mulatta* beschrieben (Kenter und Cohen, 2006). Der Unterschied an Position 65 könnte ein unterschiedliches Bindevverhalten von TGN1412 an CD28 zwischen den beiden Spezies hervorrufen, was zu einer verschieden starken T-Zellaktivierung führen kann (Kenter und Cohen, 2006). Dieser Vergleich und der daraus resultierende Sequenzunterschied beruht auf öffentlich zugänglichen Sequenzen von CD28. Darüber hinaus wurden von Kenter *et al.* weitere Unterschiede in der extrazellulären und Transmembrandomäne beschrieben (Kenter und Cohen, 2006). Auch in Abbildung 4.1 sind drei Aminosäureunterschiede in der Transmembrandomäne von CD28 gezeigt. Diese drei nicht-konservierten Aminosäureunterschiede könnten einen Einfluss auf die laterale Interaktion zwischen CD28 und weiteren Signalmolekülen innerhalb der Plasmamembran haben (Horejsi *et al.*, 2004).

Zur aufklärenden Analyse der Sequenzhomologie der *Target*struktur für TGN1412 wurde die cDNA von CD28 von *M. fascicularis* und *M. mulatta* sequenziert und in

Abbildung 4.1 die Bindedomäne für CD28 von Makaken mit der des Menschen verglichen. Die Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne von CD28 von *M. mulatta* und *M. fascicularis* ist identisch mit der humanen extrazellulären Domäne von CD28 (Abb. 4.1 und Genbankeinträge 111144662 und 112817616 für *M. mulatta* und 110611295, 111144664 und 110611297 für *M. fascicularis*, sowie (Gibbs *et al.*, 2007)). Unter dem Vorbehalt, dass die Anzahl an CD28-Molekülen auf der Oberfläche von nicht-humanen Primaten und dem Menschen vergleichbar ist, sollte die Bindung des mAk TGN1412 demzufolge gleich sein. Dies spiegelt sich wider in der vergleichbaren Dekoration von CD28 auf humanen T-Zellen sowie den T-Zellen von *M. mulatta* und *M. fascicularis* mit Alexa488-konjugiertem TGN1412 (Abb. 4.3 A). Mögliche Unterschiede in der Bindungsaffinität von humanem und *M. fascicularis* CD28 wurden in der präklinischen Entwicklung von TGN1412 analysiert (Human:  $K_d$   $4 \times 10^{-9}$ ; *M. fascicularis*:  $K_d$   $6 \times 10^{-9}$ ) und können ausgeschlossen werden (Hanke, 2006). Dennoch sind funktionelle Unterschiede aufgrund der drei Aminosäureunterschiede in der Transmembrandomäne zwischen dem Menschen und den getesteten nicht-humanen Primaten nicht auszuschließen (Ohresser *et al.*, 2006; Sender *et al.*, 2008). Unter Umständen kann das Bindungsverhalten von wichtigen Signalmolekülen an der Transmembrandomäne und somit die Signalweiterleitung von TGN1412 ins Zellinnere zwischen dem Menschen und nicht-humanen Primaten verändert sein (Kenter und Cohen, 2006).

Außerdem ist der Vergleich der Signalkaskade der relevanten Spezies mit humanen Zellen wichtig. Nach Stimulation humaner T-Zellen mit dem mAk TGN1412 kam es im Gegensatz zur konventionellen Stimulation mit anti-CD28- und anti-CD3-Ak zu einem lang anhaltenden  $Ca^{2+}$ -Ausstoß (Abb. 4.4). Des Weiteren wurde in mit TGN1412 stimulierten humanen T-Zellen das Protein Phospholipase C gamma 1 (PLC $\gamma$ 1), welches für die intrazelluläre Signaltransduktion wichtig ist, lang anhaltend aktiviert (Sender *et al.*, 2008). Diese lang anhaltende  $Ca^{2+}$ -Freisetzung scheint eine spezifische Eigenschaft des humanen System zu sein, da humane T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen von Ratten oder von nicht-humanen Primaten sensitiver auf CD28-Superagonisten wie TGN1412 reagieren (Dennehy *et al.*, 2003). Ein lang anhaltender  $Ca^{2+}$ -Ausstoß wurde nach superagonistischer CD28-Stimulation bereits für T-Zellen von Ratten beschrieben. Allerdings war dabei aufgrund der schlechten Zugänglichkeit des CD28-Epitops eine Vorinkubation der Ratten-T-Zellen mit TGN1412 von mehreren Stunden erforderlich (Dennehy *et al.*, 2003). Wie T-Zellen von Ratten (Dennehy *et al.*, 2007) brauchen auch humane T-Zellen einen funktionellen TCR, um ein  $Ca^{2+}$ -Signal zu induzieren (Sender *et al.*, 2008).

Interessanterweise zeigen im Gegensatz zu humanen T-Zellen die T-Zellen von Makaken keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach Stimulation mit TGN1412 (Abb. 4.4 C; (Sender *et al.*, 2008).

Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Wirkung von TGN1412 in den verschiedenen Spezies nicht mit einer andersgearteten Zellverteilung zusammenhängt, wurden Blutproben von nicht-humanen Primaten mit humanen Blutproben verglichen. Sowohl in humanen Blutproben als auch in Blutproben von nicht-humanen Primaten sind unter den Lymphozyten etwa 70 % T-Zellen, und innerhalb dieser T-Zellpopulation ist die Verteilung von  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen beim Menschen und nicht-humanen Primaten vergleichbar (Abb. 4.3 B; (Ibegbu *et al.*, 2001; Sopper *et al.*, 1997)). Ein wesentlicher Aspekt in dieser Studie ist weiterhin, dass die hier verwendeten Affen zwar regelmäßig auf Infektionen hin überprüft werden, aber nicht unter spezifischen pathogenfreien (SPF) Bedingungen, wie z.B. Labormäuse, gehalten werden. Demzufolge kann der reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstoß der Affen nicht mit einem naiveren Aktivierungsstatus der T-Zellen in nicht-humanen Primaten zusammenhängen, wie dies bei unter SPF-Bedingungen gehaltenen Labortieren beobachtet werden kann. Entsprechend der reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Induktion in Makaken war auch Proliferation von TGN1412-stimulierten T-Zellen von Makaken im Vergleich zu humanen T-Zellen reduziert (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigte vor kurzem eine Studie, dass T-Zellen von Schimpansen nach TCR-Stimulation *in vitro* weniger reaktiv zu sein scheinen als humane T-Zellen, was sich auf den Verlust der *Siglecs* (*sialic acid binding Ig-like lectins*) auf humanen T-Zellen zurückführen lassen könnte (Nguyen *et al.*, 2006). *Siglecs* können sowohl positive als auch negative Regulatoren des Immunsystems sein. Die mit CD33-verwandten *Siglecs* variieren zwischen den Spezies (Crocker *et al.*, 2007). Es scheint, als ob ihre Expression während der Evolution vom Affen zum Menschen verloren ging (Nguyen *et al.*, 2006). Demzufolge könnte das Fehlen der *Siglecs* auf humanen Zellen erklären, warum humane T-Zellen stärker auf superagonistische CD28-spezifische mAk reagieren als T-Zellen von Makaken. Des Weiteren könnte die schnelle Induktion von  $\text{T}_{\text{regs}}$  nach Applikation des CD28 superagonistischen mAk in Mäusen einen Zytokinsturm verhindert haben (Gogishvili *et al.*, 2009). Die Induktion von  $\text{TGF-}\beta$  in Mäusen könnte protektiv gegen einen Zytokinsturm gewirkt haben (Perruche *et al.*, 2009).

