

Aus dem Institut für medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung und Charakterisierung eines Immunzytokins basierend auf PankoMab-GEX® zur Optimierung der Tumorthherapie

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Maria Dix

aus Leipzig

Datum der Promotion: 18.09.2020

Vorwort

Anteile meiner Arbeit wurden bereits auf der Konferenz CIMT- Cancer Immunotherapy am 16.05.2018 auf einem Poster präsentiert.

Abstract number 211

“Comprehensive characterization of IL-15-based tumor targeted Immunocytokines”

Laura Dix, Patrik Kehler, Anika Jäkel, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk

Glycotope GmbH, Berlin, Germany

Cytokines are promising drugs for anti-cancer treatment as they modulate immune responses. Yet, administration of cytokines is often hindered by dose-limiting toxicities preventing their use as effective modulators. Particularly interleukin-15 (IL-15), as a potent stimulator of NK and CD8 T cells, is an attractive cytokine for cancer therapy. IL-15 induces high levels of anti-tumor cytotoxicity when used in combination with common tumor targeting antibodies in vitro and in vivo. However, by specifically targeting the tumor using an IL-15 based immunocytokine immune cells are preferentially activated at the local tumor site thereby increasing the potency of common tumor targeting antibodies. As a prerequisite for safe and effective immunocytokine therapy highly specific tumor targets are necessary. One promising tumor antigen is TA-MUC1, a novel carbohydrate / protein mixed epitope on the tumor marker MUC1 that is virtually absent from normal cells. TA-MUC1 shows a broad distribution among epithelial cancers of different origin and is also present on metastases and cancer stem cells underpinning its broad therapeutic potential. Based on our anti-TA-MUC1 IgG1 PankoMab-GEX we developed an immunocytokine platform consisting of different constructs to analyze the influence of IL15 potency, tumor targeting via TA-MUC1 and additional Fc-mediated immune cell binding. Three types of IL-15 with varying potency were tested. Furthermore, we generated Fc silenced immunocytokines to analyze the impact of a functional Fc part especially on NK cell activation and cytotoxicity. In addition, we developed untargeted immunocytokines to point out the influence of the TA-MUC1 antigen binding. Functional characterization of these immunocytokines involved in vitro analysis of immune cell activation, proliferation, cytotoxicity and cytokine release. By using this broad screening approach, we could show that our immunocytokines induce higher cytotoxicity against tumor cells and increase activation and proliferation especially on NK, NKT and CD8 T cells compared to the common tumor targeting IgG1 originator antibody. The mediated cytotoxicity was strongly dependent on TA-MUC1 antigen binding, IL-15 potency and the functional Fc terminus. The study emphasizes the advantage of comprehensive construct screening for immunocytokine lead candidate identification and in particular highlights TA-MUC1 as a promising antigen for development of immunocytokines as the untargeted immunocytokines did not achieve comparable efficacy.

Des Weiteren wurden Daten für die Patentseröffnung verwendet. Das Patent wurde im März 2018 im Europäischen Patentamt eingereicht und wird im Jahr 2019 veröffentlicht.

„Fusion protein constructs comprising an anti-MUC1 antibody and IL-15“

Johanna Rühmann, Patrik Kehler, Anika Jäkel, Laura Dix, Antje Danielczyk, Steffen Goletz

Alle Daten, die in der Dissertation, auf dem Poster und im Patent dargestellt wurden, wurden dabei von mir, Laura Maria Dix, generiert.

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung/ abstract	8
1 Zusammenfassung	8
2 Abstract	10
II Einleitung	11
3 Antikörper in der Krebstherapie	11
4 Zytokine in der Krebstherapie	14
4.1 Interferon-alpha	15
4.2 Interleukin-2	15
4.3 Interleukin-15	16
4.3.1 IL-15 Rezeptor	16
4.3.2 Funktion von IL-15	17
4.3.3 Präklinische und klinische Untersuchungen mit IL-15	18
4.4 Weitere proinflammatorische Interleukine	19
5 Immunzytokine	20
6 Tumorerflächenantigen TA-MUC1	22
7 Fragestellung	25
III Material und Methoden	27
8 Herstellung rekombinanter Proteine	27
9 Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
10 Zellzählung	30
11 Stabile Transfektion von Zellen	30
12 Klonierung von Zellen durch Aussaat in semisolidem Medium	31

13 Produktion von Zellkulturüberstand zur Antikörpergewinnung	32
14 Aufreinigung der Antikörper mittels Protein-A	32
15 Analytische und präparative Größenausschlusschromatografie	33
16 Endotoxinbestimmung	34
17 Isolierung von PBMCs aus Primärmaterial	34
18 Durchflusszytometrie	35
19 Aktivierung von PBMCs, NK- und T-Zellen	36
20 Proliferation von NK-Zellen und PBMCs	37
20.1 Analyse der Proliferation mittels CellTiter Glow®	37
20.2 Analyse der Proliferation mittels Cell Trace Violet	37
21 Ermittlung der natürlichen sowie antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität mittels Europiumbeladung der Zielzellen	38
22 Ermittlung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase-Detektion	39
23 Zytokinanalyse nach Immunzellstimulation	40
24 MUC1 Antigen ELISA	40
25 FcγRIIIaV AlphaScreen™	41
26 IL-15 Rezeptorbindung	41
27 <i>In vivo</i> Pharmakokinetikanalyse	42
28 Wirksamkeitsstudie <i>in vivo</i>	43
IV Ergebnisse	45
29 Auswahl eines immunzellstimulierenden Interleukins	45
29.1 Aktivierung von NK- und T-Zellen	45
29.2 Granzym B Sekretion	50

29.3 Natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen	51
29.4 Proliferation von NK-Zellen	53
29.5 Zusammenfassung der Vorversuche	54
30 Vergleich verschiedener PM-IL-15 Immunzytokine	56
30.1 Generierung, Produktion und Reinigung der PM-IL-15 Immunzytokine	56
30.2 Bindungseigenschaften der PM-IL-15 Immunzytokine	57
30.2.1 Antigenbindung	57
30.2.2 FcγRIIIaV-Bindung	59
30.2.3 IL-15 Rezeptorbindung	60
30.3 Aktivierung der Immunzellpopulationen	61
30.4 Zytokinprofil der PM-IL-15 Antikörper	65
30.5 Natürliche Zytotoxizität	67
30.6 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	68
30.6.1 Einfluss der Fc-Glykosylierung auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	68
30.6.2 Einfluss der Antigenbindung auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	71
30.6.3 Betrachtung der Effektorfunktion im Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch	72
30.7 Proliferation der unterschiedlichen Immunzellpopulationen	73
30.8 Einfluss der Antikörper auf die Immunzellpopulationen	75
31 In vivo Untersuchungen	78
31.1 Ermittlung der Serumhalbwertszeit in C57BL/6 Mäusen	78
31.2 Wirksamkeitsstudie	80
V Diskussion	83
32 Vergleich proinflammatorischer Zytokine	83
33 Vergleich der PM-IL-15 Immunzytokine in vitro	87
33.1 Unterschiede der verschiedenen IL-15 Potenzen auf die Immunzellen	87
33.2 Einfluss der Bindung der Immunzytokine an den FcγRIIIa Rezeptor auf Immunzellen	91
33.3 Einfluss der Bindung der Immunzytokine an das Antigen TA-MUC1	93
33.4 Auswahl des für die Therapie geeignetsten Immunzytokins	94

34 Pharmakokinetik und Wirksamkeitanalyse <i>in vivo</i>	95
VI Ausblick	98
Literatur	100
Abkürzungsverzeichnis	112
Eidesstattliche Versicherung	113
Publikationsliste	114
Lebenslauf	115
Danksagung	116

Teil I

Zusammenfassung/ abstract

1 Zusammenfassung

Zytokine stellen ein vielversprechendes Therapeutikum für die Immuntherapie bei Tumorerkrankungen dar. Dabei ist IL-15 ein interessantes Zytokin, da es vor allem NK- und CD8⁺ T-Zellen sehr stark aktiviert und diese Zellen maßgeblich an der Tumorreduktion beteiligt sind. Sowohl bei der Monotherapie mit IL-15 als auch in Kombination aus IL-15 und Antikörpern konnte *in vitro* und *in vivo* ein gesteigerter Tumorrückgang gezeigt werden. Der Einsatz von Zytokinen in der Therapie ist jedoch auf Grund von starken Toxizitäten dosislimitierend, weshalb die geringen verwendeten Konzentrationen oftmals nicht ausreichend für einen Therapieeffekt sind. Des Weiteren liegt die Serumhalbwertszeit im Falle von IL-15 bei lediglich 30 Minuten. Bei der Therapie mit IL-15 werden hauptsächlich die Immunzellen in der Zirkulation stimuliert, während nur wenige Immunzellen in der Tumorumgebung aktiviert werden. Deshalb stellen Immunzytokine einen vielversprechenden Ansatz für die Immuntherapie dar. Durch die Fusion eines Antikörpers und Zytokins entstehen antigenspezifische Immunzytokine, welche die Immunzellen gezielt in der immunsuppressiven Tumormikroumgebung aktivieren können. Zudem kann die Serumhalbwertszeit verlängert werden.

Ein für die Immuntherapie interessantes Antigen ist TA-MUC1, da es von soliden Tumorzellen exprimiert wird und auf gesunden Zellen nahezu nicht. PankoMab-GEX® ist ein Antikörper, der ein tumorspezifisches Kohlenhydrat/Protein Konformationsepitop auf MUC1 (TA-MUC1) bindet und ADCC gegen TA-MUC1 exprimierende Tumorzellen induzieren kann. Ob PankoMab-GEX® als Grundlage für die Entwicklung eines Immunzytokins geeignet ist, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Für diese Arbeit wurden insgesamt zehn Immunzytokine basierend auf PankoMab-GEX® generiert, welche sich hinsichtlich ihrer IL-15 Potenz (IL-15mut, IL-15wt, IL-15sushi), der FcγRIIIa Bindung sowie der Antigenbindung unterscheiden. Die Arbeit umfasste dabei die Generierung, Produktion und Reinigung der Konstrukte sowie die Charakterisierung der Bindungseigenschaften und der immunologischen Wirkung der Immunzytokine *in vitro* und *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Immunzellen mit den Immunzytokinen zu einer Steigerung der Aktivierung, Proliferation, Zytotoxizität und Zytokinausschüttung bei NK- und T-Zellen führt. Dabei konnte herausgestellt werden, dass das PM-IL-15sushi ein besonders potentes Immunzytokin ist, da es die zytotoxischen Immunzellen sehr stark aktiviert.

Anhand der durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass sich PankoMab-GEX® auf Grund der einzigartigen Antigenbindung für die Entwicklung eines Immunzytokins eignet. Angesichts der deutlich stärkeren Potenz des PM-IL-15sushi im Vergleich zu den anderen untersuchten Immunzytokinen sowie der vielversprechenden Wirksamkeitsstudie *in vivo* wurde dieses Konstrukt als potentiell, neuartiges Therapeutikum ausgewählt.

2 Abstract

Cytokines are promising immunotherapeutic drugs to treat cancer. Especially IL-15 is a potent cytokine as it strongly activates NK and CD8⁺ T cells which are important for tumor cell reduction. *In vitro* and *in vivo* studies already demonstrated tumor shrinkage after the combination therapy using an antibody and IL-15 or using IL-15 alone. The administration is dose limited due to strong toxicities. Therefore, low concentrations are administered which are not effective enough to enhance immune cell activity in the tumor microenvironment. Furthermore, serum half-life of IL-15 is only 30min. Using IL-15 for immunotherapy mainly activates circulating immune cells whereas immune cells in the tumor microenvironment get less activated. That is why immunocytokines are promising products for immunotherapy. Newly antigenspecific immunocytokines are generated by linking a cytokine to an antibody. These immunocytokines induce immune cell activation in the tumor microenvironment and prolong serum half-life.

One promising tumor antigen is TA-MUC1 which is expressed on solid tumors and is virtually absent on normal tissue. PankoMab-GEX® is an antibody which binds a novel carbohydrate/protein mixed epitope on the tumor marker MUC1 and mediates ADCC against TA-MUC1 expressing tumor cells. During this study it was analyzed if PankoMab-GEX® is a suitable antibody to generate an immunocytokine.

This study included the generation of ten immunocytokines based on PankoMab-GEX® which differ in IL-15 potency (IL-15mut, IL-15wt, IL-15sushi), FcγRIIIa binding and antigen binding. The generation, production and down stream purification of all immunocytokines were part of this study as well as the analysis of the binding characterization and the immunological effect *in vitro* and *in vivo*. It was shown that immune cell stimulation using immunocytokines enhance the NK and T cell activation, proliferation, cytotoxicity and cytokine secretion. It turned out, PM-IL-15sushi is a highly potent immunocytokine which strongly activates cytotoxic immune cells.

Regarding the generated data it is confirmed that PankoMab-GEX® is a potent antibody to develop an immunocytokine because of its unique antigen binding. The strong potency and great outcome of the efficacy study *in vivo* using PM-IL-15sushi compared to the other immunocytokines recommend that PM-IL-15sushi should be selected as a new anticancer therapeutic.

Teil II

Einleitung

3 Antikörper in der Krebstherapie

Chemotherapie, Bestrahlung und operative Tumorentfernung waren lange Zeit die einzigen Therapieansätze im Bereich der Krebstherapie, die jedoch oftmals nicht zur Ausheilung der Erkrankung führten, da die Therapien unspezifisch auf sich teilende Zellen wirken. Zusätzlich bringen diese Therapien hohe Nebenwirkungen mit sich, weil auch gesunde Körperzellen zerstört werden. Trotz der Erfolge neuer Therapieansätze in der Krebsforschung in den letzten Jahren sind Krebserkrankungen immer noch die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [1]. Weltweit wurde Lungenkrebs im Jahr 2015 auf Platz fünf der häufigsten Todesursachen von der *World Health Organization* gelistet [2] und bei der ausschließlichen Betrachtung der Todesursachen in Industrienationen fiel auf, dass in diesen Ländern vermehrt Brust- und Darmkrebserkrankungen auftreten und auch zum Tode führen. Das Robert Koch Institut geht davon aus, dass bis zum Jahr 2020 die Inzidenz für Brust-, Lungen- und Prostatakrebs weiterhin zunehmen wird, jedoch die allgemeine Krebssterblichkeit eingeschränkt werden kann [1]. Diese positive Prognose geht vor allem auf die immer neuen Entwicklungen der Krebstherapie zurück. Durch die zielgerichtete Immuntherapie können Tumorzellen auf Grund der Expression tumorspezifischer oder tumorassoziierter Antigene von entsprechenden therapeutischen Antikörpern erkannt werden. Tumorspezifische Antigene werden auf Grund von Mutationen von Tumorzellen, aber nicht von gesunden Zellen exprimiert. Beispielsweise ist das Gen, welches das Protein p53 kodiert, bei Tumorzellen häufig mutiert und stellt somit ein tumorspezifisches Antigen dar [3]. Tumorassozierte Antigene können von tumorösen sowie gesunden Zellen exprimiert werden, wobei Tumorzellen das Antigen überexprimieren. Ein Beispiel für ein tumorassoziertes Antigen ist der humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (HER2), welcher von Brustkrebszellen überexprimiert wird und auf Grund dessen die Bindung eines anti-HER2/neu Antikörpers möglich wird [4].

Den Anfang der zielgerichteten Krebstherapie bildete Anastrozol im Jahr 1996. Dieser Aromatasehemmer wird bei der Brustkrebstherapie eingesetzt, um den Estrogenspiegel im Blut zu senken, wodurch dem Tumor das Estrogen zur Proliferation fehlt [5]. Anastrozol bildete die Grundlage der Entwicklung weiterer Signaltransduktionshemmer, wie zum Beispiel Imatinib. Es inhibiert die Tyrosinkinasefunktion der Wachstumsrezeptoren auf der Zelloberfläche, was zum programmierten Zelltod der Tumorzellen führt [6].

Der monoklonale Antikörper Rituximab leitete im Jahr 1997 den Beginn der Krebsimmun-

therapie ein. Rituximab bindet spezifisch an CD20 (*cluster of differentiation*) positive Zellen und wird heutzutage als Standardtherapie bei Non-Hodgkin-Lymphom Patienten eingesetzt [7]. Schon ein Jahr später erhielt Trastuzumab die Zulassung bei metastasierendem, HER2-positivem Brustkrebs [4]. Beide Antikörper binden spezifisch über die variablen Domänen an das jeweilige Tumoroberflächenantigen und aktivieren über den Fc-Teil FcγRIIIa (CD16a) positive Immunzellen, wie NK-Zellen und Makrophagen. Über diese Bindung wird die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bei NK-Zellen und die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) bei Makrophagen gegen die Tumorzellen induziert [8]. Des Weiteren kann über den Fc-Teil die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) vermittelt werden [9].

Da die Tumormikroumgebung allerdings stark inhibierend auf die Immunzellen wirken kann, werden derzeit weitere Ansätze entwickelt, um die Aktivierung des Immunsystems zu optimieren. Im Idealfall setzt sich die Tumormikroumgebung neben den Tumorzellen und dessen Gefäßsystem aus Immunzellen, Fibroblasten, Perizyten und Adipozyten zusammen. Für die Immuntherapie ist es wichtig, dass sich eine hohe Anzahl an Immunzellen in der Tumormikroumgebung befindet, damit diese gegen den Tumor aktiviert werden können. Ein Beispiel für solche inflammatorisch „heißen“ Tumore, die vor allem sehr gut von NK-Zellen infiltriert sind, sind gastrointestinale Stromatumore mit einem Anteil an ca. 25% NK-Zellen [10]. Diese Tumore eignen sich demzufolge besonders für die klassische Antikörpertherapie. Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Tumore, die nicht von Immunzellen infiltriert, sondern von den Immunzellen umgeben sind (*immune-excluded tumors*). Dazu gehören vor allem nicht-kleinzellige Lungentumore [11]. Als immunologisch „kalte“ Tumore werden Tumore deklariert, welche keine Immunzellen in ihrer direkten Umgebung haben [12]. Patienten mit immunologisch „kalten“ Tumoren sprechen deshalb schlecht auf eine Immuntherapie an und müssen auf ein positives Ansprechen der Bestrahlungs- oder Chemotherapie hoffen. Um das Anwendungsgebiet der Krebsimmuntherapie zu erweitern, werden derzeit verschiedene Ansätze erprobt, welche die Infiltration des Tumorgewebes mit Immunzellen verbessern sollen (Kapitel 5).

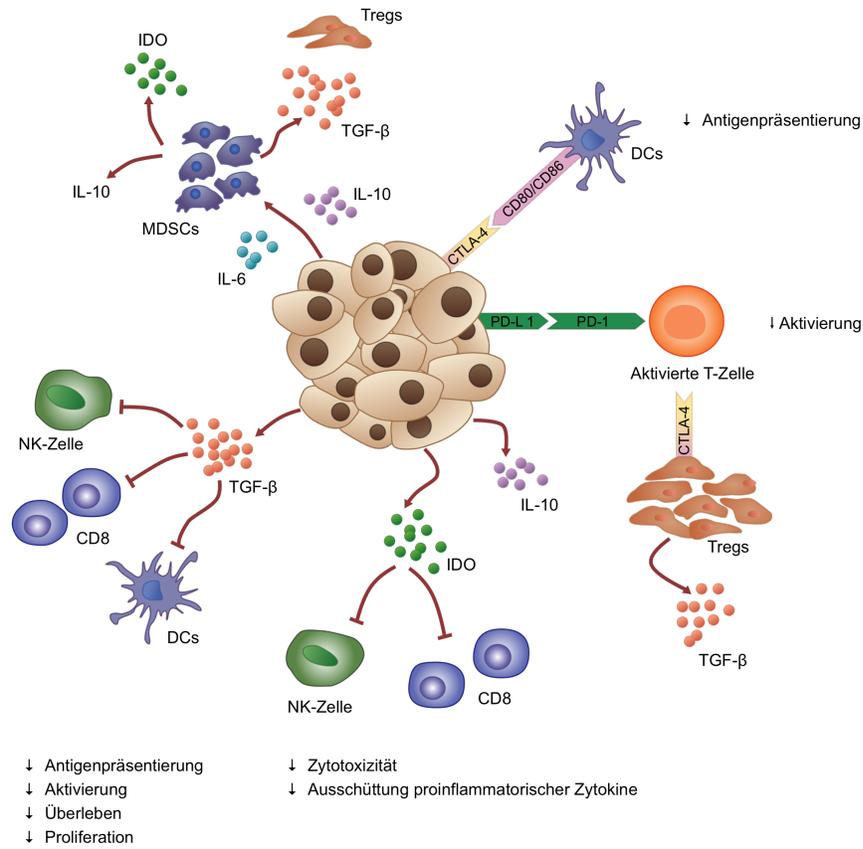


Abbildung 1: Immunzellen in der Tumormikroumgebung

Die Kommunikation zwischen den Immun- und Tumorzellen in der Tumormikroumgebung wird durch Zytokine (Interleukin-6 (IL), IL-10, IL-23), Chemokine (CXC-Chemokin-Ligand-1 (CXCL), CXCL8, CXCL12), Wachstumsfaktoren (transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)) und Enzyme (Mesenchymale-Epidermale Transition Rezeptor-Tyrosinkinase (c-Met), Sarcoma (c-Src) Tyrosinkinase) gesteuert [13]. Dabei schützt sich der Tumor vor einem Angriff des Immunsystems indem zum Beispiel immunsuppressive Zytokine ausgeschüttet und auf der Zelloberfläche Antigene präsentiert werden, die zu einer Inhibierung der Immunzellen führen (Abbildung 1). Ziel der heutigen Immuntherapeutika ist es, diesen Schutz des Tumors vor einem Angriff des Immunsystems aufzuheben und die Immunzellen vor Ort zu reaktivieren. Deshalb stehen aktuell Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren wie Nivolumab und Atezolizumab im Fokus der aktiven Immuntherapie bei Krebspatienten. Das Prinzip dieser Antikörper beruht darauf, die durch die Tumorzellen induzierten immunsuppressiven Blockaden der T-Zellen aufzuheben, um die Immunzellen gegen den Tumor zu reaktivieren. Nivolumab und Atezolizumab wirken dabei auf die *programmed cell death protein 1* (PD-1) - *programmed cell death*

protein 1 ligand (PD-L1) Blockade. Im gesunden Körper wird durch die Bindung von PD-L1 an aktivierten PD-1 exprimierenden T-Zellen Apoptose und Anergie induziert, wodurch das Immunsystem vor einer Überaktivierung geschützt wird [14]. Da viele Tumorzellen ebenfalls PD-L1 exprimieren, werden die in der Tumormikroumgebung vorhandenen T-Zellen inhibiert und greifen den Tumor nicht an. Bei der Immuntherapie mit anti-PD-1 und anti-PD-L1 Antikörpern kann diese Blockade aufgehoben und die T-Zellen reaktiviert werden [15]. Für die Immuntherapie sind bereits folgende anti-PD-L1 Antikörper zugelassen: Atezolizumab bei Patienten mit Urothelialeukarzinom, Avelumab für Merkelzellkarzinom Patienten und Durvalumab gegen Blasenkarzinom [16]. Ein weiterer Ansatz die PD-1/PDL-1 Kaskade zu blockieren, ist das PD-1 an der T-Zelloberfläche zu binden, sodass die Bindung der T-Zellen an den PD-1 Liganden der Tumorzellen blockiert wird. Nivolumab ist ein anti-PD-1 Antikörper und ist seit 2015 bei Patienten mit nicht-resezierbaren oder metastasierenden Melanomen und bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom zugelassen [17, 18].

4 Zytokine in der Krebstherapie

Mit dem fortschreitenden Verständnis der Tumorentstehung und der Schutzmechanismen der Krebszellen vor dem Immunsystem ist die Aktivierung des Immunsystems stärker in den Fokus der Forschungen geraten, um den Körper bei der Abwehr von Tumorzellen besser zu unterstützen. Ein Ansatz zur Aktivierung des Immunsystems stellen Zytokine dar, welche spezifisch Immunzellpopulationen stimulieren. Die Immunzellen selber sezernieren sowohl immunsupprimierende als auch -stimulierende Zytokine, die dann auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin) oder auf benachbarte Zellen (parakrin) wirken. Diese niedermolekularen Peptidmediatoren werden deshalb als Botenstoffe des Immunsystems bezeichnet und sind hochwirksam. Der Oberbegriff Zytokin schließt alle Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Chemokine ein. In der derzeitigen Krebstherapie werden hauptsächlich Interleukine und Interferone eingesetzt [19].

4.1 Interferon-alpha

Interferon-alpha (IFN- α) war das erste Zytokin, welches bei Patienten mit Melanom im vierten Stadium eingesetzt und von der *Food and Drug Administration* (FDA) später zur Behandlung von Melanom, Nierenzellkarzinom, HIV-assoziiertem Kaposi-Sarkom, follikulärem Lymphom und Haarzellenleukämie zugelassen wurde [20, 21]. Die immunomodulatorischen Eigenschaften von IFN- α sind komplex. Es steigert die Zytotoxizität und das Überleben von NK-Zellen, die Antikörperproduktion von B-Zellen, die Reifung von dendritischen Zellen, erhöht die Chemotaxis, das CD8⁺ T-Zellpriming gegen den Tumor und induziert die Generierung und das Überleben von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen [22, 23]. Des Weiteren wirkt IFN- α anti-tumoral indem es die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse I Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen induziert und die Tumorangione hemmt. In einigen Tumorzellen induziert IFN- α außerdem Caspase-abhängige Apoptose [24]. Bei einer Behandlung mit IFN- α sind Fieber, Müdigkeit, Muskelschmerzen und bei längerer Therapie auch Autoimmunerkrankung zu erwarten. Auf Grund der kurzen Halbwertszeit von Zytokinen ist seit 2011 pegyliertes IFN-alpha von der FDA für Melanompatienten zugelassen, welches zudem besser von den Patienten vertragen wird und dabei genauso effektiv bei metastasierenden Tumorerkrankungen wie nicht pegyliertes IFN- α wirkt [25].

4.2 Interleukin-2

Ein weiteres von der FDA für die Behandlung von Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom und Melanom zugelassenes Zytokin ist Interleukin-2 (IL-2) [26]. IL-2 wird hauptsächlich von CD4⁺ Helferzellen produziert und wirkt proliferationsinduzierend auf NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und aktiviert die NK-Zell- und T-Zell-Zytotoxizität sowie die Antikörperproduktion von B-Zellen [27]. Außerdem fördert eine Aktivierung der Immunzellpopulationen mit IL-2 die Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen wie IFN- α , IL-1 β und IFN- γ [28]. Auf Grund der starken Sekretion weiterer immunstimulierender Zytokine kommt es bei vielen Patienten durch die IL-2 Therapie zu teils schweren Nebenwirkungen, die bis hin zur Ausprägung von Autoimmunerkrankungen führen können. Für die Behandlung mit hochkonzentriertem IL-2 wird das Kapillarlecksyndrom als weitere Nebenwirkung beschrieben, wobei die kapillaren Gefäße durchlässig werden, was zu einem hypovolämischen Schock, zur Hypotonie und Ausbildung von Ödemen bei den Patienten führen kann [29, 30]. Auch der aktivierungsinduzierte Zelltod (*activation induced cell death*, AICD)

wird mit der Wirkung von IL-2 verbunden. Dieser dient normalerweise als Schutz des Immunsystems vor einer Autoimmunreaktion, ist für die Immuntherapie jedoch nachteilig, da beim AICD die T-Zellen in Apoptose gehen. Ursache dafür ist die Entwicklung der T-Zellen nach der Aktivierung mit IL-2. Zuerst erfolgt durch die IL-2 induzierte Aktivierung und einem zusätzlichen Antigenkontakt die klonale Expansion der T-Zellen [31]. Anschließend werden jedoch antigenspezifische T-Zellen durch die längere Anwesenheit von IL-2 in ihrer Umgebung für die Apoptose sensibilisiert. Es gibt mehrere Signalwege, die am AICD beteiligt sind [32, 33, 34, 35, 36]. Hauptsächlich wird der AICD über den CD95-CD95L Signalweg vermittelt, bei dem die aktivierten T-Zellen CD95L hochregulieren und darüber die Apoptose von benachbarten CD95⁺ T-Zellen induzieren können [37]. Sekretieren T-Zellen CD95L, ist es sogar möglich, dass sie sich selbst in Apoptose bringen. Diese schweren Nebenwirkungen und die kurze Halbwertszeit der Zytokine, die im Fall von IL-2 ungefähr sechs Minuten beträgt [38], sind die Nachteile dieser Therapieform.

4.3 Interleukin-15

4.3.1 IL-15 Rezeptor

Wie Interleukin-2 gehört Interleukin-15 zur Proteinstrukturfamilie der Vier-Helix-Bündel Zytokine [39]. Obwohl beide Zytokine nur wenig Gemeinsamkeiten auf DNA Ebene und der Abfolge der Aminosäuresequenz aufweisen, zeigen sie in der Sekundär- und Tertiärstruktur gleiche strukturelle Merkmale auf, durch die es ihnen ermöglicht wird, an dieselben Rezeptoruntereinheiten zu binden [40, 39]. Der IL-2/IL-15 Rezeptor besteht aus den spezifischen alpha-Ketten IL-2R α Kette (CD25) bzw. der IL-15R α Kette (CD215), sowie den gemeinsamen β - (CD122) und γ - (CD132) Ketten. Die Bindungsaffinität zur β - und γ -Untereinheit ist für beide Zytokine gleich (Kd 10e-9M) [39]. Dahingegen bindet IL-15 1000fach affiner an die IL-15R α Untereinheit (Kd 10e-11M) als IL-2 an die IL-2R α Untereinheit (Kd 10e-8M) [41, 42]. Die α -Rezeptorunterheiten beider Rezeptoren beinhalten eine bzw. beim IL-2R α zwei sogenannte „sushi“-Domänen, welche auf Grund ihrer Cysteine und der damit verbundenen Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen oft bei Protein-Protein Interaktionen zu finden sind [42]. Durch die Substitution des ersten bzw. vierten Cysteins der IL-15R α Untereinheit konnte gezeigt werden, dass keine Bindung des IL-15 an den Rezeptor mehr stattfinden kann [43].

4.3.2 Funktion von IL-15

Im Plasma zirkulierendes IL-15 ist als Heterodimer an sIL-15R α gebunden, wodurch das *single-chain* IL-15 vor intrazellulärer Degradation geschützt und dessen *Recycling* in den Zellen gefördert wird [44]. Hauptsächlich wird humanes IL-15 jedoch als membranständiger Komplex am IL-15R α auf dendritischen Zellen, Monozyten und Bindegewebszellen präsentiert, wie es in Abbildung 2 dargestellt ist [45, 46].

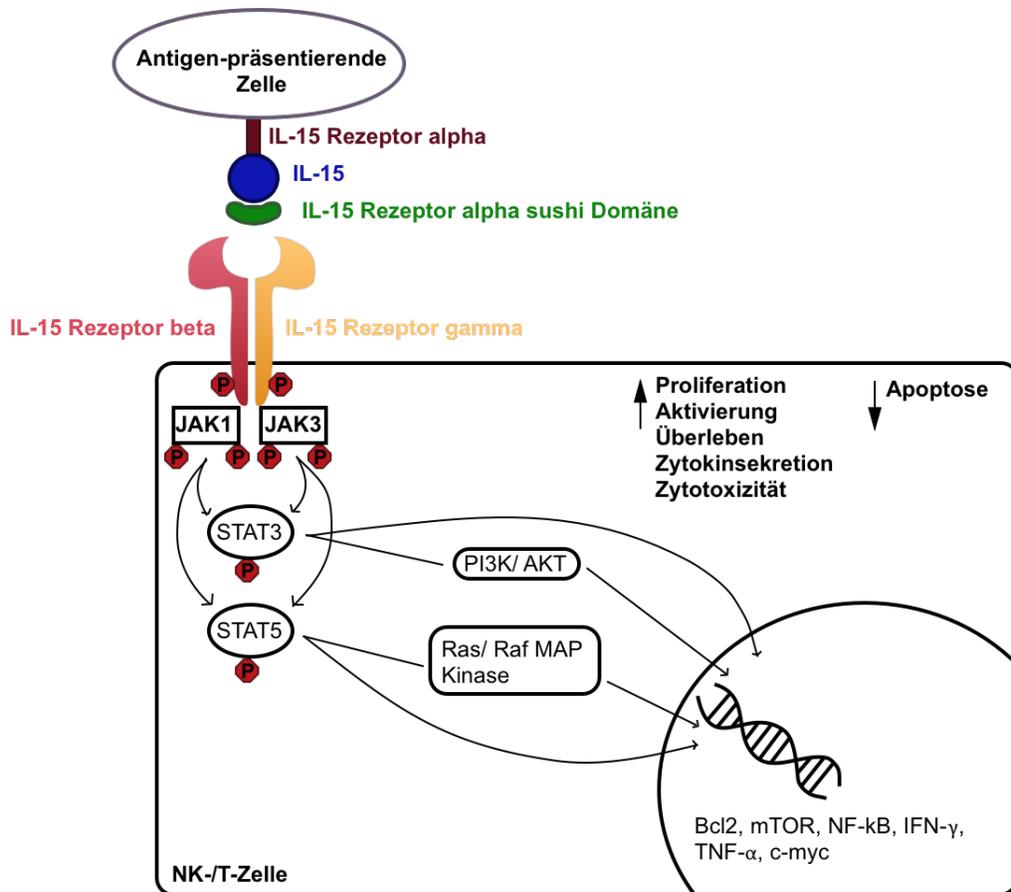


Abbildung 2: IL-15 Signalkaskade in IL-15R β/γ exprimierenden Zellen
Adaptiert nach Mishra 2014 [47]

Die IL-15 Expression wird in dendritischen Zellen durch die Aktivierung mit Typ 1 Interferonen, Lipopolysaccharid oder Agonisten des Toll-like Rezeptors induziert [48]. Binden NK- bzw. T-Zellen über den IL-15R β/γ an den membranständigen IL-15R α -IL-15 Komplex auf dendritischen Zellen oder Monozyten, bildet sich eine immunologische Synapse, worüber die Proliferation, die zytotoxische Aktivierung sowie durch Inhibition der Apoptose das Überleben der NK- und T-Zellen induziert wird. Dabei erfolgt die Aktivierung der Protein-Tyrosinkinasen

Janus Kinase (JAK) 1 und JAK3 innerhalb weniger Minuten nach der Bindung von IL-15 an die β/γ Einheit des Rezeptors [49]. Diese Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) 3 und STAT5 sowie deren Translokation in den Zellkern [50, 51]. Zu den Transkriptionsprodukten zählen allen voran das Protein Bcl-2, welches Apoptose inhibiert [52], mTOR, was das Überleben, Wachstum und die Proliferation der Zellen reguliert [53], sowie die Expression von Zytokinen wie zum Beispiel IFN- γ , TNF- α und GM-CSF [40]. Die Sekretion dieser Zytokine bewirkt eine Aktivierung weiterer Immunzellen in der Umgebung [54].

Für die Maturation von NK-Zellen spielt IL-15 ebenfalls eine wichtige Rolle. Während die NK-Progenitorzellen im Knochenmark noch kein CD122 exprimieren, wird CD122 bei NK-Vorläuferzellen hochreguliert [55], wodurch die Bindung von IL-15 möglich ist. Es folgt eine Ausreifung der Zelle in eine CD56^{bright} NK-Zelle, welche abhängig vom IL-15 ist [56]. CD56^{bright} NK-Zellen sind schnell proliferierende Zellen, welche eine starke IFN- γ Sekretion aufweisen und besitzen somit eine immunmodulatorische Funktion [57], weshalb sie vor allem im lymphatischen oder inflammatorischen Gewebe zu finden sind [58]. Im Vergleich zu den CD56^{bright} NK-Zellen sind die CD56^{dim} NK-Zellen an zytotoxischen Prozessen beteiligt. Obwohl CD56^{bright} und CD56^{dim} als zwei NK-Zellphänotypgruppen beschrieben werden, konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass CD56^{bright} Zellen zu CD56^{dim} Zellen ausdifferenzieren können [59, 60, 61, 62]. Werden ausgereifte NK-Zellen weiterhin mit IL-15 stimuliert, können diese Zellen einen *memory-like* Phänotyp ausprägen, welcher durch die Expression von CD57, CD69, CD94, *natural killer group 2 member C* (NKG2C) und *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR) sowie starke Produktion von Perforin und IFN- γ charakterisiert ist. Diese *memory-like* NK-Zellen sind zirkulierende, zytotoxische Zellen, die auf Grund ihrer hohen CD16 Expression sehr gut mit Hilfe einer Antikörpertherapie gegen die Tumorzellen aktiviert werden können [63].

4.3.3 Präklinische und klinische Untersuchungen mit IL-15

Im Gegensatz zur Autoimmuntherapie, bei der versucht wird mit IL-15 Antagonisten die Immunzellen zu inhibieren, wird in der Krebstherapie rekombinant humanes IL-15 (rhIL-15) untersucht, um die Immunzellen gegen die Tumorzellen zu aktivieren. Eine Vielzahl an Mausstudien mit rhIL-15 zeigten den positiven Einfluss von rhIL-15 auf das Überleben von krebskranken Mäusen [64, 65, 66]. Dabei konnte sogar gezeigt werden, dass sich durch die Stimulation mit rhIL-15 tumorreaktive CD8⁺ T-Zellen ausbilden [67]. Auf Grund dieser positiven *in vivo* Ergebnisse erfolgte eine Toxizitätsstudie in Makaken, bei denen nach der Infusion mit 20 μ g/kg/Tag rhIL-15 eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden NK- und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen wurde [68]. Folglich wurde eine Studie zur Dosisfindung bei Patienten mit metastasie-

rendem Melanom bzw. Nierenkarzinom durchgeführt, in der die maximal tolerierte Dosis auf 0,3µg/kg/Tag rhIL-15 festgelegt wurde, nachdem sich bei den Patienten mit 1,0µg/kg/Tag und 3,0µg/kg/Tag rhIL-15 schwere Nebenwirkung wie Hypotonie und Thrombozytopenie zeigten. Bei fünf von achtzehn Patienten war eine Tumorrückbildung von 10-30% festzustellen [69].

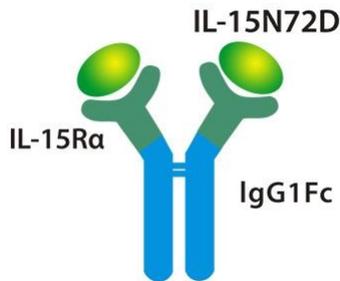


Abbildung 3: IL-15 Superagonist ALT-803 der Firma Altor Bioscience

In Kombination mit therapeutischen Antikörpern wird aktuell das Produkt von Altor Bioscience ALT-803 getestet. Die Besonderheit des ALT-803 ist, dass die Produktionszellen das rhIL-15 und den IL-15Ralpha/Fc-Teil ko-exprimieren und sich daraus ein löslicher, stabiler Komplex bildet, welcher in der Abbildung 3 dargestellt ist [70]. Zudem enthält die Sequenz des rhIL-15 eine N72D Punktmutation, wodurch die Bindungsaffinität zum IL-15Rβ erhöht wird und folglich die Aktivierung verstärkt abläuft [71]. ALT-803 wird derzeit sowohl als Monotherapie bei Patienten mit soliden Tumoren und multiplem Myelom als auch in Kombination mit weiteren Antikörpern getestet. In einer Phase I Studie wurde ALT-803 bei 33 Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen getestet, welche nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation erneut erkrankten [72]. Die getesteten Dosen von 1, 3, 6 und 10µg/kg wurden gut vertragen. Es wurde keine dosislimitierende Toxizität oder Graft-versus-host-Krankheit festgestellt. Die Behandlung mit ALT-803 führte zu einer gesteigerten Aktivierung, Proliferation und Expansion von NK- und CD8⁺ T-Zellen. 19% der Patienten sprachen auf die Therapie an einschließlich eines Patienten, welcher eine komplette Remission über 7 Monate zeigte [72]. Die Kombination aus ALT-803 und Rituximab wird bei indolenten Non-Hodgkin Lymphom Patienten und bei nicht-kleinzelligen Lungenkrebspatienten und die Kombination aus ALT-803 und Nivolumab erprobt [73].

