

Aus dem Charité Comprehensive Cancer Center  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das Potenzial der Glyko-Optimierung bei kombinatorischen Krebs-  
Immuntherapien mit monoklonalen Antikörpern

The Potential of Glyco-Optimization for Combinatory Anti-Cancer  
Immunotherapies with Monoclonal Antibodies

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Phillip Schiele

aus Eberswalde

Datum der Promotion:

17.09.2021

## **Vorwort**

Anteile meiner Arbeit wurden bereits auf wissenschaftlichen Konferenzen, als Poster beziehungsweise Vortrag präsentiert. Außer den jeweiligen Abstracts erfolgte keine öffentlich verfügbare Publikation der dargestellten Daten.

CIMT- Cancer Immunotherapy am 16.05.2018 in Mainz:

Poster 1:

**Immunomodulatory properties of the glyco-engineered anti-EGFR antibody Tomuzotuximab;** *Phillip Schiele*, Christoph Goletz

Vortrag 1 und Poster 2

**Glyco-engineering of an anti-CD40 antibody enhances its agonistic activity;** *Phillip Schiele*, Hans Baumeister, Patrik Kehler, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk

Cambridge Healthtech Institute's Fourth Annual Immuno-Oncology Summit Europe vom 18.-20.03.2018 in London:

Poster 3:

**The Importance of the Immunomodulatory Properties of the Glyco-Engineered Anti-EGFR Antibody Tomuzotuximab for IO Combinations;** *Phillip Schiele*, Christoph Goletz, Anika Jäkel, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk

New and Emerging Technologies – Biotech meets medicine, glyconet Berlin-Brandenburg vom 18.-20.09.2019 in Potsdam-Golm:

Vortrag 2:

**Immunomodulatory properties of the glyco-engineered anti-EGFR antibody Tomuzotuximab and rationales for IO combinations;** *Phillip Schiele*, Christoph Goletz, Anika Jäkel, Johanna Gellert, Antje Danielczyk

Des Weiteren werden Daten der Doktorarbeit zur Einreichung einer wissenschaftlichen Publikation in einem Journal verwendet. Eine Veröffentlichung wird im Jahr 2019/20 erwartet.

Die Generierung und initiale Charakterisierung von Tomuzotuximab und der verwendeten anti-CD40 Antikörper wurde durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH durchgeführt. Dabei

entstandene Daten werden, sofern sie für das Verständnis der Dissertationsarbeit notwendigerweise dargestellt wurden, im Text separat als solche hervorgehoben. Sofern praktische Arbeiten präsentierter Daten durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH durchgeführt wurden, werden diese innerhalb der Abbildungsbeschriftung hervorgehoben. Alle weiteren Daten, die in dieser Dissertation dargestellt werden, wurden von mir, Phillip Schiele, generiert und analysiert.

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Abstract.....	3
3	Einleitung.....	4
3.1	Krebsimmuntherapie mit monoklonalen Antikörpern.....	4
3.2	EGFR als Target der Krebstherapie.....	6
3.2.1	Glyko-Optimierung von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern.....	9
3.2.2	Tomuzotuximab .....	11
3.3	Antikörper gegen Immun-Checkpoint-Moleküle .....	15
3.3.1	Antagonistische Immun-Checkpoint-Antikörper.....	16
3.3.2	Agonistische Immun-Checkpoint-Antikörper.....	19
3.4	Fragestellungen.....	23
4	Methodik.....	24
4.1	Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	24
4.1.1	Tumorzelllinien .....	24
4.1.2	Primärmaterial .....	26
4.2	Therapeutische Antikörper .....	26
4.3	Durchflusszytometrie.....	27
4.4	Induktion von CD137 auf NK-Zellen.....	28
4.4.1	Experimente mit KHYG-1-Zellen.....	28
4.4.2	Experimente mit primären, humanen NK-Zellen.....	28
4.5	Ermittlung der Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC).....	28
4.5.1	Ermittlung der ADCC durch Freisetzung von Europium.....	28
4.5.2	Bestimmung der agonistischen Aktivität von CD137 Reagenzien .....	30
4.5.3	FACS-basierte Ermittlung der ADCC.....	30
4.6	Zytokinfreisetzung nach Antikörperstimulation.....	31
4.6.1	Vergleich von Cetuximab und Tomuzotuximab .....	31

4.6.2	Vergleich der anti-CD40 hIgG1 Antikörper .....	32
4.7	Regulation von PD-L1 auf Tumorzellen .....	33
4.8	3D Sphäroid-Modell .....	33
4.8.1	FACS-Analyse der Sphäroidkulturen.....	34
4.8.2	Immunhistochemische (IHC) Analyse der Sphäroidkulturen .....	34
4.9	Reifung von Monozyten in PBMC: Tumorzell-Ko-Kulturen .....	35
4.10	Allogene gemischte-Leukozyten-Reaktion (MLR) .....	36
4.11	NFκB Aktivierung mittels HEK Blue Kit .....	38
4.12	Zytotoxizität der anti-CD40 hIgG1 Antikörper gegen Immunzellen .....	38
4.13	Statistik .....	39
5	Ergebnisse.....	40
5.1	Tomuzotuximab führt zur verstärkten Immunmodulation .....	40
5.1.1	Hochregulation des stimulatorischen Immun-Checkpoint-Moleküls CD137 auf NK-Zellen.....	40
5.1.2	Einfluss von Tomuzotuximab auf die Tumor-Mikroumgebung .....	45
5.1.3	Reifung von Monozyten durch Tomuzotuximab .....	52
5.1.4	Verbesserte Aktivierung und Reifung des angeborenen Immunsystems führt zur verstärkten T-Zell-Stimulation .....	54
5.1.5	Anti-PD-1/anti-PD-L1 mAbs verstärken den ADCC durch Tomuzotuximab .....	58
5.1.6	Bedeutung der Defukosylierung für die T-Zell-Aktivierung in anti-EGFR x anti-PD-1/anti-PD-L1 Kombinationen.....	61
5.2	Charakterisierung von agonistischen anti-CD40 Antikörpern .....	64
5.2.1	Antikörper Isotyp und Grad der Fukosylierung beeinflussen die agonistische Aktivität	64
5.2.2	ADCC als zusätzlicher Effektormechanismus der hIgG1 Varianten .....	66
5.2.3	Einfluss der anti-CD40 mAbs auf die Immunzellinfiltration.....	67
5.2.4	Potential der anti-CD40 Varianten zur T-Zell-Aktivierung in MLRs.....	68
5.2.5	Zytokin-Freisetzung und ADCC gegen Immunzellen .....	70

6	Diskussion .....	77
6.1	Tomuzotuximab als Partner für Kombinationstherapien.....	77
6.1.1	Beeinflussung der Immunzellen und Tumormikroumgebung durch IgG1 Antikörper.....	77
6.1.2	Kombinationen mit agonistischen Checkpoint-Antikörpern.....	84
6.1.3	Kombinationen mit antagonistischen Checkpoint-Antikörpern.....	88
6.2	Potential der Glyko-Optimierung von agonistischen Checkpoint Antikörpern .....	97
7	Fazit und Ausblick.....	105
8	Literatur .....	108
9	Eidesstattliche Versicherung .....	124
10	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen.....	125
11	Lebenslauf .....	126
12	Publikationsliste .....	126
13	Danksagung .....	128

## Abkürzungsverzeichnis

(h)IgG	(humanes) Immunglobulin G	IFN- $\gamma$	Interferon gamma
(mo)-DC	(Monozyten-abgeleitete) Dendritische Zelle	IL	Interleukin
[M]	Mittelwert	kDa	Kilodalton
ABC	Antigen binding capacity	mAk	monoklonaler Antikörper
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	Med	Medium
ADCP	Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis	MFI	median fluorescence intensity
BSA	Bovine serum albumin	MLR	mixed leukocyte reaction
bzw.	Beziehungsweise	MTD	Maximal tolerierte Dosis
c	Konzentration	NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
CD	Cluster of Differentiation	NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
CI	Confidence interval, Konfidenzintervall	NSCLC	Non-small cell lung cancer
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	OD	Optische Dichte
CRC	Colorectal cancer, Darmkrebs	PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
CRS	Cytokine release syndrom	PBS	Phosphate buffered saline
Ctx	Cetuximab	PD-1	Programmed cell death 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PD-L1	Programmed cell death ligand 1
DMSO	Dimethylsulfoxid	SEM	standard error of mean
E: T	Effector: target cell ratio	TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Fab	Fragment antigen binding	TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Tom	Tomuzotuximab
Fc	Fragment crystallizable region	T-Zelle	T-Lymphozyt
Fc $\gamma$ R	Fc gamma Rezeptor	u. A.	unter Anderem
FKS	Fetales Kälberserum	ü. N.	über Nacht
GM-CSF	colony-stimulating factor Granulocyte macrophage	v. A.	vor allem
GO	Glyko-optimiert	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HNC	Head and neck cancer, Kopf- und Halskrebs	vs.	versus
IHC	Immunhistochemie		

# 1 Zusammenfassung

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Tumor-assoziierte Antigene oder Immun-Checkpoint-Moleküle bietet vielfältige Möglichkeiten bei der Immuntherapie von Krebs. Trotz der enormen Erfolge der letzten Jahre sind derzeitige Antikörpertherapien auf bestimmte Patientenpopulationen begrenzt, wodurch eine starke Nachfrage an optimierten Therapien besteht. Neben der reinen Blockade bestimmter Signalwege durch den Fab-Anteil des Antikörpers, konnte durch aktuelle Studien gezeigt werden, dass die Interaktionen des Antikörper-Fc-Anteils mit Immunzellen eine entscheidende Rolle bei der antitumor-Immunantwort einnimmt. Eine Möglichkeit diese Wechselwirkungen zu verstärken, bietet die Glyko-Optimierung des Antikörpers. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die immunmodulatorischen Effektorfunktionen glyko-optimierter Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) und den ko-stimulierenden Rezeptor CD40 untersucht, um den Einfluss der Fc-Glykosylierung zu beschreiben und Rationale für kombinatorische Immuntherapien abzuleiten.

Im Vergleich zu Cetuximab führte der glyko-optimierte anti-EGFR Antikörper Tomuzotuximab zu einer stärkeren Hochregulation von CD137 auf NK-Zellen und T-Zellen. Durch die agonistische ko-Stimulation von CD137 konnten höhere Tumorlysen erreicht werden. Die Glyko-Optimierung führte außerdem zur Infiltration von Immunzellen in Tumorsphäroide und zu einer effektiveren Differenzierung von antigenpräsentierenden Zellen, wodurch die Aktivierung allogener T-Zellen gesteigert werden konnte. Die stärkere Immunaktivierung durch Tomuzotuximab führte allerdings auch zur Induktion des inhibitorischen Checkpoint-Moleküls PD-L1 auf Monozyten, DCs und Tumorzellen und zum Anstieg des entsprechenden Rezeptors, PD-1, auf T-Zellen. In Kombinationsexperimenten mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern wurde gezeigt, dass diese die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität und T-Zellantwort durch Cetuximab und Tomuzotuximab verstärken.

In einem zweiten Projekt wurden Isotyp- und Glykosylierungsvarianten eines agonistischen anti-CD40 mAKs verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass ein glyko-optimierter hIgG1 anti-CD40 mAK die Funktionen eines agonistischen Antikörpers mit den vorteilhaften Effekten der Fc-FcγRIIIa-Interaktion auf die Vernetzung des angeborenen und adaptiven Immunsystems optimal kombiniert. In Experimenten zur möglichen Reduktion von Immunzellen oder der Freisetzung



von Zytokinen zeigten sich keine deutlich erhöhten Risiken durch den glyko-optimierten hIgG1 anti-CD40 Antikörper.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit der Vorteil glyko-optimierter Antikörper gegenüber „normal“-glykosylierter Antikörper gegen zwei verschiedene Zielstrukturen bei der Aktivierung einer breiten antitumor Immunantwort aufgezeigt. Die stärkere Hochregulationen kostimulierender und inhibierender Checkpoint-Moleküle sowie erste Kombinationsexperimente bieten Ansatzpunkte für zukünftige Konzepte der Krebstherapie.

## 2 Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) against tumor associated-antigens or immune checkpoint molecules offer diverse opportunities for cancer immunotherapy. Despite the recent clinical successes, currently approved antibody therapies are limited to a small patient population highlighting the medical need for optimized therapeutics and/or therapies. In addition to the blockade of defined signaling cascades, recent studies showed the importance of antibody mediated cross-linking via the antibody Fc part. A possibility to increase the affinity of this interaction is glyco-optimization of the Fc part. The aim of the presented studies was the analysis of immunomodulatory effector functions of glyco-optimized antibodies against the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the co-stimulatory receptor CD40 to describe the influence of Fc glycosylation and to build up rationales for combinatory immunotherapies.

Tomuzotuximab, a glyco-optimized anti-EGFR mAb resulted in enhanced upregulation of CD137 on NK cells and T cells compared to cetuximab. Hence, combination with agonistic co-stimulation of CD137 resulted in ameliorated tumor cell lysis. Glyco-optimization also improved immune cell infiltration into tumor spheroids, increased differentiation of antigen presenting cells and activation of allogeneic T cell responses. However, enhanced immune activation by tomuzotuximab also induced the inhibitory checkpoint molecule PD-L1 expression on monocytes, DCs and tumor cells as well as upregulation its receptor PD-1 on T cells. In combination with anti-PD-1/anti-PD-L1 antibodies, antibody-dependent cellular cytotoxicity and T cell stimulation mediated by cetuximab and tomuzotuximab was enhanced.

Additional studies compared isotype and glycosylation variants of an agonistic anti-CD40 mAb. Functional tests showed best results for a glyco-optimized anti-CD40 hIgG1 mAb that combines improved agonistic activity and the advantageous Fc-Fc $\gamma$ RIIIa mediated cross-linking of innate and adaptive immunity (ADCC, T cell activation, immune cell migration) without critical increased risk for side effects (cytokine release syndrome, immune cell ADCC).

In summary, the presented studies show the improved immunomodulation by glyco-optimized antibodies compared to “normal” glycosylated antibodies against two different targets. The ameliorated upregulation of co-stimulatory und inhibitory checkpoint molecules as well as the results of preliminary experiments using antibody combinations represent valuable starting points for future therapy concepts.

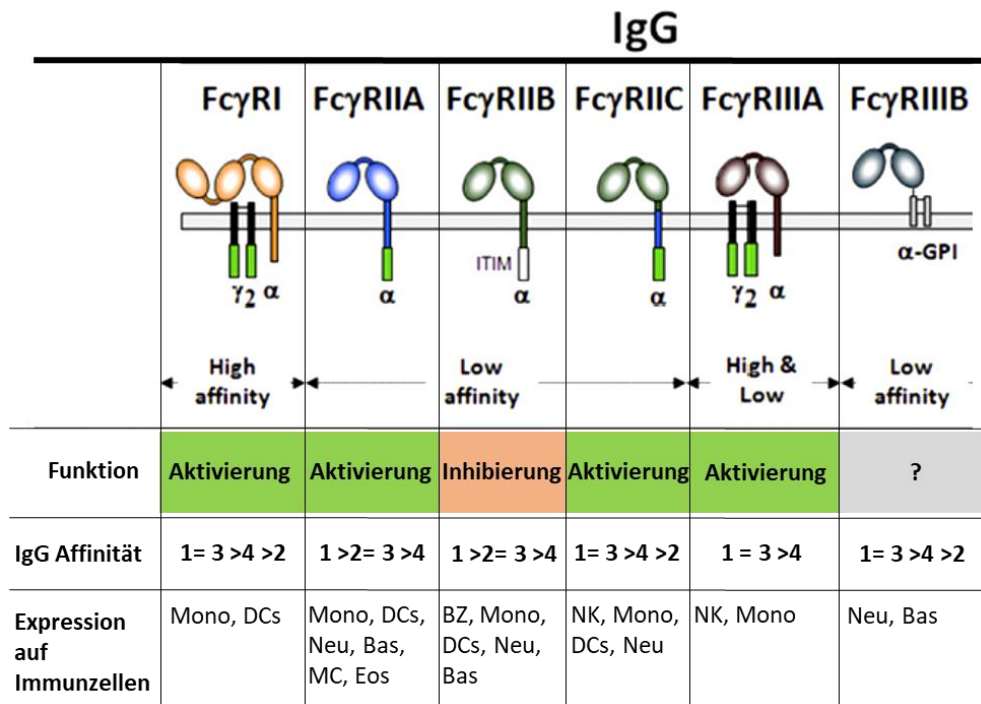
## 3 Einleitung

### 3.1 Krebsimmuntherapie mit monoklonalen Antikörpern

Nach einem Bericht des Robert Koch Institutes, leben in Deutschland aktuell ungefähr vier Millionen Menschen mit Krebs [1]. Trotzdem die Krebssterblichkeit seit Anfang der 1990er Jahre rückläufig ist, sind Tumorerkrankungen bundesweit nach Herz-Kreislaufkrankungen weiterhin die zweithäufigste Todesursache. Die am weitesten verbreitete Therapieform zur medikamentösen Behandlung von Krebs bleibt die Chemotherapie. Chemotherapeutika blockieren das Zellwachstum sich schnell teilender Zellen und führen so zum Absterben von Tumorzellen. Diese Therapieform ist allerdings nur bedingt zielgerichtet, weshalb auch gesundes Gewebe, welches auf eine schnelle Zellteilung angewiesen ist (z. B. Knochenmark, Verdauungstrakt) angegriffen wird, was zu schweren Nebenwirkungen führen kann. Anfang 2019 wurde vom Bundesgesundheitsministerium und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung die „Nationale Dekade gegen den Krebs“ ausgerufen. Ein Ziel dieser Initiative ist es die Heilungschancen von Patienten durch die zügige Entwicklung neuartiger Krebstherapien zu verbessern.

Die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern (mAk) stellt eine der vielversprechendsten Entwicklungen der letzten Jahre dar, um Tumorzellen gezielt zu eliminieren und das patienteneigene Immunsystem gegen den Krebs zu mobilisieren. Monoklonale Antikörper besitzen durch ihre strukturellen Eigenschaften verschiedene antitumorale Wirkmechanismen. Monoklonale Antikörper bestehen aus je zwei schweren und leichten Ketten, welche aus Aminosäuren aufgebaut sind und über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden [2]. Der variable Anteil der schweren und leichten Kette bildet die Antigenbindungsregion (engl. *fragment antigen binding*, Fab), wodurch die Spezifität des Antikörpers definiert und über die Blockade oder Stimulation der gebundenen Zielstruktur direkte Einflüsse auf Signalwege vermittelt werden können. Im Gegensatz zu den hoch-variablen Fab-Domänen wird der Isotyp eines mAk durch eine begrenzte Auswahl an konstanten Regionen der schweren Kette definiert (engl. *crystallisable fragment*, Fc), wonach die Immunglobulin-(Ig)-Klassen D, E, G, A und M unterschieden werden können. Bisher wurden nur Antikörper des Isotyps Immunglobulin G (IgG) zugelassen [3], welche wiederum, abhängig von der schweren Kette des Fc-Anteils ( $\gamma 1-4$ ) in vier Subgruppen unterteilt werden. Über den Fc-Anteil von mAks des Isotyps IgG können diese mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) auf Immunzellen interagieren. Diese

Interaktionen können zur Aktivierung oder Inaktivierung der Immunzellen oder zur Vernetzung der durch den Antikörper gebundenen Antigene führen, weshalb die Affinität der Fc-Fc $\gamma$ R-Interaktion einen erheblichen Einfluss auf die Effektorfunktionen von mAKs ausübt (Abbildung 1).



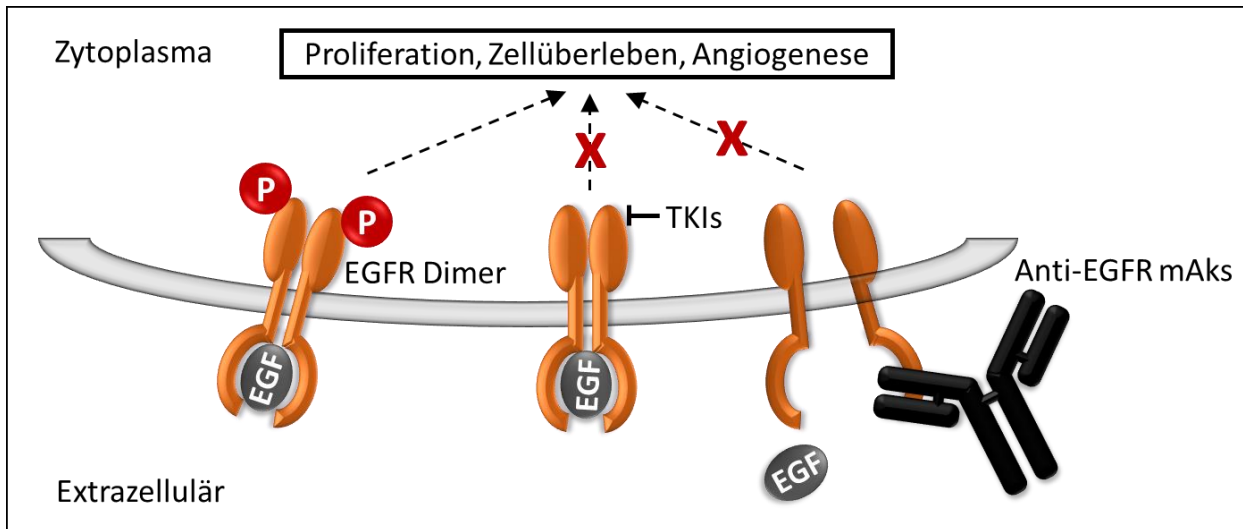
**Abbildung 1: IgG Isotypen und deren Interaktionen mit Fc $\gamma$ R auf Immunzellen.** Fc $\gamma$ R werden abhängig von ihrer Struktur in verschiedene Typen unterteilt, welche auf unterschiedlichen Immunzellen exprimiert werden. Die Stimulation der Fc $\gamma$ R über den Fc-Anteil von mAKs kann zur Aktivierung oder Inhibierung der Immunzellen beitragen, wobei die vier IgG-Subgruppen unterschiedliche Affinitäten zu Fc $\gamma$ R zeigen. Abkürzungen: NK= NK-Zellen, BZ= B-Zellen, Mono= Monozyten, DCs= Dendritische Zellen, Neu= Neutrophile, Bas= Basophile, Eos= Eosinophile, MC= Mastzellen (modifiziert nach: [4, 5]).

Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Subgruppe von IgG Antikörpern, zeigen Antikörper des Isotyps IgG1 die stärkste Affinität zu dem Fc $\gamma$ RIIIa. Dieser ist auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten exprimiert und führt nach Stimulation durch den Fc-Anteil eines IgG1 mAKs zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) und antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose (ADCP) und somit zur direkten Abtötung der Antikörper-gebundenen Tumorzellen durch Immunzellen. Deshalb zeigen Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene die größte antitumor Reaktivität als IgG1 Isotyp, weshalb bisher vor allem IgG1 Antikörper zugelassen wurden [3, 6]. Aber auch Effektorfunktionen von mAKs, welche zur Blockade oder Stimulation von Signalwegen eingesetzt werden, können durch Interaktionen mit Fc $\gamma$ R beeinflusst werden [6].

### 3.2 EGFR als Target der Krebstherapie

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein 170 kDa großes, transmembranes Glykoprotein der ErbB Proteinfamilie und besteht aus drei Domänen: 1) der extrazellulären Domäne zur Bindung der Liganden (z. B. epidermaler Wachstumsfaktor, TGF- $\alpha$ ), 2) eine transmembrane  $\alpha$ -Helix und 3) der katalytischen Region im Zytoplasma mit der Tyrosinkinase-Domäne. Durch die Bindung der Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren. Dies aktiviert die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität und die Autophosphorylierung des C-Terminus, wodurch eine Vielzahl nachgeschalteter Signalkaskaden ausgelöst und die Differenzierung, Proliferation, Migration, Angiogenese und Apoptose von Zellen beeinflusst wird [7, 8]. Im gesunden Gewebe wird der EGFR auf Epithelzellen exprimiert und ist am Zellwachstum, Differenzierung und Reparaturmechanismen beteiligt. Der EGFR wird auf einer Vielzahl von Tumoren epithelialen Ursprungs (z. B. Lungenkrebs, Darmkrebs, Glioblastom, Kopf- und Halskrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Brustkrebs) exprimiert und zeigt dort eine ca. 10-25-fach höhere Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe. Das führt zu einer schnellen Vermehrung von Tumorzellen und korreliert mit einem schlechten Ansprechen auf zytotoxische Chemotherapien, weshalb die Blockade dieses Signalweges eine gute Strategie für die Therapie EGFR-positiver Tumore ist [9, 10].

Derzeit werden zwei therapeutische Ansätze zur Blockade des EGFR-Signalweges verfolgt. Einerseits können kleine Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) verwendet werden, um die intrazelluläre Domäne des EGFR zu blockieren und die Signalweiterleitung zu stoppen. Im Gegensatz dazu konkurrieren EGFR-spezifische Antikörper um die Ligand-Bindungsstelle der extrazellulären Domäne und verhindern so die Dimerisierung der Rezeptoren (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Strategien zur Inhibition des EGFR.** EGFR-vermittelte Signalkaskaden führen zur Proliferation, erhöhtem Zellüberleben und Angiogenese. Therapeutisch kann dieser Signalweg über die Blockade der Tyrosinkinase-Aktivität durch TKIs oder der Rezeptor-Ligand-Interaktion durch EGFR-spezifische mAbs inhibiert werden.

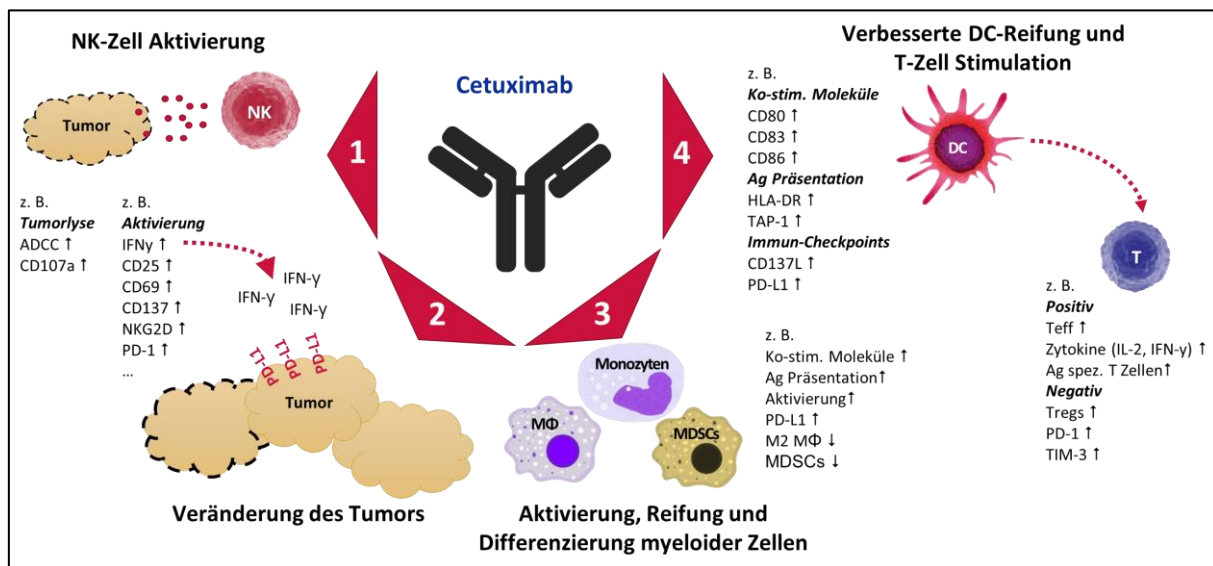
Beide Ansätze zeigen in definierten Patientenkohorten bereits klinische Erfolge, was zur Zulassung von sieben TKI und drei anti-EGFR mAbs führte ([7]; Tabelle 1).

**Tabelle 1: Zugelassene, zielgerichtete Therapien gegen den EGFR.**

Tyrosinkinase-Inhibitoren	Zugelassene Indikation(en)
Dacomitinib	EGFR-mutierter Lungenkrebs (NSCLC)
Erlotinib	Lungenkrebs (NSCLC), Bauchspeicheldrüsenkrebs
Gefitinib	Lungenkrebs (NSCLC)
Lapatinib	HER2 positiver Brustkrebs
Neratinib	HER2 positiver Brustkrebs
Osimertinib	EGFR-mutierter Lungenkrebs (NSCLC)
Vandetanib	Schilddrüsenkrebs
Antikörper	
Cetuximab	Kopf- und Halskrebs, <i>KRAS</i> Wildtyp Darmkrebs
Necitumumab	Lungenkrebs (NSCLC)
Panitumumab	<i>KRAS</i> Wildtyp Darmkrebs

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Mutationen im EGFR oder die Aktivierung alternativer Signalwege zur Resistenz gegen die Therapie mit EGFR-blockierenden Therapien führen [11]. Das kann einerseits dazu führen, dass Therapien nur für Patienten mit einem definierten Mutationsstatus zugelassen werden oder Moleküle gezielt gegen eine EGFR-Mutation entwickelt werden müssen (Tabelle 1). Für eine Therapie einer möglichst breiten

Patientenpopulation kann es daher hilfreich sein, durch den Fc-Anteil EGFR-spezifischer Antikörper weitere Effektormechanismen zu ermöglichen [12]. Am Beispiel von Kopf- und Halskrebs, welcher durch eine relativ starke Infiltration mit Immunzellen charakterisiert ist [13], postulierten Agarwal et al., dass die Blockade des EGFR nicht das relevante bzw. einzige Ziel von anti-EGFR Antikörpertherapien sein sollte [14]. Über den Vergleich von klinischen Studien zeigen sie einen Vorteil des IgG1 Antikörpers Cetuximab gegenüber dem IgG2 Antikörper Panitumumab und Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Gefitinib oder Erlotinib und vermuteten Immunzell-vermittelte Effekte als Ursache. Der Einfluss des IgG1-Isotypes von Cetuximab auf die NK-Zell-vermittelte ADCC *in vitro* und in klinischen Studien ist bereits seit längerer Zeit bekannt [15-18] und weitere Effekte auf Antigen-präsentierende Zellen, sowie die Generierung von T-Zell-Antworten sind Erkenntnisse aktueller Forschung und werden in Abbildung 3 zusammengefasst.



**Abbildung 3: Klinisch-relevante Effektormechanismen des IgG1 mAbs Cetuximab.** Der anti-EGFR mAb Cetuximab interagiert über seinen Fc-Anteil mit dem Fc $\gamma$ RIIIa auf Immunzellen. 1) Am besten beschrieben ist die Aktivierung von NK-Zellen, was zur ADCC gegen Tumorzellen, der Regulation von Aktivierungsmarkern und Checkpoint-Molekülen, sowie der Produktion von Zytokinen beiträgt. 2) Durch die selektive Depletion von Tumorzellen durch ADCC und die Zytokinproduktion aktivierter Immunzellen können auf Tumorzellen z. B. inhibierende Moleküle hochreguliert werden. 3-4) Cetuximab führt über das veränderte Zytokininmilieu und die Interaktion mit Fc $\gamma$ R auch zur Aktivierung, Differenzierung und Regulation ko-stimulierender Moleküle auf myeloiden Zellen (z. B. Monozyten, Makrophagen, DCs). 4) Durch die vermehrte Freisetzung von Antigenen (z. B. durch ADCC) und Reifung antigenpräsentierender Zellen reguliert Cetuximab ebenfalls die antitumor Reaktion durch T-Zellen (erstellt nach: [19-26]). Abkürzungen: Ko-stim. = Ko-stimulatorisch, Ag= Antigen, MΦ= Makrophagen, MDSC= *Myeloid-derived suppressor cells*, Teff= Effektor-T-Zellen, Treg= regulatorische T-Zellen.

Der Fc $\gamma$ RIIIa, welcher für die Fc-abhängigen Effekte von Cetuximab die größte Relevanz zeigt, tritt in zwei Allotypen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Fc-Anteil, auf. Abhängig von der Aminosäure an Stelle 158, Phenylalanin (F) oder Valin (V), werden Menschen in drei Fc $\gamma$ RIIIa-

Genotypen unterteilt: FcγRIIIa-158-F/F, FcγRIIIa-158-F/V, FcγRIIIa-158-V/V. Dabei zeigen Rezeptoren, welche Valin tragen, die höchste Affinität zu Fc-Anteilen von IgG1-Antikörpern, wohingegen Rezeptoren mit Phenylalanin eine geringere Bindung ermöglichen [27]. Das hat zur Folge, dass die positiven Effekte des IgG1-Fc-Anteils von Cetuximab auf eine geringe Patientenpopulation begrenzt sind, da weniger als 20% der kaukasischen Bevölkerung homozygot für den FcγRIIIa-158-V sind [17, 28]. Deshalb sollte es ein Ziel neuartiger Antikörper sein, die Affinität zum FcγRIIIa zu erhöhen, um das Patientenspektrum zu erweitern. Eine Möglichkeit die Moleküleigenschaften von mAks zu verbessern bietet das *Glycoengineering*, also die Optimierung der auf dem Antikörper befindlichen Zuckerstrukturen.

### 3.2.1 Glyko-Optimierung von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern

IgG Moleküle sind Glykoproteine, welche in jeder CH<sub>2</sub>-Domäne der schweren Kette eine konservierte *N*-Glykosylierung am Asparagin-297 besitzen. Zusätzlich tragen ungefähr 20% der humanen IgG Moleküle ein weiteres Glykosylierungsmotiv in der Antigenbindungs-Region [2]. Auch wenn Kohlenhydrate nur ca. 2-3% der Molekülmasse ausmachen [29], hat die Zusammensetzung der Glykanstrukturen einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität, Immunogenität und Funktionalität von mAks [30-32]. Die *N*-Glykosylierung ist eine der komplexesten posttranslationalen Modifikationen bei der Generierung von Biopharmazeutika und zeichnet sich durch eine hohe Heterogenität aus. Beginnend am Endoplasmatischen Retikulum, an welchem ein Vorläufer-Kohlenhydrat an die *N*-Glykosylierungsmotive angehängen und im Anschluss wieder gekürzt wird, werden die Glykanstrukturen durch ein komplexes Netzwerk an Glykosidasen und Glykosyltransferasen auf dem Weg der Antikörper durch den Golgi-Apparat aufgebaut. Anders als bei vielen Glykoproteinen sind *N*-Glykane der Fc- und Fab-Region von mAks in der Regel vom komplexen Typ mit nur zwei Antennen, wodurch die Varianz auf 36 mögliche Strukturen begrenzt wird [31]. Die Grundstruktur von IgG Glykanen ist ein Heptasaccharid bestehend aus vier *N*-Acetylglucosaminen (GlcNAc) und drei Mannosen. Diese Grundstruktur beinhaltet in der Regel zusätzlich eine *core*-Fukosylierung am ersten GlcNAc und kann an den terminalen GlcNAc durch weitere Saccharide (z. B. GlcNAc, Galaktosen (Gal), Sialinsäuren) verlängert werden.

Die Zusammensetzung der am Aufbau der Glykanstrukturen beteiligten Enzyme kann sich zwischen verschiedenen Organismen teilweise stark unterscheiden [33]. Deshalb wird bereits durch die Wahl des Expressionssystems monoklonaler Antikörper die Art möglicher Glykanstrukturen vorbestimmt. Der derzeitige Goldstandard für die Generierung von



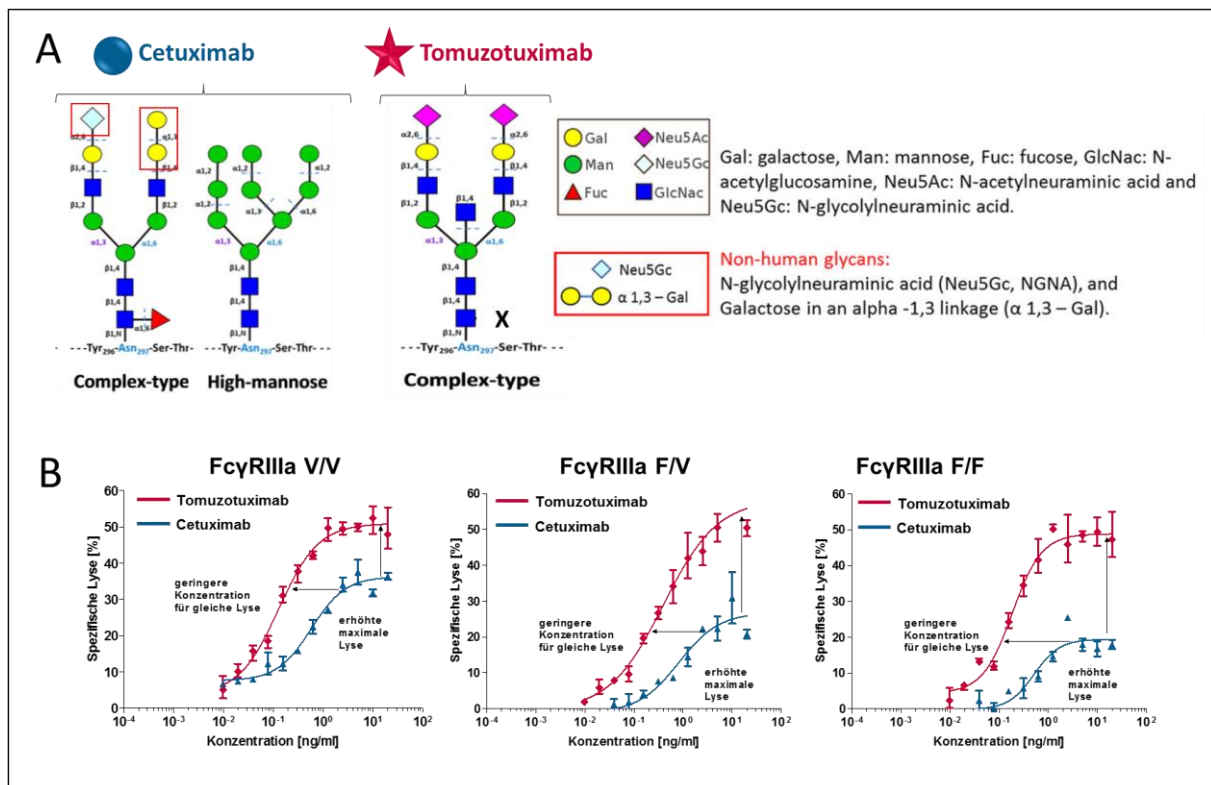
Glykoproteinen ist die Produktion in Zellen des chinesischen Zwerghamsters (engl. *Chinese Hamster Ovary cells*, CHO), oder murinen NS0 und Sp2/0 Zellen [34]. Diese zeichnen sich durch eine hohe Produktivität und günstige Herstellkosten aus, produzieren allerdings Biotherapeutika mit Glykanen, welche sich stark von den menschlichen Mustern unterscheiden [35]. Der anti-EGFR mAk Cetuximab wird in der murinen Hybridom-Zelllinie Sp2/0 produziert, was einen Einfluss auf dessen Produkteigenschaften hat. Anders als humane Zellen exprimieren murine Hybridomzellen zwei Enzyme, welche zu immunogenen Glykanen führen. Die Alpha-(1,3)-Galaktosyltransferase katalysiert die Ausbildung des Galili-Epitopes (GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-Gal- $\alpha$ -(1,3)-Gal) und die CMP-*N*-Acetylneuraminsäure-Hydroxylase ermöglicht die Generierung von Glykanen mit *N*-Glycolylneuraminsäuren (NeuGc), welche vor allem in der Fab-Glykosylierung von Cetuximab auftreten [33, 35]. In einigen Regionen Amerikas konnte gezeigt werden, dass das Galili-Epitop von Cetuximab bei bis zu 33% der behandelten Patienten zu schwerwiegenden allergischen Reaktionen durch anti-Alpha-(1,3) -Gal spezifische IgE Antikörper führen kann [36]. Zusätzlich zeigen ungefähr 85% gesunder Probanden gegen NeuGc-gerichtete Immunreaktionen [29]. Da das Vorkommen nicht-humaner Glykanstrukturen das Auftreten von Nebenwirkungen erhöht und somit die Anzahl von Patienten, welche mit einem Antikörper behandelt werden können, eingeschränkt wird, sollten diese in neuartigen Antikörpern vermieden werden.

Neben der Bedeutung für die Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit beeinflusst vor allem die Struktur der Glykane am Asparagin-297 im Fc-Anteil von IgG1 Antikörpern auch deren Funktionalität. Die Vermittlung von ADCC gegen Tumorzellen, welche durch die Interaktion des Fc-Anteils von mAks mit dem Fc $\gamma$ RIIIa exprimiert auf Immunzellen vermittelt wird, ist ein wichtiger Effektormechanismus von mAks des Isotypen IgG1 (z. B. Cetuximab; [15]). Die Alpha-(1,6)-Fukosylierung des ersten GlcNAc der Glykanstruktur (*core*-Fukosylierung) kann die Interaktion des Antikörpers mit den Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immunzellen behindern und somit dessen Effektorfunktionen einschränken. Durch die Reduktion der *core*-Fukosylierung kann die Bindung an den Fc $\gamma$ RIIIa deutlich gesteigert werden [29]. Dementsprechend zielen verschiedene Methoden des *Glycoengineering*, wie z. B. die Überexpression der GlcNAc-Transferase III oder die Reduktion der Aktivität der Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase in der Produktionszelle, darauf ab, den Fukose-Anteil von mAks zu minimieren [37]. Bisher wurden zwei glyko-optimierte Antikörper gegen hämatologische Erkrankungen zugelassen (anti-CD20 Obinutuzumab [38], anti CCR-4 Mogamulizumab [39]), nachdem diese eine Verbesserung des Progressionsfreien Überlebens im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie zeigten. Das Potenzial Fc-optimierter

Antikörper auch bei soliden Tumorerkrankungen wurde kürzlich durch die positiven Ergebnisse der SOPHIA Studie mit Margetuximab, einem anti-HER2 Antikörper, welcher auf der Antigenbindung von Trastuzumab beruht und durch ausgetauschte Aminosäuren im Fc-Anteil ebenfalls eine verstärkte FcγRIIIa-Bindung aufweist, bestätigt [40, 41].

### 3.2.2 Tomuzotuximab

Durch die kontrollierte Biosynthese bestimmter Glykane mittels *Glycoengineering* können therapeutische Proteine mit verbesserten Eigenschaften generiert werden. Tomuzotuximab (vorher CetuGEX, oder GT-MAB 5.2-GEX) ist ein glyko-optimierter anti-EGFR Antikörper mit identischen Antigen-Bindungseigenschaften (Affinität, Spezifität) und Fab-vermittelten Effektorfunktionen (z. B. EGFR-Inhibierung, Apoptose-Induktion), wie der bereits zugelassene Antikörper Cetuximab. Tomuzotuximab wurde mit der humanen GlycoExpress® Plattform der Glycotope GmbH generiert. Diese Plattform basiert auf humanen Zelllinien und ermöglicht die Produktion therapeutischer Proteine mit humaner Glykosylierung und deren Optimierung für verbesserte Produkteigenschaften. Im Vergleich zu Cetuximab trägt Tomuzotuximab keine Glykane mit dem immunogenen Galili-Epitop oder der nicht-humanen Sialinsäure Neu5Gc. Außerdem konnte durch die Reduktion von langen Mannose-Strukturen und die deutlich erhöhte terminale Sialylierung der Glykane von Tomuzotuximab die Halbwertszeit im Vergleich zu Cetuximab gesteigert werden (Abbildung 4a; [42]).



**Abbildung 4: Die Antikörper-Glykosylierung beeinflusst Fc-vermittelte Effektorfunktionen.** (A) Vergleich der N-Glykan-Strukturen von Cetuximab und Tomuzotuximab am Asparagin 297 (Darstellung aus [43]). Anders als Tomuzotuximab trägt Cetuximab auch Glykane, welche das Galili-Epitop und NeuGc beinhalten. Durch die Auswahl der Produktionszelllinie wurde der *core*-Fukose Anteil der Glykane von Tomuzotuximab reduziert. (B) Der Einsatz EGFR-spezifischer mAbs ermöglicht zusätzlich die Aktivierung Fc $\gamma$ R-positiver Immunzellen (z. B. NK-Zellen). Die Defukosylierung von Tomuzotuximab induziert eine stärkere ADCC, als Cetuximab in Experimenten mit Immunzellen von Spendern mit verschiedenen Fc $\gamma$ RIIIa-Genotypen (modifiziert nach [44]).

Durch die Generierung des Antikörpers über die GlycoExpress® Plattform wurde die Fc-*core*-Fukosylierung reduziert, um eine verstärkte Fc $\gamma$ RIIIa Interaktion zu ermöglichen. Dadurch konnte die *in vitro* ADCC im Vergleich zu Cetuximab mit Immunzellen von Spendern mit allen drei funktionell relevanten Fc $\gamma$ RIIIa-Genotypen (10-250-fach) gesteigert werden (Abbildung 4b, [42, 44]). Vergleichbare Resultate wurden bereits für den ebenfalls glyko-optimierten anti-EGFR mAk Imgatuzumab (GA-201) gezeigt, welcher von der Firma Genentech/Roche entwickelt wurde [45]. Durch die glyko-optimierten anti-EGFR Antikörper werden auch gegen Tumorzellen mit *KRAS*-Mutation [45], oder dem Einzelnukleotid-Polymorphismus EGFRK<sub>521</sub> effektive ADCC vermittelt [46]. Diese beiden Veränderungen des EGFR sind mit einem verringerten Überleben nach Cetuximab-Therapie assoziiert [47, 48].

Tomuzotuximab wurde bisher in zwei klinischen Studien getestet. In einer Phase I Studie (NCT01222637) konnte die Verträglichkeit und die klinische Aktivität von Tomuzotuximab in Patienten mit fortgeschrittenen, soliden Tumoren, welche nicht weiter auf die Standardtherapie

ansprechen, nachgewiesen werden [44]. In der Phase II RESGEX Studie (NCT02052960) wurde im Anschluss die klinische Effektivität der beiden anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Tomuzotuximab bei Patienten mit fortgeschrittenem, rezidiven/metastasierenden Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (R/M HNC) verglichen. Trotz der überzeugenden *in vitro* Ergebnisse der deutlich gesteigerten ADCC konnte weder in dieser Studie [49], noch in Studien mit dem ebenfalls glyko-optimierten anti-EGFR Imgatuzumab bei Patienten mit Kopf-Hals Tumoren oder *KRAS*-mutiertem Darmkrebs [50, 51] ein Vorteil gegenüber der Behandlung mit Cetuximab festgestellt werden.

Neben Studien, welche die Rolle der ADCC durch Antikörpertherapien in Frage stellen [17], könnten weitere Faktoren zu diesen Beobachtungen geführt haben. Die vorherige oder gleichzeitige Behandlung von Patienten mit Chemotherapie kann beispielsweise die ADCC reduzieren [52]. Studien mit Imgatuzumab zeigten, dass NK-Zellen von Patienten nach gescheiterter Chemotherapie auch durch glyko-optimierte Antikörper wesentlich schwächer aktiviert werden können [53]. Durch die Expression des EGFR auf Zellen der Basalschicht der Epidermis kommt es bei der zielgerichteten EGFR-Therapie häufig zu toxischen Hautreaktionen, welche spätestens ab Grad 3 der Nebenwirkungen mit systemischer Gabe von Kortikosteroiden behandelt werden [54]. Untersuchungen zeigten, dass auch diese die ADCC durch Cetuximab und glyko-optimierter Antikörper verringern können [55, 56]. Da die erhöhte ADCC Aktivität durch NK-Zellen mit einem besseren Ansprechen von Patienten auf die Cetuximab-Therapie korreliert [18, 57], kann die klinische Effektivität von glyko-optimierten Antikörpern stark von der Vorbehandlung, sowie dem Vorliegen und der Aktivität von NK-Zellen beeinflusst werden, was bei der Auswahl geeigneter Indikationen und Patienten berücksichtigt werden sollte.

Auch wenn bisher kein glyko-optimierter anti-EGFR Antikörper zugelassen wurde, bestätigen die Analysen immunologischer Biomarker (z. B. Zytokine, Immunzellpopulationen) der klinischen Studien eine verstärkte Immunzellaktivierung [44, 50, 51]. Eine Subgruppen-Analyse der RESGEX Studie fand heraus, dass die Therapie mit Tomuzotuximab das progressionsfreie Überleben von Humanen-Papillomvirus-positiven Patienten im Vergleich zu Cetuximab steigerte [58]. Diese Patienten zeichneten sich durch eine erhöhte Immunzellzahl zu Beginn der Therapie aus, woraus sich vermuten lässt, dass die Aktivierung des Immunsystems ein entscheidender Faktor bei der Therapie mit glyko-optimierten Antikörpern ist. Auch wenn HNC Tumore als verhältnismäßig stark immuninfiltriert beschrieben sind [13], herrscht in diesen und anderen soliden Tumoren ein immunsupprimierendes Milieu vor. Sowohl die starke Induktion oder Rekrutierung von regulatorischen Immunzellen (regulatorische T-Zellen (Treg), M2

Makrophagen, myeloide Suppressorzellen (MDSC)) und die hohe Konzentration immuninhibierender Zytokine (z. B. TGF- $\beta$ , IL-10) reduziert die klinische Effizienz monoklonaler Antikörper [21, 59-61]. Außerdem zeigten Studien, dass EGFR-positive Tumore häufig eine hohe Expression inhibierender Immun-Checkpoint-Moleküle, wie z. B. PD-L1 aufweisen (z. B. HNC: 37-82 %, Darmkrebs (CRC): 7-24 %, Tabelle 2), weshalb diese bei anti-EGFR Therapien bedacht werden sollten.

**Tabelle 2: Anteil PD-L1 positiver HNC und CRC Tumore.**

Indikation	PD-L1+ [%]	Besonderheiten	Ref.
Kopf- und Halskrebs	67,4	PD-L1+ Patienten mit besserem Ansprechen auf Pembro.	[62]
Nasopharynxkarzinom	64,3	Nur HPV- Patienten, nur 1/56 MSI	[63]
Nasopharynxkarzinom	24	75 % der Patienten zeigen PD-L1 auf Immunzellen	[64]
Kopf- und Halskrebs	54	Höhere PD-L1 Frequenz in HPV+ Tumoren (82 vs. 45 %)	[65]
Kopf- und Halskrebs	36,7	Bessere Überleben durch Nivolumab bei PD-L1+ Patienten	[66]
Kopf- und Halskrebs	82	Keine Korrelation von PD-L1 und Ansprechrage nach Nivo.	[67]
Kopf- und Halskrebs	72,2	PD-L1+ (inkl. Immunzellen) mit besserer Überlebensrate	[68]
Oropharynxkarzinom	47	TILs korrelieren mit erhöhtem PD-L1 und Überlebensrate	[69]
Kopf- und Halskrebs	77,8	PD-L1+ Patienten für Pembro.-Therapie eingeschlossen	[70]
Darmkrebs	20,5	Höhere PD-L1 Expression auf Tumoren und Immunzellen von MSI Patienten	[71]
Darmkrebs	21	PD-L1 Expression korreliert mit dMMR	[72]
Darmkrebs	24,1	geringe Ansprechrage von Pembrolizumab	[73]
Darmkrebs	7	56 % KRAS-mut Patienten; 5 % dMMR	[74]

Zusammenfassung von Studien mit zugelassenen anti-PD-L1 Immunhistochemie-Antikörpern (Klon: 22-C3, 28-8, SP142, SP263) und einer PD-L1 Nachweisgrenze von  $\geq 1$  % positiver Zellen. Abkürzungen: HPV= Humanes Papillomvirus, MSI= Mikrosatelliten-instabil, Pembro. = Pembrolizumab, Nivo. = Nivolumab, TILs= Tumorerinfiltrierende Lymphozyten, dMMR= defiziente Mismatchreparatur.

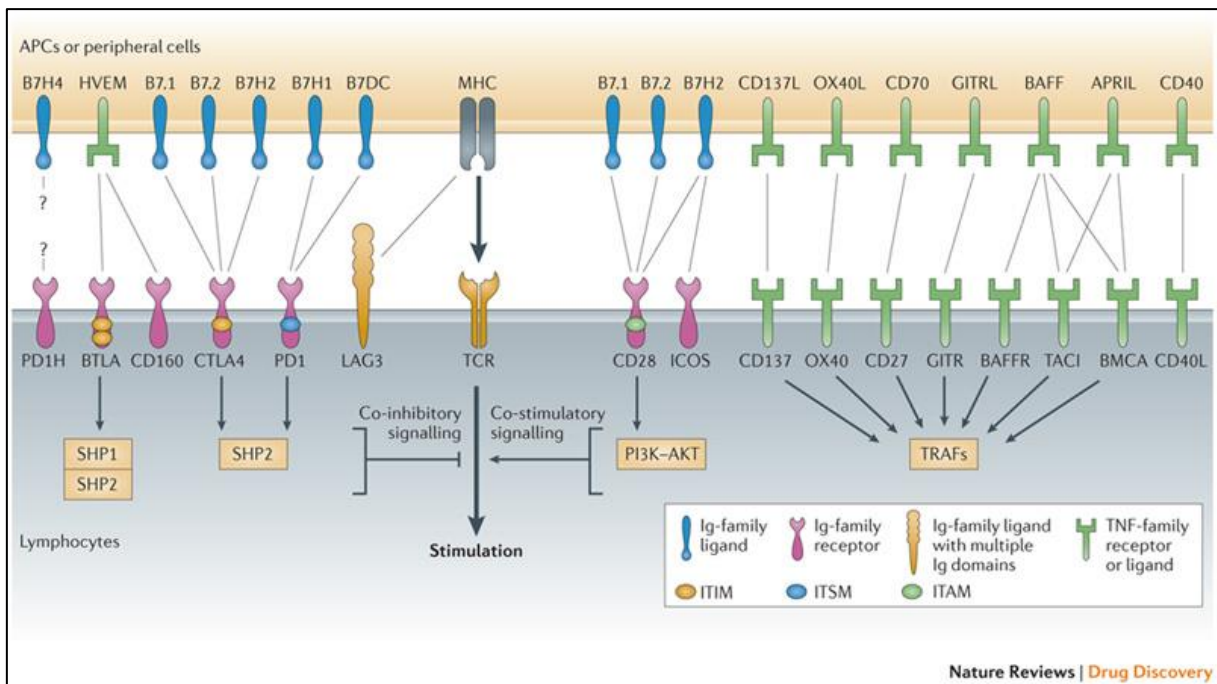
Ein besseres Verständnis der immunmodulierenden Effekte der gegen den EGFR gerichteten Antikörpertherapien und die Auswahl geeigneter Patienten könnten daher dazu beitragen, die Vorteile der glyko-optimierten Antikörper als Mono- und Kombinationstherapie klinisch erst vollständig wirksam zu machen. Außerdem stellt die Expression und Regulation von Immun-Checkpoint-Molekülen einen wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Kombinationstherapien dar.

### 3.3 Antikörper gegen Immun-Checkpoint-Moleküle

In einem Vortrag vor Amsterdamer Studenten postulierte Paul Ehrlich bereits 1909 die besondere Rolle zellulärer Immunität bei der Bekämpfung von Tumoren [75], was nach jahrelanger Forschung heutzutage unter dem Begriff *Immunoediting* zusammengefasst wird [76, 77]. Laut dieser Theorie besteht die antitumor Immunantwort aus drei Phasen: 1) der Eliminierungsphase, in welcher Tumorzellen durch tumorspezifische Immunzellen abgetötet werden, 2) aufgrund des Selektionsdrucks vermehren sich in der Gleichgewichtsphase Tumorzellen, welche vom Immunsystem nicht erkannt wurden beziehungsweise verändern ihren Phänotypen und 3) durch die Reduktion präsentierter Antigene, eine veränderte Angiogenese und die Ausbildung einer immunsuppressiven Tumorumgebung entgehen Tumorzellen in der *Immunescape*-Phase dem Immunsystem komplett und es kommt zur Krebserkrankung [76-78].

Eine besondere Rolle bei der antitumor Immunität besitzen Immun-Checkpoint-Moleküle. Dabei handelt es sich um membranständige Moleküle, welche die Aktivierung von Immunzellen regulieren. Abhängig von ihrer Funktion auf Immunzellen werden stimulierende und inhibierende Checkpoint-Moleküle unterschieden. Während einer normalen Immunreaktion dienen Checkpoint-Moleküle der Initiation von Immunreaktionen, der Verhinderung von Autoimmunität oder Eingrenzung von Entzündungsreaktionen [79]. Durch die Reduktion stimulierender oder die verstärkte Expression inhibierender Signalwege nutzen Tumorzellen diesen Regulationsmechanismus allerdings auch, um dem Immunsystem zu entgehen [79].