Zudem könnte sich die Anzahl, die Größe und/oder die Verteilung von *Lipid Rafts* zwischen Affen und humanen T-Zellen unterscheiden. *Lipid Rafts* sind Domänen in der Zellmembran, die sich durch eine veränderte Lipid- und Protein-Zusammensetzung von

der restlichen Membran unterscheiden und u.a. bei der Endozytose und der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Simons und Toomre, 2000). Diese Punkte müssen in Zukunft näher untersucht werden. Da auch die T-Zellproliferation von Makaken im Vergleich zum Menschen schwächer ist (Daten nicht gezeigt), scheint der mAk TGN1412 in Makaken im Gegensatz zum Menschen nicht als Superagonist zu wirken (Stebbing *et al.*, 2007). Dies bietet eine erste Erklärung für die aufgetretenen schweren Nebenwirkungen nach TGN1412-Applikation im Menschen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass trotz der Abwesenheit von toxischen Signalen im Affenmodell, welches als der goldene Standard für präklinische Tests bezeichnet wird, *in vitro*-Analysen von humanen Zellen weiterhin obligatorisch sind, um Risiken in *first-in-human*-Studien zu reduzieren.

In der Patentschrift für den mAk TGN1412 ist beschrieben, dass die IgG1-Variante von TGN1412, TGN1112, in PBMCs eine Proliferation von T-Zellen induzierte, während das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von TGN1112 dies nicht konnte (Hanke *et al.*, 2006). Somit deuten bereits die präklinischen Daten darauf hin, dass der Fc-Teil des superagonistischen mAk TGN1112 eine Rolle bei der Vermittlung der Funktion spielt. Auch für den mAk OKT3 ist beschrieben, dass das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment keine Aktivierung von T-Zellen induzieren kann, wohingegen der vollständige Antikörper dazu in der Lage ist (Woodle *et al.*, 1998). Aus Daten, die bei Anwendung der *BIAcore*-Methode mit humanem IgG aus dem Serum ermittelt wurden, ist bekannt, dass FcγR, insbesondere FcγRI (CD64), mit der Subklasse IgG4 geringer interagiert als mit anderen Ig-Subklassen. Da für die Indikation von TGN1412 Fc-vermittelte Interaktionen vermieden werden sollten, wurde aus diesem Grund von der Firma TeGenero die Subklasse IgG4 für TGN1412 ausgewählt. Wir konnten zeigen, dass die alleinige lösliche Zugabe des IgG4 mAk TGN1412 zu humanen T-Zellen keine Proliferation induzieren konnte. Das Beschichten von Zellkulturplatten (*coating*) mit dem mAk TGN1412 und die Zugabe von humanen T-Zellen führte hingegen zu einer Proliferation von T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Methode des Antikörper-Beschichtens mit TGN1412 wurde bereits in der Literatur beschrieben (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff*, 2006; Stebbings *et al.*, 2007). In der Publikation von Stebbings *et al.* wurden zwei Arten des Beschichtens des mAk TGN1412 analysiert. Zum einen wird TGN1412 mit Hilfe einer puffernden Substanz (*wet-coating*) und zum anderen über das Trocknen mit warmer Luft (*air-dried coating*) auf der Zellkulturplatte beschichtet. Nur nach Trocknung des mAk TGN1412 mit warmer Luft wurde in PBMCs eine Proliferation von T-Zellen induziert (Stebbing *et al.*, 2007). Im



Gegensatz zu Stebbings *et al.* konnten wir jedoch zeigen, dass die lösliche Zugabe von TGN1412 in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper zur Kreuzvernetzung von T-Zellen führte, so dass eine Proliferation von T-Zellen ausgelöst werden konnte (Abb. 4.5). Die Proliferation von TGN1412-stimulierten T-Zellen wird dosisabhängig induziert und weist eine sogenannte glockenförmige Dosis-Wirkungskurve auf. In *M. fascicularis* wurden in präklinischen Tests Dosen an TGN1412 von bis zu 50 mg/kg eingesetzt, welche keine Nebenwirkungen hervorriefen. Solche hohen Dosen TGN1412 induzierten *in vitro* auch in humanen T-Zellen mit einer vergleichbaren Konzentration von  $>10 \mu\text{g/ml}$  keine Proliferation (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu induzierten niedrigere Konzentrationen TGN1412 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) *in vitro* eine massive Proliferation von T-Zellen. Diese Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  *in vitro* ist vergleichbar mit der Konzentration an TGN1412 ( $0,1 \text{ mg/kg}$ ), wie sie in den Probanden vorgelegen hatte. Diese Dosisabhängigkeit von TGN1412 ist auch von Stebbings *et al.* beobachtet worden (Stebbing *et al.*, 2007). Sowohl durch das *coating* als auch durch das Kreuzvernetzen von Antikörpern weisen diese eine regelmäßige und geordnetere Struktur auf. Diese Struktur spiegelt möglicherweise die *in vivo* vorhandene Struktur, die bei Zell-Zell-Interaktionen oder der immunologischen Synapse vorliegt, wider. Durch das Kreuzvernetzen kann es zu einer Verdichtung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche (*Cluster*) kommen, so dass die Signalweiterleitung begünstigt und dadurch eine Immunantwort verstärkt wird.

Der anti-IgG4-Antikörper induziert über die Kreuzvernetzung des mAk TGN1412 eine Aktivierung von T-Zellen. Diese Aktivierung spiegelt sich auch in der Expression von Zytokinen wider. Während durch die alleinige Zugabe von TGN1412 in löslicher Form keine Zytokine sekretiert werden konnten, so wurden die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17 sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 von TGN1412-stimulierten T-Zellen in Kombination mit einem anti-IgG4-Antikörper sezerniert. Diese Zytokine bilden einen Teil des *in vivo* aufgetretenen Zytokinsturms (Suntharalingam *et al.*, 2006). Demnach ist der Fc-Teil des mAk TGN1412 für seine Funktion essentiell.