4.4 Weitere proinflammatorische Interleukine

Neben IFN-α, IL-2 und IL-15 gibt es noch weitere immunzellstimulierende Interleukine, die für die Tumorthherapie von Interesse sind. Dazu zählt Interleukin-12, welches von antigenpräsentierenden Zellen produziert wird [74]. Die Funktionen von IL-12 sind die Aktivierung und

Proliferationsinduktion von NK- und T-Zellen sowie die Steigerung der Effektorfunktion dieser Immunzellen, indem die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine reguliert wird [75, 76, 77]. Des Weiteren führt die Stimulation von NK-Zellen mit IL-12 zu einer gesteigerten Produktion von Perforin und Granzym B [78]. Bis zum derzeitigen Zeitpunkt gibt es noch keine Zulassung von der FDA für die Therapie von Krebspatienten mit IL-12 als rekombinant hergestelltes Protein oder als Immunzytokin.

Ein weiteres als proinflammatorisch beschriebenes Zytokin ist IL-18. Es wird hauptsächlich von Makrophagen produziert und von nahezu allen Immunzellen gebunden [79, 80]. Die Stimulation von Immunzellen mit IL-18 führt zu einer starken IFN- γ Sekretion, weshalb es auch als IFN- γ induzierender Faktor beschrieben ist [81]. Eine Hochregulation von IL-18 wird vor allem bei Autoimmunerkrankungen wie dem Hashimoto beobachtet [82, 83], wobei ein Zusammenhang der IL-18 Stimulation und einer verstärkten IFN- γ , TNF- α und IL-1 β Sekretion gezeigt werden konnte [84].

IFN- γ wird ebenfalls durch die Stimulation von Immunzellen mit IL-21 sekretiert. IL-21 wird von T- und NK-Zellen produziert und wirkt proinflammatorisch auf nahezu alle Immunzellpopulationen [85]. Eine Stimulation mit IL-21 steigert die Phagozytose von Makrophagen, die Zytotoxizität und Proliferation von NK- und zytotoxischen T-Zellen und die Proliferation und IgG Produktion von B-Zellen [85, 86]. In zahlreichen *in vitro* Studien mit rhIL-21 konnte ein anti-Tumoreffekt durch die Immunzellstimulation gezeigt werden [87]. In einer klinischen Phase I Studie mit 15 Dickdarmkrebspatienten, in welcher rhIL-21 mit Cetuximab kombinierte wurde, wurde eine verstärkten T- und NK-Zellaktivierung in den Patienten analysiert [88]. Die Erkrankung blieb bei 9 von 15 Patienten durch die Behandlung in einem stabilen Zustand. Es konnte kein Rückgang der Krankheit festgestellt werden [88].

Ebenfalls NK-Zellaktivierende Eigenschaften werden dem Interleukin-27 zugeschrieben. Es wird von Monozyten und dendritischen Zellen produziert und steigert vor allem die zytotoxische Effektorfunktion der NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen [89]. Die Stimulation mit IL-27 führt zudem zu einer erhöhten IFN- γ Sekretion in NK-Zellen [89]. Außerdem hat IL-27 einen Einfluss auf die Differenzierung und Antikörperproduktion von B-Zellen [90]. *In vivo* konnte in Mäusen ein guter anti-Tumoreffekt durch die IL-27 Behandlung gezeigt werden [91, 92]. Weitere klinische Daten gibt es derzeit noch nicht.

5 Immunzytokine

Der Begriff Immunzytokin beschreibt ein Fusionsprotein bestehend aus einem Antikörper und einem Zytokin. Dabei kann der Antikörper ein Immunglobulin G (IgG) sein oder aus Fragmenten daraus bestehen. Der Hauptgrund für die Entwicklung von Immunzytokinen mit tumor-

spezifischen Fab-Teil ist die Aktivierung der Immunzellen in der Tumormikroumgebung. Da das Immunzytokin auf Grund seiner Antigenbindung sich im Tumor anreichern kann, soll das immuninhibitorische Milieu des Tumors durch stimulierende Zytokine verändert werden. Bei Verwendung eines IgG mit funktionellem Fc-Teil kann zusätzlich zur Bindung der Tumorzelle über den Fab-Teil und der Aktivierung der Immunzellen über das immunstimulierende Zytokin noch ADCC durch die aktivierten NK-Zellen sowie ADCP über die Makrophagen vermittelt werden [93]. Ein weiterer Vorteil von Fusionsproteinen mit Fc Teil ist eine Halbwertszeitverlängerung der sonst so schnell abgebauten Zytokine durch das über den FcRn vermittelte Antikörperrecycling [94]. Die Zytokine weisen in der Tumormikroumgebung unterschiedliche Wirkungen auf. Für IL-2, IL-12 und TNF- α ist eine massive Tumordinfiltration durch T- und NK-Zellen beschrieben [95, 96, 97]. Zusätzlich aktivieren Zytokine wie IL-2 und TNF- α das Endothelium, was die Aufnahme anderer Therapeutika in den Tumor begünstigt [98, 99]. Das von Roche entwickelte Immunzytokin Cergutuzumab Amunaleukin (CEA-IL2v) erzeugte erst kürzlich sehr gute Ergebnisse im Mausmodell, wo gezeigt werden konnte, dass das Immunzytokin sehr stark im Tumor angereichert wird [100]. Da die mutierte IL-2 Variante nicht an CD25 bindet, aktiviert es lediglich die zytotoxischen CD8⁺ T- und NK-Zellen. Somit verschiebt sich das CD4:CD8 T-Zellverhältnis deutlich, was ebenfalls in der Studie gezeigt werden konnte. Die NK- und CD8⁺ T-Zellpopulationen expandierten um ein zehnfaches und dieses Level konnte bis zu 14 Tage nach der Gabe des Immunzytokins bei CD8⁺ T-Zellen und bei NK-Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen aufrechterhalten werden. Zusätzlich erreichte das Fusionsprotein CEA-IL2v eine im Vergleich zu löslichem IL-2 verlängerte Plasmahalbwertszeit, die eine Anreicherung im Tumor weiter begünstigte [100].

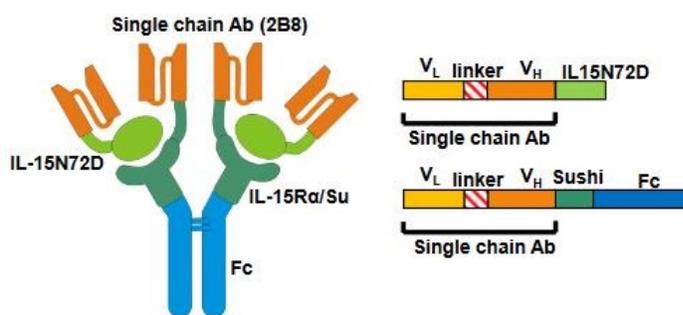


Abbildung 4: Immunzytokin der Firma Altor Bioscience basierend auf dem ALT-803 aus Abbildung 3 mit vier zusätzlichen anti-CD20 *single-chain*-Fragmenten

Altor Bioscience entwickelte ebenfalls auf Grundlage ihres ALT-803 ein Immunzytokin, welches an CD20 positive Zellen bindet. In der Abbildung 4 ist zu erkennen, dass sie dabei die Grundstruktur des ALT-803 beibehalten haben, welche um jeweils vier anti-CD20 *single-*

chain-Fragmente ergänzt wurde. Dabei ist ein *single-chain*-Fragment an die sushi-Sequenz gebunden, während das andere *single-chain*-Fragment am IL-15 gebunden ist. In *in vitro* Versuchen konnten sie zeigen, dass mit dem targetierenden anti-CD20 Immunzytokin der ADCC Effekt, die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) und die Apoptoseinduktion bei B-Zellen im Vergleich zur Behandlung mit Rituximab deutlich verbessert werden kann. Sowohl in *Xenograft* Modellen in der Maus als auch in Makaken konnte mit dem anti-CD20 ALT-803 Fusionsprotein eine starke anti-Tumoraktivität nachgewiesen werden [93].

In präklinischen Studien erzeugten Immunzytokine in Kombination mit bereits bestehenden Tumorthapeutika vielversprechende Synergieeffekte hinsichtlich des Tumorrückgangs. Immunzytokine werden daher in der Forschung in Kombination mit Bestrahlungstherapien [101], Chemotherapien [102], *Checkpoint*-Inhibitoren [103] und antigenbindenden Antikörpern [104] untersucht. Auch mit CEA-IL2v wurden Kombinationsstudien an Mäusen mit Trastuzumab bzw. Cetuximab durchgeführt, die zu einem Tumorrückgang führten und das Überleben der Mäuse deutlich verbesserte im Vergleich zur Monotherapie mit CEA-IL2v bzw. Trastuzumab oder Cetuximab [100].

Die Folgen einer Langzeittherapie mit Immunzytokinen sind noch schwierig einzuschätzen. Da die Immunzellen bei einer Infusion mit Immunzytokinen schon im Blut aktiviert werden, muss mit Hyperzytokinämie und daraus resultierenden starken Nebenwirkungen gerechnet werden. In einer Dosisfindungsstudie von ALT-803 mit Konzentrationen von 1 (n=6), 3 (n=3), 6 (n=4) und 10µg/kg (n=3) und einer wöchentlichen Gabe über 4 Wochen entwickelten die Patienten, die mit 6 und 10µg/kg behandelt wurden, Fieber, welches jedoch bereits 12h nach der Infusion zurück ging [105]. Des Weiteren wurde 4h nach der Infusion ein starker Anstieg von IFN-γ und IL-6 im Serum gemessen. Die Nebenwirkungen waren jedoch nicht dosislimitierend. Es konnte zudem eine dosisabhängige Proliferation von CD8⁺ T- und NK-Zellen nach 3 bzw. 5 Tagen der Erstinfusion beobachtet werden. In der Patientengruppe mit 10µg/kg nahm die absolute Anzahl an NK-Zellen über den Verlauf von 28 Tagen stetig zu [105]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Therapie mit geringen Dosen verträglich und gleichzeitig auch effektiv sein kann.

6 Tumoroberflächenantigen TA-MUC1

Ein für die Immuntherapie interessantes Tumoroberflächenantigen stellt das tumorassoziierte Mucin-1 (TA-MUC1) dar. Im Normalgewebe ist epitheliales Mucin-1 (MUC1) ein stark glykosyliertes Typ 1 Transmembranprotein, das als Heterodimer vorliegt und auf der apikalen Zelloberfläche von epithelialen Geweben exprimiert wird [106]. Dazu gehören der Magen, die Gallenblase, die Lunge, die Nieren und Brustdrüsen [107]. Des Weiteren ist MUC1

auch auf hämatopoetischen Zellen wie den T- und B-Zellen oder den Erythroblasten zu finden [108]. Nach der abgeschlossenen Synthese von MUC1 im endoplasmatischen Retikulum entstehen durch proteolytische Spaltung zwei Fragmente: die größere extrazelluläre N-terminale MUC1 Untereinheit und die kleinere C-terminale MUC1 Untereinheit, welche aus einer kurzen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Abschnitt besteht [109]. Die N-terminale MUC1 Untereinheit besteht aus einer Prolin-, Serin- und Threonin-reichen (PST) Domäne, welche sich je nach Individuum aus 20-120 Tandem-Wiederholungen einer Aminosäuresequenz aus 20 Aminosäuren mit fünf potentiellen O-Glykosylierungen zusammensetzt [110]. Die Funktionen von MUC1 sind vielfältig untersucht worden. Dazu gehört unter anderem der Schutz vor Bakterien und viralen Pathogenen durch Bildung und Aufrechterhaltung des Mucus [111], sowie die Beteiligung bei Adhäsions- und Anti-Adhäsions-Mechanismen [112, 113].

Obwohl MUC1 auch in epithelialen Normalgeweben stark exprimiert wird, unterscheidet es sich in den Tumorzellen dahingehend, dass die bei Normalgeweben hauptsächlich apikale Expression in den Tumorzellen verloren geht [112]. Zusätzlich wird MUC1 in Tumorgewebe häufig stärker exprimiert und stellt somit ein interessantes Antigen dar. In Tumorzellen fördert MUC1 die Glukoseaufnahme und den Stoffwechsel der Zellen. Zudem vermittelt es die Produktion von Wachstumsfaktoren und ist an Tumorinvasion, Metastasierung, Angiogenese, und Resistenzausbildung gegenüber Apoptose sowie Chemotherapeutika beteiligt [109].

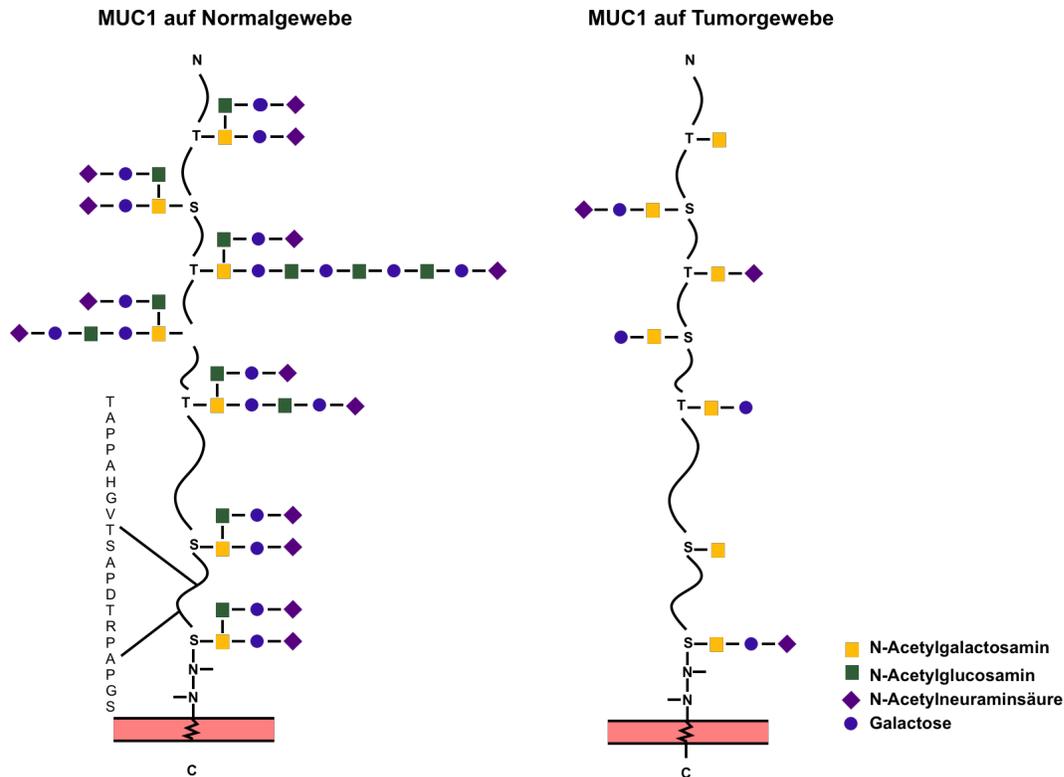


Abbildung 5: Vergleich der Glykosylierung des Mucin-1 auf Normalgewebe zum Tumorgewebe

Adaptiert nach Prima Biomed (Immunocellular Cell Therapy Approach to Clinical Success Case Study of CVac™, Commercial Translation of Regenerative Medicine London 2013)

Im Vergleich zu auf Normalgewebe zu findenden MUC1 weist TA-MUC1 eine veränderte O-Glykosylierung auf, wodurch neue Peptidepitope und Kohlenhydrat-Tumorantigene zugänglich werden [114]. PankoMab-GEX® ist ein von der Glycotope GmbH entwickelter humanisierter monoklonaler Antikörper, der ein tumorspezifisches Kohlenhydrat/Protein Konformationsepitop auf MUC1 (TA-MUC1) erkennt. Aufgrund der spezifischen Bindung an TA-MUC1 ist PankoMab-GEX® in der Lage, zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe zu unterscheiden [115]. Dabei erfolgt die Bindung von PankoMab-GEX® an die PDTRP Sequenz (Prolin, Asparaginsäure, Threonin, Arginin, Prolin) innerhalb der Tandem-Wiederholungen des MUC1, wenn das Threonin Core-1- (Thomson-Friedenreich Antigen, TF) oder Tn- (TF Vorgänger) glykosyliert ist [115]. Die komplexe, verzweigte Glykosylierung des MUC1 auf Normalgewebe wird im Tumorgewebe nicht mehr ausgebildet, wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Die spezifische Bindung von PankoMab-GEX® wurde bereits auf einer Vielzahl von soliden Tumoren, wie bei Ovarial-, Lungen- und Brustkrebs, nachgewiesen [116, 117, 118]. Die erste klinische Phase I Studie mit PankoMab-GEX® erzielte sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der

Verträglichkeit, Sicherheit und einer erfolgsversprechenden anti-karzinogenen Wirkung. Aufgrund der guten Verträglichkeit, bei der keine antikörperabhängigen Toxizitäten festgestellt werden konnten, wurde PankoMab-GEX® in einer Phase IIb Erhaltungsstudie bei Patienten mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom untersucht [119]. Bei diesem Studiendesign konnte zwischen PankoMab-GEX® und dem Placebo kein Unterschied festgestellt werden [120].

7 Fragestellung

Als Weiterentwicklung der bestehenden Krebstherapien mit Antikörpern stellen Immunzytokine einen interessanten und vielversprechenden Ansatz dar. Dabei können die guten Ergebnisse der Antikörpertherapie mit den Vorteilen der Zytokintherapie kombiniert werden, um die Behandlung von Krebserkrankungen durch eine stärkere Immunstimulation zu optimieren. Zusätzlich kann die sonst sehr geringe Halbwertszeit der Zytokine durch die Bindung an einem klassischen IgG Antikörper verlängert werden. Somit besteht dieser Nachteil der bisherigen Zytokintherapie nicht mehr. Einen großen Vorteil von Immunzytokinen bietet die spezifische Antikörperbindung an Tumorzellen, die demzufolge zu einer zielgerichteten Aktivierung der Immunzellen in der Tumormikroumgebung führen soll. Da der Antikörper PankoMab-GEX® tumorspezifisch an TA-MUC1 bindet, ist dieser Antikörper als Grundlage für die Herstellung und Untersuchung eines Immunzytokins sehr vielversprechend. PankoMab-GEX® wurde bei Patienten mit Ovarialkarzinom getestet und konnte im Vergleich zur Placebo-Gruppe nicht zu einer Verbesserung der Krankheit führen. Die Tumormikroumgebung von Ovarialkarzinomen ist als sehr immunsuppressiv beschrieben [121], sodass die Entwicklung von Immunzytokinen für diese Tumorerkrankung einen besonders interessanten Ansatz bietet. Deshalb sollen in dieser Arbeit die Vorteile eines Immunzytokins bestehend aus PankoMab-GEX® und eines Zytokins im Vergleich zu dem bereits bestehenden PankoMab-GEX® in der Behandlung von soliden Tumoren herausgestellt werden. Basierend auf dem Erkenntnisstand, dass PankoMab-GEX® ein gut verträglicher, therapeutischer Antikörper ist, soll anhand der Generierung eines Immunzytokins auf Grundlage dieses Antikörpers die Funktion des PankoMab-GEX® erweitert werden, sodass die Immunzellen in der Tumormikroumgebung zusätzlich stimuliert werden. PankoMab-GEX® dient dabei auf Grund seiner spezifischen Tumorbindung als Carrier, um das Zytokin gezielt zum Tumor zu bringen. Dies hätte zum Vorteil, dass sich die Immunzellen im Tumor anreichern sowie aktiver gegen den Tumor arbeiten könnten.

Bestandteil dieser Arbeit ist es, sechs Interleukine (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27) hinsichtlich ihrer immunzellstimulierenden Eigenschaften zu vergleichen und auf Grund der Ergebnisse der Aktivierungs-, Proliferations- und Zytotoxizitätsinduzierung ein Interleukin aus-

zuwählen. Das ausgewählte Interleukin soll im Folgenden an die C_H3-Domäne des PankoMab-GEX® gekoppelt, in der humanen Produktionszelllinie der Glycotope GmbH produziert und gereinigt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Immunzyktine sind monomere angereichert und endotoxinfrei, um sie in immunologischen Analysen testen zu können. Da PankoMab-GEX® ein bereits vollständig charakterisierter, therapeutischer Antikörper ist, liegt das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Untersuchung der Aktivierung und Proliferation der Immunzellen in Folge der Stimulation durch das Immunzytokin, sowie der Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber den Tumorzellen.

Teil III

Material und Methoden

8 Herstellung rekombinanter Proteine

Zur Herstellung rekombinanter Immunzytokine wurden ausgewählten IL-15 Sequenzen in das Glycotope-eigene Vektorsystem zur Expression rekombinanter Antikörper kloniert. Der Vektor enthält den konstanten Teil des Immunglobulins (Ig) des firmeneigenen Antikörpers PankoMab-GEX®. An der C_H3 (*heavy chain*, schwere Kette) Domäne dieses Antikörpers erfolgt N-terminal die Ligation der jeweiligen IL-15 Sequenz über einen GGGGS (G4S)₄ Linker. Die verwendeten IL-15 Sequenzen wurden dafür bei Geneart (Thermo Fisher Scientific, Regensburg) in Auftrag gegeben. Dabei wurde einmal die unveränderte humane IL-15 (IL-15wt) Aminosäuresequenz verwendet, eine IL-15 Aminosäuresequenz mit der Mutation I67E (nach Bernard 2004, IL-15mut) und die IL-15R α sushi-Domäne mit der über einen weiteren (G4S)₄ Linker gekoppelten IL-15 Aminosäuresequenz (IL-15sushi) verwendet. Die Sequenzen sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten IL-15 Aminosäuresequenzen

interne Bezeichnung	Aminosäuresequenz
IL-15mut	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLESGDASIHDTVENLEILANNSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
IL-15wt	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
IL-15sushi	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTE CVLNKATNVAHWTTPLKCIIRGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESG CKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

Der fertige Expressionsvektor wurde lyophilisiert geliefert (~5 μ g/Vial) und in 50 μ l H₂O gelöst. Für die Herstellung von Plasmid-Präparationen (z.B. Maxi-Präparationen) waren 0,1-

1µl dieser Lösung ausreichend, um dam^-/dcm^- chemisch kompetente *E. coli* Zellen (New England BioLabs) zu transformieren. Die aus den Mini-Präparationen (GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham)) enthaltenen Plasmide wurden präparativ mit Fast Digest XbaI (Thermo Fisher Scientific) und Fast Digest SmaI (Thermo Fisher Scientific) verdaut. Gleichzeitig wurde der Expressionsvektor entsprechend verdaut und dephosphoryliert (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific)), damit eine Re-Ligation vermieden wird.

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese wurden die geschnittenen Plasmidfragmente, welche mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) versetzt, auf ein 1 % (w/v) Agarosegel (HEEO ultra-quality agarose, Roth, Karlsruhe) geladen und bei 70V für 60-120min getrennt wurden. Als Standard wurde der GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder bzw. GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Gel wurde 30min mit GelRed (Biotrend, Köln) gefärbt und anschließend konnten die DNA Banden im BIO-VISION documentation system 3000 superbright (Peqlab, Erlangen) sichtbar gemacht werden.

Die Reinigung der geschnittenen Plasmide aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kits (250) (Thermo Fisher Scientific). Expressionsvektor und Insert wurden in der nachfolgenden Ligation zusammengebracht. Die Mengen an Vektor bzw. Insert, die in einem Ligationsansatz gemischt wurden, richteten sich nach deren Größen und wurden wie folgt berechnet:

$$DNA\ Menge\ (Fragment)[ng] = 5 * DNA\ Menge\ (Vektor)[ng] * \frac{L\ddot{a}nge\ (Insert)[bp]}{L\ddot{a}nge\ (Vektor)[bp]}$$

Der Ligationsansatz wurde gut gemischt und mindestens 1h bei RT inkubiert (Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche, Basel), T4 DNA Ligase (Invitrogen, Carlsbad)). Die Transformation des Ligationsansatzes in dam^+ kompetente NEB 5-alpha *E. coli* Zellen (New England BioLabs, Ipswich) erfolgte nach Herstellervorschrift. Nach der Überprüfung der Ligation durch die Betrachtung der Restriktionskontrollen im Agarosegel sowie einer externen Sequenzierung konnte die aus den Maxi-Präparationen (EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Venlo)) enthaltene DNA PvuI-linearisiert werden.

Zur Linearisierung wurde PvuI (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Hierzu wurden 100µg DNA mit 20µl 10x Puffer und 5µl Enzym in einem 200µl Ansatz gemischt und für mindestens 16h bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Phenol/ Chloroform-Aufreinigung der linearen DNA (Roti-Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (Roth), Trichlormethan/ Chloroform (Roth), Sodium acetate solution 3M (Sigma Aldrich, St. Louis)). Das Verhältnis der UV-Messung 260nm/280nm am Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) muss im Bereich von $1,8 \pm 0,1$ liegen, um eine einwandfreie Qualität der DNA zu gewährleisten.

9 Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C, 8% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Suspensionszelllinien wurden je nach Wachstum alle 2-3 Tage in Zellkulturflaschen (Techno Plastic Products TPP, Trasadingen) verdünnt und mit Zellzahlen zwischen 2x10⁵ vitale Zellen/ml und 1x10⁶ vZ/ml kultiviert. Adhärenzte Zelllinien wurden ab einer Konfluenz von ca. 80% mit Accutase (Sigma Aldrich) gelöst und entsprechend verdünnt in den Zellkulturflaschen ausgesät. Die verwendeten Zelllinien und deren Medien sind in der Tabelle 2 dargestellt. Alle Medienbestandteile wurden von der Firma Biochrom bezogen.

Tabelle 2: Übersicht über alle verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Medium	Zusätze (% in v/v)
MUC1-4T1	murin, Brustkrebs	RPMI	10% FKS, 1% L-Glutamin
Jurkat	human, T-Zell Leukämie	RPMI	10% FKS, 1% L-Glutamin
MCF-7	human, Brustkrebs	RPMI	10% FKS, 1% L-Glutamin
Ovcar-3	human, Ovarialkarzinom	RPMI	20% FKS, 1% L-Glutamin, 0,02µg/ml Insulin
T47D	human, Brustkrebs	RPMI	10% FKS, 1% L-Glutamin
GEX [®]	human, myeloische Leukämie	GTM	0,002% HSA

Die Kryokonservierung der serumfreien Zellen erfolgte in Kryoröhrchen (Alpha Laboratories, Eastleigh) bei einer Vitalität von mindestens 90% mit 2x10⁶ vZ/ml im Kulturmedium ohne Selektionsdruck, welchem 10%(v/v) DMSO (Sigma Aldrich) beigefügt wurden. Für serumhaltige Zellen wurde 7,5%(v/v) DMSO hinzugesetzt. PBMCs wurden mit Zellzahlen von 4x10⁷ vZ/ml in Einfriermedium bestehend aus 15% AIMV Medium (Gibco, Karlsruhe), 75% hitzeinaktiviertem FKS und 10% DMSO eingefroren. Die Lagerung aller Zellen erfolgte in flüssigem

Stickstoff. Die kryokonservierten Zellen wurden zuerst auf Eis und anschließend bei RT aufgetaut und in 37°C vorgewärmtes Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 5min bei 311 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen wurden mit 2×10^5 vZ/ml in 6-Wellplatten (TPP) definiert ausgesät. Bei stabil transfizierten Zellen wurde nach 2 Tagen oder wenn die Zellvitalität über 80% betrug der Selektionsdruck zum Medium gegeben.

10 Zellzählung

Die Zellzählungen erfolgten gemäß der Herstellerangaben mit Hilfe des Guava® easyCyte (Merck Millipore, Burlington) oder dem Luna-FL Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Seoul) durch Färbung der Zellen mit Trypanblau (Biochrom, Berlin) bzw. dem AO/PI Cell Viability Kit (Logos Biosystems).

11 Stabile Transfektion von Zellen

Um die Transfektion erfolgreich durchführen zu können, wurden nur Zellen verwendet, die eine Vitalität >85% besitzen und die nicht länger als drei Monate kultiviert wurden. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen mit 2×10^5 vZ/ml definiert ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit dem Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Basel). Pro Transfektionsansatz wurden 2×10^6 vitale Zellen zentrifugiert (5min, 300 x g), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100µl Nucleofectorsolution aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 9µg DNA und anschließend die Elektroporation (Nucleofector® II Device, Lonza) der Zellen. Zuletzt wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, im Brutschrank in 6-Wellplatten kultiviert und nach 48h Stunden mit dem jeweiligen Selektionsdruck versetzt. Die Expressionsvektoren der schweren und leichten Kette enthalten Selektionsmarker, die es den erfolgreich transfizierten Zellen in Anwesenheit von Puromycin (schwere Kette) (Clontech, Fremont) und Methotrexat (leichte Kette) (Sigma Aldrich) ermöglicht zu überleben, während die nicht transfizierten Zellen unter diesen Kultivierungsbedingungen absterben. Methotrexat ist ein Folsäure-Analogon, welches die Dihydrofolatreduktase inhibiert. Diese katalysiert die Umwandlung von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure, welche sowohl für die Biosynthese von Glycin aus Serin und Thymidin-Monophosphat aus Deoxyuridin als auch für die Purin-Biosynthese verantwortlich ist. Auf Grund des Methotrexats führt die Inhibierung der Dihydrofolatreduktase zum Zelltod. Nur die Zellen, welche zusätzlich zu dem Zielgen mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen transfiziert wurden, können überleben. Wird der Selektionsdruck schrittweise erhöht, führt dies zu einer gesteigerten Genamplifikation und Produktivität der Zellen, da sowohl das

Dihydrofolatreduktase-Gen als auch das Zielgen amplifiziert wird [122]. Puromycin wirkt als Analogon für die Aminoacyl-tRNA, weshalb die Verwendung zu einem Abbruch der Translation bei Säugetierzellen führt [123]. Die Produktion der Zellen wurde nach zwei Wochen Kultivierung Octet® QK^e System (Pall FortéBio, Menlo Park) durch die Verwendung von Protein-G gekoppelten Sensoren (Pall FortéBio) überprüft. Für den Vergleich der Produktionsrate zwischen den Zellen mit unterschiedlichem Selektionsdruck wurden die Zellen mit 2×10^5 vitalen Zellen/ml definiert in 5ml ausgesät. Nach 72h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellzahlen und Titer bestimmt und verglichen. Die Zellpools mit den besten Produktionsraten wurden für die Klonentwicklung ausgewählt. Das verwendete Amplifikationsschema ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Amplifikationsschema

Amplifikationsstufe	Methotrexat [nM]	Puromycin [$\mu\text{g/ml}$]
1	50	0,4
2	100	0,4
3	200	0,8
4	400	1,6

12 Klonierung von Zellen durch Aussaat in semisolidem Medium

Um eine genetisch möglichst einheitliche Zellpopulation zu erhalten, wurden Populationen aus einer isolierten Zelle gezüchtet. Die aus einer Zelle hervorgehende Zellpopulation wird „Klon“ genannt. Durch den Einsatz eines geeigneten fluoreszenzmarkierten Proteins konnte die Produktivität der einzelnen Klone bereits während der Klonierung überprüft werden.

Die Methode der Aussaat in semisolidem Medium beruht darauf, möglichst viele gut separierte und regelmäßig geformte, aus einer Einzelzelle entstandene Kolonien zu züchten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Dichten von 500 Zellen/ml in 40ml CloneMatrix Concentrate (Molecular Devices, San José) zusammen mit dem CloneDetect Antikörper (Molecular Devices) sowie 50ml 2xGTM Medium in 6-Well Platten ausgesät. Nach zwei Wochen Inkubation im Brutschrank wurden die stark fluoreszierenden Klonkolonien mit dem ClonePix 2 Systems (Molecular Devices) identifiziert und in 96-Well Rundbodenplatten mit GTM Medium ohne Selektionsdruck überführt. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Klone auf ihre

Produktivität überprüft. Die Klone mit dem besten Titer wurden mit Selektionsdruck kultiviert und 3-5 Klone für die Kryokonservierung ausgewählt.

13 Produktion von Zellkulturüberstand zur Antikörpergewinnung

Die Produktion der Antikörper erfolgte im 5L Maßstab. Dafür wurden 2×10^5 vitale Zellen/ml in Medium ohne Selektionsdruck in 5x1L Spinnerflaschen überführt und geerntet sobald die Vitalität unter 80% betrug. Durch einmaliges Abzentrifugieren der Zellsuspension in 500ml-Zentrifugenbechern bei $3000 \times g$, 30min und 4°C wurden die Zellen vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde über einen $3\mu\text{m}$ Filter (Vorabtrennung) und $1,2\mu\text{m}$ Filter (Feinabtrennung) (PALL Corporation, New York) filtriert. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration über einen $0,22 \mu\text{m}$ „rapid“-Filtermax Filter (TPP).

14 Aufreinigung der Antikörper mittels Protein-A

Für die Aufreinigung der Antikörper wurde nach der Equilibrierung der HiScreen MabSelect SuRe Säule (GE Healthcare) mit 1xPBS (Biochrom) der Überstand über Nacht mit Laufgeschwindigkeiten von 4,5-4,7ml/min mit Hilfe einer Äkta Start Anlage (GE Healthcare) aufgetragen. Nach dem erfolgreichen Auftrag erfolgte ein Waschschrift der Säule mit 1xPBS bis die Grundlinie (Signal $<20\text{mAu}$) wieder erreicht wurde. Anschließend wurde der Antikörper mit dem Elutionspuffer bestehend aus 0,1M Zitronensäure (Roth), 0,15M Natriumchlorid (Roth) und einem pH von 3,6 von der Säule eluiert. Die 1ml Peakfraktionen wurden in $200\mu\text{l}$ 2,45M Kaliumphosphatpuffer (Roth) mit einem pH von 7,2 neutralisiert und mit einem 50kDa Amicon-Ultra Zentrifugationsfilter (Merck Millipore) auf 1xPBS umgepuffert und steril filtriert. Die Proteinbestimmung erfolgte am NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) unter Berücksichtigung der in Tabelle 4 verwendeten Extinktionskoeffizienten. Die Antikörper wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 4: Extinktionskoeffizienten zur Konzentrationsbestimmung

Konstrukt	Extinktionskoeffizient
PM-IL-15mut/ PM-IL-15mut NA	1,299
PM-IL-15wt/ PM-IL-15wt NA	1,299
PM-IL-15sushi/ PM-IL-15sushi NA	1,346
MOPC-IL-15wt/ MOPC-IL-15wt NA	1,341
MOPC-IL-15sushi/ MOPC-IL-15sushi NA	1,385

15 Analytische und präparative Größenausschlusschromatografie

Die analytische Monomerbestimmung und präparative Monomeranreicherung der Antikörper erfolgte mittels Größenausschlusschromatografie mit der Säule Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare), welche an eine Äkta Prime Anlage (GE Healthcare) angeschlossen wurde. Als Laufpuffer wurde steriles 1xPBS verwendet. Für die analytische Untersuchung wurden 200µg des Proteins aufgetragen, die Laufgeschwindigkeit wurde auf 0,3ml/min eingestellt und es erfolgte keine Fraktionierung.

Auf Grund der hohen Aggregatanteile in allen Antikörperkonstrukten wurde anschließend eine präparative Aggregatabreicherung mit derselben Größenausschlusschromatografiesäule durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit betrug ebenfalls 0,3ml/min, wobei nach 6ml Durchlaufvolumen die Probe injiziert und auf die Säule aufgetragen wurde. Ab 7ml Durchlaufvolumen startete die Fraktionierung von 0,3ml/Fraktion. Die Fraktionen wurden gesammelt und steril filtriert. Die anschließende Analytik erfolgte mit 40µg Probe an einer HPLC-Anlage mit der ACQUITY UPLC ProteinSEC Column 450 2,5µm 4,6x150mm Säule (Waters, Milford). In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der analytischen SEC aller Immunzytokine vor und nach der präparativen SEC dargestellt.

Tabelle 5: Analyse der Immunitokine vor und nach präparativer SEC

Konstrukt	vor präparativer SEC			nach präparativer SEC		
	D/A	M	F	D/A	M	F
PM-IL-15mut	32,1	54,4	13,5	3,3	93,8	2,9
PM-IL-15mut NA	33,7	55,2	11,1	14,9	82,0	3,1
PM-IL-15wt	25,3	74,7	-	3,1	96,3	0,6
PM-IL-15wt NA	26,0	74,0	-	4,8	94,8	0,4
PM-IL-15sushi	59,0	41,0	-	6,3	93,7	-
PM-IL-15sushi NA	49,3	50,7	-	1,6	98,1	0,3
MOPC-IL-15wt	16,9	81,1	2,0	3,3	93,4	3,3
MOPC-IL-15wt NA	21,7	78,3	-	13,5	82,6	3,9
MOPC-IL-15sushi	56,2	43,8	-	2,2	95,6	2,2
MOPC-IL-15sushi NA	60,7	39,1	-	2,0	97,7	0,3

D= Dimer, A= Aggregat, M= Monomer, F= Fragment

16 Endotoxinbestimmung

Im Anschluss an die erfolgreiche Monomeranreicherung erfolgte die Bestimmung des Endotoxingehaltes in den Proben intern in der Arbeitsgruppe *Down Stream Processing* (DSP). Dafür wurden die Proben mit dem ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript, New Jersey) bei einer Konzentration von 30µg/ml vermessen. Als Standard wurde das Lipopolysaccharid (Sigma Aldrich) aus *E. coli* verwendet. Für die Verwendung der Proben in den immunologischen Versuchen sollte der Anteil an Endotoxin geringer als 0,125EU/ml sein.

17 Isolierung von PBMCs aus Primärmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete humane Primärmaterial stammte aus Frischblut (Praxis von Herrn Dr. Christ, Berlin) und Buffy Coats (Deutsches Rotes Kreuz, Berlin). Die Aufreinigung erfolgte mittels einer Ficoll-Dichtezentrifugation bestehend aus 20ml Biocoll Separating Solution (Biochrom), welche mit 20ml Primärmaterial beschichtet wurden. Die Falkons (TPP) wurden 12min bei 1045 x g mit langsamer Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Die PBMCs wurden von der auf dem Biocoll aufliegenden Schicht abgenommen und zweimal mit 50ml 1xPBS bei einer Zentrifugation von 700 x g für 10min gewaschen. Zuletzt wurden sie in

dem jeweiligen Versuchsmedium aufgenommen, gezählt und entsprechend dem jeweiligen Versuch auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt.

18 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen erfolgte am Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^5 Z/Well in 96-Well Rundplatten (TPP) mit den jeweiligen fluoreszierenden Primärantikörpern in 50 μ l 1xPBS/5% FKS (Biochrom) für 20min auf Eis gefärbt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen (300 x g, 5min) mit 200 μ l/Well mit 1xPBS/5% FKS wurden die Zellen in 100 μ l PBS und 10% DAPI (Merck Millipore) aufgenommen und analysiert.

Bei der Färbung mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern erfolgte zuerst die Bindung des Primärantikörpers in 1xPBS/5% FKS für 30min auf Eis. Anschließend wurde nach zweimaligem Waschen der Zellen (300 x g, 5min) mit in 1xPBS/5% FKS der Sekundärantikörper ebenfalls in 1xPBS/5% FKS für 30min auf Eis inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen konnten die gefärbten Zellen in 100 μ l PBS analysiert werden. Die Tabelle 6 zeigt die verwendeten Antikörper und deren eingesetzten Verdünnungen.