Das Interesse, das Immunsystem über die gezielte Stimulation oder Blockade ausgewählter Signalwege durch mAbs zu manipulieren, ist spätestens nach der Zulassung von Antikörpern gegen CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*, Ipilimumab, 2011) und den PD-1 Rezeptor (engl. *Programmed cell Death-1*, Nivolumab, 2014) stetig gestiegen und bietet die Möglichkeit Patienten verschiedenster Indikationen, unabhängig von speziellen Tumorantigenen, zu therapieren. Anders als Therapien gegen tumorassoziierte Antigene, binden Checkpoint-Antikörper in der Regel auch über ihren Fab-Teil an Zellen des Immunsystems, um diese direkt zu stimulieren oder inhibierende Moleküle zu blockieren. Einige inhibierende und aktivierende Signalwege, welche an der antitumor Immunität beteiligt sind und Ziele für die Generierung spezifischer Antikörper sind, werden in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Die Aktivierung von Immunzellen wird durch ein großes Netzwerk an ko-stimulierenden und ko-inhibierenden Oberflächenrezeptoren reguliert.** Diese werden als Immun-Checkpoint-Moleküle bezeichnet. Abbildung aus [80]

Derzeit sind sieben mAbs, ausschließlich gegen inhibitorische Checkpoint-Moleküle, zugelassen, wobei sechs dieser Antikörper die Interaktion von PD-1 und dessen Liganden (PD-L1) blockieren [81].

### 3.3.1 Antagonistische Immun-Checkpoint-Antikörper

Inhibierende Immun-Checkpoint-Moleküle sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und der Regulation der Stärke und Dauer physiologischer Immunreaktionen beteiligt, um die Schädigung von gesundem Gewebe zu verhindern. Sie werden aber auch in der *Escape*-Phase durch Tumore ausgenutzt, um dem Immunsystem zu entgehen [79]. Die Entwicklung von mAbs zur Blockade der durch den Tumor dysregulierten Signalwege zur Re-Aktivierung des Immunsystems, ist ein wichtiger Durchbruch der aktuellen Krebsforschung.

Ipilimumab war der erste Checkpoint-Antikörper, welcher zur Therapie von Melanom-Patienten zugelassen wurde [82]. Dieser Antikörper ist gegen CTLA-4 gerichtet, ein Molekül der CD28:B7-Familie, welches nach der Stimulation des T-Zell-Rezeptors auf Effektor- und regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Während der Priming-Phase von naiven T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen, konkurriert CTLA-4 mit CD80 und CD86 um die Bindung an das ko-stimulierende Molekül CD28 und fungiert somit als Bremse der T-Zell-Stimulation.

Die Blockade von CTLA-4 durch Ipilimumab hebt die Inhibition der T-Zell-Aktivierung auf und fördert deren Proliferation und Infiltration in den Tumor [83-85].

Antikörper gegen die PD-1/PD-L1 Achse sind bereits gegen eine Vielzahl an Tumorerkrankungen zugelassen (u. A. Melanom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Nierenkarzinom, Blasenkrebs, Kopf- und Halskrebs) und werden weiterhin in über 1000 klinischen Studien untersucht [86]. Im Gegensatz zu CTLA-4 werden Immunzellen durch die Interaktion von PD-1 und PD-L1 während der Effektorphase der Immunreaktion eingeschränkt. Der PD-1 Rezeptor (auch CD279) wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und DCs exprimiert [87, 88]. Studien zeigen, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten zu einem erhöhten Anteil PD-1 tragen, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [88]. PD-1 bindet an die zwei Liganden PD-L1 (B7-H1, CD274) und PD-L2 (B7-DC, CD273). Da bisher kein Unterschied in der klinischen Effektivität von anti-PD-1 und anti-PD-L1 mAbs festgestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass PD-L1 der relevantere Ligand zur Inhibierung der Immunantwort ist [86]. PD-L1 kann durch intrinsische Faktoren (z. B. Verlust der Phosphatase und Tensin homolog Phosphatase (PTEN), Aktivierung der anaplastischen Lymphomkinase (ALK), Mutationen des EGFR) oder durch Zytokine (z. B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), welche durch ein aktiviertes Immunsystem produziert wurden, hochreguliert werden [89]. Letzteres wird als adaptiver Resistenzmechanismus bezeichnet und könnte erklären, warum bisherige Immuntherapien mit Vakzinen oder Tumor-spezifischen IgG1 Antikörpern wenig erfolgreich bleiben, da die Aktivierung des Immunsystems zur Hochregulation von inhibitorischen Checkpoint-Liganden beiträgt [89]. Der Effekt der Interaktion von PD-1 und PD-L1 ist am besten für die Aktivierung von T-Zellen beschrieben. Der zytoplasmatische Anteil von PD-1 enthält zwei Tyrosin-basierte, inhibitorische Motive, welche nach Interaktion von PD-1 mit PD-L1 die Phosphorylierung des T-Zell-Rezeptors sowie des ko-Stimulators CD28 blockieren und nachgeschaltete Signalwege verhindern [86, 88]. Wie der Name des Rezeptors - *Programmed cell Death-1* - vermuten lässt, führt die Bindung von PD-L1 an PD-1 positive Immunzellen zur Eliminierung von Effektor-Immunzellen durch Apoptose. Außerdem wird durch die Stimulation von PD-1 die Proliferation von Immunzellen reduziert, es kommt zur verringerten Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen (z. B. Perforin, Granzyme-B) und zur Vermehrung von regulatorischen Immunzellen [88]. Durch die Blockade der PD-1/PD-L1 Achse mit mAbs können diese inhibitorischen Effekte aufgehoben werden, wodurch die Anzahl tumorreaktiver Immunzellen und die Produktion inflammatorischer Zytokine gesteigert wird.



Im Vergleich zu Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene ist die Auswahl des geeigneten Isotyps für Immun-Checkpoint-Antikörper um einiges komplexer. Aufgrund der Expression der Checkpoint-Moleküle auf Tumor- und/oder Immunzellen hängt der Isotyp stark von dem gewünschten Effektormechanismus ab. Dies wird beispielsweise an den derzeitig zugelassenen Antikörpern gegen die PD-1/PD-L1 Achse deutlich [90]. Die anti-PD-1 Antikörper Nivolumab, Pembrolizumab und Cemiplimab sind vom Isotypen IgG4, welcher nur eine sehr geringe Bindung an Fc $\gamma$ R zeigt. Dadurch soll verhindert werden, dass PD-1 positive, tumorreaktive Immunzellen durch Fc $\gamma$ RIIIa positive Immunzellen abgetötet werden. Die anti-PD-L1 Antikörper Atezolizumab und Durvalumab sind zwar vom Isotypen IgG1, tragen aber eine Mutation, wodurch die *N*-Glykosylierung im Fc Teil und damit die Bindung an den Fc $\gamma$ RIIIa verhindert wird und sie als ausschließlich blockierende Antikörper fungieren. Mit Avelumab ist allerdings auch ein anti-PD-L1 IgG1 Antikörper mit funktionellem Fc Teil zugelassen. Dieser ermöglicht neben der Blockade der PD-1/PD-L1 Interaktion auch die direkte ADCC gegen PD-L1 exprimierende Tumorzellen, wobei PD-L1 positive Immunzellen der Peripherie wegen der geringen Expressionsdichte nicht betroffen sind [91-94]. In Experimenten mit Fc $\gamma$ R humanisierten Mäusen zeigten Dahan und Kollegen, dass im Gegensatz zu anti-PD-1 Antikörpern, die antitumor Aktivität von PD-L1 Antikörpern durch die Interaktion mit Fc $\gamma$ R positiven Immunzellen gesteigert werden kann [95]. Passend dazu konnten wir kürzlich zeigen, dass die verstärkte Affinität eines glyko-optimierten anti-PD-L1 IgG1 Antikörpers dessen Effektorfunktionen (ADCC, T-Zell-Stimulation) deutlich steigerte [96]. Welche Bedeutung der Antikörper-Isotyp auf die klinische Aktivität von anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörper hat, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Durch die Blockade inhibitorischer Checkpoint-Moleküle, v. A. der PD-1/PD-L1 Achse, gelang es im Laufe der letzten Jahre das progressionsfreie Überleben und die Überlebensrate von Patienten diverser Krebsindikationen signifikant zu steigern. Trotz der enormen Erfolge sind aber auch Checkpoint-Antikörper in ihrer Wirkung limitiert [86]. Bereits kurz nach der Zulassung von Ipilimumab und Nivolumab wurde begonnen, nach geeigneten Kombinationsmöglichkeiten zu forschen. Die naheliegende Kombination beider Checkpoint-Antikörper wurde schon 2015 für Patienten mit BRAF V600-Wildtyp Hautkrebs zugelassen, nachdem in der CheckMate-069 Studie eine deutlich höhere objektive Ansprechrates und längeres progressionsfreies Überleben gezeigt werden konnte [97]. Eine aktuelle Studie des Cancer Research Institute's [98] zeigt das Ausmaß der Nachfrage an kombinatorischen Immuntherapien und wirft gleichzeitig Fragen zum wissenschaftlichen Hintergrund und Redundanz der 469 allein

im Jahr 2017 gestarteten anti-PD-1/PD-L1-Kombinationsstudien, für welche 52.539 Patienten rekrutiert werden, auf. Diese Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit optimierter Therapiekonzepte und die Erarbeitung einer wissenschaftlichen Rationale für optimale Kombinationen aus Immuntherapien. Aufgrund der starken Präsenz inhibierender Checkpoint-Moleküle (z. B. PD-L1, s. Tabelle 2) auf Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression und der immunmodulierenden Eigenschaften von anti-EGFR-Antikörpern (Abbildung 3) könnte die Kombination beider Therapiekonzepte mit optimierten Antikörpern zu synergistischen Effekten führen, da adaptive Resistenzmechanismen durch diese Kombination aufgehoben würden [20].

### 3.3.2 *Agonistische Immun-Checkpoint-Antikörper*

Im Gegensatz zu inhibitorischen Checkpoint-Molekülen kann die Aktivierung von Immunzellen durch die Stimulation mit agonistischen Immun-Checkpoint-mAks direkt verstärkt werden. Abhängig von der Struktur der Rezeptoren werden stimulierende Checkpoint-Moleküle in die CD28/CTLA-4-Familie und Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) unterschieden (Abbildung 5). Zwei Beispiele für TNFR, welche bereits für die Entwicklung agonistischer Checkpoint-Antikörper verwendet werden, sind CD137 und CD40.

CD137 (auch 4-1BB, TNFRS9) ist ein ko-stimulierender Oberflächenrezeptor, welcher auf verschiedenen, aktivierten Immunzellen exprimiert wird (z. B. CD8+, CD4+,  $\gamma\delta$ - und regulatorische T-Zellen, NKT (Natürliche Killer-T-) Zellen, NK-Zellen, DCs und Mastzellen [99, 100]. Sobald exprimiert, bindet CD137 hochaffin an den CD137-Liganden (CD137L), welchen vor allem antigenpräsentierende Zellen tragen. Die Aktivierung von CD137 verstärkt die Produktion anti-apoptotischer Moleküle, die Proliferation, die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und erhöht die zytotoxische Aktivität von CD8 positiven T-Zellen und NK-Zellen gegen Tumorzellen [101, 102]. Bisher durchliefen zwei agonistische anti-CD137 Antikörper klinische Studien. Nachdem Urelumab (BMS-663513, IgG4) in präklinischen Mausmodellen vielversprechende antitumor Aktivitäten vermittelte, zeigte sich, dass dieser Antikörper zu einer starken Lebertoxizität führt, wodurch das klinische Programm lange Zeit ausgesetzt werden musste [103]. Veröffentlichte Daten einer aktuellen Studie mit deutlich reduzierter Antikörper-Dosis zeigten nahezu keine klinische Effektivität von Urelumab als Monotherapie [104]. Ein zweiter anti-CD137 Antikörper, Utomilumab (PF-05082566, IgG2), bindet ein anderes Epitop im CD137 und zeigt eine bessere Verträglichkeit bei geringerer agonistischer Stimulation. In einer klinischen Phase I Studie mit einer Dosis von bis zu 10 mg/kg führte auch Utomilumab bei Patienten mit soliden Tumoren nur zu einer objektiven

Ansprechrate von 3,8 % [105]. Dennoch ist die Aktivierung von CD137 mit agonistischen Antikörpern ein sehr interessanter Ansatz für die Kombination mit Tumor-spezifischen Antikörpern des Isotyps IgG1, da CD137 auf NK-Zellen nach Stimulation des FcγRIIIa induziert wird. In präklinischen Modellen führte die Kombination aus CD137-Stimulation mit den IgG1 Antikörpern Rituximab, Trastuzumab und Cetuximab zu einer gesteigerten ADCC gegen Tumorzellen [106, 107]. Neben der Kombination mit Tumor-spezifischen Antikörpern untersuchen einige Studien aktuell den Nutzen der CD137-Stimulation in Kombination mit Chemotherapie, Radiotherapie, Vakzinen oder Zytokinen [103].

Ein weiterer ko-stimulierender Immun-Checkpoint ist CD40. Anders als die meisten anderen Checkpoint-Moleküle, welche hauptsächlich für die Aktivierung von T-Zellen beschrieben sind, ist dieser TNFR vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen (z. B. B-Zellen, Monozyten, DCs) exprimiert. Die Aktivierung dieser Zellen über den natürlichen Liganden (CD40L, auch CD154), oder agonistische Antikörper initiiert eine Reihe, an den zytoplasmatischen Teil von CD40 angeschlossenen, Adapterproteinen, wodurch die Expression ko-stimulierender und Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle hochreguliert werden [108]. Neben PD-1 wird CD40 als eines der wichtigsten Targets der Immuntherapie angesehen [109]. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass CD40 eine entscheidende Rolle bei der Initiierung effektiver antitumor T-Zell-Reaktionen spielt und durch die Vernetzung angeborener und adaptiver Immunantworten die Konversion immunologisch kalter in stark immuninfiltrierte Tumore ermöglichen kann. Somit wären agonistische anti-CD40 Antikörper ideale Partner für Kombinationen mit anderen Immuntherapien, wie z. B. antagonistischen Checkpoint mAks oder Vakzinen [110]. Derzeit befinden sich sieben agonistische anti-CD40 mAks in der klinischen Entwicklung (Tabelle 3, Abbildung 6).

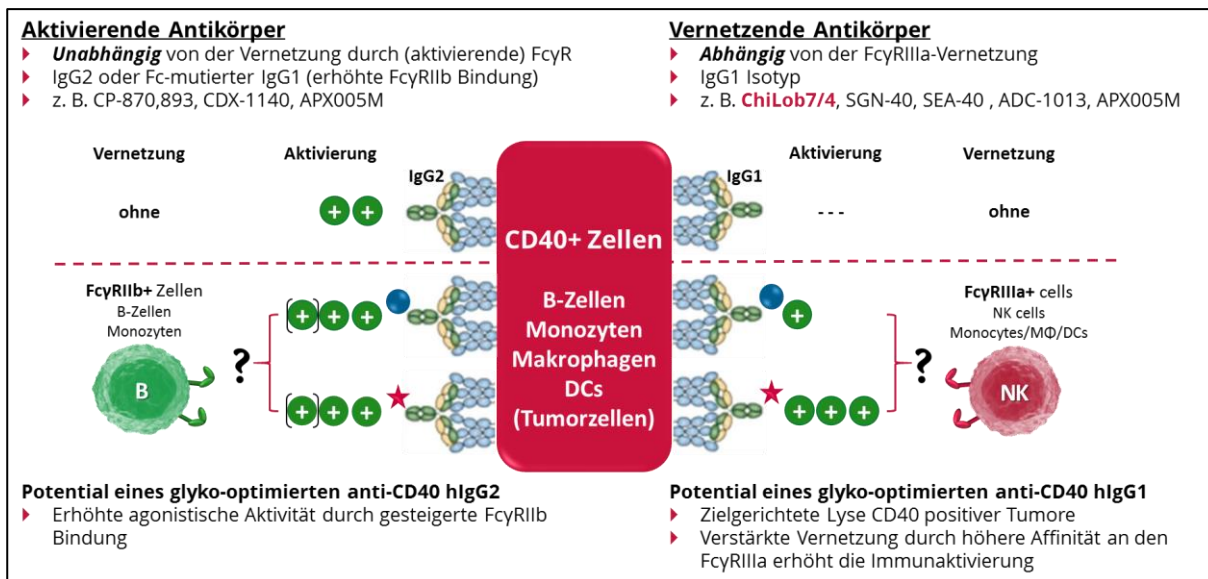
**Tabelle 3 Zusammenfassung klinisch entwickelter, agonistischer anti-CD40 Antikörper [111-113].**

<b>Antikörper</b>	<b>Isotyp, Besonderheit</b>	<b>Firma</b>
Selicrelumab	IgG2	Roche
CDX-1140	IgG2	Celldex
SGN-40	IgG1	Roche
SEA-CD40	IgG1, defukosylierter SGN-40	Roche
ADC-1013	IgG1	Janssen
APX-005M	IgG1, höhere Affinität zu FcγRIIb	Apexigen
ChiLob 7/4	IgG1	University Southampton, BioNTech

Eine Besonderheit von TNFR ist, dass deren Aktivierung durch die natürlichen Liganden oder agonistische mAks von einer Multimerisierung der Rezeptoren zu Trimeren- oder „Superclustern“ abhängt, was für die Generierung agonistischer Antikörper von entscheidender Bedeutung ist [113, 114]. Einige Studien deuten darauf hin, dass das Epitop und der Isotyp der Antikörper die Stärke der Stimulation beeinflusst. TNFR bestehen aus vier Cystein-reichen Domänen (CRD). Experimente mit Antikörpern gegen CD137 und CD40 zeigten, dass Antikörper gegen die CRD-1 eine stärkere agonistische Aktivität vermittelten, als Antikörper, welche an die Membran-nahe CRD-4 binden [115, 116].

Ein weiterer Level der Komplexität bei der Generierung agonistischer mAks entsteht durch die Wahl des Isotyps, wobei die Entscheidung über den optimalen Isotypen noch zur wissenschaftlichen Diskussion steht [117]. Für den anti-CD40 Antikörper Selicrelimab mit dem Isotypen IgG2 konnte gezeigt werden, dass das besondere Epitop dieses Antikörpers eine FcγR unabhängige Aktivierung vermittelt [118]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die spezielle Struktur der Hinge-Region von IgG2 Antikörpern die Multimerisierung von CD40 ohne die Vernetzung über FcγR erlaubt [116, 119], diese aber durch die Interaktion mit dem inhibitorischen FcγRIIb optimiert werden kann [113, 120, 121]. Dennoch basieren fünf der bisher sieben klinisch entwickelten anti-CD40 Antikörper auf dem Isotyp IgG1 (Tabelle 3, Abbildung 6).

Die Aktivierung von Immunzellen durch agonistische anti-CD40 IgG1 Antikörper wird durch die Bindung an den FcγRIIIa vermittelt. Dabei bringt die Interaktion der mAks mit FcγRIIIa positiven Immunzellen mehrere CD40 Rezeptoren in räumliche Nähe und es kommt zur Multimerisierung. Neben antigenpräsentierenden Zellen exprimieren auch nahezu alle B-Zell-Erkrankungen und 40-75% an Karzinomen CD40 [117]. Durch die Generierung von anti-CD40 mAks mit dem Isotypen IgG1 kann daher zusätzlich ADCC gegen CD40 positive Tumorzellen vermittelt werden, wodurch ein zweiter Effektormechanismus ermöglicht und die Freisetzung von Tumorantigenen gefördert wird. Abhängig von der Art der Rezeptor-Multimerisierung und Bedeutung der FcγR-bedingten Aktivierung von Immunzellen werden aktivierende und vernetzende agonistische Antikörper unterschieden (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Unterscheidung der Wirkmechanismen agonistischer anti-CD40 Antikörper.** Aktivierende anti-CD40 Antikörper sind zumeist vom Isotypen IgG2 und führen ohne die Vernetzung über aktivierende FcγRs zur Aktivierung von Immunzellen. Im Gegensatz dazu sind vernetzende anti-CD40 IgG1 mAKs von der Interaktion mit v. A. FcγRIIIa positiven Immunzellen abhängig. Eine Ausnahme bildet der IgG1 mAk APX-005M, welcher mit einer verstärkten Affinität für den FcγRIIb entwickelt wurde und dadurch beide Arten der Multimerisierung und die Aktivierung von FcγRIIIa positiven Immunzellen ermöglichen kann [122, 123]. Durch die unterschiedliche Interaktion mit FcγR auf Immunzellen besitzen diese Antikörper-Klassen ein unterschiedliches Potenzial für die Generierung verbesserter mAKs durch *Glycoengineering*.

Basierend auf dem chimären anti-CD40 Antikörper ChiLob 7/4 haben Mitarbeiter der Glycotope GmbH humanisierte Varianten der Isotypen hIgG1 und hIgG2 generiert. Zusammengefasst konnten durch diese Arbeiten humanisierte Antikörper-Varianten mit vergleichbarer Antigenerkennung, wie der chimäre anti-CD40 ChiLob 7/4, entwickelt werden. Durch die Expression der Antikörper in zwei unterschiedlichen Zelllinien der GlycoExpress® Plattform tragen die Antikörper entweder stark-fukosylierte, oder Fucose-reduzierte Fc-Glykane. Biochemische Analysen zeigten, dass die hIgG1 und hIgG2 Varianten mit geringer Fc-Fukosylierung deutlich verstärkt an den hFcγRIIIa binden. Überraschenderweise führte vor allem die Defukosylierung des humanisierten IgG1 Antikörpers ebenfalls zu einer stärkeren Bindung an den FcγRIIb. Aus ersten funktionellen Experimenten geht hervor, dass die generierten Antikörper-Varianten unterschiedlich starke Effektorfunktionen vermitteln. Durch Experimente der vorliegenden Doktorarbeit werden diese Beobachtungen vertieft, sowie Untersuchungen zu möglichen Problemen mit Fc-optimierten, agonistischen anti-CD40 Antikörpern durchgeführt.

### 3.4 Fragestellungen

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAk) in der Krebstherapie gewinnt aktuell immer stärker an Bedeutung. Trotz des enormen Erfolges von zielgerichteten Therapien mit tumorantigenspezifischen Antikörpern oder Antikörpern gegen immunologische Checkpoint-Moleküle, ist die klinische Effektivität weiterhin beschränkt auf eine geringe Wirkdauer und/oder Patientenpopulation. Aus diesem Grund liegt ein Augenmerk der aktuellen Krebsforschung auf 1) der Optimierung bereits bestehender Therapien durch Weiterentwicklung struktureller Eigenschaften der Medikamente und 2) der rationalen Kombination mehrerer Therapiekonzepte. Neben der spezifischen Bindung einer Targetstruktur steht die Bedeutung der Fc-vermittelten Effektorfunktionen durch mAk in der wissenschaftlichen Diskussion. Die Auswahl des Antikörper Isotyps sowie der Ansatz der Fc-Glyko-Optimierung bietet die Möglichkeit, die Wechselwirkungen der Fc-Anteile der Antikörper mit den Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immunzellen zu beeinflussen. Bestandteil der vorliegenden Dissertation ist daher die Charakterisierung der Bedeutung des Fc-Anteils bei EGFR targetierenden- und Immun-Checkpoint Antikörpern in zwei Teilprojekten.

Am Beispiel des glyko-optimierten anti-EGFR Antikörpers Tomuzotuximab sollen die immunmodulatorischen Eigenschaften und die Kreuzvernetzung von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems durch einen Fc-optimierten Antikörper untersucht werden. Hierfür werden die Auswirkungen von Tomuzotuximab mit denen des nicht-glyko-optimierten Cetuximab auf Immunzellpopulationen und Tumorzellen in diversen *in vitro* Stimulationsexperimenten vergleichend analysiert. Daraus sollen im weiteren Verlauf Rationale für Kombinationstherapien mit Immun-Checkpoint-Antikörpern abgeleitet und *in vitro* getestet werden.

In einem zweiten Teilprojekt soll außerdem geklärt werden, ob die Wahl des Isotyps und dessen Fc-Glyko-Optimierung die Wirkmechanismen eines agonistischen anti-CD40 Antikörpers beeinflussen. Hierfür wurden von der Glycotope GmbH auf Basis des Antikörpers ChiLob7/4 humanisierte anti-CD40 Antikörper mit hIgG1 oder hIgG2 Isotyp in verschiedenen Glykosylierungsvarianten generiert, welche innerhalb dieser Arbeit im Detail charakterisiert werden sollen. Der Fokus der hierbei durchzuführenden Analysen liegt dabei auf der Funktionalität (agonistische Aktivität, Fc-vermittelte Effekte) und potenzieller Immuntoxizitäten (Immunzelldepletion, Zytokin-Freisetzungssyndrom).

## 4 Methodik

### 4.1 Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen

#### 4.1.1 Tumorzelllinien

Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit 25-150 cm<sup>2</sup> großer Wachstumsfläche (TPP) kultiviert und waren frei von *Mycoplasma*-Kontaminationen (Testung mit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit, Lonza, #LT07-318). Alle Zellzählungen wurden mittels Luna-FL Automated Cell Counter (Logos Biosystems) nach Färbung der Zellen mit Trypanblau (Biozym, #872030) bzw. dem AO/PI Cell Viability Kit (Logos Biosystems, #F23001) durchgeführt.

Suspensionszelllinien wurden alle 2-3 Tage auf eine Zellzahl von 2x10<sup>5</sup>-1x10<sup>6</sup> Z/ml verdünnt. Adhärent wachsende Zellen wurden alle 2-3 Tage ab einer Konfluenz von 70-90 % durch Accutase (Sigma Aldrich, #A6964) oder Trypsin (HSC-4, Gibco, #25200) vom Flaschenboden abgelöst und verdünnt weiterkultiviert. Um genetische Veränderungen durch Langzeitkultivierungen zu reduzieren, wurden die Zelllinien nach 30 Passagen verworfen und neue Kulturen aus kryokonservierten Rückstellproben angesetzt. Die verwendeten Zelllinien und deren Medien sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Medien RPMI 1640 (#FG1215), DMEM (#F0415) sowie L-Glutamin (#K0283) kamen von Biochrom, das McCoy's 5a Medium von Gibco (#26600) und das fetale Kälberserum (FKS) wurde von Sigma Aldrich (#F7524) bezogen. Weitere Zusätze kamen von Peprotech (IL-2, #200-02) und Sigma-Aldrich (Insulin, #I9278).

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Ursprung	a/s	Medium	Zusätze (% in v/v)	EGFR	PD-L1	CD40
<i>A-431</i>	epidermoides Karzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	4,8E+05	1,1E+04	-
<i>CaOv-3</i>	Ovarkarzinom	a	DMEM	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	1,8E+05	1,3E+04	1,1E+04
<i>CAPAN-2</i>	Pankreasadenokarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	1,9E+05	1,8E+04	-
<i>DU-145</i>	Prostatakarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	2,4E+05	2,2E+04	4,8E+03
<i>H1975</i>	Lungenadenokarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	1,2E+05	1,8E+04	-
<i>H460</i>	Lungenkarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	8,3E+04	-	2,3E+02
<i>HCC-366</i>	Lungenkarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	2,9E+05	1,7E+03	-
<i>HCT-116</i>	Kolorektalkarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	1,1E+05	-	-
<i>HSC-4</i>	Zungenkarzinom	a	DMEM	10 % FKS, 2 % L-Glutamin	3,2E+05	9,3E+03	5,8E+03
<i>KHYG-1</i>	NK-Zell-Leukämie	s	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 10 ng/ml IL-2	-	-	-
<i>Ls174T</i>	kolorektales Adenokarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	7,5E+04	1,6E+02	-
<i>MCF-7</i>	Brustkrebs	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	8,3E+03	2,3E+02	-
<i>Ovcar-3</i>	Ovaradenokarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 0,02 µg/ml Insulin	1,5E+05	7,3E+03	-
<i>Panc-1</i>	Pankreaskarzinom	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	2,5E+05	4,8E+03	-
<i>Ramos</i>	Burkitt-Lymphom	s	RPMI 1640	20 % FKS, 1 % L-Glutamin	n.d.	-	1,8E+04
<i>SAT</i>	Karzinom der Mundhöhle	a	DMEM	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	-	-	-
<i>SK-BR-3</i>	Brustdrüse	a	McCoy's 5a	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	1,1E+05	4,3E+03	-
<i>SK-OV-3</i>	Ovaradenokarzinom	a	McCoy's 5a	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	1,6E+05	1,1E+04	-
<i>T-47D</i>	Brustdrüse	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	4,2E+04	5,9E+03	-
<i>ZR-75-1</i>	Brustdrüse	a	RPMI 1640	10 % FKS, 1 % L-Glutamin	5,1E+03	3,4E+03	-

a/s: adhären oder Suspension; Expression von EGFR, PD-L1 und CD40 als Antikörper-Bindungs-Kapazitäten pro Zelle (ABC/Zelle; E+0x = x 10<sup>x</sup>).

Für die verwendeten Zelllinien wurden die Experiment-relevanten Antigenexpressionsraten des EGFR, von PD-L1 und/oder CD40 quantitativ bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit sättigenden Konzentrationen (je 100 µg/ml) des anti-EGFR Tomuzotuximab, des anti-PD-L1 Atezolizumab oder anti-CD40 (Klon 5C3, BD Biosciences, #555587), oder einer Isotypkontrolle (Klon MOPC21, Biolegend, #400124) behandelt. Für die Quantifizierung der Antikörper-Bindungs-Kapazitäten (engl. *antibody binding capacity*, ABC) wurde das Quantum™ Simply



Cellular®-Kit (für anti-EGFR und anti-PD-L1, Bangs Laboratories, Inc., #816), oder das QIFIKIT® (anti-CD40, DAKO, #K0078) verwendet. Die relevanten ABCs der verwendeten Zelllinien sind unter Angabe der durchschnittlichen Expressionsstärke in ABC/Zellen ebenfalls in Tabelle 4 angegeben (Experimente zur Ermittlung der ABCs für EGFR und PD-L1 wurden durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH durchgeführt).

Neben der Wildtyp-Variante der NK-Zelllinie KHYG-1 wurden durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH Varianten mit dem humanen FcγRIIIa (CD16-158aF oder CD16-158aV) stabil transfiziert [96]. Um eine kontinuierliche Expression zu gewährleisten wurde deren Medium 25 nmol/L Methotrexat (Sigma-Aldrich, #M8407) als Selektionsdruck hinzugefügt.

Sofern nicht anders angegeben, wurde für Ko-Kulturen und Stimulationsexperimente RPMI 1640 mit 5 % FKS als Medium verwendet.

#### *4.1.2 Primärmaterial*

Humane PBMCs von gesunden Spendern wurden aus Frischblut (Praxis von Herrn Dr. Christ, Berlin), Leukapherese-Produkten (Charité, Berlin), oder kommerziell erhältlichen Buffy coats (Deutsches Rotes Kreuz, Berlin) mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Biochrom, #L6113; 20 ml Biocoll-Solution + 20 ml Primärmaterial, 12 min bei 1045 x g) isoliert. Die aufgereinigten PBMCs wurden dann entweder frisch oder nach Kryokonservierung und Lagerung in flüssigem Stickstoff verwendet. Für die Kryokonservierung wurden die PBMCs mit einer Vitalität >90 % in Einfriermedium (15 % AIMV-Medium (Gibco, #12055), 75 % FKS, 10 % DMSO (Sigma Aldrich, #D2650)) aufgenommen. Für Experimente, in denen Unterschiede zwischen den FcγRIIIa-Genotypen untersucht werden sollten, führten Mitarbeiter der Glycotope GmbH FcγRIIIa Genotyp-spezifische, quantitative PCR-Analysen durch. Alle Frischblut- und Leukapheresatspender, deren Immunzellen in dieser Arbeit verwendet wurden, gaben ihre schriftliche Einwilligung für die Durchführung wissenschaftlicher Experimente.

## **4.2 Therapeutische Antikörper**

Die in dieser Arbeit verwendeten, therapeutischen Antikörper von Fremdfirmen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Zusammenfassung klinischer Antikörper.**

Antikörper	Handelsname	Antigen	Hersteller	Bestellnummer
<i>Cetuximab</i>	Erbix®	EGFR	Merck KGaA	PZN-0493528
<i>Avelumab</i>	Bavencio®	PD-L1	Merck KGaA	NDC-44084-3535-1
<i>Atezolizumab</i>	Tecentriq®	PD-L1	Genentech, Inc	NDC-50242-917-01
<i>Nivolumab</i>	Opdivo®	PD-1	Bristol-Myers Squibb	NDC-0003-3772-11
<i>Pembrolizumab</i>	Keytruda®	PD-1	Merck & Co	NDC-0006-3029-01
<i>Rituximab</i>	Mabthera®	CD20	Hoffmann-La Roche	PZN-8709896
<i>Obinutuzumab</i>	Gazyvaro®	CD20	Hoffmann-La Roche	PZN-10048686
<i>Trastuzumab</i>	Herceptin®	HER2/neu	Hoffmann-La Roche	PZN-1289787

Für die Experimente zum Einfluss der Fc-Fukosylierung auf die CD137-Expression auf NK-Zellen wurde u. A. Rituximab mit Obinutuzumab verglichen. Dabei ist zu beachten, dass diese Antikörper unterschiedlichen Generationen von anti-CD20 Antikörpern angehören und Obinutuzumab als Typ II mAk zu einer verbesserten Induktion des direkten Zelltods führt.

Tomuzotuximab, der defukosylierte anti-HER-2 (Timigutuzumab, ehemals TrasGEX; [124]), sowie die unterschiedlich Fc-fukosylierten anti-PD-L1 und anti-CD40 Antikörper wurden durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH unter Verwendung der GEX®-Expressions-Plattform generiert [96, 125]. Der anti-CD40 Antikörper ChiLob 7/4 als IgG1 und IgG2, der anti-CD137 Antikörper SAP-3-28, sowie Surrogat-Antikörper des anti-CD28 TGN1412 und des anti-CD40 CP-870,893 wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Glennie, *University of Southampton*, in CHO-Zellen generiert und zur Testung bereitgestellt.

### 4.3 Durchflusszytometrie

Die Vermessung durchflusszytometrischer Experimente erfolgte am BD FACSCanto™ II oder am Attune™ NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Zu Beginn jedes Messtages wurde die Funktionsfähigkeit der Geräte durch Vermessung von CS&T Research Beads (BD Biosciences, #655050) bzw. Attune™ Performance Tracking Beads (Thermo Fisher Scientific, #4449754) bestätigt. Nach Überführung der zu analysierenden Zellen in 96-Well-Rundbodenplatten (TPP) wurden diese mit FACS-Puffer (1x PBS/0,2 % BSA, Sigma, #A9647) gewaschen. Die an Fluoreszenzfarbstoffe konjugierten Antikörper wurden ebenfalls in 1x PBS/0,2 % BSA verdünnt und die Färbung erfolgte für 20-30 min auf Eis. Die Zusammensetzung der Färbeantikörper ist in jedem Experiment, welches über Durchflusszytometrie ausgewertet wurde, separat aufgeführt. Nach zweimaligem Waschen (300 x g, 5 min) wurden die Zellen wieder in FACS-Puffer aufgenommen und 10 % DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Merck, #124653) oder 20 µg/ml 7-AAD (7-Aminoactinomycin D,

Sigma-Aldrich, #A9400; in Experimenten mit KHYG-1-Zellen verwendet) als lebend/tod-Farbstoff zugegeben. Nach Aufnahme der Daten erfolgte die Auswertung innerhalb der BD FACSDiva™ Software oder mittels FlowJo V10.

#### **4.4 Induktion von CD137 auf NK-Zellen**

##### *4.4.1 Experimente mit KHYG-1-Zellen*

Für den Nachweis der Bedeutung der Interaktion zwischen dem Fc-Anteil von IgG1 Antikörpern mit dem FcγRIIIa wurden je 1 µg/ml Tomuzotuximab oder Pembrolizumab (hIgG4) auf den Boden von 96-Well-Flachbodenplatten gebunden. Die Bindung der Antikörper an den Plattenboden erfolgte über Trocknung der in PBS verdünnten Antikörper unter sterilen Bedingungen (ü. N.). Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend mit 1x PBS abgewaschen und KHYG-1-CD16aF zur Stimulation hinzugegeben. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Detektion von CD137 (αCD137-APC, Klon: 4B4-1, BD #550890, 1:20) auf vitalen KHYG-1-CD16aF-Zellen (7-AAD-Färbung).

##### *4.4.2 Experimente mit primären, humanen NK-Zellen*

Negativ-selektierte, humane NK-Zellen (Invitrogen, #11349D) wurden mit verschiedenen Tumorzelllinien (E:T-Ratio 1:1) für 24 h Ko-kultiviert und mit verschiedenen Antikörpern stimuliert (Antikörper und Konzentration siehe Abbildungsbeschreibung). Anschließend wurde die CD137-Expression (αCD137, Klon: 4B4-1, -PE, BD #555956, 1:20 oder -AF647, Biolegend #309824, 1:200) auf CD56+ NK-Zellen (αCD56-FITC, Klon: REA196, Miltenyi #130-100-746, 1:400) durchflusszytometrisch analysiert.

#### **4.5 Ermittlung der Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC)**

##### *4.5.1 Ermittlung der ADCC durch Freisetzung von Europium*

Zum Vergleich der ADCC zwischen Cetuximab und Tomuzotuximab und deren Kombinationen mit Nivolumab wurden DU-145 Zellen mit Europium beladen. Hierfür wurden  $3 \times 10^6$  Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 100 µl Europiumpuffer (50 mM HEPES, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTPA, 2 mM Europium-III-acetat, pH 7,4) für 6 min auf Eis inkubiert und anschließend elektroporiert (Nucleofector® Device, Lonza). Nicht aufgenommenes Europium wurde dann über sechsmaliges Waschen (14 ml RPMI 1640/5 %

FKS, 5 min, 300 x g) entfernt. Abschließend wurde die Zellzahl bestimmt und für das gewünschte Effektor: Target-Ratio (E: T-Ratio) verdünnt. Als Effektorzellen wurden für diese Experimente PBMCs aus Buffy coats isoliert. Diese wurden entweder direkt verwendet, oder vor dem Beginn der Ko-Kultivierung für 72 h in RPMI 1640/10 % FKS/1 % L-Glutamin mit 10 µM Hydrokortison (Sigma-Aldrich, #H0396) und anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Beads (Beads: PBMCs = 1:5; Gibco, #11131D) vorstimuliert. Letzteres sollte die PD-1 Expression auf NK- und T-Zellen erhöhen und einen immunsuppressiven Phänotyp induzieren. Die Expression von PD-1 wurde durchflusszytometrisch analysiert (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Fluoreszenzantikörper zur Detektion von PD-1 auf NK- und T-Zellen.**

Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD56	AF488	NCAM1	BD Biosciences	557699	1:100
CD4	PE	RPA-T4	Biologend	300508	1:800
CD279	AF647	EH12.2H7	Biologend	329910	1:200
CD8	AF700	SK1	Biologend	344724	1:100
CD3	BV711	OKT3	BD Biosciences	563724	1:150

Nach Zugabe der Effektorzellen mit einem E: T-Ratio von 80:1 wurden 0,15 ng/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab (max. Lyse bei ~1 ng/ml) ±10 µg/ml Nivolumab zu den Ansätzen gegeben. Nach 5 h bei 37 °C im Inkubator wurden die Platten zentrifugiert (5 min, 300 x g) und 25 µl des Überstandes zu je 200 µl DELFIA® Enhancement Solution (PerkinElmer, #1244-105) gegeben. Während einer zehnmütigen Inkubation kommt es zur Chelatisierung des Europiums, welches dann als Fluoreszenzsignal am Tecan Infinite F200 (Tecan) mit einer Zeitverzögerung von 400 µs, einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 612 nm gemessen werden kann. Zur Berechnung der spezifischen Lyse wurden je 6 Wells für Kontrollen mitgeführt: a) Überstand von Europium-beladenen DU-145 Zellen (basale Freisetzung, BR), b) beladene DU-145 Zellen, wie im Ansatz, aber ohne Effektorzellen (spontane Freisetzung, SR) und c) beladene DU-145 Zellen mit 1 % Triton-X-100 (Sigma Aldrich, maximale Freisetzung, MR). Daraus lässt sich nach Bestimmung des freigesetzten Europiums im Experimentansatz (ER) und folgender Formel die spezifische Lyse berechnen:

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

Als Qualitätskontrolle des Experimentes diene die Bestimmung der Spontanlyse (((SR-BR) / (MR-BR)) x 100 %), welche unterhalb des Grenzwertes von 20 % lag.

Die ADCC-Experimente zum Vergleich der anti-CD40 Antikörper wurden mit KHYG-1-CD16-158aV (E: T 10:1), oder PBMCs (E: T 100:1) gegen verschiedene Europium-beladene Tumorzellen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

#### 4.5.2 Bestimmung der agonistischen Aktivität von CD137 Reagenzien

Isolierte PBMCs aus Buffy coats wurden für zwei Tage in Hochdichtekulturen (HD,  $1,5 \times 10^7$  Z/ml in 24-Well-Platte) inkubiert. Anschließend wurden je  $1 \times 10^5$  PBMCs aus HD-Kulturen auf 96-Well-Platten aufgebracht, welche zuvor mit 0,02 µg/ml anti-CD3 Antikörper (Klon: OKT3, Biolegend, #317326) beschichtet wurden (Trocknung unter sterilen Bedingungen, ü. N.). Zur Bestimmung der agonistischen Aktivität des rekombinanten CD137-Liganden (Peprotech, #310-11) sowie der anti-CD137 Antikörper anti-4B4-1 (Biolegend, #309802), anti-AF838 (R&D systems, #AF838) und anti-SAP-3-28 (M. Glennie, University of Southampton), wurden diese mit 5 µg/ml zu den Ansätzen hinzugegeben. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von 5 µg/ml anti-CD28 (Biolegend, #302914). Nach sechstägiger Inkubation wurde die Anzahl CD3+CD8+ (αCD3-BV711, Klon: OKT3, Biolegend #317328, 1:400; αCD8-AF647, Klon: SK1, Biolegend #344726, 1:400) T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt, um daraus die x-fache Änderung der absoluten Zellzahl durch die Stimulation mit den Testreagenzien zu berechnen.

#### 4.5.3 FACS-basierte Ermittlung der ADCC

Da nicht alle Tumorzellen effektiv mit Europium beladen werden können und der Anteil an Spontanlyse nach über 5 h Inkubation stetig steigt, wurde eine weitere Methode etabliert, um längere Stimulationszeiten zu realisieren. Hierfür wurden NK-Zellen aus kryokonservierten PBMCs von Leukapherese-Produkten aufgereinigt (Invitrogen, #11349D) und in einem E: T-Ratio von 5:1 zu  $4 \times 10^4$  HSC-4 Zellen gegeben. Diesen Ansätzen wurden 10 ng/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab ±10 µg/ml Avelumab oder 1 µg/ml anti-CD137 SAP-3-28 zugegeben und für 24 h im Inkubator kultiviert. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl vitaler HSC-4 Zellen wurden die Zellen mit Accutase (15-20 min) abgelöst und für eine FACS-Färbung (siehe Tabelle 7) vorbereitet.

**Tabelle 7: Antikörper zum Nachweis der Anzahl vitaler Tumorzellen.**

Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD326	AF488	9C4	Biolegend	324210	1:200
CD25	PE	BC96	Biolegend	302606	1:400
CD274	PE/Cy7	MIH1	BD Biosciences	558017	1:80
CD137	AF647	4B41	Biolegend	309824	1:200
CD3	APC-Vio770	REA613	Miltenyi Biotech	130-109-464	1:800
CD56	BV711	NCAM16.2	BD Biosciences	563169	1:600

Nach der Färbung wurden gleiche Volumina an Zellen vermessen, um die Änderung der Anzahl vitaler, EpCAM+ HSC-4 Zellen zu bestimmen. Über das Mitführen eines Kontrollansatzes, behandelt mit einem hIgG1 Isotyp-Antikörper (Sigma Aldrich, #I5154), wurde die spezifische Lyse wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \left(1 - \frac{\#HSC-4_{\text{Behandlung}}}{\#HSC-4_{\text{hIgG1}}}\right) \times 100\%$$

Zusätzlich konnte über die angewendete FACS-Färbung der Anteil aktivierter CD56+CD137+ NK-Zellen sowie die PD-L1 Expression auf vitalen EpCAM+ HSC-4 Zellen bestimmt werden.

## 4.6 Zytokinfreisetzung nach Antikörperstimulation

### 4.6.1 Vergleich von Cetuximab und Tomuzotuximab

Für die Analyse der Zytokinsekretion durch PBMCs nach Cetuximab- oder Tomuzotuximab-Stimulation wurde die Antigenbindung durch Lufttrocknung (ü. N. unter sterilen Bedingungen) von 10 µg/ml anti-EGFR mAk (in PBS) an 96-Well Rundbodenplatten simuliert. Anschließend wurden die Platten mit 1x PBS gewaschen, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen und 200 µl heparinisiertes Blut von gesunden Spendern zugegeben. Nach 4 h bei 37 °C und anschließender Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse der Zytokinzusammensetzung bei -80 °C gelagert. Um die Sekretion von IL-6, TNF-α und IFN-γ zu bestimmen, wurden die Proben auf Eis aufgetaut und jede in unverdünnten Triplikaten mittels *ultra-sensitive human proinflammatory 4-plex kit* (Meso Scale Discovery, #N45009A-1) vermessen. Die Aufnahme der Elektrochemilumineszenz wurde am SECTOR® Imager SI2400 (Meso Scale Discovery) durchgeführt und die Berechnung der Zytokinkonzentrationen erfolgte über Standardkurven.

#### 4.6.2 Vergleich der anti-CD40 hIgG1 Antikörper

Die Analyse eines möglichen Zytokinsturms durch anti-CD40 hIgG1 Antikörper wurden mittels zweier unterschiedlicher Methoden getestet. Dabei wurden folgende Stimulationen verglichen: a) Mediumkontrolle, b) Tomuzotuximab, c) anti-CD40 hIgG1, d) anti-CD40 hIgG1-GO, e) anti-CD40 CP-870,893 und f) anti-CD28 TGN1412 (je 10 µg/ml).

##### 1) Zytokinfreisetzung durch PBMCs aus Hochdichtekulturen:

Humane PBMCs von gesunden Spendern wurden aus Frischblutproben isoliert und für 48 h in AB-Medium (RPMI 1640 Medium + 2 mM L-Glutamin + 1x nicht-essenzielle Aminosäuren (Merck, #K0293) + 10 % Hitze-inaktiviertes humanes AB Serum (Sigma, #H3667)) mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^7$  Z/1,5 ml in 24-Well Flachbodenplatten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und je  $3 \times 10^5$  HD-PBMCs in AB-Medium auf 96-Well Flachbodenplatten übertragen und 10 µg/ml der zu testenden Antikörper zugegeben (Einfachbestimmungen/Spender). Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

##### 2) Zytokinfreisetzung in Ko-Kulturen aus PBMCs und humanen Endothelzellen

Humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC, engl. *human umbilical vein endothelial cells*, Lonza, #C2519A) wurden in AB-Medium kultiviert und zwischen den Passagen 2-8 für die Experimente verwendet. Dafür wurden zu Beginn  $3 \times 10^4$  HUVEC ü. N. in AB-Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde das AB-Serum entfernt und  $1,25 \times 10^5$  PBMCs/Well, isoliert aus Frischblut und aufgenommen in Assay-Medium (AB-Medium mit 2 % AB-Serum), sowie 10 µg/ml der zu testenden Antikörper hinzugegeben (Einfachbestimmungen/Spender). Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Nachdem alle Überstände gesammelt wurden, wurde die Sekretion von IL-2, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  mittels *U-PLEX Biomarker Group 1 Human Assays* (Meso Scale Discovery, #K15067L-4) vermessen. Die Aufnahme der Elektrochemilumineszenz erfolgte am SECTOR® Imager SI2400 (Meso Scale Discovery) und die Zytokinkonzentrationen wurden über Kalibrierungskurven berechnet.

## 4.7 Regulation von PD-L1 auf Tumorzellen

Die Regulation von PD-L1 auf Tumorzellen wurde unter drei Bedingungen getestet. (1) Um den direkten Effekt von anti-EGFR mAk-aktivierten Immunzellen auf die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen zu untersuchen, wurden PBMCs mit Tumorzellen (E:T-Ratio 10:1) und verschiedenen Konzentrationen Cetuximab oder Tomuzotuximab in 96-Well Flachbodenplatten stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mittels Accutase abgelöst (15-20 min). Die Detektion von PD-L1 auf EpCAM+ Tumorzellen erfolgte nach Färbung der Zellen nach dem Schema aus Tabelle 9 (Ansatz 1). (2) Zusätzlich wurde der Einfluss der Zytokine IL-6 (Peprotech, #200-06), TNF- $\alpha$  (Peprotech, #300-01) und IFN- $\gamma$  (Miltenyi Biotech, #130-096484) auf die PD-L1 Expression von HSC-4 Zellen untersucht. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  HSC-4/Well einer 96-Well Flachbodenplatte ausgesät und für 72 h mit 2 ng/ml oder 10 ng/ml der Zytokine  $\pm$ Zugabe von 1  $\mu$ g/ml eines anti-IFN- $\gamma$  Antikörpers (Biolegend, #B251601) stimuliert. Anschließend wurden die HSC-4 geerntet (siehe (1)), um die PD-L1 Expression ( $\alpha$ CD274-PE/Cy7, Klon: MIH1, BD Biosciences, 1:80) auf vitalen Zellen zu bestimmen. (3) Aufgereinigte PBMCs wurden für 72 h mit HSC-4 Zellen (10:1) und 10  $\mu$ g/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab behandelt, um physiologische Zytokinkonzentrationen zu erhalten. Anschließend wurden  $1 \times 10^5$  Z/60  $\mu$ l unbehandelte HSC-4 Zellen ausgesät und 140  $\mu$ l des generierten Ko-Kulturüberstandes ( $\pm$ 1  $\mu$ g/ml anti-IFN- $\gamma$ ) zugegeben. Nach weiteren 72 h wurde die HSC-4 Zellen geerntet, um die PD-L1 Expression ( $\alpha$ CD274-PE/Cy7, Klon: MIH1, BD Biosciences, 1:80) zu bestimmen.

In Experimenten zur Reduktion der PD-L1 Expression durch EGFR-TKIs wurden  $2 \times 10^5$  Tumorzellen mit 1  $\mu$ M Erlotinib (Sigma, #CDS022564) oder 0,1  $\mu$ M Afatinib (Selleckchem, #S1011) behandelt. Nach drei bis sieben Tagen erfolgte die Detektion von PD-L1 über die Bindung von 1  $\mu$ g/ml Atezolizumab und Gegenfärbung mit einem PE-konjugiertem anti-human IgG/IgM Antikörper (Jackson ImmunoResearch, #109-116-127, 1:100).

## 4.8 3D Sphäroid-Modell

Für die Untersuchung der Effekte der verschiedenen Antikörper auf die Infiltration von Immunzellen in kompakte Tumorsphäroide wurden  $1 \times 10^4$  HSC-4 (Cetuximab-Tomuzotuximab-Vergleich) oder  $1,6 \times 10^3$  MCF-7 (Vergleich der anti-CD40 Antikörper) in 96-Well Corning® Sphäroid Microplates (Sigma-Aldrich, #CLS4520) im jeweiligen Zellkulturmedium kultiviert. Dadurch bildeten sich nach drei Tagen einheitlich-große (~300  $\mu$ m), kompakte Sphäroide, zu



welchen dann  $2 \times 10^5$  PBMCs hinzugegeben wurden. Zur Stimulation wurden die Ansätze mit 10 µg/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab bzw. 1 µg/ml anti-CD40 Antikörper für zwei Tage inkubiert. Die Auswertung der Experimente erfolgte durch FACS-Analyse und immunhistochemische Färbung von Sphäroid-Schnitten.

#### 4.8.1 FACS-Analyse der Sphäroidkulturen

Nach zweitägiger Ko-Kultur wurden die Sphäroide geerntet, in eine frische 96-Well Rundbodenplatte (TPP) überführt und 3x mit 1x PBS gewaschen. Der Erfolg des Waschens wurde mikroskopisch kontrolliert (Reduktion der Immunzellen außerhalb der Sphäroide). Anschließend wurden die Sphäroide durch Zugabe von Accutase (MCF-7) oder Trypsin (HSC-4) für 20-30 min dissoziiert, in FACS-Puffer aufgenommen und für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Antikörper zur Bestimmung infiltrierter Immunzellen in Tumorsphäroide.**

Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD326	AF488	9C4	Biologend	324210	1:200
CD56	PE	REA196	Miltenyi Biotech	130-113-312	1:300
CD326	PerCPVio700	REA613	Miltenyi Biotech	130-109-465	1:100
CD274	PE/Cy7	MIH1	BD Biosciences	558017	1:80
CD137	AF647	4B4-1	Biologend	309824	1:200
CD4	BV421	RPA-T4	Biologend	300532	1:500
CD8	BV605	SK1	Biologend	344742	1:400

Die Behandlung von PBMCs mit Trypsin hat die Abspaltung verschiedener Oberflächenmoleküle zur Folge. Zum Beispiel konnten die Marker CD56, CD4 und CD8 nicht weiter nachgewiesen werden, weshalb sich die Auswertung der Infiltration in HSC-4 Sphäroide auf die Unterscheidung von CD3+ und CD3- Immunzellen beschränken musste.

#### 4.8.2 Immunhistochemische (IHC) Analyse der Sphäroidkulturen

Da die Sensitivität der FACS-Analysen stark vom Erfolg des Wegwaschens nicht-infiltrierter Immunzellen und der vollständigen Sphäroid-Dissoziation abhängt, wurden zusätzlich IHC-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden Sphäroide einer Stimulation in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Formalin für 3 h (Sigma, #HT501128). Die fixierten Sphäroide wurden dann in Histogel (Thermo-Scientific, #HG-4000-012) aufgenommen, mit Richard-Allan Scientific™ Mark-It™ (Fisher Scientific, #12648076) gefärbt, entwässert (STP 120 Gewebereinbettungsautomat mit

Abschleuderfunktion, Thermo Fisher) und parafiniert (HistoStar™ Embedding Workstation, Thermo Fisher). Nachdem die Proben ausgehärtet waren, wurden 5 µm dicke Schnitte (Rotationsmikrotom HM340, Thermo Scientific) angefertigt und für die Färbung durch eine ü. N. Inkubation bei 55 °C vorbereitet. Dann wurden die Schnitte für 15 min mit Xylol (Roth, #4436.2) de-parafiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe re-hydriert (98-50 % (v/v) Ethanol, Roth, #5054.5; 1x PBS). Die Antigen-de-Maskierung erfolgte durch Inkubation in 10 mM Natriumzitatpuffer (pH 6,0) im Dampfkocher bei 95 °C für 20 min. Nach Abkühlen der Schnitte wurden diese einmal in 1x PBS gewaschen, um anschließend die endogene Peroxidase-Aktivität durch 3 % (v/v) Wasserstoffperoxid (Roth, #8070) zu blockieren (10 min). Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Schnitte dann mit 1x PBS/2 % BSA inkubiert (60 min). Nach einem erneuten Waschschrift (3x, 1x PBS, 3 min) wurden die Sphäroide mit den Primärantikörpern (anti-huCD8, Klon: C8/144B, Biolegend, #372902, 1:400; anti-huCD45, Klon: PD7/26/16+2B11, Thermo, #MA5-13197, 1:400) oder einer Isotypkontrolle (mIgG1, Klon: MOPC-21, Biolegend, #400124, 10 µg/ml), verdünnt in 1x PBS/2 % BSA, für 60 min behandelt. Überschüssige Antikörper wurden dann von den Schnitten gewaschen (3x, 1x PBS, 3 min), um die Schnitte anschließend mit HRP-konjugiertem anti-Maus-Polymeren gegenzufärben (30 min, Dako, #K4001). Nach dem Entfernen (3x, 1x PBS, 3 min) von überschüssigem Sekundärreagenz, erfolgte die Farbentwicklung durch die Zugabe des HRP-Substrates 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Dako, #K3467) für 10 min. Zur Gegenfärbung der Sphäroide wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Meyer's Hämatoxylin (Thermo Fisher, #72804) überführt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50-98 % (v/v) Ethanol) de-hydriert, in Xylol getaucht (15 min) und mittels Entellan (Merck, #1079600500) auf Objektträgern eingebettet. Die Auswertung der Färbungen wurde am Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) und der ZEN-blue Software (Zeiss) durchgeführt. Dargestellte Bilder wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

#### **4.9 Reifung von Monozyten in PBMC: Tumorzell-Ko-Kulturen**

Zur Untersuchung des Einflusses von Cetuximab und Tomuzotuximab auf die Regulation von Reifungs- und Checkpoint-Molekülen auf Monozyten wurden Ko-Kulturen aus PBMCs und Tumorzellen (E:T-Ratio 10:1, 96-Well Flachbodenplatte) mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen stimuliert (0,01 ng/ml - 10 µg/ml; dargestellt nur 10 ng/ml). Nach drei Tagen wurden die Zellen gewaschen, mittels Accutase vom Plattenboden abgelöst und für

die durchflusszytometrische Testung vorbereitet (Tabelle 9). Die Expressionsdichte verschiedener Oberflächenmoleküle wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (engl. *median fluorescence intensity*, MFI) auf CD14+HLA-DR+ Monozyten analysiert. Um die technischen Einflüsse auf die Ergebnisse verschiedener Spender an unterschiedlichen Messtagen zu minimieren, wurde die relative, x-fache Änderung der Expression im Verhältnis zur Experimenten-Mediumkontrolle berechnet ( $MFI_{\text{Probe}}/MFI_{\text{Medium}}$ ).