Nach intravenöser Applikation von IgG sind Blut- und Endothelzellen die ersten Zelltypen, die mit dem Antikörper in Kontakt treten. Diese Zellen können somit für das Kreuzvernetzen des mAk TGN1412 verantwortlich sein. Außerdem verteilt sich der Antikörper in kürzester Zeit weiter, so dass zusätzlich weitere Kompartimente betroffen sind, die bei der Funktion von Antikörpern mitwirken können. Das Kreuzvernetzen des Fc-Teils eines IgG-Antikörpers erfolgt über die Fc $\gamma$ R. Wie in der Literatur beschrieben

(Ravetch und Kinet, 1991) konnte mit FACS-Färbungen (Abb. 4.8) bestätigt werden, dass T-Zellen bis auf geringe Mengen des Fc $\gamma$ RIII (CD16) keine Fc $\gamma$ R exprimieren. Außer T-Zellen exprimieren alle Blutzellen mindestens einen der drei Fc $\gamma$ R (Abb. 4.8; (Nimmerjahn und Ravetch, 2008; Ravetch und Kinet, 1991)). Blutzellen können mit ihrem Fc $\gamma$ R den Fc-Teil von Antikörpern binden und somit aktiviert werden. Während die Fc $\gamma$ R auf Monozyten oder NK-Zellen nicht in der Lage waren, TGN1412 auf T-Zellen kreuzzuvernetzen, induzierte die Kreuzvernetzung mittels Fc $\gamma$ RII auf B-Zellen überraschenderweise sowohl die Proliferation von T-Zellen als auch die Sekretion von Zytokinen (Abb. 4.9 und 4.10). Überstände von diesen Stimulationen (TGN1412-stimulierte T-Zellen in Kombination mit B-Zellen) induzieren in Kombination mit TGN1412 auf frischen T-Zellen jedoch keine Proliferation (Weißmüller, 2009), was darauf hindeutet, dass das Zytokinmilieu alleine nicht ausreichend ist, die Proliferation von TGN1412-behandelten T-Zellen zu induzieren. Monozyten waren zwar nicht imstande, eine Proliferation von mit TGN1412 stimulierten T-Zellen hervorzurufen, dennoch wurden die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-17 exprimiert. Monozyten tragen wie die B-Zellen den inhibierenden Fc $\gamma$ RIIB (CD32B) auf ihrer Oberfläche. Darüber hinaus exprimieren sie jedoch auch den Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) und den hochaffinen, aktivierenden Fc $\gamma$ RI (CD64) (Nimmerjahn und Ravetch, 2007; Woof und Burton, 2004). Auf einer Zelle befinden sich demnach sowohl aktivierende als auch inhibierende Fc $\gamma$ R, die Signale in das Zellinnere weiterleiten. Die Bindung von TGN1412 sowohl an aktivierende als auch an inhibierende Fc $\gamma$ R reduziert im Ganzen vermutlich die Aktivierung der Zelle.

Die Kreuzvernetzung von Antikörpern mit Blutzellen und die daraus resultierende Sekretion von Zytokinen wurde bereits für den mAk OKT3 beschrieben (Alegre *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2000). Diese Sekretion von Zytokinen konnte mit einem in seinem Fc-Teil veränderten mAk, hOKT3 $\gamma$ 1, reduziert werden. Der mAk hOKT3 $\gamma$ 1 (IgG1) besitzt die gleiche Bindedomäne wie OKT3 (IgG2a), weist jedoch in seiner C<sub>H</sub>2 Region des Fc-Teils an Position 234 und 235 zwei Aminosäureaustausche von Leucin gegen Alanin auf, was eine reduzierte Fc $\gamma$ R-Bindungsaffinität zur Folge hat (Alegre *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2000).

Eine Bindung des Fc-Teils von TGN1412 trägt maßgeblich zu seiner Funktion bei. Die zusätzliche Bindung von Fc $\gamma$ R auf primären Immunzellen, insbesondere auf B-Zellen, induziert die Expression von Zytokinen. Durch spezifische Blockierung der Fc $\gamma$ RII auf

B-Zellen (Abb. 4.11) kam es zu einer deutlich verminderten Sekretion von Zytokinen. Dies spiegelt die Bedeutsamkeit der Fc $\gamma$ R für den mAk TGN1412 wider.

Neben Immunzellen des peripheren Blutes können auch andere Zelltypen wie Endothelzellen zur Kreuzvernetzung von TGN1412 *in vivo* beigetragen haben. In einer ersten Studie nach dem TGN1412-Zwischenfall konnte gezeigt werden, dass PBMCs nach Co-Kultivierung mit humanen Endothelzellen die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-6 sekretierten (*Expert Group on Phase One Clinical Trails: Chairman Duff, 2006*). Des Weiteren wurde die Expression der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8 und IFN- $\gamma$  nach Co-Kultivierung von adhärennten HUVECs beschrieben, die mit TGN1412 stimulierten PBMCs behandelt wurden (Stebbing *et al.*, 2007).

In der Literatur ist beschrieben, dass Endothelzellen verschiedene Fc $\gamma$ R exprimieren. Allerdings weisen die Endothelzellen aus verschiedenen Organen eine unterschiedliche Expression der Fc $\gamma$ R auf (Sedmak *et al.*, 1991). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass Endothelzellen der Aorta (*human aortic endothelial cells: HAEC*) den Fc $\gamma$ RII (CD32) und Fc $\gamma$ RIII (CD16) exprimieren (Pan *et al.*, 1998). Die Expression der Fc $\gamma$ R auf Endothelzellen konnte nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  verstärkt werden (Pan *et al.*, 1998; Weißmüller, 2009). Vermutlich waren die Fc $\gamma$ R auf den Endothelzellen an der Kreuzvernetzung des Fc-Teils von TGN1412 zusätzlich beteiligt, wodurch es zu der schnellen Aktivierung des Immunsystems kam.

Ein Jahr nach dem TGN1412-Zwischenfall wurde die Möglichkeit diskutiert, dass weitere Zelloberflächenrezeptoren auf Endothelzellen *in vivo* eine Rolle bei der Induktion des Zytokinsturms gespielt haben können, wie z.B. das co-stimulatorische Molekül ICOS (*inducible costimulator*) (Hunig, 2007). Zwar weist TGN1412 keine Kreuzreaktivität mit dem zytotoxischen T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4) oder ICOS auf (TeGenero, 2005b; TeGenero, 2005a), ICOS könnte mit seinem Ligand ICOS-Ligand (ICOS-L; (Brodie *et al.*, 2000)) jedoch für ein zusätzliches co-stimulatorisches Signal sorgen, welches mit der CD28-Stimulation zusammenwirkt (Hunig, 2007). Das co-stimulatorische Molekül ICOS gehört wie auch CD28 zur B7-Familie. Es wird im Gegensatz zu CD28 nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert und induziert die Sekretion von IL-10 (Hutloff *et al.*, 1999; van Berkel und Oosterwegel, 2006). *In vitro* können T-Zellen über Stimulation des TCRs und des co-stimulatorischen Moleküls ICOS aktiviert werden, so dass diese proliferieren (van Berkel und Oosterwegel, 2006).

Ein mögliches Modell zur Induktion der schnell aufgetretenen, schwerwiegenden Nebenwirkungen *in vivo* im Menschen könnte folgendermaßen aussehen: Nach Injektion des mAk TGN1412 bindet dieser an CD28 auf humanen T-Zellen. Fc $\gamma$ R-exprimierende Zellen, insbesondere B-Zellen, sind in der Lage, TGN1412 über ihre Fc $\gamma$ R kreuzzuvernetzen. Dadurch wird die Proliferation von T-Zellen und die Sekretion verschiedener Zytokine induziert. Diese Zytokine können wiederum Einfluss auf die T-Zelle und die B-Zelle ausüben sowie auf weitere benachbarte Zellen wie z.B. Endothelzellen. Auf Endothelzellen induzieren die sekretierten Zytokine, besonders IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die verstärkte Expression von Fc $\gamma$ R, welche zusätzlich imstande sein könnten, TGN1412 über seinen Fc-Teil kreuzzuvernetzen.