Tabelle 6: Übersicht über verwendete fluoreszierende Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Fluoreszenz- markierung	Klon	Firma	eingesetzte Verdünnung
CD3	APC-Vio770	REA613	Miltenyi Biotech	1:800
CD4	BV421	RPA-T4	BioLegend	1:500
CD8	AF700	SK1	BioLegend	1:400
CD14	FITC	REA599	Miltenyi Biotech	1:1000
CD19	FITC	HIB19	BioLegend	1:400
CD25	APC	REA570	Miltenyi Biotech	1:80
CD45	Pacific Blue	HI30	BioLegend	1:400
CD56	BV711	NCAM16.2	BD Pharming	1:600
CD69	PE	FN50	BioLegend	1:200
F(ab') ₂ goat anti human IgG(H+L)	PE	Polyklonal	Jackson Laboratory	1:100

19 Aktivierung von PBMCs, NK- und T-Zellen

Für die Untersuchung des Aktivierungszustandes der einzelnen Immunpopulationen wurden sowohl PBMCs als auch aufgereinigte NK- und T-Zellen verwendet. Die Aufreinigung der NK- und T-Zellen aus den PBMCs erfolgte laut der Herstellerangaben der verwendeten Dynabeads Kits (Invitrogen). Die Zellen wurden mit einer definierten Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ vZ/Well in RPMI und 5% FKS ausgesät und mit den jeweiligen Zytokin- bzw. Antikörperkonzentrationen über einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in der Tabelle 7 dargestellt. Die Analyse der Aktivierung erfolgte nach 24h, 48h, 72h bzw. 5 Tagen durch die Färbung der Oberflächenmarker CD25 und CD69 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und der Detektion am Attune Nxt Flow Cytometer.

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Zytokine

Zytokin	Firma
IL-2	Peprotech
IL-10	Peprotech
IL-12	Peprotech
IL-15	Peprotech
IL-18	Biovision
IL-21	Peprotech
IL-27	Peprotech
TGF- β	Peprotech

20 Proliferation von NK-Zellen und PBMCs

20.1 Analyse der Proliferation mittels CellTiter Glow®

Die Proliferation von aufgereinigten NK-Zellen nach der Stimulation mit den jeweiligen Zytokinen wurde unter Verwendung der CellTiter Glow® Reagenz (Promega, Madison) durchgeführt. Die Reagenz lysiert die Zellen und generiert ein in Abhängigkeit des ATP-Gehalts in der Zelle stabiles Lumineszenz-Signal, welches detektiert werden konnte. Der Gesamt-ATP-Gehalt ist abhängig von der Anzahl an vitalen Zellen im jeweiligen Ansatz. Anhand des gemessenen Fluoreszenz-Signals kann auf die Anzahl der Zellen im Experiment geschlossen werden. Die Zellen wurden dafür mit einer Zellzahl von 1×10^5 vZ/Well ausgesät und mit dem jeweiligen Interleukin für 72h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 100µl des Überstandes wurden im Anschluss im 100µl der CellTiter Glow Reagenz vermischt und laut Herstellerangaben für 10min inkubiert. Die Auswertung der Lumineszenz erfolgte am Tecan Infinite F200 (Tecan, Männedorf).

20.2 Analyse der Proliferation mittels Cell Trace Violet

Bei der Betrachtung der Proliferation aller Immunzellen nach Stimulation mit den jeweiligen Immunzytokinen wurden die Zellen mit Cell Trace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific) beladen. Das CTV diffundiert in die Zellen und bindet intrazellulär Amine. Bei jeder Zellteilung wird das CTV an die Tochterzellen in gleichen Teilen weitergegeben, sodass sich das CTV-

Signal in den Zellen verringert. Diese Signalunterschiede von geteilten und nicht geteilten Zellen können im Durchflusszytometer detektiert werden. Die Beladung der Zellen erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ vZ/Well mit den jeweiligen Antikörperkonzentrationen bei 37°C im Brutschrank in RPMI und 5% FKS inkubiert. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Immunzellen mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und es folgte die Detektion am Attune Nxt Flow Cytometer.

21 Ermittlung der natürlichen sowie antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität mittels Europiumbeladung der Zielzellen

Die Testung der Antikörper auf ihre Funktion, NK-Zellen zu aktivieren und natürliche Zytotoxizität gegenüber Jurkatzellen bzw. ADCC gegenüber antigenspezifischen Zielzellen zu vermitteln, erfolgte auf Grundlage der Beladung der jeweiligen Zielzellen mit Europium, welches bei der Zellyse der Zielzellen freigesetzt wird und im Überstand detektiert werden kann. Die Detektion der Zellyse beruht auf der Chelatisierung des Europiums mit den Liganden, welche in der DELFIA® Enhancement Solution (PerkinElmer, Waltham) enthalten sind. Dabei entstehen stark fluoreszierende Chelate, welche detektiert werden können.

Die Beladung der Zielzellen mit Europium erfolgte durch Elektroporation der Zellen. Dafür wurden 3×10^6 vitale Zielzellen mit PBS gewaschen und anschließend in 100µl kaltem Europiumpuffer (50mM Hepes, 93mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 10mM DTPA, 2mM Europium-III-acetat, pH 7,4) aufgenommen und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mittels des Nucleofector® Device (Lonza) elektroporiert und erneut 10min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Zielzellen sechsmal mit 14ml Medium (RPMI + 5% FKS) gewaschen und dabei für 5min bei 311 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 5ml Medium aufgenommen, gezählt und auf 5×10^4 vZ/ml eingestellt.

Die Antikörperverdünnungen wurden 10-fach mit dem Medium angesetzt, da im Well eine 1:10 Verdünnung mit den Effektor- und Zielzellen stattfindet. Es wurden jeweils 20µl der Antikörper in Triplikaten in 96-Well Rundbodenplatten (TPP) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl der europiumbeladenen Zielzellen und 80µl der Effektorzellen, welche zuvor auf 5×10^6 vZ/ml eingestellt wurden, damit ein Effektor- zu Zielzellratio von 80:1 im Well vorliegt. Für die Kontrollansätze wurden jeweils in sechsfach Bestimmungen 100µl Medium und 100µl der europiumbeladenen Zielzellen (Spontanrelease), 100µl Medium und 100µl Überstand der europiumbeladenen Zielzellen (Basalrelease) und 80µl Medium, 100µl der

europiumbeladenen Zielzellen und 20µl 10% Triton-X 100 (Sigma Aldrich) (Maximalrelease) pipettiert. Daraus lässt sich mit folgenden Formeln die Spontanlyse sowie die spezifische Lyse berechnen.

$$\text{Spontanlyse [\%]} = \frac{(SR-BR)}{(MR-BR)} * 100$$

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{(ER-SR)}{(MR-BR)} * 100$$

Die Ansätze wurden für 5h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Platten für 5min bei 311 x g, sodass 25µl des Überstandes zu 200µl der DELFIA® Enhancement Solution in weiße 96- Well Flachbodenplatten (Corning, Kaiserslautern) hinzugegeben werden konnten. Nach 10min Inkubation konnte das Fluoreszenzsignal am Tecan Infinite F200 (Tecan) mit einer Zeitverzögerung von 400µs, einer Anregungswellenlänge von 340nm und einer Emissionswellenlänge von 612nm durchgeführt werden.

22 Ermittlung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase-Detektion

Ein weitere Möglichkeit die Lyse von Tumorzellen basierend auf dem ADCC-Effekt zu untersuchen basiert auf der Sekretion von LDH (Lactatdehydrogenase) durch apoptotische Zellen. Der Vorteil dieses Experiments ist die längere Inkubationszeit von bis zu 48h. Dahingegen ist der Versuchsansatz mit Europium auf eine Inkubationszeit von 5h limitiert, da die Europiumbeladung der Zielzellen nicht stabil ist und bei einer längeren Inkubation der Wert der Spontanlyse ansteigt.

Für die Durchführung des Versuchs wurden die Zielzellen in 96-Well Flachbodenplatten mit einer Zellzahl von 1,5x10⁴vZ/Well in 200µl RPMI + 10% FKS + 1% L-Glutamin ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Platten bei 311 x g für 5min zentrifugiert, das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden in 100µl Phenolrot-freiem Medium (Biochrom) + 1% FKS aufgenommen. Dazu wurden 20µl der zehnfach angesetzten Antikörperverdünnung und 80µl der PBMCs mit einer Zellzahl von 2x10⁵vZ/ml dazu gegeben. Als Kontrollen dienen der Basalrelease-Ansatz bestehend aus Effektor- und Zielzellen sowie dem Maximalrelease-Ansatz bestehend aus Zielzellen mit Zugabe von 1% Triton-X 100. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Platten für 5min bei 311 x g zentrifugiert und 100µl des

Überstandes mit 100µl der *Reaction mixture* des Cytotoxicity Detection Kit (Roche) zusammen pipettiert. Nach maximal 30min Inkubation im Dunkeln wurde die Absorption bei 492nm mit einer Referenzwellenlänge von 630nm am EnSpire® 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer) gemessen. Die Berechnung der Lyse erfolgt auf Grundlage folgender Formel:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{(ER-BR)}{(MR-BR)} * 100$$

23 Zytokinanalyse nach Immunzellstimulation

Die Analyse der Zytokine GM-CSF, INF-γ, TNF-α und MIP-1α erfolgte mit U-PLEX Platten (Meso Scale Discovery, Rockville). Die Zytokinanalyse wurde von Überständen verschiedener PBMC Spender durchgeführt, welche für 24h, 48h und 72h mit den jeweiligen Antikörpern im 96-Well Rundbodenplatten stimuliert wurden. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll und die Detektion im SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery).

Die Analyse der Granzym B Sekretion erfolgte laut Herstellerprotokoll des Granzyme B Duo Set ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis) und die Detektion wurde am Tecan Infinite F200 (Tecan) durchgeführt.

24 MUC1 Antigen ELISA

Das glykosylierte MUC1-Protein (Biosyntan, Berlin) wurde mit 50µl/Well auf eine Maxisorp 96-Wellplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 5°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Beschichtungslösung verworfen und die Mikrotiterplatte ausgeschlagen. Anschließend wurde die Platte insgesamt viermal mit je 200µl Waschpuffer (1x DPBS mit 0,05%(v/v) Tween 20 (Roth)) gewaschen. Bevor 200µl/Well der Blocklösung (1xDPBS mit 2% BSA (Roth)) auf die Platte gegeben wurde, wurde der Waschpuffer aus der Platte geschlagen. Nach dem Blocken der Platte für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut viermal mit dem Waschpuffer gewaschen und ausgeschlagen. Die Proben und der Standard wurden mit einem Volumen von 50µl auf die Platte gegeben und für 2h auf einem Horizontalschüttler (Thermo Fisher Scientific) mit 300rpm inkubiert. Es folgte erneut ein Waschschrift mit viermaligem Waschen und Ausschlagen der Platte. Danach wurde der POD-gekoppelte *rabbit anti-human IgG Fc fragment specific* (Jackson Immuno Research) mit einer Konzentration von 50ng/ml und einem Volumen von 50µl auf die Platte pipettiert und die Platte erneut bei 300rpm für 1h inkubiert. Nach viermaligem Waschen und Ausschlagen der Platte wurden 100µl TMB-Fertiglösung (Tebu-Bio, Offenbach) dazugegeben. Das Abstoppen

der Reaktion erfolgte nach 3-10min mit je 50µl 2,5N Schwefelsäure (Roth). Unmittelbar nach dem Abstoppen wurde die Mikrotiterplatte im EnSpire 2300 Multilabel (Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 450nm mit 630nm Korrektur vermessen.

25 FcγRIIIaV AlphaScreen™

Die Alpha® Plattform (Perkin Elmer) beruht auf der chemisch-physikalischen Interaktion von sogenannten Donor- und Akzeptorbeads. Der rekombinante FcγRIIIaV-His wird an Nickel-chelatierte Donorbeads gebunden. Die humanen Antikörper der Probe (IgG) und die Kaninchen-Antikörper, welche kovalent an den Akzeptorbeads gebunden sind, konkurrieren um die Bindung an den FcγRIIIaV. Bei Interaktion der Kaninchen-Antikörper mit FcγRIIIaV werden Donor- und Akzeptorbeads in räumliche Nähe gebracht ($s < 200\text{nm}$), wodurch nach Anregung (680nm) gebildeter Singulett-Sauerstoff auf die Akzeptorbeads übergehen kann. Diese emittieren dadurch Licht im Wellenlängenbereich von 520-620nm. Bei Vorhandensein eines höher affinen Antikörpers konkurriert dieser mit dem Akzeptorbead-gebundenen Kaninchen-Antikörper um die Interaktion mit dem FcγRIIIaV (CD16aV). Folglich wird die Emission konzentrationsabhängig reduziert. CD16aV beschreibt die homozygote Variante des CD16a Rezeptors, bei der an der Aminosäurestelle 158 ein Valin vorzufinden ist. Der CD16aV Rezeptor bindet humanes IgG1 mit einer höheren Affinität als die homozygote CD16aF Variante, bei der an der Aminosäurestelle 158 ein Phenylalanin exprimiert wird.

Es wurden zunächst je 15µl FcγRIIIaV-Rezeptor mit einer Konzentration von 0,5µl/Well auf eine 96-Well $\frac{1}{2}$ area plate (Corning) pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von je 15µl Antikörperprobe/Well. Die Proben wurden für 30min auf dem Horizontalschüttler bei ca. 180rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor die Akzeptor- und Donorbeads mit einem Volumen von 20µl/Well dazugeben wurden, wurde die Stammlösung bestehend aus je 50µg/ml der Beads in einem lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß angesetzt. Die Zugabe der Beads erfolgte in einem abgedunkelten Raum ohne künstliche Lichtquellen. Nach der Inkubation für 1h wurden die Proben im EnSpire 2300 Multimode (Perkin Elmer) gemessen (Dunkeladaptation für 2 min, Anregungswellenlänge 680nm, Emissionswellenlänge 520-620nm).

26 IL-15 Rezeptorbindung

Die Überprüfung der IL-15 Rezeptorbindung erfolgte mittels ELISA. Dafür wurden die rekombinanten humanen IL-15 Rezeptoren α (Fc Chimera, R&D Systems) bzw. β (Fc Chimera, Abcam) jeweils mit 50µl/Well und einer Konzentration von 1µg/ml über Nacht bei 4°C auf

96-Well Maxisorp Platten gebunden. Vor und nach dem Blocken für 2h bei Raumtemperatur mit 200µl/Well 2% BSA/PBS erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platten mit 200µl/Well 0,05% Tween 20/1xPBS mit anschließendem Ausschlagen der Platten. Es wurden 50µl der Proben auf die Platte pipettiert und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut mit 200µl/Well 2% BSA/PBS gewaschen und ausgeschlagen. Danach wurde der POD-gekoppelte *rabbit anti-human IgG F(ab')₂ fragment specific* (Jackson Immuno Research) Sekundärantikörper mit einem Volumen 50µl/Well und einer Konzentration von 50ng/ml für 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen und Ausschlagen der Platten erfolgte die Zugabe von 100µl/Well TMB. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 3-10min mit je 50µl 2,5N Schwefelsäure (Roth). Unmittelbar nach dem Abstoppen wurde die Mikrotiterplatte im EnSpire 2300 Multilabel (Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 450nm mit 630nm Korrektur vermessen.

27 *In vivo* Pharmakokinetikanalyse

Die Durchführung der Pharmakokinetik erfolgte bei der Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH. Es wurden 3 weibliche C57BL/6 Mäuse pro Gruppe verwendet. Es wurden C57BL/6 Mäuse für die Pharmakokinetikanalyse verwendet, um den Vergleich mit HEK293 produzierten hIL-15 herstellen zu können. Die Serumhalbwertszeit von 30min wurde in C57BL/6 Mäusen analysiert. Den Tieren wurden 250pmol des jeweiligen Antikörpers intravenös gegeben. Dies entspricht 47,75µg von PM-IL-15sushi Fc_{ko} und 43,5µg von PM-IL-15wt Fc_{ko}. Das Serum wurde nach folgenden Zeitpunkten entnommen: 5min, 1h, 6h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d und 8d. Des Weiteren wurde vor und nach der Behandlung das Blut der Mäuse entnommen und mittels Durchflusszytometrie auf die Immunzellpopulationen untersucht. Die dabei verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die Analyse der Milz

Antigen	Floureszenz- markierung	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3	FITC	17A2	BioLegend	1:400
CD8	BV421	53-6.7	BioLegend	1:1000
CD45R	APC-Cy7	RA3-6B2	BioLegend	1:6800
MHC-II	APC	M5/114.15.2	BioLegend	1:1000

Das Serum wurde in einem Titer-ELISA analysiert. Dafür wurden je 50 μ l/well mit 2 μ g/ml des Maus anti-human Igk Antikörper (BD Biosciences) in 0,1M Carbonatpuffer (pH 9,6) auf 96-Well Maxisorp Platten (Nunc®, Thermo Fisher) über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden die beschichteten Platten einmal mit Waschpuffer (1xDPBS mit 0,05% Tween 20 (Roth)) gewaschen, ausgeschlagen und für 2h bei RT mit 200 μ l/well Blocklösung (5% BSA (Sigma Aldrich) in 1xDPBS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen wurden die Überstände sowie die Standardreihe mit 50 μ l/well aufgetragen und 1h bei RT inkubiert. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen und Ausschlagen der Platten mit Waschpuffer sowie die Zugabe des Sekundärantikörpers POD-gekoppelter *goat anti-human IgG Fcy fragment specific* (Jackson ImmunoResearch), welcher für 30min bei RT inkubierte. Der Detektionsantikörper wurde je nach Lot 1:15.000 – 1:60.000 in 1% BSA/DPBS verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligen Waschen wurden 100 μ l/well TMB (Tebu-Bio) für 3-10min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit jeweils 50 μ l/well 2.5N Schwefelsäure (Roth) gestoppt. Die Absorption wurde bei 450nm und 620nm am Tecan Infinite F200 gemessen.

28 Wirksamkeitsstudie *in vivo*

Die Wirksamkeitsstudie wurde ebenfalls bei Experimental Pharmacology & Oncology Berlin-Buch GmbH durchgeführt. Für die Wirksamkeitsstudie wurden vorab 4T1 Zellen mit TA-MUC1 transfiziert, da für ein syngenes Mausmodel keine murinen TA-MUC1 exprimierenden Tumorzellen existieren. Das Protokoll lehnt sich an die Versuche um Pulaski und Ostrand-Rosenberg an, welche mit 4T1 Zellen ein gutes Anwachsen sowie eine Metastasierung der

Zellen zeigen konnten [124]. Es wurden insgesamt 9 weibliche Balb/c Mäuse verwendet, so dass 3 Tiere/Gruppe mit 200µl der jeweiligen Reagenz intraperitoneal behandelt werden konnten. Gruppe A erhielt die PBS-behandelte Kontrollgruppe, Gruppe B wurde mit 1mg/kg und Gruppe C mit 200µg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelt. Als Tumorzellen wurden TA-MUC1-transifizierte 4T1 Zellen verwendet, welche an Tag 0 appliziert wurden. Die Behandlung der Tiere erfolgte ab Tag 1 zweimal wöchentlich. An Tag 21 wurde die Studie beendet. Es wurden der Tumor der 0,2mg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten und der unbehandelten Gruppe in der Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Immunzellpopulationen analysiert. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die Analyse des Tumors

Antigen	Floureszenz- markierung	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3	BV711	17A2	BioLegend	1:200
CD8	BV421	53-6.7	BioLegend	1:1000
CD45	APC-Cy7	30F11	BioLegend	1:600
NK-1.1	FITC	PK136	BioLegend	1:200

Teil IV

Ergebnisse

29 Auswahl eines immunzellstimulierenden Interleukins

29.1 Aktivierung von NK- und T-Zellen

Für die Auswahl eines für ein Immunzytokin geeigneten Interleukins wurden insgesamt sechs Interleukine verglichen. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 und IL-27 sind in der Literatur als Botenstoffe beschrieben, welche aktivierend auf NK- und T-Zellen wirken. Aus diesem Grund wurden in Vorversuchen diese Interleukine hinsichtlich ihrer immunzellstimulierenden Eigenschaften untersucht.

Um die Aktivierung der NK- und T-Zellen nach der Stimulation mit den jeweiligen Interleukinen genauer zu betrachten, wurden isolierte NK- und T-Zellen mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins stimuliert. Nach 24h, 48h bzw. 72h wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 untersucht. Sowohl CD25 als auch CD69 werden bei einer Aktivierung von NK- bzw. T-Zellen hochreguliert, weshalb es über diese Marker möglich ist, Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand der Zellen zu treffen. Um eventuelle Wechselwirkungen verschiedener Immunzellpopulationen während der Aktivierung darzustellen, wurde zusätzlich zu den isolierten NK- und T-Zellen auch die Aktivierung von stimulierten PBMCs analysiert. Die Untersuchung der Aktivierung von NK- und T-Zellen wurde insgesamt sechsmal mit PBMCs und dreimal mit aufgereinigten NK- bzw. T-Zellen mit jeweils unterschiedlichen Spender-PBMCs durchgeführt. In der folgenden Abbildung 6 wird das Ergebnis der Aktivierung eines Spenders dargestellt.

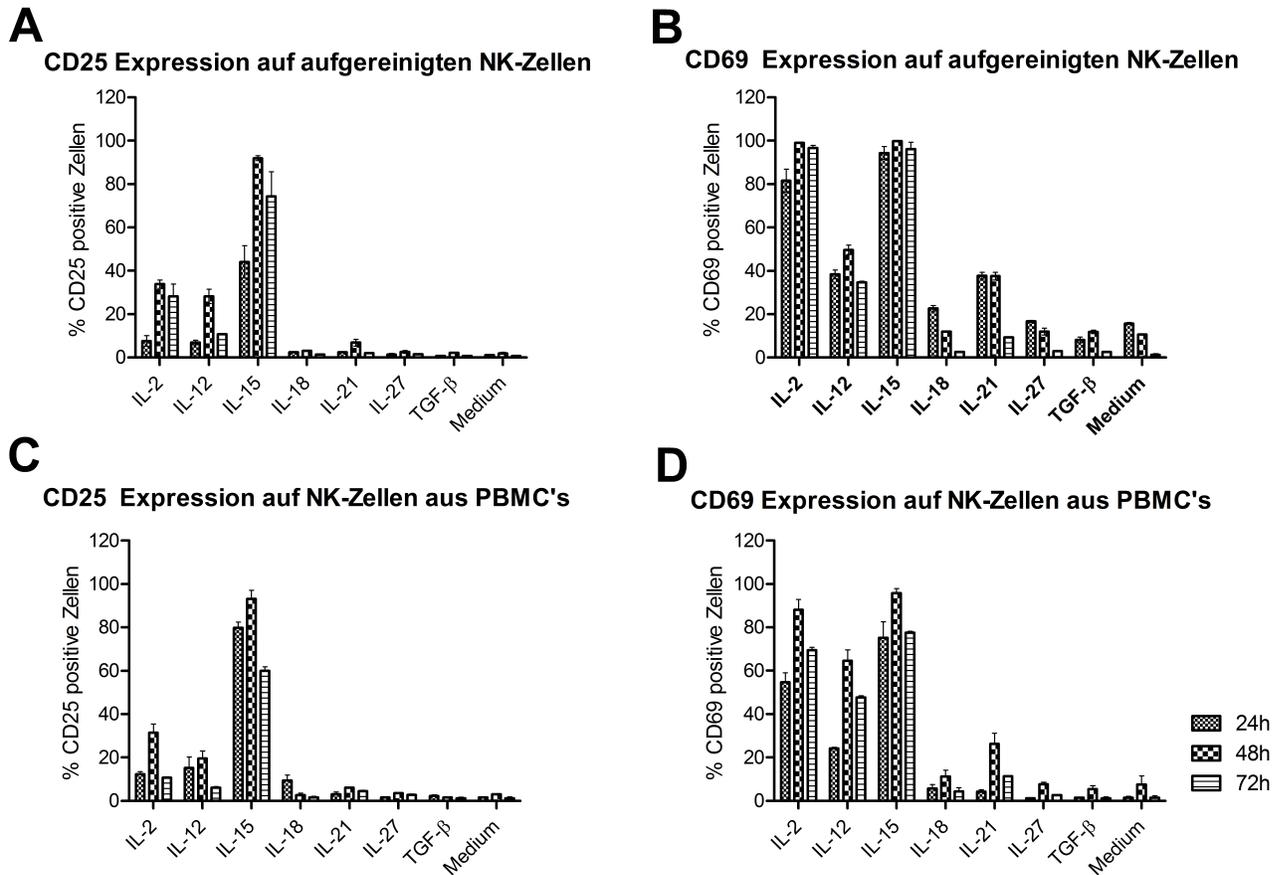


Abbildung 6: CD25 und CD69 Expression auf NK-Zellen nach Interleukinstimulation

Die Stimulation erfolgte mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins, die Zellen wurden nach 24h, 48h und 72h mittels Durchflusszytometrie analysiert, CD25 Expression auf (A) aufgereinigten NK-Zellen und (C) NK-Zellen in PBMCs, CD69 Expression auf (B) aufgereinigten NK-Zellen und (D) NK-Zellen in PBMCs, dargestellt sind repräsentative Mittelwerte (n=2) eines Spenders

In der Abbildung 6 ist der prozentuale Anteil an aktivierten CD25- bzw. CD69-positiven NK-Zellen dargestellt. Die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 wird nach der Stimulation der NK-Zellen hochreguliert, was sich sowohl bei den isolierten NK-Zellen als auch den NK-Zellen, welche in einem Immunzellpool stimuliert wurden, zeigt. Nach 48h Stimulation ist mit allen Interleukinen das maximale Expressionslevel erreicht, was daran zu erkennen ist, dass die Expression nach 72h bereits runterreguliert wird. Vor allem IL-15 stimulierte NK-Zellen regulieren nach 48h Inkubation sowohl CD25 als auch CD69 bis zu 100% hoch. Da dieser Effekt schon bei den aufgereinigten NK-Zellen zu erkennen ist, wird durch die Ko-Kultivierung mit den anderen Immunzellen keine Steigerung der Expression mehr induziert. Die Stimulation mit IL-2 induziert nach 48h ebenfalls eine CD69 Expression von bis zu 100% bei aufgereinigten NK-Zellen. Im Vergleich dazu ist die Expression bei ko-kultivierten

NK-Zellen mit 90% positiven Zellen geringer. Dieser Effekt wird bei der Betrachtung der Werte nach 24h Stimulation noch deutlicher. Während die CD69 Expression bei den aufgereinigten NK-Zellen 80% beträgt, liegt die Expression bei den ko-kultivierten NK-Zellen bei 55% CD69-positiven Zellen. Die Stimulation mit IL-12 und IL-21 über 48h resultiert lediglich in einer Hochregulation von bis zu 50% (IL-12) und 37% (IL-21) CD69. Dabei kann die Expression von IL-12 stimulierten, ko-kultivierten NK-Zellen auf 65% CD69-positive Zellen gesteigert werden. Für IL-12 ist zusätzlich eine Hochregulation der CD25 Expression auf 28% positive Zellen festzustellen. Keine Veränderung des CD25 und CD69 Expressionslevels konnte bei IL-18 und IL-27 stimulierten NK-Zellen gezeigt werden. Die TGF- β enthaltene Negativkontrolle zeigte ebenso keine Aktivierung der einzelnen Immunzellen.

Da durch die T-Zellaufreinigung nur CD3⁺ T-Zellen angereichert wurden, wurden für die Analyse mittels des Durchflusszytometers die Oberflächenantigene CD4⁺ und CD8⁺ zusätzlich angefärbt. In der Abbildung 7 werden die Ergebnisse der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen dargestellt.

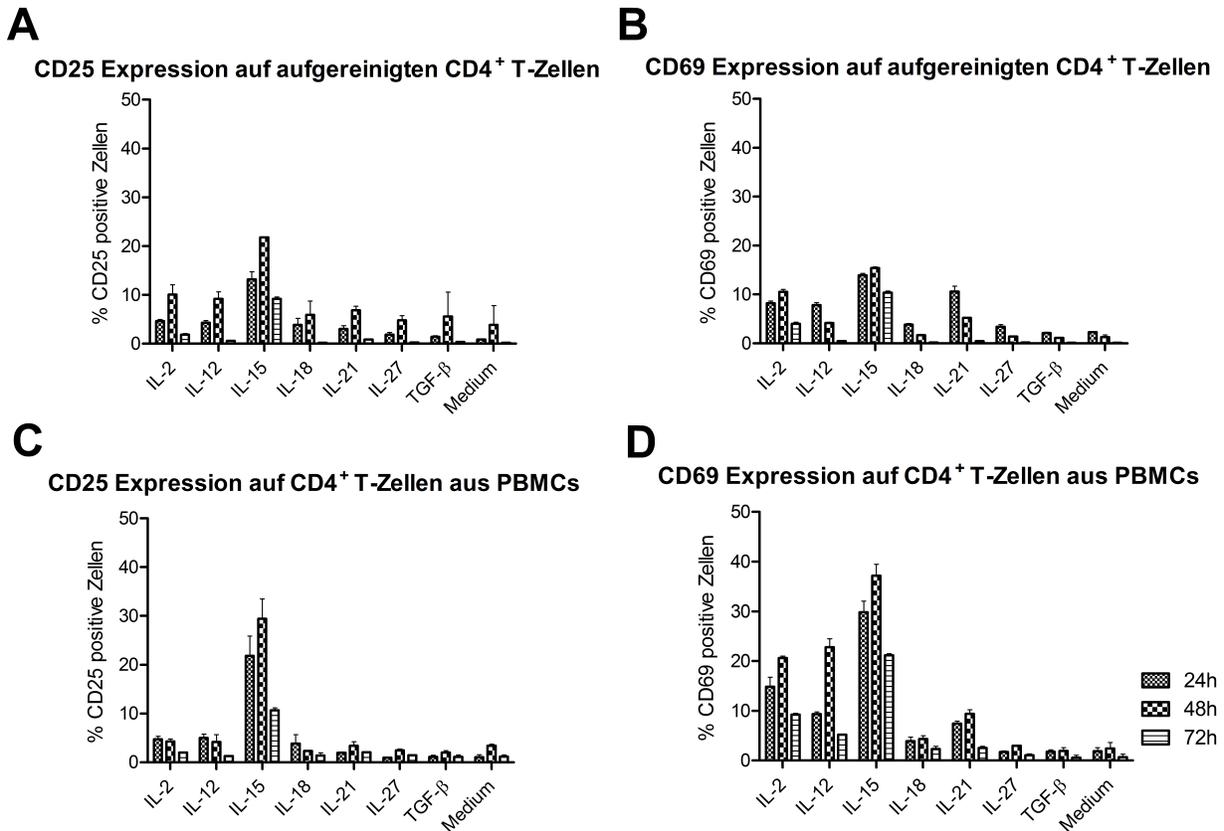


Abbildung 7: CD25 und CD69 Expression auf CD4⁺ T-Zellen nach Interleukinstimulation

Die Stimulation erfolgte mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins, die Zellen wurden nach 24h, 48h und 72h mittels Durchflusszytometrie analysiert, CD25 Expression auf (A) aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen und (C) CD4⁺ T-Zellen in PBMCs, CD69 Expression auf (B) aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen und (D) CD4⁺ T-Zellen in PBMCs, dargestellt sind repräsentative Mittelwerte (n=2) eines Spenders

Wie schon bei den NK-Zellen ist auch für die CD4⁺ T-Zellen das maximale Expressionslevel nach einer 48 stündigen Stimulation erreicht. Die Ko-Kultivierung der Immunzellen wirkt sich besonders auf die CD4⁺ T-Zellen aus. Durch die Stimulation mit IL-15 zeigt sich eine Steigerung der CD69 Expression nach 48h Stimulation von 15% bei aufgereinigten T-Zellen auf 37% positiven Zellen bei Ko-Kultivierung mit weiteren Immunzellen. Dieser Effekt ist ebenfalls bei der CD25 Expression zu beobachten. Auch bei der Stimulation mit IL-2 und IL-12 ist ein positiver Einfluss der Ko-Kultivierung auf die CD69 Expression auf CD4⁺ T-Zellen zu erkennen. Wie bei den NK-Zellen zu erkennen war, zeigt sich auch bei den CD4⁺ T-Zellen keine Änderung des Expressionslevels durch die Stimulation der Zellen mit IL-18 bzw. IL-27. Im Vergleich aller Interleukine zeigt IL-15 den größten Effekt auf die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen.

Die Abbildung 8 stellt die CD25 und CD69 Expression der CD8⁺ T-Zellen nach der Stimulation

mit den jeweiligen Interleukinen dar.

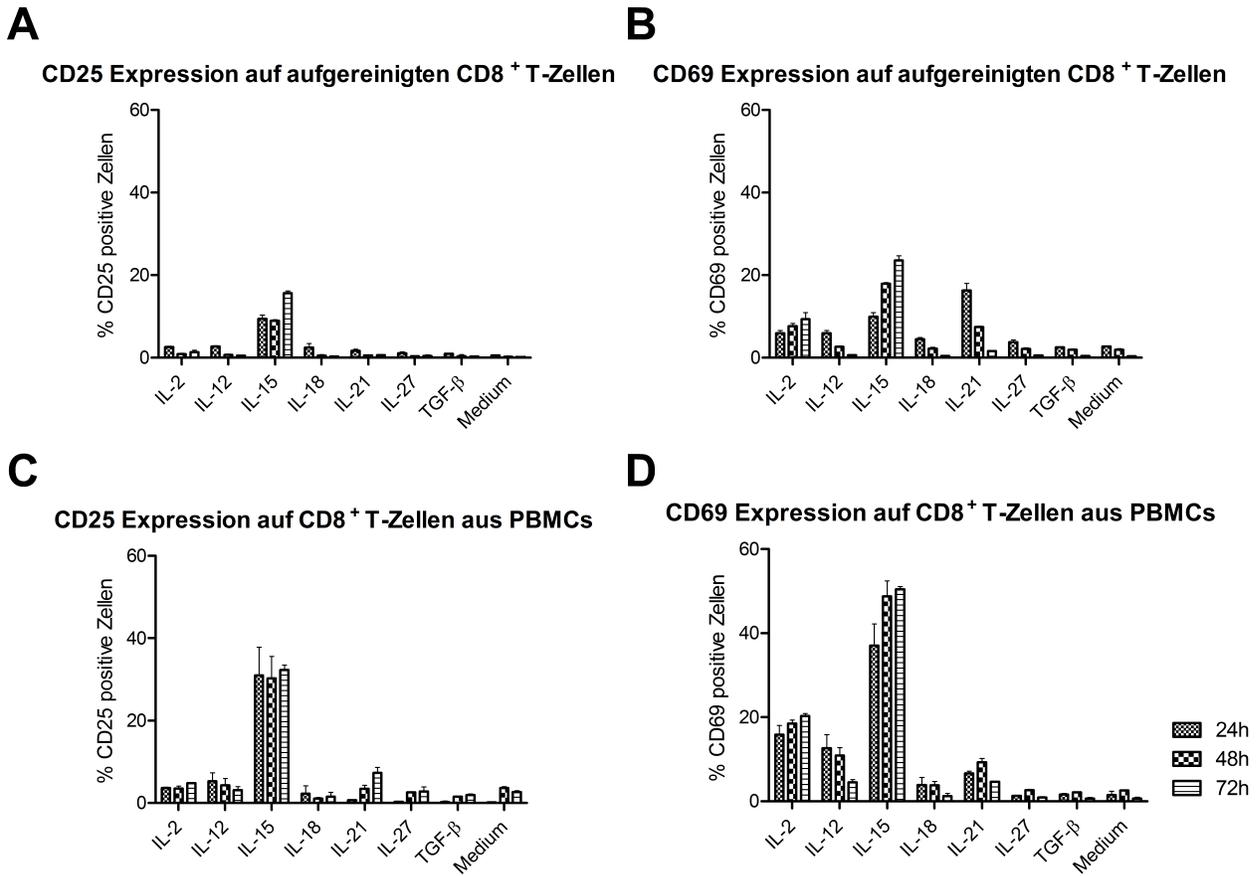


Abbildung 8: CD25 und CD69 Expression auf CD8⁺ T-Zellen nach Interleukinstimulation

Die Stimulation erfolgte mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins, die Zellen wurden nach 24h, 48h und 72h mittels Durchflusszytometrie analysiert, CD25 Expression auf (A) aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen und (C) CD8⁺ T-Zellen in PBMCs, CD69 Expression auf (B) aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen und (D) CD8⁺ T-Zellen in PBMCs, dargestellt sind repräsentative Mittelwerte (n=2) eines Spenders

Bei den CD8⁺ T-Zellen zeigt sich, dass die längere Kultivierung über 72h zu einer höheren Expression der Aktivierungsmarker im Vergleich zu der Kultivierung über 48h führt. Dies wird besonders bei der Kultivierung der Zellen mit IL-15 deutlich. Auch bei den CD8⁺ T-Zellen führt die Stimulation von PBMCs zu einer verstärkten Aktivierung im Vergleich zu den isolierten T-Zellen. Nach 72h beträgt die CD25 Expression auf aufgereinigten T-Zellen 16%, bei ko-kultivierten 32% positive Zellen und die CD69 Expression 24% bei aufgereinigten und 50% positive Zellen bei ko-kultivierten Zellen. Dieser Einfluss lässt sich auch bei IL-2 stimulierten T-Zellen erkennen, wobei die CD25 Expression sehr gering ist und auch die CD69 Expression bei aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen lediglich 10% und bei ko-kultivierten Zellen 20% beträgt und somit geringer ist als bei IL-15 stimulierten Zellen. Die Aktivierung der aufgereinigten T-Zellen

mit IL-21 zeigt nach 24h eine Hochregulation von CD69 auf CD8⁺ T-Zellen, welche nach 48h jedoch schon wieder abnimmt. Ein Einfluss der Ko-Kultivierung mit weiteren Immunzellen ist dabei nicht zu erkennen.

Abschließend ist festzuhalten, dass IL-2 und IL-15 den größten Einfluss auf die Aktivierung der NK-, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zeigen. Vor allem bei der Betrachtung der T-Zellen wird bestätigt, dass eine Ko-Kultivierung der Immunzellen zu einer gesteigerten Aktivierung führt.

29.2 Granzym B Sekretion

Da gezeigt werden konnte, dass die Aktivität von Immunzellen durch die Stimulation mit Interleukinen beeinflusst wird, sollte untersucht werden, ob auch die Granzym B Produktion und Sekretion in den Immunzellen durch die Interleukinstimulation beeinflusst wird. Granzym B ist maßgeblich an dem Prozess der NK-Zellvermittelten Zytotoxizität beteiligt. Die NK-Zelle sekretiert diese Protease zusammen mit Perforin, wodurch die Membran der Zielzelle perforiert wird und durchlässig für das Granzym B wird, was zum Abbau der DNA der Zielzelle und somit deren Zelltod führt. Deshalb wurde die Granzym B Sekretion im Überstand von vorstimulierten PBMCs (50ng/ml des jeweiligen Interleukins) nach einer Stimulationzeit von 24h, 48h und 72h mit Hilfe eines ELISA-Kits analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 9 dargestellt.