**Tabelle 9: Antikörper-Ansätze für die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmolekülen auf Monozyten.**

(1) Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD326	AF488	9C4	Biolegend	324210	1:200
CD163	PE	REA812	Miltenyi Biotech	130-112-128	1:100
CD274	PE/Cy7	MIH1	BD Biosciences	558017	1:80
CD86	APC	FM95	Miltenyi Biotech	130-113-569	1:200
CD14	APC/Cy7	HCD14	Biolegend	325620	1:800
HLA-DR	BV711	G46-6	BD Biosciences	563696	1:200
(2) Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD40	FITC	5C3	Biolegend	334306	1:400
CD80	PE	L307.4	BD Biosciences	557227	1:50
CD274	PE/Cy7	MIH1	BD Biosciences	558017	1:80
CD86	APC	FM95	Miltenyi Biotech	130-113-569	1:200
CD14	APC/Cy7	HCD14	Biolegend	325620	1:800
HLA-DR	BV711	G46-6	BD Biosciences	563696	1:200

Bezeichnet als (1) und (2) sind zwei verschiedene Färbeansätze.

#### 4.10 Allogene gemischte-Leukozyten-Reaktion (MLR)

PBMCs aus Buffy coats wurden zu einem Teil als Rückstellprobe kryokonserviert (siehe 4.1.2) und zum Anderen verwendet, um Monozyten zu isolieren (Percoll-Gradient, GE Healthcare, #17-0891-02, für 50 ml Gradient: 24,25 ml Percoll, 20,75 ml *aqua dest.*, 5 ml 1,6 M NaCl; je 10 ml Gradient/9 ml Zellsuspension mit  $5 \times 10^7$  PBMCs/ml; Zentrifugation: 15 min, 580 x g, Beschleunigung/Bremse minimal). Aus diesen Monozyten wurden im Folgenden Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (engl. *monocyte-derived dendritic cells*, mo-DC) hergestellt. Dafür wurden  $\sim 1 \times 10^6$  Monozyten/ml in MEM Alpha Medium (Thermo Fisher Scientific, #22571) mit 20 % FKS und 10 % konditioniertem Medium (Überstand von 5637 Zellkultur), 250 U/ml GM-CSF (Gentaur Pharmaceuticals, #04-RHUGM-CSF) und 500 U/ml IL-4 (Peprotech, #200-04) inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die generierten mo-DCs mittels Accutase abgelöst und in 96-Well Flachbodenplatten mit Cetuximab oder Tomuzotuximab unter An/Abwesenheit von autologen NK-Zellen (isoliert aus Rückstell-PBMCs, Invitrogen, #11349D) und Tumorzellen (1:1:1, je  $5 \times 10^4$  Zellen) behandelt. Nach zweitägiger Inkubation wurden die

Zellen entweder mittels Accutase abgelöst, um den DC-Phänotypen durchflusszytometrisch zu bestimmen (Tabelle 10) oder zur allogenen Stimulation von T-Zellen verwendet.

**Tabelle 10: Antikörper zur Detektion von Oberflächenmolekülen auf DCs.**

Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD274	FITC	MIH1	BD Biosciences	558065	1:10
CD80	PE	L307.4	BD Biosciences	557227	1:50
CD11c	PE/Cy7	BU15	Biologend	337216	1:400
CD86	APC	FUN-1	Miltenyi Biotech	130-094-876	1:50
CD14	APC/Cy7	HCD14	Biologend	325620	1:800
HLA-DR	BV711	G46-6	BD Biosciences	563696	1:200

Die Expression von CD80, CD86 und PD-L1 wurde auf CD11c+HLA-DR+ mo-DCs analysiert. Für Vergleiche verschiedener Experimente wurde die Expressionsdichte relativ zur Mediumkontrolle berechnet (MFIProbe/MFIMedium).

Für die allogene T-Zell-Stimulation wurden T-Zellen aus kryokonservierten PBMCs von Leukapheresaten isoliert (Invitrogen, #11344D) und im Verhältnis von 10:1 zu den mo-DC-Kulturen gegeben (engl. *mixed lymphocyte reaction*, MLR). Zusätzlich erfolgte eine erneute Zugabe der anti-EGFR mAbs, identisch zum Startpunkt der mo-DC-Reifung, sowie, sofern angegeben, die Zugabe von 10 µg/ml Nivolumab, Avelumab oder αPDL1<sub>GE</sub>. Die Aktivierung (CD25, CD137 Expression) und Regulation von PD-1 auf Immunzellpopulationen wurde nach weiterer fünftägiger Inkubation gemessen (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Antikörper zur Analyse der Aktivierung von Immunzellen nach MLRs.**

Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD4	FITC	RPA-T4	Biologend	300538	1:300
CD25	PE	BC96	Biologend	302606	1:400
CD3	PerCPVio700	REA613	Miltenyi Biotech	130-109-465	1:100
CD137	AF647	4B4-1	Biologend	309824	1:50
CD279	BV421	EH12.2H7	Biologend	329920	1:100
CD8	BV605	SK1	Biologend	344742	1:400
CD56	BV711	NCAM16.2	BD Biosciences	563169	1:600

Die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD137, sowie die Expression von PD-1 (CD279) wurden auf CD3+CD4+ T-Zellen, CD3+CD8+ T-Zellen und CD3-CD56+ NK-Zellen vermessen.

Da die Zielstruktur der anti-CD40 Antikörper bereits auf den Immunzellen vorhanden ist, wurde in mo-DC-Reifungs-Experimenten und MLRs zur Testung dieser Antikörper (1 µg/ml) auf die Zugabe von Tumorzellen verzichtet. Zusätzlich konnte dadurch die Inkubationszeit der MLRs auf fünf Tage reduziert werden (Weglassen der Vorkultur aus DCs: NK-Zellen: Tumorzellen). Die angeschlossenen Analysen wurden identisch zu den Vergleichen zwischen Cetuximab und Tomuzotuximab durchgeführt.

#### 4.11 NFκB Aktivierung mittels HEK Blue Kit

Für die Analyse der agonistischen Aktivität der anti-CD40 Antikörper wurde das HEK-Blue™ CD40L-Kit verwendet (Invivogen, #hkb-cd40-kit). Dafür wurden  $5 \times 10^4$  HEK-Blue™ CD40L-Zellen (Medium: DMEM mit 10 % FKS und 2 mM L-Glutamin) ± humane PBMCs, aufgereinigte B-Zellen (Invitrogen, #11351D), *in vitro* generierte DCs (siehe 4.10, je  $1 \times 10^5$  Z/Well) oder KHYG-1-CD16aF/V (beide Allotypen,  $1 \times 10^4$  Z/Well) sowie 100 ng/ml der anti-CD40 Antikörper (anti-CD40 hIgG1/hIgG1-GO, hIgG2/hIgG2-GO) inkubiert. Nach 24 h wurden 40 µl des Überstandes der (ko)-Kulturen zu 160 µl QUANTI-Blue™ (Invitrogen, #rep-qb1) gegeben, um nach 5 min Inkubation die Sekretion der embryonalen, alkalischen Phosphatase (SEAP) am Tecan Infinite F200 (Tecan) zwischen den Wellenlängen 620-655 nm zu vermessen.

#### 4.12 Zytotoxizität der anti-CD40 hIgG1 Antikörper gegen Immunzellen

Zur Untersuchung einer möglichen Immunzytotoxizität der anti-CD40 hIgG1 Antikörper wurden  $2 \times 10^5$  PBMCs ±  $4 \times 10^4$  autologer mo-DCs (siehe 4.10) mit 10 ng/ml, 1 µg/ml oder 100 µg/ml anti-CD40 hIgG1/hIgG1-GO in 96-Well Flachbodenplatten ü. N. stimuliert. Da der EGFR auf keiner der getesteten Immunzellen exprimiert ist, wurde Tomuzotuximab als irrelevante defukosylierte Isotypkontrolle mitgeführt. Außerdem diente die erfolgreiche Lyse von B-Zellen durch den defukosylierten anti-CD20 Antikörper Obinutuzumab als Positivkontrolle. Am Folgetag nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet (bei Zugabe von mo-DCs mittels 15 min Accutase) und für durchflusszytometrische Analysen vorbereitet (Tabelle 12).

**Tabelle 12 Antikörper zur Detektion von Immunzelledepletion.**

Antigen	Fluoreszenzmarkierung	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
CD19	FITC	HIB19	Biologend	302206	1:200
CD11c	PE/Cy7	BU15	Biologend	337216	1:400
CD14	APC	63D3	Biologend	367118	1:400
HLA-DR	APC-Fire	L243	Biologend	307658	1:1000

Zur Quantifizierung absoluter Zellzahlen wurden gleiche Volumina der Zellsuspensionen vermessen. Über das Mitführen einer Mediumkontrolle konnte die Reduktion der Immunzellpopulationen berechnet werden (Reduktion [%] =  $(1 - (\#Probe/\#[M]_{Medium})) \times 100$  %).

#### 4.13 Statistik

Ziel dieser Doktorarbeit war die Deskription bisher unbekannter Effekte. Daher haben durchgeführte Statistiken (z. B. p-Werte) keinen konfirmatorischen Charakter und sind deskriptiv zu verstehen. Die graphischen, sowie die statistischen Auswertungen quantitativer Datensätze erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism5. Sofern nicht anders hervorgehoben, sind in den gezeigten Abbildungen die Mittelwerte [M] und Standardfehler (engl. *standard error of mean*, SEM) von technischen und/oder biologischen Replikaten abgebildet. Für den Vergleich von zwei unabhängigen oder abhängigen Gruppen wurden ungepaarte bzw. gepaarte Student's t-Tests durchgeführt (Ausnahme: Kombinationsexperimente, s. Bildunterschrift). Bei Vergleichen von drei und mehr Gruppen wurden Unterschiede über eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way ANOVA) und angeschlossenem Bonferroni post-hoc Test durchgeführt. Ein  $\alpha$ -Niveau von  $p < 0,05$  wurde zur Definition signifikanter Unterschiede angewendet (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant). Allerdings wurden zwischen den unterschiedlichen Analysen das mögliche Auftreten von Fehlern durch multiples Testen nicht berücksichtigt [126]. Zur Einschätzung der beobachteten Effekte wurden zusätzlich die 95 % Konfidenzintervalle von relevanten Mittelwertsdifferenzen angegeben ( $[M] - 1,96 \times \sigma/\sqrt{n}; [M] + 1,96 \times \sigma/\sqrt{n}$ ).

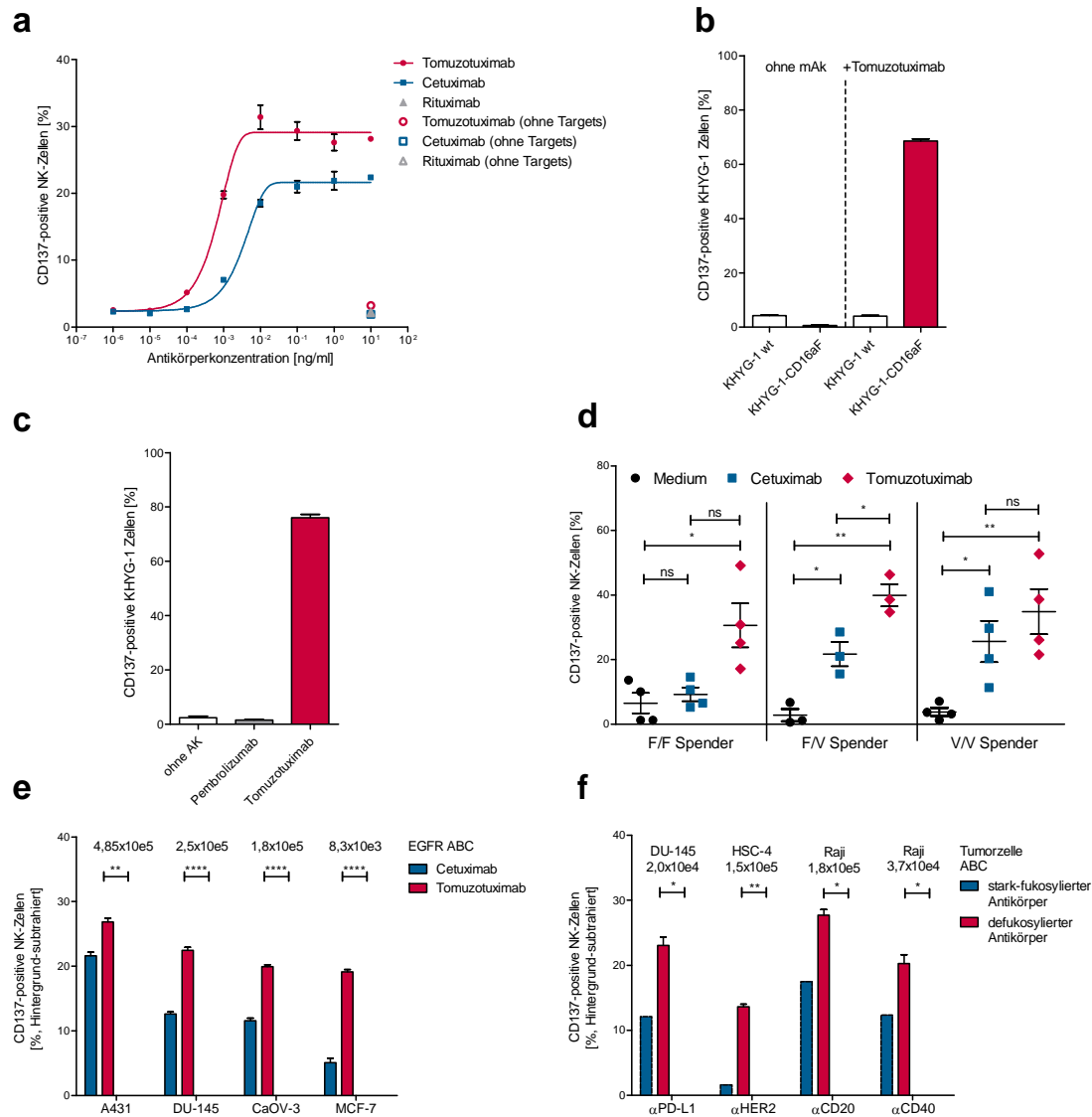
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Tomuzotuximab führt zur verstärkten Immunmodulation

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit sollten Effektorfunktionen des defukosylierten anti-EGFR mAks Tomuzotuximab, die über die reine Blockade des EGFR und den NK-Zell-vermittelten ADCC hinausgehen, charakterisiert werden. Zur Beschreibung der Tomuzotuximab-vermittelten Effekte auf die Aktivierung und Vernetzung von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie der Regulation von Immun-Checkpoint-Molekülen, wurden verschiedene In-vitro-Stimulationsexperimente durchgeführt. Daraus wurden Rationale für die Kombination mit weiteren immunmodulatorischen mAk abgeleitet und getestet, ob die Effektorfunktionen der verschiedenen Antikörper voneinander profitieren können.

#### 5.1.1 Hochregulation des stimulatorischen Immun-Checkpoint-Moleküls CD137 auf NK-Zellen

Die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen spielt bei der Aktivierung von NK-Zellen eine entscheidende Rolle und kann durch Bindung agonistischer mAks zur ADCC-Verstärkung ausgenutzt werden. Frühere Studien zeigten bereits, dass die Interaktion der Fc-Region Tumorspezifischer Antikörper mit dem FcγRIIIa (CD16) zur CD137 Induktion auf NK-Zellen führt [127, 128]. Die in diesen Studien verwendeten Antikörper wurden nicht glyko-optimiert, weshalb die Auswirkungen einer Fc-Defukosylierung klinisch relevanter Antikörper auf die CD137-Expression bisher unbekannt sind. Um den Effekt der Fc-Fukosylierung auf die CD137-Expression zu untersuchen, wurden stark EGFR-exprimierende DU-145 Zellen mit isolierten NK-Zellen kultiviert und mit Konzentrationsreihen von Cetuximab oder Tomuzotuximab inkubiert (Abbildung 7a). Wie zu erwarten, führte Cetuximab zum Anstieg der CD137-Expression auf NK-Zellen. Im Vergleich zu Cetuximab resultierte Tomuzotuximab ab einer Konzentration von 0,1 pg/ml in einer stärkeren CD137-Induktion über den weiteren Konzentrationsverlauf. Im Gegensatz dazu führte keine der Kontrollen (1) Rituximab, dessen Antigen im Ansatz nicht vorkommt, oder 2) Cetuximab/Tomuzotuximab ohne DU-145 Zellen) zur Erhöhung von CD137, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Induktion von CD137 von der Anwesenheit des relevanten Antigens abhängt.



**Abbildung 7: Steigerung der CD137 Expression auf NK Zellen durch Antikörperbehandlung.** (a) Konzentrationsabhängige Induktion von CD137 durch Cetuximab und Tomuzotuximab auf humanen NK-Zellen nach 24 h Ko-Kultivierung mit DU-145 Zellen (1:1). Stimulationen mit Rituximab oder ohne Tumorzellen wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Der Graph entspricht einem repräsentativen Experiment und stellt den [M] des %-Anteils CD137-positiver NK-Zellen  $\pm$ SEM von technischen Triplikaten dar. (b) Wildtyp (wt) oder human CD16-aF-transfizierte KHYG-1 Zellen wurden  $\pm$ 1  $\mu$ g/ml plattengebundenem Tomuzotuximab für 24 h inkubiert. (c) KHYG-1-CD16-aF Zellen wurden für 24 h  $\pm$ 1  $\mu$ g/ml plattengebundenem Pembrolizumab oder Tomuzotuximab inkubiert. In (b, c) ist der [M] des %-Anteils CD137-positiver Zellen  $\pm$ SEM von technischen Duplikaten dargestellt. (d) NK-Zellen von vier Fc $\gamma$ RIIIa-F/F, drei Fc $\gamma$ RIIIa-F/V und vier Fc $\gamma$ RIIIa-V/V Spendern wurden mit DU-145 kultiviert und für 24 h mit 10 ng/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab behandelt. Neben dem [M] von Triplikaten aus Einzelexperimenten, ist der [M] des %-Anteils CD137-positiver NK-Zellen  $\pm$ SEM abgebildet. (e) Anteil an CD137 positiven NK-Zellen (V/V Spender) nach 24 h Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab gegen verschiedene Tumorzelllinien. Technische Triplikate  $\pm$ SEM sind dargestellt. (f) Vergleich der CD137 Induktion auf NK-Zellen (V/V Spender) durch 10  $\mu$ g/ml stark- und defukosylierter mAks gegen verschiedene Antigene ( $\alpha$ PD-L1:  $\alpha$ PDL1<sub>WT</sub> vs.  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub>;  $\alpha$ HER2: Trastuzumab vs. Timigituzumab;  $\alpha$ CD20: Rituximab vs. Obinutuzumab;  $\alpha$ CD40: anti-CD40 hIgG1 vs. anti-CD40 hIgG1-GO). Neben den verwendeten Targetzellen, sind die relevanten ABC aufgeführt. Die Balken zeigen den [M] von technischen Triplikaten  $\pm$ SEM. In den Abbildungen (f-g) wurden die Werte des %-Anteils CD137-positiver NK-Zellen der Mediumkontrolle abgezogen, um die spezifische Induktion darzustellen. Die praktische Durchführung der Experimente (b-c), sowie sechs Experimente aus (d) wurden durch Mitarbeiter der GlycoTope GmbH übernommen. Statistik: (d) One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test oder (e, f) Student's t-Tests wurden verwendet, um statistische Unterschiede zu berechnen.

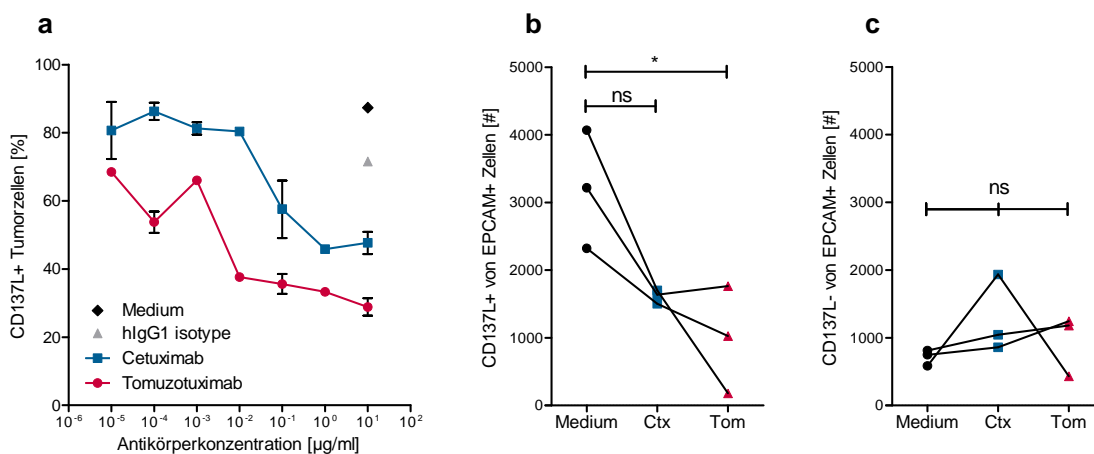


Die Defukosylierung des Fc-Anteils von mAbs führt vor allem zur gesteigerten Affinität zum FcγRIIIa. Deshalb wurde im Folgenden untersucht welchen Einfluss diese Interaktion auf die Tomuzotuximab-vermittelte CD137 Expression hat. In Abbildung 7b wurden zwei Varianten der NK-Zelllinie KHYG-1 mit Tomuzotuximab behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass Tomuzotuximab nur bei der human-FcγRIIIa (CD16-158-F/F) transfizierten Variante zur Steigerung von CD137 führt. Weiterhin konnten keine gesteigerten CD137-Level durch die Verwendung des hIgG4 mAbs Pembrolizumab erreicht werden, da er nur eine schwache Bindung an den FcγRIIIa aufweist (Abbildung 7c). Die Ergebnisse aus Abbildung 7b-c und der Umstand, dass nur die Blockade des FcγRIIIa einen inhibierenden Einfluss zeigt, hebt die Bedeutung dieses Rezeptors für die Induktion von CD137 hervor. Im Menschen tritt der FcγRIIIa mit einem funktionellen Polymorphismus der Aminosäure an Stelle 158 auf, wodurch der Rezeptor in drei Allotypen auftreten kann. Da sich diese Allotypen in ihrer Affinität zum FcγRIIIa unterscheiden und somit die Aktivierung durch den Fc-Anteil von IgG1 mAbs beeinflusst wird, wurden PBMCs verschiedener Spender genotypisiert und anhand der FcγRIIIa-Sequenz dem entsprechenden Allotyp zugeordnet. Wie in Abbildung 7e dargestellt, führte Cetuximab zum Anstieg von CD137 auf NK-Zellen von F/V und V/V Spendern, aber nicht auf NK-Zellen von Spendern mit dem gering-affinen FcγRIIIa-158-F/F. Demgegenüber führte Tomuzotuximab zu einer CD137-Steigerung auf NK-Zellen von Spendern aller drei Allotypen.

Die gesteigerte Induktion von CD137 durch Tomuzotuximab ist nicht auf die Verwendung der EGFR stark-positiven DU-145 beschränkt und lässt sich auf weitere Tumorzellen übertragen (Abbildung 7f; A-431:  $p = 0,003$ ; DU-145/CaOV-3/MCF-7:  $p < 0,0001$ ). Es konnte für beide Antikörper ein positiver Trend zwischen der EGFR-Dichte und der Stärke der CD137 Induktion festgestellt werden, wobei der Unterschied zwischen Cetuximab und Tomuzotuximab mit geringerer EGFR-Expression leicht ansteigt. Der Effekt von hIgG1 mAbs auf die Expression von CD137 auf NK-Zellen wurde bereits für Antikörper gegen verschiedene Tumorantigene (z.B. Cetuximab, Rituximab, Trastuzumab) gezeigt [101]. Um zu testen, ob die gesteigerte CD137 Induktion durch Defukosylierung ebenfalls auf andere Antikörper übertragbar ist, wurden Antikörperpaare gegen PD-L1 ( $p = 0,016$ ), HER2 ( $p = 0,003$ ), CD20 ( $p = 0,02$ ) und CD40 ( $p = 0,04$ ) mit unterschiedlicher Fc-Fukosylierung miteinander verglichen. Wie in Abbildung 7g dargestellt, führten die defukosylierten Antikörper gegen jedes der vier getesteten Antigene zur verstärkten CD137 Expression im Vergleich zur stark-fukosylierten Variante.

Funktionell könnte die gesteigerte Expression von CD137 auf NK-Zellen zu einer erhöhten Zytotoxizität gegen Tumorzellen führen, sobald der Rezeptor über den natürlichen Liganden,

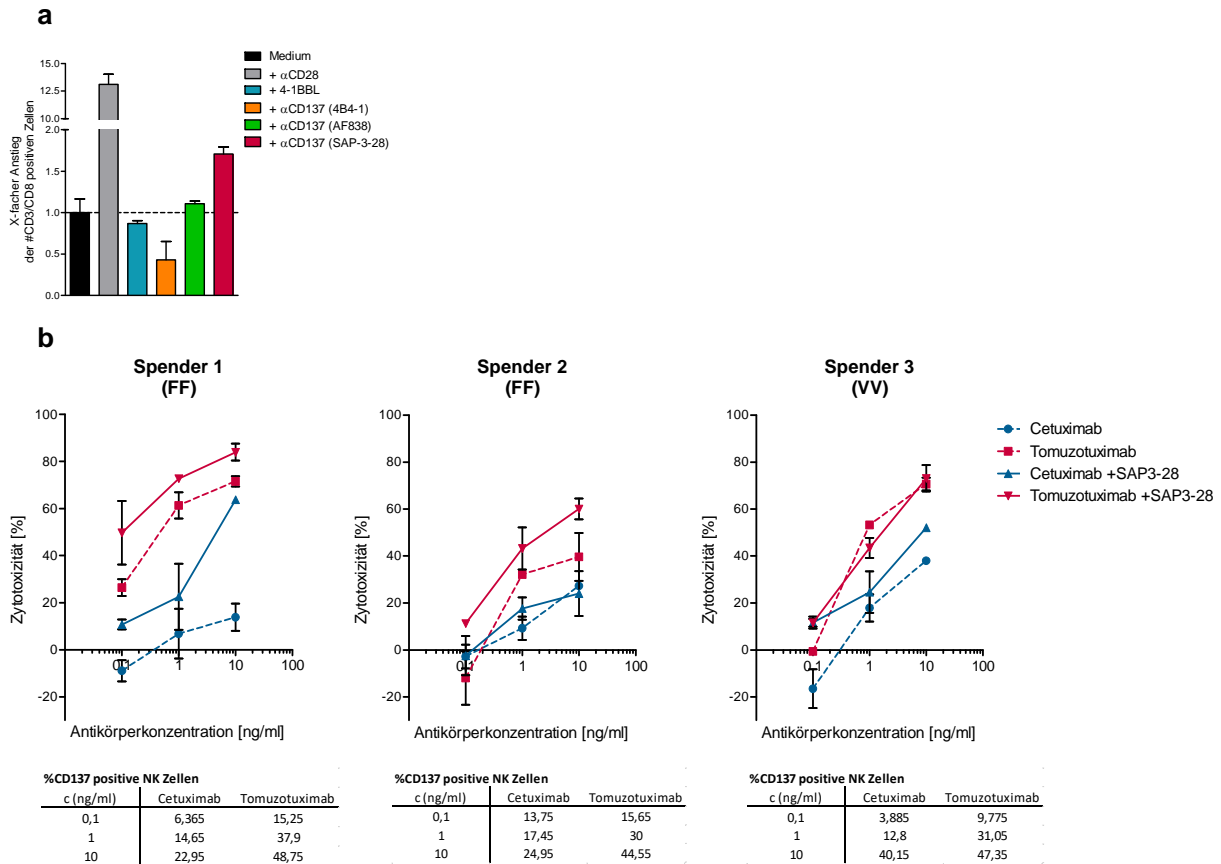
oder einen agonistischen Antikörper aktiviert wird. In einem ersten Ansatz sollte deshalb untersucht werden, wie der CD137-Ligand (CD137L) den ADCC durch Cetuximab und Tomuzotuximab beeinflusst. Hierfür wurden PBMCs mit HSC-4, welche EGFR exprimieren und zu einem großen Anteil CD137L-positiv sind, kultiviert und mit Cetuximab oder Tomuzotuximab behandelt. Wie erwartet reduzierten beide Antikörper die Anzahl lebender Zellen durch ADCC (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde der prozentuale und absolute Anteil CD137L positiver Zellen durch Cetuximab und Tomuzotuximab stark reduziert (Abbildung 8a-b), während der Anteil an CD137L-negativen Zellen nahezu konstant blieb (Abbildung 8c). Obwohl der Trend für beide Antikörper sichtbar ist, führt Tomuzotuximab zu einer tendenziell stärkeren Abnahme CD137L-positiver Tumorzellen (in 2/3 Experimenten; nur Tomuzotuximab erreicht statistische Signifikanz im Vergleich zur Mediumkontrolle). In diesem Ansatz kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Sensitivität CD137L-positiver HSC-4 Zellen auch auf andere Faktoren neben der Stimulation von CD137 zurückzuführen ist, weshalb eine abschließende Bewertung der Effekte ohne Folgeexperimente (z. B. Blockade der CD137:CD137L Interaktion) nicht möglich ist.



**Abbildung 8: Reduktion von CD137-Ligand-positiven Zellen durch Cetuximab und Tomuzotuximab.** Ko-Kulturen aus PBMCs und HSC-4 Zellen wurden für 72 h mit Cetuximab und Tomuzotuximab stimuliert. Anschließend wurden die adhärennten Zellen geerntet und der Anteil vitaler HSC-4 Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (a) Konzentrationsabhängige Reduktion des %-Anteils CD137L-positiver Tumorzellen durch anti-EGFR mAk-Behandlung. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes als [M] ±SEM von technischen Duplikaten. (b-c) Zusammenfassung der absoluten Zellzahlen (b) CD137L-positiver und (c) CD137L-negativer HSC-4 Zellen nach Behandlung mit 10 ng/ml anti-EGFR. Jeder Datenpunkt entspricht dem [M] aus drei individuellen Experimenten mit unterschiedlichen PBMC-Spendern, wobei Stimulationen eines Spenders über Linien verbunden sind. Statistik: One-Way ANOVA Analysen mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test vergleichen die Antikörperbehandlung zur Mediumkontrolle.

Therapeutisch kann CD137 über den rekombinanten CD137L oder agonistische anti-CD137-Antikörper stimuliert werden. Zur Auswahl eines geeigneten Reagenz für Kombinations-

experimente, wurden der rekombinante CD137L und drei verschiedene anti-CD137 Antikörper auf agonistische Aktivität getestet. Wie in Abbildung 9a gezeigt, führten die getesteten Stimulanzen zu unterschiedlich starker Proliferation von CD8+ T-Zellen.



**Abbildung 9: ADCCs in Kombination mit einem agonistischen  $\alpha$ CD137 Antikörper.** (a) Test der agonistischen Aktivität verschiedener CD137-Stimulanzen.  $1 \times 10^5$  PBMCs aus HD-Kulturen wurden für sechs Tage mit  $0,02 \mu\text{g/ml}$  plattengebundenem anti-CD3 sowie  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD28, 4-1BBL, oder anti-CD137 (Klon: 4B4-1, AF838, SAP-3-28) stimuliert. Das Balkendiagramm zeigt die [M] der x-fachen Steigerung der Anzahl an CD3+CD8+ T-Zellen von technischen Triplikaten  $\pm$ SEM. (b) Ko-Kulturen aus HSC-4 Zellen und PBMCs von drei Spendern wurden mit 0,1/1/10 ng/ml anti-EGFR  $\pm$   $10 \mu\text{g/ml}$  anti-CD137 SAP-3-28 behandelt. Nach 24 h wurde die Anzahl vitaler HSC-4 gemessen und anhand der Mediumkontrolle die Zytotoxizität berechnet. Jeder Datenpunkt entspricht dem [M] von technischen Duplikaten  $\pm$ SEM. In Tabellen unterhalb der Diagramme sind die Frequenzen ([M] von Duplikaten) %-CD137+ NK-Zellen nach Stimulation mit den anti-EGFR Antikörpern aufgeführt.

Da in diesem Vorversuch nur der anti-CD137 SAP-3-28 (University of Southampton; [129]) zu einer deutlich gesteigerten Proliferation von CD8 T-Zellen führte, wurde dieser für Kombinationsexperimente verwendet. Hierfür wurden gereinigte NK-Zellen mit den anti-EGFR mAks allein oder in Kombination mit SAP-3-28 stimuliert. Abbildung 9b zeigt die ADCC gegen HSC-4 Zellen, sowie die CD137 Expression der NK-Zellen von Experimenten mit drei verschiedenen Spendern. Trotz erfolgreicher CD137 Induktion durch die anti-EGFR mAks bei allen Spendern zeigte sich kein einheitliches Bild bei der Steigerung der ADCC durch die

Kombination mit SAP-3-28. Die Tomuzotuximab-vermittelte HSC-4-Lyse konnte für Spender 1 und 2 (beide FcγRIIIa-158-F/F), aber nicht für Spender 3 (FcγRIIIa-158-V/V) gesteigert werden. Die Kombination von SAP-3-28 mit Cetuximab zeigte hingegen eine ADCC-Steigerung für Spender 1 und 3, aber nicht für Spender 2. Hervorzuheben ist, dass Cetuximab bei dem F/F Spender 1 eine ungewöhnlich hohe CD137 Expression induzierte. Tomuzotuximab führte allerdings mit allen Spendern – allein und in Kombination mit SAP-3-28 – zur stärkeren Zytotoxizität im Vergleich zu Cetuximab.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die CD137 Induktion auf NK-Zellen durch die Fc-Defukosylierung verstärkt werden kann. Durch die Defukosylierung wird der Einfluss des FcγRIIIa Polymorphismus reduziert und eine effektive CD137 Steigerung auch gegen Tumorzellen mit geringer Antigenexpression erreicht. Die ADCC von HSC-4 Zellen führte zu einer selektiven Lyse von CD137L-positiven Targetzellen. Dies deutete darauf hin, dass eine Kombination mit einem agonistischen anti-CD137 Antikörper oder dem rekombinanten CD137L von Vorteil sein könnte. Die Kombination von Cetuximab und Tomuzotuximab mit einem agonistischen anti-CD137 Antikörper führte zur leichten Steigerung der ADCCs. Zur Bestätigung dieser Beobachtungen müssten allerdings größere Spenderkohorten untersucht und/oder weitere anti-CD137 Antikörper getestet werden. Da derzeit kein klinisch relevanter anti-CD137 mAk zugänglich ist, wurde im Rahmen der Doktorarbeit darauf verzichtet.

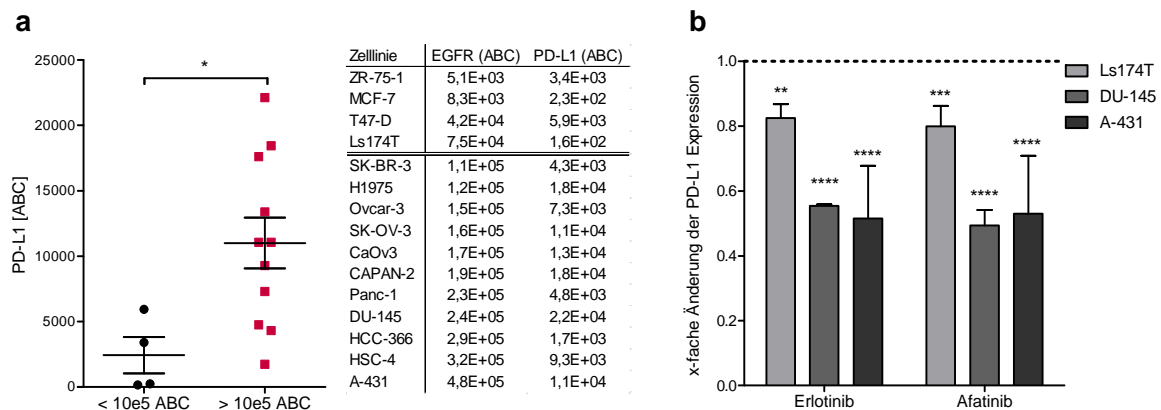
### 5.1.2 Einfluss von Tomuzotuximab auf die Tumor-Mikroumgebung

Eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems könnte durch die Rekrutierung von Immunzellen und die Regulation von Immun-Checkpoint-Molekülen die Tumor-Mikroumgebung (engl. *Tumor microenvironment*, TME) beeinflussen. Im folgenden Kapitel wurde der Einfluss der Glyko-Optimierung auf die Expression von inhibierenden Checkpoint-Liganden auf Tumorzellen, sowie die Infiltration von Immunzellen in 3D-Tumorsphäroide, untersucht.

#### 5.1.2.1 Regulation von inhibierenden Checkpoint-Liganden

Inhibierende Checkpoint-Liganden, wie zum Beispiel PD-L1, werden unter anderem dazu benötigt, um Entzündungsreaktionen im Anschluss einer erfolgten Immunantwort zu beenden. Dieser Regulationsmechanismus kann durch Krebszellen allerdings auch ausgenutzt werden, um das Immunsystem zu hemmen. Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen EGFR- und PD-L1-Expression gibt, wurde deren Antigendichte auf verschiedenen Tumorzellen untersucht (Abbildung 10a). Durch die Bestimmung der Antikörper-Bindungskapazität des anti-

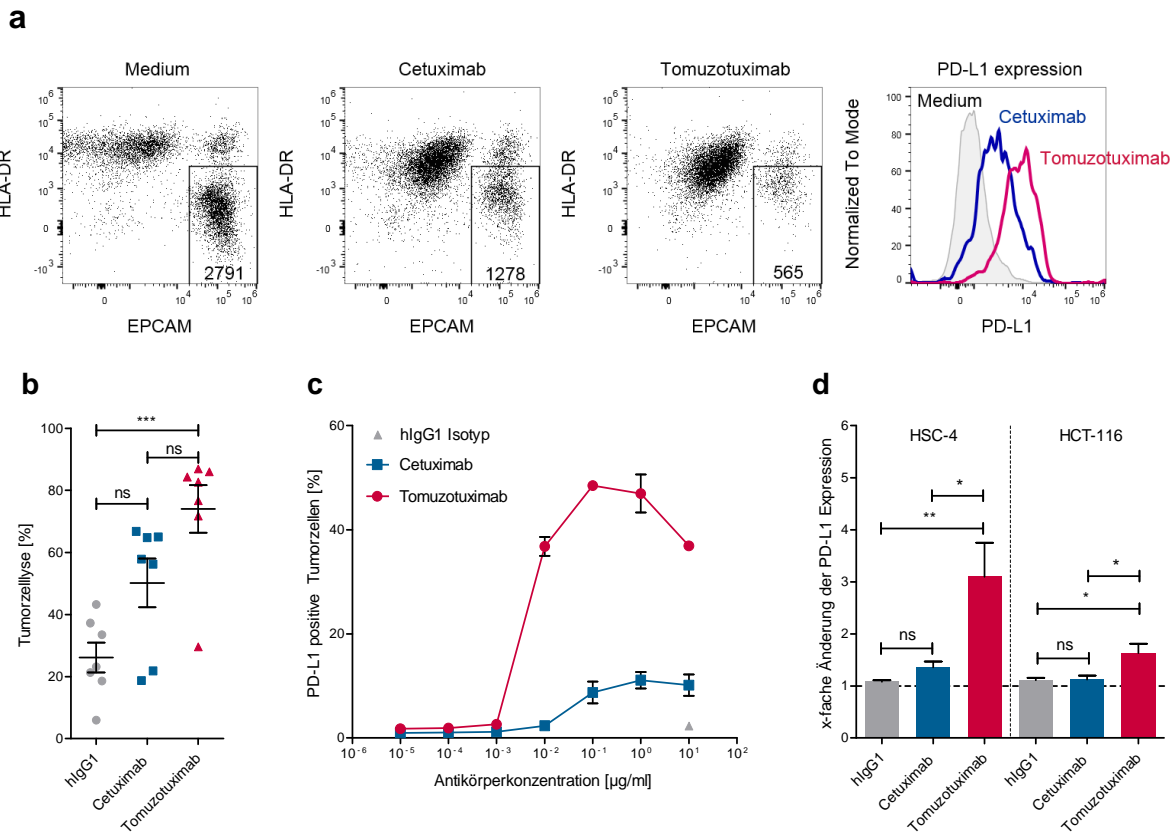
PD-L1 mAs Atezolizumab wird ersichtlich, dass Zellen mit einer erhöhten EGFR Expression ( $> 1 \times 10^5$  Tomuzotuximab-Bindungsstellen/Zelle) ebenfalls stärker PD-L1 positiv sind ( $[M_{>10^5}] - [M_{<10^5}] = +8,0 \times 10^3$  Atezolizumab-ABC,  $p = 0,025$ ). Einige Studien konnten bereits zeigen, dass eine erhöhte EGFR-Aktivierung zur erhöhten PD-L1 Expression führt, welche durch die reine Blockade reduziert werden kann [89, 130-132]. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden EGFR-positive Zellen mit den EGFR TKIs Erlotinib und Afatinib behandelt. Wie in Abbildung 10b gezeigt, führten beide EGFR-TKIs zur signifikanten Reduktion der PD-L1 Expression auf Ls174T, DU-145 und A-431 Zellen, mit einem ausgeprägterem Effekt für die stärker EGFR-positiven DU-145 und A-431 Zellen. Durch diese Beobachtungen konnte bestätigt werden, dass die Expression von PD-L1 mit der EGFR-Aktivierung assoziiert ist.



**Abbildung 10: Korrelation der EGFR- und PD-L1 Expression.** (a) Die ABCs für Tomuzotuximab und den anti-PD-L1 Antikörper Atezolizumab wurden auf verschiedenen Tumorzelllinien bestimmt. Die quantitative ABC-Bestimmung erfolgte mittels Quantum™ Simply Cellular®-Kit. Die Zelllinien sind nach ihrer Tomuzotuximab-ABC gruppiert ( $< 10e5$  und  $> 10e5$ ) und die y-Achse stellt die Atezolizumab-ABC dar. Zusätzlich ist der  $[M] \pm SEM$  gezeigt. In der nebenstehenden Tabelle sind die exakten ABC-Bestimmungen jeder Zelllinie abgebildet ( $E+0x = 10^x$ ). Die praktische Durchführung der zugrunde liegenden Experimente erfolgte durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH. (b) Tumorzellen wurden in FKS-haltigem Medium ohne zusätzliche Zugabe von EGF kultiviert, um anschließend die PD-L1 Expression nach Behandlung mit  $1 \mu M$  Erlotinib oder  $0,1 \mu M$  Afatinib zu analysieren. Dargestellt ist der  $[M]$  der x-fachen Änderung der PD-L1 Dichte (MFI) im Vergleich zur Mediumkontrolle auf A-431 ( $n = 4$ ), DU-145 ( $n = 2$ ) und Ls174T ( $n = 3$ ). Statistik: (a) ein ungepaarter Student's t-Test vergleicht die Atezolizumab-ABCs der gruppierten Zelllinien; (b) One-Way ANOVA mit angeschlossenem Bonferroni post-hoc Test vergleicht die Änderung der PD-L1 Expression zur Mediumkontrolle.

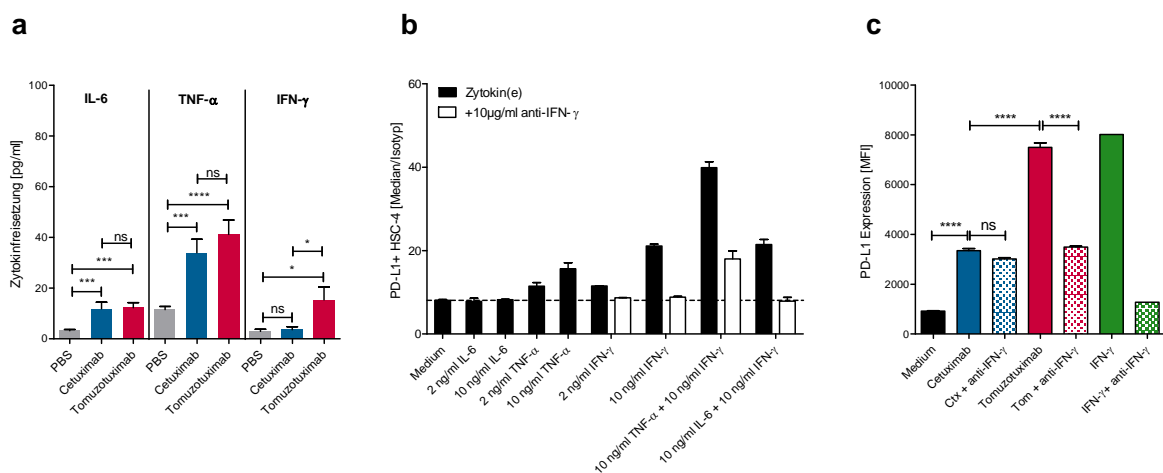
Concha-Benavente und Kollegen zeigten bereits, dass die Aktivierung von NK-Zellen durch Cetuximab zur Freisetzung von  $IFN-\gamma$  führt, wodurch PD-L1 auf Tumorzellen hochreguliert wird [19]. Um die Auswirkungen einer verstärkten Immunreaktion durch Tomuzotuximab auf die PD-L1 Expression von Tumorzellen zu untersuchen wurden PBMCs mit Tumorzellen kultiviert und mit einer Isotypkontrolle, Cetuximab oder Tomuzotuximab stimuliert. Wie zu erwarten, führte Tomuzotuximab zu einer stärkeren ADCC gegen HSC-4 Zellen als Cetuximab (Abbildung 11a-b,  $[M_{Tom}] - [M_{Cix}] = +23,9 \%$ , 95 % CI [9,9 – 37,9 %]). Abbildung 11c zeigt die PD-L1

Expression auf vitalen HSC-4 Zellen nach Behandlung mit anti-EGFR mAKs. Die Stimulation einer Immunantwort durch beide Antikörper führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Anteils PD-L1-positiver Tumorzellen (Abbildung 11c). Dieser Effekt ist deutlich ausgeprägter durch Tomuzotuximab ( $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Ctx}}] = +1,7\text{-fach}$ , 95 % CI [0,5 – 3,0-fach]) und ließ sich auch mit einer weiteren Tumorzelllinie (HCT116, CRC;  $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Ctx}}] = +0,5\text{-fach}$ , 95 % CI [0,2 – 0,8-fach]) reproduzieren (Abbildung 11d).



**Abbildung 11: Erhöhte PD-L1 Expression auf Tumorzellen nach Tomuzotuximab-ADCC.** Der Einfluss der anti-EGFR mAKs auf die Lyse und die Regulation von PD-L1 auf HSC-4 Zellen nach dreitägigen Ko-Kultivierungen mit PBMCs (E: T, 5:1) und den angegebenen Antikörpern wurde durchflusszytometrisch untersucht. (a) Repräsentative FACS-Plots sind dargestellt. Nach vorangestellter Auswahl von Einzelzellen und lebenden Zellen (DAPI negativ) wurde die PD-L1 Expression auf großen ( $FSC_{\text{hoch}}/SSC_{\text{hoch}}$ ), HLA-DR-/EPCAM+ Zellen (Ausschluss von Monozyten) als Histogramm dargestellt. Die Zahl in dem ausgewählten Ausschnitt entspricht der absoluten Anzahl an HSC-4 Zellen ( $[M]$  von Duplikaten). (b) Aus den absoluten Anzahlen an HSC-4 wurde in sieben Experimenten mit unterschiedlichen PBMC-Spendern die Lyse von HSC-4 ermittelt ( $n = 7$ ). Zusätzlich zu den  $[M]$  der Einzelexperimente ist der  $[M]$  der %-Tumorzelllyse aller Experimente  $\pm$ SEM dargestellt. (c) %-Anteil PD-L1-positiver HSC-4 Zellen nach Behandlung mit aufsteigenden anti-EGFR mAk Konzentrationen. Der  $[M] \pm$ SEM von technischen Duplikaten ist gezeigt. (d) Zusammenfassung des Anstieges an PD-L1 auf HSC-4 (x-fache Änderung der Expressionsdichte  $[MFI]$  im Vergleich zur Mediumkontrolle;  $n = 9$ ) und HCT-116 Zellen ( $n = 5$ ) nach Stimulation mit 10 ng/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab. Die abgebildeten Daten entsprechen dem  $[M]$  der PD-L1-Änderung  $\pm$ SEM von Experimenten mit verschiedenen Spendern. Statistik: (b, d) One-Way ANOVA mit angeschlossener Bonferroni post-hoc Test wurde durchgeführt.

Neben dem selektiven Abtöten durch ADCC können lösliche Faktoren, wie z. B. proinflammatorische Zytokine, zu einer erhöhten PD-L1 Expression beitragen. Daher sollte getestet werden, ob eine erhöhte Zytokinsekretion ein weiterer Grund für den PD-L1 Anstieg nach Tomuzotuximab-Behandlung sein kann. Aus der Phase I Studie von Tomuzotuximab ist bekannt, dass Patienten nach der ersten Tomuzotuximab-Infusion u. A. erhöhte IL-6 und TNF- $\alpha$  Level zeigen [44]. Zusätzlich sollte die Wirkung von IFN- $\gamma$  getestet werden, da es mit NK-Zell-Aktivierung assoziiert ist und zur Regulation von PD-L1 führt [19]. Die Stärke der Zytokinsekretion nach PBMC-Aktivierung durch Cetuximab oder Tomuzotuximab wurde an 14 gesunden Spendern getestet (Abbildung 12a, Tabelle 13).



**Abbildung 12: Relevanz von Zytokinen auf die Antikörper-vermittelte Steigerung von PD-L1.** (a) Zytokinfreisetzung nach Stimulation von PBMCs mit 10  $\mu$ g/Well Cetuximab oder Tomuzotuximab (n = 14 PBMC-Spender). Nach 4 h Inkubation wurden die Überstände gesammelt, um die Produktion von IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zu bestimmen. Der [M, pg/ml] freigesetzter Zytokine +SEM ist dargestellt. Die Messung der Zytokinfreisetzung erfolgte durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH. (b) HSC-4 Zellen wurden mit 2 oder 10 ng/ml IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  allein, oder in Kombinationen  $\pm$  1  $\mu$ g/ml neutralisierendem anti-IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach drei Tagen wurde die PD-L1 Expression auf EpCAM+ HSC-4 gemessen. Der [M] der PD-L1 MFI von technischen Duplikaten +SEM ist dargestellt. (c) Überstand von Ko-Kulturen von PBMCs und HSC-4 (5:1, drei Tage)  $\pm$  10  $\mu$ g/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab wurde zu frisch-ausgesäten HSC-4 Zellen ( $\pm$  1  $\mu$ g/ml anti-IFN- $\gamma$ ; Kontrolle 1,1 ng/ml IFN- $\gamma$ ) gegeben. Nach weiteren drei Tagen wurde die PD-L1 Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Der [M] der PD-L1-Expression (MFI) +SEM von technischen Duplikaten eines repräsentativen Experimentes von vier individuellen Experimenten ist abgebildet. Statistik: (a, c) One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test wurde durchgeführt.

**Tabelle 13: Statistische Auswertung der Zytokinsekretion durch PBMCs nach Stimulation mit immobilisiertem Cetuximab oder Tomuzotuximab.**

Zytokin	Vergleich	n	[M <sub>1</sub> ]	[M <sub>2</sub> ]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI
IFN- $\gamma$	IgG1 vs. Ctx.	14	2,93	3,55	+0,62	[-1,4 - 2,7]
	IgG1 vs. Tom.	14	2,93	15,38	+12,45	[3,6 - 21,3]
	Ctx. vs. Tom.	14	3,55	15,38	+11,84	[2,3 - 21,4]
TNF- $\alpha$	IgG1 vs. Ctx.	14	11,52	33,94	+22,42	[13,3 - 31,5]
	IgG1 vs. Tom.	14	11,52	41,19	+29,67	[19,6 - 39,7]
	Ctx. vs. Tom.	14	33,94	41,19	+7,25	[-2,1 - 16,6]
IL-6	IgG1 vs. Ctx.	14	3,18	11,82	+8,64	[3,9 - 13,4]
	IgG1 vs. Tom.	14	3,18	12,27	+9,09	[5,9 - 12,3]
	Ctx. vs. Tom.	14	11,82	12,27	+0,45	[-2,2 - 3,1]

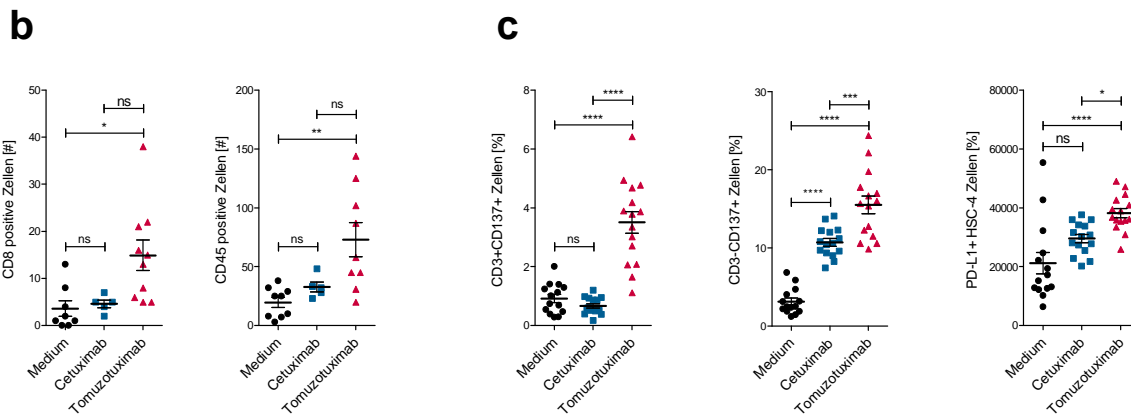
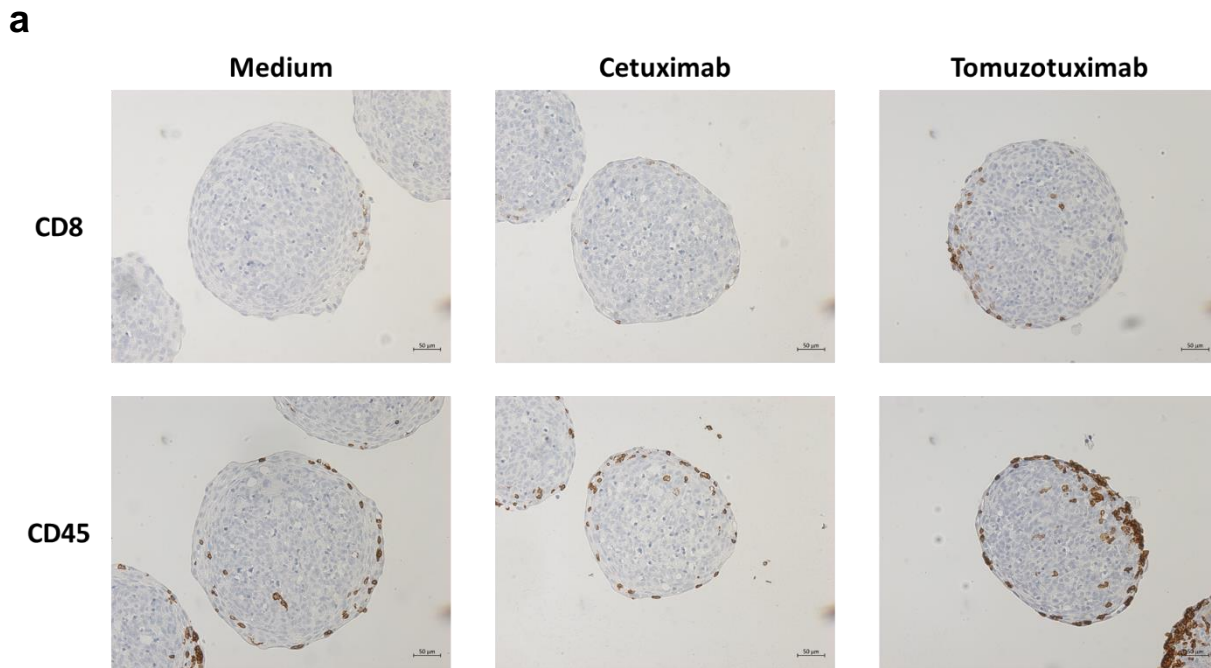
Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als Zunahme der Zytokine [pg/ml] aufgeführt.