Immunologische Prozesse beruhen oft auf Spezies-spezifischen Mechanismen, wodurch die schwerwiegenden Nebenwirkungen, die in der Phase-I Studie mit TGN1412 auftraten, in den bisher relevanten Testspezies nicht ausreichend vorhergesagt werden konnten. Demnach ist es wichtig, weiterhin neue präklinische Modelle zur Testung von mAk zu etablieren.

Tonsillen zählen zum mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) und sind sekundäre immunologische Organe im Bereich von Mundhöhle und Rachen. Tonsillen sind von einem mehrschichtigen Epithel umgeben. Die Tonsille ist in verschiedene Bereiche wie die T-Zellzone und die B-Zellzone (follikuläre Strukturen unterhalb des Epithels) unterteilt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation der Tonsillenschnitte mit TGN1412 zur Überlappung dieser beiden Bereiche kommt. Die T-Zellen befinden sich nun auch in den follikulären Strukturen der B-Zellen (Abb. 4.12 C), so dass TGN1412 auf den T-Zellen von den B-Zellen kreuzvernetzt werden kann, was dann zur Proliferation der T-Zellen und zur Sekretion von Zytokinen führte (Abb. 4.12 A und B). Des Weiteren liegen die Zellen in sekundären lymphatischen Organen wie den Tonsillen im Gegensatz zum peripheren Blut sehr nahe beieinander, wodurch die T-Zellen einen anderen Aktivierungszustand aufweisen (Stefanova *et al.*, 2002). Möglicherweise reicht diese Voraktivierung bereits aus, so dass TGN1412 auf T-Zellen wirken kann, ohne dass das Kreuzvernetzen des Antikörpers notwendig ist. Diese Theorie wurde von T. Hünig bestätigt, indem er zeigen konnte, dass die Präinkubation von PBMCs in hoher Dichte zu einem anderen Aktivierungsstatus der T-Zellen führt, so dass daraus isolierte T-Zellen, die mit TGN1412 stimuliert wurden, Zytokine sekretieren

(Hunig, 2010). Im Vergleich dazu sind isolierte Zellen aus dem peripheren Blut nicht dazu in der Lage.

Nach Stimulation der Tonsillenschnitte *in vitro* kam es zur Sekretion von Zytokinen (Abb. 4.12). Nicht alle Zytokine, die während des Zytokinsturms im Menschen sekretiert wurden, konnten in den Tonsillenschnitten *in vitro* nach Stimulation mit TGN1412 nachgewiesen werden. Obwohl es zur massiven Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-12p70 und IL-23 nach TGN1412-Stimulation im Menschen kam (Suntharalingam *et al.*, 2006), wurden diese Zytokine nach 72 Stunden in den humanen Tonsillenschnitten nicht gebildet (Daten nicht gezeigt). Voraussichtlich waren *in vivo* weitere Komponenten wie Zellen, Rezeptoren, Zytokine etc. in die Induktion des Zytokinsturms involviert. Die *in vitro*-Stimulation von Tonsillenschnitten kann also teilweise den Zytokinsturm abbilden, der in den sechs Probanden während der Phase-I Studie aufgetreten ist.

Generell erfordert die Testung neuer Therapeutika die Analyse *in vivo*. Oft werden hierfür Mäuse oder nicht-humane Primaten als *in vivo*-Modelle verwendet. Allerdings scheinen diese im Falle von TGN1412 nicht die geeigneten Tiermodelle gewesen zu sein. Die Analyse im Menschen hingegen ist streng limitiert, wodurch die Notwendigkeit für Tiermodelle entsteht, die die Untersuchungen von humanen Zellen *in vivo* erlauben, so dass das Risiko unvorhersehbarer Nebenwirkungen für den Menschen minimiert werden kann. Ein solches Modell zur präklinischen Testung von mAk könnten humanisierte Mäuse bieten. Humanisierte Mäuse sind meist immundefiziente Mäuse, die mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC), mit PBMCs oder mit humanem Gewebe rekonstituiert wurden. Des Weiteren können Mäuse als humanisiert bezeichnet werden, wenn sie ein humanes Transgen tragen. In diesen immundefizienten Mäusen, die mit einem humanen Immunsystem ausgestattet sind, kann *in vivo* u.a. der Einfluss von superagonistischen mAk untersucht werden (Legrand *et al.*, 2006; Shultz *et al.*, 2007). Erste Arbeiten in RAG2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> Mäusen, die mit humanen CD34<sup>+</sup> Blutstammzellen humanisiert wurden, konnten bereits zeigen, dass superagonistische anti-CD28 mAk in der Lage sind, eine transiente T-Zellproliferation (einschließlich CD25<sup>+</sup> Zellen) hervorzurufen und eine lang anhaltende Depletion peripherer T-Zellen zu induzieren (Legrand *et al.*, 2006). Bis heute ist die Methodik der Humanisierung allerdings noch nicht vollständig etabliert, so dass es keine 100%ige Humanisierung gibt. In eigenen Vorarbeiten konnte bestätigt werden, dass die Humanisierungen von mehreren Mäusen mit Zellen eines Spenders zu unterschiedlichen humanen Zellzahlen in der Maus führt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist es von

großer Bedeutung, dass die Methode der Humanisierung weiter etabliert wird, denn humanisierte Mäuse könnten eine gute Alternative für die *in vivo*-Studien des humanen Immunsystems sowie die Testung humaner Therapeutika bieten.

Viele Antikörper vermitteln einen Teil ihrer Funktion über ihre Fc:Fc $\gamma$ R-Bindung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der mAk TGN1412 in seiner löslichen Form weder zu einer Proliferation von T-Zellen noch zu einer Freisetzung von Zytokinen führte. Um diese Effekte zu erreichen, muss der mAk TGN1412 kreuzvernetzt werden. Dies kann in *in vitro*-Tests zum einen über einen anti-IgG4-Antikörper induziert werden oder durch Bindung von TGN1412 an eine Zellkulturplatte. *In vivo* kann diese Kreuzvernetzung über Fc $\gamma$ R, welche auf humanen Blutzellen exprimiert werden, induziert werden.

Makaken schienen im Falle des mAk TGN1412 nicht das prädiktive Modell zur Analyse von superagonistischen mAk wie TGN1412 zu sein. Aufgrund unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden konnten die schwerwiegenden Nebenwirkungen nicht vorhergesagt werden. Im Gegensatz dazu bieten *in vitro*-Experimente mit Gewebeschnitten humaner Tonsillen eine neue Alternative zur präklinischen Testung von mAk. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der im Menschen aufgetretene Zytokinsturm *in vitro* abgebildet werden konnte und Tonsillen somit eine prädiktive Methode zur Testung von mAk darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abramowicz,D., Schandene,L., Goldman,M., Crusiaux,A., Vereerstraeten,P., De Pauw,L., Wybran,J., Kinnaert,P., Dupont,E., Toussaint,C., 1989. Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* 47, 606-608.
2. Acuto,O., Michel,F., 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 939-951.
3. Aigner,A., Neumann,S. *Immunchemie. Grundlagen - Anwendungen - Perspektiven.* 1997. Gustav Fischer.
4. Akira,S., Takeda,K., Kaisho,T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675-680.
5. Alegre,M.L., Collins,A.M., Pulito,V.L., Brosius,R.A., Olson,W.C., Zivin,R.A., Knowles,R., Thistlethwaite,J.R., Jolliffe,L.K., Bluestone,J.A., 1992. Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 148, 3461-3468.
6. Amigorena,S., Bonnerot,C., 1999. Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol. Rev.* 172, 279-284.
7. Anderson,C.L., Grey,H.M., 1974. Receptors for aggregated IgG on mouse lymphocytes: their presence on thymocytes, thymus-derived, and bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 139, 1175-1188.
8. Arnold,J.N., Wormald,M.R., Sim,R.B., Rudd,P.M., Dwek,R.A., 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 21-50.
9. Bessler,W.G., Baron,D., 1988. [Production and application of monoclonal antibodies]. *Naturwissenschaften* 75, 496-502.
10. Bettelli,E., Oukka,M., Kuchroo,V.K., 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8, 345-350.
11. Beutler,B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845-859.
12. Beutler,B., Eidenschenk,C., Crozat,K., Imler,J.L., Takeuchi,O., Hoffmann,J.A., Akira,S., 2007. Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 753-766.
13. Beyersdorf,N., Gaupp,S., Balbach,K., Schmidt,J., Toyka,K.V., Lin,C.H., Hanke,T., Hunig,T., Kerkau,T., Gold,R., 2005. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 202, 445-455.