Granzym B Konzentrationen aus Überstand von unterschiedlich stimulierten PBMCs

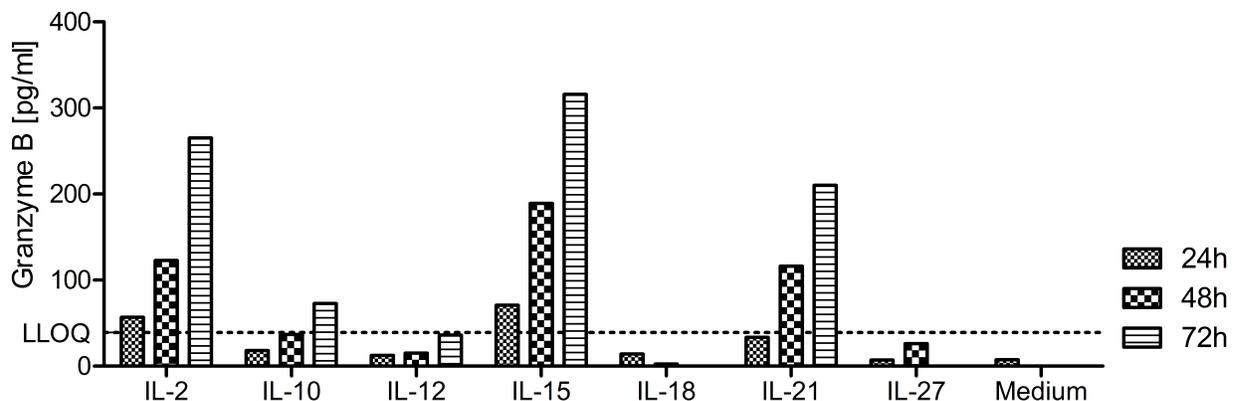


Abbildung 9: Bestimmung der Granzym B Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit Interleukinen

Die Stimulation erfolgte mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins, die Überstände wurden nach 24h, 48h und 72h abgenommen, Analyse der Überstände erfolgte im ELISA, dargestellt sind die anhand der Standardkurve zurück gerechneten Mittelwerte (n=2), LLOQ: lower limit of quantification

Anhand der Analyse des Überstandes ist zu erkennen, dass nach einer Inkubationszeit von 24h die Granzym B Sekretion noch sehr gering ist und lediglich bei den IL-2 und IL-15 stimulierten PBMCs überhalb des unteren Detektionslimits liegt. Eine verstärkte Sekretion von Granzym B ist nach der Stimulation der PBMCs mit IL-2, IL-15 und IL-21 nach 48h und 72h zu erkennen. Dabei konnte in dem Ansatz mit IL-15 vorstimulierten PBMCs eine Granzym B Konzentration von 316pg/ml nach einer Inkubationszeit von 72h gemessen werden, was in diesem Versuch die höchste gemessene Konzentration ist. Im Vergleich dazu ist in der Mediumkontrolle und der Negativkontrolle, welche mit IL-10 stimulierte PBMCs enthält, sowie in den mit IL-12, IL-18 und IL-27 stimulierten Proben keine Zunahme der Granzym B Sekretion über den gesamten Zeitraum zu detektieren. In diesem Versuch zeigt sich der starke immunzellstimulierende Effekt von IL-2, IL-15 und IL-21.

29.3 Natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen

Der Einfluss der ausgewählten Interleukine auf die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen wurde ebenfalls betrachtet. Dafür wurden aus eingefrorenen PBMCs aufgereinigte NK-Zellen mit 50ng/ml des jeweiligen rekombinant humanen Interleukins für 24h vorstimuliert und am folgenden Tag zusammen mit Jurkatzellen untersucht. Die Jurkatzellen sind mit Europiumpuffer beladen, welcher bei der Zielzelllyse im Überstand frei gesetzt wird und detektiert werden kann. Der Versuch wurde insgesamt viermal mit jeweils unterschiedlichen PBMC Spendern durchgeführt. In Abbildung 10 ist das Ergebnis der Analyse eines Spenders dargestellt.

Vergleich von unterschiedlich stimulierten NK-Zellen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber Jurkatzellen

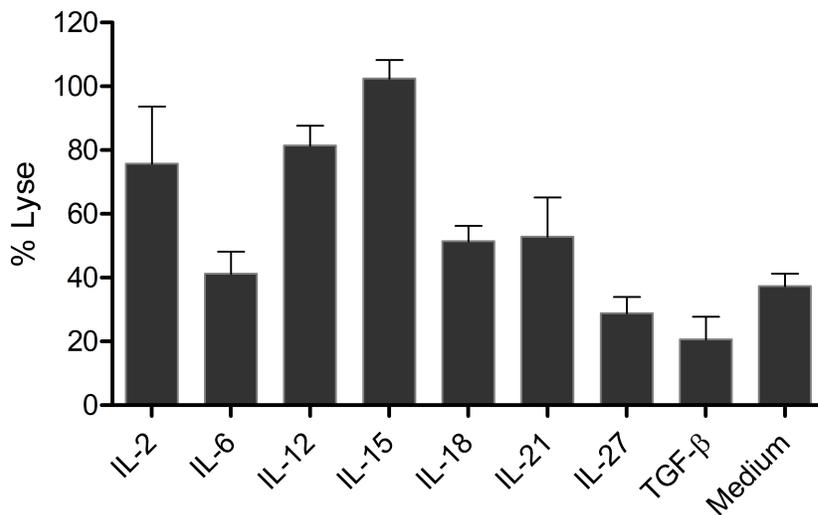


Abbildung 10: Zytotoxizität von aufgereinigten und über 24h stimulierten NK-Zellen gegenüber Jurkatzellen

Die Stimulation der NK-Zellen erfolgte mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins 24h bevor die europiumbeladenen Jurkatzellen dazu gegeben wurden, eingesetztes E:T Verhältnis 3:1, Inkubationszeit: 5h, dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis eines Experiments mit PBMCs eines Spenders, Mittelwerte (n=3) der berechneten spezifischen Lyse \pm SEM

Durch Zugabe von IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 oder IL-21 kann die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber der Jurkatzellen gesteigert werden. Dabei zeigt sich, dass eine Stimulation der NK-Zellen mit IL-15 zu einer 100%igen Lyse der Jurkatzellen führt. Im Vergleich zur Mediumkontrolle mit 40% lysierten Zellen wird dabei eine Steigerung der natürlichen Zytotoxizität um den Faktor 2,5 erhalten. In den Ansätzen mit IL-2 bzw. IL-12 stimulierten NK-Zellen sind ca. 80% lysierte Zielzellen enthalten, was im Vergleich zur Mediumkontrolle einer Verdoppelung an lysierten Zellen entspricht. Im Vergleich dazu wird durch die Stimulation der NK-Zellen mit IL-18 bzw. IL-21 nur eine geringe gesteigerte Zytotoxizität von 10% lysierten Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle induziert. Obwohl IL-27 als NK-Zellaktivierend beschrieben ist, ist nach einer Stimulation mit diesem Interleukin kein Einfluss auf die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen in diesem Versuchsansatz auszumachen. Es ist vielmehr ein immunsuppressiver Effekt durch die IL-27 Stimulation zu beobachten, was durch eine Zielzelllyse von insgesamt 29% lysierten Zellen zu zeigen ist. TGF-β wurde in diesem Versuch als Negativkontrolle mitgeführt, da es als immunsuppressiv beschrieben ist. Nach der Stimulation der NK-Zellen mit TGF-β zeigt sich, dass die NK-Zellen in ihrer natürlichen Zytotoxizität gegenüber den Jur-

katzellen gehemmt werden und im Vergleich zur Mediumkontrolle eine geringere natürliche Zytotoxizität von 21% lysierten Zellen aufweisen.

29.4 Proliferation von NK-Zellen

Als abschließende Untersuchung des Interleukinvergleichs wurden NK-Zellen aufgereinigt, drei Tage mit den jeweiligen Interleukinen stimuliert und anschließend die Proliferation mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Assays analysiert. Bei der Bindung der in dem CellTiter-Glo[®] enthaltenen Luziferase und dem von der Zelle enthaltenen ATP entsteht eine stabile Lumineszenz, die abhängig vom ATP-Gehalt zu detektieren ist. Eine Anforderung an das spätere Immunzytokin ist es, dass die Proliferation der NK-Zellen durch die Interleukinstimulation gesteigert wird, um eine Vermehrung der Immunzellen in der Tumormikroumgebung zu induzieren. In der Abbildung 11 ist der Vergleich der Stimulation mit 50ng/ml IL-2, IL-12, IL-15 und IL-21 auf die Proliferation der NK-Zellen dargestellt. Die Stimulation mit TGF- β dient als Negativkontrolle. Insgesamt wurde dieser Versuch zweimal mit unterschiedlichen Spendern durchgeführt.

Vergleich der unterschiedlichen Interleukinstimulation auf die Proliferation von aufgereinigten NK-Zellen

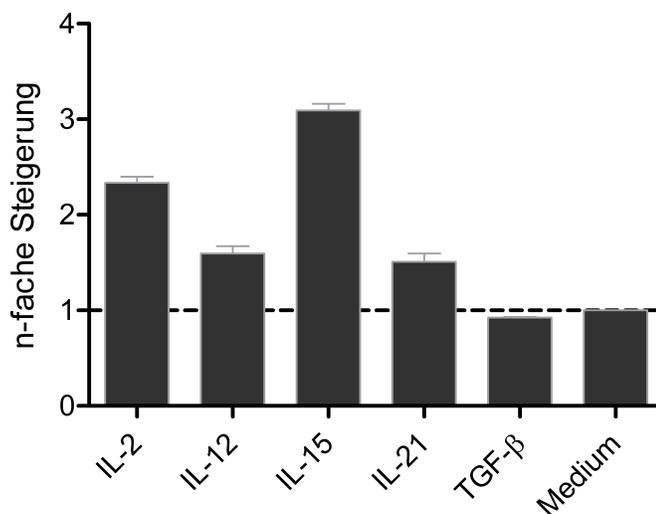


Abbildung 11: Proliferation von NK-Zellen nach dreitägiger Interleukinstimulation

Die Stimulation erfolgte mit 50ng/ml des jeweiligen Interleukins, nach 72h wurden die Überstände geerntet und mit dem CellTiter-Glo[®] Kit vermessen, dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) eines Spenders

Auf Grund der gemessenen Lumineszenzen nach der Interleukinstimulation der NK-Zellen

kann auf einen hohen ATP-Gehalt dieser Zellen und somit deren Proliferation geschlossen werden. Im Vergleich zur Mediumkontrolle und der Negativkontrolle ist die Lumineszenz in dem mit IL-2 stimulierten Ansatz doppelt so hoch und bei dem mit IL-15 stimulierten Ansatz sogar dreifach so hoch. Auch durch die Stimulation der Zellen mit IL-12 sowie IL-21 wird eine Proliferation in den NK-Zellen induziert. Dabei führt die Stimulation der NK-Zellen mit IL-12 bzw. IL-21 lediglich zu einer 1,5fachen Steigerung des Lumineszenzsignals. Demzufolge proliferieren durch die Stimulation mit IL-12 und IL-21 weniger NK-Zellen als durch IL-2 bzw. IL-15 Stimulation. Die Proliferation der NK-Zellen wird durch die TGF- β Stimulation nicht beeinflusst.

29.5 Zusammenfassung der Vorversuche

Wenn alle Ergebnisse der Vorversuche zusammengefasst betrachtet werden (Tabelle 10), werden durch die Stimulation der Immunzellen mit IL-15 die für eine Immunzytokintherapie geeignetsten Eigenschaften gemessen, da sowohl die natürliche Zytotoxizität, die Granzym B Sekretion als auch die Proliferation der NK-Zellen gesteigert wird. Zudem lässt sich die Aktivierung der NK- und T-Zellen über die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 nachweislich steigern. Im Vergleich wurden durch die Stimulation mit IL-2 ebenfalls vor allem NK-Zellen aktiviert sowie eine erhöhte Granzym B Sekretion, natürliche Zyotoxizität und Proliferation von NK-Zellen erhalten. Für IL-12 und IL-21 konnte ein geringer Einfluss auf die Aktivierung der Immunzellen, die Proliferation von NK-Zellen sowie die Granzym B Sekretion (IL-21) und natürliche Zytotoxizität (IL-12) gezeigt werden. Mit IL-18 und IL-27 wurde kein Einfluss auf die Immunzellen in den durchgeführten Experimenten festgestellt. Auf Grund der Ergebnisse wurde IL-15 schlussendlich für die Entwicklung eines Immunzytokins basierend auf dem bereits von der Firma Glycotope GmbH entwickelten, therapeutischen anti-TA-MUC1 Antikörper PankoMab-GEX® ausgewählt.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Vorversuche

	IL-2	IL-12	IL-15	IL-18	IL-21	IL-27
Aktivierung NK-Zellen	++	+	+++	-	+	-
Aktivierung T-Zellen	+	+	+++	-	+	-
Granzym B Sekretion	++	-	+++	-	++	-
Natürliche Zytotoxizität	++	++	+++	+	+	-
Proliferation NK-Zellen	++	+	+++	n.d.	+	n.d.

+++ starker Einfluss, ++ mittlerer Einfluss, + geringer Einfluss, - kein Einfluss, n.d. nicht definiert

30 Vergleich verschiedener PM-IL-15 Immunzytokine

30.1 Generierung, Produktion und Reinigung der PM-IL-15 Immunzytokine

Vor der Generierung der PM-IL-15 Immunzytokine wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt, welche dazu führte, dass Immunzytokine mit unterschiedlichen IL-15 Potenzen entwickelt werden sollten. Das PM-IL-15wt bildet dabei das Immunzytokin mit einer normalen IL-15 Potenz, da es die humane IL-15 Aminosäuresequenz enthält. Die PM-IL-15mut Variante ist das Immunzytokin mit der geringsten IL-15 Potenz. Es enthält die Mutation I67E in der IL-15 Aminosäuresequenz. Auf Grund dieser Mutation ist die Bindung an die IL-15R α -Untereinheit inhibiert. Bernard et al. konnten zeigen, dass die Mutation in der IL-15 Sequenz zu einer Proliferationsinhibierung bei NK-Zellen im Vergleich zum IL-15wt führt [125]. Die höchste Potenz soll mit dem PM-IL-15sushi erzeugt werden. Es beinhaltet zusätzlich zur IL-15wt Sequenz die Sequenz der IL-15R α sushi-Domäne. Diese Domäne verstärkt die Bindung des IL-15 an die IL-15R β/γ -Untereinheit, weshalb die Signalweiterleitung potenter ablaufen soll. Die unterschiedlichen IL-15 Varianten wurden an die C_H3 Domäne des PankoMab-GEX® über einen (G4S)₄-Linker gekoppelt und sind in Abbildung 12 dargestellt. Zusätzlich zu den ADCC-kompetenten Immunzytokinen wurden noch Fc_{ko} Immunzytokine generiert. Diese sind auf Grund der Mutation N297A am Fc-Teil nicht glykosyliert und vermitteln keinen ADCC mehr. Um den Einfluss der Antigenbindung im ADCC besser untersuchen zu können, wurden MOPC21 (*Mouse IgG1 Isotype Control*)-IL-15 Immunzytokine entwickelt, welche kein TA-MUC1 binden. Dafür wurde sowohl die IL-15wt als auch die IL-15sushi Sequenz über einen (G4S)₄-Linker an die C_H3-Domäne gekoppelt. Es wurden zudem Fc-glykosylierte als auch Fc_{ko} MOPC-Immunzytokine generiert.

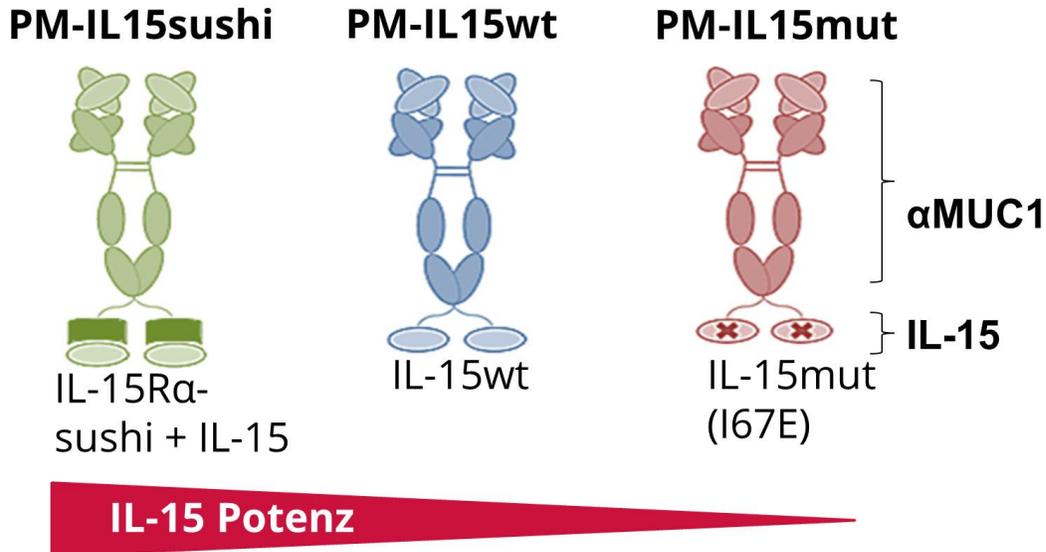


Abbildung 12: Übersicht über die Immunzytokine PM-IL-15sushi, PM-IL-15wt und PM-IL-15mut

Die Produktion wurde in 5x1L Zellkulturspinner bzw. im 5L Batch-Verfahren durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte zuerst mit einer Protein A Säule und anschließend erfolgte die Aggregatabreicherung mit Hilfe einer SEC (Kapitel 15). Die Ausbeute betrug nach der Aufreinigung inklusive Aggregatabreicherung 8,2% PM-IL-15mut, 20,8% PM-IL-15wt, 16,7% PM-IL-15sushi, 6,9% PM-IL-15mut- Fc_{ko}, 12,7% PM-IL-15wt- Fc_{ko} und 17,5% PM-IL-15sushi- Fc_{ko}. Die Werte beziehen sich hierbei auf die Ausbeute, welche nach der Protein A Aufreinigung erhalten wurden. Die beste Ausbeute wurde demnach für das PM-IL-15wt Konstrukt erhalten.

30.2 Bindungseigenschaften der PM-IL-15 Immunzytokine

30.2.1 Antigenbindung

Inwiefern die Kopplung der IL-15 Varianten an den PankoMab-GEX® Antikörper die Bindung beeinflusst, sollte zunächst in der Analyse der Bindung des Fab-Teil an TA-MUC1 positive Zellen gezeigt werden. Als TA-MUC1 positive Zelllinie wurden T47D ($1,93 \cdot 10^6$ ABC, *antigen binding capacity*) verwendet. Die Detektion der Bindung der PM-IL-15 Konstrukte erfolgt mittels Durchflusszytometrie mit einem PE-markierten Sekundärantikörper, welcher die F(ab')₂ Domäne von humanen IgG bindet. Zusätzlich zu den PM-IL-15 Immunzytokinen wurden die MOPC-IL-15 Immunzytokine untersucht. Damit sollte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den PM-IL-15 Konstrukten mit den MOPC-IL-15 Konstrukten keine Zellbindung stattfindet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 dargestellt.

Bindung der Immunzytokine an eine stark TA-MUC1 exprimierende Zelllinie T47D ($1,93 \cdot 10^6$ ABC)

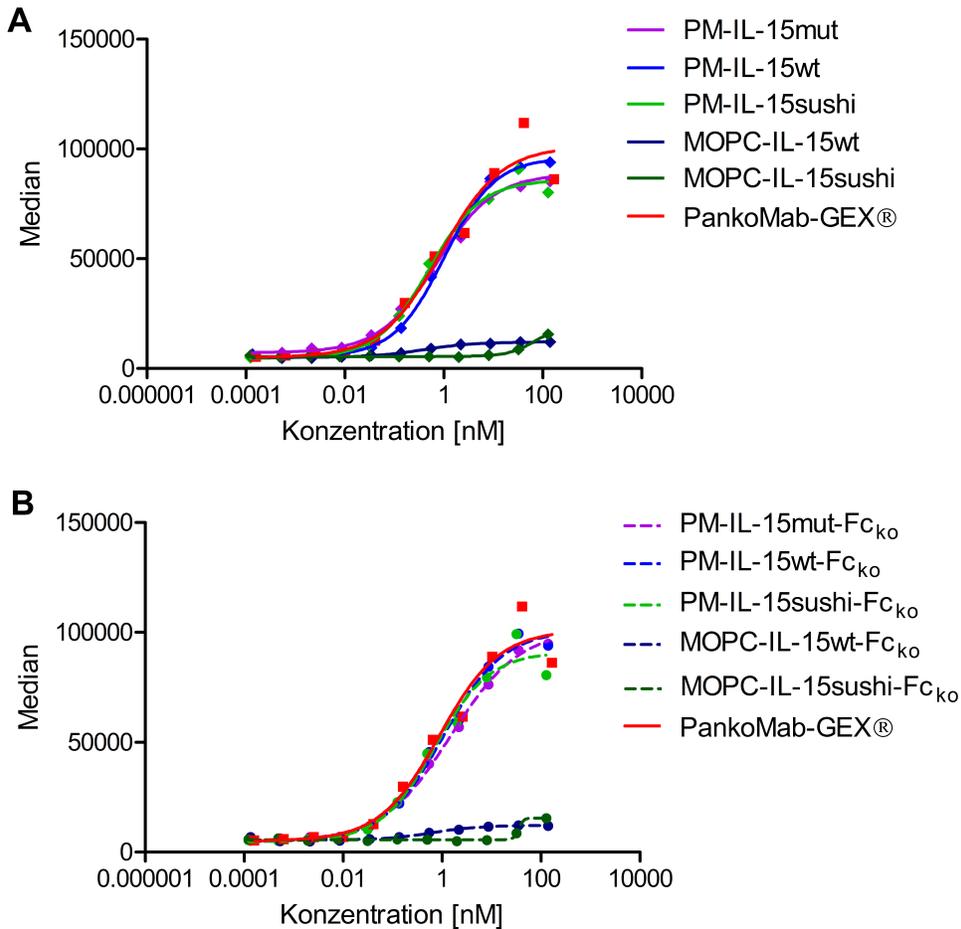


Abbildung 13: Antigenbindung der Immunzytokine an T47D

TA-MUC1 Bindungseigenschaften der Immunzytokine (A) mit funktionellem Fc-Teil und (B) ohne funktionellen Fc-Teil im Vergleich zu PankoMab-GEX® an T47D, Detektion: *F(ab')₂ goat anti human IgG(H+L)*

Anhand der Abbildung 13 wird deutlich, dass alle PM-IL-15 Konstrukte in gleichem Maße wie PankoMab-GEX® an die TA-MUC1 positive Zelllinie T47D binden. Bei Verwendung hoher Konzentrationen zeigen die MOPC-IL-15 Immunzytokine eine leichte Bindung, welche im Antigen-ELISA nochmals untersucht werden sollte und in der Abbildung 14 dargestellt ist.

Bindung der Immunzytokine an glykosyliertes MUC1

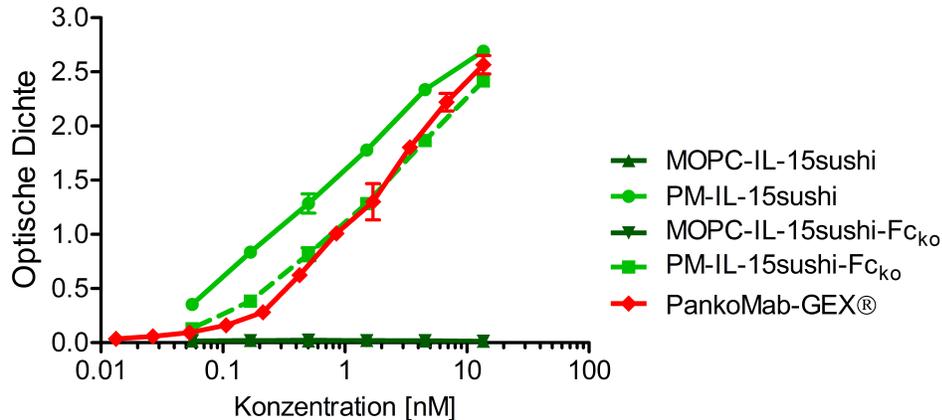


Abbildung 14: Antigenbindung von PankoMab-GEX® sowie die IL-15sushi Immunzytokine an glykosyliertes MUC1

MUC1 Bindungseigenschaften der IL-15sushi Immunzytokine im Vergleich zu PankoMab-GEX® an glykosyliertes MUC1, Detektion: *POD rabbit anti-human IgG Fc fragment specific*

Im Antigen-ELISA kann keine Bindung der MOPC-IL-15sushi Konstrukte an das glykosylierte MUC1 Peptid gezeigt werden. Somit kann bestätigt werden, dass die MOPC-IL-15 Immunzytokine kein TA-MUC1 binden. Zudem kann in diesem ELISA gezeigt werden, dass die PM-IL-15sushi Immunzytokine vergleichbar zum PankoMab-GEX® binden. Die etwas affinere Bindung des PM-IL-15sushi kann durch den höheren Aggregatgehalt erklärt werden, welcher grundsätzlich zu einer stärkeren Bindung führt.

30.2.2 FcγRIIIaV-Bindung

Die Bindung an den FcγRIIIaV, welcher hauptsächlich auf NK-Zellen, aber auch auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, ist entscheidend für die Vermittlung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität. Um zu zeigen, dass die Bindung bei den Fc_{ko} Konstrukten nicht mehr stattfindet, wurde ein AlphaLISA durchgeführt. Da alle Konstrukte auf demselben *Backbone* basieren, wurde der AlphaLISA lediglich mit den Konstrukten PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{ko} durchgeführt. In der Abbildung 15 sind die Ergebnisse des AlphaLISA zu sehen.

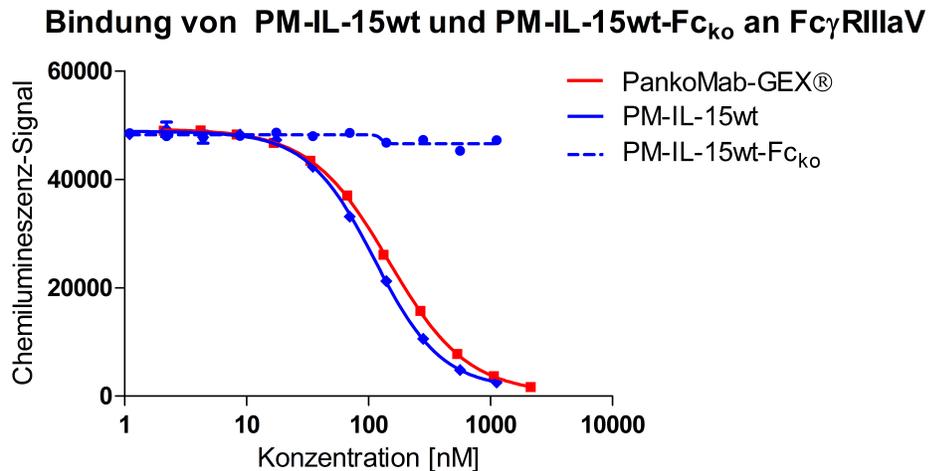
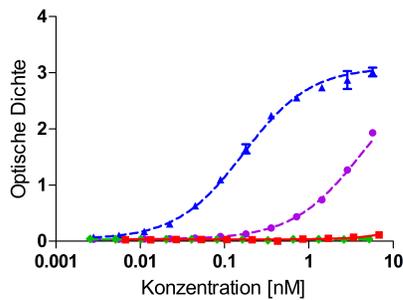
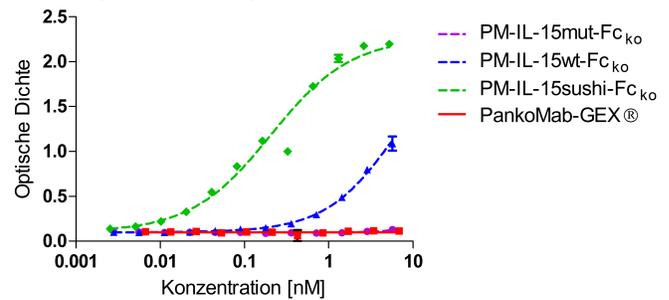


Abbildung 15: FcγRIIIaV-Bindung von PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{ko}
FcγRIIIaV Bindungseigenschaften von PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{ko} im Vergleich zu PankoMab-GEX®,
Detektion: Emission der Akzeptorbeads (AlphaScreen™ Plattform, Perkin Elmer)

Die Bindung an den FcγRIIIaV erfolgt nur bei der Verwendung des PankoMab-GEX® und des PM-IL-15wt Konstrukts. Demzufolge kann für die Konstrukte mit Fc-Glykosylierung die Bindung an den Rezeptor nachgewiesen werden. Dabei bindet das PM-IL-15wt Konstrukt potenter an den FcγRIIIaV als PankoMab-GEX®. Bei der Betrachtung des PM-IL-15wt-Fc_{ko} Konstrukts ist keine Bindung an den FcγRIIIaV zu erkennen.

30.2.3 IL-15 Rezeptorbindung

Der IL-15 Rezeptor setzt sich aus drei Untereinheiten, der α-, β- und γ-Untereinheit, zusammen. Deshalb erfolgt die Untersuchung der Bindung an den IL-15 Rezeptor mit Hilfe eines ELISA, bei welchem jeweils die Bindung an eine Untereinheit ermittelt werden kann. Wichtig für die Signalweiterleitung ist die Bindung an die IL-15Rβ/γ-Untereinheit. In dieser Arbeit wurde die Bindung der Immunzytokine an die α- und β-Rezeptoruntereinheit untersucht. Die Ergebnisse des ELISA sind in der Abbildung 16 dargestellt.

A Bindung der Immunzytokine an den IL-15R α **B Bindung der Immunzytokine an den IL-15R β** **Abbildung 16: Bindung der Fc_{ko}-Immunzytokine an den IL-15R α bzw. IL-15R β**

Bindungseigenschaften von PM-IL-15mut-Fc_{ko}, PM-IL-15wt-Fc_{ko} und PM-IL-15sushi-Fc_{ko} im Vergleich zu PankoMab-GEX®, Detektion: POD *rabbit anti-human IgG F(ab')₂ fragment specific*

IL-15R α wird lediglich von PM-IL-15wt-Fc_{ko} und PM-IL-15mut-Fc_{ko} gebunden, wobei PM-IL-15wt-Fc_{ko} potenter an die α -Unterheit bindet. Für PM-IL-15sushi-Fc_{ko} findet keine Bindung an die α -Unterheit statt. Bei der Betrachtung der Bindung an die β -Unterheit wird ersichtlich, dass PM-IL-15sushi-Fc_{ko} hingegen diese Rezeptorunterheit sehr potent bindet. Auch PM-IL-15wt-Fc_{ko} bindet die β -Unterheit, jedoch weniger affin als PM-IL-15sushi-Fc_{ko}. Bei dem PM-IL-15mut-Fc_{ko} ist selbst bei der höchsten getesteten Konzentration von 5,7nM keine Bindung an die β -Unterheit zu erkennen. Wie zu erwarten war, bindet PankoMab-GEX® keine der untersuchten IL-15 Rezeptoruntereinheiten.

30.3 Aktivierung der Immunzellpopulationen

Für die Analyse der Aktivierung der einzelnen Immunzellpopulationen (NK-, NKT-, CD4⁺ T-, CD8⁺ T-Zellen) wurden PBMCs aus Frischblut aufgereinigt, mit den jeweiligen PM-IL-15 Konstrukten stimuliert und nach 5 Tagen Inkubation im Brutschrank auf die CD25 und CD69 Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dieser Versuch wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Exemplarisch wird daraus das Ergebnis für einen Spender in Abbildung 17 dargestellt.

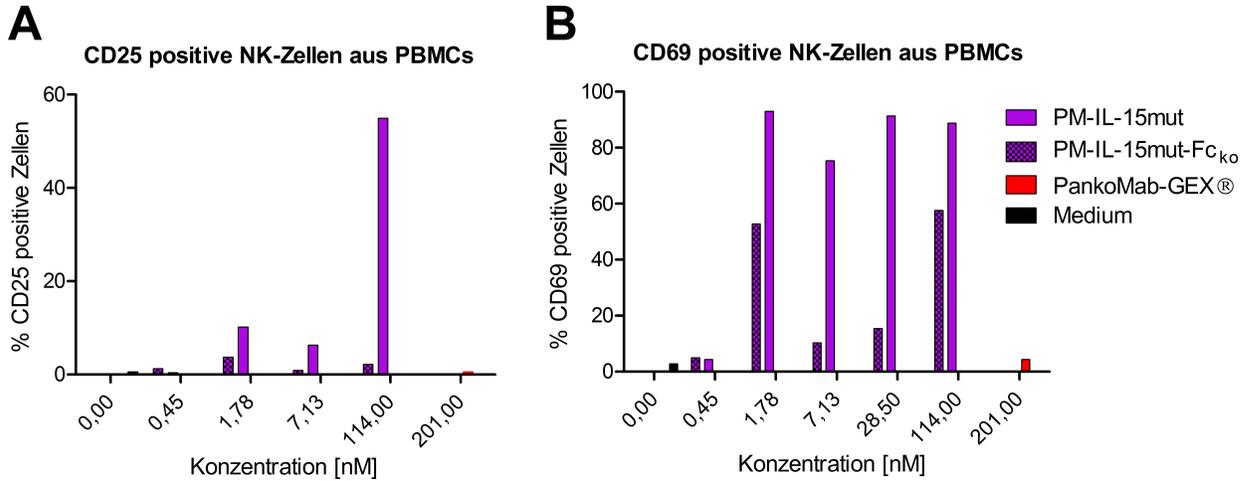


Abbildung 17: Expression von CD25 und CD69 auf NK-Zellen nach Stimulation mit PM-IL-15mut bzw. PM-IL-15mut-Fc_{ko}

Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15mut bzw. PM-IL-15mut-Fc_{ko} über 5 Tage, Startkonzentration 114nM 1:3 Verdünnung, Konzentration PankoMab-GEX® 201nM, (A) CD25 und (B) CD69 Expression auf NK-Zellen aus PBMCs, dargestellt sind Einzelmessungen

Bei der Aktivierung der Immunzellen durch die Inkubation mit den PM-IL-15mut und PM-IL-15mut-Fc_{ko} wird deutlich, dass lediglich die NK-Zellen aktiviert werden, weshalb die T-Zellen in dieser Übersicht nicht dargestellt wurden. Ein Einfluss auf die Aktivierung der NK-Zellen zeigt sich erst ab einer Konzentration von 28,5nM (CD25) Expression bzw. 1nM (CD69). Im Vergleich dazu wird CD69 bei der Stimulation von PM-IL-15sushi bereits ab einer Konzentration von unter 0,01nM und bei der Stimulation von PM-IL-15wt ab einer Konzentration von 0,03nM eine Hochregulation von CD69 auf NK-Zellen erreicht, was eine bis zu ca. 100fach höhere Potenz dieser Konstrukte im Vergleich zum PM-IL-15mut Konstrukt darstellt (Abbildung 18).

In dem folgenden Experiment, welches in der Abbildung 18 dargestellt ist, wurden die PM-IL-15sushi und PM-IL-15wt Konstrukte mit und ohne funktionellem Fc-Teil dahingehend verglichen, ob sie eine CD25 Expression induzieren.

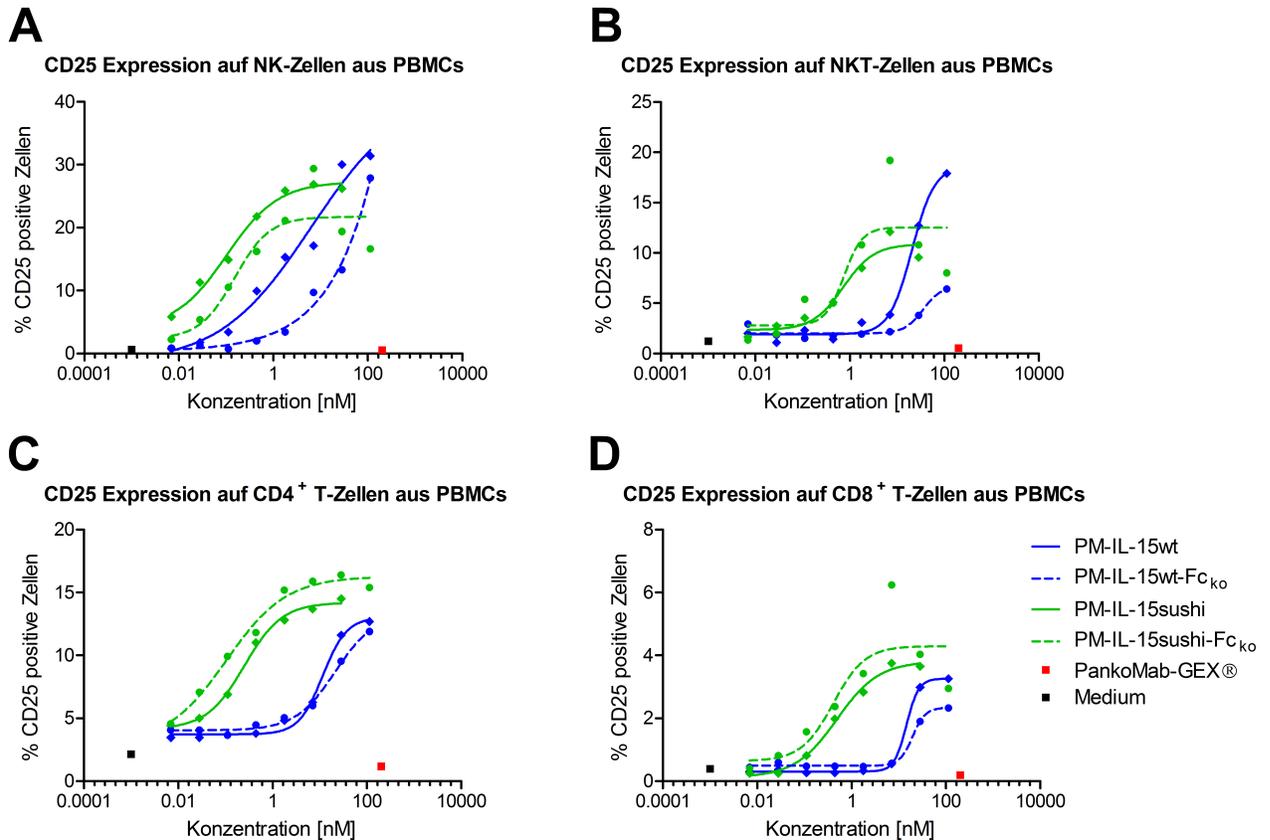


Abbildung 18: Expression von CD25 auf NK-, NKT-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt-Fc_{KO}/sushi-Fc_{KO}. Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt/sushi-Fc_{KO} über 5 Tage, Startkonzentration 114nM 1:3 Verdünnung, Konzentration PankoMab-GEX® 201nM, CD25 Expression auf (A) NK-, (B) NKT-, (C) CD4⁺ und (D) CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs, dargestellt sind Einzelmessungen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der CD25 Expression nach 5 Tagen Stimulation mit den jeweiligen PM-IL-15 Konstrukten wird deutlich, dass CD25 vor allem auf NK-, NKT- und CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der jeweiligen PM-IL-15 Immunitokinkonzentration hochreguliert wird. Der Einfluss der Fc-glykosylierten im Vergleich zu den Fc_{KO} Immunitokinen wird vor allem bei den NK-Zellen ersichtlich. Bereits bei einer Konzentration von 0,007nM PM-IL-15sushi ist eine starke Hochregulation von CD25 zu detektieren, während für denselben Effekt eine Konzentration von 0,028nM PM-IL-15sushi-Fc_{KO} benötigt wird. Dieser Effekt ist auch bei der Betrachtung der PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{KO} zu beobachten. Das PM-IL-15sushi Konstrukt wirkt am potentesten auf die NK-Zellaktivierung gefolgt vom PM-IL-15sushi-Fc_{KO}, PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{KO} Immunitokine. Die PM-IL-15sushi und PM-IL-15sushi-Fc_{KO} Immunitokine induzieren bei NKT-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die stärkste Aktivierung gefolgt von den PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{KO} Immunitokinen. In der Abbil-

Abbildung 19 sind die Ergebnisse der CD69 Expression nach Stimulation mit PM-IL-15 Immunzytokinen auf den verschiedenen Immunzellpopulationen dargestellt.