Beide Antikörper führten zum Anstieg von IL-6 und TNF- $\alpha$ . Im Gegensatz dazu führte nur Tomuzotuximab zu einem deutlichen Anstieg von IFN- $\gamma$ . Daraufhin wurden HSC-4 Zellen mit IL-6, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  behandelt, um den Einfluss der Zytokine auf die PD-L1 Expression zu analysieren. IL-6 allein zeigte keinen Einfluss auf PD-L1, wogegen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zu einer Steigerung von PD-L1 führten (Abbildung 12b). Durch Zugabe eines IFN- $\gamma$ -neutralisierenden Antikörpers konnte die durch IFN- $\gamma$  hervorgerufene PD-L1 Induktion blockiert werden. Zur Untersuchung der Effekte durch das Zytokin-Gemisch, welches durch Immunzellen nach der Aktivierung durch mAks produziert wird, wurden PBMCs im Beisein von HSC-4 Zellen mit 10  $\mu$ g/ml Tomuzotuximab und Cetuximab stimuliert. Anschließend wurde der Überstand dieser Zellkulturen auf frische HSC-4 Zellen übertragen und diese für weitere drei Tage inkubiert. Zur Untersuchung der IFN- $\gamma$ -Abhängigkeit wurden jeweils Ansätze mit oder ohne IFN- $\gamma$ -blockierenden Antikörper getestet. Verglichen mit Überstand von Cetuximab-stimulierten PBMCs, zeigt Abbildung 12c, dass der Überstand von Ko-Kulturen mit Tomuzotuximab zur stärkeren Induktion von PD-L1 führt. Außerdem ließ sich der PD-L1 Anstieg durch Tomuzotuximab (und der IFN- $\gamma$  Positivkontrolle), aber nicht Cetuximab, durch den IFN- $\gamma$ -blockierenden Antikörper reduzieren. Dies deutet darauf hin, dass die verstärkte PD-L1 Induktion durch Tomuzotuximab über IFN- $\gamma$  vermittelt wird. Der leichte Anstieg von PD-L1 durch den Cetuximab-Überstand, welcher vergleichbar mit dem PD-L1 Level des Tomuzotuximab-Überstandes nach Zugabe des IFN- $\gamma$ -Antikörpers ist, lässt die Beteiligung weiterer Zytokine vermuten, welche durch beide Antikörper vergleichbar hochreguliert werden (z. B. TNF- $\alpha$ ).



### 5.1.2.2 Chemotaxis in 3D Tumorsphäroide

Für eine effektive Antitumor-Reaktion durch Immuntherapien mit mAbs ist das Vorhandensein von Effektorimmunzellen essenziell. Um zu testen, welchen Einfluss Cetuximab und Tomuzotuximab auf die Migration von Immunzellen in Tumor-ähnliche Strukturen zeigt, wurden Experimente mit HSC-4-Sphäroiden durchgeführt. Durch Kultivierung von HSC-4 Zellen in *Corning® spheroid microplates* für drei Tage bilden sich kompakte Sphäroide, zu denen im Anschluss PBMCs zugegeben wurden. Nach zweitägiger Stimulation mit 10 µg/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab wurden die Sphäroide immunhistochemisch oder mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 13a zeigt repräsentative Aufnahmen zur Bestimmung der Infiltration von Immunzellen nach IHC-Färbung für CD8 und CD45 von Schnitten, welche ungefähr den Sphäroidmittelpunkt darstellen. Nach Behandlung durch Tomuzotuximab zeigte sich eine deutliche Steigerung der Anzahl an CD8 ( $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Med}}] = +10,3$  Zellen) und CD45 positiven Zellen ( $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Med}}] = +53,3$  Zellen) innerhalb der Sphäroid-Schnitte, was für eine erhöhte Immunzellinfiltration spricht (Abbildung 13b). Im Gegensatz dazu, zeigte Cetuximab nur minimale Effekte (CD8+: +1 Zelle; CD45+: +13,1 Zellen).



**Abbildung 13: Infiltration von Immunzellen in HSC-4 Sphäroide.** HSC-4 Zellen wurden in *Corning® spheroid microplates* ausgesät und formten nach drei Tagen einheitlich große Sphäroide (~300-400 µm). Anschließend wurden PBMCs ±10 µg/ml Antikörper zugegeben. (a) Repräsentative IHC Färbungen für CD8 und CD45 von Schnitten unterschiedlich-behandelter Sphäroide sind abgebildet (20-fache Vergrößerung). (b) Die Auszählung CD8- (n = Med.: 8; Ctx.: 5; Tom.: 10 Sphäroide) und CD45- (n = Med.: 9; Ctx.: 5; Tom.: 9 Sphäroide) positiver Zellen in individuellen Sphäroiden eines repräsentativen Experimentes von zwei Versuchen mit unterschiedlichen PBMC-Spendern ist dargestellt. (c) Zusätzlich zur IHC-Färbung wurden einige Sphäroide mittels Trypsin-Behandlung dissoziiert, um die Aktivierung der infiltrierenden Immunzellen zu bestimmen. Der [M] des %-Anteils CD137-positiver CD3+ (T-Zellen) und CD3- (Surrogat für NK-Zellen) Immunzellen und des MFIs von PD-L1 auf EpCAM+ HSC-4 aus individuellen Sphäroiden (n = Med.: 14; Ctx. und Tom.: 16 Sphäroide) ±SEM ist abgebildet. Statistik: (b, c) One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test wurde durchgeführt.

Da diese immunhistochemische Auswertung nur die Analyse einer Ebene der Sphäroide erlaubt, ist davon auszugehen, dass die Absolutwerte für das gesamte Sphäroid weitaus höher sind. Durch die Dissoziation einzelner Sphäroide konnte der Aktivierungsgrad der infiltrierten Immunzellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Hierbei zeigten CD3+ ( $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Ctx}}] = +2,8 \%$ ) und CD3- Immunzellen ( $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Ctx}}] = +4,8 \%$ ) aus Sphäroid-Ansätzen nach

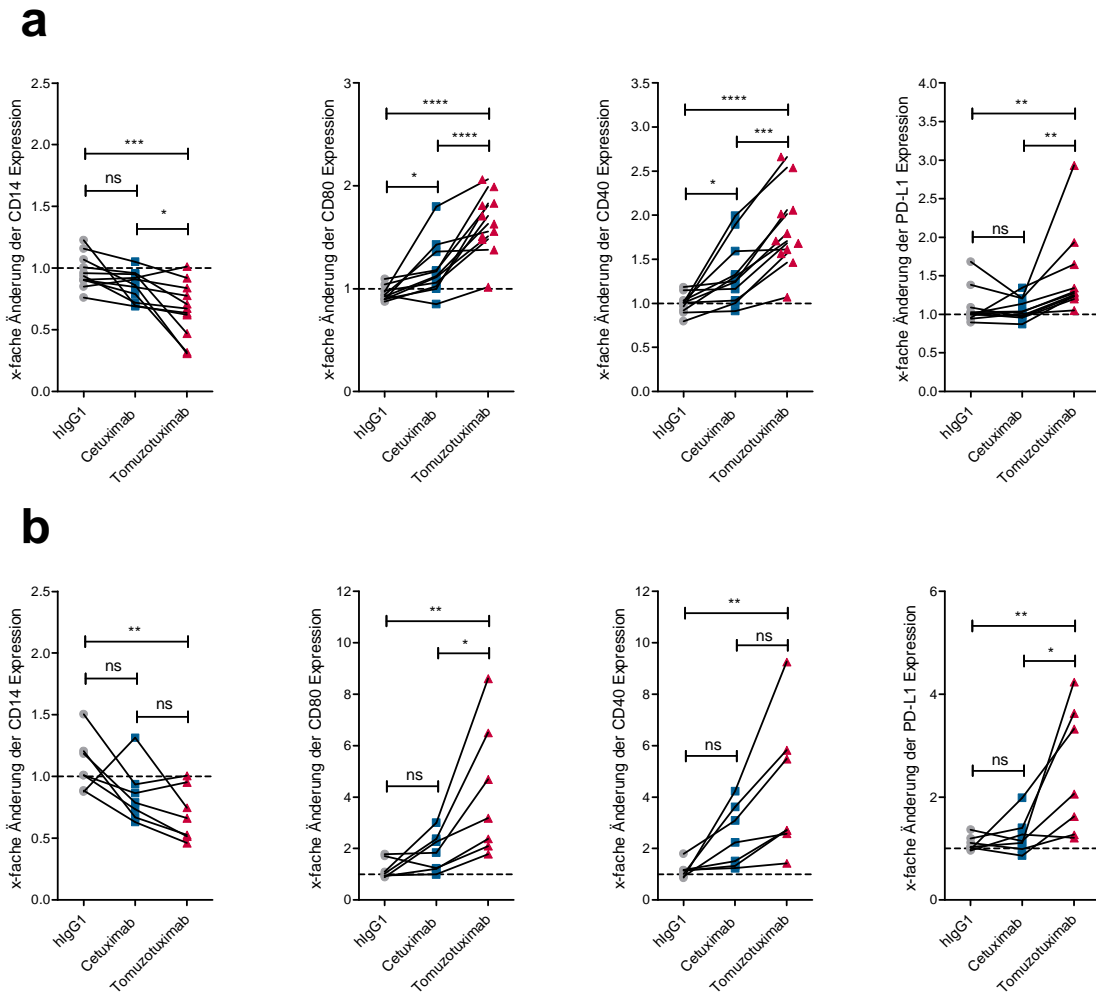
Stimulation mit Tomuzotuximab eine signifikant stärkere Expression des Aktivierungsmarkers CD137 im Vergleich zu Cetuximab und der Mediumkontrolle (Abbildung 13c). Zusätzlich konnte in den Sphäroid-Kulturen eine signifikant erhöhte PD-L1 Expression auf HSC-4-Zellen nach Immunzellaktivierung mit Tomuzotuximab detektiert werden ( $[M_{\text{Tom}}] - [M_{\text{Ctx}}] = +8657$  der MFI; ca. 29 % höhere Expression).

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Immunzellaktivierung durch Tomuzotuximab nicht nur auf 2D-Kulturen beschränkt ist. Die stärkere Immunzellinfiltration in kompakte 3D-Tumorzell-Strukturen, sowie deren Aktivierung und die Regulation von Checkpoint-Molekülen, könnten für eine erfolgreiche Kombi-Immuntherapie bedeutsam sein.

### 5.1.3 Reifung von Monozyten durch Tomuzotuximab

Monozyten und sich aus ihnen entwickelnde Zellen (z. B. Makrophagen, MDSC, DCs), könnten durch ihre Rolle bei der Vernetzung von angeborenen und adaptiven Immunzellen einen großen Einfluss auf die Effektorfunktionen von Fc-optimierten Antikörpern haben. Des Weiteren können sie durch die Expression von Checkpoint-Molekülen für die Auswahl von Kombinationstherapien bedeutsam sein. Um die Auswirkungen von Tomuzotuximab auf Monozyten zu untersuchen wurden PBMCs mit Tumorzellen kultiviert und mit Cetuximab oder Tomuzotuximab stimuliert. Nach dreitägiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Expressionsdichte der Aktivierungs- und Reifungsmarker CD14 und CD80, sowie der Checkpoint-Moleküle CD40 und PD-L1 auf CD14+HLA-DR+ Monozyten durchflusszytometrisch analysiert. In Experimenten mit der HNC Zelllinie HSC-4 und die CRC Zelllinie HCT-116 konnte eine Antikörperkonzentrationsabhängige Regulation aller Marker beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Während der Reifung von Monozyten zu Monozyten-abgeleiteten DCs (mo-DCs) wird das Oberflächenmolekül CD14 herunterreguliert. In den durchgeführten Experimenten führte Tomuzotuximab, aber nicht Cetuximab, zu einer reduzierten CD14 Expression (Abbildung 14a-b). Gleichermäßen führte Tomuzotuximab zu einer deutlich gesteigerten Expression der ko-stimulierenden Oberflächenproteine CD80 und CD86 im Vergleich zu Cetuximab. Als möglicher Ausgangspunkt für Kombinationstherapien wurden zusätzlich die Expressionen der Checkpoint-Moleküle CD40 und PD-L1 analysiert. Die Expression des ko-stimulierenden Immun-Checkpoints CD40 konnte durch beide Antikörper gesteigert werden, erreichte durch Tomuzotuximab allerdings ebenfalls höhere Werte. Vergleichbar zu den Ergebnissen zum Einfluss der Antikörper auf Tumorzellen, wurde PD-L1 auch auf Monozyten nur durch Tomuzotuximab signifikant erhöht, wohingegen durch

Cetuximab kaum Veränderungen sichtbar wurden. Die statistische Auswertung zur Regulation der oben beschriebenen Oberflächenmoleküle durch Tomuzotuximab im Vergleich zu Cetuximab ist in Tabelle 14 zusammengefasst.



**Abbildung 14: Differenzierung und Aktivierung von Monozyten durch Tomuzotuximab.** Der Effekt von Cetuximab und Tomuzotuximab auf die Aktivierung/Differenzierung und Regulation von Checkpoint-Molekülen auf CD14+HLA-DR+ Monozyten wurde in Ko-Kultivierungen von PBMCs unterschiedlicher Spender mit (a) HSC-4 (n = 11; FF/FV/VV: 4/5/2) und (b) HCT-116 Zellen (n = 7; 3/3/1) getestet. Neben dem [M] der Änderung des MFI im Vergleich zur Medium-Kontrolle aus technischen Duplikaten individueller Experimente, nach Stimulation mit 10 ng/ml anti-EGFR für drei Tage, sind Behandlungen eines Experimentes durch Linien verbunden. Statistik: (b, c) One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Tests wurden durchgeführt.

**Tabelle 14: Statistische Auswertung der gesteigerten Oberflächenmarker-Expression nach Tomuzotuximab.**

Zelllinie	Marker	n	[M <sub>Ctx</sub> ]	[M <sub>Tom</sub> ]	[M <sub>Tom</sub> ]-[M <sub>Ctx</sub> ]	95 % CI
<i>HSC-4</i>	CD14	11	0,85	0,66	-0,19	[-0,32 - - 0,06]
	CD40	11	1,34	1,83	+0,50	[0,36 - 0,64]
	CD80	11	1,19	1,63	+0,44	[0,28 - 0,61]
	CD86	11	0,97	1,23	+0,26	[0,05 - 0,47]
	PD-L1	11	1,07	1,49	+0,42	[0,15 - 0,70]
<i>HCT-116</i>	CD14	7	0,85	0,70	-0,15	[-0,31 - 0,01]
	CD40	7	2,46	4,28	+1,83	[0,61 - 3,04]
	CD80	7	1,84	4,18	+2,33	[0,91 - 3,76]
	CD86	7	1,23	1,45	+0,22	[-0,23 - 0,67]
	PD-L1	7	1,25	2,48	+1,23	[0,40 - 2,06]

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als x-facher Anstieg (+) oder x-fache Reduktion (-) im Vergleich zur Medium-Kontrolle angegeben.

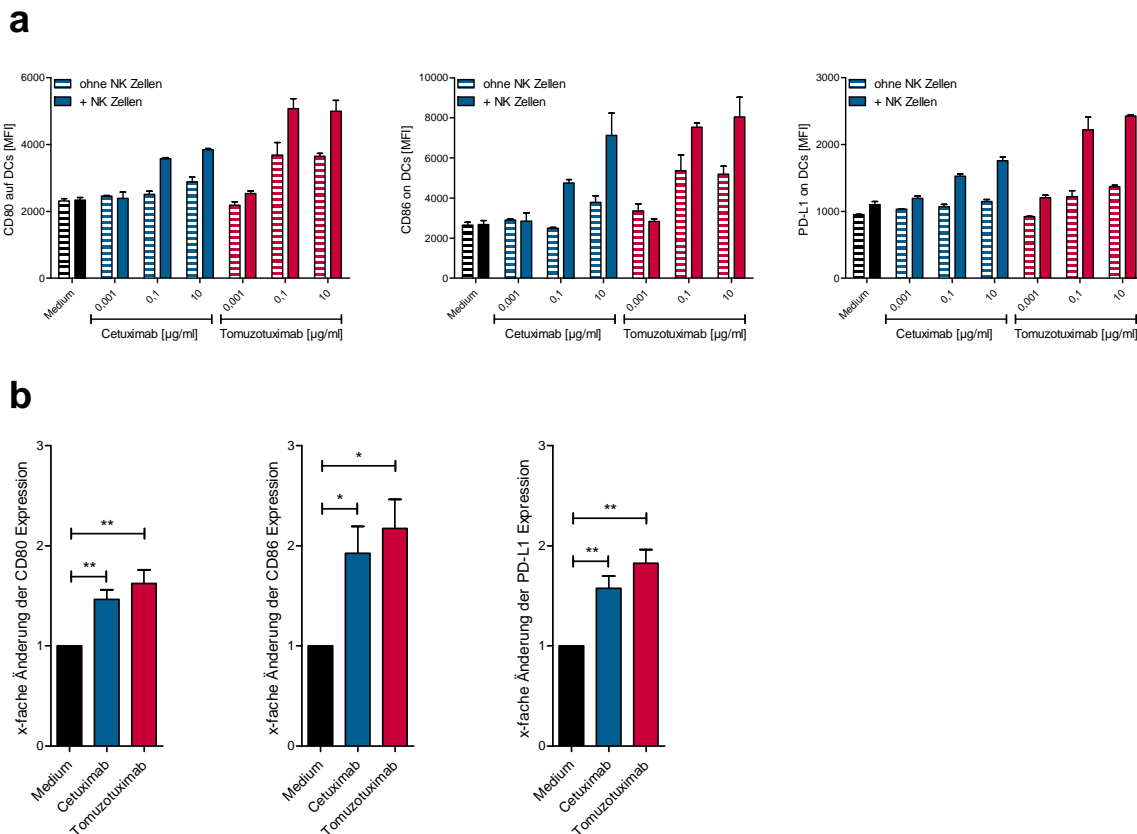
Diese Ergebnisse (Expression von CD80, CD40, PD-L1) konnten mit je einer weiteren HNC (SAT) und CRC (Ls174T) Zelllinie bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und untermauern damit die gesteigerte Reifung und Aktivierung sowie die gesteigerte Hochregulation von CD40 und PD-L1 auf Monozyten durch Tomuzotuximab. Im Gegensatz zur Stimulation mit hIgG1 Antikörpern, zeigte der TKI Erlotinib keinen Einfluss auf die Expression von CD14, CD40, CD80 oder PD-L1 (Daten nicht gezeigt). Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die beobachteten Effekte über den Fc-Anteil der Antikörper vermittelt werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Tomuzotuximab zu einer verstärkten Reifung und zur Expression von ko-stimulierenden Oberflächenmolekülen auf Monozyten führt. Die stärkere Hochregulation von CD40 und PD-L1 auf Monozyten können Ausgangspunkte für Kombinationsstrategien darstellen.

#### *5.1.4 Verbesserte Aktivierung und Reifung des angeborenen Immunsystems führt zur verstärkten T-Zell-Stimulation*

Unter 5.1.3 wurde gezeigt, dass die Stimulation von Monozyten mit Tomuzotuximab eine Reifung in Richtung mo-DCs bewirkt (Runterregulation von CD14; Hochregulation von ko-stimulierenden Molekülen). Um die Bedeutung der NK-Zell-Aktivierung bei der Regulation von Oberflächenmolekülen auf DCs zu untersuchen, wurden mo-DCs im Beisein von HSC-4 Zellen und anti-EGFR mAk mit oder ohne NK-Zellen behandelt. In Abbildung 15a sind die Expressionen von CD80, CD86 und PD-L1 auf DCs nach zweitägiger Kultivierung eines repräsentativen Experimentes dargestellt. Tomuzotuximab führte zu einer gesteigerten Hochregulation der drei Marker im Vergleich zu Cetuximab. Die beobachteten Effekte hängen

von der Aktivierung von NK-Zellen ab, da CD80, CD86 und PD-L1 in Ansätze ohne NK-Zellen wesentlich schwächer anstiegen. Der Vergleich der Antikörper mit Immunzellen von fünf verschiedenen Spendern zeigte eine signifikant gesteigerte Expression von CD80, CD86 und PD-L1 durch beide Antikörper mit einer Tendenz zur stärkeren Hochregulation durch Tomuzotuximab (Abbildung 15b, Tabelle 15).



**Abbildung 15: Tomuzotuximab-aktivierte NK-Zellen verbessern die Reifung von mo-DCs.** (a) Unreife mo-DCs (IL-4 + GM-CSF, sieben Tage) wurden mit oder ohne autologen NK-Zellen und HSC-4 (1:1:1) kultiviert und mit 0,001/0,1/10  $\mu\text{g/ml}$  Cetuximab oder Tomuzotuximab stimuliert. Nach zwei Tagen wurden die adhärennten Zellen geerntet und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Expression (MFI) von CD80 (links), CD86 (Mitte) und PD-L1 (rechts) auf CD11c+HLA-DR+ DCs eines repräsentativen von drei individuellen Experimenten. Die [M] der MFI +SEM von technischen Duplikaten sind dargestellt. (b) Zusammenfassung der Expressions-Änderung (MFI) von CD80 (links), CD86 (Mitte) und PD-L1 (rechts) auf CD11c+HLA-DR+ DCs im Vergleich zur Mediumkontrolle aus Experimenten mit fünf verschiedenen Spendern in Ko-Kulturen mit NK- und HSC-4 Zellen und 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-EGFR mAk ( $n = 5$ ). Abgebildet sind die Mittelwerte der Expressions-Änderung ( $\text{MFI}_{\text{Probe}}/\text{MFI}_{\text{Medium}}$ ) +SEM. Statistik: (b) Über One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test wurden Unterschiede zur Mediumkontrolle berechnet.

**Tabelle 15: Statistische Auswertung der Regulation von CD80, CD86 und PD-L1 auf moDCs durch Cetuximab und Tomuzotuximab.**

Marker	Vergleich	n	[M <sub>1</sub> ]	[M <sub>2</sub> ]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI
<i>CD80</i>	Med. vs. Ctx.	5	1,00	1,46	+0,46	[0,27 - 0,65]
	Med. vs. Tom.	5	1,00	1,62	+0,62	[0,36 - 0,89]
	Ctx. vs. Tom.	5	1,46	1,62	+0,16	[-0,05 - 0,37]
<i>CD86</i>	Med. vs. Ctx.	5	1,00	1,92	+0,92	[0,40 - 1,45]
	Med. vs. Tom.	5	1,00	2,17	+1,17	[0,61 - 1,74]
	Ctx. vs. Tom.	5	1,92	2,17	+0,25	[0,01 - 0,49]
<i>PD-L1</i>	Med. vs. Ctx.	5	1,00	1,57	+0,57	[0,33 - 0,81]
	Med. vs. Tom.	5	1,00	1,83	+0,83	[0,56 - 1,09]
	Ctx. vs. Tom.	5	1,57	1,83	+0,25	[0,03 - 0,48]

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als Zunahme x-fachen Anstieges (MFI) zur Mediumkontrolle dargestellt.

Um den Einfluss der unterschiedlich gereiften mo-DCs auf die Aktivierung einer T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden den DC: NK: Tumorzell-Kulturen nach zwei Tagen zusätzlich allogene, negativ-isolierte T-Zellen zugefügt. Nach einer Kultivierung über weitere fünf Tage wurde die Expression von CD25, CD137 und PD-1 auf CD4 und CD8 positiven T-Zellen analysiert (Abbildung 16a). Die Zugabe von Tomuzotuximab führte ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml zu einer signifikant stärkeren Steigerung der CD25 und CD137 Expression auf CD8 positiven T-Zellen im Vergleich zu Cetuximab (Abbildung 16b, Tabelle 16).

**Tabelle 16: Statistische Auswertung der Regulation von CD25 und CD137 auf CD8+ T-Zellen durch Cetuximab und Tomuzotuximab.**

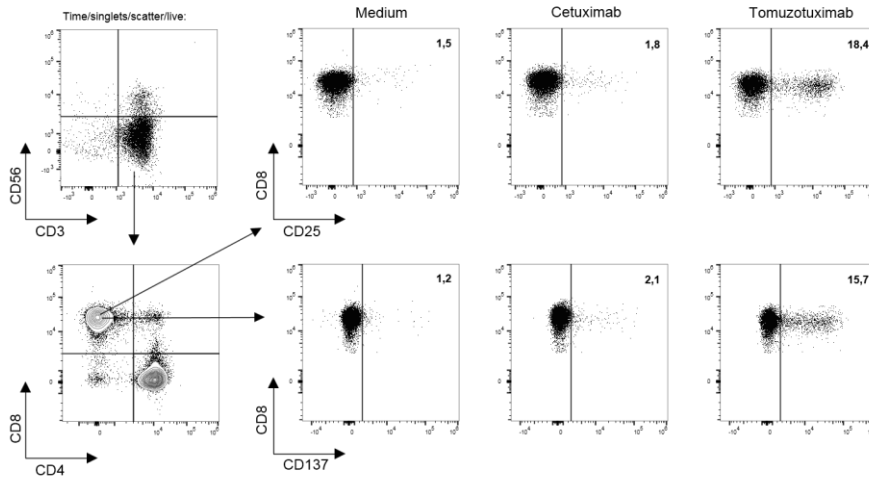
Marker	Konzentration [µg/ml]	n	[M <sub>Ctx</sub> ]	[M <sub>Tom</sub> ] ± σ	[M <sub>Tom</sub> ] - [M <sub>Ctx</sub> ]	95 % CI
<i>CD25</i>	0,001	10	3,3	3,0	-0,26	[-0,59 - 0,07]
	0,1	10	4,6	8,5	+3,84	[1,71 - 5,97]
	10	10	4,6	9,7	+5,08	[1,56 - 8,60]
<i>CD137</i>	0,001	10	3,3	2,9	-0,35	[-0,67 - -0,03]
	0,1	10	3,9	8,2	+4,27	[2,17 - 6,37]
	10	10	4,9	10,7	+5,77	[2,56 - 8,98]

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als %-Anteile CD25/CD137+ CD8+ T-Zellen dargestellt.

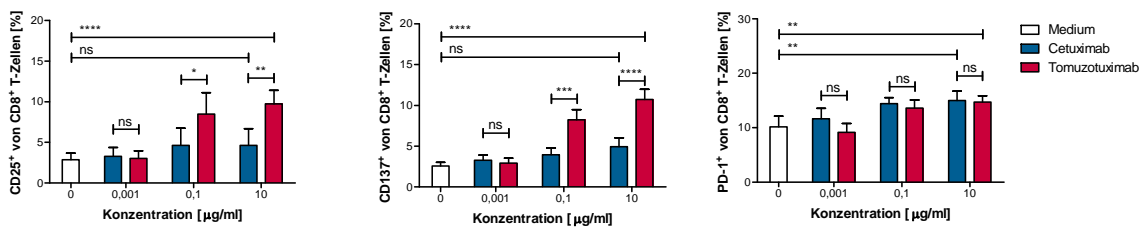
Zusätzlich wurde durch beide Antikörper eine vergleichbar starke Zunahme PD-1 positiver CD8 T-Zellen beobachtet (bei 10 µg/ml: Ctx. +4,8 %, 95 % CI [1,3 – 8,3]; Tom. +4,5 %, 95 % CI [1,7 – 7,3]). Im Gegensatz dazu resultierte weder die Behandlung mit Cetuximab noch Tomuzotuximab in eine bedeutsam erhöhte CD4 T-Zell-Aktivierung (bei 10 µg/ml, CD137: Ctx. /Tom. +1,1 %), führte allerdings ebenfalls zu einem Anstieg von PD-1 (Abbildung 16c; bei 10 µg/ml, Ctx. +3,8 %, 95 % CI [1,2 – 6,5]; Tom. +4,4 %, 95 % CI [2,1 – 6,7]). Passend zu der Hypothese, dass eine verstärkte NK-Zell-Aktivierung für die beobachteten Effekte bedeutsam ist, zeigten NK-Zellen auch in diesem Versuchsaufbau eine verstärkte CD137 Expression nach Tomuzotuximab-Behandlung (Abbildung 16d). Die Ergebnisse der besseren CD8 T-Zell-Aktivierung durch Tomuzotuximab konnten durch die Verwendung einer weiteren

Tumorzelllinie (CRC: HCT-116; CD25:  $[M_{\text{Tom}}-M_{\text{CtX}}] = +4,1 \%$ , 95 % CI [0,7 – 7,5]; CD137:  $[M_{\text{Tom}}-M_{\text{CtX}}] = +4,3 \%$ , 95 % CI [1,3 – 7,4]) bestätigt werden (Abbildung 16e).

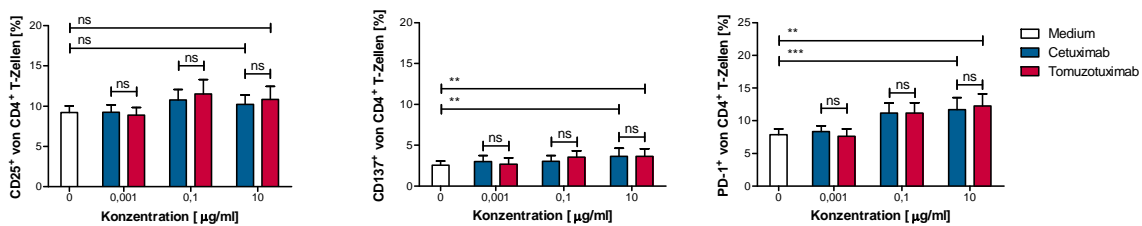
**a**



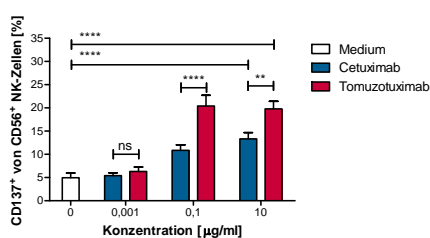
**b**



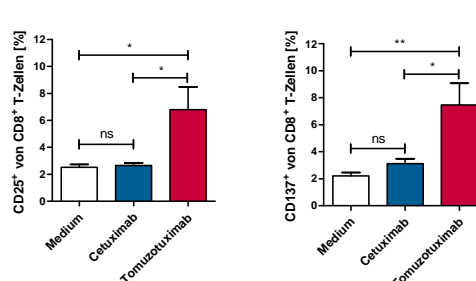
**c**



**d**



**e**



**Abbildung 16: Tomuzotuximab vermittelt eine verstärkte CD8 T-Zell-Aktivierung.** Der stimulierende Effekt von Cetuximab und Tomuzotuximab auf T-Zellen wurde in allogenen MLRs mit HSC-4 (a-d) oder HCT-116 (e) als Target-Zellen untersucht. Nach fünftägiger Ko-Kultivierung wurde die T-Zell-Aktivierung durchflusszytometrisch erfasst. (a) Am Beispiel von Ansätzen, welche  $\pm 10 \mu\text{g/ml}$  anti-EGFR behandelt wurden, wird die Gating-Strategie zur Analyse der Aktivierung von CD8+ T-Zellen aufgezeigt. Angegebene Zahlen stellen den [M] des %-Anteils



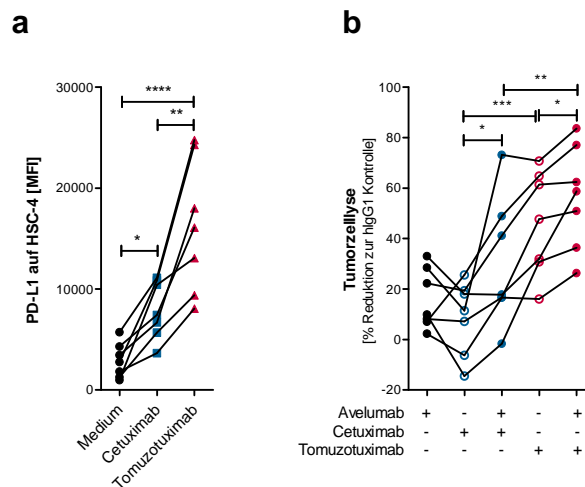
positiver Zellen von Duplikaten eines repräsentativen Experimentes dar. (b-c) Zusammenfassung der Induktion von CD25 (links), CD137 (Mitte) und PD-1 (rechts) auf CD8+ (b) und CD4+ (c) T-Zellen aus zehn Experimenten mit unterschiedlichen DC/NK-Zell:T-Zell-Spender-Kombinationen (n = 10). Der [M] des %-Anteils positiver Zellen +SEM von Ansätzen, welche mit 0/0,001/0,1/10 µg/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab stimuliert wurden, ist dargestellt. (d) In den Experimenten aus (b-c) wurde die CD137 Expression auf CD56-positiven NK-Zellen bestimmt. Dargestellt ist der [M] des %-Anteils CD137-positiver Zellen +SEM von zehn Experimenten (n = 10). (e) Anstelle von HSC-4 wurden HCT-116 in den vorangestellten Ko-Kultivierungen aus mo-DCs: NK-Zellen: Tumorzellen eingesetzt. Dargestellt sind die [M] der %-Anteile CD25- (links) und CD137-positiver (rechts) CD8+ T-Zellen nach fünftägiger Stimulation mit 10 µg/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab aus Experimenten mit sieben DC/NK-Zell: T-Zell-Spender-Kombinationen (n = 7). Statistik: (b-e) One-Way ANOVA mit angeschlossenem Bonferroni post-hoc Test wurde durchgeführt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Cetuximab und Tomuzotuximab zu einer gesteigerten Reifung von mo-DCs führen. Diese wurde zumindest teilweise durch NK-Zellen unterstützt und es zeigten sich stärkere Effekte durch Tomuzotuximab. In Experimenten bestehend aus mo-DCs und allogenen T-Zellen (engl. *Mixed-Lymphocyte-Reaction*, MLR) konnte gezeigt werden, dass Tomuzotuximab zu einer starken CD8 T-Zell-Antwort führt. Außerdem zeigten T-Zellen nach der Stimulation mit Cetuximab und Tomuzotuximab vergleichbar erhöhte PD-1 Level.

#### 5.1.5 *Anti-PD-1/anti-PD-L1 mAks verstärken den ADCC durch Tomuzotuximab*

Unter 5.1.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Immunzellen mit anti-EGFR mAks zu einer Steigerung von PD-L1 auf Tumorzellen führt (Anteil und Dichte). Durch die erhöhte Expression dieses immuninhibierenden Liganden kann einerseits eine effektivere Antitumor-Reaktion verhindert werden; sie stellt andererseits allerdings auch ein therapeutisches Target dar. Avelumab ist der einzige, derzeit zugelassene Antikörper gegen die PD-1: PD-L1 Achse, welcher neben der Blockade des Signalweges auch ADCC gegen PD-L1 positive Tumorzellen vermittelt. Da bereits gezeigt werden konnte, dass dieser Antikörper von einer gesteigerten PD-L1 Expression profitiert [91, 93, 94], sollte in einem ersten Ansatz getestet werden, ob die Kombination aus anti-EGFR mAk und Avelumab zu einer gesteigerten ADCC führt. Vergleichbar zu vorherigen Experimenten mit längerer Inkubation, führte auch eine 24-stündige Inkubation von HSC-4 Zellen mit aufgereinigten NK-Zellen zu einer verstärkten PD-L1 Expression auf vitalen Tumorzellen nach Tomuzotuximab Behandlung (Abbildung 17a;  $[M_{Tom}] - [M_{Ctx}]$ : +8268 MFI, 95 % CI [4394 – 12142]). Da HSC-4 Zellen den EGFR und PD-L1 exprimieren, führten Cetuximab, Tomuzotuximab und Avelumab allein zu einer Reduktion der vitalen HSC-4 Zellen. Wie zu erwarten, führte Tomuzotuximab zu einer deutlich stärkeren ADCC als Cetuximab allein. In Kombination mit Avelumab konnte für Cetuximab und Tomuzotuximab eine gesteigerte ADCC erzielt werden. Allerdings erreichten Kombinationen

aus Tomuzotuximab und Avelumab höhere Lyse-Werte, als die Kombination aus Cetuximab und Avelumab (Abbildung 17b, Tabelle 17).



**Abbildung 17: Erhöhte ADCC durch Kombinationen aus anti-EGFR mAKs und Avelumab.** NK-Zellen von sieben Spendern wurden mit HSC-4 Zellen Ko-kultiviert (5:1) und mit 10 ng/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab stimuliert. Nach 24 h wurden die adhärennten Zellen geerntet und durchflusszytometrisch analysiert. (a) Die Induktion von PD-L1 auf vitalen HSC-4 Zellen wurde in jedem Experiment kontrolliert (n = 7) und als [M] der PD-L1 Dichte (MFI) +SEM dargestellt. (b) Die Anzahl vitaler, HSC-4 Zellen wurde in jeder Einzelbehandlung und in Kombinationen mit 1 µg/ml Avelumab gemessen. Daraus wurde die spezifische Tumorzelllyse jedes Ansatzes relativ zur hIgG1-Kontrolle berechnet. Die dargestellten Punkte repräsentieren die [M] des %-Anteils an Tumorzelllyse basierend auf technischen Duplikaten (n = 5) oder Triplikaten (n = 2) aus sieben individuellen Experimenten. Zusammengehörige Ansätze ±Avelumab sind über Linien verbunden. Statistik: (a) One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test wurde durchgeführt, oder (b) gepaarte Student's t-Tests wurden verwendet, um Unterschiede zu berechnen.

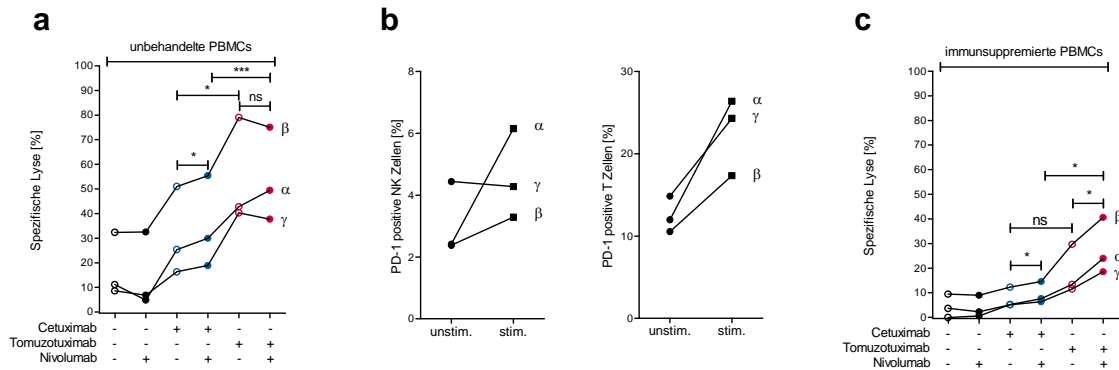
**Tabelle 17: Statistische Auswertung der Kombi-ADCC-Experimente zwischen anti-EGFR und Avelumab.**

Vergleiche	n	[M <sub>1</sub> ]	[M <sub>2</sub> ]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI	p-Wert
<i>Ctx. vs. Tom.</i>	7	6,77	46,19	39,42	[28,2 - 50,6]	0,0006
<i>Ctx. vs. Ctx. +Ave.</i>	7	6,77	30,35	23,58	[6,8 - 40,4]	0,0267
<i>Tom. vs. Tom. +Ave.</i>	7	46,19	56,51	10,32	[3,2 - 17,4]	0,0193
<i>Ctx. +Ave. vs. Tom. +Ave.</i>	7	30,35	56,51	26,16	[15,7 - 36,6]	0,0016

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als %-Anteil spezifischer Lyse dargestellt.

In einem weiteren Ansatz sollte getestet werden, ob die reine Blockade der PD-1/PD-L1 Achse ausreicht, um die Tumorzelllyse durch Tomuzotuximab zu verstärken. Dazu wurden Kombinationen mit dem anti-PD-1 IgG4 Nivolumab durchgeführt, der aufgrund seines Isotyps hauptsächlich blockiert und kaum über seinen Fc-Teil wirkt. PBMCs von gesunden Spendern zeigen nur eine sehr geringe PD-1 Expression auf NK- und T-Zellen und besitzen in dem gewählten Experiment-Aufbau eine sehr hohe Reaktivität. Das führte dazu, dass in einem ersten Versuch ohne Vorbehandlung der Effektorzellen nahezu keine Steigerung der anti-EGFR mAK-vermittelten ADCC durch Zugabe des anti-PD-1 Antikörpers Nivolumab beobachtet werden konnte (Abbildung 18a). Um immunsupprimierte Immunzellen mit erhöhter PD-1 Expression zu

generieren, wurden PBMCs vor dem Start des ADCC-Experimentes für drei Tage mit anti-CD3/anti-CD28-beladenen Beads und Hydrokortison stimuliert [133]. Diese Vorbehandlung führte mit drei verschiedenen PBMC-Spendern zu einer deutlichen Zunahme von PD-1 positiven T-Zellen und bei zwei von drei Spendern ebenfalls zur leichten Steigerung von PD-1 auf NK-Zellen (Abbildung 18b).



**Abbildung 18: Nivolumab verstärkt die ADCC-Aktivität immunsupprimierter PBMCs durch Tomuzotuximab.** (a) Die ADCC von PBMCs von drei Spendern gegen DU-145 Zellen (E: T = 80:1, n = 3) durch 0,15 ng/ml anti-EGFR ±10 µg/ml Nivolumab wurde in fünfständigen Europium-Freisetzungsexperimenten ermittelt. Jeder Punkt basiert auf dem [M] des %-Anteils spezifischer Lyse von technischen Triplikaten und zusammenhängende Daten jedes Spenders sind durch Linien verbunden. (b) PBMCs von drei Spendern wurden mit 100 µM Hydrokortison und anti-CD3/anti-CD28-Beads für drei Tage stimuliert. Anschließend wurde die PD-1 Expression auf CD56+ NK-Zellen (links) und CD3+ T-Zellen (rechts) analysiert. Die [M] des %-Anteils PD-1 positiver Zellen von technischen Triplikaten der drei Spender vor und nach Stimulation sind dargestellt. (c) Diese PBMCs wurden dann in ADCC-Experimenten gegen DU-145 vergleichbar zu (a) eingesetzt. Die spezifischen Lysen von DU-145-Zellen mit immunsupprimierten PBMCs von drei Spendern sind als [M] des %-Anteils spezifischer Lyse von technischen Triplikaten je Datenpunkt dargestellt. Zusammenhängende Daten jedes Spenders sind durch Linien verbunden. Zusätzlich wurden die jeweiligen Spender aus (a-c) durch α, β und γ hervorgehoben. Statistik: gepaarte Student's t-Tests wurden verwendet, um Unterschiede zu berechnen.

Im Vergleich mit unbehandelten PBMCs (Abbildung 18a) wurden in Experimenten mit diesen PBMCs tendenziell geringere Lysen durch Cetuximab und Tomuzotuximab erreicht, was dafür sprechen kann, dass die Vorbehandlung zu einem erschöpften Immunzell-Phänotyp führte (Abbildung 18c). Zusätzlich verringerte sich der Vorteil der Tumorzelllyse von Tomuzotuximab gegenüber Cetuximab ( $[M_{Tom}] - [M_{Ctx}]$ : +23,2 % vs. +10,7 %). Unter Verwendung dieser supprimierten PBMCs führte die Zugabe von Nivolumab zu Tomuzotuximab zu einer Steigerung der ADCC gegen die PD-L1 positiven DU-145 Zellen um +9,5 %, wohingegen der Effekt für Cetuximab sehr gering ausfiel (+2,0 %). Vor allem der Vergleich zwischen den Kombinationen aus Cetuximab oder Tomuzotuximab mit Nivolumab zeigte einen deutlichen Vorteil der Kombination mit Tomuzotuximab (1,7-fache Lyse-Differenz im Vergleich zur Einzelbehandlung). Eine Zusammenfassung der statistischen Berechnungen der ADCC-Experimente mit unbehandelten und vorstimulierten PBMCs ist in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18: Zusammenfassung der Kombi-ADCC Experimente bestehend aus anti-EGFR und Nivolumab mit verschiedenen Effektorzellen.**

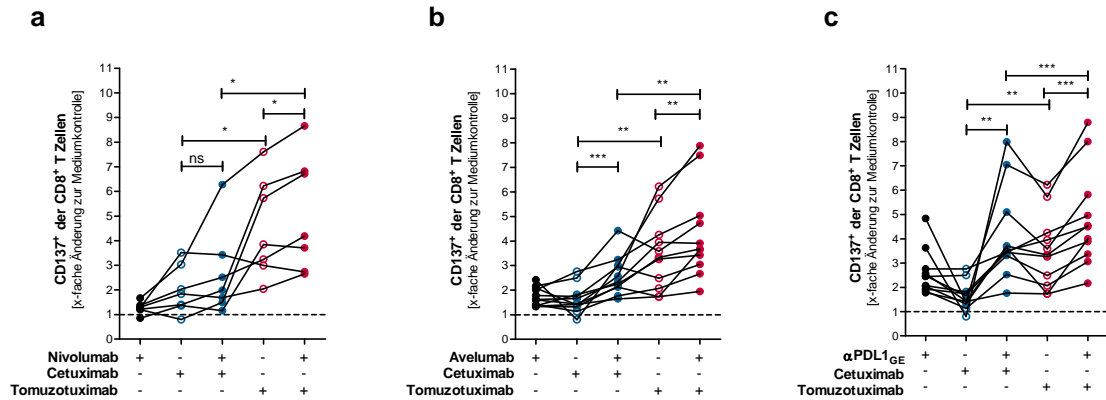
<b>ADCC mit unbehandelten PBMCs</b>	n	[M1]	[M2]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI	p-Wert
<i>Ctx. vs. Tom</i>	3	30,9	54,1	23,2	[17,1 – 29,2]	0,017
<i>Ctx vs. Ctx. +Nivo.</i>	3	30,9	34,8	3,9	[2,6 – 5,2]	0,028
<i>Tom. vs. Tom. +Nivo.</i>	3	54,1	54,2	0,1	[-6,5 – 6,6]	0,99
<i>Ctx. +Nivo. vs. Tom. +Nivo.</i>	3	34,8	54,1	19,4	[18,9 – 19,8]	0,0001
<b>ADCC mit vorbehandelten PBMCs</b>	n	[M1]	[M2]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI	p-Wert
<i>Ctx. vs. Tom</i>	3	7,6	18,2	10,7	[15,7 - 29,1]	0,0887
<i>Ctx vs. Ctx. +Nivo.</i>	3	7,6	9,5	2,0	[2,3 - 5,6]	0,0314
<i>Tom. vs. Tom. +Nivo.</i>	3	18,2	27,7	9,5	[-1,1 - 5,6]	0,0179
<i>Ctx. +Nivo. vs. Tom. +Nivo.</i>	3	9,5	27,7	18,2	[15,7 - 25,7]	0,0481

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als %-Anteil spezifischer Lyse dargestellt.

Zusammenfassend zeigte die Kombination aus Tomuzotuximab und anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern ein größeres Potenzial zur Steigerung der ADCC gegen Tumorzellen im Vergleich zu Kombinationen mit Cetuximab.

### 5.1.6 Bedeutung der Defukosylierung für die T-Zell-Aktivierung in anti-EGFR x anti-PD-1/anti-PD-L1 Kombinationen

Die MLR ist ein etablierter, funktioneller Versuchsaufbau, um den Einfluss von Reagenzien auf die Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Immunzellaktivierung durch Tomuzotuximab die PD-L1 Expression auf Tumorzellen und DCs steigert sowie PD-1 auf aktivierten T-Zellen induziert, sollte der Effekt der Kombination von anti-EGFR und anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern auf die Aktivierung von T-Zellen untersucht werden. Dafür wurden in MLRs, vergleichbar zu den Experimenten aus Abbildung 16, Kombinationen mit dem derzeit zugelassenen anti-PD-1 Antikörper Nivolumab, sowie dem anti-PD-L1 Antikörper Avelumab mitgeführt (Abbildung 19a-b). Wie bereits gezeigt, hat Tomuzotuximab allein einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die CD137 Expression von CD8+ T-Zellen, als Cetuximab allein (Abbildung 19a-c). Die Zugabe von Nivolumab resultierte für Tomuzotuximab, nicht aber für Cetuximab, zu einer statistisch signifikanten Steigerung der CD137 Expression auf CD8 T-Zellen im Vergleich zur Einzelbehandlung. Dementsprechend führte die Kombination aus Tomuzotuximab und Nivolumab zu einer deutlich stärkeren T-Zell-Aktivierung, als die Kombination aus Cetuximab mit Nivolumab (Statistik siehe Tabelle 19).



**Abbildung 19: Kombinations-MLRs mit anti-EGFR und anti-PD-1/PD-L1 mAbs.** Die Steigerung der CD137-Expression auf T-Zellen durch die Kombination aus 10 µg/ml Cetuximab oder Tomuzotuximab mit 10 µg/ml anti-PD-1 mAk Nivolumab (a; n = 7), oder den anti-PD-L1 mAbs Avelumab (b; n = 11) und αPDL1<sub>GE</sub> (c; n = 11) wurde in MLRs untersucht. Die x-fache Änderung des %-Anteils CD137-positiver CD8+ T-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle ist dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den [M] aus technischen Duplikaten. Ergebnisse, welche zu einem Experiment gehören sind durch Linien verbunden. Die Experimente aus (b) und (c) wurden mit identischen DC/NK-Zell: T-Zell-Kombinationen durchgeführt. Statistik: gepaarte Student's t-Tests wurden verwendet, um Unterschiede zu berechnen.

Da die Kombinations-Experimente zum Teil mit unterschiedlichen Immunzellspendern durchgeführt wurden, kann kein direkter Vergleich auf die absolute Stärke der T-Zell-Antwort zwischen Nivolumab (Abbildung 19a) und Avelumab (Abbildung 19b) gezogen werden. Dennoch scheint Avelumab in diesem Versuchsaufbau zu einer etwas stärkeren T-Zell-Antwort zu führen ([M]-x-fache Steigerung zur Mediumkontrolle ±σ: Nivolumab 1,27 ±0,2; Avelumab 1,74 ±0,4). Die Zugabe von Avelumab zu Cetuximab und Tomuzotuximab führte zur Steigerung der CD137 Expression auf CD8+ T-Zellen im Vergleich zur Behandlung mit anti-EGFR allein. Der deutliche Vorteil der Kombination aus Tomuzotuximab und Avelumab im Vergleich zu Cetuximab und Avelumab ist aber weiterhin deutlich sichtbar (Statistik siehe Tabelle 19).

Avelumab ist der einzige derzeit zugelassene anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörper, welcher über seinen Fc-Teil mit dem FcγRIIIa auf Immunzellen interagieren kann, was eine mögliche Erklärung für die, im Vergleich zu Nivolumab, besseren Ergebnisse darstellt. Kürzlich konnten wir zeigen, dass die Verwendung von anti-PD-L1 Antikörpern mit einem IgG1 Isotyp zu einer verstärkten T-Zell-Aktivierung führt, welche ebenfalls durch die Reduktion der Fc-Fukosylierung optimiert werden konnte [96]. In einem weiteren Ansatz, dessen Ergebnis in Abbildung 19c dargestellt ist, sollte daher getestet werden, inwiefern der, sich in der präklinischen Entwicklung befindende, αPDL1<sub>GE</sub> für Kombinationen mit anti-EGFR mAbs geeignet ist. Wie bereits beschrieben [96], führte der αPDL1<sub>GE</sub> ([M] ±σ: 2,57±0,9) in den durchgeführten Experimenten (identische Immunzellspender und Ctx./Tom.-Kontrollen, wie in

Experimenten mit Avelumab) zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung als Avelumab und die Kombination aus  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> mit Tomuzotuximab führte zu einer Steigerung im Vergleich zur Monotherapie. Überraschender Weise führte die Zugabe von  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> zu Cetuximab zu einer deutlich stärkeren Erhöhung der CD137 Expression auf CD8 T-Zellen im Vergleich zu Kombinationen mit Nivolumab oder Avelumab. Das führte dazu, dass der Unterschied zwischen Cetuximab und Tomuzotuximab in Kombinationen mit  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> am geringsten war. Dennoch zeigte Tomuzotuximab auch in diesen Kombinationen einen leicht höheren Anteil CD137+ T-Zellen als eine vergleichbare Kombination mit Cetuximab. Eine Zusammenfassung der statistischen Auswertung zu den Kombinations-MLR-Experimenten ist in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 19: Statistische Zusammenfassung der Kombinations-MLR-Experimente mit anti-EGFR ± Nivolumab, Avelumab oder  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub>.**

<b>+ Nivolumab</b>	n	[M1]	[M2] ± $\sigma$	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI	p-Wert
<i>Ctx. vs. Tom</i>	7	2,0	4,5	2,5	[0,6 - 4,4]	0,0269
<i>Ctx. vs. Ctx. +Nivo.</i>	7	2,0	2,6	0,7	[-0,3 - 1,6]	0,2009
<i>Tom. vs. Tom. +Nivo.</i>	7	4,5	5,1	0,5	[0,1 - 1,0]	0,0367
<i>Ctx. +Nivo. vs. Tom. +Nivo.</i>	7	2,6	5,1	2,4	[0,7 - 4,1]	0,0219
<b>+ Avelumab</b>	n	[M1]	[M2]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI	p-Wert
<i>Ctx. vs. Tom</i>	11	1,6	3,5	1,9	[0,8 - 2,9]	0,0035
<i>Ctx. vs. Ctx. +Ave.</i>	11	1,6	2,6	1,0	[0,6 - 1,4]	0,0005
<i>Tom. vs. Tom. +Ave.</i>	11	3,5	4,3	0,8	[0,4 - 1,3]	0,0034
<i>Ctx. +Ave. vs. Tom. +Ave.</i>	11	2,6	4,3	1,7	[0,7 - 2,8]	0,0065
<b>+ <math>\alpha</math>PDL1<sub>GE</sub></b>	n	[M1]	[M2]	[M <sub>2</sub> ] - [M <sub>1</sub> ]	95 % CI	p-Wert
<i>Ctx. vs. Tom</i>	11	1,6	3,5	1,9	[0,8 - 2,9]	0,0035
<i>Ctx. vs. Ctx. +<math>\alpha</math>PDL1<sub>GE</sub></i>	11	1,6	4,1	2,5	[1,2 - 3,8]	0,0025
<i>Tom. vs. Tom. +<math>\alpha</math>PDL1<sub>GE</sub></i>	11	3,5	4,8	1,3	[0,8 - 1,9]	0,0005
<i>Ctx. +<math>\alpha</math>PDL1<sub>GE</sub> vs. Tom. +<math>\alpha</math>PDL1<sub>GE</sub></i>	11	4,1	4,8	0,7	[0,4 - 0,9]	0,0002

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen sind als Zunahme des x-fachen Anstieges dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Tomuzotuximab-vermittelte CD8 T-Zell-Aktivierung in MLRs durch die Zugabe von Nivolumab, Avelumab und  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> gesteigert werden kann. Dagegen führte mit Cetuximab nur die Zugabe der beiden anti-PD-L1 IgG1 Antikörper Avelumab und  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> zu einer bedeutsam gesteigerten CD137-Expression auf CD8 T-Zellen. Jede der getesteten Kombinationen erreichte mit Tomuzotuximab eine höhere T-Zell-Aktivierung als ein vergleichbarer Ansatz mit Cetuximab. Diese Beobachtungen zeigen die Bedeutung der Fc-Fc $\gamma$ RIIIa Interaktion und das Potenzial der Defukosylierung von mAks bei der Kombination von anti-EGFR und anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern.