14. Beyersdorf,N., Hanke,T., Kerkau,T., Hunig,T., 2006. CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4+CD25+ regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.* 5, 40-45.
15. Biacore AB. *BIAtechnology handbook*. 1994. RAK Design, Uppsala, Sweden.
16. Bielekova,B., Becker,B.L., 2010. Monoclonal antibodies in MS: mechanisms of action. *Neurology* 74 Suppl 1, S31-S40.
17. Bischof,A., Hara,T., Lin,C.H., Beyers,A.D., Hunig,T., 2000. Autonomous induction of proliferation, JNK and NF-alphaB activation in primary resting T cells by mobilized CD28. *Eur. J. Immunol.* 30, 876-882.
18. Borchmann,P., Riethmuller,G., Engert,A., 2001. [Monoclonal antibodies: development and clinical prospects]. *Internist (Berl)* 42, 803-814.
19. Brodie,D., Collins,A.V., Iaboni,A., Fennelly,J.A., Sparks,L.M., Xu,X.N., van der Merwe,P.A., Davis,S.J., 2000. LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr. Biol.* 10, 333-336.
20. Bruhns,P., Iannascoli,B., England,P., Mancardi,D.A., Fernandez,N., Jorieux,S., Daeron,M., 2009. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716-3725.
21. Chatenoud,L., Ferran,C., Legendre,C., Thouard,I., Merite,S., Reuter,A., Gevaert,Y., Kreis,H., Franchimont,P., Bach,J.F., 1990. In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation* 49, 697-702.
22. Coiffier,B., Lepage,E., Briere,J., Herbrecht,R., Tilly,H., Bouabdallah,R., Morel,P., Van Den,N.E., Salles,G., Gaulard,P., Reyes,F., Lederlin,P., Gisselbrecht,C., 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 346, 235-242.
23. Corrales-Aguilar,E. A novel method for measuring IgG-dependent triggering of host FcγRs CD16, CD32 and CD64 reveals a selective inhibition through herpesviral FcγRs. *Doktorarbeit*. 2008. Humboldt-Universität Berlin.
24. Crocker,P.R., Paulson,J.C., Varki,A., 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255-266.
25. Daeron,M., 1997. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234.
26. Dennehy,K.M., Elias,F., Na,S.Y., Fischer,K.D., Hunig,T., Luhder,F., 2007. Mitogenic CD28 signals require the exchange factor Vav1 to enhance TCR signaling at the SLP-76-Vav-Itk signalosome. *J. Immunol.* 178, 1363-1371.
27. Dennehy,K.M., Kerstan,A., Bischof,A., Park,J.H., Na,S.Y., Hunig,T., 2003. Mitogenic signals through CD28 activate the protein kinase Ctheta-NF-kappaB pathway in primary peripheral T cells. *Int. Immunol.* 15, 655-663.



28. Dubel,S., 2007. Recombinant therapeutic antibodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 723-729.
29. Edelman,G., 1972. Antibody structure and molecular immunology. Nobel Lecture 31-54.
30. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic S6. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. CPMP/ICH/302/95. 1998a.
31. European Medicines Agency (EMA). Note for guidance on preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. CPMP/ICH/302/95(ICH Topic 6). 1998b.
32. European Medicines Agency (EMA). Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity. EMA/CPMP/SWP/104/99. 2000.
33. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Comparability of Biotechnology-derived Medicinal Products after a Change in the Manufacturing Process Non-Clinical and Clinical Issues. EMA/CHMP/BMWP/101695/2007. 2006a. EMA/CHMP/BMWP/101695.
34. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins. EMA/CHMP/BMWP/14327/2006. 2006b.
35. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Development of a CHMP Guideline on the Non-Clinical Requirements to Support Early Phase I Clinical Trials with Pharmaceutical Compounds. 2006c. EMA/CHMP/SWP/91850/2006.
36. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies and related Substances. EMA/CHMP/WP/157653/2007. 2007a.
37. European Medicines Agency (EMA). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first in human clinical trials with investigational medicinal products. 2007b.
38. Evans,E.J., Esnouf,R.M., Manso-Sancho,R., Gilbert,R.J., James,J.R., Yu,C., Fennelly,J.A., Vowles,C., Hanke,T., Walse,B., Hunig,T., Sorensen,P., Stuart,D.I., Davis,S.J., 2005. Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat. Immunol.* 6, 271-279.
39. Expert Group on Phase One Clinical Trials: Chairman Duff,G. Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials: Final Report. Final Report. 2006. The Stationary Office (TSO), Norwich, United Kingdom.
40. Faria,A.M., Weiner,H.L., 2006. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 5, 179-190.
41. FDA (U.S.Department of Health Services Food and Drug Administration), CDER (Centre for Drug Evaluation and Research), CBER (Centre for Biologics and