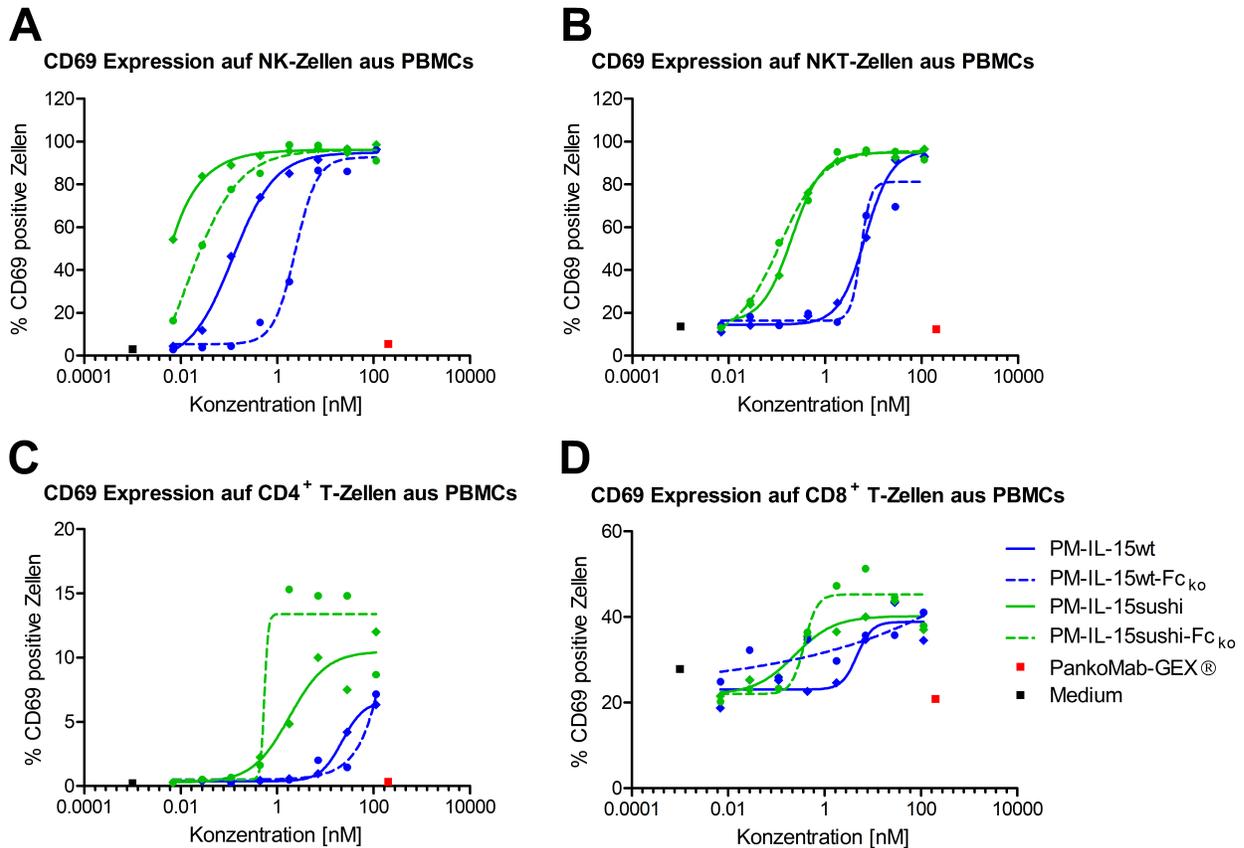


Abbildung 19: Expression von CD69 auf NK-, NKT-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt/sushi-Fc_{ko}

Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt/sushi-Fc_{ko} über 5 Tage, Startkonzentration 114nM 1:3 Verdünnung, Konzentration PankoMab-GEX® 201nM, CD69 Expression auf (A) NK-, (B) NKT-, (C) CD4⁺ und (D) CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs, dargestellt sind Einzelmessungen

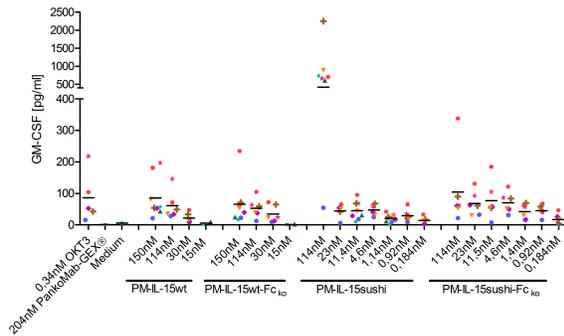
Das Ergebnis der CD69 Expression spiegelt das Ergebnis der CD25 Expression wider. Die Aktivierung der NK-Zellen durch das PM-IL-15sushi Immunzytokin ist sehr potent und induziert schon bei geringen Konzentrationen eine starke Hochregulation von CD69. Der Einfluss des Fc-Teils auf die NK-Zellen wird bei der CD69 Expression noch deutlicher erkennbar als bei der CD25 Expression. Die höhere Potenz der Fc-glykosylierten Variante im Vergleich zur Fc_{ko}-Variante ist sowohl bei der Betrachtung der PM-IL-15sushi als auch der PM-IL-15wt Immunzytokine zu erkennen. Bei der Betrachtung der NKT-Zellen zeigt sich, dass die Stimulation dieser Zellpopulationen bereits bei geringen Konzentrationen von 0,1nM PM-IL-15sushi bzw. PM-IL-15sushi-Fc_{ko} zu einer verstärkten CD69 Expression führt. Im Vergleich dazu wer-

den für dieselbe Aktivierung mit den PM-IL-15wt bzw. PM-IL-15wt- Fc_{ko} Konstrukten 7,1nM benötigt. Auch auf die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wirkt die Stimulation mit PM-IL-15sushi bzw. PM-IL-15sushi- Fc_{ko} potenter als die Stimulation mit PM-IL-15wt bzw. PM-IL-15wt- Fc_{ko}.

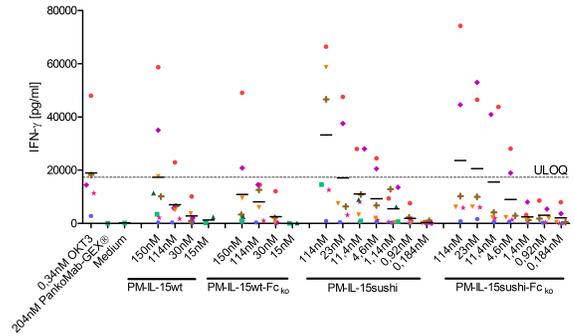
30.4 Zytokinprofil der PM-IL-15 Antikörper

Anhand der Zytokinausschüttung von stimulierten PBMCs kann ein Rückschluss auf die Verträglichkeit der Immunzytokine gezogen werden. Eine hohe Zytokinausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt zwar zu einer erweiterten Immunzellstimulation, jedoch kann diese zu einem Zytokinsturm im Patienten führen, der schwerwiegende Nebenwirkungen für den Patienten bedeuten kann. Deshalb ist es von Interesse, die Zytokinausschüttung im Vergleich zu bereits in Klinik bekannten Therapeutika zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde der OKT3 Antikörper mitgeführt, der T-Zellen stimuliert. Die Behandlung mit OKT3 führte zu einer starken Zytokinausschüttung in den Patienten. In der Abbildung 20 ist die Analyse der gemessenen Zytokine von acht Spendern dargestellt.

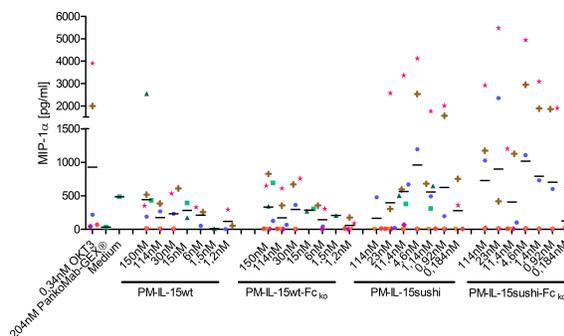
A GM-CSF



B IFN- γ



C MIP-1 α



D TNF- α

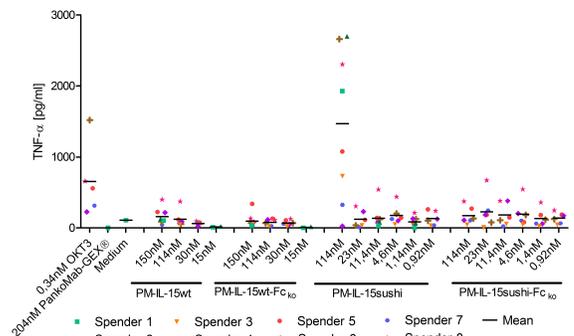


Abbildung 20: Zytokinausschüttung von PBMCs nach PM-IL-15 Stimulation

Inkubation der PBMCs über 72h, Vermessung der Zytokine (A) GM-CSF, (B) IFN- γ , (C) MIP-1 α und (D) TNF- α aus den Überständen mit MSD UPLEX Platten (ULOQ - *upper limit of quantitation*)

Anhand der gemessenen Zytokinausschüttung zeigt sich, dass vor allem die Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15sushi zu einer erhöhten Sekretion von GM-CSF, IFN- γ , MIP-1 α und TNF- α führt. Die Stimulation der PBMCs mit den verschiedenen PM-IL-15 Immunzytokinen resultiert in einer hohen IFN- γ Ausschüttung, wobei bei Verwendung hoher Konzentrationen der Immunzytokine IFN- γ Konzentrationen über dem oberen Detektionslimit gemessen wurden. Für GM-CSF, MIP-1 α und TNF- α wurde das obere Detektionslimit nicht überschritten. Bei Betrachtung aller Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Stimulation mit den Fc_{ko}-Varianten zu einer etwas geringeren Zytokinausschüttung führt im Vergleich zu den dazu gehörigen Immunzytokinen mit funktionellem Fc-Teil. Dies wird vor allem bei der Betrachtung der Zytokinausschüttung von GM-CSF und TNF- α nach PM-IL-15 bzw. PM-IL-15sushi-Fc_{ko} Stimulation ersichtlich. Wenn 114nM des jeweiligen Immunzytokins eingesetzt werden, werden im Mittel GM-CSF Konzentrationen von 45pg/ml (PM-IL-15wt), 40pg/ml (PM-IL-15wt-Fc_{ko}), 741pg/ml (PM-IL-15sushi) und 78pg/ml (PM-IL-15sushi-Fc_{ko}) sekretiert. Die Konzentrationen von sekretiertem TNF- α betragen bei Stimulation mit 114nM im Mittel 93pg/ml (PM-IL-15wt), 60pg/ml

(PM-IL-15wt-Fc_{ko}), 1.469pg/ml (PM-IL-15sushi) und 130pg/ml (PM-IL-15sushi-Fc_{ko}). Bei Betrachtung der IFN- γ Konzentration wurden nach der Stimulation mit 114nM folgende Konzentrationen im Mittel analysiert: 5.301pg/ml (PM-IL-15wt), 6.141pg/ml (PM-IL-15wt-Fc_{ko}), 33.300pg/ml (PM-IL-15sushi) und 17.743pg/ml (PM-IL-15sushi-Fc_{ko}). Die MIP-1 α Konzentrationen betragen nach der Stimulation mit 114nM im Mittel 118pg/ml (PM-IL-15wt), 117pg/ml (PM-IL-15wt-Fc_{ko}), 55pg/ml (PM-IL-15sushi) und 573pg/ml (PM-IL-15sushi-Fc_{ko}), wobei das Maximum der MIP-1 α Sekretion nach Stimulation mit PM-IL-15sushi bereits bei einer Konzentration von 4,6nM (874pg/ml) erreicht wurde. Im Vergleich zu OKT3 zeigt sich, dass die Stimulation mit PM-IL-15sushi zu einer höheren Zytokinausschüttung führt als die Stimulation mit OKT3. Dabei muss berücksichtigt werden, dass OKT3 mit einer viel geringeren Konzentration von 0,34nM eingesetzt wurde. Im direkten Vergleich ist OKT3 bei der Betrachtung der Zytokindaten bei Verwendung der geringen Konzentration viel potenter in der Induktion der Zytokinausschüttung als die PM-IL-15 Immunzytokine.

30.5 Natürliche Zytotoxizität

Der Einfluss der Immunzytokine auf die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen kann mit europiumbeladenen Jurkatzellen, welche TA-MUC1 negativ sind, untersucht werden. Die Abbildung 21 zeigt die Lyse der Jurkatzellen nach 5h Inkubation mit den PBMCs sowie den PM-IL-15 Immunzytokinen.

Vergleich der Immunzytokine hinsichtlich ihrer Potenz Zytotoxizität gegenüber Jurkatzellen zu induzieren

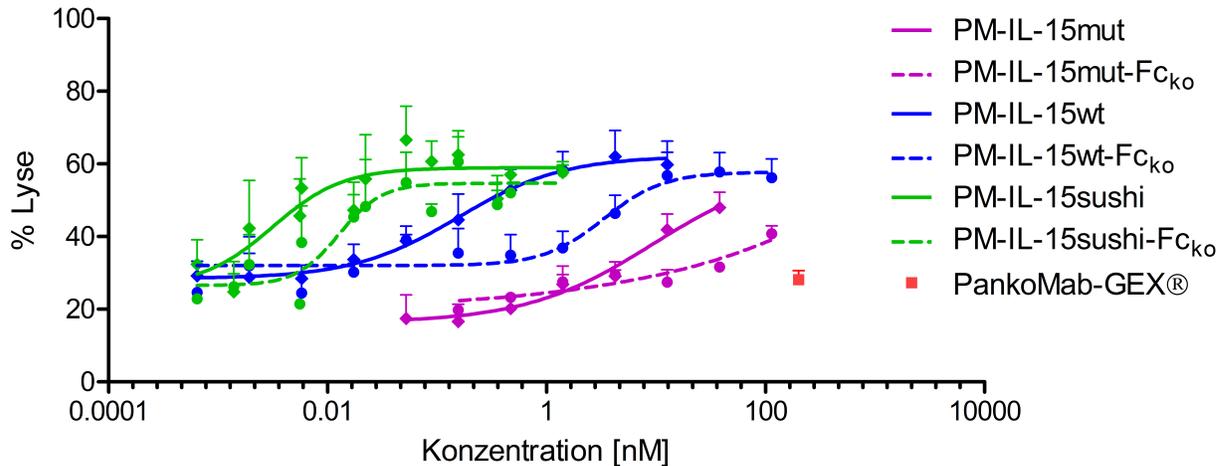


Abbildung 21: Induktion der natürlichen Zytotoxizität von NK-Zellen durch PM-IL-15 Immunzytokine

Die Stimulation der PBMCs erfolgte mit unterschiedlichen Startkonzentrationen für die jeweiligen Konstrukte, E:T Verhältnis 80:1, Inkubationszeit: 5h, dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der spezifischen Lyse + SEM eines Spenders

Die Stimulation der NK-Zellen mit den jeweiligen Immunzytokinen resultiert in einer gesteigerten natürlichen Zytotoxizität. Dabei induzieren die Immunzytokine eine Zielzelllyse entsprechend der IL-15 Potenzen: IL-15sushi > IL-15wt > IL-15mut. Bereits in geringen Konzentrationen des PM-IL-15sushi Konstrukts von 0,006nM wird eine Zielzelllyse induziert, wogegen mit dem PM-IL-15wt Konstrukt eine Konzentration von 0,16nM und mit PM-IL-15mut 12,7nM benötigt wird, um vergleichbare Zielzelllysen zu induzieren. Zudem ist zu beobachten, dass die Fc_{ko}-Varianten im Vergleich zu den Fc-glykosylierten eine geringere Zielzelllyse induzieren. Die zusätzliche Stimulation über den FcγRIII resultiert demzufolge in einer stärkeren Aktivierung der Zytotoxizität der NK-Zellen.

30.6 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

30.6.1 Einfluss der Fc-Glykosylierung auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Der Einfluss der Immunzytokine auf die Effektorfunktionen der NK-Zellen wurde zusätzlich im ADCC-Versuch untersucht. Der Versuch wurde mit zwei Zelllinien durchgeführt, welche eine hohe (T47D; $1,93 \cdot 10^6$ ABC) und niedrige (Ovar-3; $7,68 \cdot 10^4$ ABC) TA-MUC1 Expres-

sion zeigen. Der Versuch wurde mit den T47D Zellen fünfmal und mit den Ovar-3 Zellen dreimal mit jeweils unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Exemplarisch wird lediglich eine Abbildung aus den durchgeführten Versuchen gezeigt. In Abbildung 22 ist das Ergebnis des ADCC-Versuchs mit den T47D als Zielzelllinie dargestellt.

Vergleich von Immunzytokinen im Europium-ADCC bei Verwendung einer stark TA-MUC1 exprimierenden Zelllinie T47D ($1,93 \cdot 10^6$ ABC)

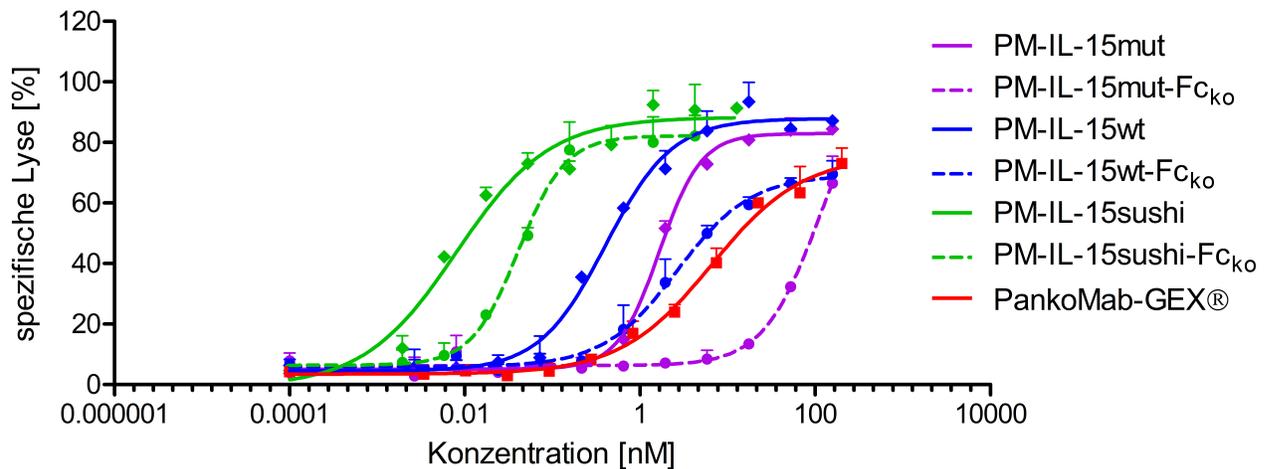


Abbildung 22: Europium-ADCC mit PBMCs gegen T47D durch PM-IL-15 Immunzytokine
Europium-ADCC zum Vergleich der unterschiedlichen Immunzytokine gegen T47D, E:T Verhältnis von 80:1, Inkubationszeit: 5h, Startkonzentration 114nM (Immunzytokine) und 201nM (PankoMab-GEX®) 1:3 Verdünnung, dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der berechneten spezifischen Lyse + SEM eines Spenders

Die Zielzellyse der T47D Zelllinie ist bei allen verwendeten PM-IL-15 Immunzytokinen konzentrationsabhängig. Im Vergleich aller PM-IL-15 Konstrukte zeigt das PM-IL-15sushi Immunzytokin schon in sehr geringen Konzentrationen von 0,002nM eine potente Induktion der Zielzellyse durch die NK-Zellen. Weniger potent im Vergleich zu dem PM-IL-15sushi Immunzytokin ist das PM-IL-15wt Konstrukt, bei dem ab einer Konzentration von 0,22nM eine Zielzellyse zu detektieren war. Wie zu erwarten war, ist das PM-IL-15mut Immunzytokin im Vergleich zu den anderen PM-IL-15 Immunzytokinen das Konstrukt mit der geringsten Induktion der Zielzellyse durch die NK-Zellen. Einen Einfluss auf die Zielzellyse zeigt sich bei diesem Konstrukt ab einer Konzentration von 0,83nM. Diese unterschiedliche Potenzen der PM-IL-15 Immunzytokine werden auch anhand der berechneten mittleren effektiven Konzentrationen (EC50) ersichtlich, welche für das PM-IL-15sushi Konstrukt 0,006nM, PM-IL-15wt 0,617nM und PM-IL-15mut 3,196nM betragen. Damit liegen die EC50 Werte der Immunzytokine alle deutlich unter dem EC50 des PankoMab-GEX® von 6nM. Obwohl die Fc_{ko}-Konstrukte keine Bindung an den FcγRIII der NK-Zellen vermitteln, induzieren sie eine Lyse

der T47D Zellen. Im Vergleich zu den Konstrukten mit funktionellem Fc-Teil führt die Inkubation mit den Fc_{ko}-Konstrukten jedoch zu einer geringeren Zytotoxizität, was sich anhand der EC50 Werte von 0,032nM (PM-IL-15sushi-Fc_{ko}), 3,311nM (PM-IL-15wt-Fc_{ko}) und 64,880nM (PM-IL-15mut-Fc_{ko}) widerspiegelt. Die folgende Abbildung 23 zeigt den ADCC-Versuch mit den Ovar-3 als Zielzelllinie.

Vergleich von Immunzytokinen im Europium-ADCC bei Verwendung einer schwach TA-MUC1 exprimierenden Zelllinie Ovar-3 ($7,68 \cdot 10^4$ ABC)

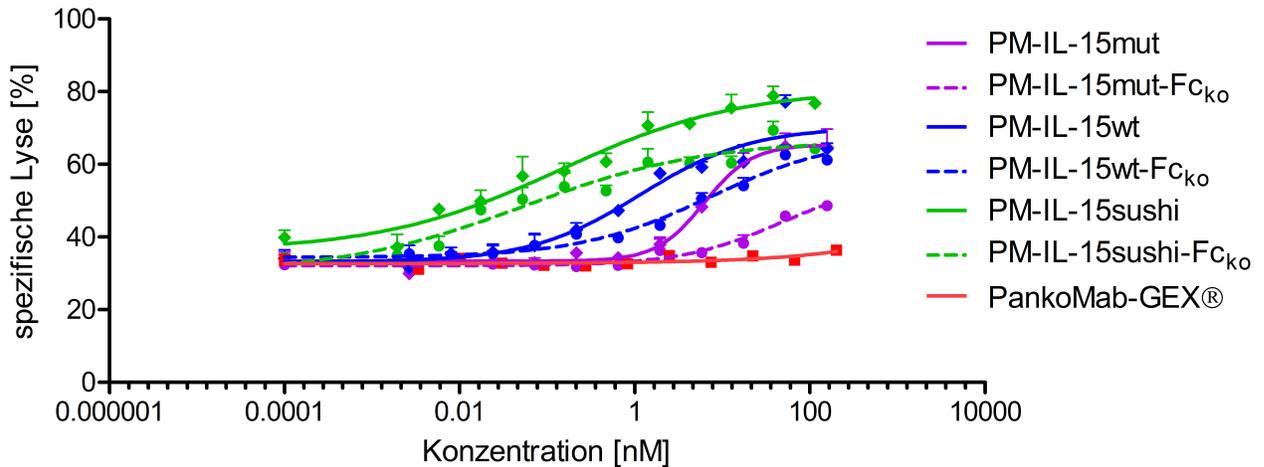


Abbildung 23: Europium-ADCC mit PBMCs gegen Ovar-3 durch PM-IL-15 Immunzytokine. Europium-ADCC zum Vergleich der unterschiedlichen Immunzytokine gegen eine schwach TA-MUC1 exprimierende Zielzelle mit einem verwendeten E:T Verhältnis von 80:1, Inkubationszeit: 5h, Startkonzentration 114nM (Immunzytokine) und 201nM (PankoMab-GEX®) 1:3 Verdünnung, dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der berechneten spezifischen Lyse + SEM eines Spenders

Auch bei der Verwendung der gering TA-MUC1 exprimierenden Zelllinie Ovar-3 können mit den Immunzytokinen Zelllysen induziert werden, während PankoMab-GEX® keine Zelllyse induziert. Die EC50 beträgt für PM-IL-15sushi 0,081nM, PM-IL-15wt 1,021nM und PM-IL-15mut 6,671nM. Beim Vergleich zu dem Versuch mit den T47D als Zielzellen verschiebt sich die EC50 hin zu höheren Konzentrationen. Des Weiteren sind die Maximallysen bei der Verwendung der Ovar-3 Zellen geringer. Das PM-IL-15sushi Konstrukt induziert bei der Verwendung einer niedrig TA-MUC1 exprimierenden Zelllinie, wie bereits in dem Versuch mit der TA-MUC1 hochexprimierenden T47D Zelllinie gezeigt wurde, am potentesten die Zielzelllyse durch die NK-Zellen gefolgt von dem PM-IL-15wt sowie dem PM-IL-15mut Konstrukt. Bei der Betrachtung der Fc_{ko}-Konstrukte zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis zu dem Versuch mit den T47D als Zielzelllinie. Die berechneten EC50 der Fc_{ko}-Konstrukte betragen 0,100nM für PM-IL-15sushi-Fc_{ko}, 16,750nM PM-IL-15wt-Fc_{ko} und 22,640nM für PM-IL-15mut-Fc_{ko}. Dem-

zufolge sind die Fc_{ko} -Konstrukte weniger potent im Vergleich zu den jeweiligen Konstrukten mit funktionellem Fc-Teil.

30.6.2 Einfluss der Antigenbindung auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Um den Einfluss der Antigenbindung im ADCC zu untersuchen, wurden die antigenunspezifischen MOPC-IL-15 mit den PM-IL-15 Konstrukte verglichen. Im Vergleich der PM-IL-15 und MOPC-IL-15 Antikörper kann überprüft werden, wie wichtig die Antigenbindung an TA-MUC1 für die Aktivierung der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber der Tumorzellen ist. Insgesamt wurde dieser Versuch dreimal mit verschiedenen Spendern durchgeführt. In Abbildung 24 ist das Ergebnis der Analyse eines Spenders dargestellt.

Vergleich der PM-IL-15- Fc_{ko} Konstrukte mit MOPC-IL-15- Fc_{ko} zur Überprüfung der antigenabhängigen spezifischen Lyse

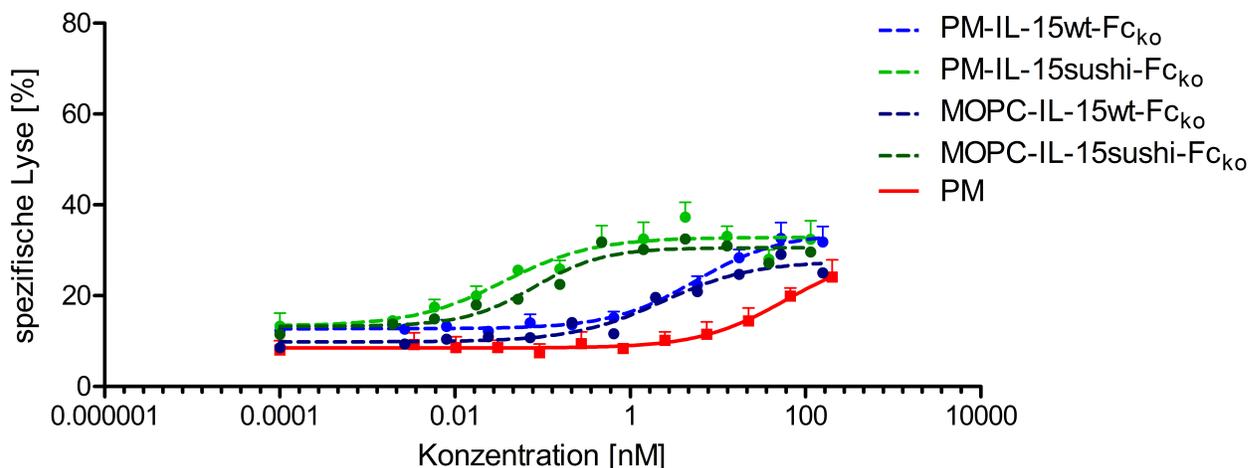


Abbildung 24: Europium-ADCC mit PBMCs gegen Ovar-3 durch PM-IL-15 und MOPC-IL-15 Immunzytokine

Europium-ADCC zur Ermittlung der Antigenabhängigkeit der Immunzytokine gegen Ovar-3, E:T Verhältnis von 80:1, Inkubationszeit: 5h, Startkonzentration 114nM (Immunzytokine) und 201nM (PankoMab-GEX®) 1:3 Verdünnung, dargestellt sind (A) die PM-IL-15 und MOPC-IL-15 mit funktionellem Fc-Teil und (B) Fc_{ko} -Varianten der PM-IL-15 und MOPC-IL-15 Immunzytokine, Mittelwerte (n=3) der berechneten spezifischen Lyse + SEM eines Spenders

Der Einfluss der Antigenbindung auf die Zytotoxizität der NK-Zellen wird anhand der höheren maximalen Zielzelllysen bei Verwendung der PM-IL-15 Konstrukte mit funktionellem Fc-Teil von bis zu 66% Lyse im Vergleich zu einer Maximallyse von 30% (MOPC-IL-15sushi) deutlich. Die MOPC-IL-15 Konstrukte induzieren lediglich natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen

gegenüber den Zielzellen, während auf Grund der Antigenbindung der PM-IL-15 Konstrukte zusätzlich ADCC vermittelt werden kann. Die unterschiedlichen Potenzen der IL-15wt und IL-15sushi Konstrukte ist dabei sowohl bei den MOPC-IL-15 als auch den PM-IL-15 Konstrukten zu erkennen. Immunzytokine mit der IL-15sushi Variante zeigen schon in sehr geringen Konzentration von 0,017nM MOPC-IL-15sushi bzw. PM-IL-15sushi eine Zielzelllyse. Im Vergleich dazu werden durch die IL-15wt Immunzytokine höhere Konzentrationen von 0,216nM MOPC-IL-15wt bzw. PM-IL-15wt für vergleichbare Zielzelllysen benötigt. Ein Einfluss des Fc-Teils ist sowohl bei den PM-IL-15 als auch MOPC-IL-15 Konstrukten zu erkennen. Die Effektorfunktion der NK-Zellen wird durch den funktionellen Fc-Teil zusätzlich gesteigert. Die Antigenbindung der PM-IL-15 Antikörper ist entscheidend für die Zielzelllyse im ADCC-Versuch bei der Verwendung von Konstrukten mit funktionellem Fc-Teil.

30.6.3 Betrachtung der Effektorfunktion im Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch

Des Weiteren erfolgte die Analyse der Effektorfunktion der Immunzellen mit einem Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch. Im Vergleich zum Europium-ADCC Ansatz werden dabei nicht die Zielzellen beladen, sondern es wird die freigesetzte Lactatdehydrogenase (LDH) im Überstand gemessen. LDH wird von allen apoptotischen Zellen sekretiert. Durch die Messung des freigesetzten LDH ist es möglich die Zytotoxizität über 24h zu betrachten. Der Versuchsansatz wurde mit fünf Zelllinien und sechs unterschiedlichen PBMC-Spendern durchgeführt. Exemplarisch wird nur ein Versuch mit MCF-7 Zielzellen ($8,41 \cdot 10^4$ ABC) in der Abbildung 25 dargestellt.

Vergleich der PM-IL-15 Immunzytokine im Langzeit-Zytotoxizitäts-Assay über 24h

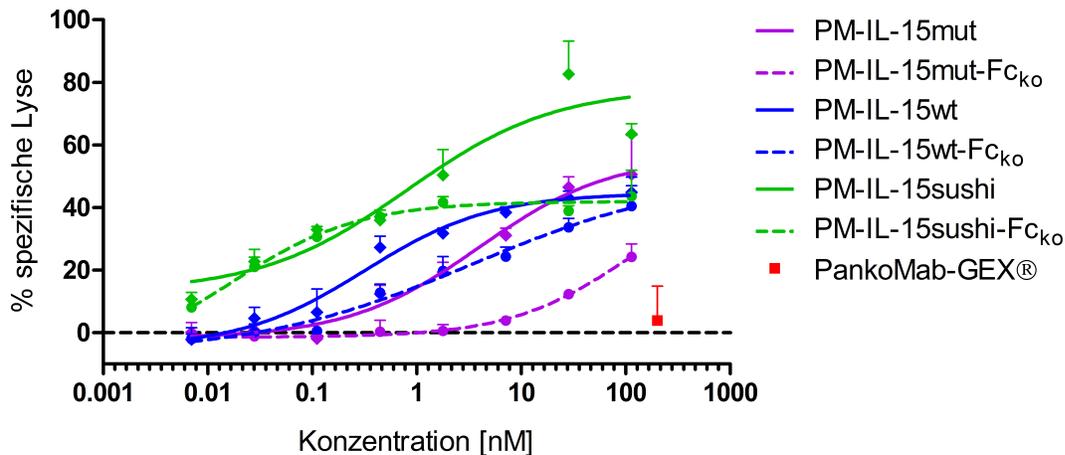


Abbildung 25: Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch mit PBMCs gegen MCF-7 durch PM-IL-15 Immunzytokine

Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch zur Ermittlung der Effektorfunktion von Immunzellen über einen Zeitraum von 24h, verwendetes E:T Verhältnis von 10:1, Inkubationszeit: 24h, Startkonzentration 114nM (Immunzytokine) 1:3 Verdünnung, PankoMab-GEX® Konzentration 201nM, dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der berechneten spezifischen Lyse + SEM eines Spenders

Auf Grund des geringen E:T Verhältnis von 10:1 wird bei der Verwendung des PankoMab-GEX® Antikörpers keine Zytotoxizität vermittelt. Im LDH-Zytotoxizitäts-Versuch wird der Einfluss des funktionellen Fc-Teils auf die Effektorfunktion der Immunzellen bei Verwendung der PM-IL-15 Konstrukte erneut herausgestellt. Während die NK-Zellen mit den Fc_{ko}-Varianten keinen ADCC vermitteln, sondern durch die gesteigerte natürliche Zellzytotoxizität bis zu 44% (PM-IL-15sushi-Fc_{ko}, PM-IL-15wt-Fc_{ko}) der Zielzellen in Apoptose bringen, werden bei der Verwendung der PM-IL-15 Konstrukte mit funktionellem Fc-Teil Zielzelllysen von bis zu 80% induziert (PM-IL-15sushi). Das bedeutet, dass sich die Maximallyse auch in diesem Experiment aus der natürlichen Zytotoxizität und der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität zusammensetzt. Dies zeigt den wichtigen Effekt, dass die PM-IL-15 Immunzytokine zu einer deutlichen Verbesserung des ADCC-Effektes im Vergleich zu PankoMab-GEX® führen, welcher in diesem Versuchsansatz keine Zielzelllyse vermittelt. In diesem Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch wird zudem bestätigt, dass das PM-IL-15sushi Konstrukt im Vergleich zu den PM-IL-15wt und PM-IL-15mut Konstrukten am stärksten Zielzelllyse induziert.

30.7 Proliferation der unterschiedlichen Immunzellpopulationen

Die Untersuchung der Proliferation der einzelnen Immunzellpopulation erfolgte durch das

Markieren der Zellen mit CellTrace™ Violet (CTV). Die Detektion des CTV erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Das CTV lagert sich in dem Zellplasma der Zelle an und wird bei der Zellteilung auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt, weshalb in der Durchflusszytometrie ein geringeres CTV Signal bei geteilten Zellen gemessen wird. Die Ergebnisse der Proliferation der verschiedenen Immunzellen nach der Stimulation mit den Immunzytokinen wird in der Abbildung 26 gezeigt.

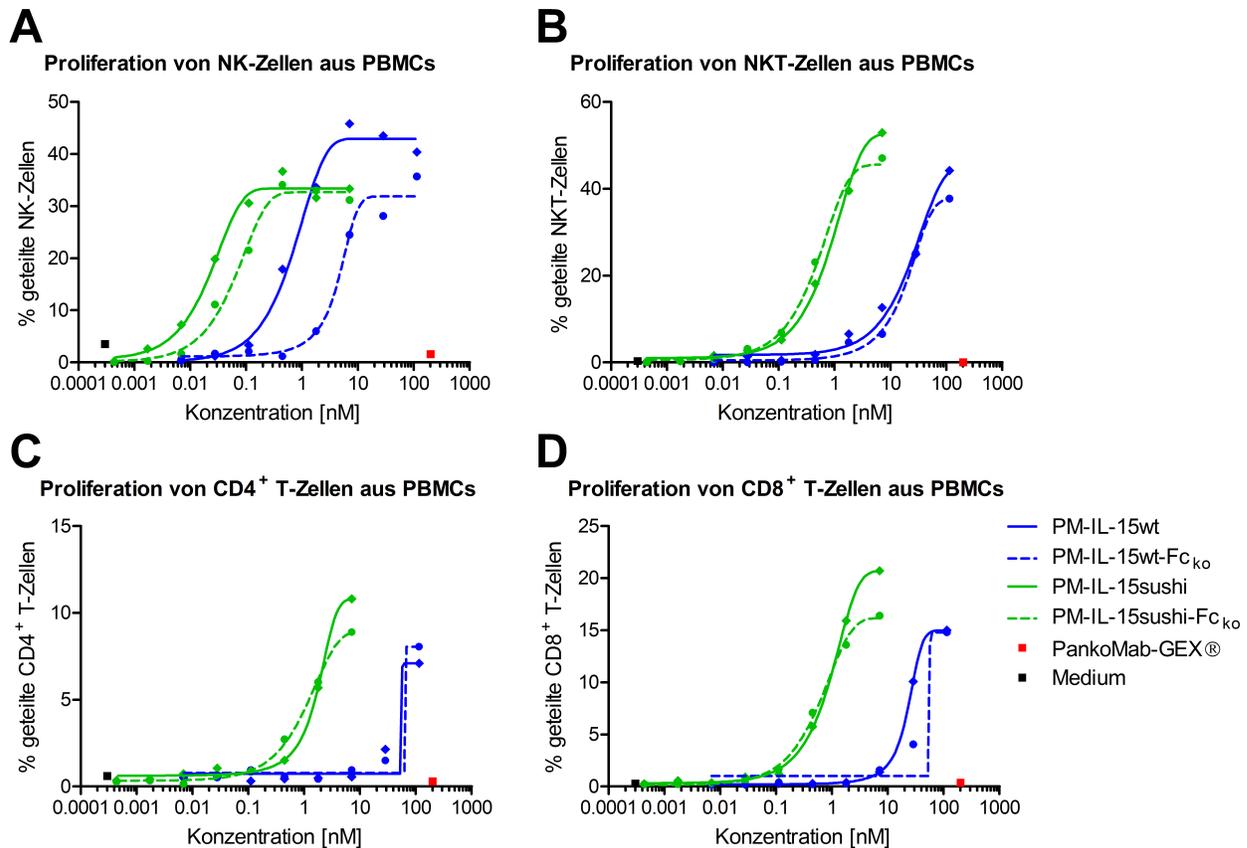


Abbildung 26: Proliferation von NK-, NKT-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt/sushi-Fc_{KO}

Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt/sushi-Fc_{KO} über 5 Tage, Startkonzentration 114nM 1:3 Verdünnung, Konzentration PankoMab-GEX® 201nM, Proliferation von (A) NK-, (B) NKT-, (C) CD4⁺ und (D) CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs, dargestellt sind Einzelmessungen

Die Immunzellen proliferieren in Abhängigkeit der PM-IL-15 Immunzytokine. Dabei proliferieren die NK- und NKT-Zellen stärker als die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Wie schon in der Aktivierung gezeigt wurde, ist der Einfluss des Fc-Teil lediglich bei den NK-Zellen festzustellen. Die Proliferationsinduktion ist bei den NK-Zellen bei Verwendung des PM-IL-15sushi Konstrukts potenter als PM-IL-15sushi-Fc_{KO} bzw. ist PM-IL-15wt potenter als PM-IL-15wt-Fc_{KO}. Wird die

Proliferation der NKT-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen betrachtet, sind das PM-IL-15sushi bzw. PM-IL-15sushi-Fc_{ko} Konstrukt potenter als das PM-IL-15wt bzw. PM-IL-15wt-Fc_{ko} Konstrukt.