## 5.2 Charakterisierung von agonistischen anti-CD40 Antikörpern

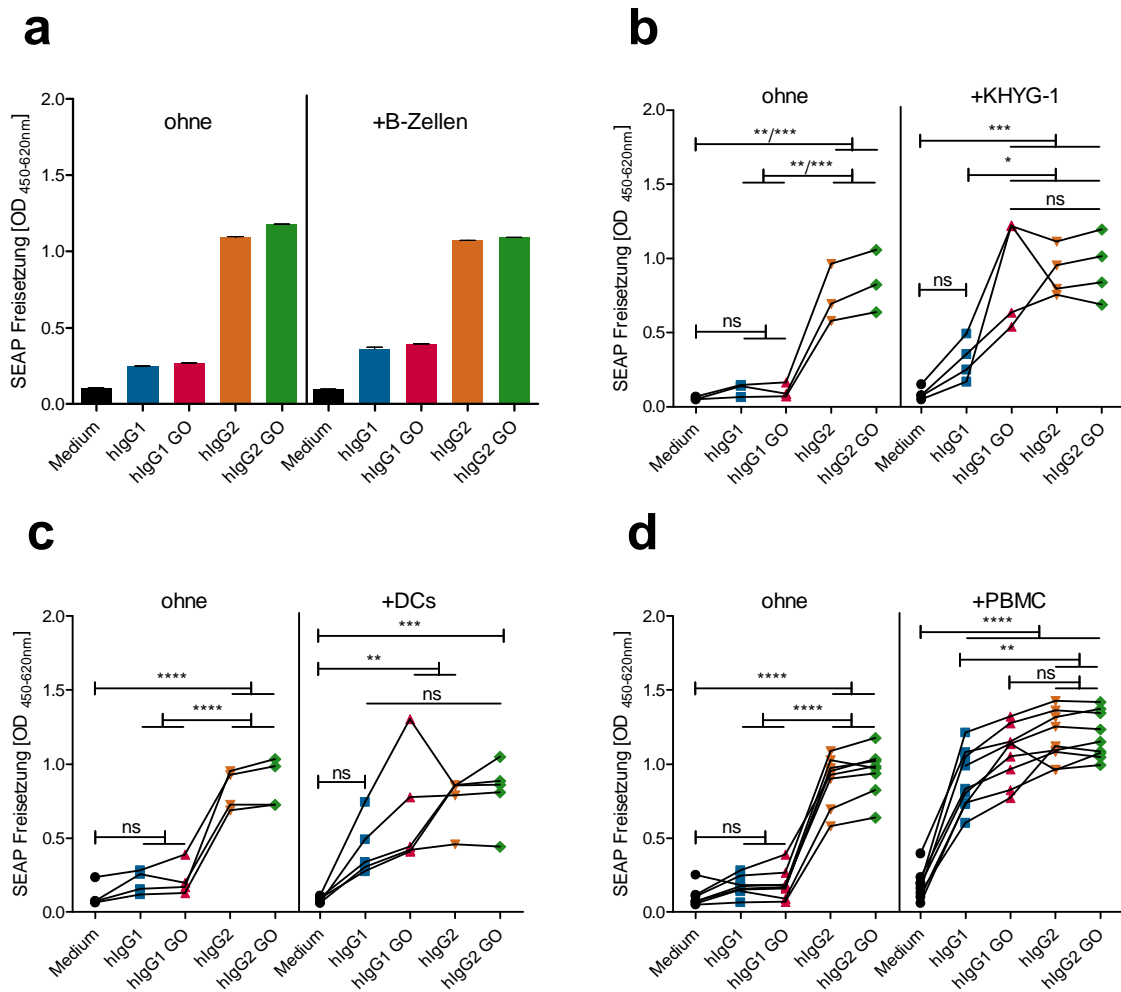
Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit sollte die Bedeutung der Auswahl des Isotyps sowie der Reduzierung der Fukosylierung auf die Effektorfunktionen eines agonistischen anti-CD40 Antikörpers untersucht werden. Hierzu wurden vier Antikörper-Varianten in verschiedenen Stimulationsexperimenten verglichen, um die Stärke der CD40-Stimulation, die Vermittlung von ADCC, die Aktivierung von T-Zellen über anti-CD40 Antikörper-gereifte Antigenpräsentierenden Zellen und die Infiltration von Immunzellen in 3D-Tumorspäroide zu bestimmen. Abschließend wurde das Potenzial einer gesteigerten Lyse CD40 positiver Immunzellen und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Zytokinsturms durch einen defukosylierten anti-CD40 IgG1 Antikörper untersucht.

### 5.2.1 Antikörper Isotyp und Grad der Fukosylierung beeinflussen die agonistische Aktivität

Durch frühere Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass die agonistische Aktivität der anti-CD40 Antikörper-Varianten stark vom Antikörper-Isotyp und/oder dem Versuchsaufbau bezüglich der Kreuzvernetzung abhängt. Dabei zeigten die hIgG2-Varianten unabhängig von der Fc-vermittelten Antikörpervernetzung eine Erhöhung der NF $\kappa$ B-Aktivierung. Im Gegensatz dazu benötigen die IgG1-Varianten eine Fc-Vernetzung, um agonistisch wirken zu können. Unter physiologischer Fc-Vernetzung über den Fc $\gamma$ RIIIa zeigte sich, dass der defukosylierte hIgG1 zu einer deutlich stärkeren NF $\kappa$ B-Aktivierung führt, als der stark-fukosylierte Antikörper. Diese Beobachtung wurde bisher nur exemplarisch über die Zugabe einer Fc $\gamma$ RIIIa-transfizierten NK-Zelllinie gezeigt, weshalb untersucht werden sollte, ob sich vergleichbare Effekte auch unter Nutzung von Primärzellen reproduzieren lassen.

Durch Verwendung von CD40-transfizierten HEK-Blue™ Zellen wurde der Einfluss der Zugabe unterschiedlicher Immunzellen auf die agonistische Aktivität der normal oder Fukose-reduzierten (glyko-optimiert, -GO) anti-CD40 hIgG1 und hIgG2 Varianten getestet. Durch die Zugabe von B-Zellen (Abbildung 20a), welche nur Fc $\gamma$ RIIA/B exprimieren, zeigt sich im Vergleich zu Ansätzen ohne B-Zellen eine minimale Steigerung der SEAP-Freisetzung durch die hIgG1-Varianten. Das Signal liegt allerdings weiterhin deutlich unter dem der hIgG2-Varianten und es zeigt sich kein Vorteil der Defukosylierung. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe Fc $\gamma$ RIIIa-tragender Zellen, wie z. B. der Fc $\gamma$ RIIIa-transfizierten NK-Zelllinie KHYG-1-CD16 (Abbildung 20b), humaner DCs (Abbildung 20c) oder humaner PBMCs (Abbildung 20d), zu einer Signalerhöhung durch die anti-CD40 hIgG1 Antikörper. Auch wenn nur bei Verwendung

der hFcγRIIIa-transfizierten KHYG-1-Zellen statistisch signifikante Unterschiede berechnet wurden, konnte durch die physiologische Fc-Vernetzung gezeigt werden, dass der defukosylierte hIgG1-GO eine etwas stärkere NFκB-Aktivierung als die stark-fukosylierte Variante vermittelt. Zusätzlich erreichte der hIgG1-GO Antikörper eine vergleichbare agonistische Aktivierung, wie die IgG2-Varianten.



**Abbildung 20: NFκB-Aktivierung durch die anti-CD40 Antikörper.** HEK-Blue™ Zellen wurden ü. N. ±Immunezellen (1:20) mit 100 ng/ml anti-CD40 Antikörper behandelt, um anschließend die freigesetzte SEAP-Konzentration zu bestimmen. (a) Das Ergebnis der Zugabe von B-Zellen eines Spenders ist als [M] +SEM von technischen Duplikaten dargestellt. Die weiteren Diagramme fassen Experimente unter Zugabe von CD16a transfizierten KHYG-1-Zellen (b, n = 4, je 2x -CD16aF bzw. -CD16aV transfizierte KHYG-1-Zellen verwendet), DCs (c, n = 5) sowie PBMCs (d, n = 9) zusammen. Jeder Datenpunkt basiert auf dem [M] von technischen Duplikaten und Datenpunkte eines Experiments sind durch Linien verbunden. Die praktische Durchführung der zugrunde liegenden Experimente wurde durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH übernommen. Statistik: (b-d) Unterschiede wurden durch One-Way ANOVA mit angeschlossenem Bonferroni post-hoc Test berechnet.

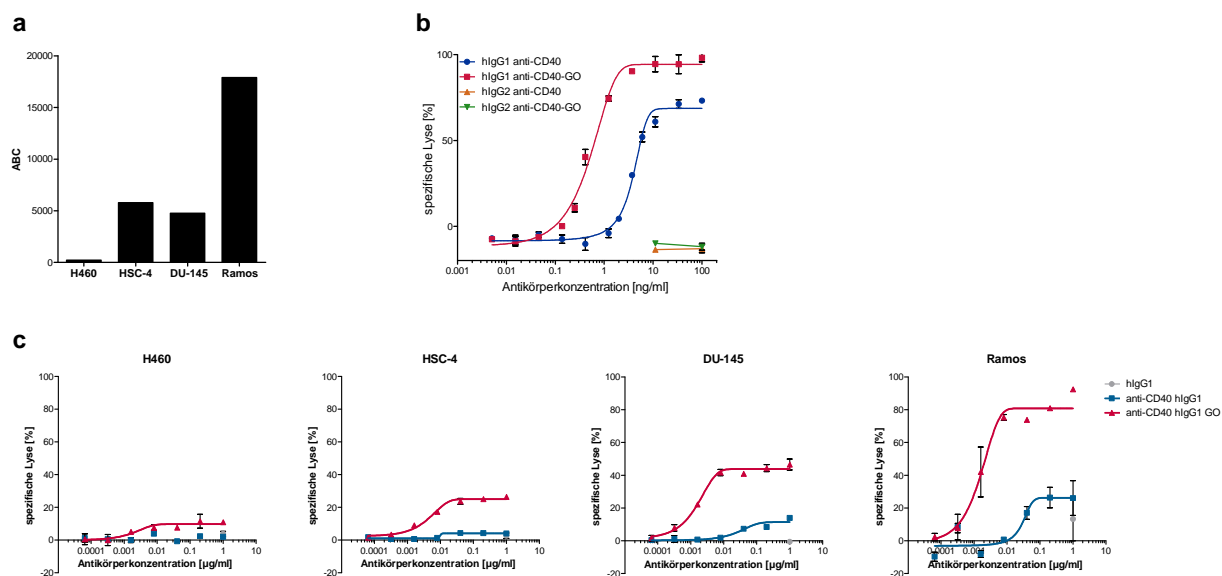
Durch diese Experimente werden bisherige Ergebnisse zur Bedeutung der Fc-Vernetzung für agonistische Antikörper mit IgG1 und IgG2 Isotyp bestätigt. Die Bindung an FcγRIIIa/b zeigt in



einem durchgeführten Experiment durch Zugabe von B-Zellen keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu führt die physiologische Vernetzung der IgG1-Varianten über den FcγRIIIa zur verbesserten agonistischen Aktivität, welche vor allem für den defukosylierten Antikörper die Stärke der sehr potenten IgG2-Varianten erreicht. Für die beiden hIgG2 Varianten konnte kein Einfluss der Zugabe von Immunzellen beobachtet werden.

### 5.2.2 ADCC als zusätzlicher Effektormechanismus der hIgG1 Varianten

Die Generierung von Antikörpern im IgG1-Format hat das Potenzial die ADCC gegen Tumorzellen zu den Effektorfunktionen eines agonistischen anti-CD40 Antikörpers hinzuzufügen. Um die ADCC-Aktivität aller anti-CD40 Antikörpervarianten zu testen, wurde die CD40-Expression auf verschiedenen Tumorzellen bestimmt (Abbildung 21a). Für den Vergleich beider hIgG1 und hIgG2 Varianten wurde die Lyse von CD40 stark-exprimierenden Ramos-Zellen durch KHYG-1-CD16aV untersucht. Wie erwartet, führen nur die hIgG1 Antikörper zur gesteigerten Tumorzelllyse. Neben einer höheren Maximallyse zeigt sich die Wirkung bereits bei geringeren Antikörperkonzentrationen der defukosylierten Variante (Abbildung 21b). Um die Antigenabhängigkeit der ADCC durch die anti-CD40 hIgG1 Antikörper zu untersuchen, wurden die Lysen von Tumorzellen mit unterschiedlicher Antigendichte verglichen. In ADCC-Experimenten mit PBMCs als Effektorzellen zeigte sich eine Korrelation zwischen der ADCC Aktivität und dem CD40-Expressionslevel mit der stärksten Lyse gegen Ramos-Zellen und nahezu keiner Lyse gegen die CD40 negative Zelllinie H460 (Ramos > DU145 > HSC-4 > H460). Zusätzlich zeigt sich gegen die drei Zelllinien mit relevanter CD40-Expression (Ramos, DU145, HSC-4) eine deutlich stärkere ADCC durch den defukosylierten hIgG1-GO Antikörper.

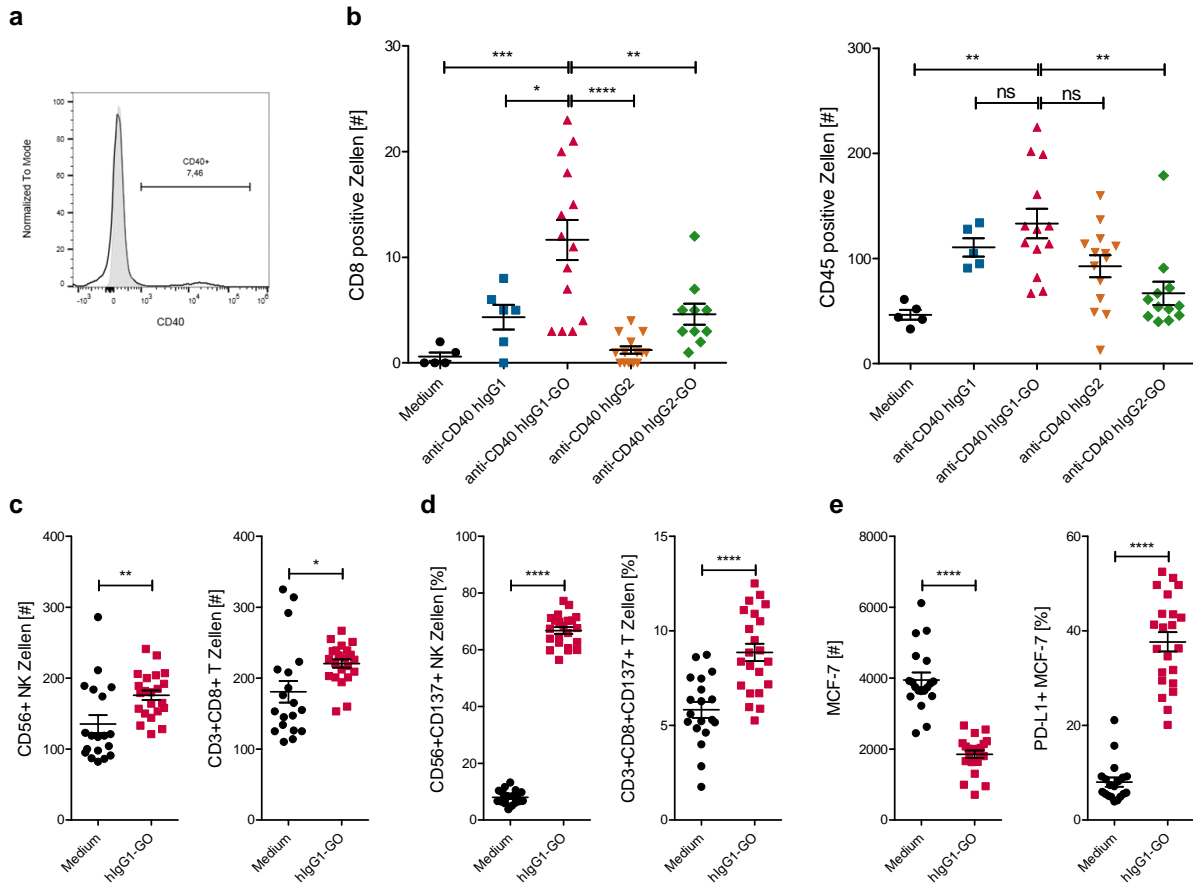


**Abbildung 21: ADCC-Aktivität der anti-CD40 Antikörper-Varianten.** (a) Die CD40-Expression auf verschiedenen Zelllinien wurde über die Bindung von 100 µg/ml anti-CD40 und Detektion mittels FITC-konjugierten Sekundärantikörpers ermittelt. Die Quantifizierung der ABC erfolgte durch QIFIKIT-Beads®. Dargestellt ist der [M] der ABC/Zelle von Duplikaten für H460-, HSC-4-, DU145- und Ramos-Zellen. (b, c) Europium-beladene Tumorzellen (b: Ramos; c: H460, HSC-4, DU-145, Ramos) wurden mit KHYG-1-CD16aV (b; E:T 10:1) oder PBMCs (c; E:T 100:1; FcγRIIIa-F/F-Spender) und aufsteigenden Konzentrationen anti-CD40 mAk behandelt. Nach 5 h wurde das freigesetzte Europium detektiert, um die spezifische Lyse zu bestimmen. Jeder Datenpunkt entspricht dem [M] des %-Anteils spezifischer Lyse von technischen Triplikaten ±SEM. Die praktische Durchführung des Experimentes aus (b) wurde durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH übernommen.

### 5.2.3 Einfluss der anti-CD40 mAks auf die Immunzellinfiltration

Um zu untersuchen, ob die Stimulation von Immunzellen mit agonistischen anti-CD40 mAks die Immunzell-Mikroumgebung von Tumoren beeinflussen kann, wurden Tumor-Sphäroid-Kulturen mit MCF-7 Zellen angelegt. Diese Krebsstammzell-angereicherte Zelllinie bildet vergleichbar zu den HSC-4 Zellen (5.1.2.2) durch die Kultivierung in *Corning® spheroid microplates* einheitlich große Sphäroide und besitzt nur einen sehr geringen Anteil CD40+ Zellen (<10 %, Abbildung 22a). Nach Ko-Kultivierung mit PBMCs und 1 µg/ml anti-CD40 mAk für zwei Tage konnte die Immunzellinfiltration mittels IHC (Abbildung 22b) und durchflusszytometrisch (Abbildung 22c) analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation mit anti-CD40 hlgG1-GO die höchste Anzahl CD45+ Immunzellen, CD8+ T-Zellen, sowie CD56+ NK-Zellen innerhalb der MCF-7-Sphäroide nachgewiesen werden konnte. Über die gesteigerte Expression von CD137 konnte für den defukosylierten anti-CD40 hlgG1-GO zusätzlich gezeigt werden, dass die infiltrierten NK- und CD8+ T-Zellen aktiviert wurden (Abbildung 22d). Diese Aktivierung der Immunzellen führte außerdem zu einer deutlichen Reduktion vitaler Tumorzellen, wobei übrigbleibende MCF-7 einen stark erhöhten Anteil PD-L1+ Zellen aufweisen (Abbildung 22e).

Zusammenfassend führt der anti-CD40 hIgG1-GO im Vergleich zu den anderen Varianten zu einer deutlich stärkeren Infiltration aktivierter Immunzellen, was in einer erhöhten PD-L1 Expression auf den Tumorzellen resultiert.

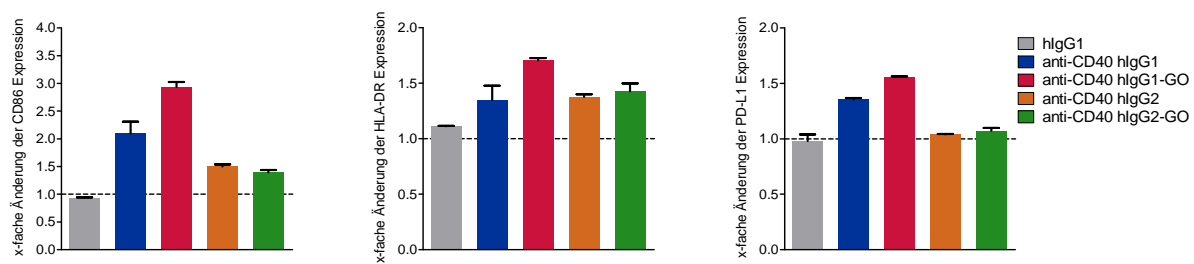


**Abbildung 22: Immunzellinfiltration durch anti-CD40 mAKs in MCF-7 Sphäroide.** (a) Die CD40-Expression auf MCF-7 wurde über die Bindung von 100  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD40 (schwarz) bzw. einer hIgG1-Kontrolle (grau) und Detektion mittels FITC-konjugierten Sekundärantikörpers ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm des resultierenden FITC-Signals. (b-e) MCF-7 Sphäroide wurden für zwei Tage mit PBMCs und 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD40 mAK Ko-kultiviert. (b) Nach IHC-Färbung wurden Sphäroid-infiltrierende CD8+ Zellen (n = Med.: 5, hIgG1: 6, hIgG1-GO: 14, hIgG2: 14, hIgG2-GO: 10) und CD45+ Zellen (n = Med.: 5, hIgG1: 5, hIgG1-GO: 13, hIgG2: 14, hIgG2-GO: 12) einzelner Sphäroide ausgezählt. (c-e) Medium (n = 19) oder anti-CD40 hIgG1-GO (n = 22) stimulierte Ko-Kulturen wurden mittels Accutase dissoziiert, um die (c) Anzahl und (d) CD137 Expression von CD56+ und CD3+CD8+ Zellen, sowie (e) die Anzahl und den Anteil PD-L1-positiver MCF-7 Zellen zu bestimmen. Die Ergebnisse für anti-CD40 hIgG1-GO konnten in einem weiteren Experiment bestätigt werden. In (b-e) sind die [M]  $\pm$ SEM von Replikaten abgebildet. Statistik: (b) One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Test, oder (c-e) ungepaarte Student's t Tests wurden verwendet, um Unterschiede zu berechnen.

#### 5.2.4 Potential der anti-CD40 Varianten zur T-Zell-Aktivierung in MLRs

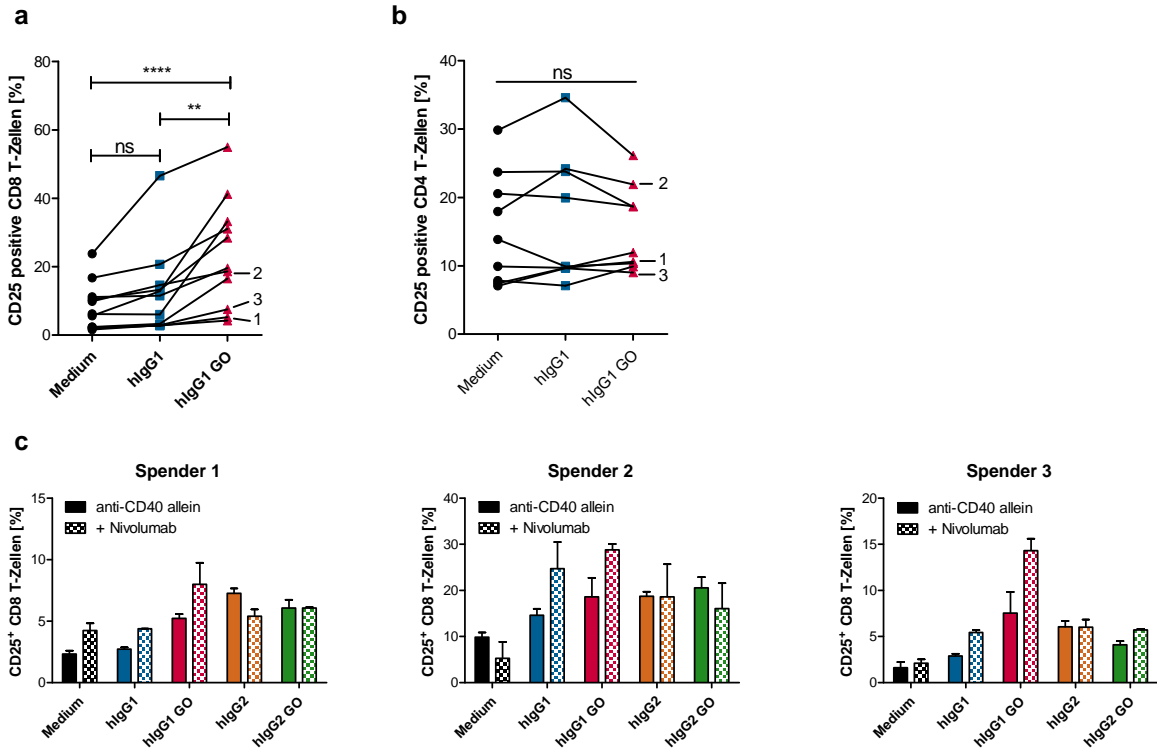
Eine der Hauptfunktionen agonistischer CD40-Stimulation ist die Reifung von DCs zur besseren Präsentation von Antigenen an T-Zellen. Daher sollte getestet werden, ob die Glyko-Optimierung von anti-CD40 mAKs einen Einfluss auf die Reifung von DCs zeigt. In Ko-Kultivierungen von unreifen mo-DCs mit autologen PBMCs führte die Zugabe aller vier anti-

CD40 Varianten zum Anstieg des ko-stimulierenden Liganden CD86 sowie des MHC II Rezeptors HLA-DR (Abbildung 23). Dabei resultierte der defukosylierte hIgG1-GO tendenziell zur stärksten Erhöhung beider Oberflächenmoleküle. Zusätzlich steigerte die defukosylierte anti-CD40 hIgG1-Variante auch die PD-L1 Expression im Vergleich zum stark-fukosylierten anti-CD40 hIgG1. Interessanteweise haben die beiden hIgG2-Varianten keinen Einfluss auf die Expression von PD-L1, was auf unterschiedliche Wirkmechanismen der beiden Isotypen hindeutet.



**Abbildung 23: Einfluss der anti-CD40 Antikörper auf die Reifung von mo-DCs.** GM-CSF/IL-4-differenzierte mo-DCs wurden mit autologen PBMCs (1:5) und 0,1 µg/ml anti-CD40 Antikörper für zwei Tage behandelt. Dargestellt sind die x-fachen Änderungen der Expressionsdichten (MFI) von CD86 (links), HLA-DR (Mitte) und PD-L1 (rechts) auf CD11c+HLA-DR+ DCs im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis mit mo-DCs und PBMCs eines Spenders als [M] +SEM von technischen Duplikaten.

Anschließend wurde der Einfluss der anti-CD40 hIgG1 Glykosylierungsvarianten auf die Aktivierung von T-Zellen in allogenen MLRs untersucht. Wie in Abbildung 24a dargestellt, führte der anti-CD40 hIgG1-GO zu einer deutlichen Steigerung CD25 positiver CD8 T-Zellen. Im Gegensatz dazu hatte der stark-fukosylierte Antikörper nahezu keinen Effekt ( $[M_{\text{hIgG1-GO}}] - [M_{\text{hIgG1}}] = +11,2 \%$ , 95 % CI [5,8 – 16,7]). In drei verschiedenen MLR wurde auch durch die anti-CD40 hIgG2 Antikörper eine, von der Fukosylierung der Antikörper unabhängige, gesteigerte CD25-Expression festgestellt (Abbildung 24c). Anders als für CD8+ T-Zellen konnte unabhängig vom eingesetzten Antikörper kein Unterschied bei der CD25-Expression auf CD4+ T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 24b). Da DCs nach Behandlung mit anti-CD40 hIgG1 mAks eine höhere PD-L1 Expression zeigten, wurde weiterhin getestet, ob die Zugabe des anti-PD-1 Antikörpers Nivolumab die T-Zell-Stimulation zusätzlich steigern kann. Wie in Abbildung 24c dargestellt, führte die Zugabe von Nivolumab zu beiden hIgG1-Varianten, nicht aber zu den hIgG2-Varianten, zu einer erhöhten CD25 Expression auf CD8+ T-Zellen.



**Abbildung 24: T-Zell-Aktivierung durch anti-CD40 mAbs in allogenen MLRs.** GM-CSF/IL-4-differenzierte mo-DCs wurden mit allogenen T-Zellen (1:10) und 1 µg/ml anti-CD40 mAk für fünf Tage behandelt, um im Anschluss die T-Zellaktivierung zu analysieren. Die Expression von CD25 auf CD8+ (a, n = 11) und CD4+ T-Zellen (b, n = 9) nach Stimulation verschiedener DC: T-Zell-Spender-Kombinationen mit den IgG1 Glykosylierungs-varianten ist abgebildet. Dabei repräsentiert jeder Datenpunkt den [M] des %-Anteils CD8+CD25+ oder des %-Anteils CD4+CD25+ T-Zellen von technischen Duplikaten und Daten eines Experimentes sind durch Linien verbunden. (c) Einfluss der Kombination aus 1 µg/ml anti-CD40 ±10 µg/ml Nivolumab auf die Regulation von CD25 auf CD8+ T-Zellen. Dargestellt sind die [M] des %-Anteils CD8+CD25+ T-Zellen +SEM aus Duplikaten mit drei verschiedenen DC: T-Zell-Spender-Kombinationen (n = 3; T-Zell-Spender für 1 und 3 sind identisch). Werte der Experimente aus (c) sind auch in (a-b) enthalten und wurden mit 1-3, für Spender 1-3, gekennzeichnet. Statistik: (b) One-Way ANOVA mit angeschlossenem Bonferroni post-hoc Test wurde durchgeführt.

Zusammenfassend zeigte sich eine verstärkte Reifung von DCs durch die anti-CD40 hIgG1 Varianten, welche v. A. für den defukosylierten anti-CD40 hIgG1-GO auch zu einer verstärkten T-Zell-Aktivierung führt. Außerdem zeigten die hIgG1 Varianten in ersten Experimenten ein größeres Potential bei der Kombination mit dem anti-PD-1 mAk Nivolumab.

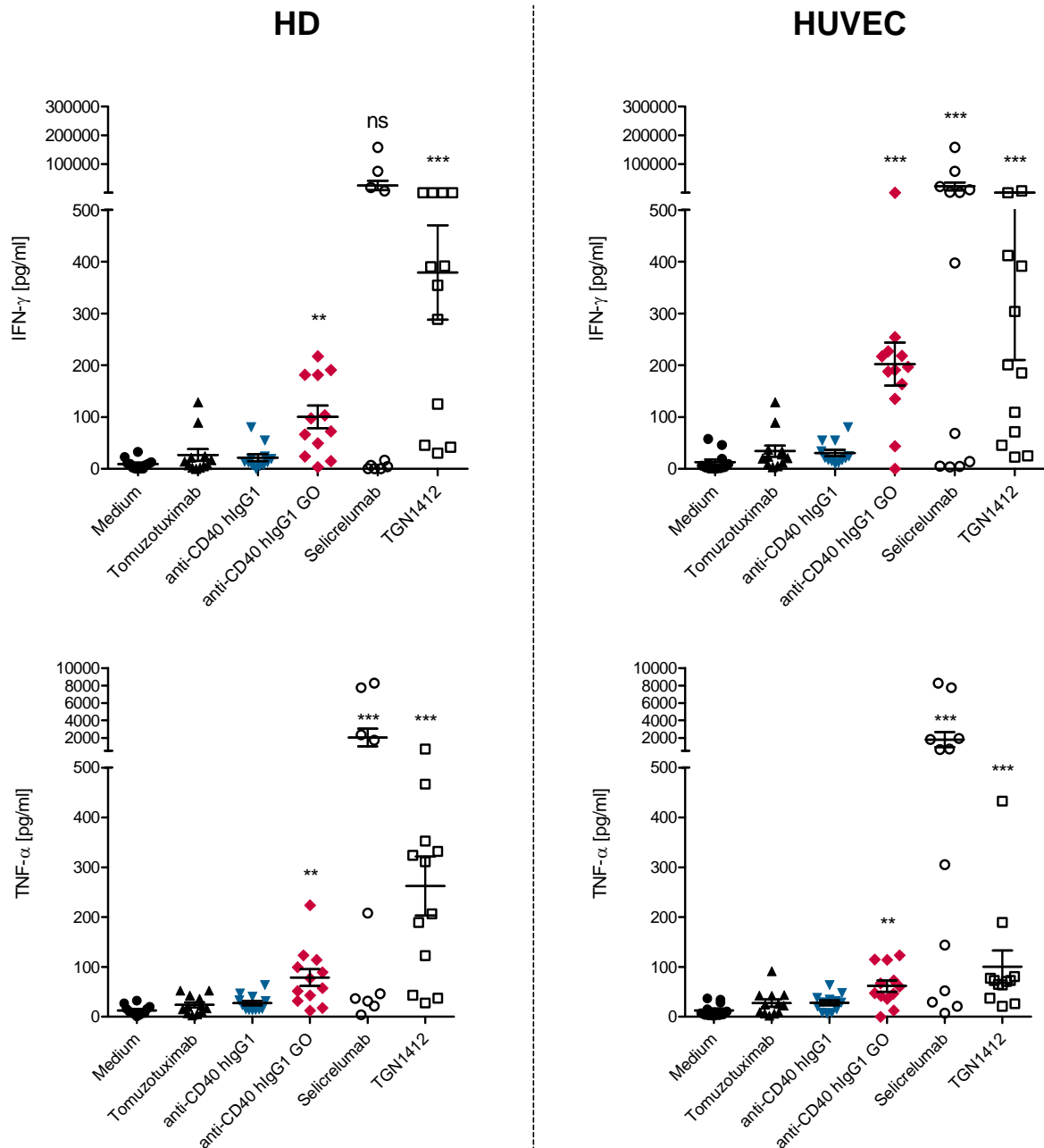
### 5.2.5 Zytokin-Freisetzung und ADCC gegen Immunzellen

Der therapeutische Einsatz von immunstimulierenden Antikörpern birgt die Gefahren eines starken Zytokinsturms und darüber hinaus, speziell für glyko-optimierte Antikörper mit dem IgG1 Isotyp, die unerwünschte ADCC gegen CD40-positive Immunzellen. Im folgenden Abschnitt sind Experimente zur Abschätzung der Gefahr durch das Auftreten eines Zytokinsturms sowie die Lyse von CD40-positiven Immunzellen dargestellt.

#### 5.2.5.1 Zytokin-Freisetzung durch anti-CD40 hIgG1 Antikörper

Die übermäßige Freisetzung von Zytokinen kann für Patienten dramatische Folgen haben und die Anwendbarkeit einer Therapie mit agonistischen Antikörpern stark limitieren. Die Gefahr des Zytokinsturms durch die anti-CD40 hIgG1 Antikörper wurde mittels zweier unterschiedlicher Testsysteme *in vitro* getestet. Die Verwendung von PBMCs, welche vorher in einer hohen Dichte kultiviert wurden (engl. *high-density-culture*, HD) oder die Ko-Kultivierung von PBMCs mit Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) sind etablierte Methoden zur Detektion eines Zytokin-Freisetzung-Syndroms (engl. *cytokine release syndrome*, CRS), welche mit klinischen Erfahrungen verschiedener mAbs korrelieren [134]. Da ein gewisser Grad an Zytokinausschüttung zu den Effektorfunktionen der anti-CD40 Antikörper gehört, wurden zur Einschätzung der Verträglichkeit der anti-EGFR Tomuzotuximab, der anti-CD40 IgG2 Selicrelumab und der anti-CD28 IgG4 TGN1412 als Kontrollantikörper mitgeführt, für welche es bereits klinische Erfahrungen zum Auftreten eines CRS gibt.

Nach Stimulation einer Immunantwort in der HD- oder HUVEC-Kultur erfolgte die Messung der Freisetzung von IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  mittels eines Multiplex Assay Kits (MSD), welches die gleichzeitige Quantifizierung verschiedener Zytokine aus einer Probe erlaubt. In Abbildung 25, sowie in Tabelle 20 und Tabelle 21 ist die Zytokinfreisetzung durch verschiedene Antikörper in pg/ml zusammengefasst. Beide Systeme zum Nachweis eines möglichen CRS führten zu vergleichbaren Resultaten und zeigten eine deutliche Sekretion aller getesteten Zytokine durch die beiden Positivkontrollen Selicrelumab und TGN1412, wohingegen der klinisch gut händelbare Tomuzotuximab unter diesen Bedingungen keine Auffälligkeiten zeigte. Passend zur erwarteten verstärkten Aktivierung Fc $\gamma$ RIIIa positiver Immunzellen durch den defukosylierten anti-CD40 hIgG1-GO, führte dieser zur leichten Steigerung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , blieb dabei allerdings weit unter den Effekten der kritischen Positivkontrollen. Im Gegensatz dazu induzierte der stark-fukosylierte anti-CD40 hIgG1 keine gesteigerte Zytokinproduktion, was die schwächeren Effektorfunktionen in den vorangegangenen Experimenten begründen könnte. Für die Zytokine IL-2, IL-6, IL-8 und IL-10 konnte kein Einfluss der anti-CD40 hIgG1 Antikörper festgestellt werden.



**Abbildung 25: Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in HD- oder HUVEC-Kulturen nach Antikörperstimulation.** IFN- $\gamma$ - (oben) TNF- $\alpha$ -Freisetzung (unten) durch PBMCs aus HD-Kultur-Ansätzen (links) oder aus HUVEC-Ko-Kulturen (rechts) nach  $\bar{u}$ . N. Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml der angegebenen Antikörper. Dargestellt ist der [M] der Zytokinkonzentration  $\pm$ SEM aus Stimulationen mit elf PBMC-Spendern aus HD-Kulturen (n = 12; ein Spender wurde zweifach getestet) und zehn PBMC-Spendern aus HUVEC-Ko-Kulturen (n = 12; zwei Spender wurden zweifach getestet). Die praktische Durchführung der zugrunde liegenden Experimente wurde durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH übernommen. Statistik: Kruskal-Wallis Tests mit angeschlossenenm Dunnett's multiplem Vergleichstest wurden verwendet, um Unterschiede zur Mediumkontrolle zu berechnen.

**Tabelle 20: Antikörper-vermittelte Zytokinausschüttung durch PBMCs aus der HD-Kultivierung.**

	Medium		Tomuzotuximab		anti-CD40 hlgG1		anti-CD40 hlgG1 GO		Selicrelumab		TGN1412												
	[M]	95% CI	n	[M]	95% CI	n	sign.	[M]	95% CI	n	sign.	[M]	95% CI	n	sign.								
IL-2	12	2	12	12	2	12	ns	17	2	12	ns	44	13	10	ns	119	15	12	***				
IL-6	93	29	12	96	30	12	ns	115	37	12	ns	2794	814	10	*	590	146	12	*				
IL-8	8329	1792	9	8417	1933	9	ns	9395	1410	9	ns	12992	1414	9	ns	26810	5190	7	**	19032	2252	9	ns
IL-10	1	0	12	1	0	12	ns	1	0	12	ns	26	12	10	ns	26	12	10	ns	10	1	12	***
TNF $\alpha$	13	2	12	24	3	12	ns	27	3	12	ns	79	10	12	**	2045	674	10	***	262	35	12	***
IFN $\gamma$	9	2	12	27	7	12	ns	22	4	12	ns	100	13	12	**	25706	10804	12	ns	379	55	12	***

Der [M] freigesetzter Zytokine ist in pg/ml angegeben. Statistik: Kruskal-Wallis Tests mit angeschlossenenem Dunnett's multiplem Vergleichstest (für IL-8 Bonferroni\* multipler Vergleichstest) wurden verwendet, um Unterschiede zur Mediumkontrolle zu berechnen. 95% CI =  $\pm$  von [M]; sign.= Signifikanz.

**Tabelle 21: Antikörper-vermittelte Zytokinausschüttung durch PBMCs aus der HUVEC-Kultivierung.**

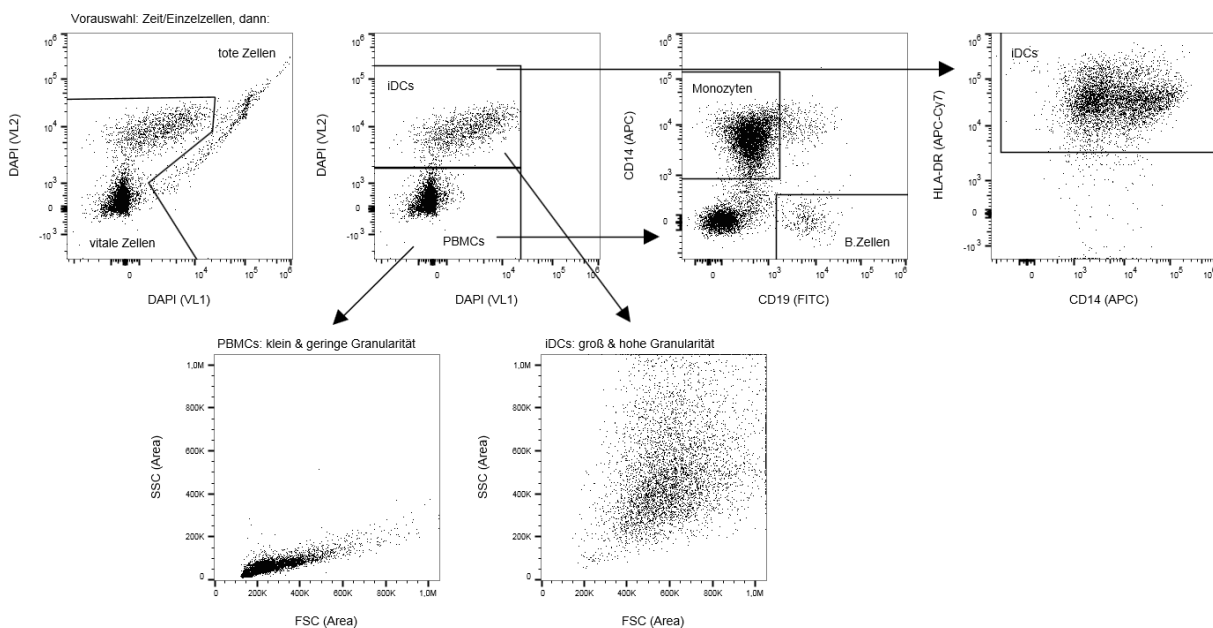
	Medium		Tomuzotuximab		anti-CD40 hlgG1		anti-CD40 hlgG1 GO		Selicrelumab		TGN1412												
	[M]	95% CI	n	[M]	95% CI	n	sign.	[M]	95% CI	n	sign.	[M]	95% CI	n	sign.								
IL-2	7	1	12	10	2	12	ns	10	2	12	ns	43	10	12	*	99	11	12	***				
IL-6	152	33	12	655	224	12	ns	304	59	12	ns	6097	793	12	***	2028	321	12	**				
IL-8	6737	1346	7	13402	4079	7	ns	11475	1268	7	ns	13518	3027	7	ns	24264	5897	7	ns	43793	18486	7	*
IL-10	0	0	12	0	0	12	ns	0	0	12	ns	24	9	12	**	24	9	12	**	8	1	12	***
TNF $\alpha$	13	2	12	27	4	12	ns	28	3	12	ns	62	7	12	**	1808	514	12	***	101	20	12	***
IFN $\gamma$	13	3	12	34	6	12	ns	30	4	12	ns	202	25	12	***	22574	8271	12	***	745	320	12	***

Der [M] freigesetzter Zytokine ist in pg/ml angegeben. Statistik: Kruskal-Wallis Tests mit angeschlossenenem Dunnett's multiplem Vergleichstest wurden verwendet, um Unterschiede zur Mediumkontrolle zu berechnen. 95% CI =  $\pm$  von [M]; sign.= Signifikanz.



### 5.2.5.2 ADCC Experimente gegen autologe Immunzellen

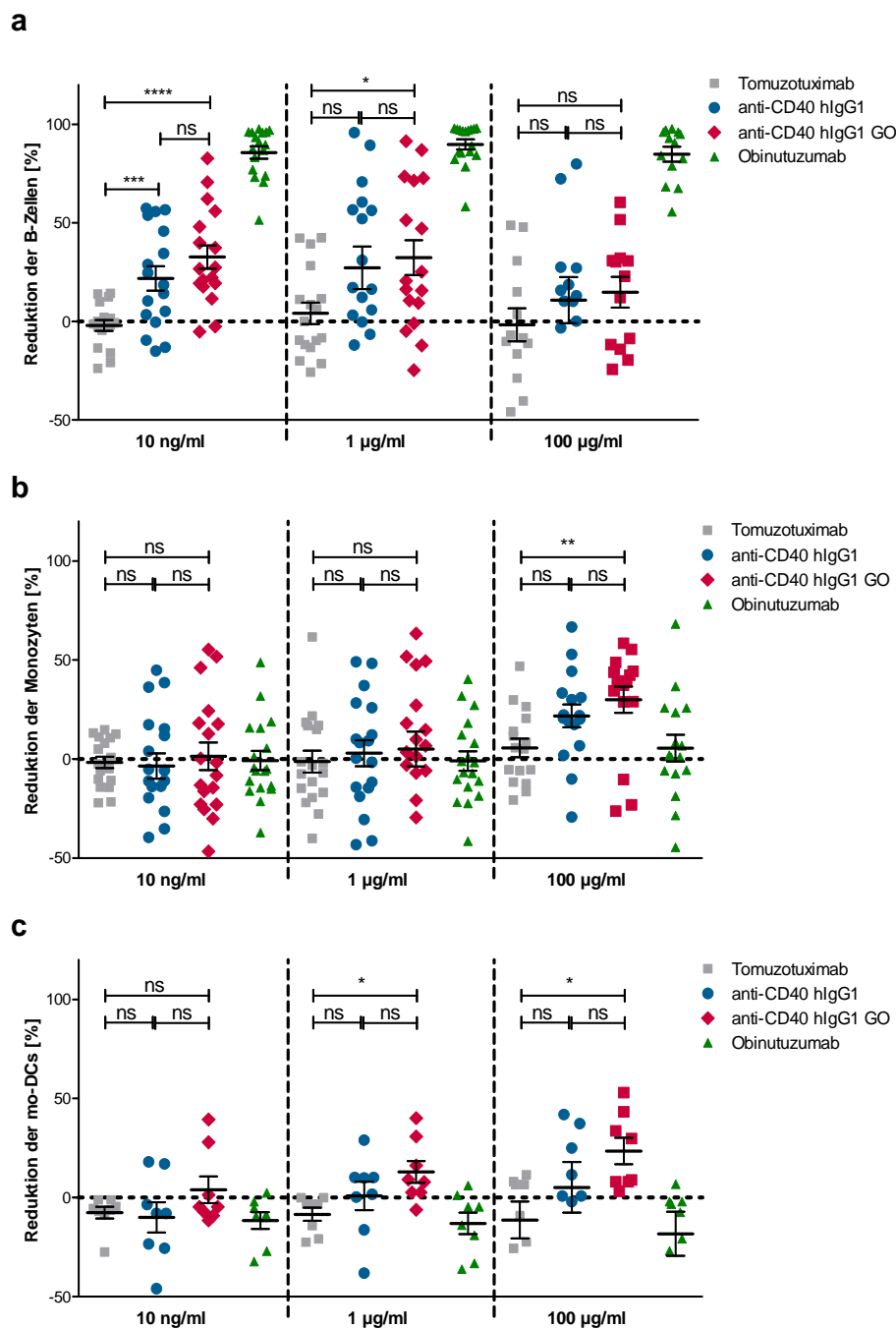
Zusätzlich zu der wünschenswerten Effektorfunktion der ADCC gegen CD40-positive Tumorzellen könnten durch die anti-CD40 hIgG1 Antikörper CD40-positive Immunzellen depletiert werden. Da sie die stärkste CD40-Expression zeigen, wurden FACS-basierte ADCC-Experimente gegen tote autologe B-Zellen, Monozyten und mo-DCs durchgeführt. Dafür wurden die Immunzellen für 24 h mit hohen anti-CD40 hIgG1 Konzentrationen behandelt, um anschließend deren absolute Zellzahlen durchflusszytometrisch zu bestimmen. Die Auswahlstrategie zur Quantifizierung von B-Zellen, Monozyten und DCs ist in Abbildung 26 gezeigt.



**Abbildung 26: Gating-Strategie zur Detektion der absoluten Anzahl verschiedener Immunzell-populationen.** Eine repräsentative Gating-Hierarchie zur Unterscheidung von vitalen B-Zellen (CD19+), Monozyten (CD14+) und mo-DCs (hohe Autofluoreszenz und CD11c+HLA-DR+, iDCs) ist dargestellt (Behandlung = Mediumkontrolle). (1) Auswahl DAPI negativer Zellen, (2) Abgrenzung von mo-DCs über hohe Autofluoreszenz, (3a) Definition von mo-DCs als CD14+HLA-DR+ Zellen, (3b) Aufteilung der PBMCs in CD19+ B-Zellen und CD14+ Monozyten.

Als Positivkontrolle wurde die Reduktion von B-Zellen durch den B-Zell-depletierenden anti-CD20 Antikörper Obinutuzumab [135] mitgeführt (Abbildung 27a). Obinutuzumab führte in den meisten Experimenten ab einer Konzentration von 10 ng/ml zu einer nahezu vollständigen B-Zell-Depletion ( $p < 0,0001$  im Vergleich zu Tomuzotuximab). Im Gegensatz dazu, zeigte Tomuzotuximab, welcher als Isotypkontrolle eines defukosylierten mAKs mit irrelevanter Spezifität mitgeführt wurde, im Mittel von 17 getesteten Spender keinen Einfluss auf die B-Zell-Anzahl. Beide Varianten des anti-CD40 IgG1 mAKs führten zu einer Reduktion der B-Zellen. Vor allem bei geringer Antikörperkonzentration ließ sich zusätzlich eine minimal höhere Zytotoxizität durch den defukosylierten anti-CD40 hIgG1-GO nachweisen, welche aber keine

statistische Signifikanz erreichte. Beide anti-CD40 Antikörper zeigten allerdings deutlich geringere Effekte, als Obinutuzumab (Abbildung 27a).



**Abbildung 27: Autologer Immunzell-ADCC durch anti-CD40 hIgG1 Antikörper.** PBMCs ±mo-DC (5:1) wurden für 24 h mit den anti-CD40 IgG1 mAKs inkubiert, um ihren Einfluss auf die Anzahl verschiedener Immunzellpopulationen durchflusszytometrisch zu bestimmen. Der anti-EGFR mAK Tomuzotuximab diente als defukosylierte Negativkontrolle und der anti-CD20 mAK Obinutuzumab als Positivkontrolle der Depletion von B-Zellen. Im Vergleich zur Mediumkontrolle wurde die Reduktion der absoluten Anzahl vitaler (a) B-Zellen (n = 17 Spender), (b) Monozyten (n = 18 Spender) und (c) unreifer mo-DCs (n = 8 Spender) bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den [M] der prozentualen Reduktion im Vergleich zur Mediumkontrolle aus technischen Triplikaten. Zusätzlich dazu ist der [M] ±SEM der unterschiedlichen Behandlungsgruppen dargestellt. Statistik: One-Way ANOVA mit angeschlossenen Bonferroni post-hoc Tests wurden durchgeführt, um Behandlungsgruppen zu vergleichen.

Monozyten (Abbildung 27b) und mo-DCs (Abbildung 27c) exprimieren weder den EGFR noch CD20, weshalb Tomuzotuximab und Obinutuzumab keinen Einfluss auf die Anzahl beider Zellpopulation zeigten. Auch die beiden anti-CD40 hIgG1-Varianten zeigten bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml keine einheitliche Lyse von Monozyten, wobei die Monozyten-Anzahl bei einigen Spendern doch recht stark reduziert wurde. Erst bei einer sehr hohen Konzentration von 100 µg/ml anti-CD40 hIgG1/hIgG1-GO konnte eine Abnahme beider Zellpopulationen festgestellt werden, welche nur durch den hIgG1-GO statistisch signifikant wurde. Vergleichbare Effekte konnten gegen mo-DCs bereits ab 1 µg/ml der Antikörper beobachtet werden. Im Vergleich zur Reduktion von B-Zellen sind die Effekte auf Monozyten und DCs allerdings minimal. Die statistischen Auswertungen zum Effekt der getesteten Antikörper auf die Reduktion von B-Zellen, Monozyten und mo-DCs sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

**Tabelle 22: Zusammenfassung des Einflusses der anti-CD40 hIgG1 mAks auf die Anzahl von B-Zellen, Monozyten und iDCs.**

Target	c	Vergleiche	n	[M <sub>1</sub> ]	[M <sub>2</sub> ] ±σ	[M <sub>2</sub> ] -[M <sub>1</sub> ]	95 % CI
<i>B-Zellen</i>	10 ng/ml	Tom. vs. IgG1-GO	17	-2,2	32,6	34,7	[24,9 - 44,5]
		IgG1 vs. IgG1-GO	17	21,8	32,6	10,9	[3,7 - 18,0]
	1 µg/ml	Tom. vs. IgG1-GO	17	4,4	32,4	28,3	[11,4 - 45,2]
		IgG1 vs. IgG1-GO	17	27,2	32,4	5,2	[-4,4 - 14,8]
	100 µg/ml	Tom. vs. IgG1-GO	13	-1,7	14,8	16,5	[2,8 - 30,3]
		IgG1 vs. IgG1-GO	13	10,8	14,8	4,0	[-9,9 - 18,0]
<i>Monozyten</i>	10 ng/ml	Tom. vs. IgG1-GO	18	-1,7	1,4	2,3	[-8,9 - 13,6]
		IgG1 vs. IgG1-GO	18	-3,6	1,4	4,6	[-2,7 - 11,8]
	1 µg/ml	Tom. vs. IgG1-GO	18	-1,2	5,1	6,0	[-10,5 - 22,5]
		IgG1 vs. IgG1-GO	18	2,9	5,1	1,4	[-10,0 - 12,8]
	100 µg/ml	Tom. vs. IgG1-GO	16	5,7	30,0	24,3	[11,4 - 37,2]
		IgG1 vs. IgG1-GO	16	21,8	30,0	8,2	[-4,7 - 21,0]
<i>iDCs</i>	10 ng/ml	Tom. vs. IgG1-GO	8	-7,6	4,0	11,6	[-1,5 - 24,6]
		IgG1 vs. IgG1-GO	8	-10,0	4,0	13,9	[6,5 - 21,3]
	1 µg/ml	Tom. vs. IgG1-GO	8	-8,4	12,9	21,4	[8,3 - 34,5]
		IgG1 vs. IgG1-GO	8	0,8	12,9	12,1	[-0,9 - 25,1]
	100 µg/ml	Tom. vs. IgG1-GO	8	-11,3	23,5	34,8	[13,3 - 56,4]
		IgG1 vs. IgG1-GO	8	5,1	23,5	18,3	[-0,3 - 36,9]

Mittelwerte [M] und Mittelwertdifferenzen ([M<sub>2</sub>] -[M<sub>1</sub>]) sind als prozentuale Abnahme der jeweiligen Zellpopulation im Vergleich zur Mediumkontrolle dargestellt.

Zusammengefasst führte der anti-CD40 hIgG1-GO zu einer leicht erhöhten Freisetzung von TNF-α und IFN-γ in CRS Experimenten, blieb dabei aber deutlich unter kritischen Kontrollantikörpern. Beide anti-CD40 hIgG1 Varianten führen aufgrund der recht hohen Expression von CD40 zur Reduktion von B-Zellen und bei hohen Konzentrationen zur leichten Abnahme von Monozyten und DCs.