- Research). Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. 2010.
42. Feuerer,M., Hill,J.A., Mathis,D., Benoist,C., 2009. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat. Immunol.* 10, 689-695.
  43. Fontenot,J.D., Rudensky,A.Y., 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 6, 331-337.
  44. Gaston,R.S., Deierhoi,M.H., Patterson,T., Prasthofer,E., Julian,B.A., Barber,W.H., Laskow,D.A., Diethelm,A.G., Curtis,J.J., 1991. OKT3 first-dose reaction: association with T cell subsets and cytokine release. *Kidney Int.* 39, 141-148.
  45. Geissmann,F., Manz,M.G., Jung,S., Sieweke,M.H., Merad,M., Ley,K., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.
  46. Germain,R.N., Margulies,D.H., 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 403-450.
  47. Gibbs,R.A., Rogers,J., Katze,M.G., Bumgarner,R., Weinstock,G.M., Mardis,E.R., Remington,K.A., Strausberg,R.L., Venter,J.C., Wilson,R.K., Batzer,M.A., Bustamante,C.D., Eichler,E.E., Hahn,M.W., Hardison,R.C., Makova,K.D., Miller,W., Milosavljevic,A., Palermo,R.E., Siepel,A., Sikela,J.M., Attaway,T., Bell,S., Bernard,K.E., Buhay,C.J., Chandrabose,M.N., Dao,M., Davis,C., Delehaunty,K.D., Ding,Y., Dinh,H.H., Dugan-Rocha,S., Fulton,L.A., Gabisi,R.A., Garner,T.T., Godfrey,J., Hawes,A.C., Hernandez,J., Hines,S., Holder,M., Hume,J., Jhangiani,S.N., Joshi,V., Khan,Z.M., Kirkness,E.F., Cree,A., Fowler,R.G., Lee,S., Lewis,L.R., Li,Z., Liu,Y.S., Moore,S.M., Muzny,D., Nazareth,L.V., Ngo,D.N., Okwuonu,G.O., Pai,G., Parker,D., Paul,H.A., Pfannkoch,C., Pohl,C.S., Rogers,Y.H., Ruiz,S.J., Sabo,A., Santibanez,J., Schneider,B.W., Smith,S.M., Sodergren,E., Svatek,A.F., Utterback,T.R., Vattathil,S., Warren,W., White,C.S., Chinwalla,A.T., Feng,Y., Halpern,A.L., Hillier,L.W., Huang,X., Minx,P., Nelson,J.O., Pepin,K.H., Qin,X., Sutton,G.G., Venter,E., Walenz,B.P., Wallis,J.W., Worley,K.C., Yang,S.P., Jones,S.M., Marra,M.A., Rocchi,M., Schein,J.E., Baertsch,R., Clarke,L., Csuros,M., Glasscock,J., Harris,R.A., Havlak,P., Jackson,A.R., Jiang,H., Liu,Y., Messina,D.N., Shen,Y., Song,H.X., Wylie,T., Zhang,L., Birney,E., Han,K., Konkel,M.K., Lee,J., Smit,A.F., Ullmer,B., Wang,H., Xing,J., Burhans,R., Cheng,Z., Karro,J.E., Ma,J., Raney,B., She,X., Cox,M.J., Demuth,J.P., Dumas,L.J., Han,S.G., Hopkins,J., Karimpour-Fard,A., Kim,Y.H., Pollack,J.R., Vinar,T., Addo-Quaye,C., Degenhardt,J., Denby,A., Hubisz,M.J., Indap,A., Kosiol,C., Lahn,B.T., Lawson,H.A., Marklein,A., Nielsen,R., Vallender,E.J., Clark,A.G., Ferguson,B., Hernandez,R.D., Hirani,K., Kehrer-Sawatzki,H., Kolb,J., Patil,S., Pu,L.L., Ren,Y., Smith,D.G., Wheeler,D.A., Schenck,I., Ball,E.V., Chen,R., Cooper,D.N., Giardine,B., Hsu,F., Kent,W.J., Lesk,A., Nelson,D.L., O'brien,W.E., Prufer,K., Stenson,P.D., Wallace,J.C., Ke,H., Liu,X.M., Wang,P., Xiang,A.P., Yang,F., Barber,G.P., Haussler,D., Karolchik,D., Kern,A.D., Kuhn,R.M., Smith,K.E., Zwiag,A.S., 2007. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 316, 222-234.

48. Gogishvili,T., Langenhorst,D., Luhder,F., Elias,F., Elflein,K., Dennehy,K.M., Gold,R., Hunig,T., 2009. Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. *PLoS. One.* 4, e4643.
49. Hanke,T., Trischler,M., Guntermann,C. Superagonistic anti-CD28 Antibody. *PCT/EP2005/012050.* 2006.
50. Hanke,T., 2006. Lessons from TGN1412. *Lancet* 368, 1569-1570.
51. Hansel,T.T., Kropshofer,H., Singer,T., Mitchell,J.A., George,A.J., 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.*
52. Hara,T., Fu,S.M., Hansen,J.A., 1985. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.* 161, 1513-1524.
53. Harwood,N.E., Batista,F.D., 2010. Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 185-210.
54. Hassan,M.S., Abedi-Valugerdi,M., Lefranc,G., Hammarstrom,L., Smith,C.I., 1991. Biological half-life of normal and truncated human IgG3 in scid mice. *Eur. J. Immunol.* 21, 1319-1322.
55. Hoebe,K., Janssen,E., Beutler,B., 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5, 971-974.
56. Holländer GA. *Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis.* 2006. Urban Fischer Verlag.
57. Horejsi,V., Zhang,W., Schraven,B., 2004. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 603-616.
58. Hunig,T. unpublizierte Daten. 2010. Präsentation: Workshop on in vitro cytokine release assay, EMEA, London.
59. Hunig,T., 2007. Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies. *Adv. Immunol.* 95, 111-148.
60. Hunig,T., Dennehy,K., 2005. CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol. Lett.* 100, 21-28.
61. Hutloff,A., Dittrich,A.M., Beier,K.C., Eljaschewitsch,B., Kraft,R., Anagnostopoulos,I., Kroczeck,R.A., 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
62. Ibegbu,C., Brodie-Hill,A., Kourtis,A.P., Carter,A., McClure,H., Chen,Z.W., Nahmias,A.J., 2001. Use of human CD3 monoclonal antibody for accurate CD4+ and CD8+ lymphocyte determinations in macaques: phenotypic characterization of the CD3- CD8+ cell subset. *J. Med. Primatol.* 30, 291-298.
63. Iwasaki,A., Medzhitov,R., 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291-295.

64. Janeway, C.A., Jr., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1, 1-13.
65. Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
66. Janssen-Cilag. Orthoclone OKT3 Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz. 2008.
67. Jefferis, R., Lefranc, M.P., 2009. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs.* 1, 332-338.
68. Jefferis, R., Lund, J., 2002. Interaction sites on human IgG-Fc for Fcγ3R: current models. *Immunol. Lett.* 82, 57-65.
69. Jonuleit, H., Kuhn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A.H., 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27, 3135-3142.
70. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670-673.
71. Kawai, T., Akira, S., 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 7, 131-137.
72. Kenter, M.J., Cohen, A.F., 2006. Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412. *Lancet* 368, 1387-1391.
73. Kohler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
74. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485-517.
75. Leclerc, J.C., Plater, C., Fridman, W.H., 1977. The role of the Fc receptor (FcR) of thymus-derived lymphocytes. I. Presence of FcR on cytotoxic lymphocytes and absence of direct role in cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 7, 543-548.
76. Legrand, N., Cupedo, T., van Lent, A.U., Ebeli, M.J., Weijer, K., Hanke, T., Spits, H., 2006. Transient accumulation of human mature thymocytes and regulatory T cells with CD28 superagonist in "human immune system" Rag2(-/-)γ3R(-/-) mice. *Blood* 108, 238-245.
77. Liedert, B., Krafft, H., Kalinke, U., Schneider, C., 2007. Lektion gelernt? Klinische Studien nach TeGenero. *Transkript* 6.
78. Lin, C.H., Hunig, T., 2003. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur. J. Immunol.* 33, 626-638.
79. Loertscher, R., 2002. The utility of monoclonal antibody therapy in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 34, 797-800.