30.8 Einfluss der Antikörper auf die Immunzellpopulationen

Auf Grund der IL-15 Rezeptorexpression der B-, NK-, T-Zellen und Monozyten wäre es denkbar, dass durch die Konstrukte mit funktionellem Fc-Teil die NK-Zellen die körpereigenen IL-15 Rezeptor-exprimierenden Zellen angreifen. Dazu wurden PBMCs mit den jeweiligen PM-IL-15 Konstrukten über einen Zeitraum von 24h, 48h und 72h inkubiert und anschließend die Immunzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der Abbildung 27 dargestellt.

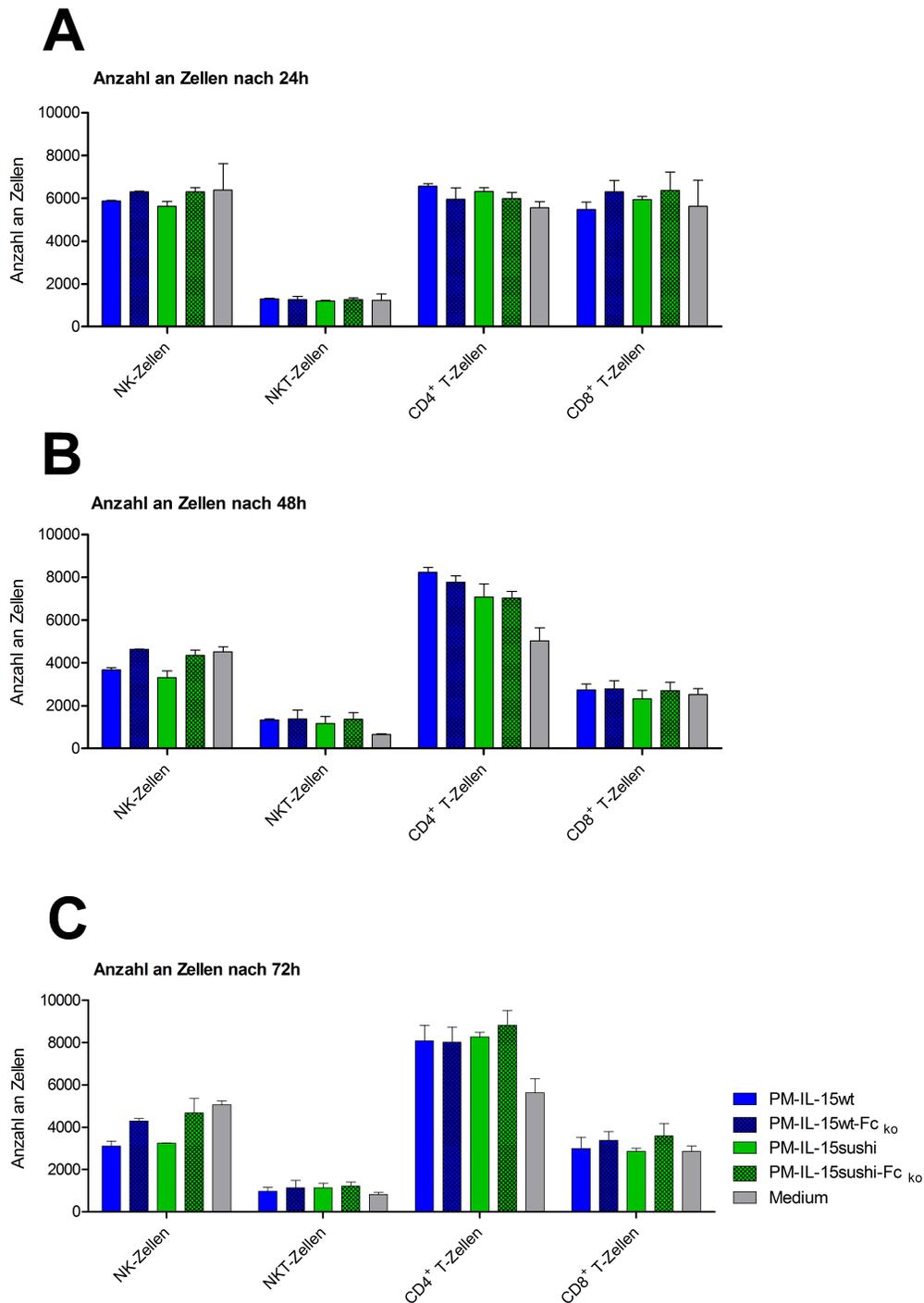


Abbildung 27: Immunzellpopulationen nach Stimulation mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt-Fc_{ko}/sushi-Fc_{ko}

Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15wt/sushi bzw. PM-IL-15wt/sushi-Fc_{ko} über 24h, 48h und 72h, Konzentration 114nM, Anzahl an Zellen der jeweiligen Immunzellpopulationen nach (A) 24h, (B) 48h und (C) 72h, dargestellt sind Mittelwerte (n=2) + SEM

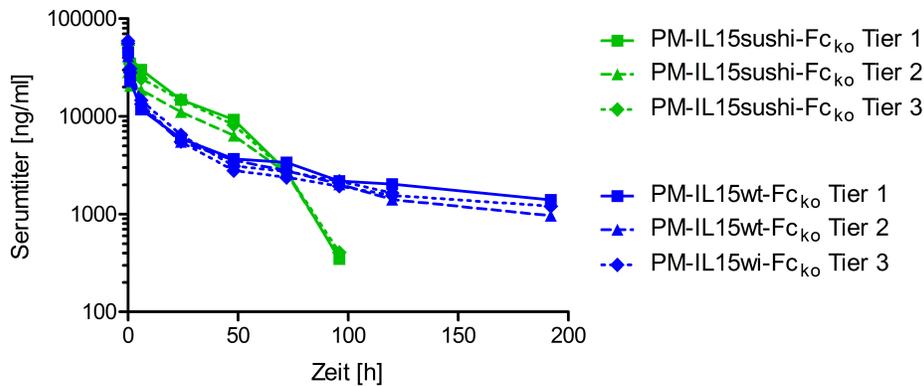
Nach 48h Inkubation der Immunzellen mit den jeweiligen PM-IL-15 Immunzytokinen ist ein geringer Rückgang der Anzahl der Zellen bei Betrachtung der NK-, NKT- und CD8⁺ T-Zellen zu erkennen. Bei den CD4⁺ T-Zellen ist dagegen eine Zunahme zu beobachten. Da keine der betrachteten Immunzellpopulationen verschwindet, ist nicht von einem durch die Immunzytokine induzierten ADCC gegen die körpereigenen Immunzellen auszugehen.

31 *In vivo* Untersuchungen

31.1 Ermittlung der Serumhalbwertszeit in C57BL/6 Mäusen

Zur Untersuchung der Serumhalbwertszeit von PM-IL-15wt-Fc_{ko} und PM-IL-15sushi-Fc_{ko} wurde eine Pharmakokinetikanalyse durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob die höhere Affinität des PM-IL-15sushi-Fc_{ko} zum IL-15R β / γ einen Einfluss auf die Halbwertszeit im Vergleich zu dem weniger affinen PM-IL-15wt-Fc_{ko} hat. Dafür wurden die Konstrukte mit 250pmol i.v. in jeweils drei C57BL/6 Mäuse injiziert. Es wurden 5min, 1h, 6h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d und 8d nach der Injektion Serumproben entnommen und die Konzentrationen von PM-IL-15wt-Fc_{ko} und PM-IL-15sushi-Fc_{ko} mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 28 sind die Absolutwerte der Serumtiter sowie die Serumhalbwertszeiten der einzelnen Tiere dargestellt.

A Vergleich der Absolutwerte der ermittelten Seruntiter von PM-IL-15sushi-Fc_{ko} und PM-IL-15wt-Fc_{ko}



B Vergleich der Serumhalbwertszeiten von PM-IL-15sushi-Fc_{ko} und PM-IL-15wt-Fc_{ko}

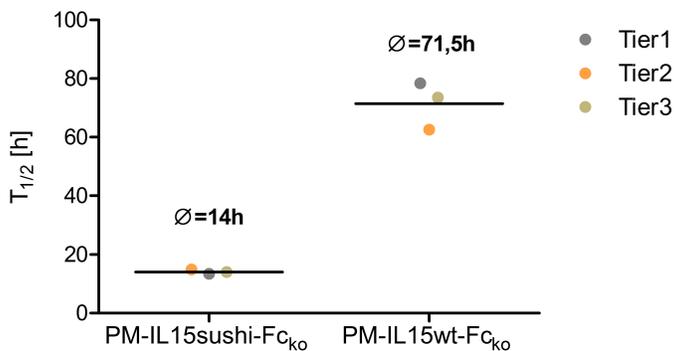


Abbildung 28: Absolutwerte der Seruntiter und die berechneten Serumhalbwertszeiten von PM-IL-15wt-Fc_{ko} und PM-IL-15sushi-Fc_{ko}

Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA ermittelt, dargestellt sind (A) Messwerte der Seruntiter und (B) die berechneten Serumhalbwertszeiten der Immunzytokine

Aus der Gruppe der mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten Tiere verstarb ein Tier bereits an Tag 5 nach der Injektion. Es war jedoch trotzdem möglich, die Serumhalbwertszeit für das PM-IL-15sushi-Fc_{ko} Konstrukt zu berechnen, da in den zwei Tieren dieser Gruppe ab Tag 5 kein Titer im Serum mehr gemessen werden konnte und für die Berechnung der Halbwertszeit die Messzeitpunkte 5min-4d ausreichend waren. Über die gemessenen Titer können Rückschlüsse auf die Serumhalbwertszeit getroffen werden. Die Serumhalbwertszeit der zwei verwendeten Konstrukte unterscheidet sich sehr stark, wobei die drei Tiere pro Gruppe untereinander sehr gut vergleichbar sind. Während das PM-IL-15sushi-Fc_{ko} Konstrukt bereits nach 14h seine Halbwertszeit im Serum erreicht hat und 96h nach der Injektion nicht mehr

im Serum nachgewiesen werden konnte, konnte PM-IL-15wt-Fc_{ko} mit einer Halbwertszeit von 71,5h sogar nach 8 Tagen noch im Serum nachgewiesen werden.

In dieser PK-Studie wurden zudem die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen vor und nach der Injektion in der Durchflusszytometrie analysiert. Da in der Gruppe, der mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten Tiere, ein Tier bereits an Tag 5 verstarb, fehlt für dieses Tier der Wert an Messtag 8 in der Betrachtung der Zellpopulationen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 29 zu sehen.

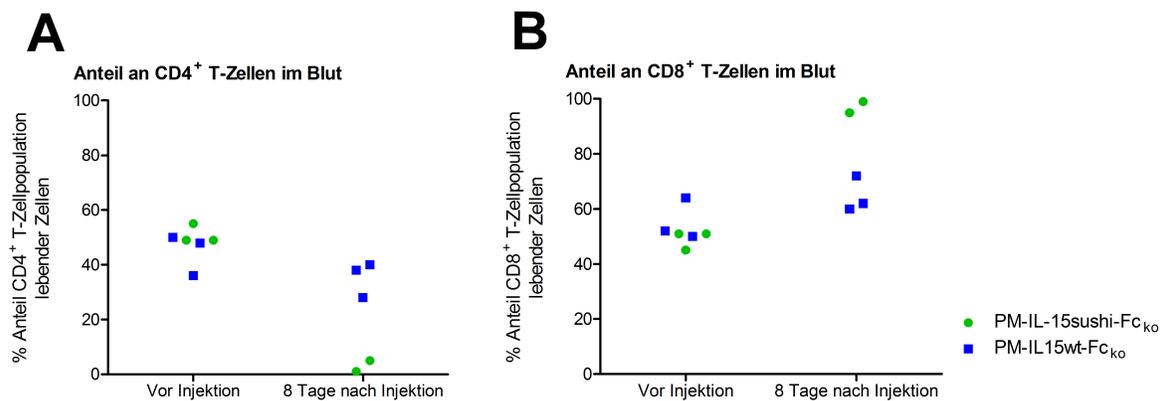


Abbildung 29: Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen vor und 8 Tage nach der Injektion

Dargestellt sind die Anteile an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen berechnet auf die gesamte gemessene Anzahl an lebenden Zellen (A) vor der Injektion und (B) 8 Tage nach der Injektion

Vor der Behandlung der Tiere ist der Anteil von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen in allen Tieren vergleichbar. 8 Tage nach der Injektion zeigt sich, dass der Anteil an CD4⁺ T-Zellen in den mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten Tieren abnimmt und demzufolge der Anteil an CD8⁺ T-Zellen stark zunimmt, sodass sich das Verhältnis von CD4⁺: CD8⁺ T-Zellen von 50 : 50 vor der Injektion hinzu 3 : 97 entwickelt. Bei den mit PM-IL-15wt-Fc_{ko} behandelten Tieren verändert sich ebenfalls das CD4⁺: CD8⁺ Verhältnis hinzu 40 : 60. Die Stimulation der Immunzellen *in vivo* resultiert demzufolge in einer starken Aktivierung und Proliferation der CD8⁺ T-Zellen in der Zirkulation.

31.2 Wirksamkeitsstudie

Um ein erstes Ergebnis bezüglich der Verträglichkeit und Wirksamkeit der Immuzytokine *in vivo* zu erhalten, wurden zwei Gruppen á 3 Tiere/Gruppe mit jeweils 1mg/kg bzw. 0,2mg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelt. Die Konzentrationen wurden anhand der *in vitro* Ergebnisse

ausgewählt. Da die Wirksamkeit und Verträglichkeit des Ursprungsantikörpers Pankomab in umfangreichen präklinischen und klinischen Studien untersucht wurde, wurde bewusst auf das Konstrukt mit funktionellem Fc-Teil verzichtet, da zuerst die Wirkung des IL-15sushi im Tumor untersucht werden sollte. Der zusätzliche Einfluss des Fc-Teils sollte in dieser Studie noch nicht betrachtet werden. Eine Tumorreduktion auf Grundlage eines ADCC-Effektes kann mit dieser Studie demnach nicht erwartet werden. Vielmehr dient dieser Versuch der Untersuchung der Immunzellen im Tumor. Das Ziel der Immunzytokine soll die Anreicherung von IL-15 auf Grund der Tumorspezifität des Pankomab im Tumor sein, die wiederum zu einer Aktivierung und Proliferation der Immunzellen vor Ort führen soll. Auf Grund der chemotaktischen Wirkung von IL-15 ist zudem mit einer Migration von Immunzellen zum Tumor zu rechnen. Als Vergleichsgruppe diente eine mit PBS behandelte Gruppe. Da die Gruppe, welche mit 1mg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelt wurde, die zweite Injektion nicht vertragen hatte, konnten ausschließlich die Ergebnisse der unbehandelten Gruppe mit der 0,2mg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten Gruppe verglichen werden. Als Ergebnis wurde der Tumor am Ende der Studie an Tag 21 in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

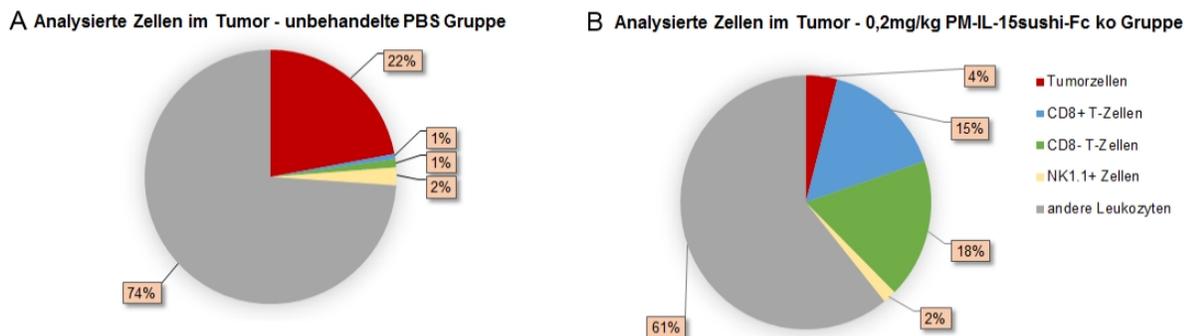


Abbildung 30: Anteil der unterschiedlichen Zellpopulationen im Tumor der behandelten und unbehandelten Tiere

Analyse der Zellen im Tumor mittels Durchflusszytometrie an Tag 21

Anhand des Tumorwachstums sind zunächst keine Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe auszumachen (nicht dargestellt). Bei der Betrachtung der Tumorzellsuspension mittels Durchflusszytometrie wurde in der behandelten Gruppe ein Anteil von insgesamt 4% Tumorzellen analysiert. Im Vergleich dazu enthält die Tumorzellsuspension in der unbehandelten Gruppe einen Anteil von 22% Tumorzellen. Zudem sind in der behandelten Gruppe mit einem Anteil von 15% CD8⁺ und 18% CD8⁻ mehr T-Zellen im Tumor. Zum Vergleich dazu befinden sich im unbehandelten Tumor lediglich jeweils 1% CD8⁺ bzw. CD8⁻T-Zellen. Sowohl in der behandelten als auch unbehandelten Gruppe sind eine

Vielzahl an Leukozyten vorhanden, welche in der Analyse nicht genauer bestimmt werden konnten.

Teil V

Diskussion

32 Vergleich proinflammatorischer Zytokine

Die Forschung an Immuntherapeutika für die Krebstherapie hat sich in den letzten 20 Jahren stetig weiterentwickelt. Nach der Entwicklung und Zulassung von klassischen Antikörpern wie Rituximab schreitet auch die Entwicklung innovativer Immuntherapeutika ständig voran, um die Tumortherapie zu optimieren. Vor allem *Checkpoint*-Inhibitoren erlangen seit einigen Jahren Zulassungen zur Behandlung verschiedenster Indikationen, wie zum Beispiel bei metastasierenden Melanomen oder Urothelialeukarzinomen. Doch in den letzten Phase III Studien zeigte sich, dass auch die vielversprechende Wirkung von *Checkpoint*-Inhibitoren limitiert ist. Für Tecentriq wurde in der IMblaze370 Studie in Kombination mit Cobimetinib bei Patienten mit kolorektalem Karzinom der Endpunkt des progressionsfreien Überlebens nicht erreicht (NCT02788279). Tecentriq scheiterte ebenfalls in der IMvigor211 Studie bei Patienten mit Blasenkrebs (NCT02302807). Auch die Kombitherapie aus Keytruda und dem IDO1-Inhibitor Epcadostat bei Patienten mit metastasierendem Melanom wurde gestoppt, da der erste Meilenstein der Studie nicht erreicht wurde (Keynote-252/ ECHO-301 Studie, NCT02752074). Deshalb geraten neben den *Checkpoint*-Antikörpern vor allem auch Immunzytokine in den Fokus der Forschung, da sie zum einen eine gute Kombination zur Therapie mit *Checkpoint*-Inhibitoren darstellen und zum anderen auch als Monotherapie aussichtsreiche Ergebnisse erzielen. Die hoch potenten Zytokine wie zum Beispiel IL-2 haben den Nachteil, dass sie für die Monotherapie auf Grund von starken Toxizitäten dosislimitierend sind [28]. Die Administration von geringen Dosen sowie die kurze Halbwertszeit der Zytokine ist demzufolge nicht ausreichend, um einen Therapieeffekt zu erzielen [38]. Antigen-spezifische Immunzytokine haben den Vorteil die Immunzellen in der Tumormikroumgebung gezielt zu aktivieren und das immunsuppressive Milieu, welches durch den Tumor gebildet wird, aufzuheben [100]. Dies führt zu einer Aktivierung der Immunzellen, welche proliferieren und weitere proinflammatorische Zytokine ausstoßen können, wodurch die Tumorabwehr gesteigert werden kann. Für die Therapie von soliden Tumoren ist aktuell Cergutuzumab Amunaleukin (CEA-IL2v) von Roche in der Entwicklung. Die bei Cergutuzumab Amunaleukin verwendete IL-2 Variante bindet nicht an CD25, weshalb es keine CD4⁺ sondern ausschließlich zytotoxische CD8⁺ und NK-Zellen aktiviert [100]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass diese exklusive Aktivierung zu einer Verschiebung des CD4⁺/CD8⁺ Verhältnisses und einer Expansion der NK- und CD8⁺ T-Zellen führt. Zudem konnte die Halbwertszeit des IL-2 deutlich verlängert werden [100].

Ein weiteres Immunzytokin, welches von Altor Bioscience entwickelt wird und CD20 bindet, konnte bisher in *in vitro* Versuchen im Vergleich zu Rituximab eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen induzieren. Das Konstrukt basiert auf ALT-803, einem IL-15 Superagonist, welcher die IL-15R α sushi-Domäne enthält [93]. Die *in vivo* Studien von ALT-803 in *Xenograft* Mäusen und Makaken zeigten ebenfalls eine stärkere Tumorreduktion im Vergleich zu Rituximab [93]. Auf Grund dieser vielversprechenden Untersuchungen ist die Entwicklung weiterer antigentargetierenden Immunzytokine für die Tumorthherapie von großem Interesse. Deshalb wurden in dieser Arbeit Immunzytokine generiert, welche auf dem von der Firma Glycotope entwickelten PankoMab-GEX $\text{\textcircled{R}}$ basieren. Dieser Antikörper bindet das Kohlenhydrat-Protein-Epitop TA-MUC1, welches nahezu ausschließlich auf Tumoren exprimiert wird. TA-MUC1 wird dabei auf vielen soliden Tumoren, wie Magen-, Gallenblase- oder Nierenkrebs, exprimiert [115]. Deshalb bietet die spezifische Tumorbinding des PankoMab-GEX $\text{\textcircled{R}}$ eine gute Voraussetzung für die Entwicklung eines Immunzytokins.

Die Entwicklung eines Immunzytokins basierend auf PankoMab-GEX $\text{\textcircled{R}}$ umfasste ein *Screening* verschiedener Zytokine, aus denen das Vielversprechenste ausgewählt werden sollte. Die Auswahl eines Zytokins, welches für die Entwicklung eines Immunzytokins am geeignetsten ist, basierte auf den Ergebnissen der Voruntersuchungen, in denen insgesamt sechs Interleukine miteinander verglichen wurden. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 und IL-27 sind als proinflammatorische Interleukine beschrieben und wurden aus diesem Grund für die Entwicklung eines Immunzytokins ausgewählt. Die Voruntersuchungen beinhalteten die Betrachtung des Einflusses der Interleukine auf die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen, der Granzym B Sekretion sowie der Aktivierung von NK- und T-Zellen und der Proliferation von NK-Zellen nach der Interleukinstimulation.

Die Stimulation mit IL-18 bzw. IL-27 zeigte keine Aktivierung der Immunzellen (Tabelle 10). Da laut Literatur die Stimulation mit IL-18 bzw. IL-27 zu einer gesteigerten IFN- γ Sekretion führen soll [81, 89], wurde erwartet, dass ein Einfluss auf die Aktivierung der Immunzellen zu erkennen ist. In dieser Arbeit wurden bei der Verwendung von 50ng/ml IL-27 keine Stimulation der Immunzellen erreicht. Ziblat et al. konnte dahingegen eine gesteigerte Aktivierung, Proliferation und Zytotoxizität von NK-Zellen nach der Stimulation mit 10ng/ml IL-27 beobachten. Dabei verwendete die Gruppe um Ziblat et al. als zusätzliche Stimulation 1ng/ml IL-15. Da IL-15 schon in geringen Konzentrationen sehr potent aktivierend auf NK-Zellen wirkt, kann die Kombination aus IL-15 und IL-27 zu der gesteigerten Aktivierung geführt haben. Ziblat et al. zeigte zudem, dass eine zu IL-15 und IL-27 zusätzliche Stimulation mit IL-18 die IFN- γ Sekretion erhöht [89]. In dieser Arbeit wurde IL-18 als alleiniger Stimulus betrachtet und es konnte lediglich eine gesteigerte natürliche Zytotoxizität beobachtet werden. Kawashima et al. konnte *in vitro* nach 7d Stimulation von PBMCs mit 50ng/ml IL-18 keinen Effekt auf die

IFN- γ Sekretion feststellen. Erst nach Ko-Stimulation mit 1ng/ml IL-12 wurden hohe IFN- γ -Titer im Überstand gemessen [126]. Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass nach IL-18 Stimulation *in vitro* ohne Ko-Stimulation keine Aktivierung bei aufgereinigten PBMCs zu erkennen ist. Da kein Immunzytokin mit zwei unterschiedlichen Zytokinen generiert werden sollte und IL-27 und IL-18 keinerlei Aktivierung bzw. Proliferation von Immunzellen induzierte, wurden diese Zytokine in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

Eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD25 bzw. CD69 konnte durch die Stimulation mit IL-12 (CD25 und CD69) und IL-21 (CD69) auf NK-Zellen beobachtet werden (Abbildung 6). Auf die Expression von CD25 und CD69 von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnte in dieser Arbeit ein geringer Einfluss der Stimulation mit IL-12 bzw. IL-21 gezeigt werden (Abbildung 7 und 8). Für IL-12 und IL-21 ist beschrieben, dass die CD25 bzw. CD69 Expression vor allem auf NK-Zellen induziert wird, diese jedoch in der Kombination mit IL-2 (IL-21) bzw. IL-15 (IL-12) verstärkt wird [127, 128]. Dies entspricht den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen und bestätigt, dass die Aktivierung von IL-12 und IL-21 auf T-Zellen durch weitere Analysen zu untersuchen sind. CD25 und CD69 eignen sich nicht für die Analyse der T-Zellaktivierung nach IL-12 bzw. IL-21 Stimulation. Bei der Betrachtung der Zytotoxizität und Proliferation von NK-Zellen konnte in dieser Arbeit ein Einfluss durch die Stimulation mit IL-21 gezeigt werden (Abbildung 10 und 11). IL-21 wird als proliferationsinduzierend auf NK-, T- und B-Zellen beschrieben [87]. Des Weiteren steigert IL-21 in NK- und CD8⁺ T-Zellen die Zytotoxizität [129]. Somit konnten die in der Literatur beschriebenen Angaben für IL-21 in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch die Granzym B Produktion nach IL-21 Stimulation konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abbildung 9) und entspricht den Angaben der Literatur [130]. Bei der Betrachtung des Einflusses auf die natürliche Zytotoxizität konnte die Stimulation mit IL-12 eine erhöhte Zielzellyse induzieren. Auch die Proliferation von NK-Zellen wurde durch IL-12 gesteigert. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Angaben, dass Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von NK-Zellen durch IL-12 vermittelt wird [131, 132]. Die Granzym B Sekretion wurde durch die Stimulation mit IL-12 nicht beeinflusst. Laut Literatur sollte IL-12 jedoch die Granzym B Produktion steigern [133]. Argentati et al. zeigte bereits mit *ex vivo* aufgereinigten murinen Immunzellen, dass eine Stimulation von IL-12 zu einer Aktivierung der Granzym B Produktion führt. Dabei wurde die Granzym B Expression mittels RT-PCR analysiert [133]. Die Gruppe um Chowdhury et al. konnte zudem in humanen CD8⁺ isolierten T-Zellen nach IL-12 Stimulation durch intrazelluläre Färbung mittels der Durchflusszytometrie einen Anstieg von Granzym B beobachten. Bei Argentati et al. und Chowdhury et al. erfolgte die Messung der Granzym B Produktion in der Zelle, während in dieser Arbeit die Sekretion von Granzym B durch die Analyse des Überstandes erfolgte. Demzufolge ist es möglich, dass die Granzym B Produktion in der Zelle nach IL-12 Stimu-

lation ansteigt, dieses jedoch nicht sekretiert wird und somit nicht im Überstand analysiert werden kann. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Stimulation mit IL-12 bzw. IL-21 zu einer Aktivierung der Immunzellen führt. Diese ist dabei jedoch nicht so potent wie die Stimulation mit IL-2 oder IL-15 (Tabelle 10).

Nach der Stimulation der PBMCs mit IL-2 bzw. IL-15 konnte eine starke Hochregulation von CD25 und CD69 auf allen Immunzellpopulation beobachtet werden (Abbildung 6, 7 und 8). Dabei wurde die CD25 und CD96 Expression nach IL-15 Stimulation deutlich stärker induziert als durch IL-2 Stimulation. Vor allem auf NK- und CD8⁺ T-Zellen wurden durch die Stimulation mit IL-15 CD25 und CD69 stark hochreguliert. Interessanterweise ist die Bindungsaffinität von IL-2 und IL-15 an die IL-2/IL-15R β / γ Untereinheit gleich [39]. Diese ist für die Signalweiterleitung entscheidend. Trotzdem wurde durch die Stimulation der PBMCs durch IL-15 eine stärkere Lyse der Jurkatzellen induziert, was auf eine höhere Potenz des IL-15 im Vergleich zum IL-2 schließen lässt. Diese Annahme stützen auch die Ergebnisse der Untersuchung der Granzym B Sekretion sowie der Proliferation der NK-Zellen nach der Stimulation mit IL-2 bzw. IL-15 (Tabelle 10). Die Wirkung von IL-2 und IL-15 wurde bereits ausgiebig auf NK-Zellen in der Literatur untersucht [39]. Dabei beobachtete Pillet et al., dass inaktive NK-Zellen die IL-15R α Untereinheit gering und die IL-2/IL-15R β Untereinheit CD122 sehr hoch exprimieren. In inaktivem Zustand werden die IL-2R α sowie die IL-2/IL-15R γ Untereinheit nicht exprimiert [134]. Durch die Stimulation von IL-15 bzw. IL-2 wird die IL-2/IL-15R γ Untereinheit innerhalb von 12h hochreguliert. Die IL-15R α erreicht sein maximales Expressionslevel 16-20h nach IL-15 Stimulation. Währenddessen wird die IL-2R α Untereinheit CD25 nach IL-2 Stimulation gering exprimiert und nur sehr langsam hochreguliert, sodass erst nach 48h die maximale Expression erreicht ist. Das heißt zusammengefasst, dass für IL-15 die Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen einen Tag nach der Stimulation mit IL-15 mehr als zweifach höher ist als die Bindungsstellen für IL-2 nach IL-2 Stimulation [134]. Dies resultiert in einer effizienteren Signalweiterleitung sowie Aktivierung der Zellen durch die Stimulation mit IL-15. In allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte eine deutlich höhere Potenz nach der Stimulation mit IL-15 im Vergleich zur Stimulation mit IL-2 gezeigt werden. Ein entscheidender Grund für die Wahl von IL-15 für die Entwicklung eines Immunzytokins ist die Wirkung von IL-2 auf regulatorische T-Zellen. Da es zum einen besonders aktivierend auf CD4⁺ T-Zellen wirkt, zum anderen aber auch AICD vermittelt, ist IL-2 ein kontroverses Zytokin [135]. Die Aktivierung regulatorischer T-Zellen wird in der Tumorthherapie vermieden, da diese immunsuppressiv auf weitere Immunzellen wirken können [136]. Auf Grund der Vorversuche wurde IL-15 für die Entwicklung eines Immunzytokins basierend auf dem PankoMab-GEX® ausgewählt.

33 Vergleich der PM-IL-15 Immunzytokine *in vitro*

33.1 Unterschiede der verschiedenen IL-15 Potenzen auf die Immunzellen

Bestandteil dieser Arbeit war die Entwicklung, Generierung und Produktion von gegen TA-MUC1 gerichteten IL-15 Immunzytokinen, welche anschließend in funktionellen Versuchen verglichen wurden. Dafür wurden insgesamt sechs antigenspezifische Immunzytokine entwickelt. Der Unterschied zwischen diesen sechs Immunzytokinen ist zum einen die IL-15 Potenz und zum anderen die Affinität zum Fc γ RIIIa. Es wurden insgesamt drei verschiedene IL-15 Potenzen generiert (IL-15mut, IL-15wt, IL-15sushi), welche jeweils an den PankoMab-GEX® gekoppelt wurden. Zusätzlich zu den drei daraus entstandenen Immunzytokinen mit funktionellem Fc-Teil wurden Fc_{ko}-Varianten entwickelt, welche keine Bindung an den Fc γ RIIIa mehr zeigen. Dadurch wird kein ADCC, CDC und keine Phagozytose vermittelt. In dieser Arbeit wurde auf die Untersuchung des CDC verzichtet, da für den PankoMab-GEX® bisher kein CDC-Effekt gezeigt werden konnte. Da keiner der getesteten therapeutischen Antikörper der Firma Glycotope CDC vermittelt, wird vermutet, dass die IgG1-Antikörper auf Grund ihrer Aminosäuresequenz kein CDC vermitteln können. Laut Kellner et al. ist es jedoch möglich anhand von IgG1-Fc Mutationen die Bindungsaffinität der Antikörper zum C1q zu erhöhen. Dabei sind folgende Mutationen S267E, H268F, S324T, G236A und I332E für die Steigerung der Affinität zum C1q bedeutend [137]. Auch die Untersuchung der Phagozytose wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet, sollte aber für die finale Charakterisierung der Immunzytokine im Anschluss an die Arbeit noch durchgeführt werden. Für die Untersuchung der antigenabhängigen Funktion der Immunzytokine wurden MOPC-IL-15 Immunzytokine generiert, welche keine humanen Antigenstrukturen binden. Die drei Hauptanforderungen an das Immunzytokin sind die spezifische Bindung des Tumorantigens TA-MUC1, damit das Immunzytokin im Tumor angereichert werden kann, die Vermittlung von Anti-Tumorzytotoxizität sowie die Induktion von Aktivierung, Proliferation und Zytokinfreisetzung in NK-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Des Weiteren soll untersucht werden, ob körpereigene IL-15 Rezeptor-exprimierende Immunzellen von den NK-Zellen angegriffen werden und ob die Kopplung des Zytokins an den Antikörper zu einer Halbwertszeitverlängerung des Zytokins führt.

Nach der Generierung, Produktion und Aufreinigung zeigte sich, dass alle PM-IL-15 Immunzytokine einen hohen Aggregatgehalt aufweisen. Da Aggregate die Funktionalität der Immunzytokine beeinflussen [138], wurden die in dieser Arbeit verwendeten Immunzytokine soweit aufgereinigt, dass ihr Monomeranteil ca. zwischen 95-100% betrug (Tabelle 5). Diese Aufreinigung hatte zur Folge, dass die Ausbeute der Immunzytokine am Ende der Aufreini-

gung sehr gering war. Für bispezifische Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Länge des Linkers entscheidend für die Entstehung von Aggregaten ist [139]. Schanz et al. zeigte anhand des Beispiels eines bispezifischen CCR5 Antikörpers das längere Linker von 30 Aminosäuren zu einer Reduktion des Aggregatgehalts von 50% auf 6% im Vergleich zu kürzeren Linkern (20 oder 25 Aminosäuren) führen können [140]. Da die Linker der in dieser Arbeit verwendeten Immunzytokine eine Länge von 20 Aminosäuren haben, wäre dies ein erster Ansatz zur Proteinoptimierung. Um die Ausbeute der Produktionszellen zu erhöhen, kann zum einen die Klonentwicklung optimiert werden beginnend bei der Optimierung des eingesetzten DNA-Verhältnisses von leichter und schwerer Kette bei der Transfektion, sowie einer größer angelegten Klonauswahl mit einer erhöhten Anzahl an Klonen. Zum anderen kann der Produktions- und Aufreinigungsprozess optimiert werden, indem individuell abgestimmte Prozessbedingungen, wie zum Beispiel Medien- oder Pufferoptimierung bestimmt werden. Die unterschiedlichen Potenzen der PM-IL-15 Immunzytokine konnten in allen durchgeführten Versuchen herausgestellt werden, wobei Immunzytokine mit IL-15sushi am potentesten gefolgt von den weniger potenten IL-15wt und den gering potenten IL-15mut Immunzytokinen waren. Diese Unterschiede resultieren aus den verschiedenen Affinitäten der IL-15 Varianten zu den jeweiligen IL-15 Rezeptoruntereinheiten. Die in der Arbeit verwendete Mutation des IL-15 an der Aminosäurestelle 67 ist dafür beschrieben, dass sowohl die Bindung an den IL-15R α als auch die Proliferationsinduktion im Vergleich zur IL-15wt Sequenz inhibiert ist [125]. In dieser Arbeit konnte zusätzlich zu der geringeren Bindung des IL-15mut an den IL-15R α noch gezeigt werden, dass IL-15mut in den getesteten Konzentrationen nicht an den IL-15R β bindet (Abbildung 16). Dieser Rezeptor ist zusammen mit dem IL-15R γ jedoch entscheidend für die Signalweiterleitung in der Zelle [39]. Im Vergleich dazu wird die Bindung von IL-15 an die IL-15R β/γ Untereinheit erhöht, wenn das IL-15 an die sushi-Domäne des IL-15R α gekoppelt ist [141]. Die höhere Affinität des IL-15sushi an den IL-15R β im Vergleich zum IL-15wt konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Das IL-15sushi bindet dagegen nicht an den IL-15R α , da die sushi-Domäne selbst ein Teil des Rezeptors ist.

Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Immunzytokine zur IL-15R β/γ Untereinheit zeigten sich anhand die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen. Die geringe Potenz des PM-IL-15mut konnte bei der Untersuchung der Aktivierung, der natürlichen Zytotoxizität sowie der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität beobachtet werden. Bereits bei der Aktivierung wurde CD25 auf NK-Zellen erst ab einer Konzentrationen von 114nM PM-IL-15mut hochreguliert (Abbildung 17). Die Hochregulation von CD25 und CD69 auf NK-Zellen zeigt jedoch, dass IL-15mut die IL-15R β/γ Untereinheit binden kann, da ohne diese Bindung keine Signalweiterleitung in die Zelle stattfinden kann. Aufgrund der niedrigen Affinität des IL-15mut an die IL-15R β/γ Untereinheit sind im Vergleich zu IL-15wt bzw. IL-15sushi höhe-

re Konzentrationen von IL-15mut nötig, um eine Aktivierung der Immunzellen zu erreichen. Im Vergleich zum PankoMab-GEX® konnte im Europium-ADCC mit dem PM-IL-15mut Konstrukt eine gesteigerte Zielzellyse induziert werden, welche jedoch deutlich geringer ausfiel als mit PM-IL-15wt und PM-IL-15sushi (Abbildung 21). Die unterschiedlichen Potenzen werden anhand der berechneten EC50 Werte von 0,006nM (PM-IL-15sushi), 0,617nM (PM-IL-15wt) und 3,196nM (PM-IL-15mut) deutlich. Die hohen benötigten Dosen des PM-IL-15mut Immunzytokins könnten später in der Therapie sowohl ein Vorteil als auch Nachteil darstellen. Ein Vorteil wäre die vermutlich höhere Anreicherung des Immunzytokins im Tumor. Nachteilig ist dabei jedoch der geringe Einfluss auf die Aktivität der Immunzellen. In dieser Arbeit wurde mit PM-IL-15mut lediglich eine Aktivierung von NK-Zellen, nicht aber T-Zellen erreicht. Zudem besteht bei der Gabe hoher Dosen ein größeres Risiko für ungewünschte Injektionsreaktionen [142]. Ein weiterer Nachteil des PM-IL-15mut Konstrukts ist vor allem die schlechte Produktivität und der hohe Aggregatanteil nach der Aufreinigung, weshalb die Ausbeute nach dem gesamten Aufreinigungsverfahren sehr gering ist (Kapitel 30.1). Auf Grund der genannten Nachteile wurde PM-IL-15mut als ungeeignet für die weitere Entwicklung eines Immunzytokins betrachtet.