## 6 Diskussion

### 6.1 Tomuzotuximab als Partner für Kombinationstherapien

#### 6.1.1 Beeinflussung der Immunzellen und Tumormikroumgebung durch IgG1 Antikörper

In aktuellen Studien (Zusammengefasst in Abbildung 3) konnte gezeigt werden, dass die Effektorfunktionen des anti-EGFR mAbs Cetuximab nicht auf die reine Blockade des Rezeptors begrenzt sind, sondern die Aktivierung einer antitumor Immunantwort über die Interaktion des Antikörper-Fc-Anteils mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren, exprimiert auf Immunzellen, von entscheidender Bedeutung ist. Bisherige Studien zur Beteiligung des Immunsystems fokussierten sich vor allem auf die stimulierenden Effekte von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern des Isotyps IgG1 auf NK-Zellen, da diese den relevanten Fc $\gamma$ RIIIa exprimieren. So hängt das progressionsfreie Überleben von CRC Patienten nach Behandlung mit Cetuximab mit der Anzahl tumorinfiltrierender NK-Zellen zusammen [136] und korreliert in einigen Studien mit dem Fc $\gamma$ RIIIa Allotyp der Patienten [16-18]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Testung der basalen NK-Zell-Aktivierung durch Cetuximab ein positives Ansprechen von HNC und CRC Patienten auf die Antikörpertherapie vorhersagen kann [18, 57, 137]. Die Aktivierung von NK-Zellen wird durch ein Gleichgewicht stimulierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Tumor-infiltrierende NK-Zellen sind einer Vielzahl immunsupprimierender Faktoren ausgesetzt (z. B. TGF- $\beta$ ), welche die Expression aktivierender Rezeptoren reduzieren (z. B. NKG2D, NKp46, NKp30, DNAM-1) und inhibierender Rezeptoren (z. B. NKG2A, PD-1) erhöhen, was zur Anergie der NK-Zellen führen kann [138]. Ein möglicher Ansatzpunkt diese aufzuheben ist es die Expression ko-stimulierender Rezeptoren zu steigern [139, 140]. CD137 ist ein ko-stimulierender TNFR, welcher auf einer Vielzahl hämatopoetischer, aktivierter Zellen transient exprimiert ist (z. B. CD4 und CD8 T-Zellen, NK-Zellen, DCs) und dessen Signalweg die antitumor Zytotoxizität, sowie das Überleben und Proliferation dieser Immunzellen verstärken kann [99]. Die Aktivierung von NK-Zellen über Zytokine [141] oder die Stimulation des Fc $\gamma$ RIIIa führt zur Hochregulation von CD137 [24, 127, 128, 142, 143]. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass der anti-EGFR IgG1 Antikörper Cetuximab *in vitro* und auf zirkulierenden und intratumoralen NK-Zellen von HNC und CRC Patienten zur Hochregulation von CD137 führt, wobei die stärksten Effekte bei Patienten beobachtet wurden, die mindestens ein Allel des hoch-affinen Fc $\gamma$ RIIIa-158-V trugen [127, 128]. Misumi und Kollegen demonstrierten, dass der Antikörper-Isotyp und dessen Affinität zum Fc $\gamma$ RIIIa für eine effektive

CD137 Induktion entscheidend ist. Am Beispiel von Trastuzumab zeigten sie ebenfalls, dass dieser CD137 bei Spendern, welche wenigstens ein Allel des hoch-affinen Fc $\gamma$ RIIIa tragen wesentlich stärker induziert [143]. Die Zulassung eines anti-EGFR Antikörpers mit dem Isotypen IgG2, Panitumumab, welcher trotz unterschiedlichem Fab-Teil vergleichbare Fab-vermittelte Effekte auslöst, aber wesentlich schwächer an den Fc $\gamma$ RIIIa bindet, erlaubt den direkten Isotyp-Vergleich zu Cetuximab. So vermittelt Panitumumab nahezu keine ADCC [144], oder gesteigerte CD137 Expression auf NK-Zellen [145], was in Studien mit HNC Patienten eventuell das bessere Abschneiden von Cetuximab erklären könnte [20]. Studien von Lin et al. mit immobilisierten Antikörpern zeigten, dass die Stärke der Induktion von CD137, vergleichbar zur Vermittlung der ADCC und der Aktivierung von NK-Zellen, durch die Reduktion der Fc-Fukosylierung gesteigert werden kann [142]. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass der defukosylierte anti-EGFR mAk Tomuzotuximab im Vergleich zu Cetuximab zu einer stärkeren Induktion von CD137 auf einer Fc $\gamma$ RIIIa transfizierten NK-Zelllinie und primären NK-Zellen von gesunden Spendern führt. Da der IgG4 mAk Pembrolizumab im Vergleich zu Tomuzotuximab CD137 auf NK-Zellen nicht induzierte und nur die Blockade des Fc $\gamma$ RIIIa die CD137 Induktion durch Tomuzotuximab reduzierte (Daten nicht gezeigt), konnte die Bedeutung der Interaktion des Antikörpers mit dem Fc $\gamma$ RIIIa auf NK-Zellen weiter herausgearbeitet werden. Wie bereits durch Srivastava et al. [127] beschrieben, führte Cetuximab in Experimenten der vorgelegten Doktorarbeit nur bei Spendern mit den Fc $\gamma$ RIIIa-Genotypen -158-F/V und -158-V/V zur NK-Zell-Aktivierung. Im Gegenteil dazu führte die höhere Rezeptor-Affinität von Tomuzotuximab auch bei Spendern mit dem gering-affinen -158-F/F Allotypen zur Steigerung von CD137. Diese Beobachtungen decken sich mit den bereits bekannten Ergebnissen der gesteigerten quantitativen (Höhe der Lyse) und qualitativen (Anzahl getöteter Tumorzellen durch eine NK-Zelle) ADCC durch defukosylierte Antikörper [44, 45, 146, 147].

Im Gegensatz zu Fab-vermittelten Effekten von Cetuximab, korreliert die Fc-vermittelte ADCC mit einer stärkeren Antigenexpression [148, 149]. Vergleichbar dazu zeigte sich, dass die Stärke der CD137 Induktion durch Cetuximab und Tomuzotuximab von der EGFR-Dichte auf den Tumorzellen abhängt, wobei Tomuzotuximab auch bei relativ schwach-exprimierenden Zellen, aber nicht bei Abwesenheit von EGFR-positiven Zellen, zur effektiven Hochregulation führte. Ähnliche Beobachtungen beschrieben Gerdes et al. bei der Analyse der ADCC des glyko-optimierten anti-EGFR GA201 [45]. Makkouk und Kollegen konnten zeigen, dass neben Cetuximab (HNC) auch die Therapien mit Trastuzumab (Brustkrebs) und Rituximab (Non-

Hodgkin-Lymphom, beide IgG1) zum Anstieg der CD137 Expression auf NK-Zellen führen [150]. Für diese drei Antikörper konnten sie nachweisen, dass der FcγRIIIa Polymorphismus der wichtigste Prädiktor für die CD137 Expressionsstärke nach Antikörpergabe war, was darauf hindeutet, dass dieser Effekt durch Defukosylierung gesteigert werden könnte. Deshalb wurde in dieser Doktorarbeit getestet, ob sich die stärkere CD137 Hochregulation durch den defukosylierten mAk Tomuzotuximab auch auf weitere Antikörper übertragen lässt. Durch den Vergleich von stark- und niedrig-fukosylierten Antikörpern gegen PD-L1, HER2/neu, CD20 und CD40 (und EGFR) konnte eine gesteigerte CD137 Induktion durch defukosylierte Antikörper gegen verschiedene Antigene demonstriert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die verbesserte Regulation von CD137, vergleichbar zu beobachteten Effekten der ADCC, einen allgemeinen Effekt defukosylierter Antikörper darstellt und sich auf Antikörper beliebiger Spezifität übertragen lässt. Da gezeigt werden konnte, dass eine stärkere Expression von CD137 auf tumorinfiltrierenden NK-Zellen nach Cetuximab Therapie mit der Ansprechrate von Patienten mit HNC in Verbindung steht [127], wäre eine Analyse der CD137 Expression auf Immunzellen von Patienten nach Behandlung mit defukosylierten Antikörpern von großem Interesse.

In umfangreichen Genexpressionsanalysen in 25 unterschiedlichen Krebsarten zeigten Gentles et al., dass der größte Anteil tumorinfiltrierender Immunzellen aus myeloiden Zellen besteht (z. B. Monozyten, Makrophagen, DCs) [151]. Im Falle von HNC ist bereits bekannt, dass diese vor allem immunsuppressive Monozyten, M2 Makrophagen und myeloide Suppressorzellen rekrutieren oder induzieren, wodurch die antitumor Immunität, z. B. durch Effektor-T-Zellen, abgeschwächt wird [59, 152, 153]. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung des insulinähnlichen Wachstumsfaktors-1 (IGF-1) durch EGFR-exprimierende Tumorzellen einen immunsuppressiven Makrophagen-Phänotypen induziert. Durch die Blockade des EGFR durch Cetuximab [154] und über die Interaktion des Fc-Anteils von Cetuximab mit Monozyten [22, 25] konnte die Polarisation von antitumor-reaktiven M1 zu suppressiven M2 Makrophagen verhindert und so das Tumorwachstum reduziert werden. Im Gegensatz zur ausbleibenden Aktivierung von NK-Zellen, kann auch Panitumumab, über die Interaktion mit dem FcγRII, zur zytotoxischen Aktivierung und Differenzierung von Monozyten beitragen [25, 144]. Da myeloide Zellen in gewissen Anteilen aber auch den aktivierenden FcγRIIIa exprimieren, führte die Fc-Optimierung von Tomuzotuximab in Ko-Kulturen aus PBMCs und HNC oder CRC Zelllinien zu einer, im Vergleich zu Cetuximab, verbesserten Differenzierung (CD14↓) und zur verstärkten Expression ko-stimulierender Moleküle (CD80) sowie

stimulatorischer (CD40) und inhibitorischer (PD-L1) Checkpoint-Moleküle auf Monozyten. Neben der direkten Stimulation von Monozyten können diese Effekte auch durch die Freisetzung von Zytokinen durch andere Fc $\gamma$ RIIIa exprimierende Immunzellen (z. B. NK-Zellen) begründet werden. Die in den durchgeführten Analysen verwendeten Spender zeigten eine natürlich-vorkommende Verteilung der Fc $\gamma$ RIIIa Genotypen, weshalb eine künstliche Verzerrung der Ergebnisse ausgeschlossen werden kann. Beobachtungen für den glyko-optimierten anti-EGFR GA201, welcher verstärkte Effektorfunktionen von Makrophagen im Vergleich zu Cetuximab [155] und eine deutliche Infiltration CD68-positiver Makrophagen in Tumore von CRC Patienten zeigte [50], unterstützen die Ergebnisse für Tomuzotuximab.

Dendritische Zellen sind durch die Präsentation von Antigenen das wichtigste Bindeglied zwischen Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und somit an der Aktivierung spezifischer T-Zell-Antworten beteiligt. In Studien wurde nachgewiesen, dass Patienten mit diversen Tumorerkrankungen (u. A. HNC, Lungen-, Magen-, Brustkrebs) mit einer hohen Anzahl funktionstüchtiger DCs eine bessere Prognose zeigen [156]. Verschiedene Faktoren der Tumormikroumgebung führen allerdings zur Generierung schlecht gereifter DC mit einer verringerten Expression ko-stimulierender Moleküle [157] und Molekülen, welche an der Antigenprozessierung beteiligt sind [158, 159] und für eine effektive T-Zell-Stimulation benötigt würden [160]. Durch Untersuchungen der letzten Jahre rückt die Bedeutung der Aktivierung adaptiver Immunantworten durch IgG1 Antikörper wie Cetuximab immer mehr in den Mittelpunkt [24-26, 145, 161]. Dabei spielt die Fc-Fc $\gamma$ RIIIa vermittelte Zytokinfreisetzung, die ADCC und die damit verbundenen Freisetzung tumorspezifischer Antigene bei der Antigen-spezifischen T-Zell-Stimulation eine entscheidende Rolle, weshalb Panitumumab, welcher NK-Zellen nicht aktiviert keinen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen zeigte [145, 162]. Übereinstimmend mit dem kürzlich veröffentlichten Vergleich zweier unterschiedlich stark Fc-fukosylierter anti-PD-L1 Antikörper [96], führte auch Tomuzotuximab, im Vergleich zu Cetuximab, zu einer leicht gesteigerten Reifung von mo-DCs (CD80, CD86 $\uparrow$ ). In Experimenten dieser Doktorarbeit resultierte die Zugabe von NK-Zellen in einer stärkeren Hochregulation beider Marker als ohne NK-Zellen. Studien zeigten, dass lösliche Faktoren wie IFN- $\gamma$ , aber auch TNF- $\alpha$ , die entscheidenden Zytokine für die Reifung von mo-DCs und die Hochregulation von Komponenten der Antigenprozessierung sind, welche zur der Generierung zytotoxischer T-Zell-Antworten führen [24, 158, 163, 164]. Da Tomuzotuximab *in vitro* zur stärkeren Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  führt und Patienten nach Behandlung mit Tomuzotuximab unter Anderem

erhöhte TNF- $\alpha$  Werte zeigten [44], kann angenommen werden, dass Tomuzotuximab auch im Patienten zur verbesserten DC-Reifung beitragen kann.

Die Stimulation einer T-Zell-vermittelten Immunantwort ist das Ziel vieler derzeit zugelassener Immuntherapien (z. B. Zytokine, anti-CTLA-4, anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörper). In HNC Patienten konnten bereits Korrelationen zwischen der Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen und klinischer Ansprechrate nach Therapie mit Cetuximab beobachtet werden [165]. Um die stimulierenden Eigenschaften der generierten DCs nach Cetuximab- oder Tomuzotuximab-Behandlung zu testen, wurden MLRs mit allogenen T-Zellen durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Tomuzotuximab-gereifte mo-DCs, im Vergleich zu Cetuximab-gereiften mo-DCs, wesentlich bessere Stimulatorzellen für die Initiierung einer CD8-spezifischen T-Zell-Aktivierung sind (CD25, CD137 $\uparrow$ ). Obgleich Jie et al. [21] auch Effekte von Cetuximab auf tumorinfiltrierende CD4 T-Zellen von HNC Patienten beschreiben, passt das Ergebnis der bevorzugten Aktivierung CD8 positiver T-Zellen zu Beobachtungen aus *in vitro* Analysen mit PBMCs von CRC Patienten [128]. Ein möglicher Grund für die ausbleibende Aktivierung von CD4+ T-Zellen könnte in deren Expression des EGFRs liegen. Murine und humane CD4+ T-Zellen können den EGFR exprimieren, wobei dessen Stimulation an der Aktivierung (u. A. CD25 Expression), Zytokinfreisetzung und Proliferation beteiligt ist [166, 167]. Verschiedene Studien zeigten außerdem, dass die Internalisierung von Antigen-IgG1 Antikörper-Komplexen (Immunkomplexen) und die damit einhergehende bessere DC-Reifung zur Antigenpräsentation auf MHC-1-Molekülen führt, wodurch eine CD8-spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst wird [161, 168]. Da die Glyko-Optimierung von Tomuzotuximab diesen Prozess durch die höhere Affinität zum Fc $\gamma$ RIIIa verstärken sollte, kann das ein weiterer Grund für die bevorzugte Aktivierung von CD8 positiven T-Zellen sein. Zusätzlich könnten auch direkte Effekte der Defukosylierung auf die Aktivierung Fc $\gamma$ RIIIa-exprimierender T-Zellen auftreten. Ein Beispiel wären unkonventionelle,  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche zwischen 1-10 % der humanen, CD3 positiven T-Zellen ausmachen [169]. ADCC Experimente zeigten, dass die Degranulation und IFN- $\gamma$  Produktion durch IgG1 Antikörper behandelte  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Glyko-Optimierung verstärkt werden kann [170]. Da allerdings weniger als 1 % der  $\gamma\delta$  T-Zellen CD8 exprimieren [171], sollten sie für die Auswertung der Analysen zur Aktivierung CD8 positiver T-Zellen in dieser Doktorarbeit durch die gewählte Auswahlstrategie keine bedeutenden Auswirkungen haben. Neben  $\gamma\delta$  T-Zellen trägt auch ein kleiner Anteil von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen den Fc $\gamma$ RIIIa (0,3-15 % der CD3+ Zellen; zu 89 % CD8+, hauptsächlich CD45RA+CCR7-) und ist in der Lage ADCC zu vermitteln [172]. Kubach und Kollegen zeigten, dass Apera, eine Fc-modifizierte



Variante von Cetuximab mit erhöhter FcγRIIIa Affinität, zu einer verstärkten Aktivierung und Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt [173]. Da diese Zellpopulation auch in den Analysen zum Vergleich von Cetuximab und Tomuzotuximab vertreten sein kann und die durch Apera beschriebenen Effekte FcγRIIIa vermittelt sind, kann ein direkter Einfluss von Tomuzotuximab auf die CD8 T-Zell-Aktivierung an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu Tomuzotuximab zeigte sich durch Cetuximab, trotz deutlich verbesserter mo-DC-Reifung im Vergleich zu unbehandelten mo-DCs, nahezu kein T-Zell-stimulierender Effekt, was neben der unterschiedlichen Potenz beider Antikörper auch an der Quelle und Art der Effektorzellen liegen kann. In vergleichenden Studien zwischen PBMCs von gesunden Spendern mit denen von CRC Patienten wurde gezeigt, dass weder der Aktivierungsmarker CD137 noch der Degranulationsmarker CD107a auf PBMCs gesunder Spender durch die Stimulation mit Cetuximab steigt [128]. Die Generierung einer Antigen-spezifischen Reaktion mit PBMCs von gesunden Spendern durch Cetuximab wurde bisher nur unter Verwendung von Peptid-spezifischen T-Zellen [24] oder einem Protokoll mit mehreren Stimulationsrunden [145] erreicht. In zukünftigen Untersuchungen sollten daher die direkten Einflüsse von Tomuzotuximab auf die Aktivierung von T-Zellen sowie die Unterschiede zwischen Tomuzotuximab und Cetuximab unter Verwendung von Patienten-PBMCs oder generierter Antigen-spezifischer T-Zellen getestet werden. Die klinische Relevanz der Aktivierung adaptiver Immunität durch Cetuximab [24, 25, 127, 128], welcher in Vergleich zu Tomuzotuximab *in vitro* nahezu keinen Effekt zeigte, sowie die starke *in vivo* T-Zell-Aktivierung durch Apera [173], lassen vermuten, dass Tomuzotuximab auch in Patienten zu einer erhöhten T-Zell-Aktivierung führen kann.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Analyse der Aktivierung und Migration von Immunzellen in physiologischeren 3D-Kulturen, da die immunologische Zusammensetzung der Tumormikroumgebung vor allem für Kombinationen mit weiteren Immuntherapien von Bedeutung ist. Die Infiltration von Immunzellen durch anti-EGFR Antikörper kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Einerseits führt die Aktivierung des EGFR auf HNC Zelllinien zur Reduktion der Typ-1 Zytokin-induzierten Produktion der T-Zell-anziehenden Chemokine CCL5, CXCL9 und CXCL10 und kann durch die Blockade mit Cetuximab gesteigert werden [174]. Andererseits wurde am Beispiel von Trastuzumab ebenfalls gezeigt, dass dieser durch die Aktivierung von NK-Zellen unter Anderem zur Freisetzung von IL-8 führt, welches die Migration von naiven und aktivierten T-Zellen fördert [175]. Diese Beobachtungen bestätigten sich in Brustkrebspatienten, wobei erhöhte IL-8 Werte mit dem therapeutischen Ansprechen korrelierten und zur Migration von T-Zellen durch Patientenserum führte [175].

Interessanterweise führte die Gabe von Tomuzotuximab in Patienten mit Krebs im fortgeschrittenen Stadium bereits nach zwei Stunden zu einer deutlich erhöhten IL-8 Serumkonzentration [44]. Um die Effekte von Tomuzotuximab auf die Migration von Immunzellen zu untersuchen, wurden PBMCs mit HSC-4 Sphäroiden Ko-kultiviert und die Infiltration von NK- und T-Zellen bestimmt. Durch IHC und durchflusszytometrische Analysen zeigte sich, dass Tomuzotuximab, aber nicht Cetuximab, zu einem deutlichen Anstieg infiltrierter, CD45 positiver Immunzellen, CD8 positiver Zellen und NK-Zellen führt. Zusätzlich konnte, vergleichbar zu den 2D-Experimenten, eine stärkere Induktion von CD137 auf NK- und T-Zellen durch Tomuzotuximab beobachtet werden. Da beide Antikörper ein identisches Potential zur Antigenbindung und EGFR-Inhibierung aufweisen, zeigt sich hierdurch, dass in dem gewählten Versuchsaufbau Fc-vermittelte Effektorfunktionen (und nicht die reine Blockade des EGFR) für die verbesserte Migration durch Tomuzotuximab verantwortlich sind. In Experimenten mit immobilisiertem Cetuximab oder Tomuzotuximab führten beide Antikörper zur gesteigerten Zytokinsekretion, wobei Tomuzotuximab eine verstärkte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induzierte. Ohta et al. zeigten, dass TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zur Hochregulation der Chemokine IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CXCL20 führen [176], weshalb vermutet werden kann, dass IL-8 auch in den aktuellen *in vitro* Studien bedeutsam sein könnte. Neben der möglicherweise positiven Effekte auf die Immunzellinfiltration führt eine erhöhte intratumorale IL-8 Expression allerdings auch zur verstärkten Proliferation, Metastasierung, Chemoresistenz, Angiogenese und Infiltration immunsupprimierender, myeloider Zellen [177], weshalb dessen Rolle in der antitumor Immunität weiter untersucht werden sollte. In einer kleinen Kohorte mit relativ großen Unterschieden in der basalen Immunzellinfiltration zwischen je 15 HNC Patienten führte der glyko-optimierte anti-EGFR Imgatuzumab (GA201) zu einer tendenziell stärkeren Tumordinfiltration von CD3+ Zellen (700 mg: 12/15, +52,2%) im Vergleich zu Cetuximab (11/15, +47,9%; [51]). Diese Studie zeigt allerdings auch, dass die basale Immunzellinfiltration für die gesteigerte Immunmigration entscheidend ist, da in einer Kohorte mit niedriger basaler Infiltration (1400 mg Imgatuzumab) deutlich reduzierte Effekte beobachtet wurden. Vergleichbar konnte bei der Analyse von CRC Patienten gezeigt werden, dass in deren Metastasen nach Behandlung mit Cetuximab eine deutlich erhöhte Anzahl CD3+ Zellen vorliegt [178, 179]. Auch hier zeigte sich, dass die gesteigerte Immuninfiltration vor allem in Metastasen mit einer hohen, basalen Immuninfiltration sichtbar wurde [179]. Die bereits für Cetuximab und GA201 beschriebene Infiltration myeloider Zellen [50, 161] konnten im Verlauf dieser Doktorarbeit für Tomuzotuximab und Cetuximab mit HSC-4-Sphäroiden bisher nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Nachteile des verwendeten Modells sind, dass es derzeit ausschließlich aus Zellen einer Zelllinie besteht, welche über ihre umgebende extrazelluläre Matrix zusammengehalten werden und die Infiltration von PBMCs gesunder Spender getestet wurde. Welchen Einfluss die Tumervaskularisierung, das umliegende, oftmals immuninhibierende, Tumorstroma oder die Expression immunsupprimierender Moleküle auf Immunzellen ausübt, konnte daher nicht dargestellt werden. Allerdings konnte bereits durch das vergleichsweise einfache 3D-HSC-4-Sphäroidmodell eine Migration von Lymphozyten, vergleichbar zu bisher veröffentlichten, klinischen Erfahrungen mit anderen IgG1 mAbs, nachgewiesen werden. Deshalb sollte das Ziel zukünftiger Untersuchungen zur Immunzellinfiltration nach Tomuzotuximabgabe die Analyse komplexerer Modelle und das Überprüfen der Immunzellmigration in Tumoren behandelter Patienten beinhalten.

### 6.1.2 Kombinationen mit agonistischen Checkpoint-Antikörpern

Basierend auf der starken Hochregulation von CD137 (4-1BB, TNFR9) auf NK- und CD8+ T-Zellen nach Tomuzotuximab-Behandlung, war ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob die ko-Stimulation dieses Rezeptors den ADCC durch anti-EGFR hIgG1 Antikörper verstärken kann. CD137 ist ein Mitglied der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren und kann nach Stimulation die Effektorfunktionen aktivierter NK-Zellen durch die Hochregulation von NKG2D verstärken [180]. Experimentell und therapeutisch existieren bisher zwei Möglichkeiten CD137 auf Effektorzellen zu stimulieren: a) über die Interaktion mit dem natürlichen Liganden CD137L, oder b) die Applikation eines agonistischen anti-CD137 Antikörpers. Beide Herangehensweisen wurden in der vorliegenden Arbeit in der Kombination mit anti-EGFR mAb Stimulation *in vitro* getestet.

Für die Stimulation von CD137 positiven NK-Zellen mit dem natürlichen Liganden konnte bereits gezeigt werden, dass dies die Proliferation, Vitalität, Zytokinausschüttung und die natürliche Zytotoxizität gegen NK-Zell sensitive Tumoren verstärkt [37, 180, 181]. Neben der Expression von CD137L auf antigenpräsentierenden Zellen und einigen aktivierten Lymphozyten, wurde auch dessen Expression auf malignen Tumoren und daraus generierten Zelllinien beschrieben und zeigt dort antitumor aber auch tumorfördernde Effekte [182-184]. Um die Auswirkungen der CD137L Expression von Tumorzellen auf die ADCC durch Cetuximab und Tomuzotuximab zu untersuchen, wurde diese auf verschiedenen Zelllinien getestet. Dabei zeigten die CRC Zelllinien Ls174T und HCT-116 sowie die HNC Zelllinie HSC-4 eine nachweisbare CD137L Expression, wohingegen z. B. CaOV-3 nahezu CD137L negativ waren

(Daten nicht gezeigt). In FACS-basierten ADCC-Experimenten zeigte sich eine deutliche Reduktion des Anteils und der Anzahl CD137L positiver HSC-4 Zellen, wobei kein Einfluss auf den Anteil CD137L negativer Zellen beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung spricht für eine präferierte ADCC gegen CD137L positive Tumorzellen. Dabei schienen die Effekte auf CD137L positive Zellen nach Behandlung mit Tomuzotuximab im Vergleich zu Cetuximab leicht erhöht. Die bevorzugte Lyse CD137L positiver Zellen könnte für das Auftreten einer verbesserten ko-Stimulation über die erhöhte CD137 Expression auf NK-Zellen sprechen. Entsprechend konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von CD137L auf Tumorzellen zur erhöhten Expression zytotoxischer Moleküle (Perforin, Granzym B) auf NK-Zellen und zur IFN- $\gamma$  Sekretion in Ko-Kulturen mit T-Zellen führt [141, 183]. Andererseits führt Tomuzotuximab auch zur effektiven Lyse von Zellen, welche zumindest basal kein CD137L tragen (z. B. CaOV-3, Daten nicht gezeigt), weshalb andere Mechanismen der höheren ADCC-Sensitivität (z. B. Expression des EGFR oder weiterer ko-Stimulatoren) nicht ausgeschlossen werden können. In Folgestudien sollte deshalb getestet werden, ob die CD137L Expression auf Tumorzellen, vergleichbar zur Expression auf DCs, durch inflammatorische Signale gesteigert wird [185] und ob die Blockade des CD137L zur Reduktion der ADCC führt.

Urelumab war der erste agonistische anti-CD137 Antikörper, der klinisch entwickelt wurde. Nachdem Urelumab in einer Dosisfindungsstudie klinische Effekte als Monotherapie zeigte, musste eine Phase II Studie aufgrund schwerer Leberschädigungen frühzeitig gestoppt werden [104]. Es konnte gezeigt werden, dass CD137 auch auf Endothelzellen und einigen Lebergeweben exprimiert wird und dort über die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (z. B. ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) zur verstärkten Lymphozyten-Infiltration in Lebergewebe und Markern erhöhter Leberaktivität führt [186-188]. Aufgrund dieser Target-abhängigen Nebenwirkungen musste die Dosis in Folgestudien auf 0,1-0,3 mg/kg reduziert werden, was dazu führte, dass in der Urelumab Monotherapie und in Kombination mit Nivolumab bei Patienten mit soliden Tumoren nahezu keine Effektivität nachgewiesen werden konnte [189]. Auch Utomilumab, welcher aufgrund seiner geringeren agonistischen Aktivität [115] und geringeren Nebenwirkungen mit 10 mg/kg dosiert werden kann, zeigte bisher als Monotherapie nur mäßige Erfolge [105]. Ein möglicher Grund für das Ausbleiben klinischer Wirksamkeit ist das basale Expressionsprofil von CD137. Buchan und Kollegen zeigten, dass CD137 in murinen und humanen Tumoren (u. A. HNC und CRC) vor allem von regulatorischen T-Zellen (Treg) exprimiert wird und, dass eine antitumor Stimulation durch einen agonistischen Antikörper daher entweder einer vorherigen Treg Depletion oder einer Steigerung der CD137 Expression

auf Effektorzellen (z. B. durch Vakzinierung) bedarf [190]. Da durch Tomuzotuximab eine deutliche Steigerung von CD137 auf NK- und T-Zellen erreicht wurde, könnte dies die klinische Wirksamkeit agonistischer anti-CD137 Antikörper steigern. Aktuell sind weder Urelumab noch Utomilumab kommerziell erhältlich, weshalb in einem ersten Schritt ein geeignetes Surrogat-Reagenz mit agonistischer Aktivität ermittelt werden musste. Hierfür wurde die ko-Stimulation in einem CD8+ T-Zell-Proliferationsansatz ermittelt. Durch den löslichen CD137L zeigte sich keine gesteigerte Anzahl CD8+ T-Zellen, was nicht verwunderlich ist, da eine effektive Stimulation des CD137 von der Ausbildung trimerer Rezeptorkomplexe abhängt, welche unter diesen Bedingungen kaum möglich ist. Der Vergleich der beiden anti-CD137 Antikörperklone 4B4-1 und AF838 zeigte, dass 4B4-1 zu einer Reduktion und AF838 zu einem Anstieg CD8+ T-Zellen führt. Diese Beobachtung deckt sich mit Studien, in denen 4B4-1 zur verringerten NK- und T-Zell Aktivität gegen CD137L positive Tumoren führt [182, 191], wohingegen AF838 die Proliferation und Zytokinproduktion beider Populationen verstärkt und die Effektorfunktionen tumorinfiltrierender CD8+ T-Zellen fördert [192-194]. Im Gegensatz zu 4B4-1 (CRD2, [195]), bindet der anti-CD137 Antikörper SAP-3-28, wie Urelumab, in der CRD1 Region von CD137 und führt zu einer starken Proliferation von CD8+ T-Zellen [129]. Da dieser Antikörper im Vergleich zu AF838 eine deutlich stärkere agonistische Aktivität zeigte, wurde SAP-3-28 für Kombinationsexperimente eingesetzt.

Die Kombination aus tumorspezifischen IgG1 Antikörpern und agonistischer CD137 Stimulation wird/wurde derzeit in sechs Studien, davon zwei in Kombination mit Cetuximab, untersucht (Tabelle 23).

**Tabelle 23: Aktuelle klinische Studien zur Kombination aus Tumor-gerichteten IgG1 Antikörpern mit den anti-CD137 mAbs Urelumab und Utomilumab.**

Antikörper	Studie	anti-CD137	Indikation	Primäre(r) Endpunkt(e)
<i>Cetuximab</i>	NCT02110082	Urelumab	Kopf- und Halskrebs	Verträglichkeit
	NCT03290937	Utomilumab	Darmkrebs	Dosisfindung, Verträglichkeit, immunologische Biomarker
<i>Trastuzumab</i>	NCT03414658	Utomilumab	Brustkrebs	Progressionsfreies Überleben
<i>Rituximab</i>	NCT02951156	Utomilumab	B-Zell Lymphom	Verträglichkeit, Ansprechrage, PFS
	NCT01775631	Urelumab	Non-Hodgkin-Lymphom	Verträglichkeit
	NCT03440567	Utomilumab	B-Zell Lymphom oder Mantelzelllymphom	Dosisfindung, Verträglichkeit

Erste präklinische und klinische Erfahrungen zeigen, dass die Kombination aus Cetuximab und Urelumab die Zytotoxizität und Proliferation von NK-Zellen verstärkt, wobei die bessere CD137

Induktion durch Cetuximab bei Spendern mit dem FcγRIIIa-158-V/V-Genotypen mit der Stärke des gesteigerten ADCCs korreliert [127]. In ADCC-Experimenten führte die Kombination aus Tomuzotuximab und SAP-3-28 bei zwei Spendern, welche den FcγRIIIa-F/F Genotyp tragen zu einer leicht gesteigerten ADCC gegen Tumorzellen, wohingegen keine Steigerung bei einem FcγRIIIa-V/V Spender erreicht wurde. Im Gegensatz dazu führte die Kombination aus Cetuximab und SAP-3-28 bei einem –F/F- und einem V/V-Spender zur gesteigerten Tumorzelllyse. Die positiven Ergebnisse mit Cetuximab mit diesem FcγRIIIa-F/F-Spender können durch die, für Patienten dieses FcγRIIIa-Polymorphismus, ungewöhnlich starke CD137 Induktion erklärt werden. Grundsätzlich decken sich diese Beobachtungen mit Erfahrungen aus der Literatur und zeigen gleichzeitig die Schwierigkeiten der *in vitro* Analyse dieser Kombination, da die Ermittlung von Unterschieden der ADCC begrenzt ist. So konnten Masu und Kollegen am Beispiel von Trastuzumab zeigen, dass die Möglichkeit der agonistischen CD137 Stimulation *in vitro* von der Stärke der CD137 Induktion, dem FcγRIIIa Polymorphismus, der Antigenexpression der Tumorzelle, sowie deren ADCC-Sensitivität auf die Einfachbehandlung abhängt [196]. Zusätzlich könnte im Falle der HSC-4 Zellen auch die relativ hohe CD137L Expression, welche möglicherweise bereits eine starke natürliche CD137-Stimulation vermittelt, den Effekt eines anti-CD137 Antikörpers überdecken. Einige Studien zeigen außerdem, dass die Analyse der ADCC möglicherweise nicht der optimale Messerwert für die Kombination mit agonistischer CD137-Stimulation ist. So führte die Zugabe von Urelumab zu Daratumumab (anti-CD38, IgG1) oder die Stimulation Zytokin-aktivierter NK-Zellen über den CD137L zwar zur Regulation von Aktivierungsmarkern und zur Freisetzung von Zytokinen, aber nicht zur erhöhten ADCC [141, 197]. Zukünftig sollten daher Einflüsse der Kombination auf die Proliferation, Vitalität und Zytokinfreisetzung zytotoxischer Immunzellen und die Vernetzung angeborener und adaptiver Immunzellen [127] analysiert werden. Allgemein bilden die starke Hochregulation von CD137 durch Tomuzotuximab und erste Kombinationseffekte bei Spendern mit dem FcγRIIIa-158-F/F interessante Ansatzpunkte, welche durch weiterführende Studien bestätigt werden sollten.

Neben der stärkeren Expression von CD137 auf NK- und CD8+ T-Zellen führte Tomuzotuximab auch zu einer stärkeren Hochregulation des ko-stimulierenden Oberflächenrezeptors CD40 (TNFRSF5) auf Monozyten im Vergleich zu Cetuximab. Die agonistische Stimulation von CD40 kann die Aktivierung und Reifung antigenpräsentierender Zellen steigern, wodurch die Generierung Antigen-spezifischer T-Zellen gefördert wird [198]. Verschiedene Studien zeigten, dass die Expression von CD40 auf intratumoralen Monozyten und DCs reduziert ist, was zu

einer deutlichen Reduktion der T-Zell ko-Stimulation führt [162, 199]. Die Generierung von agonistischen Antikörpern gegen CD40 ist Bestandteil der aktuellen präklinischen und klinischen Forschung, wurde bisher aber noch nicht in Kombination mit Tomuzotuximab getestet. Die stärkere Hochregulation von CD40 auf Monozyten durch Tomuzotuximab stellt einerseits eine weitere Begründung für die stärkere T-Zell-Aktivierung in MLRs dar und positioniert Tomuzotuximab als idealen Partner für CD40-gerichtete Kombinationstherapien.

### 6.1.3 Kombinationen mit antagonistischen Checkpoint-Antikörpern

Obwohl Tomuzotuximab *in vitro* zu einer erhöhten Zytotoxizität gegen Tumorzellen führt, konnte in der Phase II RESGEX Studie bei Patienten mit HNC kein gesteigertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Cetuximab gezeigt werden [49]. Interessanterweise zeigte jedoch eine Untergruppenanalyse [58], dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren, welche einen besseren Immunstatus aufwiesen, besser auf Tomuzotuximab ansprachen. Dies zeigt, dass die Fc-Optimierung von Tomuzotuximab im richtigen Patientenkollektiv eine Rolle spielen kann und deutet darauf hin, dass die *in vitro*-beobachtenden gesteigerten immunstimulierenden Eigenschaften von Tomuzotuximab auch in der Klinik eine Relevanz haben könnten. Ein möglicher Grund für das Ausbleiben der Überlegenheit von Tomuzotuximab, bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv der RESGEX Studie ist die Hochregulation von immuninhibierenden Signalwegen vor oder während der Antikörperbehandlung. Ein weiterer Teil dieser Doktorarbeit war es daher, zu untersuchen, ob die *in vitro* Immunzellstimulation durch Tomuzotuximab zur Hochregulation von inhibierenden Checkpoint-Molekülen führt und eine Kombination mit antagonistischen Checkpoint-Antikörpern sinnvoll erscheint. Da es bereits viele Hinweise gibt, dass Cetuximab einen Einfluss auf die PD-1: PD-L1 Achse, hat sollte vor allem der Einfluss von Tomuzotuximab auf die Expression von PD-1 und PD-L1 untersucht werden.

Die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen wird durch einige Faktoren reguliert, welche in direktem Zusammenhang mit einer Therapie mit EGFR-spezifischen Antikörpern stehen können. Einige Studien zeigten, dass die gesteigerte Expression des EGFR oder das Vorliegen aktivierender EGFR-Mutationen zur gesteigerten PD-L1 Expression auf Tumorzellen führt, welche wiederum über die Blockade des EGFR mit TKI reduziert werden konnte [89, 130-132]. Mechanistisch führt die Aktivierung des EGFR Signalweges durch die Hochregulation der  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyl Transferase (B3GNT3) zur gesteigerten Glykosylierung von PD-L1, wodurch die Bindung zu PD-1 ermöglicht und der Abbau von PD-L1 blockiert wird [200, 201].

Passend zu diesen Beobachtungen stellte sich bei der Analyse von Zelllinien mit unterschiedlicher EGFR Expression in der vorgelegten Doktorarbeit heraus, dass Zellen mit hoher EGFR-Dichte PD-L1 stärker exprimieren. Die reine Blockade des EGFR durch die EGFR-TKIs Erlotinib und Afatinib resultierte in einer reduzierten Expression von PD-L1 auf den EGFR-positiven Ls174T, DU-145 und A-431 Zellen, wodurch die Bedeutung dieses Signalweges auf die Expression von PD-L1 bestätigt wurde.

In verschiedenen Studien mit HNC und CRC Patienten korrelierte das Auftreten PD-L1 positiver Tumore mit der Infiltration von Effektor-Immunzellen und einem erhöhten Level des Zytokins IFN- $\gamma$  [19, 202-205]. In Ko-Kultivierungsexperimenten mit PBMCs und Tumorzellen führte Tomuzotuximab, im Vergleich zu Cetuximab, zu einer deutlich stärkeren Erhöhung der PD-L1 Expression auf HNC und CRC Zelllinien. Neben einer möglicherweise auftretenden selektiven ADCC gegen PD-L1 negative Tumorzellen in Experimenten dieser Doktorarbeit, zeigten andere Studien für Cetuximab und Trastuzumab bereits, dass die gesteigerte Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch aktivierte Immunzellen die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen fördert und möglicherweise zur Therapieresistenz beiträgt [19, 206]. In Zytokinfreisetzungsexperimenten mit Platten-gebundenen Antikörpern bewirkte Tomuzotuximab eine deutlich erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentration im Kulturüberstand, wohingegen Cetuximab kein IFN- $\gamma$  induzierte. Auch für einen defukosylierten Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD20 wurde bereits eine gesteigerte Freisetzung von IFN- $\gamma$  im Vergleich zum hoch-fukosylierten mAk beschrieben [207]. In Folge führte der Überstand von Tomuzotuximab aktivierten PBMCs zu einer deutlich höheren PD-L1 Expression auf HSC-4 Zellen, als Überstand von Cetuximab aktivierten PBMCs. Durch die Blockade von IFN- $\gamma$  wurde die PD-L1 Induktion durch Tomuzotuximab-aktivierten Überstand auf das Niveau von Cetuximab gesenkt, wobei die Effekte durch Cetuximab-Überstand unberührt blieben. Dadurch wurde gezeigt, dass in den durchgeführten Experimenten IFN- $\gamma$  für die, im Vergleich zu Cetuximab, gesteigerte PD-L1 Regulation durch Tomuzotuximab verantwortlich ist. Dass auch Cetuximab PD-L1 induziert und ein Teil der Tomuzotuximab-vermittelten Induktion von PD-L1 sich durch IFN- $\gamma$ -Blockade nicht verhindern lässt, deutet auf die Beteiligung weiterer Zytokine hin, welche durch beide Antikörper vergleichbar freigesetzt werden (z.B. TNF- $\alpha$ ). Tomuzotuximab führte ebenfalls in einem 3D-Sphäroidmodell zur Steigerung von PD-L1 auf Tumorzellen, wodurch angenommen werden kann, dass dieser Effekt auch bei soliden Tumoren mit starker Immunzellfiltration eine Rolle spielt.

Neben der Bedeutung einer gesteigerten PD-L1 Expression als Resistenzmechanismus für die Therapie mit anti-EGFR mAks, kann diese auch einen Einfluss auf die Kombination mit anti-



PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern haben. Für jeden der derzeit zugelassenen anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern konnte bisher in einigen klinischen Studien eine Korrelation zwischen PD-L1 Expression der Tumorzellen und besserem Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden [208, 209]. Die starke Immunaktivierung, erhöhte Immunzellinfiltration und eine dadurch gesteigerte intratumorale PD-L1 Expression nach Tomuzotuximab könnte daher einen positiven Einfluss auf eine zusätzliche Therapie mit anti-PD-1/anti-PD-L1 mAk haben. Avelumab ist der einzige derzeit zugelassene anti-PD-1/anti-PD-L1 mAk, welcher über seinen Fc-Anteil NK-Zellen aktiviert und ADCC gegen Tumorzellen vermittelt, während alle anderen anti-PD-1/PD-L1 mAk hauptsächlich über Blockade bzw. Reaktivierung erschöpfter T-Zellen wirken. Da bereits demonstriert wurde, dass die IFN- $\gamma$ -induzierte PD-L1 Expression den ADCC gegen Tumorzellen durch Avelumab fördert [91, 93, 94], deuten die Ergebnisse zur PD-L1 Hochregulation nach Tomuzotuximab auf eine gute Kombinierbarkeit hin. In ADCC Experimenten zeigte sich, dass die Kombination von Cetuximab und Tomuzotuximab mit Avelumab die ADCC-Aktivität steigert. Dabei führte die Kombination mit Tomuzotuximab zu höheren Lysewerten als die Kombination mit Cetuximab. Jedoch beruhen die in diesen Experimenten beobachteten Effekte vermutlich eher auf der direkten, zusätzlichen NK-Zell-Aktivierung über die Interaktion des Fc-Anteils von Avelumab mit dem Fc $\gamma$ RIIIa auf NK-Zellen und weniger auf der Blockade der PD-1:PD-L1 Achse. Die Expression von PD-1 und die Effekte blockierender Antikörper wurden bisher vor allem für T-Zellen beschrieben. Dennoch zeigen aktuelle Studien, dass NK-Zellen von Krebspatienten ebenfalls verstärkt PD-1 exprimieren, wodurch deren Effektorfunktionen (z. B. Zytokinproduktion, Degranulation, natürliche Zytotoxizität und ADCC) reduziert werden. Im Umkehrschluss erhöhte die Reduktion der PD-L1 Expression auf Tumorzellen oder die Blockade der PD-1:PD-L1 Interaktion die Ausschüttung von Zytokinen, die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren und den ADCC durch Cetuximab-aktivierte NK-Zellen [19, 210-216]. Da NK- und T-Zellen von gesunden Spendern nur zu einem sehr geringen Anteil PD-1 exprimieren und in den Experimenten mit Tomuzotuximab keine Hochregulation von PD-1 auf NK-Zellen beobachtet wurde ([212]; Daten nicht gezeigt), führten erste Kombinationen aus anti-EGFR mAk und Nivolumab mit unstimulierten PBMCs zu keiner gesteigerten ADCC gegen PD-L1 positive Tumorzellen. Xing und Kollegen zeigten, dass eine starke Aktivierung von PBMCs gesunder Spender unter gleichzeitiger Suppression mit Steroiden die PD-1 Expression auf T-Zellen steigern kann und gleichzeitig deren Effektorfunktionen hemmt [133]. In den hier durchgeführten Experimenten zeigten neben T-Zellen auch NK-Zellen unter Anwendung dieses Protokolls eine leicht gesteigerte PD-1 Expression. Die Verwendung derart generierter PBMCs führte zu einer

verringerten ADCC durch Cetuximab und Tomuzotuximab. Durch Zugabe von Nivolumab konnte die Tomuzotuximab-vermittelte ADCC gesteigert werden, wohingegen keine/kaum Steigerung für Cetuximab beobachtet wurde. Mazorra und Kollegen zeigten, dass die Aktivierung von NK-Zellen durch Cetuximab zum deutlichen Anstieg des inhibitorischen Rezeptors TIM-3, aber nicht PD-1 führte, was ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre, um die Aktivität von Tumor- bzw. Therapie-supprimierten NK-Zellen gezielt zu steigern [145].

Zusätzlich zur Expression von PD-L1 auf Tumorzellen zeigen klinische Beobachtungen (siehe Tabelle 2, [208, 209]), dass aktivierte Immunzellen in einigen Fällen die hauptsächlichen Träger von PD-L1 in der Tumormikroumgebung sind. Die Aktivierung von myeloiden Zellen über NFκB oder die Interaktion zwischen aktivierenden Fcγ-Rezeptoren mit dem Fc-Anteil von mAks können die PD-L1 Expression auf Monozyten, Makrophagen und DCs steigern [22, 23, 145, 161, 217]. Der *in vitro* Vergleich von Cetuximab und Tomuzotuximab bestätigte frühere Untersuchungen, welche zeigten, dass eine verbesserte Aktivierung und Differenzierung von Monozyten und DCs durch anti-EGFR mAks mit dem Isotyp IgG1 mit einer gesteigerten PD-L1 Expression einhergeht [22, 23, 145]. Bei der Stimulation von Monozyten in Ko-Kulturen aus PBMCs und Tumorzellen resultierte nur die Behandlung mit Tomuzotuximab, nicht aber Cetuximab, in einer Steigerung von PD-L1 auf Monozyten, wohingegen die PD-L1 Expression auf mo-DCs durch beide Antikörper erhöht wurde. Diese Unterschiede können auf den veränderten Phänotypen der mo-DCs durch deren Generierung aus Monozyten (z. B. Expression von FcγRs, basale PD-L1 Expression) oder der Zusammensetzung der Immunzellen im Experimentaufbau erklärt werden. Zum Beispiel wurden bei der Reifung der mo-DCs im Verhältnis mehr NK-Zellen eingesetzt. Da in Ansätzen ohne die Zugabe von NK-Zellen nahezu kein PD-L1 Anstieg festgestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass die Aktivierung von NK-Zellen der Hauptfaktor für die anti-EGFR mAks induzierte PD-L1 Expression auf myeloiden Zellen ist, was sich mit bereits publizierten Erfahrungen für Cetuximab deckt [145, 161]. Passend zu der in der vorliegenden Doktorarbeit ermittelten geringeren *in vitro* Induktion von PD-L1 durch Cetuximab, zeigte sich in HNC Patienten nach Behandlung mit Cetuximab ebenfalls keine Änderung der PD-L1 Expression auf CD11b+ Monozyten [127]. Im Gegensatz dazu konnte in einer Zwischenauswertung der Immunzell-Phänotypisierung während der klinischen Studie GATTO (NCT03360734) ein signifikanter Anstieg PD-L1 positiver Monozyten innerhalb der PBMCs nach Tomuzotuximab-Behandlung festgestellt werden (Manuskript in Vorbereitung), weshalb die Regulation von PD-L1 auf myeloiden Zellen auch

einen Einfluss auf die Effizienz von Tomuzotuximab in der Monotherapie ausüben könnte. In folgenden klinischen Studien sollte deshalb getestet werden, ob die Stärke der PD-L1 Induktion auf myeloiden Zellen und Tumorzellen mit dem Ansprechen von Patienten auf die anti-EGFR Therapie korreliert.

In MLRs zeigte sich, dass die Aktivierung CD8 positiver T-Zellen durch Cetuximab und Tomuzotuximab von einer gesteigerten PD-1 Expression begleitet wird. Durch die gleichzeitig hohe Induktion von PD-L1 auf Tumorzellen und Antigenpräsentierenden Zellen könnte daher die antitumor Aktivität von PD-1 exprimierenden T-Zellen deutlich reduziert werden, wodurch die positiven Effekte der anti-EGFR mAKs in der Klinik nicht vollständig zum Tragen kommen. Studien zeigten, dass besonders Effektor-T-Zellen von z. B. HNC und CRC Patienten eine erhöhte Expression von PD-1 aufweisen [218, 219]. Des Weiteren stellte sich in aktuellen klinischen Untersuchungen zum Immunzell-Phänotyp nach Cetuximab-Behandlung heraus, dass die Therapie den Anteil PD-1 positiver CD8+ und Antigen-spezifischer T-Zellen erhöht. Dabei korrelierte die erhöhte PD-1 Expression mit einer verringerten Ansprechrate auf Cetuximab und stellt dadurch einen möglichen Resistenzmechanismus der Monotherapie dar [220-222]. Grundsätzlich zeigen PD-1 positive T-Zellen, vergleichbar zu den Ergebnissen aus den MLR Experimenten, einen aktivierten Phänotypen, weshalb Therapien, welche PD-1 auf tumorspezifischen T-Zellen steigern, einen starken Synergieeffekt mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Therapien zeigen sollten [223]. Für die *in vitro* Charakterisierung von anti-PD-1/anti-PD-L1 mAKs ist die MLR eine sehr geeignete Methode [224], mit der z. B. bereits gezeigt werden konnte, dass eine gesteigerte PD-L1 Expression auf Monozyten die T-Zell-Aktivierung inhibiert [225]. Anders als in bisherigen Berichten wurde für die Analyse der T-Zell-Aktivierung mittels MLRs anstelle der Freisetzung von Zytokinen oder der T-Zell-Proliferation die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD137 auf CD8+ T-Zellen bestimmt. Dadurch kann möglicherweise erklärt werden, weshalb Nivolumab allein in den durchgeführten Experimenten nahezu keinen Effekt zeigte. Interessanterweise führte die Zugabe von Nivolumab nur in Kombination mit Tomuzotuximab, nicht aber Cetuximab, zur gesteigerten CD137 Expression im Vergleich zur Einfachbehandlung, was an der erhöhten Immunzell-Aktivierung und PD-L1 Expression durch Tomuzotuximab liegen kann. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnten wir zeigen, dass die Interaktion von anti-PD-L1 Antikörpern mit dem FcγRIIIa auf Immunzellen die T-Zell-Aktivierung steigern kann [96]. Vergleichbar zu den dort beschriebenen Ergebnissen, führte der glyko-optimierte  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> auch im Beisein der HSC-4 Tumorzellen zu einer höheren CD137 Expression als Avelumab und Nivolumab (Nivolumab < Avelumab <

$\alpha$ PDL1GE). Überraschenderweise zeigte die Stärke der anti-PD-L1 Fc-Fc $\gamma$ RIIIa Interaktion auch einen Einfluss auf die Kombination mit Cetuximab und Tomuzotuximab. Im Gegensatz zur Kombination mit Nivolumab führte Avelumab auch mit Cetuximab zur leichten Steigerung der CD137 Expression, blieb jedoch weiterhin deutlich unter der Kombination mit Tomuzotuximab. Dieser Unterschied glich sich in Kombinationen mit  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> nahezu an, da  $\alpha$ PDL1<sub>GE</sub> die T-Zell-Aktivierung *per se* und in Kombination mit Cetuximab im Vergleich zu Nivolumab und Avelumab deutlich steigerte. Diese Beobachtungen können durch überlappende Effektormechanismen glyko-optimierter IgG1 Antikörper (z. B. erhöhte NK-Zell-Aktivierung, DC-Reifung) erklärt werden und heben die Bedeutung der Fc-Glykosylierung für die Aktivierung von T-Zellen hervor.

Obwohl Synergieeffekte in den MLRs für einige Spender beobachtet wurden, sind die absoluten Steigerungen durch die Kombinationen recht gering, was vor allem *in vitro* an verschiedenen Faktoren liegen kann und Raum für Optimierungen am Versuchsaufbau bietet. Zum Ersten wurden auch für die MLR Experimente Immunzellen gesunder Spender verwendet, weshalb die PD-1 Expression der T-Zellen eventuell noch keinem erschöpften Phänotypen entspricht bzw. erst während der Inkubationszeit gesteigert wird. Filipis und Kollegen zeigten, dass die Vorbehandlung von PBMCs gesunder Spender mit Phytohämagglutinin (PHA) zu T-Zellen mit erhöhtem Anteil PD-1/TIM-3 doppelpositiver Zellen führt, welche für die Analyse von anti-PD-1 Antikörpern geeignet sind [226]. In einem ersten Experiment (Daten nicht gezeigt) führte die Kombination von Nivolumab oder Pembrolizumab mit Tomuzotuximab zu einer verstärkten Proliferation und IFN- $\gamma$  Freisetzung durch PHA-vorbehandelte PBMCs. Eine weitere Möglichkeit, die Effekte der anti-PD-1 Monotherapie- und Kombinationseffekte zu erhöhen wäre es, mehrere Re-Stimulationszyklen durchzuführen [227]. Andererseits kann in den durchgeführten Experimenten auch der induzierte Phänotyp myeloider Zellen in der Nähe von T-Zellen die Effekte durch anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörper verhindern. So konnten Sugiura und Kollegen demonstrieren, dass die *cis*-Interaktion von PD-L1 und CD80 auf derselben Antigenpräsentierenden Zelle die Bindung von PD-L1 an PD-1 auf T-Zellen unterbricht und so die Inhibierung von T-Zellen verhindert [228]. Dies kann einerseits ein Vorteil der anti-EGFR mAks sein, da sie PD-L1 und CD80 auf Monozyten und DCs gleichermaßen steigern und so womöglich die Inhibierung PD-1 positiver Immunzellen verhindern, aber deren Kombination mit anti-PD-1/anti-PD-L1 vor allem in *in vitro* Experimenten auch erschweren.

Erste Anzeichen für den Nutzen der Kombination aus anti-PD-1/anti-PD-L1 mAks mit Antikörpern des Isotyps IgG1 gegen Tumorantigene konnten über die Analyse der

Vorbehandlungs-abhängigen Ansprechraten von Patienten in anti-PD-1 Studien gezeigt werden. In einer Untergruppen-Analyse der ATTRACTION-2 Studie zur Behandlung von Patienten mit Magen- und Speiseröhrenkrebs mit Nivolumab zeigten Patienten, welche zuvor mit Trastuzumab behandelt wurden, höhere Ansprech- (+Trastuzumab 16,9 % vs. –Trastuzumab 7,7 %) und Überlebensraten (8,3 Monate vs. 4,8 Monate) [229]. Dieser Unterschied zeigte sich in der CheckMate-141 Studie bei Cetuximab vorbehandelten Kopf- und Halskrebspatienten nicht, wobei die Kohorte mit Cetuximab-Vorbehandlung Patienten mit deutlich fortgeschrittenen Tumoren enthielt [230]. Interessanterweise erhöhte Nivolumab bei Cetuximab-vorbehandelten Patienten die Überlebensrate nur bei PD-L1 positiven Tumoren, ein Effekt, welcher für Patienten ohne Cetuximab-Behandlung nicht gesehen wurde [230]. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die PD-L1 Expression in Cetuximab-behandelten Tumoren durch eine erhöhte Immunaktivierung induziert wurde. Die verstärkte Immunzellaktivierung und Hochregulation könnten daher wichtige Faktoren für die Kombination mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern darstellen. Passend dazu zeigte sich bei Chemotherapie und Cetuximab refraktären HNC Patienten in der KEYNOTE-055 Studie ein sehr hoher Anteil PD-L1 positiver Tumore (82 %), was mit einem besseren Ansprechen auf Pembrolizumab korrelierte (ORR, > 1 % PD-L1+: 18 %, <1 % PD-L1+: 12 %) [67]. Zusammen mit den *in vitro* Daten zur Regulation der PD-1: PD-L1 Achse durch Cetuximab begründen diese Ergebnisse die Initiierung einiger klinischer Studien (Tabelle 24) bei Patienten mit HNC, CRC und Lungenkrebs, welche die Effekte der Kombinationstherapie aus Cetuximab und PD-1/PD-L1-Blockade untersuchen.

**Tabelle 24 Kombinationsstudien aus Cetuximab und anti-PD-1/anti-PD-L1 mAks.**

Studie	Indikation	Checkpoint mAks	relevante Studienarme	Primäre Endpunkte
<u>NCT02764593</u>	Kopf- und Halskrebs	Nivolumab	A) Nivolumab + Cisplatin B) Nivolumab + Cetuximab	Verträglichkeit
NCT03370276	R/M Kopf- und Halskrebs	Nivolumab	Nivolumab + Cetuximab	Dosisfindung, Ein-Jahres-Überlebensrate
NCT04017650	Darmkrebs	Nivolumab	Nivolumab + Cetuximab + Encorafenib	Bestes Ansprechen, Verträglichkeit
NCT03082534	R/M Kopf- und Halskrebs	Pembrolizumab	Pembrolizumab + Cetuximab in αPD-1/Cetuximab naïve/resistenten Kohorten	Ansprechrate
NCT03532737	Kopf- und Halskrebs	Pembrolizumab	Pembrolizumab + Cetuximab beinhaltende	Verträglichkeit und Ansprechrate

			Strahlentherapie	
NCT03666325	kutanes Plattenepithel- karzinom	Pembrolizumab	Pembrolizumab + Cetuximab	bessere Ansprechrate im Vergleich zu $\alpha$ EGFR Monotherapie
NCT02451930	Lungenkrebs (NSCLC)	Pembrolizumab	Pembrolizumab + Necitumumab	Verträglichkeit und Ansprechrate
NCT02938273	Kopf- und Halskrebs	Avelumab	Avelumab + Cetuximab + Strahlentherapie	Verträglichkeit
<u>NCT02999087</u>	Kopf- und Halskrebs	Avelumab	A) Cisplatin + Strahlentherapie B) Avelumab + Cetuximab + Strahlentherapie C) Cetuximab + Strahlentherapie	Progressionsfreies Überleben
NCT03174405	Darmkrebs	Avelumab	Avelumab + Cetuximab	Progressionsfreies Überleben
<u>NCT03494322</u>	Kopf- und Halskrebs	Avelumab	A) Avelumab B) Avelumab + Cetuximab	Verträglichkeit und Krankheitskontrollrate
NCT03498378	R/M Kopf- und Halskrebs	Avelumab	Avelumab + Palbociclib + Cetuximab	Verträglichkeit
NCT03608046	R/M Darmkrebs	Avelumab	Avelumab + Cetuximab + Irinotecan	Ansprechrate
NCT03717155	Lungenkrebs (NSCLC)	Avelumab	Avelumab + Cetuximab + Gemcitabine + Cisplatin	Bestes Ansprechen
<u>NCT03944941</u>	kutanes Plattenepithel- karzinom	Avelumab	A) Avelumab B) Avelumab + Cetuximab	Progressionsfreies Überleben
<u>NCT03944252</u>	Plattenepithel- Anal-Karzinom	Avelumab	A) Avelumab B) Avelumab + Cetuximab	Ansprechrate
NCT03691714	R/M Kopf- und Halskrebs	Durvalumab	Durvalumab + Cetuximab	Ansprechrate

R/M: Rezidiv/Metastasierend, NSCLC: Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. Durch Unterstreichen sind Studien hervorgehoben in denen bereits Einfach- und Kombinationstherapien miteinander verglichen werden.