80. Lonberg, N., 2005. Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.* 23, 1117-1125.
81. Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K.M., Guntermann, C., Muller, I., Winkler, E., Kerkau, T., Ikemizu, S., Davis, S.J., Hanke, T., Hunig, T., 2003. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med.* 197, 955-966.
82. Lux, A., Aschermann, S., Biburger, M., Nimmerjahn, F., 2010. The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *Ann. Rheum. Dis.* 69 Suppl 1, i92-i96.
83. MacLennan, I.C., 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117-139.
84. Mailliard, R.B., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, C.M., Kapsenberg, M.L., Kirkwood, J.M., Storkus, W.J., Kalinski, P., 2004. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 64, 5934-5937.
85. Marasco, W.A., Sui, J., 2007. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 25, 1421-1434.
86. Marks, B.R., Nowyhed, H.N., Choi, J.Y., Poholek, A.C., Odegard, J.M., Flavell, R.A., Craft, J., 2009. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat. Immunol.* 10, 1125-1132.
87. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
88. Muller-Berghaus, J., Olson, W.C., Moulton, R.A., Knapp, W.T., Schadendorf, D., Storkus, W.J., 2005. IL-12 production by human monocyte-derived dendritic cells: looking at the single cell. *J. Immunother.* 28, 306-313.
89. Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R.A., Margulies, D.H., 2002. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 853-885.
90. Neye, H. Monoklonale Antikörper: Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel. 43. 2006. Pharmazeutische Zeitung online.
91. Nguyen, D.H., Hurtado-Ziola, N., Gagneux, P., Varki, A., 2006. Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 7765-7770.
92. Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 24, 19-28.
93. Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* 96, 179-204.

94. Nimmerjahn,F., Ravetch,J.V., 2008. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions. *Methods Mol. Biol.* 415, 151-162.
95. Nissim,A., Chernajovsky,Y., 2008. Historical development of monoclonal antibody therapeutics. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3-18.
96. Ohresser,M., Olive,D., Vanhove,B., Watier,H., 2006. Risk in drug trials. *Lancet* 368, 2205-2206.
97. Pan,L.F., Kreisler,R.A., Shi,Y.D., 1998. Detection of Fcγ receptors on human endothelial cells stimulated with cytokines tumour necrosis factor-α (TNF-α) and interferon-γ (IFN-γ). *Clin. Exp. Immunol.* 112, 533-538.
98. Paul-Ehrlich-Institut. Veröffentlichung Nr. 337 über die Zulassung von Sera und Impfstoffen sowie anderen Amtshandlungen. 2009. *Bundesanzeiger* Nr. 134.
99. Perruche,S., Zhang,P., Maruyama,T., Bluestone,J.A., Saas,P., Chen,W., 2009. Lethal effect of CD3-specific antibody in mice deficient in TGF-β1 by uncontrolled flu-like syndrome. *J. Immunol.* 183, 953-961.
100. Plevy,S., Salzberg,B., Van Assche,G., Regueiro,M., Hommes,D., Sandborn,W., Hanauer,S., Targan,S., Mayer,L., Mahadevan,U., Frankel,M., Lowder,J., 2007. A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* 133, 1414-1422.
101. Presta,L.G., 2008. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 460-470.
102. Rajewsky,K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
103. Ransohoff,R.M., 2007. Natalizumab for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 2622-2629.
104. Ravetch,J.V., 1997. Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 121-125.
105. Ravetch,J.V., Kinet,J.P., 1991. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 457-492.
106. Ravetch,J. *Fundamental Immunology* (ed. Pal, W.E.). 685-700. 2003. Lippincott-Raven, Philadelphia.
107. Reichert,J.M., Dewitz,M.C., 2006. Anti-infective monoclonal antibodies: perils and promise of development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 191-195.
108. Reichert,J.M., Rosensweig,C.J., Faden,L.B., Dewitz,M.C., 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* 23, 1073-1078.
109. Riley,J.L., June,C.H., 2005. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105, 13-21.
110. Rodriguez-Palmero,M., Hara,T., Thumbs,A., Hunig,T., 1999. Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* 29, 3914-3924.

111. Rudd,C.E., Schneider,H., 2003. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 544-556.
112. Rudolph,M.G., Stanfield,R.L., Wilson,I.A., 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 419-466.
113. Sakaguchi,S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6, 345-352.
114. Salfeld,J.G., 2007. Isotype selection in antibody engineering. *Nat. Biotechnol.* 25, 1369-1372.
115. Samuel,C.E., 2007. Innate immunity minireview series: making biochemical sense of nucleic acid sensors that trigger antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem.* 282, 15313-15314.
116. Sautès-Fridman,C., Cassard,L., Cohen-Solal,J., Fridman,W.-H. Fc Gamma Receptors: A magic link with the outside world. *Fourth Quarter*, 148-151. 2003. ASHI.
117. Schmidt,J., Elflein,K., Stienekemeier,M., Rodriguez-Palmero,M., Schneider,C., Toyka,K.V., Gold,R., Hunig,T., 2003. Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J. Neuroimmunol.* 140, 143-152.
118. Schneider,C.K., Kalinke,U., 2007. [After the TGN1412 incident. Principles for assessment of first-in-man trials with monoclonal antibodies by the Paul Ehrlich Institute]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 50, 1213-1220.
119. Schraven,B., Kalinke,U., 2008. CD28 superagonists: what makes the difference in humans? *Immunity.* 28, 591-595.
120. Schroeder,H.W., Jr., Cavacini,L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-S52.
121. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie.* 2009. Spektrum Verlag.
122. Schwartz,R.H., 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.
123. Scolnik,P.A., 2009. mAbs: a business perspective. *MAbs.* 1, 179-184.
124. Sedmak,D.D., Davis,D.H., Singh,U., van de Winkel,J.G., Anderson,C.L., 1991. Expression of IgG Fc receptor antigens in placenta and on endothelial cells in humans. An immunohistochemical study. *Am. J. Pathol.* 138, 175-181.
125. Sender,L.Y., Gibbert,K., Suezer,Y., Radeke,H.H., Kalinke,U., Waibler,Z., 2010. CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals. *Mol. Immunol.*

126. Sender,L.Y., Waibler,Z., Merten,C., Hartig,R., Kliche,S., Gunzer,M., Reichardt,P., Kalinke,U., Schraven,B., 2008. Signaling signatures and functional properties of anti-human CD28 superagonistic antibodies. PLoS. One. 3, e1708.
127. Sgro,C., 1995. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. Toxicology 105, 23-29.
128. Sharpe,A.H., Abbas,A.K., 2006. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. N. Engl. J. Med. 355, 973-975.
129. Sharpe,A.H., Freeman,G.J., 2002. The B7-CD28 superfamily. Nat. Rev. Immunol. 2, 116-126.
130. Shevach,E.M., 2000. Regulatory T cells in autoimmunity\*. Annu. Rev. Immunol. 18, 423-449.
131. Shultz,L.D., Ishikawa,F., Greiner,D.L., 2007. Humanized mice in translational biomedical research. Nat. Rev. Immunol. 7, 118-130.
132. Simons,K., Toomre,D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 31-39.
133. Singer,A.L., Koretzky,G.A., 2002. Control of T cell function by positive and negative regulators. Science 296, 1639-1640.
134. Skapenko,A., Lipsky,P.E., Schulze-Koops,H., 2006. T cell activation as starter and motor of rheumatic inflammation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 305, 195-211.
135. Sopper,S., Stahl-Hennig,C., Demuth,M., Johnston,I.C., Dorries,R., ter,M., V, 1997. Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. Cytometry 29, 351-362.
136. Soroosh,P., Doherty,T.A., 2009. Th9 and allergic disease. Immunology 127, 450-458.
137. Stebbings,R., Findlay,L., Edwards,C., Eastwood,D., Bird,C., North,D., Mistry,Y., Dilger,P., Liefoghe,E., Cludts,I., Fox,B., Tarrant,G., Robinson,J., Meager,T., Dolman,C., Thorpe,S.J., Bristow,A., Wadhwa,M., Thorpe,R., Poole,S., 2007. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. J. Immunol. 179, 3325-3331.
138. Stefanova,I., Dorfman,J.R., Germain,R.N., 2002. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. Nature 420, 429-434.
139. Steinman,R.M., Lustig,D.S., Cohn,Z.A., 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. J. Exp. Med. 139, 1431-1445.
140. Stout,R.D., Herzenberg,L.A., 1975. The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. I. Detection of a subpopulation of murine T lymphocytes bearing the Fc receptor. J. Exp. Med. 142, 611-621.