Die Potenzen der IL-15wt und IL-15sushi Immunzytokine konnten in der Aktivierung, Proliferation, natürlichen und antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität und der Zytokinfreisetzung verglichen werden. Wie erwartet, stellte sich das IL-15sushi in allen Versuchen als deutlich potenter als das IL-15wt heraus. Dies entspricht den in der Literatur beobachteten Ergebnissen sowie den in dieser Arbeit analysierten Bindungsaffinitäten zur IL-15R β / γ Unter-einheit [141]. Die Stimulation der PBMCs mit IL-15wt bzw. IL-15sushi führt zu einer starken Expression der Aktivierungsmarker CD25 bzw. CD69 (Abbildung 18 und 19). Die Hochregulation von CD25 bzw. CD69 ist das Resultat mehrerer Aktivierungsvorgänge in der Zelle, die allesamt dazu führen, dass die Immunzellen mehr Zytokine ausschütten und die Zytotoxizität gesteigert wird [40]. IL-15 wird als GM-CSF, IFN- γ , TNF- α und MIP-1 α induzierend beschrieben [143, 144, 40, 145], weshalb diese Zytokine nach der Stimulation von PBMCs mit den Immunzytokinen analysiert wurden (Abbildung 20). Als Vergleich wurde bei der Betrachtung der Zytokinfreisetzung Muromonab-CD3 (OKT3) mitgeführt, da dieser Antikörper als TNF- α und IFN- γ induzierend beschrieben ist [146]. OKT3 ist ein muriner monoklonaler anti-CD3 Antikörper, der für die Behandlung von Abstoßungsreaktionen nach allogener Organtransplantation eingesetzt wird [147]. Die höhere Potenz des PM-IL-15sushi im Vergleich zu PM-IL-15wt wird anhand der Ergebnisse der Zytokinfreisetzung deutlich, wobei vor allem hohe Konzentrationen an IFN- γ nach der Stimulation der PBMCs mit PM-IL-15sushi sekretiert werden. Bei der Analyse von sechs Spendern werden im Durchschnitt bei einer Konzentration von 114nM 4.712pg/ml (PM-IL-15wt) und 33.300pg/ml (PM-IL-15sushi) IFN-

γ sekretiert. Im Vergleich dazu wird mit OKT3 bereits bei einer Konzentration von 0,34nM 11.858pg/ml IFN- γ sekretiert, weshalb OKT3 eine deutlich stärkere IFN- γ Sekretion induziert als die PM-IL-15 Immunzytokine. Rhode et al. konnte für den Super-IL-15-Agonisten ALT-803 ebenfalls eine erhöhte IFN- γ Sekretion durch humane Immunzellen zeigen, wobei sie für löslich hinzugegebenes ALT-803 keinen Einfluss auf die IFN- γ Sekretion zeigen konnten [148]. Lediglich bei vorher immobilisiertem ALT-803 wurden hohe IFN- γ Konzentrationen von bis zu ca. 7.000pg/ml (0,8nM) gemessen. Somit kann kein direkter Vergleich zwischen dem ALT-803 und den PM-IL-15 Immunzytokinen angestellt werden. Da IFN- γ als stark proinflammatorisches Zytokin beschrieben ist, welches Proliferation und Aktivierung in Immunzellen induziert, ist davon auszugehen, dass die Immunzellen zusätzlich zu dem IL-15 über das sekretierte IFN- γ stimuliert werden [149]. Auch die GM-CSF Sekretion wurde durch die Stimulation mit den jeweiligen PM-IL-15 Immunzytokinen gesteigert. GM-CSF wirkt dabei proinflammatorisch auf T-Zellen und induziert die Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen [150, 151]. Die GM-CSF Sekretion ist vor allem bei der höchsten Konzentration von PM-IL-15sushi (114nM) mit im Durchschnitt 741pg/ml GM-CSF stark erhöht, während bei der gleichen Konzentration mit PM-IL-15wt lediglich 40pg/ml GM-CSF gemessen wurden. Da GM-CSF hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert wird, wird erneut die stärkere Wirkung des PM-IL-15sushi im Vergleich zum PM-IL-15wt auf die Immunzellen deutlich herausgestellt. Zudem wird MIP-1 α von PM-IL-15 stimulierten PBMCs sekretiert. Dieses Chemokin wird hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten, NK- und T-Zellen sekretiert und induziert Chemotaxis von Monozyten, NK- und B-Zellen sowie aktivierten CD8⁺ T-Zellen [152, 153, 154]. Auch bei der MIP-1 α Sekretion ist der potentere Einfluss von PM-IL-15sushi im Vergleich zu PM-IL-15wt auf die Immunzellen festzustellen, was durch die stärkere Bindung des PM-IL-15sushi an die IL-15R β / γ Untereinheit zu erklären ist. Zusätzlich zu MIP-1 α wird nach der Stimulation mit IL-15 TNF- α sekretiert, welches von Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Zellen produziert wird und unter anderem das Tumorstadium inhibieren kann [155, 156]. Im Vergleich zum OKT3 (0,34nM), der bei der Erstinjektion zu einer starken Entzündungsreaktion in den Patienten geführt hat [146], werden mit PM-IL-15sushi erst bei der am höchsten getesteten Konzentration von 114nM höhere Konzentrationen von IFN- γ und TNF- α sekretiert. Bei der Betrachtung der geringsten Konzentration von PM-IL-15sushi (0,92nM) und PM-IL-15wt (15nM) ist dahingegen keine IFN- γ und TNF- α Sekretion zu beobachten, weshalb OKT3 in diesem Versuchsansatz deutlich potenter Zytokinausschüttung induziert als die PM-IL-15 Immunzytokine. Es sollte bedacht werden, dass in den Patienten vor allem bis zu 4h nach der Infusion mit OKT3 erhöhte Zytokinkonzentrationen gemessen wurden [146]. Um einen direkten Vergleich zu OKT3 aufstellen zu können, müsste daher eine weitere Analyse der Zytokinausschüttung nach kürzerer Inkubationszeit durchgeführt

werden. Die Gefährdung der Patienten auf Grund von starken Zytokinausschüttungen durch die PM-IL-15 Immunzytokine in der Zirkulation sollte bei *in vivo* Versuchen berücksichtigt und untersucht werden. In dieser Arbeit konnte jedoch vorerst gezeigt werden, dass die Stimulation der Immunzellen mit den jeweiligen Immunzytokinen zu einer Zytokinausschüttung führt, welche bei vergleichbaren Konzentrationen deutlich geringer ausfiel als bei der Stimulation mit OKT3. Abschließend ist festzustellen, dass die Stimulation mit PM-IL-15 Immunzytokinen zur Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine führt, welche sich allesamt positiv auf die Immunzellen in der Tumormikroumgebung auswirken können. Durch Sekretion weiterer Zytokine nach der Stimulation der Immunzellen mit PM-IL-15 können zum Beispiel Granulozyten und Makrophagen stimuliert werden, welche durch eine Stimulation mit IL-15 nicht direkt aktiviert werden würden. Dies ist eine entscheidende Eigenschaft des Immunzytokins, da in der Tumormikroumgebung eine weitere Aktivierung von Immunzellen induziert werden soll. Zudem kann durch die Ausschüttung von TNF- α der Tumor direkt in seinem Wachstum inhibiert werden.

33.2 Einfluss der Bindung der Immunzytokine an den Fc γ RIIIa Rezeptor auf Immunzellen

Die Untersuchung der Immunzytokine beinhaltete die Bindung an den Fc γ RIIIa Rezeptor, welcher auf Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert wird. Über die Bindung kann antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch NK-Zellen bzw. Phagozytose durch Makrophagen sowie komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) induziert werden. Für die Analyse des Einflusses des funktionellen Fc-Teil der Immunzytokine wurde deshalb zusätzlich zu den Immunzytokinen mit funktionellem Fc-Teil auch Immunzytokine mit einem Fc_{ko} generiert, welche demzufolge kein ADCC mehr vermitteln können. In der Literatur ist beschrieben, dass das Ausschalten der Fc-Glykosylierung durch die Mutation N297A möglich ist [157]. Dies konnte mittels des Fc γ RIIIa AlphaLISA überprüft werden. Da alle generierten Immunzytokine dieselbe Fc-Mutation enthalten, wurden PM-IL-15wt und PM-IL-15wt-Fc_{ko} exemplarisch verglichen (Abbildung 15). Dabei zeigte sich zum einen keine Bindung des PM-IL-15wt-Fc_{ko} an den Rezeptor und zum anderen eine höhere Affinität des PM-IL-15wt zum Fc γ RIIIa im Vergleich zum PankoMab-GEX®. Leichte Änderungen der Fc-Glykosylierung der Antikörper können zu einer stark veränderten Affinität des Fc-Teils an den Fc γ RIIIa führen [158]. Mit abnehmender Core-Fukosylierung des Fc-Teils nimmt die Affinität zum Fc γ RIIIa zu [159]. Die Glykanstrukturen der Immunzytokine sollten daher bestimmt werden, um die Fc γ RIIIa-Bindung besser beurteilen zu können.

In den ADCC Versuchen konnte bei der Verwendung der TA-MUC1 stark exprimierenden

Zelllinie T47D, der TA-MUC1 schwach exprimierenden Zelllinie Ovarcar-3 im Europium-Ansatz über 5h und der TA-MUC1 schwach exprimierenden Zelllinie MCF-7 im Langzeit-Zytotoxizitäts-Versuch gezeigt werden, dass die Lyse der Zielzellen nicht nur durch die Immunzytokine mit funktionellem Fc-Teil, sondern auch durch die Fc_{ko}-Varianten vermittelt wurde. Liu et al. konnte in einem ADCC Versuch mit α CD20-ALT-803 gegen Daudi als Zielzellen ebenfalls zeigen, dass bei der Verwendung einer Fc_{ko}-Variante eine Zielzelllyse vermittelt wurde, welche jedoch mit 20% Maximallyse deutlich geringer war als bei der Verwendung der Variante mit funktionellem Fc-Teil (Maximallyse 70%) [93]. In diesem Versuch konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das Immunzytokin potenter im Vergleich zum Rituximab ist. Eine mögliche Erklärung ist die gesteigerte natürliche Zytotoxizität, die auf Grund der IL-15 Stimulation erhöht ist [40]. Dies bestätigen die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Ansatzes bei Verwendung der TA-MUC1 negativen Jurkatzellen als Zielzellen (Abbildung 20). Dabei wurde die natürliche Zytotoxizität gegen die Jurkatzellen bei der Verwendung der Fc_{ko}-Varianten gezeigt. Demzufolge wird die Zielzelllyse bei der Verwendung von Immunzytokinen mit funktionellem Fc-Teil durch zwei Effekte vermittelt: die Steigerung der natürlichen Zytotoxizität der IL-15 stimulierten NK-Zellen gegenüber der Zielzellen sowie durch den ADCC Effekt. Nicht nur bei der Betrachtung der natürlichen Zytotoxizität konnte der Einfluss des funktionellen Fc-Teils gezeigt werden, sondern auch bei der Betrachtung der Aktivierung und Proliferation. So induzierten PM-IL-15sushi und PM-IL-15wt eine stärkere Aktivierung der NK-Zellen als die jeweilig entsprechenden Fc_{ko}-Varianten. Bei NKT- und T-Zellen war dieser Unterschied dahingegen nicht zu erkennen. Dies spricht dafür, dass dieser Effekt vor allem über die Bindung des Fc γ RIIIa vermittelt wird, der nicht auf NKT- und T-Zellen, aber auf NK-Zellen sehr stark exprimiert wird [160]. Bei der Auswertung der Ergebnisse der funktionellen Analyse der mit PM-IL-15mut-Fc_{ko} stimulierten Zellen muss berücksichtigt werden, dass dieses Konstrukt nach der präparativen SEC noch immer 14,9% Aggregate enthielt und Aggregate zu einem falsch positiven Ergebnis führen [138]. Das bedeutet, dass die Ergebnisse des PM-IL-15mut-Fc_{ko} in der Auswertung vernachlässigt werden sollten. Den Einfluss auf die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen durch die Stimulation des Fc γ RIIIa hat Bryceson et al. bereits analysiert [161]. Dabei konnte seine Gruppe zeigen, dass die direkte Stimulation des Fc γ RIIIa über einen CD16 Antikörper zu einer gesteigerten natürlichen Zytotoxizität führt. Die Aktivierung über CD16 führt außerdem zu der Hochregulation von CD69 [162]. Zudem konnte gezeigt werden, dass CD25 hochreguliert wird und die Proliferation der NK-Zellen induziert wird [163]. Dies entspricht den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen, in denen ebenfalls eine höhere Potenz der Immunzytokine mit funktionellem Fc-Teil im Vergleich zu den Fc_{ko}-Varianten nachgewiesen werden konnte. Eine zusätzliche Hochregulation von CD25 und CD69 auf den NKT- und T-Zellen durch den funktionellen Fc-Teil konnte nicht beobachtet werden. Zudem

hat die zusätzliche Aktivierung des funktionellen Fc-Teils keinen Einfluss auf die Proliferation der NKT- und T-Zellen gezeigt. Die gesteigerte Potenz, welche über den Fc-Teil vermittelt wird, äußert sich schlussendlich lediglich in einer höheren Aktivierung, Zytotoxizität sowie Proliferation der NK-Zellen.

Ob gegen körpereigene IL-15 receptorexprimierende Immunzellen ADCC vermittelt wird, wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht (Abbildung 26). Es wurde vorerst der Einfluss der Immunzytokine auf die NK- und T-Zellen betrachtet. Wenn ADCC gegen die IL-15 receptorexprimierenden Zellen induziert werden würde, würde ein Verlust der jeweiligen Immunzellpopulation durch die Immunzytokine mit funktionellem Fc-Teil erwartet werden, während bei Verwendung der Fc_{ko}-Varianten keine Abnahme der Population stattfindet. Während des beobachteten Zeitraums konnten alle betrachteten Immunzellpopulationen nachgewiesen werden. Auch wenn die Anzahl der NK- und T-Zellen im Verlauf der Zeit schwankt, ist kein Verlust einer bestimmten Population zu erkennen. Somit konnte unter den getesteten Bedingungen kein ADCC-Effekt gegen körpereigene IL-15 receptorexprimierende Zellen beobachtet werden.

33.3 Einfluss der Bindung der Immunzytokine an das Antigen TA-MUC1

Die Untersuchung der PM-IL-15 Immunzytokine zeigte, dass alle gleich affin und vergleichbar zu PankoMab-GEX® tumorspezifisch an TA-MUC1 positive T47D Zellen binden. Die Bindung der IL-15 Varianten an den PankoMab-GEX® beeinflusst demzufolge die Antigenaffinität der Immunzytokine nicht. Die MOPC-IL-15 Immunzytokine zeigten in der Untersuchung mittels Durchflusszytometrie eine geringe Bindung an das TA-MUC1, welche im Antigen-ELISA wiederlegt werden konnte. Die geringe Bindung, welche in der Analyse mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde, ist auf eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zurück zu führen. Um die antigenabhängige Effektorfunktion der zytotoxischen Zellen in ADCC Versuchen auf Grund der PM-IL-15 Immunzytokine darzustellen, konnten die MOPC-IL-15 Immunzytokine demzufolge als Vergleich mitgeführt werden, da sie das Antigen nicht binden und kein ADCC vermitteln sollten. Während die MOPC-IL-15 Immunzytokine lediglich die natürliche Zytotoxizität steigern, kann durch die Verwendung der PM-IL-15 Immunzytokine mit funktionellem Fc-Teil ein ADCC-Effekt induziert werden. Dies konnte auch in einem ADCC-Ansatz gegen TA-MUC1 positive Ovar-3 als Zielzellen gezeigt werden, bei dem die MOPC-IL-15 Immunzytokine lediglich eine natürliche Zytotoxizität gegenüber den Ovar-3 vermittelten, während die PM-IL-15 Immunzytokine ADCC induzieren können (Abbildung 23). Diese Ergebnisse entsprechen den Untersuchungen von Liu et al., der ebenfalls das α CD20-ALT-803 Immunzytokin mit einem targetunspezifischen ALT-803 im ADCC-Ansatz verglichen

hat und feststellen konnte, dass bei der Verwendung des targetunspezifischen ALT-803 kein ADCC vermittelt wurde [93]. Die Antigenbindung der Immunzytokine an die Zielzelle ist demzufolge entscheidend, da darüber ADCC induziert werden kann. Bei dem Versuch mit den Ovar-3 als Zielzellen konnte zudem gezeigt werden, dass die Immunzytokine viel potenter Zelllyse induzieren als PankoMab-GEX®. Daran wird deutlich, dass die Kopplung des Zytokins an PankoMab-GEX® zu einer Optimierung des Antikörpers führt.

33.4 Auswahl des für die Therapie geeignetsten Immunzytokins

Die Anforderungen an das Produkt umfassen die spezifische Bindung des Tumorantigens TAMUC1, welche bei allen in dieser Arbeit untersuchten Immunzytokinen nachgewiesen werden konnte und vergleichbar zum Ausgangsantikörper PankoMab-GEX® war. Des Weiteren soll das Produkt natürliche und antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen induzieren. Bei der Untersuchung dieser Eigenschaften stellte sich das PM-IL-15sushi als sehr potent heraus, da es auf Grund der starken Aktivierung der Effektorzellen durch das IL-15sushi eine hohe natürliche Zytotoxizität vermittelt und zusätzlich über den funktionellen Fc-Teil effektiv ADCC gegenüber den Tumorzellen induziert. Gleichzeitig konnte bei der Untersuchung des Einflusses von PM-IL-15sushi auf körpereigene IL-15 rezep-torexprimierende Immunzellen bisher keine Induktion der Zytotoxizität gegenüber NK- bzw. T-Zellen festgestellt werden. Der funktionelle Fc-Teil vermittelt demnach effektiv ADCC gegenüber Tumorzellen jedoch keine Zytotoxizität gegenüber körpereigene Zellen. Zuletzt soll das Produkt Aktivierung, Proliferation und Zytokinfreisetzung in NK-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induzieren. Auch bei der Untersuchung dieser Eigenschaften erzielte das PM-IL-15sushi Immunzytokin die potentesten Ergebnisse. Bei der Wahl des PM-IL-15wt Immunzytokins als späteres Therapeutikum wäre auf Grund der geringen Zytokinfreisetzung ein größerer Konzentrationsspielraum bei der Dosisfindung möglich, da vermutlich deutlich höhere Konzentrationen von PM-IL-15wt eingesetzt werden könnten, die verträglicher sind als bei der Verwendung derselben Konzentrationen des PM-IL-15sushi. Bei der Verwendung des PM-IL-15sushi Immunzytokins als potentiell Therapeutikum muss bedacht werden, dass bei der späteren *in vivo* Gabe bereits in der Zirkulation eine starke Aktivierung stattfinden kann, welche zu einem Zytokinsturm im Patienten führen kann. Dies muss bei der Wahl der Dosierung bereits in Mausstudien berücksichtigt werden.

34 Pharmakokinetik und Wirksamkeitsanalyse *in vivo*

Abschließend sollte die Funktionalität der Immunzytokine auch *in vivo* untersucht werden. Da hIL-15 kreuzreaktiv in der Maus ist, ist das verwendete C57BL/6 Mausmodell geeignet, den Einfluss der Immunzytokine auf die Immunzellpopulationen zu analysieren [164]. Es wurden C57BL/6 verwendet, da in diesen Tieren bereits die Serumhalbwertszeit des von HEK293 produzierten hIL-15 mit 30min bestimmt wurde und somit als Vergleich herangezogen werden kann [164]. Die erste *in vivo* Studie diente der Bestimmung der Serumhalbwertszeit. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Halbwertszeit von IL-15 erhöht werden kann, wenn es am Antikörper gebunden ist. Deshalb wurden die PM-IL-15wt-Fc_{ko} und PM-IL-15sushi-Fc_{ko} Immunzytokine für den Vergleich ausgewählt, wobei die Konstrukte ohne funktionellen Fc-Teil gewählt wurden, um eventuelle Wechselwirkungen des Fc-Teils ausschließen zu können, welche auch die Halbwertszeit hätten beeinflussen können. Es konnte gezeigt werden, dass das PM-IL-15wt-Fc_{ko} Immunzytokine in der Maus mit 71,5h eine deutlich längere Serumhalbwertszeit hat als das PM-IL-15sushi-Fc_{ko} Konstrukt mit lediglich 14h (Abbildung 27). Obwohl PM-IL-15wt-Fc_{ko} durch die zusätzliche Bindung an den IL-15R α von mehr Immunzellpopulationen gebunden werden kann, ist jedoch die höhere Bindungsaffinität des PM-IL-15sushi-Fc_{ko} zu IL-15 rezeptorexprimierenden Zellen vermutlich der Grund für den schnelleren Abbau aus dem Serum in den Tieren. Durch die höhere Bindungsaffinität an den IL-15R β/γ wird es schneller von den Zellen gebunden, internalisiert und kann im Serum nicht mehr detektiert werden [141]. Insgesamt wird die Halbwertszeit des IL-15 von 30min durch die Kopplung an den Antikörper auf 14h erheblich verlängert [164]. In der T-Zellpopulationsanalyse des Mausbluts, welche zusätzlich Bestandteil der Untersuchung in dieser Arbeit war, zeigte sich zudem, dass die höhere Bindungsaffinität des PM-IL-15sushi an den IL-15R β/γ zu einer Populationsverschiebung der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen führt. Während das Verhältnis CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen vor der Injektion noch bei 50 : 50 lag, verschob es sich 8 Tage nach der Injektion zu 3 : 97 (Abbildung 28). Ein vergleichbarer Effekt konnte auch bei der Analyse des ALT-803 in C57BL/6 Mäusen gezeigt werden [93]. In dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko} die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen viel potenter induziert wurde als bei CD4⁺ T-Zellen. Der Anstieg der CD8⁺ T-Zellen könnte demnach durch eine stärkere Proliferation dieser Zellen erklärt werden. Zudem ist es denkbar, dass die aktivierten zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen migrieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte zirkulierende CD4⁺ T-Zellen Gewebe oder auch den Thymus infiltrieren. CD4⁺ T-Zellen konnten nach der Aktivierung zudem im Bauchfell, Fettgewebe und der Milz in der Maus nachgewiesen werden [165, 166, 167].

Die Entwicklung des CD4⁺/CD8⁺ Verhältnisses nach der Stimulation mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko}

sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit der Tod der Maus aus der mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten Gruppe auf die Injektion des Immunzytokins oder andere Gründe zurück zu führen ist. Da von drei Tieren lediglich ein Tier verstorben ist und dieses erst 5 Tage nach der Injektion verstarb, kann vorerst kein direkter Zusammenhang mit dem Versterben des Tieres auf Grund der Wirkung des Immunzytokins gezogen werden. In weiteren *in vivo* Studien sollten daher verschiedene Konzentrationen gewählt werden, um die maximal tolerierte Dosis (MTD) ermitteln zu können. Da die Tumormikroumgebung sehr suppressiv auf Immunzellen wirkt, wird ein Produkt benötigt, welches potent Immunzellen aktivieren kann. Aufgrund der guten Funktionalität von PM-IL15sushi-Fc_{ko} in den *in vitro* und *in vivo* Versuchen, wurde PM-IL-15sushi-Fc_{ko} für die Wirksamkeitsstudie gewählt. Das bereits ein Zytokin Auswirkungen auf die Tumorreduktion hat, konnte in einem syngenem Mausmodell mit CEA-IL2v gezeigt werden. Das CEA-IL2v wurde ebenfalls ohne funktionellen Fc-Teil generiert und steigerte das Überleben der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Gruppe bei der Verwendung von MC38 als Tumorzellen [100]. Für die in dieser Arbeit dargestellte Wirksamkeitsstudie wurden den Mäusen MUC1-transfizierte 4T1 injiziert, da für die erste Wirksamkeitsstudie der Einfachheit halber ein syngenes Tumormodel verwendet werden sollte. TA-MUC1 wird in der Maus nicht exprimiert, weshalb die 4T1 Zellen transfiziert wurden. Bei einem vorherigen Anwachsversuches der TA-MUC1 transfizierten 4T1 Tumorzellen zeigte sich ein schnelles Tumorstadium, weshalb die Mäuse schon früh abgetötet werden mussten. Auf Grund des starken Tumorstadiums startete die Therapie bereits am darauffolgenden Tag und die Behandlung umfasste eine zweimal wöchentliche Injektion mit jeweils 1mg/ml bzw. 0,2mg/ml des PM-IL-15sushi-Fc_{ko}. Mit Hilfe dieser ersten klein, angelegten Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit PM-IL-15sushi-Fc_{ko} einen Einfluss auf die Immunzellen im Tumor hat. Die durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellsuspension ergab einen geringeren Anteil an Tumorzellen der mit 0,2mg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} behandelten Tiere im Vergleich zu der unbehandelten PBS Kontrollgruppe. Dies war dahingehend nicht zu erwarten, da absichtlich für diese Studie das Immunzytokin PM-IL-15sushi-Fc_{ko} ohne funktionellen Fc-Teil verwendet wurde, weshalb kein ADCC gegen den Tumor vermittelt werden sollte. Da aber IL-15 die natürliche Zytotoxizität der Immunzellen steigert, ist es als positiver Nebeneffekt zu beobachten gewesen, dass in der behandelten Gruppe der Anteil an Tumorzellen geringer war als bei der unbehandelten Gruppe.

Das Hauptaugenmerk dieser Studie war jedoch die Analyse der Immunzellen im Tumor. Dabei zeigte sich eine Immunzellenanreicherung vor allem von T-Zellen von 2% in der unbehandelten zu 33% in der behandelten Gruppe (Abbildung 29). Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse aus den *in vitro* Analysen, dass bereits in geringen Konzentrationen des PM-

IL-15sushi-Fc_{ko} eine starke Zytotoxizität gegen Tumorzellen sowie die Proliferation von Immunzellen durch die Stimulation von PM-IL-15sushi-Fc_{ko} induziert werden kann. Eine weitere Möglichkeit für die verstärkte T-Zellanreicherung kann auch der chemotaktische Einfluss des IL-15 auf die Immunzellen sein. Die hohe Konzentration von 1mg/kg PM-IL-15sushi-Fc_{ko} wurde in dieser Studie nicht gut von den Mäusen vertragen. Dies äußerte sich darin, dass eine Maus bereits in der Nacht nach der zweiten Injektion verstarb und die zwei weiteren Mäuse dieser Gruppe starke Entzündungsreaktionen zeigten, weshalb sie einen Tag nach der zweiten Injektion abgetötet wurden. Um die MTD genauer zu definieren, sollte jedoch in einem weiteren Versuch die Verträglichkeit weiterer Konzentrationen in dem Bereich zwischen 0,2-1mg/ml erfolgen. Bei einer folgenden Studie sollte die Zytokinausschüttung *in vivo* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion analysiert werden, damit die Verträglichkeit besser eingeschätzt werden kann. Für den Nachweis, dass das PM-IL-15sushi Immunzytokin sich im Tumor anreichert und demzufolge auch das IL-15sushi in den Tumor gelangt, sollte eine Biodistributionsstudie durchgeführt werden. Bisher ist jedoch bereits davon auszugehen, dass sich PM-IL-15sushi-Fc_{ko} im Tumor anreichert, da eine Tumordinfiltration der T-Zellen sowie Reduktion der Tumorzellen beobachtet wurde. Des Weiteren sollte der Einfluss des Fc-Teils in weiteren *in vivo* Studien untersucht werden. Um die Funktionalität des PM-IL-15sushi Immunzytokins *in vivo* eingehender zu analysieren, sollten die Aktivierung der Immunzellen im Blut, in der Milz, den Lymphknoten und dem Tumor nach der Behandlung untersucht werden.

Teil VI

Ausblick

Anhand dieser Arbeit konnte vorerst gezeigt werden, dass Immunzytokine ein großes Potential für die Tumorthherapie darstellen, da sie das Immunsystem am Tumor reaktivieren können und zur Tumorreduktion beitragen können. Alle verwendeten Immunzytokine wiesen in dieser Arbeit eine stärkere Potenz Immunzellen zu aktivieren und Tumorzellen zu lysieren im Vergleich zu PankoMab-GEX® auf. Auf Grund der Kopplung eines Zytokins an PankoMab-GEX® ist es möglich den Antikörper zu optimieren. Das PM-IL-15sushi Immunzytokin ist ein geeignetes Produkt für die Tumorthherapie, da es sowohl *in vitro* eine gesteigerte Aktivierung, Proliferation und Zytotoxizität von Immunzellen, aber vor allem auch *in vivo* eine Tumorreduktion sowie Immunzellenanreicherung induzierte. Für die Verwendung von PM-IL-15sushi für die Therapie müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Neben den bereits erwähnten *in vivo* Studien sollten auch *in vitro* Analysen folgen, die für die weitere Charakterisierung des Immunzytokins durchgeführt werden sollten. Da Monozyten nach IL-15 Stimulation ihren Phänotyp ändern und zu dendritischen Zellen ausreifen, ist es wichtig, diese Entwicklung auch mit dem PM-IL-15sushi Immunzytokin zu untersuchen. Gleiches gilt für die Maturation der dendritischen Zellen nach IL-15 Stimulation. Die Entwicklung des CD4⁺/CD8⁺ T-Zellverhältnisses sowie des T_{reg}/T_{eff} Verhältnisses nach der Stimulation mit PM-IL-15sushi sollte ebenfalls untersucht werden. Dafür ist es entscheidend, eine gute Kinetik zu erstellen, wodurch der Verlauf dieser Effekte dargestellt werden kann. Um die Infiltration von Immunzellen zum PM-IL-15sushi Immunzytokin zu untersuchen, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Unter Verwendung von Trans-Well-Platten kann die Migration der PBMCs zum Immunzytokin analysiert werden. Bei Verwendung eines *in vitro* 3D-Modells kann die Infiltration von Immunzellen in die Tumorzellen in Abhängigkeit des PM-IL-15sushi Immunzytokins dargestellt werden. Als abschließende Untersuchung der durch PM-IL-15sushi induzierten Zytotoxizitäten sollte die Phagozytose betrachtet werden. Da bereits bekannt ist, dass PankoMab-GEX® Phagozytose induziert, ist zu klären, ob das PM-IL-15sushi Immunzytokin vergleichbar zum PankoMab-GEX® Phagozytose induzieren kann. Alle genannten Analysen dienen dazu die Wirkungsweise und die Verträglichkeit des PM-IL-15sushi genauer zu bestimmen, damit dieses Produkt als relevant und sicher in der Klinik eingesetzt werden kann. Ein weiterführender Ansatz könnte die Kombitherapie von Immunzytokinen und *Checkpoint* Antikörpern darstellen, da Immunzytokine die Wirksamkeit von *Checkpoint* Antikörpern erhöhen könnten. Durch die gezielte Aktivierung der CD8⁺T-Zellen durch das PM-IL-15sushi Immunzytokin ist denkbar, dass die Kombitherapie mit *Checkpoint* Antikörpern wie zum Beispiel

Tecentriq zu einem deutlicheren Tumorrückgang führen könnte. Inwieweit die Verwendung dieser starken Immunaktivierung ein Zytokinsturm und weitere Nebenwirkungen induziert, muss jedoch berücksichtigt und demzufolge sehr intensiv vorab untersucht werden.

Literatur

- [1] *Report zum Krebsgeschehen 2016*. Robert Koch Institut, 2016.
- [2] Report 2017. World Health Organization, 2017.
- [3] M Hollstein, D Sidransky, B Vogelstein, and CC Harris. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253 (5015):49–53, 1991.
- [4] J Albanell and J Baselga. Trastuzumab, a humanized anti-her2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*, 35:931–946, December 1999. ISSN 1699-3993.
- [5] A Buzdar, W Jonat, A Howell, SE Jones, C Blomqvist, CL Vogel, W Eiermann, JM Wolter, M Azab, A Webster, and PV Plourde. Anastrozole, a potent and selective aromatase inhibitor, versus megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer: results of overview analysis of two phase iii trials. arimidex study group. *Journal of Clinical Oncology*, 14(7):2000–2011, 1996.
- [6] M Carroll, S Ohno-Jones, S Tamura, E Buchdunger, J Zimmermann, NB Lydon, DG Gilliland, and BJ Druker. Cgp 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing bcr-abl, tel-abl, and tel-pdgfr fusion proteins. *Blood*, 90(12):4947–4952, 1997.
- [7] D R Anderson, A Grillo-López, C Varns, and K S Chambers. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-cd20 antibody (idec-c2b8) in the treatment of non-hodgkin's b-cell lymphoma. *Biochemical Society transactions*, 25:705–708, May 1997. ISSN 0300-5127.
- [8] LM Weiner, R Surana, and S Wang. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 10:317–327, May 2010. ISSN 1474-1741. doi: 10.1038/nri2744.
- [9] PV Beum, MA Lindorfer, F Beurskens, PT Stukenberg, HM Lokhorst, AW Pawluczkwycz, PWHI Parren, JGJ van de Winkel, and RP Taylor. Complement activation on b lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. *The Journal of Immunology*, 181(1):822–832, 2008. ISSN 0022-1767. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.822.
- [10] NF Delahaye, S Rusakiewicz, I Martins, C Ménard, S Roux, L Lyonnet, P Paul, M Sarabi, N Chaput, M Semeraro, V Minard-Colin, V Poirier-Colame, K Chaba, C Flament, V Baud, H Authier, S Kerdine-Römer, M Pallardy, I Cremer, L Peaudecerf, B Rocha, D Valteau-Couanet, JC Gutierrez, JA Nunès, F Commo, S Bonvalot, N Ibrahim, P Terrier, P Opolon, C Bottino, A Moretta, J Tavernier, P Rihet, JM Coindre, JY Blay, N Isambert, JF Emile, E Vivier, A Lecesne, G Kroemer, and L Zitvogel. Alternatively spliced nkp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature medicine*, 17:700–707, June 2011. ISSN 1546-170X. doi: 10.1038/nm.2366.
- [11] S Platonova, J Cherfils-Vicini, D Damotte, L Crozet, V Vieillard, P Validire, P André, MC Dieu-Nosjean, M Alifano, JF Régnerd, WH Fridman, C Sautès-Fridman, and I Cremer. Profound coordinated alterations of intratumoral nk cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer research*, 71:5412–5422, August 2011. ISSN 1538-7445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4179.
- [12] G Sconocchia, R Arriga, L Tornillo, L Terracciano, S Ferrone, and GC Spagnoli. Melanoma cells inhibit nk cell functions. *Cancer research*, 72:5428–9; author reply 5430, October 2012. ISSN 1538-7445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1181.
- [13] M Vitale, C Cantoni, G Pietra, MC Mingari, and L Moretta. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on nk-cell function. *European journal of immunology*, 44:1582–1592, June 2014. ISSN 1521-4141. doi: 10.1002/eji.201344272.

- [14] LM Francisco, VH Salinas, KE Brown, VK Vanguri, GJ Freeman, VK Kuchroo, and AH Sharpe. Pd-1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory t cells. *The Journal of experimental medicine*, 206:3015–3029, December 2009. ISSN 1540-9538. doi: 10.1084/jem.20090847.
- [15] L Shi, S Chen, L Yang, and Y Li. The role of pd-1 and pd-l1 in t-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*, 6:74, September 2013. ISSN 1756-8722. doi: 10.1186/1756-8722-6-74.
- [16] HT Lee, JY Lee, H Lim, SH Lee, JY Moon, HJ Pyo, SE Ryu, W Shin, and YS Heo. Molecular mechanism of pd-1/pd-l1 blockade via anti-pd-l1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Scientific reports*, 7:5532, July 2017. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-017-06002-8.
- [17] LA Raedler. Opdivo (nivolumab): second pd-1 inhibitor receives fda approval for unresectable or metastatic melanoma. *American health & drug benefits*, 8(Spec Feature):180, 2015.
- [18] N Rizvi, J Mazières, D Planchard, TE Stinchcombe, GK Dy, SJ Antonia, L Horn, H Lena, E Minenza, B Mennequier, GA Otterson, LT Campos, DR Gandara, BP Levy, SG Nair, G Zalcman, J Wolf, PJ Souquet, E Baldini, F Cappuzzo, C Chouaid, A Dowlati, R Sanborn, A Lopez-Chavez, C Grohe, RM Huber, CT Harbison, C Baudelet, BJ Lestini, and SS Ramalingam. Activity and safety of nivolumab, an anti-pd-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (checkmate 063): a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology*, 16(3):257–265, 2015.
- [19] S Lee and K Margolin. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3(4):3856–3893, 2011. ISSN 2072-6694. doi: 10.3390/cancers3043856.
- [20] E T Creagan, D L Ahmann, S Frytak, H J Long, M N Chang, and L M Itri. Phase ii trials of recombinant leukocyte a interferon in disseminated malignant melanoma: results in 96 patients. *Cancer treatment reports*, 70:619–624, May 1986. ISSN 0361-5960.
- [21] F Belardelli, M Ferrantini, E Proietti, and JM Kirkwood. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*, 13:119–134, April 2002. ISSN 1359-6101.
- [22] S Parlato, SM Santini, C Lapenta, T Di Pucchio, M Logozi, M Spada, AM Giammarioli, W Malorni, S Fais, and F Belardelli. Expression of ccr-7, mip-3beta, and th-1 chemokines in type i ifn-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood*, 98:3022–3029, November 2001. ISSN 0006-4971.
- [23] G Badr, G Borhis, D Treton, and Y Richard. Ifn α enhances human b-cell chemotaxis by modulating ligand-induced chemokine receptor signaling and internalization. *International Immunology*, 17(4):459–467, 2005. doi: 10.1093/intimm/dxh227.
- [24] T Zhang, HC Sun, HY Zhou, JT Luo, BL Zhang, P Wang, L Wang, LX Qin, N Ren, SL Ye, Q Li, and ZY Tang. Interferon alpha inhibits hepatocellular carcinoma growth through inducing apoptosis and interfering with adhesion of tumor endothelial cells. *Cancer letters*, 290:204–210, April 2010. ISSN 1872-7980. doi: 10.1016/j.canlet.2009.09.009.
- [25] R Dummer, C Garbe, JA Thompson, AM Eggermont, K Yoo, T Maier, and B Bergstrom. Randomized dose-escalation study evaluating peginterferon alfa-2a in patients with metastatic malignant melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24:1188–1194, March 2006. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/JCO.2005.04.3216.
- [26] S Bhatia, SS Tykodi, and JA Thompson. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park, N. Y.)*, 23:488–496, May 2009. ISSN 0890-9091.
- [27] SL Gaffen and KD Liu. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 28:109–123, November 2004. ISSN 1043-4666. doi: 10.1016/j.cyto.2004.06.010.

- [28] JB De Sanctis, I Blanca, and NE Bianco. Secretion of cytokines by natural killer cells primed with interleukin-2 and stimulated with different lipoproteins. *Immunology*, 90(4):526–533, 1997. ISSN 1365-2567. doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00174.x.
- [29] DJ Peace and MA Cheever. Toxicity and therapeutic efficacy of high-dose interleukin 2. in vivo infusion of antibody to nk-1.1 attenuates toxicity without compromising efficacy against murine leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 169:161–173, January 1989. ISSN 0022-1007.
- [30] E Assier, V Jullien, J Lefort, JL Moreau, JP Di Santo, BB Vargaftig, JR Lapa e Silva, and J Thèze. Nk cells and polymorphonuclear neutrophils are both critical for il-2-induced pulmonary vascular leak syndrome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172:7661–7668, June 2004. ISSN 0022-1767.
- [31] PH Krammer. Cd95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407:789–795, October 2000. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/35037728.
- [32] L Zheng, G Fisher, RE Miller, J Peschon, DH Lynch, and MJ Lenardo. Induction of apoptosis in mature t cells by tumour necrosis factor. *Nature*, 377(6547):348–351, 1995.
- [33] J Dhein, H Walczak, C Bäumler, KM Debatin, and PH Krammer. Autocrine t-cell suicide mediated by apo-1/(fas/cd95). *Nature*, 373(6513):438–441, 1995.
- [34] HK Sytwu, RS Liblau, and HO McDevitt. The roles of fas/apo-1 (cd95) and tnf in antigen-induced programmed cell death in t cell receptor transgenic mice. *Immunity*, 5(1):17–30, 1996.
- [35] MJ Martinez-Lorenzo, MA Alava, S Gamen, KJ Kim, A Chuntharapai, A Piñeiro, J Naval, and A Anel. Involvement of apo2 ligand/trail in activation-induced death of jurkat and human peripheral blood t cells. *European journal of immunology*, 28(9):2714–2725, 1998.
- [36] DA Hildeman, T Mitchell, TK Teague, P Henson, BJ Day, J Kappler, and PC Murrack. Reactive oxygen species regulate activation-induced t cell apoptosis. *Immunity*, 10(6):735–744, 1999.
- [37] ST Ju, DJ Panka, H Cui, R Ettinger, M el Khatib, DH Sherr, BZ Stanger, and A Marshak-Rothstein. Fas (cd95)/fasl interactions required for programmed cell death after t-cell activation. *Nature*, 373(6513):444–448, 1995.
- [38] MT Lotze, RJ Robb, SO Sharrow, LW Frana, and SA Rosenberg. Systemic administration of interleukin-2 in humans. *J Biol Response Mod.*, October 1984.
- [39] JG Giri, M Ahdieh, J Eisenman, K Shanebeck, K Grabstein, S Kumaki, A Namen, LS Park, D Cosman, and D Anderson. Utilization of the beta and gamma chains of the il-2 receptor by the novel cytokine il-15. *The EMBO journal*, 13(12):2822, 1994.
- [40] WE Carson, JG Giri, MJ Lindemann, ML Linett, M Ahdieh, R Paxton, D Anderson, J Eisenmann, K Grabstein, and MA Caligiuri. Interleukin (il) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the il-2 receptor. *The Journal of experimental medicine*, 180:1395–1403, October 1994. ISSN 0022-1007.
- [41] M Tsudo, RW Kozak, CK Goldman, and TA Waldmann. Demonstration of a non-tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24):9694–9698, 1986.
- [42] JG Giri, S Kumaki, MFDJ Ahdieh, DJ Friend, A Loomis, K Shanebeck, R DuBose, D Cosman, LS Park, and DM Anderson. Identification and cloning of a novel il-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the il-2 receptor. *The EMBO journal*, 14(15):3654, 1995.