Ein besonderes Interesse gilt hierbei den Studien NCT02764593, NCT02999087, NCT03494322, NCT03944941 und NCT03944252, da diese bereits den Unterschied zwischen Einfach- und Kombitherapie untersuchen. Die Vielzahl an Studien mit unterschiedlichen anti-PD-1/anti-PD-L1 Kombipartnern könnte zusätzlich Aufschluss über mögliche Unterschiede

zwischen den einzelnen Präparaten und des Isotyps der anti-PD-L1 Antikörper für kombinatorische Immuntherapien liefern.

Im Vergleich zur JAVELIN Studie mit Avelumab bei Patienten mit fortgeschrittenem HER-2+ Brustkrebs, in welcher kein Patient ansprach [231], zeigten kürzlich veröffentlichte Ergebnisse der PANCEA Studie (NCT02129556) eine objektive Ansprechrate von 15 % durch die Kombination aus Trastuzumab und Pembrolizumab bei PD-L1 positiven Patienten (0 % bei PD-L1 negativen; [232]). Vergleichbar zeigen erste Fallbeispiele [233] und Beobachtungen an kleinen Patientenkohorten [234] den möglichen Mehrwert der Kombination aus anti-EGFR mAks und Checkpoint-Inhibitoren. Eine retrospektive Analyse von 15 Patienten mit R/M HNC, welche am Shin Kong Wu Ho-Su Memorial Krankenhaus mit einer Kombination aus niedrig-dosierter Chemotherapie, Cetuximab und anti-PD-1-Therapie behandelt wurden, zeigte eine sehr hohe objektive Ansprechrate von 66,7 %, wobei es bei drei Patienten (20 %) zu einer kompletten Remission kam [234]. Sollte sich diese Ansprechrate in größeren Kohorten bestätigen, läge sie deutlich über den bisher erreichten Raten durch das EXTREME-Behandlungsschema (Kombination aus Chemotherapie und Cetuximab, ORR 36 %, [235]) oder anti-PD-1 mAks allein (ORR, Nivolumab/ CheckMate-141: 13 %, [66]; Pembrolizumab/ KEYNOTE-012: 18 %, [62]). In den durchgeführten *in vitro* Experimenten resultierte der glyko-optimierte Tomuzotuximab in einer stärkeren Immunzellaktivierung und Hochregulation von PD-L1 als Cetuximab, weshalb Tomuzotuximab ein noch besserer Partner für Kombinationstherapien sein sollte. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse der Phase 2 Dosisfindungsstudie zur Untersuchung der Kombination des Fc-optimierten anti-HER2 Margetuximab mit Pembrolizumab (NCT02689284, [236]) bekräftigt. Bei einer vergleichbaren Verträglichkeit zu den jeweiligen Einfachbehandlungen, sprachen in dieser Studie 21,7 % aller Patienten auf die Therapie an. Zusätzlich zeigte diese Studie, dass die Behandlung zu einer starken Infiltration von NK- und T-Zellen führte und dass geeignete Patienten über immunhistochemische Biomarker identifiziert werden konnten. So erhöhte sich die Ansprechrate bei Patienten mit hoher HER2-Expression und PD-L1 positiven Tumoren sogar auf 52,2 % bei einem progressionsfreien Überleben von 4,14 Monaten. Zusammengefasst legen die präklinischen Daten für Tomuzotuximab sowie die klinischen Erfahrungen zu anderen Tumor-gerichteten Antikörpern des Isotyps IgG1 nahe, dass Tomuzotuximab ein idealer Partner für die Kombination mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern ist, um die klinische Effektivität der Monotherapien zu verbessern.

## 6.2 Potential der Glyko-Optimierung von agonistischen Checkpoint Antikörpern

Der Ausgangspunkt für die Analyse der Rolle des Antikörper-Isotyps und der Antikörper-Glykosylierung bei agonistischen Antikörpern bildete der anti-CD40 Antikörper ChiLob 7/4. Dieser wurde im Rahmen des EU-geförderten Projektes IACT von der Firma Glycotope GmbH humanisiert und als hIgG1 bzw. hIgG2 je mit hoher oder niedriger Fc-Fukosylierung entwickelt, wodurch die Bindung an den FcγRIIIa gesteigert wurde. Aktuelle Studien zeigen, dass die Auswahl des Antikörper-Isotyps einen entscheidenden Einfluss auf die agonistische Aktivität von immunstimulierenden Antikörpern hat. In einer begleitenden *ex vivo* Untersuchung zur klinischen Phase I Studie des Ursprungsantikörpers ChiLob 7/4 als IgG1 konnte gezeigt werden, dass dieser nur nach Multimerisierung über einen Fc-spezifischen Antikörper zur Aktivierung und Reifung von B-Zellen und DCs führt und die Produktion von Zytokinen induziert [237]. Im Gegensatz zu IgG1 Antikörpern führt die Generierung von agonistischen Antikörpern mit derselben Antigenpezifität im IgG2 Format zu Superagonisten, welche unabhängig von der Bindung an Fcγ-Rezeptoren eine starke Immunantwort induzieren [116, 119]. Um die agonistische Aktivität und den Einfluss der physiologischen Fc-Vernetzung über FcγR exprimierende Immunzellen zu untersuchen, wurde die CD40 Signalvermittlung in CD40-transfizierte Reporterzellen untersucht. Hierbei bestätigte sich, dass beide hIgG2 Varianten unabhängig von der Zugabe FcγR-exprimierender Zellen agonistisch wirkten und die Freisetzung der SEAP förderten. Demgegenüber führte weder die hoch- noch die gering fukosylierte anti-CD40 hIgG1 Variante ohne Vernetzung oder unter der Zugabe von FcγRIIIa-negativen B-Zellen zu gesteigerten Signalen. Erst die Zugabe FcγRIIIa exprimierenden Zellen (KHYG-1-CD16a, DCs, PBMCs) steigerte die agonistische Aktivität beider hIgG1 Antikörper. Hervorzuheben ist, dass der glyko-optimierte anti-CD40 hIgG1 eine höhere Stimulation als der stark-fukosylierte hIgG1 zeigte und Werte der hochpotenten hIgG2 Varianten erreichte. Außerdem konnte mit dem stark-fukosylierten anti-CD40 hIgG1 durch die Zugabe von PBMCs, im Vergleich zur Zugabe der NK-Zelllinie KHYG-1-CD16a, ebenfalls eine starke agonistische Aktivität nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass neben dem FcγRIIIa weitere FcγR an der Quervernetzung von agonistischen IgG1 mAbs beteiligt sind. Zum Beispiel könnte die Bindung an den hoch-affinen FcγRIa, welcher von Monozyten und DCs exprimiert wird, von Bedeutung sein, da dieser unabhängig von der Fc-Glykosylierung an IgG1 mAbs binden kann [238]. Ein Nachteil der verwendeten Reporterzelllinie ist deren endogene Expression des TNF-α Rezeptors, dessen Stimulation laut Herstellerangaben (Invivogen, # hkb-cd40) ebenfalls zur Freisetzung von SEAP führt. Da der anti-CD40 hIgG1-GO in Experimenten zur



Zytokinfreisetzung eine erhöhte TNF- $\alpha$  Produktion vermittelte, könnte dies die Ergebnisse in dem gewählten Versuchsaufbau beeinflussen. Durch die Verwendung eines TNF- $\alpha$  blockierenden Antikörper könnte in zukünftigen Experimenten der Einfluss der verstärkten Zytokinproduktion durch anti-CD40 hIgG1-GO ermittelt werden. Frühere Experimente, bei welchen die Vernetzung der Antikörper über einen Fc-spezifischen Antikörper ohne Zugabe von Immunzellen erfolgte (Daten nicht gezeigt), zeigten allerdings bereits, dass die hIgG1 Varianten auch über die alleinige, direkte CD40 Stimulation wirken.

CD40 hat durch die Beteiligung an der Reifung von antigenpräsentierenden Zellen eine entscheidende Bedeutung für die Vernetzung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Für alle anti-CD40 Antikörper, welche derzeit in der klinischen Entwicklung sind, konnte ein positiver Einfluss auf die Reifung von DCs und die Aktivierung von T-Zellen gezeigt werden [123, 237, 239-241]. In DC-Stimulationsexperimenten resultierten die vier anti-CD40 hIgG1 und hIgG2 Varianten in einer gesteigerten Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 und HLA-DR, welches an der Antigenpräsentation beteiligt ist. Es konnte eine tendenziell stärkere Reifung durch den hIgG1-GO festgestellt werden, was möglicherweise durch die direkte Aktivierung über den Fc $\gamma$ RIIIa oder eine veränderte Zytokinzusammensetzung durch aktivierte NK-Zellen erklärt werden kann. Dies sollte allerdings durch Experimente mit weiteren Spendern bestätigt werden. Vergleichbar zu den Experimenten mit Tomuzotuximab, führte auch die bessere Reifung von DCs durch die anti-CD40 Antikörper, zu einer Aktivierung allogener CD8+ T-Zellen in MLRs. Dabei resultierte der anti-CD40 hIgG1-GO und die hIgG2 Varianten in einer höheren CD25 Expression als der hoch-fukosylierte hIgG1. Die Ergebnisse zum Vergleich der hIgG1 Varianten bestätigen Studien zu dem ebenfalls Fukose-reduzierten anti-CD40 IgG1 mAk SEA-CD40, welcher im direkten Vergleich zu seiner hoch-fukosylierten Version, SGN-40, zu einer verbesserten Monozytenreifung und T-Zell-Stimulation führt [242]. Da die dahintersteckenden Effektormechanismen vergleichbar zu den in dieser Doktorarbeit beschriebenen anti-CD40 hIgG1 Glyko-Varianten sind, ist davon auszugehen, dass auch diese eine antigenspezifische T-Zell-Antwort vermitteln können. Dies sollte aber in zukünftigen Untersuchungen bestätigt werden. Durch die Verwendung eines Mausmodells, bei welchem die Immunzellen humanes CD40 und humane Fc $\gamma$ -Rezeptoren exprimieren, zeigten Dahan und Kollegen, dass eine IgG1 Variante des anti-CD40 Selicrelumab eine stärkere antigenspezifische T-Zell-Stimulation induziert als die ursprüngliche IgG2 Version, wobei die agonistische Aktivität beider Varianten vom Vorhandensein der Fc-Glykosylierung abhing [243]. Über das Einbringen gezielter Mutationen in den Fc-Anteil der IgG1 Version, wodurch die selektive

Bindung an den inhibierenden Fc $\gamma$ RIIb gefördert wird, demonstrierten sie eine weitere Möglichkeit die agonistische Aktivität von anti-CD40 Antikörpern zu steigern.

Ein Nachteil der zugelassenen anti-PD-1/PD-L1 Antikörper ist, dass diese von der Anwesenheit intratumoraler Immunzellen abhängen und daher in sogenannten „kalten“ Tumoren (Tumore ohne Immunzell-Infiltrat) wirkungslos bleiben. Interessanter Weise resultierte die agonistische Stimulation mit anti-CD40 Antikörpern in Mausstudien mit immunologisch „kalten“ B16 Melanom-Tumoren [244] oder dem anti-PD-1/anti-PD-L1 resistenten Panc02 Bauchspeicheldrüsenkrebs-Modell [245] zur Steigerung der antitumor Immunität. In Experimenten mit immunkompetenten Mäusen und CD40-negativen Tumoren demonstrierten Mierlo und Kollegen, dass die Gabe eines agonistischen anti-CD40 Antikörpers zur CD8+ T-Zell-abhängigen Tumorreduktion führte [246]. Diese Ergebnisse legen eine verstärkte Immunzellinfiltration nahe, welche für die vier anti-CD40 hIgG1/2 Glykosylierungsvarianten im Sphäroidmodell mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet wurde. Dabei zeigte sich, dass der anti-CD40 hIgG1-GO Antikörper, trotz sehr geringer CD40 Expression der MCF-7 Zellen, zu einer deutlichen Infiltration von CD45+ Immunzellen, CD8+ T-Zellen und CD56+ NK-Zellen führte. Im Gegensatz dazu führte der hoch-fukosylierte IgG1 und beide IgG2 Varianten zu geringeren Effekten. Vergleichbar zu den Beobachtungen mit Tomuzotuximab führte die Stimulation mit anti-CD40 hIgG1-GO auch zur gesteigerten Expression von CD137 auf NK- und T-Zellen, was für eine gesteigerte Aktivierung spricht. Konsequenterweise zeigte sich durch die Analyse vitaler MCF-7 eine deutliche Abnahme der Tumorzellen nach Antikörperbehandlung. Die gesteigerte Infiltration von Immunzellen sowie deren Aktivierung durch den anti-CD40 hIgG1-GO könnten dazu beitragen, die Therapie mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern auch in primär nicht-immuninfiltrierten Tumoren zu ermöglichen.

Trotz des Potenzials von anti-CD40 Antikörpern, verschiedene Immunzellen zu aktivieren, wurden in bisherigen klinischen Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit der Monotherapie mit anti-CD40 Antikörpern zur Therapie solider Tumore nur partielle Remissionen als bestes Ansprechen beobachtet [247-250]. Erste Kombinationsstudien mit zytotoxischen Substanzen und Immun-Checkpoint-Antikörpern zeigten, dass die klinische Effizienz von anti-CD40 Antikörpern dadurch gesteigert werden kann. Byrne und Vonderheide zeigten in einem Mausmodell des Pankreasadenokarzinoms, dass ein agonistischer anti-CD40 Antikörper zwar zur Aktivierung myeloider Zellen und der Infiltration von Effektor-T-Zellen führte, aber als Monotherapie nur geringe Effekte auf das Tumorwachstum und Überleben der Mäuse hatte [251]. Diese Beobachtungen lassen zusätzliche Regulationsmechanismen vermuten, welche eine

effektive antitumor Immunität verhindern. Vergleichbar zu den Beobachtungen zu Tomuzotuximab, führte die gesteigerte Reifung von DCs durch die anti-CD40 hIgG1 Varianten, aber nicht die hIgG2 Varianten, ebenfalls zur Steigerung der PD-L1 Expression. Zusätzlich steigerte sich der Anteil PD-L1 positiver MCF-7 Zellen nach Stimulation mit anti-CD40 hIgG1-GO. Da der anti-CD40 hIgG1-GO, ähnlich zu Tomuzotuximab, ebenfalls zur starken Aktivierung von NK-Zellen, sowie zur erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  führt, können vergleichbare Regulationsmechanismen angenommen werden. In Mausmodellen resultierte die verstärkte Immunantwort durch agonistische anti-CD40 Antikörper in einer Induktion von PD-L1 auf Tumor- und Immunzellen. Dies führte einerseits zur Resistenz gegenüber der Therapie mit agonistischen anti-CD40 Antikörpern, andererseits allerdings auch zur synergistischen antitumor Antwort durch die Zugabe von anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern, welche als Monotherapie keine Wirkung zeigten [245, 252-254]. In MLRs resultierte die Kombination aus den vier anti-CD40 hIgG1/2 Glykosylierungsvarianten mit dem anti-PD-1 Antikörper Nivolumab nur für die hIgG1 Varianten in eine verstärkte Expression von CD25 auf CD8+ T-Zellen, wobei in zwei von drei Experimenten ein Vorteil von anti-CD40 hIgG1-GO festgestellt wurde. Diese Beobachtungen spiegeln die gesteigerte PD-L1 Expression auf DCs nach Behandlung mit den anti-CD40 hIgG1 Varianten wider und heben das Potenzial der Kombination aus anti-CD40 hIgG1-GO mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern erneut hervor. Die Kombination aus agonistischen anti-CD40 Antikörpern mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern wird derzeit in sieben aktiven klinischen Studien getestet (Tabelle 25). Erste Erfolge durch diese Kombination wurden durch eine Zwischenauswertung der Phase Ib Studie der Kombination aus APX005M und Nivolumab bei Patienten mit fortgeschrittenem Bauchspeicheldrüsenkrebs ersichtlich, welche auf der *American Association for Cancer Research* (AACR) Konferenz präsentiert wurden [255]. Es zeigte sich eine gute Verträglichkeit der Kombination und eine Tumorreduktion bei 20 von 24 Patienten.

**Tabelle 25 Aktive klinische Studien zur Kombination aus anti-CD40 und anti-PD-1/anti-PD-L1 mAks.**

anti-CD40 Antikörper	Studie	Kombipartner	Indikation
APX005M	NCT03123783	Nivolumab	Lungenkrebs, Melanom
APX005M	NCT03214250	Nivolumab	Bauchspeicheldrüsenkrebs
APX005M	NCT03597282	Nivolumab	Melanom
APX005M	NCT02706353	Pembrolizumab	Melanom
SEA-CD40	NCT02376699	Pembrolizumab	verschiedene
Selicrelumab	NCT03892525	Atezolizumab	B-Zell NHL
Selicrelumab	NCT02304393	Atezolizumab	solide Tumore

Zusätzlich zur Expression auf Immunzellen kann CD40 auch auf hämatologischen [256] und soliden Tumoren [108] exprimiert werden, was bei der Entwicklung eines anti-CD40 Antikörpers bedacht werden muss. Die Rolle der agonistischen Stimulation von CD40 auf Tumorzellen wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Einerseits kann die Stimulation von CD40 zur Caspase-abhängigen und -unabhängigen Induktion von Apoptose führen [108], andererseits aber auch die Produktion tumorfördernder Zytokine (z. B. VEGF, IL-6, TGF- $\beta$ ) erhöhen und die Angiogenese, Migration und das Wachstum von Tumorzellen fördern [257-259]. Daher könnte es von Vorteil sein die NK-Zell-vermittelte ADCC durch anti-CD40 Antikörper zu ermöglichen. In ADCC Experimenten zeigte sich wie erwartet, dass die hIgG1 Varianten ADCC vermitteln, wohingegen beide hIgG2 Varianten zu keiner Lyse führten. Die Stärke der beobachteten Effekte steigerte sich dabei mit zunehmender CD40 Expression und konnte für die B-Zell-Lymphom-Zellen Ramos sowie die HNC-Zelllinie HSC-4 und die Prostatakarzinomzellen DU-145 gezeigt werden. Präklinische Daten zu den ebenfalls in ihrer Fc $\gamma$ RIIIa-Bindung verstärkten anti-CD40 Antikörpern SEA-CD40 [242] und XmAbCD40 [260] zeigten bisher die gesteigerte ADCC gegen B-Zell Erkrankungen, wie z. B. das Non-Hodgkin Lymphom (NHL) oder Leukämien. Die hier präsentierten Daten zu anti-CD40 hIgG1-GO heben hervor, dass die Expression auf Zelllinien solider Tumorzellen ebenfalls ausreicht, um eine gesteigerte ADCC zu vermitteln. Bisherige Studien mit anti-CD40 Antikörpern zur Behandlung von B-Zell-Erkrankungen, auch mit ADCC-funktionalen Antikörpern (SGN-40, Lucatumumab), zeigten eine gute Verträglichkeit, aber nur ein sehr geringes klinisches Ansprechen [249, 261]. Die Fc-Optimierung des anti-CD40 Antikörpers könnte vor allem für hämatologische Tumore interessant sein, da für diese der klinische Nutzen der Defukosylierung bereits nachgewiesen wurde und zu den zwei bisher einzigen Zulassungen für glyko-optimierte Antikörper zur Krebstherapie führte. So wurde der anti-CD20 Antikörper Obinutuzumab, welcher eine reduzierte Fc-Fukosylierung aufweist, bei Patienten mit Follikulärem Lymphom zugelassen, nachdem in der GALLIUM Studie ein besseres progressionsfreies Überleben, als durch Rituximab gezeigt wurde [38]. Der zweite glyko-optimierte Antikörper, Mogamulizumab (anti-CCR-4), wurde 2018 für Patienten mit Mycosis fungoides und Sézary Syndrom, zwei seltenen Formen des Non-Hodgkin Lymphoms zugelassen, nachdem auch dieser das progressionsfreie Überleben im Vergleich zur Standardtherapie verlängerte [39]. Interessanter Weise stellte sich in *ex vivo* Studien heraus, dass der anti-CD40 Lucatumumab, trotz geringerer Expression von CD40 im Vergleich zu CD20, eine stärkere ADCC gegen Tumorzellen von B-Zell-Leukämie Patienten vermittelt als Rituximab [262]. Sie begründeten ihre Beobachtung mit einer geringeren Internalisierung des anti-CD40 Antikörpers, weshalb CD40 möglicherweise ein besseres Target

zur Therapie von B-Zell-Erkrankungen mit ADCC-vermittelnden mAk darstellt. Der klinische Nutzen der Defukosylierung des anti-CD40 SEA-CD40 wird aktuell in einer Dosisfindungsstudie bei Lymphom-Patienten untersucht und wird Aufschlüsse darüber geben, ob CD40 in dieser Indikation als Target für einen Fc-optimierten Antikörper geeignet ist.

Eines der größten Risiken von agonistischen Antikörpern ist die Auslösung einer starken Immuntoxizität durch die systemische Immunzellaktivierung. Eine der häufigsten Beobachtungen bisheriger klinischer Studien zu anti-CD40 Antikörpern ist die transiente Reduktion von B-Zellen, welche häufig mit stark erhöhten Zytokinleveln einhergeht [117, 250, 261, 263]. In einem humanisierten Mausmodell zeigten Smith und Kollegen, dass die verstärkte Bindung des Fc-Anteils eines anti-CD40 Antikörpers zu einer deutlich stärkeren B-Zell-Reduktion führt [264]. Vergleichbar dazu führten die anti-CD40 hIgG1-Varianten in autologen Immunzell-ADCC Experimenten bei einer Konzentration von 10 ng/ml zu einer Reduktion von CD19+ B-Zellen. Dabei lagen die erreichten Werte aber bei jeder Konzentration weit unter denen des Fc-optimierten anti-CD20 Antikörper Obinutuzumab, welcher ab 10 ng/ml nahezu alle B-Zellen depletierte. In bisherigen klinischen Beobachtungen führten anti-CD40 IgG1 Antikörper nur zur Reduktion von B-Zellen, dennoch exprimieren auch Monozyten und DCs CD40 und könnten daher ein mögliches Target eines glyko-optimierten anti-CD40 Antikörpers sein. In vergleichbaren Experimenten wie zur Analyse der B-Zell-Reduktion, führten erst sehr hohe Konzentrationen (100 µg/ml) zu einer deutlichen Reduktion von Monozyten und DCs. In der Phase I Studie von ChiLob 7/4 wurden abhängig von der Dosierung 17,35-65,83 µg/ml des Antikörpers in der Zirkulation von Patienten detektiert [250], weshalb davon ausgegangen werden kann, dass eine Konzentration von 100 µg/ml bei einer möglichen Therapie mit den anti-CD40 hIgG1 Varianten nicht erreicht wird. Die Beobachtung, dass Monozyten und DCs anscheinend weniger von ADCC angegriffen werden, könnte durch den „Skorpion Effekt“ erklärt werden [265]. Da Monozyten und DCs CD40 und den FcγRIIIa exprimieren könnte es nach der Bindung an CD40 zu einer *cis* Interaktion des Antikörper Fc-Anteils auf derselben Zelle kommen, wodurch der Fc-Anteil blockiert und die Aktivierung zytotoxischer Immunzellen verhindert wird.

Die Freisetzung von Zytokinen durch agonistische Antikörper ist einerseits ein gewünschter Effektormechanismus bei der Aktivierung des Immunsystems, kann aber auch in einen, für den Patienten bedrohlichen, Zytokinsturm münden. Die Erfahrungen mit dem anti-CD28 Agonisten TGN-1412 zeigten, dass die Auswahl der präklinischen Methode essenziell ist, um das Potenzial eines Zytokinsturms einzuschätzen. Die präklinische Sicherheitsbewertung dieses Antikörpers

beinhaltete die Testung des löslichen Antikörpers bei der Stimulation humaner PBMCs und die intravenöse Applikation hoher Konzentrationen in Makaken, wobei keine Auffälligkeiten festgestellt wurden [266]. Dennoch resultierte in einer Phase I Studie mit gesunden Probanden bereits eine Dosis von 0,1 mg/kg des Antikörpers zu einem lebensbedrohlichen CRS mit einem dramatischen Anstieg der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-8, IL-6, IL-4, IL-2 und IL-1 $\beta$  [267]. Auch der starke CD40 Agonist Selicrelumab führte in einer Phase I Studie bei über 10 % der Patienten zu einem Dosis-limitierendem CRS (insgesamt zeigten 56 % (15/27) der Patienten CRS Symptome), wodurch die maximal-tolerierte Dosis (MTD) für weitere Studien auf 0,2 mg/kg festgelegt wurde [268]. Um die Stärke der systemischen Immunaktivierung durch monoklonale Antikörper abschätzen zu können, ist es daher sinnvoll, in präklinischen Studien die Zytokinfreisetzung im Vergleich zu bereits charakterisierten Antikörpern zu bestimmen. Neue Methoden zur *in vitro* Darstellung eines CRS zeigen, dass die Testung an PBMCs aus HD-Kulturen oder in Ko-Kulturen mit HUVEC-Zellen gut mit beobachteten Effekten in klinischen Studien korrelieren [134]. Bei dem Vergleich der Zytokinsekretion (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-8, IL-6 und IL-2) der anti-CD40 hIgG1 Varianten und den relevanten Positivkontrollen Selicrelumab und TGN-1412 führten beide Experimentbedingungen zu vergleichbaren Resultaten und deutlichen Unterschieden zwischen den getesteten Antikörpern. Beide Positivkontrollen führten zu einem deutlichen Anstieg aller getesteten Zytokine mit den stärksten Effekten für IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Anzumerken ist, dass die verwendete Konzentration von 10  $\mu$ g/ml (entspreche ungefähr einer Dosis von 0,5 mg/kg TGN-1412; [266]), zumindest theoretisch für TGN-1412, deutlich höher ist, als die bisher in der Klinik getesteten 0,1 mg/kg. Die Resultate für Selicrelumab bestätigen allerdings qualitativ die Analysen von Patienten, welche nach Behandlung mit Selicrelumab deutlich erhöhte IL-6 und TNF- $\alpha$  Serumlevel zeigten [108]. Im Gegensatz dazu hatten die beiden anti-CD40 hIgG1 Varianten nahezu keinen Einfluss auf die Freisetzung von IL-2, IL-6, IL-8 und IL-10. Bei den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zeigte sich allerdings die gesteigerte Fc-vermittelte Immunzellaktivierung durch den anti-CD40 hIgG1-GO. Anders als der stark-fukosylierte Antikörper führte der anti-CD40 hIgG1-GO unter beiden Experimentbedingungen zu einem deutlichen Anstieg beider Zytokine, wodurch seine Effektorfunktionen bestätigt werden. Die freigesetzten Konzentrationen liegen dabei allerdings deutlich unterhalb der beiden relevanten Positivkontrollen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Notwendigkeit der Fc-Fc $\gamma$ RIIIa Interaktion eine Rolle für die Stärke des CRS spielen kann und so eventuell die Toxizität bei einer systemischen Antikörpergabe reduziert. Anders als für den Superagonisten Selicrelumab (MTD: 0,2 mg/kg; [268]) liegt die MTD für die hIgG1 Antikörper ChiLob 7/4 (2,1-3,3 mg/kg; [250]), SGN-40 (2 mg/kg; [269]) und ADC-1013 (< 1,2

mg/kg; [248]) deutlich höher. Die höchste derzeit getestete Dosis des defukosylierten SEA-CD40 liegt bei 60 µg/kg, welche gut toleriert wurde und erste antitumor Aktivitäten zeigte [270]. Ein direkter Vergleich der Zytokinfreisetzung durch die generierten anti-CD40 hIgG1 und hIgG2 Varianten wurde bisher nicht durchgeführt. Da der starke Agonismus von Selicrelumab auch an seinem besonderen Epitop liegen kann, sollten in zukünftigen Analysen zur Bestätigung dieser Theorie deshalb auch die generierten anti-CD40 hIgG2 Varianten getestet werden.

Weitere Möglichkeiten die Anwendbarkeit und Verträglichkeit agonistischer Antikörper zu erhöhen sind die Verwendung alternativer Applikationswege oder die Generierung neuartiger Konstrukte. Knorr und Kollegen konnten zeigen, dass die Optimierung der agonistischen Aktivität eines anti-CD40 Antikörpers die Nebenwirkungen einer systemischen Therapie deutlich verstärkt und über die daraus resultierende geringe Dosis die antitumor Aktivität eingeschränkt wird [244]. In ihren Experimenten mit humanisierten Mäusen führte die intratumorale Applikation des Antikörpers bei einer Konzentration, bei welcher keine der klassischen anti-CD40 Nebenwirkungen (z. B. Thrombozytopenie, erhöhte Leberwerte und Nekrose von Hepatozyten) auftreten, zu einer vollständigen und dauerhaften Tumorreduktion, auch in nicht-injizierte Tumore. In einer ersten Studie, welche die Applikation des anti-CD40 ADC-1013 (JNJ-64457107) in Metastasen von Patienten mit soliden Tumoren testete, konnten diese Ergebnisse vorerst nicht bestätigt werden, sie zeigt aber bereits mögliche Optimierungsmöglichkeiten auf [263]. Eine Alternative zur direkten Applikation des agonistischen Antikörpers in das Tumorgewebe bietet die Verwendung von bispezifischen Antikörpern. So führte beispielsweise die Kombination der Spezifitäten für CD40 und zum Fibroblasten-Aktivierungsprotein Alpha (FAP) in einem Antikörper nur im Beisein von FAP positiven Zellen zur agonistischen Aktivierung von Immunzellen. Bei deutlich verringerter Toxizität inhibierte dieses Konstrukt das Tumorwachstum stärker als ein monospezifischer anti-CD40 Antikörper [271]. Auch dieses Konzept wird derzeit in einer Phase I Dosisfindungsstudie durch die Firma AbbVie mit dem Konstrukt ABBV-428 erprobt (NCT02955251) und wird bereits für andere ko-stimulierende Moleküle wie z. B. CD137 getestet (TRIDENT™ (CD137x5T4, CD137xHer2), Macrogenics; FS222 (CD137xPD-L1), F-Star; RG7826 (CD137LxFAP), Roche; PRS-343 (CD137xHer2 Anticalin), Pieris).

## 7 Fazit und Ausblick

Monoklonale Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene und Immun-Checkpoint-Moleküle sind ein wichtiger Bestandteil der Krebsimmuntherapie. Dennoch spricht auf klassische Antikörpertherapien nur ein begrenzter Anteil der Patienten an, wodurch eine hohe Notwendigkeit für verbesserte Therapien durch optimierte Moleküle und/oder die Kombination mehrerer Therapiekonzepte besteht. Eine Möglichkeit die Immunstimulation durch monoklonale Antikörper zu erhöhen bietet die Glyko-Optimierung des Antikörper Fc-Anteils. Beispiele sind die Zulassungen der glyko-optimierten Antikörper Obinutuzumab und Mogamulizumab.

Durch die vorgelegte Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Fc-Fukosylierung für hIgG1 Antikörper gegen EGFR und CD40 zu einer verbesserten Vernetzung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem beiträgt. Dabei führte die deutlich stärkere Immunaktivierung durch Tomuzotuximab ebenfalls zur verstärkten Regulation immuninhibierender Checkpoint-Moleküle, was möglicherweise das Ausbleiben des besseren Ansprechens in einer klinischen Vergleichsstudie mit Cetuximab erklären kann. Die präsentierten Experimente fokussierten sich bisher auf die Rolle der PD-1/PD-L1 Achse als möglicher Resistenzmechanismus für die Therapie mit Tomuzotuximab. Vorläufige Ergebnisse zur Regulation von CD137, CD40 und HLA-E, sowie Literaturhinweise zur Regulation weiterer Checkpoint-Moleküle durch Cetuximab (z. B. TIM-3, CTLA-4; [21]), sollten die Basis für weiterführende Untersuchungen sein, um die immunmodulierenden Auswirkungen einer Fc-optimierten Therapie besser zu charakterisieren und optimale Kombinationspartner zu identifizieren.

Die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Experimente basierten alle auf *in vitro* kultivierten Zellkulturen, weshalb es ein Ziel in Folgestudien sein sollte, diese auf komplexere Systeme zu übertragen. Ob Mausmodelle an dieser Stelle die richtige Wahl sind, sollte in Frage gestellt werden, da 1) auch derzeitige, humanisierte Mausmodelle nicht alle Fc-Fc $\gamma$ R Interaktionen korrekt abbilden können und daher nicht klar ist, ob die komplexe Immunmodulation durch Fc-optimierte Antikörper abgebildet werden kann und 2) der allgemeine Effekt der Defukosylierung in Mäusen bereits mehrfach gezeigt wurde, dieser allerdings auf Immunreaktionen beruht, welche sich nicht auf das humane System übertragen lassen. Ein spannender Ansatz aktueller Forschung ist die Testung an Patientenabgeleiteten 2- und 3D-Kultursystemen. Vergleiche der Ansprechraten dieser Kulturen mit dem tatsächlichen Ansprechen von Patienten zeigen erste



Korrelationen z. B. mit Immuntherapien [272] und könnten in der Zukunft dazu dienen, geeignete Patienten zu identifizieren und den möglichen Erfolg von klinischen Studien bereits vor einer tatsächlichen Therapie abschätzen zu können. Tomuzotuximab wurde bereits klinisch entwickelt, weshalb ein weiterer Ansatz zur Bestätigung der Relevanz der *in vitro* generierten Daten die direkte Analyse der Immunmodulation im Patienten sein sollte. Erste Analysen einer Zwischenauswertung der GATTO-Studie (Manuskript in Vorbereitung) bestätigen bereits die starke Induktion von PD-L1 auf peripheren Monozyten durch Tomuzotuximab-Behandlung und einen hohen Anteil PD-1 positiver T-Zellen in Patienten mit HNC und CRC. Zukünftige Analysen weiterer Checkpoint- und Aktivierungs-Marker auf PBMCs und Tumorbiopsien könnten Anhaltspunkte für weitere Kombinationsstrategien liefern. Die deutlich stärkere Immunaktivierung, die Regulationen von Immun-Checkpoint-Molekülen und erste Kombinationsexperimente deuten darauf hin, dass Tomuzotuximab ein effektiverer Partner als Cetuximab für die Kombination mit Immun-Checkpoint-Antikörpern ist.

Eine Möglichkeit die antitumor Immunität von Patienten zu verbessern ist es, das Immunsystem an verschiedenen Regulationspunkten zu stimulieren. Durch die Expression von CD40 auf Tumorzellen und verschiedenen Immunzellen kann der glyko-optimierte anti-CD40 hIgG1 Antikörper verschiedene Schritte der antitumor Immunantwort [273] beeinflussen. So führte der anti-CD40 hIgG1-GO zur stärksten Reifung von DCs, Aktivierung von NK- und T-Zellen, Infiltration von Immunzellen in Tumorsphäroide und Lyse von Tumorzellen durch ADCC. Zusätzlich konnten in Experimenten zu Sicherheitsaspekten keine kritischen Effekte hinsichtlich der Depletion von Immunzellen und einer übermäßigen Zytokinenfreisetzung festgestellt werden. Dennoch sollte die mögliche Gefahr eines CRS nicht unterschätzt werden, was anhand der geringen Dosis-Steigerungen in der Dosisfindungsstudie von SEA-CD40 deutlich wird. In anschließenden Studien sollte außerdem geklärt werden, ob die Notwendigkeit der Fc-Vernetzung und dessen Abhängigkeit von FcγRIIIa-exprimierenden Immunzellen die Anwendbarkeit von agonistischen IgG1 Antikörpern einschränkt. Ein Fokus beim Einsatz glyko-optimierter Antikörper und Kombinationstherapien sollte deshalb auch auf der Auswahl geeigneter Patienten und Indikationen liegen, da für eine erfolgreiche Immuntherapie neben der Expression der Antikörper-Zielstruktur auch ein Immunsystem benötigt wird, welches auf eine Immuntherapie ansprechen kann. Eine Subgruppen-Analyse der RESGEX Studien zeigte bereits positive Einflüsse von Tomuzotuximab bei Patienten mit besserem Immunstatus [58]. Daher sollten für die Auswahl von Patienten zur Therapie mit glyko-optimierten Antikörpern

immunologische Parameter, wie z. B. das Vorliegen und die Aktivierbarkeit intratumoraler Effektorzellen, in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend heben die Ergebnisse dieser Doktorarbeit das Potenzial glyko-optimierter Antikörper gegen den EGFR und CD40 als Modulatoren des Immunsystems und als Kombinationspartner von Immuntherapien hervor. Wie sich diese Eigenschaften auf die Antitumor-Effektivität, speziell in Kombinationen mit anti-PD-1/anti-PD-L1 Antikörpern auswirken, sollte in klinischen Studien getestet werden.

## 8 Literatur

1. Barnes B, Bertz J, Buttmann-Schweiger N, Fiebig J, Jordan S, Kraywinkel K, Niemann H, Nowossadeck E, Poethko-Müller C, Prütz F, Rattay P, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U: **Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016**; 2016.
2. Higel F, Seidl A, Sorgel F, Friess W: **N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins**. *Eur J Pharm Biopharm* 2016, **100**:94-100.
3. Kretschmer A, Schwanbeck R, Valerius T, Rösner T: **Antibody Isotypes for Tumor Immunotherapy**. *Transfus Med Hemother* 2017, **44**(5):320-326.
4. Bruhns P: **Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models**. *Blood* 2012, **119**(24):5640-5649.
5. Kimberly R, Wu J, Gibson A, Su K, Qin H, Li X, Edberg J: **Diversity and Duplicity: Human Fc gamma Receptors in Host Defense and Autoimmunity**. *Immunologic research* 2002, **26**:177-189.
6. Beers SA, Glennie MJ, White AL: **Influence of immunoglobulin isotype on therapeutic antibody function**. *Blood* 2016, **127**(9):1097-1101.
7. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK: **Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy**. *Expert Opin Ther Targets* 2012, **16**(1):15-31.
8. Wieduwilt MJ, Moasser MM: **The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics**. *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**(10):1566-1584.
9. Baselga J: **Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy**. *Oncologist* 2002, **7 Suppl 4**:2-8.
10. Wee P, Wang Z: **Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways**. *Cancers (Basel)* 2017, **9**(5):52.
11. Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T: **Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms**. *Int J Mol Sci* 2017, **18**(11).
12. Overdijk MB, Verploegen S, van den Brakel JH, Lammerts van Bueren JJ, Vink T, van de Winkel JG, Parren PW, Bleeker WK: **Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity plays a prominent role in inhibiting tumorigenesis, even of tumor cells insensitive to EGFR signaling inhibition**. *J Immunol* 2011, **187**(6):3383-3390.
13. Mandal R, Senbabaoglu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, Lee KW, Ganly I, Hakimi AA, Chan TA, Morris LG: **The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications**. *JCI Insight* 2016, **1**(17):e89829.
14. Agarwal V, Subash A, Nayar RC, Rao V: **Is EGFR really a therapeutic target in head and neck cancers?** *J Surg Oncol* 2019, **119**(6):685-686.
15. Holubec L, Polivka J, Jr., Safanda M, Karas M, Liska V: **The Role of Cetuximab in the Induction of Anticancer Immune Response in Colorectal Cancer Treatment**. *Anticancer Res* 2016, **36**(9):4421-4426.
16. Magnes T, Melchardt T, Hufnagl C, Weiss L, Mittermair C, Neureiter D, Klieser E, Rinnerthaler G, Roesch S, Gaggl A, Greil R, Egle A: **The influence of FCGR2A and FCGR3A polymorphisms on the survival of patients with recurrent or metastatic squamous cell head and neck cancer treated with cetuximab**. *Pharmacogenomics J* 2018, **18**(3):474-479.
17. Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalberg JR, Dobrovic A: **A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer**. *J Hematol Oncol* 2013, **6**:1.
18. Trotta AM, Ottaiano A, Romano C, Nasti G, Nappi A, De Divitiis C, Napolitano M, Zanotta S, Casaretti R, D'Alterio C, Avallone A, Califano D, Iaffaioli RV, Scala S: **Prospective Evaluation of Cetuximab-Mediated Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients Predicts Treatment Efficacy**. *Cancer Immunol Res* 2016, **4**(4):366-374.
19. Concha-Benavente F, Srivastava RM, Trivedi S, Lei Y, Chandran U, Seethala RR, Freeman GJ, Ferris RL: **Identification of the Cell-Intrinsic and -Extrinsic Pathways Downstream of EGFR and IFNgamma That Induce PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer**. *Cancer Res* 2016, **76**(5):1031-1043.
20. Ferris RL, Lenz HJ, Trotta AM, Garcia-Foncillas J, Schulten J, Audhuy F, Merlano M, Milano G: **Rationale for combination of therapeutic antibodies targeting tumor cells and immune**

- checkpoint receptors: Harnessing innate and adaptive immunity through IgG1 isotype immune effector stimulation.** *Cancer Treat Rev* 2018, **63**:48-60.
21. Jie HB, Schuler PJ, Lee SC, Srivastava RM, Argiris A, Ferrone S, Whiteside TL, Ferris RL: **CTLA-4(+) Regulatory T Cells Increased in Cetuximab-Treated Head and Neck Cancer Patients Suppress NK Cell Cytotoxicity and Correlate with Poor Prognosis.** *Cancer Res* 2015, **75**(11):2200-2210.
  22. Li J, Srivastava RM, ETTYREDDY A, Ferris RL: **Cetuximab ameliorates suppressive phenotypes of myeloid antigen presenting cells in head and neck cancer patients.** *J Immunother Cancer* 2015, **3**:54.
  23. Pander J, Heusinkveld M, van der Straaten T, Jordanova ES, Baak-Pablo R, Gelderblom H, Morreau H, van der Burg SH, Guchelaar HJ, van Hall T: **Activation of tumor-promoting type 2 macrophages by EGFR-targeting antibody cetuximab.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(17):5668-5673.
  24. Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, Lopez-Albaitero A, Gibson SP, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL: **Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(7):1858-1872.
  25. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, Ferrone S, Garcia-Bates TM, Li J, Ferris RL: **Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients.** *Clin Cancer Res* 2016, **22**(21):5229-5237.
  26. Yang X, Zhang X, Mortenson ED, Radkevich-Brown O, Wang Y, Fu YX: **Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses.** *Mol Ther* 2013, **21**(1):91-100.
  27. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M: **Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype.** *Blood* 1997, **90**(3):1109-1114.
  28. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ: **Variant Genotypes of the Low-Affinity Fcγ Receptors in Two Control Populations and a Review of Low-Affinity Fcγ Receptor Polymorphisms in Control and Disease Populations.** *Blood* 1999, **94**(12):4220-4232.
  29. Mimura Y, Katoh T, Saldova R, O'Flaherty R, Izumi T, Mimura-Kimura Y, Utsunomiya T, Mizukami Y, Yamamoto K, Matsumoto T, Rudd PM: **Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy.** *Protein & Cell* 2018, **9**(1):47-62.
  30. Jefferis R: **Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics.** *Arch Biochem Biophys* 2012, **526**(2):159-166.
  31. Jennewein MF, Alter G: **The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation.** *Trends in Immunology* 2017, **38**(5):358-372.
  32. Abes R, Teillaud JL: **Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG.** *Pharmaceuticals (Basel)* 2010, **3**(1):146-157.
  33. Goh JB, Ng SK: **Impact of host cell line choice on glycan profile.** *Crit Rev Biotechnol* 2018, **38**(6):851-867.
  34. Hossler P, Khattak SF, Li ZJ: **Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture.** *Glycobiology* 2009, **19**(9):936-949.
  35. Beck A, Reichert JM: **Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering.** *MAbs* 2012, **4**(4):419-425.
  36. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ, Platts-Mills TA: **Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose.** *N Engl J Med* 2008, **358**(11):1109-1117.
  37. Li W, Zhu Z, Chen W, Feng Y, Dimitrov DS: **Crystallizable Fragment Glycoengineering for Therapeutic Antibodies Development.** *Front Immunol* 2017, **8**:1554-1554.
  38. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, Phillips E, Sangha R, Schlag R, Seymour JF, Townsend W, Trněný M, Wenger M, Fingerle-Rowson G, Rufibach K, Moore T, Herold M, Hiddemann W: **Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma.** *New England Journal of Medicine* 2017, **377**(14):1331-1344.
  39. Kim YH, Bagot M, Pinter-Brown L, Rook AH, Porcu P, Horwitz SM, Whittaker S, Tokura Y, Vermeer M, Zinzani PL, Sokol L, Morris S, Kim EJ, Ortiz-Romero PL, Eradat H, Scarisbrick J, Tsianakas A, Elmets C, Dalle S, Fisher DC, Halwani A, Poligone B, Greer J, Fierro MT, Khot A, Moskowitz AJ, Musiek A, Shustov A, Pro B, Geskin LJ, Dwyer K, Moriya J, Leoni M, Humphrey

- JS, Hudgens S, Grebennik DO, Tobinai K, Duvic M: **Mogamulizumab versus vorinostat in previously treated cutaneous T-cell lymphoma (MAVORIC): an international, open-label, randomised, controlled phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2018, **19**(9):1192-1204.
40. Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, Yang Y, Huang L, Burke S, Li H, Ciccarone V, Zhang T, Stavenhagen J, Koenig S, Stewart SJ, Moore PA, Johnson S, Bonvini E: **Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**(6):R123.
41. Rugo HS, Im S-A, Wright GLS, Escriva-de-Romani S, DeLaurentiis M, Cortes J, Bahadur SW, Haley BB, Oyola RH, Riseberg DA, Musolino A, Cardoso F, Curigliano G, Kaufman PA, Pegram MD, Edlich S, Hong S, Rock EP, Gradishar WJ: **SOPHIA primary analysis: A phase 3 (P3) study of margetuximab (M) + chemotherapy (C) versus trastuzumab (T) + C in patients (pts) with HER2+ metastatic (met) breast cancer (MBC) after prior anti-HER2 therapies (Tx).** *Journal of Clinical Oncology* 2019, **37**(15\_suppl):1000-1000.
42. Goletz S, Danielczyk A, Stahn R, Karsten U, Stoeckl L, Loeffler A, Hillemann A, Baumeister H: **GlycoOptimization for Fully Human and Largely Improved Biopharmaceutical Antibodies and Proteins.** *Beilstein-Institut* 2009.
43. Mastrangeli R, Palinsky W, Bierau H: **Glycoengineered antibodies: towards the next-generation of immunotherapeutics.** *Glycobiology* 2019, **29**(3):199-210.
44. Fiedler W, Cresta S, Schulze-Bergkamen H, De Dosso S, Weidmann J, Tessari A, Baumeister H, Danielczyk A, Dietrich B, Goletz S, Zurlo A, Salzberg M, Sessa C, Gianni L: **Phase I study of tomuzotuximab, a glycoengineered therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced carcinomas.** *ESMO Open* 2018, **3**(2):e000303.
45. Gerdes CA, Nicolini VG, Herter S, van Puijenbroek E, Lang S, Roemmele M, Moessner E, Freytag O, Friess T, Ries CH, Bossenmaier B, Mueller HJ, Umana P: **GA201 (RG7160): a novel, humanized, glycoengineered anti-EGFR antibody with enhanced ADCC and superior in vivo efficacy compared with cetuximab.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(5):1126-1138.
46. Braig F, Kriegs M, Voigtlaender M, Habel B, Grob T, Biskup K, Blanchard V, Sack M, Thalhammer A, Ben Batalla I, Braren I, Laban S, Danielczyk A, Goletz S, Jakubowicz E, Markl B, Trepel M, Knecht R, Riecken K, Fehse B, Loges S, Bokemeyer C, Binder M: **Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancer Is Mediated by EGFR-K521 Polymorphism.** *Cancer Res* 2017, **77**(5):1188-1199.
47. Muhammad S, Jiang Z, Liu Z, Kaur K, Wang X: **The role of EGFR monoclonal antibodies (MoABs) cetuximab/panitumab, and BRAF inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer.** *J Gastrointest Oncol* 2013, **4**(1):72-81.
48. Stoehlmacher-Williams J, Obermann L, Ehninger G, Goekkurt E: **Polymorphisms of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and survival in patients with advanced cancer of the head and neck (HNSCC).** *Anticancer Res* 2012, **32**(2):421-425.
49. Keilholz U, Kawecki A, Dietz A, Zurawski B, Schenker M, Kukielka-Budny B, Schafhausen P, Mihailov AC, Ochendusko S, Imarisio I, Mihutiu S, Oprean C-M, Folprecht G, Turcu A, Rottey S, Debourdeau P, Lavernia J, Dietrich B, Zurlo A, Fayette J: **Efficacy and safety of CetuGEX in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (RM-HNSCC): Results from the randomized phase II RESGEX study.** *Journal of Clinical Oncology* 2018, **36**(5\_suppl):59-59.
50. Delord J-P, Tabernero J, García-Carbonero R, Cervantes A, Gomez-Roca C, Bergé Y, Capdevila J, Paz-Ares L, Roda D, Delmar P, Oppenheim D, Brossard SS, Farzaneh F, Manenti L, Passiukov A, Ott MG, Soria J-C: **Open-label, multicentre expansion cohort to evaluate imgatuzumab in pre-treated patients with KRAS-mutant advanced colorectal carcinoma.** *European Journal of Cancer* 2014, **50**(3):496-505.
51. Temam S, Spicer J, Farzaneh F, Soria JC, Oppenheim D, McGurk M, Hollebecque A, Sarini J, Hussain K, Soehrman Brossard S, Manenti L, Evers S, Delmar P, Di Scala L, Mancao C, Feuerhake F, Andries L, Ott MG, Passiukov A, Delord JP: **An exploratory, open-label, randomized, multicenter study to investigate the pharmacodynamics of a glycoengineered antibody (imgatuzumab) and cetuximab in patients with operable head and neck squamous cell carcinoma.** *Ann Oncol* 2017, **28**(11):2827-2835.
52. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, Touge H, Makino H, Takata M, Miyata M, Nakamoto M, Burioka N, Shimizu E: **Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(5):1552-1561.
53. Oppenheim DE, Spreafico R, Etuk A, Malone D, Amofah E, Pena-Murillo C, Murray T, McLaughlin L, Choi BS, Allan S, Belousov A, Passiukov A, Gerdes C, Umana P, Farzaneh F,

- Ross P: **Glyco-engineered anti-EGFR mAb elicits ADCC by NK cells from colorectal cancer patients irrespective of chemotherapy.** *Br J Cancer* 2014, **110**(5):1221-1227.
54. Pinto C, Barone CA, Girolomoni G, Russi EG, Merlano MC, Ferrari D, Maiello E: **Management of skin toxicity associated with cetuximab treatment in combination with chemotherapy or radiotherapy.** *Oncologist* 2011, **16**(2):228-238.
55. Goletz C, Rühmann J, Habel B, Danielczyk A, Goletz S: **Abstract B068: Hydrocortisone, prednisolone, methylprednisolone, and dexamethasone inhibit CetuGEX™-mediated ADCC in vitro.** *Cancer Immunology Research* 2016, **4**(11 Supplement):B068.
56. Gonzalez-Nicolini V, Herter S, Lang S, Waldhauer I, Bacac M, Roemmele M, Bommer E, Freytag O, van Puijenbroek E, Umana P, Gerdes CA: **Premedication and Chemotherapy Agents do not Impair Imgatuzumab (GA201)-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Combination Therapies Enhance Efficacy.** *Clin Cancer Res* 2016, **22**(10):2453-2461.
57. Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, Monteverde M, Strola G, Lucio F, Tonissi F, Miraglio E, Granetto C, Fortunato M, Merlano MC: **Evaluation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity and cetuximab response in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer patients.** *World J Gastrointest Oncol* 2016, **8**(2):222-230.
58. Baumeister H, Zurlo A, Fayette J, Dietrich B, Keilholz U: **CetuGEX and cetuximab in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (RM-HNSCC): PK/PD results from the phase II RESGEX study.** *Journal of Clinical Oncology* 2018, **36**(5\_suppl):61-61.
59. Allen CT, Clavijo PE, Van Waes C, Chen Z: **Anti-Tumor Immunity in Head and Neck Cancer: Understanding the Evidence, How Tumors Escape and Immunotherapeutic Approaches.** *Cancers (Basel)* 2015, **7**(4):2397-2414.
60. Bedi A, Chang X, Noonan K, Pham V, Bedi R, Fertig EJ, Considine M, Califano JA, Borrello I, Chung CH, Sidransky D, Ravi R: **Inhibition of TGF-beta enhances the in vivo antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(11):2429-2439.
61. Drennan S, Stafford ND, Greenman J, Green VL: **Increased frequency and suppressive activity of CD127(low/-) regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma are associated with advanced stage and nodal involvement.** *Immunology* 2013, **140**(3):335-343.
62. Chow LQM, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, Berger R, Eder JP, Burtneß B, Lee S-H, Keam B, Kang H, Muro K, Weiss J, Geva R, Lin C-C, Chung HC, Meister A, Dolled-Filhart M, Pathiraja K, Cheng JD, Seiwert TY: **Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort.** *Journal of Clinical Oncology* 2016, **34**(32):3838-3845.
63. Chang AMV, Chiosea SI, Altman A, Pagdanganan HA, Ma C: **Programmed Death-Ligand 1 Expression, Microsatellite Instability, Epstein-Barr Virus, and Human Papillomavirus in Nasopharyngeal Carcinomas of Patients from the Philippines.** *Head Neck Pathol* 2017, **11**(2):203-211.
64. Chan OS, Kowanetz M, Ng WT, Koeppen H, Chan LK, Yeung RM, Wu H, Amler L, Mancao C: **Characterization of PD-L1 expression and immune cell infiltration in nasopharyngeal cancer.** *Oral Oncol* 2017, **67**:52-60.
65. Scognamiglio T, Chen YT: **Beyond the Percentages of PD-L1-Positive Tumor Cells: Induced Versus Constitutive PD-L1 Expression in Primary and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Head Neck Pathol* 2018, **12**(2):221-229.
66. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML: **Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck.** *New England Journal of Medicine* 2016, **375**(19):1856-1867.
67. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, Worden F, Liu SV, Gilbert J, Saba NF, Weiss J, Wirth L, Sukari A, Kang H, Gibson MK, Massarelli E, Powell S, Meister A, Shu X, Cheng JD, Haddad R: **Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study.** *J Clin Oncol* 2017, **35**(14):1542-1549.
68. Chureemas T, Larbcharoensub N, Juengsamarn J, Layangkool T, Jiarpinitnun C, Chansriwong P, Trachu N, Pattaranutaporn P, Ngamphaiboon N: **Prevalence, pattern, and impact of PD-L1 expression and HPV-status in head and neck squamous cell carcinoma.** *Japanese Society of Medical Oncology* 2016, **27**.