141. Strebhardt,K., Ullrich,A., 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* 8, 473-480.
142. Suntharalingam,G., Perry,M.R., Ward,S., Brett,S.J., Castello-Cortes,A., Brunner,M.D., Panoskaltsis,N., 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355, 1018-1028.
143. Tacke,M., Hanke,G., Hanke,T., Hunig,T., 1997. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol.* 27, 239-247.
144. Takai,T., 2002. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 580-592.
145. Takeda,K., Akira,S., 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol.* 5, 143-153.
146. Takeda,K., Akira,S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14.
147. Tato,C.M., Laurence,A., O'Shea,J.J., 2006. Helper T cell differentiation enters a new era: le roi est mort; vive le roi! *J. Exp. Med.* 203, 809-812.
148. TeGenero. TGN1412 Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD). 2005a.
149. TeGenero. TGN1412 Investigator's brochure. Humanized agonistic anti-CD28 monoclonal antibody. 1. 2005b. Würzburg, Germany.
150. Ting,J.P., Duncan,J.A., Lei,Y., 2010. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* 327, 286-290.
151. Traggiai,E., Becker,S., Subbarao,K., Kolesnikova,L., Uematsu,Y., Gismondo,M.R., Murphy,B.R., Rappuoli,R., Lanzavecchia,A., 2004. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* 10, 871-875.
152. Truneh,A., Albert,F., Golstein,P., Schmitt-Verhulst,A.M., 1985. Calcium ionophore plus phorbol ester can substitute for antigen in the induction of cytolytic T lymphocytes from specifically primed precursors. *J. Immunol.* 135, 2262-2267.
153. van Berkel,M.E., Oosterwegel,M.A., 2006. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol. Lett.* 105, 115-122.
154. Vaughan,T.J., Osbourn,J.K., Tempest,P.R., 1998. Human antibodies by design. *Nat. Biotechnol.* 16, 535-539.
155. Veldhoen,M., Uyttenhove,C., van Snick,J., Helmby,H., Westendorf,A., Buer,J., Martin,B., Wilhelm,C., Stockinger,B., 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341-1346.

156. Waibler,Z., Sender,L.Y., Kamp,C., Muller-Berghaus,J., Liedert,B., Schneider,C.K., Lower,J., Kalinke,U., 2008. Toward experimental assessment of receptor occupancy: TGN1412 revisited. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 890-892.
157. Waldmann,T.A., 2003. Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med.* 9, 269-277.
158. Wan,Y.Y., Flavell,R.A., 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 212, 114-130.
159. Weißmüller,S. Fcγ-Rezeptor Expression auf humanen primären Zellen. 2009. Paul-Ehrlich-Institut, Langen.
160. Wing,M.G., Moreau,T., Greenwood,J., Smith,R.M., Hale,G., Isaacs,J., Waldmann,H., Lachmann,P.J., Compston,A., 1996. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J. Clin. Invest* 98, 2819-2826.
161. Wing,M.G., Waldmann,H., Isaacs,J., Compston,D.A., Hale,G., 1995. Ex-vivo whole blood cultures for predicting cytokine-release syndrome: dependence on target antigen and antibody isotype. *Ther. Immunol.* 2, 183-190.
162. Winkler,U., Jensen,M., Manzke,O., Schulz,H., Diehl,V., Engert,A., 1999. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 94, 2217-2224.
163. Woodle,E.S., Bluestone,J.A., Zivin,R.A., Jolliffe,L.K., Auger,J., Xu,D., Thistlethwaite,J.R., 1998. Humanized, nonmitogenic OKT3 antibody, huOKT3 gamma(Ala-Ala): initial clinical experience. *Transplant. Proc.* 30, 1369-1370.
164. Woof,J.M., Burton,D.R., 2004. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 89-99.
165. Xu,D., Alegre,M.L., Varga,S.S., Rothermel,A.L., Collins,A.M., Pulito,V.L., Hanna,L.S., Dolan,K.P., Parren,P.W., Bluestone,J.A., Jolliffe,L.K., Zivin,R.A., 2000. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell Immunol.* 200, 16-26.
166. Zhu,J., Yamane,H., Paul,W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445-489.

## 7 Veröffentlichungen

1. **Sender,L.Y.**, Waibler,Z., Merten,C., Hartig,R., Kliche,S., Gunzer,M., Reichardt,P., Kalinke,U., Schraven,B., 2008. Signaling signatures and functional properties of anti-human CD28 superagonistic antibodies. PLoS. One. 3, e1708.
2. Waibler,Z., **Sender,L.Y.**, Kamp,C., Muller-Berghaus,J., Liedert,B., Schneider,C.K., Lower,J., Kalinke,U., 2008. Toward experimental assessment of receptor occupancy: TGN1412 revisited. J. Allergy Clin. Immunol. 122, 890-892.
3. **Sender,L.Y.**, Gibbert,K., Suezzer,Y., Radeke,H.H., Kalinke,U., Waibler,Z., 2010. CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals. Mol. Immunol.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

---

Name	Linda Yasmin Sender
Geburtsdatum	24. März 1981
Geburtsort	Groß-Gerau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

## Schulische Ausbildung

---

08/1987 – 07/1991	<b>Grundschule Ludwig Schwamb</b>
08/1997 – 07/1998	<b>Conneaut Lake High School, Pennsylvania, USA</b> High School-Abschluss mit Auszeichnung
08/1991 – 07/2000	<b>Lichtenberggymnasium, Darmstadt</b> Abschluss mit Abitur

## Berufliche Ausbildung

---

10/2000 – 09/2006	<b>Technische Universität Darmstadt</b> Fachrichtung Biologie  Thema der Diplomarbeit: „Isolierung humaner dendritischer Zellen und deren Funktionsanalyse“ Abschluss als Diplom-Biologin
09/2003 – 03/2004	<b>Universidad Alcalá de Henares, Madrid, Spanien</b> Erasmus/Sokrates-Stipendium
01/2007 – heute	<b>Paul-Ehrlich-Institut, Langen</b> Promotion, Abteilung Immunologie, Prof. Dr. Kalinke  Thema der Promotion: „Analyse von Ursachen, die bei der klinischen Prüfung des superagonistischen anti-CD28 monoklonalen Antikörpers TGN1412 zur Induktion schwerer Nebenwirkungen führte“