- [43] X Wei, M Orchardson, JA Gracie, BP Leung, B Gao, H Guan, W Niedbala, GK Paterson, IB McInnes, and FY Liew. The sushi domain of soluble il-15 receptor α is essential for binding il-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*, 167(1):277–282, 2001.
- [44] C Bergamaschi, J Bear, M Rosati, RK Beach, C Alicea, R Sowder, E Chertova, SA Rosenberg, BK Felber, and GN Pavlakis. Circulating il-15 exists as heterodimeric complex with soluble il-15r α in human and mouse serum. *Blood*, 120(1):e1–e8, 2012.
- [45] S Dubois, J Mariner, TA Waldmann, and Y Tagaya. Il-15r α recycles and presents il-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*, 17(5):537–547, 2002.
- [46] PR Burkett, R Koka, M Chien, S Chai, DL Boone, and A Ma. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (il)-15r α and il-15 supports natural killer cell and memory cd8+ t cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 200(7):825–834, 2004.
- [47] A Mishra, L Sullivan, and MA Caligiuri. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20:2044–2050, April 2014. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3603.
- [48] F Mattei, G Schiavoni, F Belardelli, and DF Tough. Il-15 is expressed by dendritic cells in response to type i ifn, double-stranded ma, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167:1179–1187, August 2001. ISSN 0022-1767.
- [49] JX Lin, TS Migone, M Tseng, M Friedmann, JA Weatherbee, L Zhou, A Yamauchi, ET Bloom, J Mietz, S John, and WJ Leonard. The role of shared receptor motifs and common stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by il-2, il-4, il-7, il-13, and il-15. *Immunity*, 2(4):331–339, 1995.
- [50] T Miyazaki, A Kawahara, H Fujii, Y Nakagawa, Y Minami, ZJ Liu, I Oishi, O Silvennoinen, BA Witthuhn, and JN Ihle. Functional activation of jak1 and jak3 by selective association with il-2 receptor subunits. *Science New York then Washington*, pages 1045–1045, 1994.
- [51] T Taniguchi, T Miyazaki, Y Minami, A Kawahara, H Fujii, Y Nakagawa, M Hatakeyama, and ZJ Liu. Il-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the il-2 receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766(1):235–244, 1995. ISSN 1749-6632. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb26671.x.
- [52] JM Adams and S Cory. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381):1322–1326, 1998. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.281.5381.1322.
- [53] M Laplante and DM Sabatini. mtor signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2):274 – 293, 2012. ISSN 0092-8674. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
- [54] WE Carson, ME Ross, RA Baiocchi, MJ Marien, N Boiani, K Grabstein, and MA Caligiuri. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 96:2578–2582, December 1995. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI118321.
- [55] EE Rosmaraki, I Douagi, C Roth, F Colucci, A Cumano, and JP Di Santo. Identification of committed nk cell progenitors in adult murine bone marrow. *European journal of immunology*, 31(6):1900–1909, 2001.
- [56] L Zamai, G Del Zotto, F Buccella, L Galeotti, B Canonico, F Luchetti, and S Papa. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human cd56(bright) nk cells differentiated in vitro from cd34+ hematopoietic progenitors. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81:294–302, April 2012. ISSN 1552-4930. doi: 10.1002/cyto.a.22025.

- [57] A Poli, T Michel, M Thérésine, E Andrès, F Hentges, and J Zimmer. Cd56bright natural killer (nk) cells: an important nk cell subset. *Immunology*, 126:458–465, April 2009. ISSN 1365-2567. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
- [58] WE Carson, TA Fehniger, and MA Caligiuri. Cd56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *European journal of immunology*, 27: 354–360, February 1997. ISSN 0014-2980. doi: 10.1002/eji.1830270203.
- [59] A Chan, DL Hong, A Atzberger, S Kollnberger, AD Filer, CD Buckley, A McMichael, T Enver, and P Bowness. Cd56bright human nk cells differentiate into cd56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179:89–94, July 2007. ISSN 0022-1767.
- [60] CI Domaica, MB Fuertes, I Uriarte, MV Girart, J Sardanons, DI Comas, DD Giovanni, MI Gaillard, L Bezrodnik, and NW Zwirner. Human natural killer cell maturation defect supports in vivo cd56(bright) to cd56(dim) lineage development. *PloS one*, 7:e51677, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0051677.
- [61] ND Huntington, N Legrand, NL Alves, B Jaron, K Weljer, A Plet, E Corcuff, E Mortier, Y Jacques, H Spits, and J Di Santo. Il-15 trans-presentation promotes human nk cell development and differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 206:25–34, January 2009. ISSN 1540-9538. doi: 10.1084/jem.20082013.
- [62] C Romagnani, K Juelke, M Falco, B Morandi, A D’Agostino, R Costa, G Ratto, G Forte, P Carrega, G Lui, R Conte, T Strowig, A Moretta, C Münz, A Thiel, L Moretta, and G Ferlazzo. Cd56brightcd16- killer ig-like receptor- nk cells display longer telomeres and acquire features of cd56dim nk cells upon activation. *The Journal of Immunology*, 178(8):4947–4955, 2007.
- [63] A Cerwenka and LL Lanier. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews. Immunology*, 16:112–123, February 2016. ISSN 1474-1741. doi: 10.1038/nri.2015.9.
- [64] R Evans, JA Fuller, G Christianson, DM Krupke, and AB Troutt. Il-15 mediates anti-tumor effects after cyclophosphamide injection of tumor-bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: the potential role of nk cell subpopulations. *Cellular immunology*, 179(1):66–73, 1997.
- [65] S Dubois, HJ Patel, M Zhang, TA Waldmann, and JR Müller. Preassociation of il-15 with il-15 α -igg1-fc enhances its activity on proliferation of nk and cd8+/cd44high t cells and its antitumor action. *The Journal of Immunology*, 180(4):2099–2106, 2008.
- [66] A Mishra, S Liu, GH Sams, DP Curphey, R Santhanam, LJ Rush, D Schaefer, LG Falkenberg, L Sullivan, L Jaroncyk, X Yang, H Fisk, LC Wu, JC Chandler, YZ Wu, NA Heerema, KK Chan, D Perrotti, Y Zhang, P Porcu, HK Racke, R Garzon, RJ Lee, G Marcucci, and MA Caligiuri. Aberrant overexpression of il-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and dna hypermethylation. *Cancer cell*, 22(5):645–655, 2012.
- [67] CA Klebanoff, SE Finkelstein, DR Surman, MK Lichtman, L Gattinoni, MR Theoret, N Grewal, PJ Spiess, PA Antony, DC Palmer, Y Tagaya, SA Rosenberg, TA Waldmann, and NP Restifo. Il-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive cd8+ t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7):1969–1974, 2004.
- [68] MC Sneller, WC Kopp, KJ Engelke, JL Yovandich, SP Creekmore, TA Waldmann, and HC Lane. Il-15 administered by continuous infusion to rhesus macaques induces massive expansion of cd8+ t effector memory population in peripheral blood. *Blood*, 118(26):6845–6848, 2011.
- [69] KC Conlon, E Lugli, HC Welles, SA Rosenberg, AT Fojo, JC Morris, TA Fleisher, SP Dubois, LP Perera, DM Stewart, CK Goldman, BR Bryant, JM Decker, J Chen, TA Worthy, WD Figg, CJ Peer, MC Sneller,

- HC Lane, JL Yovandich, SP Creekmore, M Roederer, and TA Waldmann. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and cd8 t cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *Journal of clinical oncology*, 33(1): 74–82, 2014.
- [70] K Han, X Zhu, B Liu, E Jeng, L Kong, JL Yovandich, VV Vyas, WD Marcus, PA Chavaillaz, CA Romero, PR Rhode, and HC Wong. Il-15:il-15 receptor alpha superagonist complex: High-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine*, 56(3):804 – 810, 2011. ISSN 1043-4666. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.028>.
- [71] X Zhu, WD Marcus, W Xu, HI Lee, K Han, JO Egan, J Yovandich, P Rhode, and HC Wong. Novel human interleukin-15 agonists. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183:3598–3607, September 2009. ISSN 1550-6606. doi: 10.4049/jimmunol.0901244.
- [72] R Romee, S Cooley, MM Berrien-Elliott, P Westervelt, MR Verneris, JE Wagner, DJ Weisdorf, BR Blazar, C Ustun, TE DeFor, S Vivek, L Peck, JF DiPersio, AF Cashen, R Kylo, A Musiek, A Schaffer, MJ Anadkat, I Rosman, D Miller, JO Egan, EK Jeng, A Rock, H Wong, TA Fehniger, and JS Miller. First-in-human phase 1 clinical study of the il-15 superagonist complex alt-803 to treat relapse after transplantation. *Blood*, pages blood–2017, 2018.
- [73] M Rosario, B Liu, L Kong, LI Collins, SE Schneider, X Chen, K Han, EK Jeng, PR Rhode, JW Leong, T Schappe, BA Jewell, CR Keppel, K Shah, B Hess, R Romee, DR Piwnica-Worms, AF Cashen, NL Bartlett, HC Wong, and TA Fehniger. The il-15-based alt-803 complex enhances fc γ riiia-triggered nk cell responses and in vivo clearance of b cell lymphomas. *Clinical Cancer Research*, 22(3):596–608, 2016.
- [74] G Trinchieri. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of t-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*, 84(12):4008–4027, 1994.
- [75] M Aste-Amezaga, A D’Andrea, M Kubin, and G Trinchieri. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human t and nk cells. *Cellular immunology*, 156(2):480–492, 1994.
- [76] B Perussia, SH Chan, A D’andrea, K Tsuji, D Santoli, M Pospisil, D Young, SF Wolf, and G Trinchieri. Natural killer (nk) cell stimulatory factor or il-12 has differential effects on the proliferation of tcr-alpha beta+, tcr-gamma delta+ t lymphocytes, and nk cells. *The Journal of Immunology*, 149(11):3495–3502, 1992.
- [77] G Trinchieri. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(2):133–146, 2003.
- [78] TW Salcedo, L Azzoni, SF Wolf, and B Perussia. Modulation of perforin and granzyme messenger rna expression in human natural killer cells. *The Journal of Immunology*, 151(5):2511–2520, 1993.
- [79] T Yoshimoto, K Takeda, T Tanaka, K Ohkusu, S Kashiwamura, H Okamura, S Akira, and K Nakanishi. Il-12 up-regulates il-18 receptor expression on t cells, th1 cells, and b cells: synergism with il-18 for ifn- γ production. *The Journal of Immunology*, 161(7):3400–3407, 1998.
- [80] S Nakamura, T Otani, R Okura, Y Ijiri, R Motoda, M Kurimoto, and K Orita. Expression and responsiveness of human interleukin-18 receptor (il-18r) on hematopoietic cell lines. *Leukemia*, 14(6):1052, 2000.
- [81] H Okamura, H Tsutsui, T Komatsu, M Yutsudo, A Hakura, T Tanimoto, K Torigoe, T Okura, Y Nukada, and K Hattori. Cloning of a new cytokine that induces ifn- γ production by t cells. *Nature*, 378(6552):88–91, 1995.
- [82] Z Liu, H Wang, W Xiao, C Wang, G Liu, and T Hong. Thyrocyte interleukin-18 expression is up-regulated by interferon- γ and may contribute to thyroid destruction in hashimoto’s thyroiditis. *International journal of experimental pathology*, 91(5):420–425, 2010.

- [83] C Phenekos, A Vryonidou, AD Gritzapis, CN Baxevanis, M Goula, and M Papamichail. Th1 and th2 serum cytokine profiles characterize patients with hashimoto's thyroiditis (th1) and graves' disease (th2). *Neuroimmunomodulation*, 11(4):209–213, 2004.
- [84] MG Netea, BJ Kullberg, I Verschueren, and JWM Van der Meer. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1 β . *European journal of immunology*, 30(10):3057–3060, 2000.
- [85] J Parrish-Novak, SR Dillon, A Nelson, A Hammond, C Sprecher, JA Gross, J Johnston, K Madden, W Xu, J West, S Schrader, S Burkhead, M Heipel, C Brandt, JL Kuijper, J Kramer, D Conklin, SR Presnell, J Berry, F Shiota, S Bort, K Hambly, S Mudri, C Clegg, M Moore, F Grant, C Lofton-Day, T Gilbert, F Rayond, A Ching, L Yao, D Smith, P Webster, T Whitmore, M Maurer, K Kaushansky, RD Holly, and Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in nk cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 408(6808):57–63, 2000.
- [86] F Vallières and D Girard. Il-21 enhances phagocytosis in mononuclear phagocyte cells: identification of spleen tyrosine kinase as a novel molecular target of il-21. *The Journal of Immunology*, 190(6):2904–2912, 2013.
- [87] R Spolski and WJ Leonard. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 26:57–79, 2008.
- [88] N Steele, A Anthony, M Saunders, B Esmarck, E Ehrnrooth, PEG Kristjansen, A Nihlen, LT Hansen, and J Cassidy. A phase 1 trial of recombinant human il-21 in combination with cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, 106(5):793–798, 2012.
- [89] A Ziblat, CI Domaica, RG Spallanzani, XLR Iraolagoitia, LE Rossi, DE Avila, NI Torres, MB Fuertes, and NW Zwirner. Il-27 stimulates human nk-cell effector functions and primes nk cells for il-18 responsiveness. *European journal of immunology*, 45(1):192–202, 2015.
- [90] T Yoshimoto, K Okada, N Morishima, S Kamiya, T Owaki, M Asakawa, Y Iwakura, F Fukai, and J Mizuguchi. Induction of igg2a class switching in b cells by il-27. *The Journal of Immunology*, 173(4):2479–2485, 2004.
- [91] M Hisada, S Kamiya, K Fujita, ML Belladonna, T Aoki, Y Koyanagi, J Mizuguchi, and T Yoshimoto. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer research*, 64(3):1152–1156, 2004.
- [92] R Salcedo, JK Stauffer, E Lincoln, TC Back, JA Hixon, C Hahn, K Shafer-Weaver, A Malyguine, R Kastelein, and JM Wigginton. Il-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for cd8+ t cells. *The Journal of Immunology*, 173(12):7170–7182, 2004.
- [93] B Liu, L Kong, K Han, H Hong, WD Marcus, X Chen, EK Jeng, S Alter, X Zhu, MP Rubinstein, S Shi, PR Rhode, W Cai, and HC Wong. A novel fusion of alt-803 (interleukin (il)-15 superagonist) with an antibody demonstrates antigen-specific antitumor responses. *Journal of Biological Chemistry*, 291(46):23869–23881, 2016.
- [94] C Vaccaro, J Zhou, RJ Ober, and ES Ward. Engineering the fc region of immunoglobulin g to modulate in vivo antibody levels. *Nature biotechnology*, 23:1283–1288, October 2005. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/nbt1143.
- [95] B Carnemolla, L Borsi, E Balza, P Castellani, R Meazza, A Berndt, S Ferrini, H Kosmehl, D Neri, and L Zardi. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 99:1659–1665, March 2002. ISSN 0006-4971.
- [96] L Borsi, E Balza, B Carnemolla, F Sassi, P Castellani, A Berndt, H Kosmehl, A Biro, A Siri, P Orecchia, J Grassi, D Neri, and L Zardi. Selective targeted delivery of tnfa to tumor blood vessels. *Blood*, 102:4384–4392, December 2003. ISSN 0006-4971. doi: 10.1182/blood-2003-04-1039.

- [97] C Halin, S Rondini, F Nilsson, A Berndt, H Kosmehl, L Zardi, and D Neri. Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nature biotechnology*, 20:264–269, March 2002. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/nbt0302-264.
- [98] C Halin, V Gafner, ME Villani, L Borsi, A Berndt, H Kosmehl, L Zardi, and D Neri. Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha. *Cancer research*, 63:3202–3210, June 2003. ISSN 0008-5472.
- [99] JL Hornick, LA Khawli, P Hu, J Sharifi, C Khanna, and AL Epstein. Pretreatment with a monoclonal antibody/interleukin-2 fusion protein directed against dna enhances the delivery of therapeutic molecules to solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5:51–60, January 1999. ISSN 1078-0432.
- [100] C Klein, I Waldhauer, VG Nicolini, A Freimoser-Grundschober, T Nayak, DJ Vugts, C Dunn, M Bolijn, J Benz, M Stihle, S Lang, M Roemmele, T Hofer, E van Puijenbroek, D Wittig, S Moser, O Ast, P Brünker, IH Gorr, S Neumann, MC de Vera Mudry, H Hinton, F Crameri, J Saro, S Evers, C Gerdes, M Bacac, G van Dongen, E Moessner, and P Umaña. Cergutuzumab amunaleukin (cea-il2v), a cea-targeted il-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional il-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology*, 6:e1277306, 2017. ISSN 2162-4011. doi: 10.1080/2162402X.2016.1277306.
- [101] MM van den Heuvel, M Verheij, R Boshuizen, J Belderbos, AM Dingemans, D De Ruyscher, J Laurent, R Tighe, J Haanen, and S Quarantino. Nhs-il2 combined with radiotherapy: preclinical rationale and phase ib trial results in metastatic non-small cell lung cancer following first-line chemotherapy. *Journal of translational medicine*, 13:32, January 2015. ISSN 1479-5876. doi: 10.1186/s12967-015-0397-0.
- [102] T Hemmerle, P Probst, L Giovannoni, AJ Green, T Meyer, and D Neri. The antibody-based targeted delivery of tnf in combination with doxorubicin eradicates sarcomas in mice and confers protective immunity. *British journal of cancer*, 109:1206–1213, September 2013. ISSN 1532-1827. doi: 10.1038/bjc.2013.421.
- [103] K Schwager, T Hemmerle, D Aebischer, and D Neri. The immunocytokine I19-il2 eradicates cancer when used in combination with ctla-4 blockade or with I19-tnf. *The Journal of investigative dermatology*, 133:751–758, March 2013. ISSN 1523-1747. doi: 10.1038/jid.2012.376.
- [104] C Schliemann, A Palumbo, K Zuberbühler, A Villa, M Kaspar, E Trachsel, W Klapper, HD Menssen, and D Neri. Complete eradication of human b-cell lymphoma xenografts using rituximab in combination with the immunocytokine I19-il2. *Blood*, 113:2275–2283, March 2009. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2008-05-160747.
- [105] JS Miller, S Cooley, S Holtan, M Arora, C Ustun, E Jeng, HC Wong, MR Verneris, JE Wagner, DJ Weisdorf, BR Blazar, TA Fehniger, and R Romee. First-in-human phase i dose escalation trial of il-15n72d/il-15r α -fc superagonist complex (alt-803) demonstrates immune activation with anti-tumor activity in patients with relapsed hematological malignancy. *Presented at 57th Annual Meeting and Exposition American Society of Hematology, Orlando 5.-8.12.2015*, 2015.
- [106] SJ Gendler and AP Spicer. Epithelial mucin genes. *Annual review of physiology*, 57:607–634, 1995. ISSN 0066-4278. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003135.
- [107] S Zotter. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev*, 11:55–101, 1988.
- [108] W Brugger, HJ Bühring, F Grünebach, W Vogel, S Kaul, R Müller, TH Brümmendorf, BL Ziegler, I Rappold, P Brossart, S Scheduling, and L Kanz. Expression of muc-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17:1535–1544, May 1999. ISSN 0732-183X. doi: 10.1200/JCO.1999.17.5.1535.

- [109] S Nath and P Mukherjee. Muc1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in molecular medicine*, 20:332–342, June 2014. ISSN 1471-499X. doi: 10.1016/j.molmed.2014.02.007.
- [110] SJ Gendler, CA Lancaster, J Taylor-Papadimitriou, T Duhig, N Peat, J Burchell, L Pemberton, EN Lalani, and D Wilson. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *The Journal of biological chemistry*, 265:15286–15293, September 1990. ISSN 0021-9258.
- [111] RR Parmley and SJ Gendler. Cystic fibrosis mice lacking muc1 have reduced amounts of intestinal mucus. *The Journal of clinical investigation*, 102:1798–1806, November 1998. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI3820.
- [112] J Wesseling, SW van der Valk, HL Vos, A Sonnenberg, and J Hilkens. Episialin (muc1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *The Journal of cell biology*, 129:255–265, April 1995. ISSN 0021-9525.
- [113] SE Baldus, K Engelmann, and FG Hanisch. Muc1 and the mucins: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 41:189–231, 2004. ISSN 1040-8363. doi: 10.1080/10408360490452040.
- [114] U Karsten, S von Mensdorff-Pouilly, and S Goletz. What makes muc1 a tumor antigen? *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 26:217–220, 2005. ISSN 1010-4283. doi: 10.1159/000086956.
- [115] A Danielczyk, R Stahn, D Faulstich, A Löffler, A Märten, U Karsten, and S Goletz. Pankomab: a potent new generation anti-tumour muc1 antibody. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(11):1337–1347, 2006.
- [116] A Kuemmel, K Single, F Bittinger, A Faldum, LH Schmidt, M Sebastian, P Micke, C Taube, R Buhl, and R Wiewrodt. Ta-muc1 epitope in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 63(1):98–105, 2009.
- [117] D Dian, M Lenhard, D Mayr, S Heublein, U Karsten, S Goletz, C Kuhn, I Wiest, K Friese, T Weissenbacher, and U Jeschke. Staining of muc1 in ovarian cancer tissues with pankomab-gex detecting the tumour-associated epitope, ta-muc1, as compared to antibodies hmfg-1 and 115d8. *Histol Histopathol*, 28(2): 239–44, 2013.
- [118] S Heublein, D Mayr, M Egger, U Karsten, S Goletz, M Angele, J Gallwas, U Jeschke, and N Ditsch. Immunoreactivity of the fully humanized therapeutic antibody pankomab-gex™ is an independent prognostic marker for breast cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1):50, 2015.
- [119] W Fiedler, S DeDosso, S Cresta, J Weidmann, A Tessari, M Salzberg, B Dietrich, H Baumeister, S Goletz, L Gianni, and C Sessa. A phase I study of pankomab-gex, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific muc1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas. *European Journal of Cancer*, 63:55–63, 2016.
- [120] J Ledermann, J Sehouli, B Zurawski, F Raspagliesi, U De Giorgi, S Banerjee, J Arranz Arija, M Romeo Marin, A Lisyanskaya, RL Poka, S Mihutiu, J Markowska, C Cebotaru, A Casado Herraes, N Colombo, N Kovalenko, E Kutarska, M Hall, R Belli, and A Zurlo. Lba41a double-blind, placebo-controlled, randomized, phase 2 study to evaluate the efficacy and safety of switch maintenance therapy with the anti-ta-muc1 antibody pankomab-gex after chemotherapy in patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Annals of Oncology*, 28(suppl_5), 2017.
- [121] T Worzfeld, E Pogge von Strandmann, M Huber, T Adhikary, U Wagner, S Reinartz, and R Müller. The unique molecular and cellular microenvironment of ovarian cancer. *Frontiers in oncology*, 7:24, 2017. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2017.00024.
- [122] RJ Kaufman. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods in enzymology*, 185:537–566, 1990.

- [123] S de la Luna, I Soria, D Pulido, J Ortín, and A Jiménez. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene*, 62(1):121–126, 1988.
- [124] Beth A Pulaski and Suzanne Ostrand-Rosenberg. Mouse 4t1 breast tumor model. *Current protocols in immunology*, 39(1):20–2, 2000.
- [125] J Bernard, C Harb, E Mortier, A Quémener, RH Meloen, C Vermot-Desroches, J Wijdeness, P van Dijken, J Grötzinger, JW Slootstra, A Plet, and Y Jacques. Identification of an interleukin-15 α receptor-binding site on human interleukin-15. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23):24313–24322, 2004.
- [126] M Kawashima and P Miossec. Decreased response to il-12 and il-18 of peripheral blood cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 6(1):R39, 2003.
- [127] K Skak, KS Frederiksen, and D Lundsgaard. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology*, 123(4):575–583, 2008.
- [128] SJ Lin, HC Chao, and ML Kuo. The effect of interleukin-12 and interleukin-15 on cd69 expression of t-lymphocytes and natural killer cells from umbilical cord blood. *Neonatology*, 78(3):181–185, 2000.
- [129] MT Kasaian, MJ Whitters, LL Carter, LD Lowe, JM Jussif, B Deng, KA Johnson, JS Witek, M Senices, RF Konz, AL Wurster, DD Donaldson, M Collins, DA Young, and MJ Grusby. Il-21 limits nk cell responses and promotes antigen-specific t cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity*, 16(4):559–569, 2002.
- [130] R Zeng, R Spolski, SE Finkelstein, S Oh, PE Kovanen, CS Hinrichs, CA Pise-Masison, MF Radonovich, JN Brady, NP Restifo, JA Berzofsky, and WJ Leonard. Synergy of il-21 and il-15 in regulating cd8+ t cell expansion and function. *Journal of Experimental Medicine*, 201(1):139–148, 2005.
- [131] M Kobayashi, L Fitz, M Ryan, RM Hewick, C Clark, S Chan, R Loudon, F Sherman, B Perussia, and G Trinchieri. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (nksf), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 170(3):827–845, 1989.
- [132] SF Wolf, PA Temple, M Kobayashi, D Young, M Diczig, L Lowe, R Dzialo, L Fitz, C Ferenz, and RM Hewick. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on t and natural killer cells. *The Journal of Immunology*, 146(9):3074–3081, 1991.
- [133] K Argentati, B Bartozzi, G Bernardini, and G Di Stasio. Induction of natural killer cell activity and perforin and granzyme b gene expression following continuous culture of short pulse with interleukin-12 in young and old mice. *European cytokine network*, 11(1):59–66, 2000.
- [134] AH Pillet, F Bugault, J Thèze, LA Chakrabarti, and T Rose. A programmed switch from il-15-to il-2-dependent activation in human nk cells. *The Journal of Immunology*, 182(10):6267–6277, 2009.
- [135] GHS Richter, A Mollweide, K Hanewinkel, C Zobywalski, and S Burdach. Cd25 blockade protects t cells from activation-induced cell death (aicd) via maintenance of toso expression. *Scandinavian journal of immunology*, 70:206–215, September 2009. ISSN 1365-3083. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02281.x.
- [136] B Chaudhary and E Elkord. Regulatory t cells in the tumor microenvironment and cancer progression: role and therapeutic targeting. *Vaccines*, 4(3):28, 2016.
- [137] C Kellner, S Derer, T Valerius, and M Peipp. Boosting adcc and cdc activity by fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods*, 65(1):105–113, January 2014.
- [138] AS Rosenberg. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *The AAPS journal*, 8(3):E501–E507, 2006.

- [139] R Schoonjans, A Willems, S Schoonooghe, W Fiers, J Grooten, and N Mertens. Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives. *The Journal of Immunology*, 165(12):7050–7057, 2000.
- [140] J Schanzer, A Jekle, J Nezu, A Lochner, R Croasdale, M Dioszegi, J Zhang, E Hoffmann, W Dormeyer, J Stracke, W Schäfer, C Ji, G Heilek, N Cammack, M Brandt, P Umana, and U Brinkmann. Development of tetravalent, bispecific ccr5 antibodies with antiviral activity against ccr5 monoclonal antibody-resistant hiv-1 strains. *Antimicrob Agents Chemother.*, 55(5):2369–2378, May 2011.
- [141] E Mortier, A Quéméner, P Vusio, I Lorenzen, Y Boublik, J Grötzinger, A Plet, and Y Jacques. Soluble interleukin-15 receptor alpha (il-15r alpha)-sushi as a selective and potent agonist of il-15 action through il-15r beta/gamma. hyperagonist il-15 x il-15r alpha fusion proteins. *The Journal of biological chemistry*, 281:1612–1619, January 2006. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M508624200.
- [142] RO Dillman, JC Beauregard, M Jamieson, D Amox, and SE Halpern. Toxicities associated with monoclonal antibody infusions in cancer patients. *Molecular biotherapy*, 1(2):81–85, 1988.
- [143] I González-Álvaro, C Domínguez-Jiménez, AM Ortiz, V Núñez-González, P Roda-Navarro, E Fernández-Ruiz, D Sancho, and F Sánchez-Madrid. Interleukin-15 and interferon- γ participate in the cross-talk between natural killer and monocytic cells required for tumour necrosis factor production. *Arthritis research & therapy*, 8(4):R88, 2006.
- [144] IB McInnes, BP Leung, RD Sturrock, M Field, and FY Liew. Interleukin-15 mediates t cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nature medicine*, 3(2):189–195, 1997.
- [145] EM Bluman, KJ Bartynski, BR Avalos, and MA Caligiuri. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *The Journal of clinical investigation*, 97(12):2722–2727, 1996.
- [146] L Chatenoud, C Ferran, C Legendre, I Thouard, S Merite, A Reuter, Y Gevaert, H Kreis, P Franchimont, and JF Bach. In vivo cell activation following okt3 administration. systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation*, 49(4):697–702, 1990.
- [147] Lucienne Chatenoud and Jeffrey A Bluestone. Cd3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 7(8):622, 2007.
- [148] PR Rhode, JO Egan, W Xu, H Hong, GM Webb, X Chen, B Liu, X Zhu, J Wen, L You, L Kong, AC Edwards, K Han, S Shi, S Alter, JB Sacha, EK Jeng, W Cai, and HC Wong. Comparison of the superagonist complex, alt-803, to il15 as cancer immunotherapeutics in animal models. *Cancer immunology research*, 4:49–60, January 2016. ISSN 2326-6074. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0093-T.
- [149] HA Young and KJ Hardy. Role of interferon- γ in immune cell regulation. *Journal of Leukocyte biology*, 58(4):373–381, 1995.
- [150] AW Burgess and D Metcalf. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*, 56(6):947–958, 1980.
- [151] H Yoshimura, M Hotta, A Satake, and S Nomura. Gm-csf therapy expands regulatory t cells and protects against chronic graft versus host disease, 2016.
- [152] TJ Schall, K Bacon, RD Camp, JW Kaspari, and DV Goeddel. Human macrophage inflammatory protein alpha (mip-1 alpha) and mip-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 177(6):1821–1826, 1993.
- [153] DD Taub, K Conlon, AR Lloyd, JJ Oppenheim, and DJ Kelvin. Preferential migration of activated cd4+ and cd8+ t cells in response to mip-1 alpha and mip-1 beta. *Science*, 260(5106):355–358, 1993.

- [154] AA Maghazachi, A Al-Aoukaty, and TJ Schall. Cc chemokines induce the chemotaxis of nk and il-2-activated nk cells. role for g proteins. *The Journal of Immunology*, 153(11):4969–4977, 1994.
- [155] K Haranaka, N Satomi, and A Sakurai. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (tnf) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *International journal of cancer*, 34(2):263–267, 1984.
- [156] HC Kelker, JD Oppenheim, D Stone-Wolff, D Henriksen-DeStefano, BB Aggarwal, HC Stevenson, and J Vilcek. Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin. *International journal of cancer*, 36(1):69–73, 1985.
- [157] MJ Borrok, ST Jung, TH Kang, AF Monzingo, and G Georgiou. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human igg fc. *ACS chemical biology*, 7(9):1596–1602, 2012.
- [158] Ganesh P Subedi and Adam W Barb. The structural role of antibody n-glycosylation in receptor interactions. *Structure*, 23(9):1573–1583, 2015.
- [159] Yoshitake Sakae, Tadashi Satoh, Hirokazu Yagi, Saeko Yanaka, Takumi Yamaguchi, Yuya Isoda, Shigeru Iida, Yuko Okamoto, and Koichi Kato. Conformational effects of n-glycan core fucosylation of immunoglobulin g fc region on its interaction with fc γ receptor iiia. *Scientific reports*, 7(1):13780, 2017.
- [160] HB Fleit, SD Wright, and JC Unkeless. Human neutrophil fc gamma receptor distribution and structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10):3275–3279, 1982.
- [161] YT Bryceson, ME March, HG Ljunggren, and EO Long. Synergy among receptors on resting nk cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1):159–166, 2006.
- [162] F Borrego, J Peña, and R Solana. Regulation of cd69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase c and protein tyrosine kinases. *European journal of immunology*, 23(5):1039–1043, 1993.
- [163] HS Warren and BF Kinnear. Quantitative analysis of the effect of cd16 ligation on human nk cell proliferation. *The Journal of Immunology*, 162(2):735–742, 1999. ISSN 0022-1767.
- [164] E Chertova, C Bergamaschi, O Chertov, R Sowder, J Bear, JD Roser, RK Beach, JD Lifson, BK Felber, and GN Pavlakis. Characterization and favorable in vivo properties of heterodimeric soluble il-15-il-15 α cytokine compared to il-15 monomer. *The Journal of biological chemistry*, 288:18093–18103, June 2013. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M113.461756.
- [165] C Yin, X Pei, H Shen, Y Gao, X Sun, W Wang, Q Ge, and Y Zhang. Thymic homing of activated cd4+ t cells induces degeneration of the thymic epithelium through excessive rank signaling. *Scientific reports*, 7(2421), 2017.
- [166] DB Agus, CD Surh, and J Sprent. Reentry of t cells to the adult thymus is restricted to activated t cells. *Journal of Experimental Medicine*, 173(5):1039–1046, 1991.
- [167] J Agrewala, D Brown, N Lepak, D Duso, G Huston, and S Swain. Unique ability of activated cd4+ t cells but not rested effectors to migrate to non-lymphoid sites in the absence of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9):6106–6115, 2007.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Antigen binding capacity</i>	HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	IFN	Interferon
ADCP	<i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i>	IgG	Immunglobulin G
ATP	Adenosintriphosphat	LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	MOPC	<i>Mouse IgG1 Isotype Control</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>	MTD	Maximal tolerierte Dosis
C _H 3	<i>Constant heavy chain 3</i>	NK	Natürliche Killerzelle
CTV	<i>CellTrace Violet</i>	NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	OD	Optische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid	OKT3	Muromonab-CD3
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
DSP	<i>Down Stream Process</i>	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
E:T	<i>Effector : target cell ratio</i>	PM	PankoMab-GEX®
EC50	<i>Half maximal effective concentration</i>	POD	Peroxidase
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	rhIL	Rekombinant humanes Interleukin
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>	RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable region</i>	SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
FcγRIIIa	<i>Low-affinity Fc receptor for immune-complexed IgG</i>	SEM	<i>Standard error of the mean</i>
Fc _γ KO	<i>FcγRIII binding knock out</i>	T	T-Lymphozyt
FcRn	<i>Neonatal Fc receptor</i>	TA-MUC1	<i>Tumor-associated Mucin 1</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
(G4S) ₄	GGGGS Linker	TNF	Tumornekrosefaktor
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>	ULOQ	<i>Upper limit of quantification</i>

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laura Maria Dix, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung und Charakterisierung eines Immunzytokins basierend auf PankoMab-GEX® zur Optimierung der Tumortherapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum / Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Laura Maria Dix hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Laura Dix, Patrik Kehler, Anika Jäkel, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk, Comprehensive characterization of IL-15-based tumor targeted Immunocytokines, CIMT- Cancer Immunotherapy Konferenz, 16.05.2018

Beitrag im Einzelnen: Ich, Laura Maria Dix, habe am 16.05.2018 im Rahmen der CIMT Konferenz ein Poster mit dem Titel “Comprehensive characterization of IL-15-based tumor targeted Immunocytokines” präsentiert. Das Poster enthielt die in dieser Arbeit ebenfalls dargestellten Abbildungen 19, 22, 24, 26, 28 und 29. Alle dargestellten Daten habe ich selbst generiert.

Datum / Stempel/ Unterschrift des Betreuers

Datum/ Unterschrift der Doktorandin

Publikationsliste

Patent:

Patent eingereicht 03/2018 im Europäischen Patentamt „Fusion protein constructs comprising an anti-MUC1 antibody and IL-15“

Johanna Rühmann, Patrik Kehler, Anika Jäkel, Laura Dix, Antje Danielczyk, Steffen Goletz
Veröffentlichung 2019

Poster:

CIMT Annual Meeting 16.05.2018 Mainz „Comprehensive Characterization of IL-15-based tumor targeted Immunocytokines“

Laura Dix, Patrik Kehler, Anika Jäkel, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk

Lebenslauf

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Steffen Goletz, der mir die Möglichkeit gab dieses Thema bei der Glycotope GmbH zu bearbeiten. Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Gerald Grütz für die sehr gute Betreuung auf Seiten der Charité, wodurch mir die Promotion überhaupt ermöglicht wurde. In unsere fachlichen Gespräche brachte er immer ratsame Anmerkungen ein, welche mir weitere Ansatzpunkte für die Gestaltung der Arbeit gaben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Patrik Kehler, da er mir von der Projektidee bis zur Abgabe der Arbeit mit seiner unendlichen Geduld sowie mit Rat und Tat zur Seite stand. Dabei hat er mir viele Freiheiten gegeben und ließ mich zugleich durch seine hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken. Auch die nicht-wissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben mich bis zum Ende meiner Arbeit unterstützt.

Allen Mitarbeitern der Glycotope GmbH möchte ich danken, da sie mir in der gesamten Zeit für jederlei Fragen bereitstanden und mich an ihrem Wissen teilhaben lassen haben. Dabei möchte ich vor allem Monique Rönick für die Einarbeitung in die Molekularbiologie danken. Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Preclinical Pharmacology & Cancer Immunology, in der ich so viel Teamgeist und Engagement erleben durfte, wodurch der Spaß an der Arbeit nie verloren ging. Antoinette Kranz danke ich für ihre Einweisung in die Milzaufreinigung sowie der gesamten Zusammenarbeit während der *in vivo* Analysen. An dieser Stelle möchte ich vor allem Dr. Anika Jäkel für die vielen Ratschläge und die Betreuung der *in vivo* Studien danken.

Ein großer Dank gilt natürlich meinen Mit-Doktoranden Theresa Birke, Carolin Rüniger, Sophie Marinoff und Phillip Schiele. Wir haben viel zusammen diskutiert, gelacht und auch selten mal geweint und uns dabei in den Bann der Immunonkologie ziehen lassen.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nimmt meine Familie ein. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir viele Freiheiten gegeben haben, mich bei all meinen Vorhaben unterstützt haben und ich immer auf sie zählen kann. Nicht zuletzt danke ich Sebastian Waschnick für jeden einzelnen Quark der letzten Jahre und seine aufrichtige Teilnahme als Nicht-Wissenschaftler an meinen Hochs und Tiefs des Doktoranden-Daseins. Ich freue mich auf unser baldiges Abenteuer zu dritt.