69. Solomon B, Young RJ, Bressel M, Urban D, Hendry S, Thai A, Angel C, Haddad A, Kowanzetz M, Fua T, Corry J, Fox S, Rischin D: **Prognostic Significance of PD-L1(+) and CD8(+) Immune Cells in HPV(+) Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.** *Cancer Immunol Res* 2018, **6(3)**:295-304.
70. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, Heath K, McClanahan T, Lunceford J, Gause C, Cheng JD, Chow LQ: **Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial.** *Lancet Oncol* 2016, **17(7)**:956-965.
71. Korehisa S, Oki E, Iimori M, Nakaji Y, Shimokawa M, Saeki H, Okano S, Oda Y, Maehara Y: **Clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expression and the immune microenvironment at the invasive front of colorectal cancers with high microsatellite instability.** *Int J Cancer* 2018, **142(4)**:822-832.
72. Kim ST, Klempner SJ, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, Kang WK, Kim KM, Lee J: **Correlating programmed death ligand 1 (PD-L1) expression, mismatch repair deficiency, and outcomes across tumor types: implications for immunotherapy.** *Oncotarget* 2017, **8(44)**:77415-77423.
73. O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, Elez E, Raimbourg J, Gomez-Roca C, Ejadi S, Piha-Paul SA, Stein MN, Abdul Razak AR, Dotti K, Santoro A, Cohen RB, Gould M, Saraf S, Stein K, Han SW: **Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma.** *PLoS One* 2017, **12(12)**:e0189848.
74. Roussille P, Tachon G, Villalva C, Milin S, Frouin E, Godet J, Berger A, Emambux S, Petropoulos C, Wager M, Karayan-Tapon L, Tougeron D: **Pathological and Molecular Characteristics of Colorectal Cancer with Brain Metastases.** *Cancers (Basel)* 2018, **10(12)**.
75. Ehrlich P: **Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.** *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie* 1909:117-164.
76. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH: **Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer.** *Annu Rev Immunol* 2016, **34**:539-573.
77. McCoach CE, Bivona TG: **The evolving understanding of immunoediting and the clinical impact of immune escape.** *J Thorac Dis* 2018, **10(3)**:1248-1252.
78. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ: **New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.** *Curr Opin Immunol* 2014, **27**:16-25.
79. Pardoll DM: **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12(4)**:252-264.
80. Yao S, Zhu Y, Chen L: **Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation.** *Nat Rev Drug Discov* 2013, **12(2)**:130-146.
81. Heinzerling L, de Toni E, Schett G, Hundorfean G, Zimmer L: **Checkpoint-Inhibitoren.** *Dtsch Arztebl International* 2019, **116(8)**:119-126.
82. Fellner C: **Ipilimumab (yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: serious side effects and a hefty price tag may limit its use.** *P T* 2012, **37(9)**:503-530.
83. Chen DS, Mellman I: **Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point.** *Nature* 2017, **541(7637)**:321-330.
84. Kyi C, Postow MA: **Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy.** *FEBS Lett* 2014, **588(2)**:368-376.
85. Menon S, Shin S, Dy G: **Advances in Cancer Immunotherapy in Solid Tumors.** *Cancers (Basel)* 2016, **8(12)**:106.
86. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN: **Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint.** *Immunity* 2018, **48(3)**:434-452.
87. Gelao L, Criscitiello C, Esposito A, Goldhirsch A, Curigliano G: **Immune checkpoint blockade in cancer treatment: a double-edged sword cross-targeting the host as an "innocent bystander".** *Toxins (Basel)* 2014, **6(3)**:914-933.
88. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X: **Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway.** *Trends Mol Med* 2015, **21(1)**:24-33.
89. Chen N, Fang W, Zhan J, Hong S, Tang Y, Kang S, Zhang Y, He X, Zhou T, Qin T, Huang Y, Yi X, Zhang L: **Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation.** *J Thorac Oncol* 2015, **10(6)**:910-923.
90. Chen X, Song X, Li K, Zhang T: **FcγR-Binding Is an Important Functional Attribute for Immune Checkpoint Antibodies in Cancer Immunotherapy.** *Front Immunol* 2019, **10**:292-292.

91. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang KY, Schlom J: **Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells.** *Cancer Immunol Res* 2015, **3**(10):1148-1157.
92. Donahue RN, Lepone LM, Grenga I, Jochems C, Fantini M, Madan RA, Heery CR, Gulley JL, Schlom J: **Analyses of the peripheral immunome following multiple administrations of avelumab, a human IgG1 anti-PD-L1 monoclonal antibody.** *J Immunother Cancer* 2017, **5**:20.
93. Fujii R, Friedman ER, Richards J, Tsang KY, Heery CR, Schlom J, Hodge JW: **Enhanced killing of chordoma cells by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity employing the novel anti-PD-L1 antibody avelumab.** *Oncotarget* 2016, **7**(23):33498-33511.
94. Juliá EP, Amante A, Pampena MB, Mordoh J, Levy EM: **Avelumab, an IgG1 anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor, Triggers NK Cell-Mediated Cytotoxicity and Cytokine Production Against Triple Negative Breast Cancer Cells.** *Front Immunol* 2018, **9**(2140).
95. Dahan R, Segal E, Engelhardt J, Selby M, Korman AJ, Ravetch JV: **FcγRs Modulate the Anti-tumor Activity of Antibodies Targeting the PD-1/PD-L1 Axis.** *Cancer Cell* 2015, **28**(3):285-295.
96. Goletz C, Lischke T, Harnack U, Schiele P, Danielczyk A, Rühmann J, Goletz S: **Glyco-Engineered Anti-Human Programmed Death-Ligand 1 Antibody Mediates Stronger CD8 T Cell Activation Than Its Normal Glycosylated and Non-Glycosylated Counterparts.** *Front Immunol* 2018, **9**:1614-1614.
97. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor DR, Salama AK, Taylor MH, Ott PA, Horak C, Gagnier P, Jiang J, Wolchok JD, Postow MA: **Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial.** *The Lancet Oncology* 2016, **17**(11):1558-1568.
98. Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM: **Comprehensive analysis of the clinical immunoncology landscape.** *Ann Oncol* 2018, **29**(1):84-91.
99. Bartkowiak T, Curran MA: **4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity.** *Front Oncol* 2015, **5**:117.
100. Vinay DS, Kwon BS: **4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy.** *BMB Rep* 2014, **47**(3):122-129.
101. Makkouk A, Chester C, Kohrt HE: **Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy.** *Eur J Cancer* 2016, **54**:112-119.
102. Yonezawa A, Dutt S, Chester C, Kim J, Kohrt HE: **Boosting Cancer Immunotherapy with Anti-CD137 Antibody Therapy.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(14):3113-3120.
103. Chu D-T, Bac ND, Nguyen K-H, Tien NLB, Thanh VV, Nga VT, Ngoc VTN, Anh Dao DT, Hoan LN, Hung NP, Trung Thu NT, Pham V-H, Vu LN, Pham TAV, Thimiri Govinda Raj DB: **An Update on Anti-CD137 Antibodies in Immunotherapies for Cancer.** *International journal of molecular sciences* 2019, **20**(8):1822.
104. Segal NH, Logan TF, Hodi FS, McDermott D, Melero I, Hamid O, Schmidt H, Robert C, Chiarion-Sileni V, Ascierto PA, Maio M, Urba WJ, Gangadhar TC, Suryawanshi S, Neely J, Jure-Kunkel M, Krishnan S, Kohrt H, Sznol M, Levy R: **Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody.** *Clin Cancer Res* 2017, **23**(8):1929-1936.
105. Segal NH, He AR, Doi T, Levy R, Bhatia S, Pishvaian MJ, Cesari R, Chen Y, Davis CB, Huang B, Thall AD, Gopal AK: **Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer.** *Clinical Cancer Research* 2018.
106. Bauman JE, Grandis JR: **Targeting secondary immune responses to cetuximab: CD137 and the outside story.** *The Journal of Clinical Investigation* 2014, **124**(6):2371-2375.
107. Chester C, Ambulkar S, Kohrt HE: **4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy.** *Cancer Immunol Immunother* 2016, **65**(10):1243-1248.
108. Vonderheide RH: **Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(4):1083-1088.
109. Ellmark P, Mangsbo SM, Furebring C, Tötterman TH, Norlén P: **Kick-starting the cancer-immunity cycle by targeting CD40.** *Oncoimmunology* 2015, **4**(7):e1011484-e1011484.
110. Vonderheide RH: **The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint.** *Cancer Cell* 2018, **33**(4):563-569.
111. Beatty GL, Li Y, Long KB: **Cancer immunotherapy: activating innate and adaptive immunity through CD40 agonists.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2017, **17**(2):175-186.



112. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y: **Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges.** *Journal of hematology & oncology* 2018, **11**(1):39-39.
113. Mayes PA, Hance KW, Hoos A: **The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer.** *Nat Rev Drug Discov* 2018, **17**(7):509-527.
114. Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Azpilikueta A, Etxeberria I, Bolanos E, Lang V, Rodriguez M, Aznar MA, Jure-Kunkel M, Melero I: **Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy.** *Eur J Immunol* 2016, **46**(3):513-522.
115. Chin SM, Kimberlin CR, Roe-Zurz Z, Zhang P, Xu A, Liao-Chan S, Sen D, Nager AR, Oakdale NS, Brown C, Wang F, Yang Y, Lindquist K, Yeung YA, Salek-Ardakani S, Chaparro-Riggers J: **Structure of the 4-1BB/4-1BBL complex and distinct binding and functional properties of utomilumab and urelumab.** *Nature Communications* 2018, **9**(1):4679.
116. Yu X, Chan HTC, Orr CM, Dadas O, Booth SG, Dahal LN, Penfold CA, O'Brien L, Mockridge CI, French RR, Duriez P, Douglas LR, Pearson AR, Cragg MS, Tews I, Glennie MJ, White AL: **Complex Interplay between Epitope Specificity and Isotype Dictates the Biological Activity of Anti-human CD40 Antibodies.** *Cancer cell* 2018, **33**(4):664-675.e664.
117. Vonderheide RH, Glennie MJ: **Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(5):1035-1043.
118. Richman LP, Vonderheide RH: **Anti-human CD40 monoclonal antibody therapy is potent without FcR crosslinking.** *Oncoimmunology* 2014, **3**:e28610.
119. White AL, Chan HTC, French RR, Willoughby J, Mockridge CI, Roghanian A, Penfold CA, Booth SG, Dodhy A, Polak ME, Potter EA, Ardern-Jones MR, Verbeek JS, Johnson PWM, Al-Shamkhani A, Cragg MS, Beers SA, Glennie MJ: **Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies.** *Cancer cell* 2015, **27**(1):138-148.
120. White AL, Chan HT, French RR, Beers SA, Cragg MS, Johnson PW, Glennie MJ: **FcγRIIIb controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs.** *Cancer Immunol Immunother* 2013, **62**(5):941-948.
121. White AL, Chan HT, Roghanian A, French RR, Mockridge CI, Tutt AL, Dixon SV, Ajona D, Verbeek JS, Al-Shamkhani A, Cragg MS, Beers SA, Glennie MJ: **Interaction with FcγRIIb is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody.** *J Immunol* 2011, **187**(4):1754-1763.
122. Bjorck P, Filbert E, Zhang Y, Yang X, Trifan O: **The CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M has potent immune stimulatory capabilities.** *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2015, **3**(Suppl 2):P198-P198.
123. Zhang Y, Yu G-L, Zhu W: **Anti-CD40 antibodies and methods of use** In. Edited by Inc A; 2013.
124. Fiedler W, Stoeger H, Perotti A, Gastl G, Weidmann J, Dietrich B, Baumeister H, Danielczyk A, Goletz S, Salzberg M, De Dosso S: **Phase I study of TrasGEX, a glyco-optimised anti-HER2 monoclonal antibody, in patients with HER2-positive solid tumours.** *ESMO Open* 2018, **3**(4):e000381.
125. Hart F, Danielczyk A, Goletz S: **Human Cell Line-Derived Monoclonal IgA Antibodies for Cancer Immunotherapy.** *Bioengineering (Basel)* 2017, **4**(2).
126. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M: **Wie bewertet man die p-Wert-Flut? Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen – Teil 10 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen.** *Dtsch Arztebl International* 2010, **107**(4):50-56.
127. Srivastava RM, Trivedi S, Concha-Benavente F, Gibson Sp, Reeder C, Ferrone S, Ferris RL: **CD137 stimulation enhances cetuximab induced natural killer (NK): dendritic cell (DC) priming of anti-tumor T cell immunity in head and neck cancer patients.** *Clinical Cancer Research* 2016:clincanres.0879.2016.
128. Wang L, Wei Y, Fang W, Lu C, Chen J, Cui G, Diao H: **Cetuximab Enhanced the Cytotoxic Activity of Immune Cells during Treatment of Colorectal Cancer.** *Cell Physiol Biochem* 2017, **44**(3):1038-1050.
129. Al-Shamkhani A, Chan HTC, Cragg MS, French RR, Glennie MJ, Willoughby J: **Immunomodulatory antibodies.** In. Edited by Technology CR; 2016.
130. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabel A, Tchaicha JH, Christensen CL, Mikse OR, Cherniack AD, Beauchamp EM, Pugh TJ, Wilkerson MD, Fecci PE, Butaney M, Reibel JB, Soucheray M, Cohoon TJ, Janne PA, Meyerson M, Hayes DN, Shapiro GI, Shimamura T, Sholl LM, Rodig SJ, Freeman GJ, Hammerman PS, Dranoff G, Wong KK: **Activation of the PD-1**

- pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov* 2013, **3**(12):1355-1363.
131. Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T, Matsumoto K, Takayama K, Takamori S, Kage M, Hoshino T, Nakanishi Y, Okamoto I: **Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer.** *Ann Oncol* 2014, **25**(10):1935-1940.
  132. Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, Tsai SC, Lai HW, Yang SM, Shen KH, Chen MK, Lee H, Yeh KT, Chen CJ: **High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma.** *PLoS One* 2015, **10**(11):e0142656.
  133. Xing K, Gu B, Zhang P, Wu X: **Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy.** *BMC Immunol* 2015, **16**:39.
  134. Grimaldi C, Finco D, Fort MM, Gliddon D, Harper K, Helms WS, Mitchell JA, O'Lone R, Parish ST, Piche MS, Reed DM, Reichmann G, Ryan PC, Stebbings R, Walker M: **Cytokine release: A workshop proceedings on the state-of-the-science, current challenges and future directions.** *Cytokine* 2016, **85**:101-108.
  135. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jager C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schull C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, Dabbagh K, Dyer MJ, Poppema S, Klein C, Umama P: **Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity.** *Blood* 2010, **115**(22):4393-4402.
  136. Marechal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Deviere J, Salmon I, Tejpar S, Van Laethem JL: **Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients.** *BMC Cancer* 2010, **10**:340.
  137. Lattanzio L, Denaro N, Vivenza D, Varamo C, Strola G, Fortunato M, Chamorey E, Comino A, Monteverde M, Lo Nigro C, Milano G, Merlano M: **Elevated basal antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and high epidermal growth factor receptor (EGFR) expression predict favourable outcome in patients with locally advanced head and neck cancer treated with cetuximab and radiotherapy.** *Cancer Immunol Immunother* 2017, **66**(5):573-579.
  138. Rocca YS, Roberti MP, Julia EP, Pampena MB, Bruno L, Rivero S, Huertas E, Sanchez Loria F, Pairola A, Caignard A, Mordoh J, Levy EM: **Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15.** *Front Immunol* 2016, **7**:413.
  139. Donatelli SS, Zhou JM, Gilvary DL, Eksioglu EA, Chen X, Cress WD, Haura EB, Schabath MB, Coppola D, Wei S, Djeu JY: **TGF-beta-inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(11):4203-4208.
  140. Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Goncalves A, Andre P, Romagne F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D: **Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity.** *J Clin Invest* 2011, **121**(9):3609-3622.
  141. Navabi S, Doroudchi M, Tashnizi AH, Habibagahi M: **Natural Killer Cell Functional Activity After 4-1BB Costimulation.** *Inflammation* 2015, **38**(3):1181-1190.
  142. Lin W, Voskens CJ, Zhang X, Schindler DG, Wood A, Burch E, Wei Y, Chen L, Tian G, Tamada K, Wang LX, Schulze DH, Mann D, Strome SE: **Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies.** *Blood* 2008, **112**(3):699-707.
  143. Misumi T, Tanabe K, Fujikuni N, Ohdan H: **Stimulation of natural killer cells with rhCD137 ligand enhances tumor-targeting antibody efficacy in gastric cancer.** *PLoS One* 2018, **13**(10):e0204880.
  144. Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, Peipp M, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Dechant M: **Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage.** *J Immunol* 2010, **184**(1):512-520.
  145. Mazorra Z, Lavastida A, Concha-Benavente F, Valdés A, Srivastava RM, García-Bates TM, Hechavarría E, González Z, González A, Lugiollo M, Cuevas I, Frómata C, Mestre BF, Barroso MC, Crombet T, Ferris RL: **Nimotuzumab Induces NK Cell Activation, Cytotoxicity, Dendritic**

**Cell Maturation and Expansion of EGFR-Specific T Cells in Head and Neck Cancer Patients.** *Front Pharmacol* 2017, **8**:382-382.

146. Romain G, Senyukov V, Rey-Villamizar N, Merouane A, Kelton W, Liadi I, Mahendra A, Charab W, Georgiou G, Roysam B, Lee DA, Varadarajan N: **Antibody Fc engineering improves frequency and promotes kinetic boosting of serial killing mediated by NK cells.** *Blood* 2014, **124**(22):3241-3249.
147. Schmied BJ, Riegg F, Zekri L, Grosse-Hovest L, Buhring HJ, Jung G, Salih HR: **An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of Natural Killer Cell Reactivity against Colorectal Cancer.** *Cancers (Basel)* 2019, **11**(6).
148. Derer S, Bauer P, Lohse S, Scheel AH, Berger S, Kellner C, Peipp M, Valerius T: **Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies.** *J Immunol* 2012, **189**(11):5230-5239.
149. Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, Fukuda K, Akimoto S, Hayashida T, Okabayashi K, Tsuruta M, Hasegawa H, Kitagawa Y: **Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer.** *Oncol Rep* 2014, **31**(5):2115-2122.
150. Makkouk A, Sundaram V, Chester C, Chang S, Colevas AD, Sunwoo JB, Maecker H, Desai M, Kohrt HE: **Characterizing CD137 upregulation on NK cells in patients receiving monoclonal antibody therapy.** *Ann Oncol* 2017, **28**(2):415-420.
151. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, Nair VS, Xu Y, Khuong A, Hoang CD, Diehn M, West RB, Plevritis SK, Alizadeh AA: **The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers.** *Nat Med* 2015, **21**(8):938-945.
152. De Palma M, Lewis CE: **Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies.** *Cancer Cell* 2013, **23**(3):277-286.
153. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S, Bronte V: **Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells.** *J Clin Invest* 2006, **116**(10):2777-2790.
154. Zhang W, Chen L, Ma K, Zhao Y, Liu X, Wang Y, Liu M, Liang S, Zhu H, Xu N: **Polarization of macrophages in the tumor microenvironment is influenced by EGFR signaling within colon cancer cells.** *Oncotarget; Vol 7, No 46* 2016.
155. Herter S, Birk MC, Klein C, Gerdes C, Umana P, Bacac M: **Glycoengineering of Therapeutic Antibodies Enhances Monocyte/Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity.** *The Journal of Immunology* 2014, **192**(5):2252.
156. Lotze MT: **Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer.** *Ann Surg* 1997, **226**(1):1-5.
157. Michielsen AJ, Noonan S, Martin P, Tosetto M, Marry J, Biniacka M, Maguire AA, Hyland JM, Sheahan KD, O'Donoghue DP, Mulcahy HE, Fennelly D, Ryan EJ, O'Sullivan JN: **Inhibition of dendritic cell maturation by the tumor microenvironment correlates with the survival of colorectal cancer patients following bevacizumab treatment.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(8):1829-1837.
158. Lopez-Albaitero A, Nayak JV, Ogino T, Machandia A, Gooding W, DeLeo AB, Ferrone S, Ferris RL: **Role of antigen-processing machinery in the in vitro resistance of squamous cell carcinoma of the head and neck cells to recognition by CTL.** *J Immunol* 2006, **176**(6):3402-3409.
159. Whiteside TL, Stanson J, Shurin MR, Ferrone S: **Antigen-processing machinery in human dendritic cells: up-regulation by maturation and down-regulation by tumor cells.** *J Immunol* 2004, **173**(3):1526-1534.
160. Xu S, Koski GK, Faries M, Bedrosian I, Mick R, Maeurer M, Cheever MA, Cohen PA, Czerniecki BJ: **Rapid high efficiency sensitization of CD8+ T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism.** *J Immunol* 2003, **171**(5):2251-2261.
161. Shayan G, Kansy BA, Gibson SP, Srivastava RM, Bryan JK, Bauman JE, Ohr J, Kim S, Duvvuri U, Clump DA, Heron DE, Johnson JT, Hershberg RM, Ferris RL: **Phase Ib Study of Immune Biomarker Modulation with Neoadjuvant Cetuximab and TLR8 Stimulation in Head and Neck Cancer to Overcome Suppressive Myeloid Signals.** *Clin Cancer Res* 2018, **24**(1):62-72.
162. Lee SC, Srivastava RM, Lopez-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL: **Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity.** *Immunol Res* 2011, **50**(2-3):248-254.

163. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A: **Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.** *Nature* 1997, **388**(6644):782-787.
164. Lopez-Albaitero A, Mailliard R, Hackman T, Andrade Filho PA, Wang X, Gooding W, Ferrone S, Kalinski P, Ferris RL: **Maturation pathways of dendritic cells determine TAP1 and TAP2 levels and cross-presenting function.** *J Immunother* 2009, **32**(5):465-473.
165. Ferris RL, Kim S, Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, Heron DE, Clump DA, Duvvuri U, Gooding WE, Johnson JT, Ohr J, Bauman JE: **Correlation of anti-tumor adaptive immunity with clinical response in a phase II "Window" trial of neoadjuvant cetuximab in patients with resectable stage III-IV head and neck squamous carcinoma (HNSCC).** *Journal of Clinical Oncology* 2016, **34**(15\_suppl):6060-6060.
166. Minutti CM, Drube S, Blair N, Schwartz C, McCrae JC, McKenzie AN, Kamradt T, Mokry M, Coffey PJ, Sibilia M, Sijts AJ, Fallon PG, Maizels RM, Zaiss DM: **Epidermal Growth Factor Receptor Expression Licenses Type-2 Helper T Cells to Function in a T Cell Receptor-Independent Fashion.** *Immunity* 2017, **47**(4):710-722.e716.
167. Zeboudj L, Maître M, Guyonnet L, Laurans L, Joffre J, Lemarie J, Bourcier S, Nour-Eldine W, Guérin C, Friard J, Wakkach A, Fabre E, Tedgui A, Mallat Z, Tharaux P-L, Ait-Oufella H: **Selective EGF-Receptor Inhibition in CD4+ T Cells Induces Anergy and Limits Atherosclerosis.** *Journal of the American College of Cardiology* 2018, **71**(2):160-172.
168. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S: **Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization.** *J Exp Med* 1999, **189**(2):371-380.
169. Oberg H-H, Kellner C, Peipp M, Sebens S, Adam-Klages S, Gramatzki M, Kabelitz D, Wesch D: **Monitoring circulating γδ T cells in cancer patients to optimize γδ T cell-based immunotherapy.** *Front Immunol* 2014, **5**(643).
170. Braza MS, Klein B, Fiol G, Rossi JF: **γδ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody.** *Haematologica* 2011, **96**(3):400-407.
171. Kadivar M, Petersson J, Svensson L, Marsal J: **CD8αβ<sup>+</sup> γδ T Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease.** *The Journal of Immunology* 2016, **197**(12):4584-4592.
172. Clemenceau B, Vivien R, Berthome M, Robillard N, Garand R, Gallot G, Vollant S, Vie H: **Effector memory αβ T lymphocytes can express FcγRIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity.** *J Immunol* 2008, **180**(8):5327-5334.
173. Kubach J, Hubo M, Amendt C, Stroh C, Jonuleit H: **IgG1 anti-epidermal growth factor receptor antibodies induce CD8-dependent antitumor activity.** *Int J Cancer* 2015, **136**(4):821-830.
174. Ma W, Concha-Benavente F, Santegoets S, Welters MJP, Ehsan I, Ferris RL, van der Burg SH: **EGFR signaling suppresses type 1 cytokine-induced T-cell attracting chemokine secretion in head and neck cancer.** *PLoS One* 2018, **13**(9):e0203402.
175. Roda JM, Parihar R, Magro C, Nuovo GJ, Tridandapani S, Carson WE, 3rd: **Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells.** *Cancer Res* 2006, **66**(1):517-526.
176. Ohta K, Naruse T, Kato H, Ishida Y, Nakagawa T, Ono S, Shigeishi H, Takechi M: **Differential regulation by IFNγ on TNFα-induced chemokine expression in synovial fibroblasts from temporomandibular joint.** *Mol Med Rep* 2017, **16**(5):6850-6857.
177. Mager LF, Wasmer M-H, Rau TT, Krebs P: **Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer.** *Frontiers in oncology* 2016, **6**:96-96.
178. Inoue Y, Hazama S, Suzuki N, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Tomochika S, Tsunedomi R, Tokuhisa Y, Iida M, Sakamoto K, Takeda S, Ueno T, Yoshino S, Nagano H: **Cetuximab strongly enhances immune cell infiltration into liver metastatic sites in colorectal cancer.** *Cancer Sci* 2017, **108**(3):455-460.
179. Van den Eynde M, Mlecnik B, Bindea G, Fredriksen T, Church SE, Lafontaine L, Haicheur N, Marliot F, Angelova M, Vasaturo A, Bruni D, Jouret-Mourin A, Baldin P, Huyghe N, Haustermans K, Debucquoy A, Van Cutsem E, Gigot JF, Hubert C, Kartheuser A, Remue C, Leonard D, Valge-Archer V, Pages F, Machiels JP, Galon J: **The Link between the Multiverse of Immune Microenvironments in Metastases and the Survival of Colorectal Cancer Patients.** *Cancer Cell* 2018, **34**(6):1012-1026.e1013.

180. Maniar A, Zhang X, Lin W, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, Chapoval AI: **Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement.** *Blood* 2010, **116**(10):1726-1733.
181. Vidard L, Dureuil C, Baudhuin J, Vescovi L, Durand L, Sierra V, Parmantier E: **CD137 (4-1BB) Engagement Fine-Tunes Synergistic IL-15- and IL-21-Driven NK Cell Proliferation.** *J Immunol* 2019, **203**(3):676-685.
182. Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, Kiener PA: **Constitutive Expression of Functional 4-1BB (CD137) Ligand on Carcinoma Cells.** *The Journal of Immunology* 2000, **165**(5):2903-2910.
183. Wang Q, Zhang P, Zhang Q, Wang X, Li J, Ma C, Sun W, Zhang L: **Analysis of CD137 and CD137L expression in human primary tumor tissues.** *Croat Med J* 2008, **49**(2):192-200.
184. Zhu H, Wang M, Du Y, Liu X, Weng X, Li C: **4-1BBL has a Possible Role in Mediating Castration-Resistant Conversion of Prostate Cancer via Up-Regulation of Androgen Receptor.** *Journal of Cancer* 2019, **10**(11):2464-2471.
185. Shao Z, Schwarz H: **CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction.** *J Leukoc Biol* 2011, **89**(1):21-29.
186. Dubrot J, Milheiro F, Alfaro C, Palazon A, Martinez-Forero I, Perez-Gracia JL, Morales-Kastresana A, Romero-Trevejo JL, Ochoa MC, Hervas-Stubbs S, Prieto J, Jure-Kunkel M, Chen L, Melero I: **Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ.** *Cancer Immunol Immunother* 2010, **59**(8):1223-1233.
187. Palazon A, Teijeira A, Martinez-Forero I, Hervas-Stubbs S, Roncal C, Penuelas I, Dubrot J, Morales-Kastresana A, Perez-Gracia JL, Ochoa MC, Ochoa-Callejero L, Martinez A, Luque A, Dinchuk J, Rouzaut A, Jure-Kunkel M, Melero I: **Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes.** *Cancer Res* 2011, **71**(3):801-811.
188. Wan YL, Zheng SS, Zhao ZC, Li MW, Jia CK, Zhang H: **Expression of co-stimulator 4-1BB molecule in hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor liver tissue, and its possible role in tumor immunity.** *World J Gastroenterol* 2004, **10**(2):195-199.
189. Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I: **Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies.** *Blood* 2018, **131**(1):49-57.
190. Buchan SL, Dou L, Remer M, Booth SG, Dunn SN, Lai C, Semmrich M, Teige I, Martensson L, Penfold CA, Chan HTC, Willoughby JE, Mockridge CI, Dahal LN, Cleary KLS, James S, Rogel A, Kannisto P, Jernetz M, Williams EL, Healy E, Verbeek JS, Johnson PWM, Frendeus B, Cragg MS, Glennie MJ, Gray JC, Al-Shamkhani A, Beers SA: **Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function.** *Immunity* 2018, **49**(5):958-970.e957.
191. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grunebach F, Krusch M, Wacker A, Rammensee HG, Salih HR: **CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells.** *Blood* 2010, **115**(15):3058-3069.
192. Hernandez-Chacon JA, Li Y, Wu RC, Bernatchez C, Wang Y, Weber JS, Hwu P, Radvanyi LG: **Costimulation through the CD137/4-1BB pathway protects human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death and enhances antitumor effector function.** *J Immunother* 2011, **34**(3):236-250.
193. Hodge G, Holmes M, Jersmann H, Reynolds PN, Hodge S: **Targeting peripheral blood pro-inflammatory cytotoxic lymphocytes by inhibiting CD137 expression: novel potential treatment for COPD.** *BMC Pulm Med* 2014, **14**:85.
194. Zhang H, Snyder KM, Suhoski MM, Maus MV, Kapoor V, June CH, Mackall CL: **4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy.** *J Immunol* 2007, **179**(7):4910-4918.
195. Yi L, Zhao Y, Wang X, Dai M, Hellström KE, Hellström I, Zhang H: **Human and mouse CD137 have predominantly different binding CRDs to their respective ligands.** *PloS one* 2014, **9**(1):e86337-e86337.
196. Masu T, Atsukawa M, Nakatsuka K, Shimizu M, Miura D, Arai T, Harimoto H, Kondo C, Kaneko K, Futagami S, Kawamoto C, Takahashi H, Iwakiri K: **Anti-CD137 monoclonal antibody enhances trastuzumab-induced, natural killer cell-mediated cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines with low human epidermal growth factor-like receptor 2 expression.** *PloS one* 2018, **13**(12):e0200664-e0200664.

197. Ochoa MC, Perez-Ruiz E, Minute L, Onate C, Perez G, Rodriguez I, Zabaleta A, Alignani D, Fernandez-Sendin M, Lopez A, Muntasell A, Sanmamed MF, Paiva B, Lopez-Botet M, Berraondo P, Melero I: **Daratumumab in combination with urelumab to potentiate anti-myeloma activity in lymphocyte-deficient mice reconstituted with human NK cells.** *Oncoimmunology* 2019, **8**(7):1599636.
198. Davis RJ, Ferris RL, Schmitt NC: **Costimulatory and coinhibitory immune checkpoint receptors in head and neck cancer: unleashing immune responses through therapeutic combinations.** *Cancers Head Neck* 2016, **1**:12.
199. Sathawane D, Kharat RS, Halder S, Roy S, Swami R, Patel R, Saha B: **Monocyte CD40 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).** *Hum Immunol* 2013, **74**(1):1-5.
200. Li CW, Lim SO, Chung EM, Kim YS, Park AH, Yao J, Cha JH, Xia W, Chan LC, Kim T, Chang SS, Lee HH, Chou CK, Liu YL, Yeh HC, Perillo EP, Dunn AK, Kuo CW, Khoo KH, Hsu JL, Wu Y, Hsu JM, Yamaguchi H, Huang TH, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yoo SS, Hung MC: **Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1.** *Cancer Cell* 2018, **33**(2):187-201.e110.
201. Li C-W, Lim S-O, Xia W, Lee H-H, Chan L-C, Kuo C-W, Khoo K-H, Chang S-S, Cha J-H, Kim T, Hsu JL, Wu Y, Hsu J-M, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yao J, Lee C-C, Wu H-J, Sahin AA, Allison JP, Yu D, Hortobagyi GN, Hung M-C: **Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity.** *Nature Communications* 2016, **7**(1):12632.
202. Hirai M, Kitahara H, Kobayashi Y, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S: **Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment.** *Int J Oncol* 2017, **50**(1):41-48.
203. Kim MY, Koh J, Kim S, Go H, Jeon YK, Chung DH: **Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers.** *Lung Cancer* 2015, **88**(1):24-33.
204. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M: **PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes.** *Mod Pathol* 2016, **29**(9):1104-1112.
205. Valentini AM, Di Pinto F, Cariola F, Guerra V, Giannelli G, Caruso ML, Pirrelli M: **PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments.** *Oncotarget* 2018, **9**(9):8584-8596.
206. Chaganty BKR, Qiu S, Gest A, Lu Y, Ivan C, Calin GA, Weiner LM, Fan Z: **Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN $\gamma$  secretion.** *Cancer Lett* 2018, **430**:47-56.
207. Rafiq S, Butchar JP, Cheney C, Mo X, Trotta R, Caligiuri M, Jarjoura D, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC: **Comparative assessment of clinically utilized CD20-directed antibodies in chronic lymphocytic leukemia cells reveals divergent NK cell, monocyte, and macrophage properties.** *J Immunol* 2013, **190**(6):2702-2711.
208. Chen Q, Li T, Yue W: **Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers.** *Oncotargets Ther* 2018, **11**:4673-4683.
209. Meng X, Huang Z, Teng F, Xing L, Yu J: **Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy.** *Cancer Treat Rev* 2015, **41**(10):868-876.
210. Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, Vely F, Vivier E, Olive D, Dupuy S, Levasseur F, Zucman D, Lebbe C, Sene D, Hivroz C, Caillat-Zucman S: **PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma.** *Oncotarget* 2016, **7**(45):72961-72977.
211. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ, Ritz J: **Interferon-gamma-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression.** *Oncoimmunology* 2015, **4**(6):e1008824.
212. Concha-Benavente F, Kansy B, Moskovitz J, Moy J, Chandran U, Ferris RL: **PD-L1 Mediates Dysfunction in Activated PD-1<sup>+</sup> NK Cells in Head and Neck Cancer Patients.** *Cancer Immunology Research* 2018.
213. Guo Y, Feng X, Jiang Y, Shi X, Xing X, Liu X, Li N, Fadeel B, Zheng C: **PD1 blockade enhances cytotoxicity of in vitro expanded natural killer cells towards myeloma cells.** *Oncotarget* 2016, **7**(30):48360-48374.
214. Liu Y, Cheng Y, Xu Y, Wang Z, Du X, Li C, Peng J, Gao L, Liang X, Ma C: **Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-**

- tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. *Oncogene* 2017, **36**(44):6143-6153.
215. MacFarlane AWt, Jillab M, Plimack ER, Hudes GR, Uzzo RG, Litwin S, Dulaimi E, Al-Saleem T, Campbell KS: **PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection.** *Cancer Immunol Res* 2014, **2**(4):320-331.
  216. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E: **Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization.** *J Allergy Clin Immunol* 2017, **139**(1):335-346.e333.
  217. Huang G, Wen Q, Zhao Y, Gao Q, Bai Y: **NF-kappaB plays a key role in inducing CD274 expression in human monocytes after lipopolysaccharide treatment.** *PLoS One* 2013, **8**(4):e61602.
  218. Lechner A, Schlosser H, Rothschild SI, Thelen M, Reuter S, Zentis P, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Wennhold K, Garcia-Marquez M, Tharun L, Quaas A, Schauss A, Isensee J, Hucho T, Huebbers C, von Bergwelt-Baildon M, Beutner D: **Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma.** *Oncotarget* 2017, **8**(27):44418-44433.
  219. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Nakao S, Matsutani S, Hirakawa K, Ohira M: **The Prognostic Significance of the Tumor-infiltrating Programmed Cell Death-1(+) to CD8(+) Lymphocyte Ratio in Patients with Colorectal Cancer.** *Anticancer Res* 2017, **37**(8):4165-4172.
  220. Jie HB, Srivastava RM, Argiris A, Bauman JE, Kane LP, Ferris RL: **Increased PD-1(+) and TIM-3(+) TILs during Cetuximab Therapy Inversely Correlate with Response in Head and Neck Cancer Patients.** *Cancer Immunol Res* 2017, **5**(5):408-416.
  221. Kansy BA, Shayan G, Jie HB, Gibson SP, Lei YL, Brandau S, Lang S, Schmitt NC, Ding F, Lin Y, Ferris RL: **T cell receptor richness in peripheral blood increases after cetuximab therapy and correlates with therapeutic response.** *Oncoimmunology* 2018, **7**(11):e1494112.
  222. Lee MS, Vincent BG, McRee AJ, Sanoff HK: **Association between cetuximab response and differential immunologic gene expression signatures in colorectal cancer metastases.** *Journal of Clinical Oncology* 2016, **34**(4\_suppl):558-558.
  223. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N, Gey A, Rotem-Yehudar R, Pere H, Tran T, Guerin CL, Chauvat A, Dransart E, Alanio C, Albert S, Barry B, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Bruneval P, Fridman WH, Lemoine FM, Oudard S, Johannes L, Olive D, Brasnu D, Tartour E: **PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer.** *Cancer Res* 2013, **73**(1):128-138.
  224. Fessas P, Lee H, Ikemizu S, Janowitz T: **A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab.** *Seminars in Oncology* 2017, **44**(2):136-140.
  225. Padet L, Loubaki L, Bazin R: **Induction of PD-L1 on monocytes: a new mechanism by which IVIg inhibits mixed lymphocyte reactions.** *Immunobiology* 2014, **219**(9):687-694.
  226. Filippis C, Arens K, Noubissi Nzeteu GA, Reichmann G, Waibler Z, Crauwels P, van Zandbergen G: **Nivolumab Enhances In Vitro Effector Functions of PD-1(+) T-Lymphocytes and Leishmania-Infected Human Myeloid Cells in a Host Cell-Dependent Manner.** *Front Immunol* 2017, **8**:1880-1880.
  227. Kwon M, Choi YJ, Sa M, Park S-H, Shin E-C: **Two-Round Mixed Lymphocyte Reaction for Evaluation of the Functional Activities of Anti-PD-1 and Immunomodulators.** *Immune Netw* 2018, **18**(6):e45-e45.
  228. Sugiyama D, Maruhashi T, Okazaki I-m, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T: **Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses.** *Science* 2019, **364**(6440):558-566.
  229. Satoh T, Kang YK, Chao Y, Ryu MH, Kato K, Cheol Chung H, Chen JS, Muro K, Ki Kang W, Yeh KH, Yoshikawa T, Oh SC, Bai LY, Tamura T, Lee KW, Hamamoto Y, Kim JG, Chin K, Oh DY, Minashi K, Cho JY, Tsuda M, Tanimoto M, Chen LT, Boku N: **Exploratory subgroup analysis of patients with prior trastuzumab use in the ATTRACTION-2 trial: a randomized phase III clinical trial investigating the efficacy and safety of nivolumab in patients with advanced gastric/gastroesophageal junction cancer.** *Gastric Cancer* 2019.
  230. Ferris RL, Licitra L, Fayette J, Even C, Blumenschein GR, Harrington KJ, Guigay J, Vokes EE, Saba NF, Haddad RI, Ramkumar S, Russell J, Brossart P, Tahara M, Colevas AD, Concha-

- Benavente F, Lynch M, Li L, Gillison ML: **Nivolumab in Patients With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Efficacy and Safety in CheckMate 141 by Prior Cetuximab Use.** *Clinical Cancer Research* 2019;clincanres.3944.2018.
231. Dirix LY, Takacs I, Jerusalem G, Nikolinakos P, Arkenau HT, Forero-Torres A, Boccia R, Lippman ME, Somer R, Smakal M, Emens LA, Hrinchenko B, Edenfield W, Gurtler J, von Heydebreck A, Grote HJ, Chin K, Hamilton EP: **Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study.** *Breast Cancer Res Treat* 2018, **167**(3):671-686.
232. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, Bachelot T, Hui R, Curigliano G, Campone M, Biganzoli L, Bonnefoi H, Jerusalem G, Bartsch R, Rabaglio-Poretti M, Kammler R, Maibach R, Smyth MJ, Di Leo A, Colleoni M, Viale G, Regan MM, André F, Fumagalli D, Gelber RD, Goulioti T, Hiltbrunner A, Hui R, Roschitzki H, Ruepp B, Boyle F, Stahel R, Aebi S, Coates AS, Goldhirsch A, Karlsson P, Kössler I, Fournarakou S, Gasca A, Pfister R, Ribeli-Hofmann S, Weber M, Celotto D, Comune C, Frapolli M, Sánchez-Hohl M, Huang H, Mahoney C, Price K, Scott K, Shaw H, Fischer S, Greco M, King C, Andrighetto S, Piccart-Gebhart M, Findlay H, Jenkins M, Karantza V, Mejia J, Schneier P: **Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b&#x2013;2 trial.** *The Lancet Oncology* 2019, **20**(3):371-382.
233. Chen A, Ali N, Boasberg P, Ho AS: **Clinical Remission of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Auricle with Cetuximab and Nivolumab.** *J Clin Med* 2018, **7**(1).
234. Lin Y-C, Uen W-C, Hao S-P, Hsiao C-Y, Lai H-C: **Triple combination treatment with anti-EGFR monoclonal antibody, low-dose chemotherapy, and anti-PD1 immune check-point inhibitors for recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A single institute experience.** *Journal of Clinical Oncology* 2019, **37**:e17514-e17514.
235. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer H-R, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R: **Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer.** *New England Journal of Medicine* 2008, **359**(11):1116-1127.
236. Catenacci DVT, Lim KH, Uronis HE, Kang Y-K, Ng MCH, Gold PJ, Enzinger PC, Lee KW, Lacy J, Park SH, Yen J, Odegaard J, Franovic A, Baughman JE, Wynter-Horton A, Chen F, Moore PA, Wu T, Davidson-Moncada JK, Bang Y-J: **Antitumor activity of margetuximab (M) plus pembrolizumab (P) in patients (pts) with advanced HER2+ (IHC3+) gastric carcinoma (GC).** *Journal of Clinical Oncology* 2019, **37**(4\_suppl):65-65.
237. Chowdhury F, Johnson PW, Glennie MJ, Williams AP: **Ex vivo assays of dendritic cell activation and cytokine profiles as predictors of in vivo effects in an anti-human CD40 monoclonal antibody ChiLob 7/4 phase I trial.** *Cancer Immunol Res* 2014, **2**(3):229-240.
238. Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, de Boer M, Koeleman CAM, Lissenberg-Thunnissen SN, Visser R, Brouwer M, Mok JY, Matlung H, van den Berg TK, van Esch WJE, Kuijpers TW, Wouters D, Rispens T, Wuhrer M, Vidarsson G: **Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities.** *Front Immunol* 2017, **8**(877).
239. Gardai S, Law C-I, Peng S, Yang J, Neff-laFord H, Manley T-J: **DOSAGE AND ADMINISTRATION OF NON-FUCOSYLATED ANTI-CD40 ANTIBODIES.** In. Edited by SEATTLE GENETICS I; 2017.
240. Mangsbo SM, Broos S, Fletcher E, Veitonmaki N, Furebring C, Dahlen E, Norlen P, Lindstedt M, Totterman TH, Ellmark P: **The human agonistic CD40 antibody ADC-1013 eradicates bladder tumors and generates T-cell-dependent tumor immunity.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(5):1115-1126.
241. Vitale LA, Thomas LJ, He LZ, O'Neill T, Widger J, Crocker A, Sundarapandiyam K, Storey JR, Forsberg EM, Weidlick J, Baronas AR, Gergel LE, Boyer JM, Sisson C, Goldstein J, Marsh HC, Jr., Keler T: **Development of CDX-1140, an agonist CD40 antibody for cancer immunotherapy.** *Cancer Immunol Immunother* 2019, **68**(2):233-245.
242. Gardai S, Epp A, Linares G, Westendorf L, Sutherland M-K, Neff-LaFord H, Drachman J-G, Peng S, Law C-L: **A sugar engineered non-fucosylated anti-CD40 antibody, SEA-CD40, with enhanced immune stimulatory activity alone and in combination with immune checkpoint inhibitors.** *Journal of Clinical Oncology* 2015, **33**(15\_suppl):3074-3074.
243. Dahan R, Barnhart BC, Li F, Yamniuk AP, Korman AJ, Ravetch JV: **Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fcγ3R Engagement.** *Cancer Cell* 2016, **29**(6):820-831.



244. Knorr DA, Dahan R, Ravetch JV: **Toxicity of an Fc-engineered anti-CD40 antibody is abrogated by intratumoral injection and results in durable antitumor immunity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, **115**(43):11048-11053.
245. Luheshi NM, Coates-Ulrichsen J, Harper J, Mullins S, Sulikowski MG, Martin P, Brown L, Lewis A, Davies G, Morrow M, Wilkinson RW: **Transformation of the tumour microenvironment by a CD40 agonist antibody correlates with improved responses to PD-L1 blockade in a mouse orthotopic pancreatic tumour model.** *Oncotarget* 2016, **7**(14):18508-18520.
246. van Mierlo GJ, den Boer AT, Medema JP, van der Voort EI, Franssen MF, Offringa R, Melief CJ, Toes RE: **CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(8):5561-5566.
247. Bensinger W, Maziarz RT, Jagannath S, Spencer A, Durrant S, Becker PS, Ewald B, Bilic S, Rediske J, Baeck J, Stadtmauer EA: **A phase 1 study of lucatumumab, a fully human anti-CD40 antagonist monoclonal antibody administered intravenously to patients with relapsed or refractory multiple myeloma.** *Br J Haematol* 2012, **159**(1):58-66.
248. Calvo E, Moreno V, Perets R, Yablonski-Peretz T, Fournau N, Girgis S, Guo Y, Hellemans P, Hokey D, Pendas Franco N, Xia Q, Geva R: **A phase I study to assess safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of JNJ-64457107, a CD40 agonistic monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced solid tumors.** *Journal of Clinical Oncology* 2019, **37**(15\_suppl):2527-2527.
249. Hassan SB, Sorensen JF, Olsen BN, Pedersen AE: **Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2014, **36**(2):96-104.
250. Johnson P, Challis R, Chowdhury F, Gao Y, Harvey M, Geldart T, Kerr P, Chan C, Smith A, Steven N, Edwards C, Ashton-Key M, Hodges E, Tutt A, Ottensmeier C, Glennie M, Williams A: **Clinical and biological effects of an agonist anti-CD40 antibody: a Cancer Research UK phase I study.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**(6):1321-1328.
251. Byrne KT, Vonderheide RH: **CD40 Stimulation Obviates Innate Sensors and Drives T Cell Immunity in Cancer.** *Cell Rep* 2016, **15**(12):2719-2732.
252. Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, Clendenin C, Stanger BZ, Furth EE, Wherry EJ, Vonderheide RH: **Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma.** *Cancer Immunol Res* 2015, **3**(4):399-411.
253. Zhang J, Li Y, Yang S, Zhang L, Wang W: **Anti-CD40 mAb enhanced efficacy of anti-PD1 against osteosarcoma.** *J Bone Oncol* 2019, **17**:100245-100245.
254. Zippelius A, Schreiner J, Herzig P, Muller P: **Induced PD-L1 expression mediates acquired resistance to agonistic anti-CD40 treatment.** *Cancer Immunol Res* 2015, **3**(3):236-244.
255. O'Hara MH, O'Reilly EM, Rosemarie M, Varadhachary G, Wainberg ZA, Ko A, Fisher GA, Rahma O, Lyman JP, Cabanski CR, Carpenter EL, Hollmann T, Gherardini PF, Kitch L, Selinsky C, LaVallee T, Trifan OC, Dugan U, Hubbard-Lucey VM, Vonderheide RH: **Abstract CT004: A Phase Ib study of CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M together with gemcitabine (Gem) and nab-paclitaxel (NP) with or without nivolumab (Nivo) in untreated metastatic ductal pancreatic adenocarcinoma (PDAC) patients.** *Cancer Research* 2019, **79**(13 Supplement):CT004-CT004.
256. Costello RT, Gastaut JA, Olive D: **What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy?** *Immunol Today* 1999, **20**(11):488-493.
257. Bereznyaya NM, Chekhun VF: **Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy.** *Exp Oncol* 2007, **29**(1):2-12.
258. Kim H, Kim Y, Bae S, Kong JM, Choi J, Jang M, Choi J, Hong JM, Hwang YI, Kang JS, Lee WJ: **Direct Interaction of CD40 on Tumor Cells with CD40L on T Cells Increases the Proliferation of Tumor Cells by Enhancing TGF-beta Production and Th17 Differentiation.** *PLoS One* 2015, **10**(5):e0125742.
259. Matsumura Y, Hiraoka K, Ishikawa K, Shoji Y, Noji T, Hontani K, Itoh T, Nakamura T, Tsuchikawa T, Shichinohe T, Hirano S: **CD40 Expression in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Tumor Progression and Lymph Node Metastasis.** *Anticancer Res* 2016, **36**(9):4467-4475.
260. Horton HM, Bennett MJ, Peipp M, Pong E, Karki S, Chu SY, Richards JO, Chen H, Repp R, Desjarlais JR, Zhukovsky EA: **Fc-engineered anti-CD40 antibody enhances multiple effector functions and exhibits potent in vitro and in vivo antitumor activity against hematologic malignancies.** *Blood* 2010, **116**(16):3004-3012.

261. de Vos S, Forero-Torres A, Ansell SM, Kahl B, Cheson BD, Bartlett NL, Furman RR, Winter JN, Kaplan H, Timmerman J, Whiting NC, Drachman JG, Advani R: **A phase II study of dacetuzumab (SGN-40) in patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and correlative analyses of patient-specific factors.** *Journal of Hematology & Oncology* 2014, **7**(1):44.
262. Luqman M, Klabunde S, Lin K, Georgakis GV, Cherukuri A, Holash J, Goldbeck C, Xu X, Kadel EE, 3rd, Lee SH, Aukerman SL, Jallal B, Aziz N, Weng WK, Wierda W, O'Brien S, Younes A: **The antileukemia activity of a human anti-CD40 antagonist antibody, HCD122, on human chronic lymphocytic leukemia cells.** *Blood* 2008, **112**(3):711-720.
263. Irenaeus SMM, Nielsen D, Ellmark P, Yachnin J, Deronic A, Nilsson A, Norlen P, Veitonmaki N, Wennersten CS, Ullenhag GJ: **First-in-human study with intratumoral administration of a CD40 agonistic antibody, ADC-1013, in advanced solid malignancies.** *Int J Cancer* 2019, **145**(5):1189-1199.
264. Smith P, DiLillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch JV: **Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109**(16):6181-6186.
265. Hogarth PM, Pietersz GA: **Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2012, **11**:311.
266. Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, Mistry Y, Dilger P, Liefoghe E, Cludts I, Fox B, Tarrant G, Robinson J, Meager T, Dolman C, Thorpe SJ, Bristow A, Wadhwa M, Thorpe R, Poole S: **"Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics.** *J Immunol* 2007, **179**(5):3325-3331.
267. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N: **Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.** *N Engl J Med* 2006, **355**(10):1018-1028.
268. Ruter J, Antonia SJ, Burris HA, Huhn RD, Vonderheide RH: **Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors.** *Cancer Biol Ther* 2010, **10**(10):983-993.
269. Hussein M, Berenson JR, Niesvizky R, Munshi N, Matous J, Sobecks R, Harrop K, Drachman JG, Whiting N: **A phase I multidose study of dacetuzumab (SGN-40; humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma.** *Haematologica* 2010, **95**(5):845-848.
270. Grilley-Olson JE, Curti BD, Smith DC, Goel S, Gajewski T, Markovic S, Rixe O, Bajor DL, Gutierrez M, Kuzel T, Mehta AN, Amore B, Guerrero A, Wang Z, Coveler AL: **SEA-CD40, a non-fucosylated CD40 agonist: Interim results from a phase 1 study in advanced solid tumors.** *Journal of Clinical Oncology* 2018, **36**(15\_suppl):3093-3093.
271. Rigamonti N, Schlegel A, Barsin S, Schwesternmann J, Mangold S, Kaufmann Y, Zitt C, Veitonmäki N, Levitsky V, Metz C: **Abstract 3251: Fibroblast activation protein (FAP)-selective delivery of CD40 agonistic DARPins molecule for tumor-localized immune activation.** *Cancer Research* 2019, **79**(13 Supplement):3251.
272. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, Lampis A, Eason K, Huntingford I, Burke R, Rata M, Koh D-M, Tunariu N, Collins D, Hulkki-Wilson S, Ragulan C, Spiteri I, Moorcraft SY, Chau I, Rao S, Watkins D, Fotiadis N, Bali M, Darvish-Damavandi M, Lote H, Eltahir Z, Smyth EC, Begum R, Clarke PA, Hahne JC, Dowsett M, de Bono J, Workman P, Sadanandam A, Fassan M, Sansom OJ, Eccles S, Starling N, Braconi C, Sottoriva A, Robinson SP, Cunningham D, Valeri N: **Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers.** *Science* 2018, **359**(6378):920.
273. Chen DS, Mellman I: **Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle.** *Immunity* 2013, **39**(1):1-10.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Phillip Schiele, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das Potenzial der Glyko-Optimierung bei kombinatorischen Krebs-Immuntherapien mit monoklonalen Antikörpern“ (engl. „The Potential of Glyco-Optimization for Combinatory Anti-Cancer Immunotherapies with Monoclonal Antibodies“) 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

---

(Datum, Unterschrift)

## 10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Phillip Schiele hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Goletz, C., Lischke, T., Harnack, U., Schiele, P., Danielczyk, A., Rühmann, J., & Goletz, S. (2018). Glyco-Engineered Anti-Human Programmed Death-Ligand 1 Antibody Mediates Stronger CD8 T Cell Activation Than Its Normal Glycosylated and Non-Glycosylated Counterparts. *Frontiers in immunology*, 9, 1614. doi:10.3389/fimmu.2018.01614

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an der Erstellung und Korrektur des Manuskriptes.

**Poster 1:** CIMT Annual Meeting 16.05.2018 Mainz „Immunomodulatory properties of the glyco-engineered anti-EGFR antibody Tomuzotuximab“; Phillip Schiele, Christoph Goletz

Beitrag im Einzelnen: Im Rahmen der CIMT-Konferenz habe ich, Phillip Schiele, ein Poster mit dem Titel „Immunomodulatory properties of the glyco-engineered anti-EGFR antibody Tomuzotuximab“ selbstständig erstellt und präsentiert.

**Poster 2:** CIMT Annual Meeting 16.05.2018 Mainz „Glyco-engineering of an anti-CD40 antibody enhances its agonistic activity“; Phillip Schiele, Hans Baumeister, Patrik Kehler, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk

Beitrag im Einzelnen: Im Rahmen der CIMT-Konferenz habe ich, Phillip Schiele, ein Poster mit dem Titel „Glyco-engineering of an anti-CD40 antibody enhances its agonistic activity“ selbstständig erstellt und präsentiert. Dargestellte Daten wurden teilweise durch Mitarbeiter der Glycotope GmbH generiert.

**Poster 3:** Cambridge Healthtech Institute's Fourth Annual Immuno-Oncology Summit Europe vom 18.-20.03.2018 London „The Importance of the Immunomodulatory Properties of the Glyco-Engineered Anti-EGFR Antibody Tomuzotuximab for IO Combinations“; Phillip Schiele, Christoph Goletz, Anika Jäkel, Johanna Rühmann, Antje Danjelczyk

Beitrag im Einzelnen: Im Rahmen der CIMT-Konferenz habe ich, Phillip Schiele, ein Poster mit dem Titel „The Importance of the Immunomodulatory Properties of the Glyco-Engineered Anti-EGFR Antibody Tomuzotuximab for IO Combinations“ selbstständig erstellt und präsentiert.

---

(Datum, Unterschrift)

## **11 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 12 Publikationsliste

### Paper:

Goletz, C., Lischke, T., Harnack, U., Schiele, P., Danielczyk, A., Rühmann, J., & Goletz, S. (2018). Glyco-Engineered Anti-Human Programmed Death-Ligand 1 Antibody Mediates Stronger CD8 T Cell Activation Than Its Normal Glycosylated and Non-Glycosylated Counterparts. *Frontiers in immunology*, 9, 1614. doi:10.3389/fimmu.2018.01614

### Poster:

- 1) CIMT Annual Meeting 16.05.2018 Mainz „Immunomodulatory properties of the glyco-engineered anti-EGFR antibody Tomuzotuximab“; Phillip Schiele, Christoph Goletz
- 2) CIMT Annual Meeting 16.05.2018 Mainz „Glyco-engineering of an anti-CD40 antibody enhances its agonistic activity“; Phillip Schiele, Hans Baumeister, Patrik Kehler, Johanna Rühmann, Antje Danielczyk
- 3) Cambridge Healthtech Institute’s Fourth Annual Immuno-Oncology Summit Europe vom 18.-20.03.2018 London „The Importance of the Immunomodulatory Properties of the Glyco-Engineered Anti-EGFR Antibody Tomuzotuximab for IO Combinations“; Phillip Schiele, Christoph Goletz, Anika Jäkel, Johanna Rühmann, Antje Danjelczyk

## **13 Danksagung**

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht