

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie  
(Direktion: Prof. Dr. med. Claudia Baldus)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# **Rekrutierung myeloischer Zellen durch EGFR-gerichtete Antikörper**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Steffen Kahle**

aus **Lingen (Ems)**

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Valerius

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Susanne Sebens

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 17.08.2023

gez.: Prof. Dr. Thomas Valerius  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

**Inhalt**

Abkürzungsverzeichnis ..... IV

1. Einleitung..... 1

1.1. Die „Hallmarks of Cancer“ als Basis moderner Tumorforschung..... 1

1.2. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor als Angriffspunkt für die  
zielgerichtete Tumorthherapie ..... 3

1.2.1. Biologie und Struktur des EGFR ..... 3

1.2.2. Die Rolle des EGFR in der Tumorgenese ..... 5

1.2.3. EGFR-gerichtete Tyrosinkinase-Inhibitoren ..... 6

1.2.4. EGFR-gerichtete Antikörper ..... 6

1.3. Antikörper-Isotypen und Subklassen ..... 8

1.4. Systematik und Eigenschaften humaner Fc-Rezeptoren..... 11

1.5. Monoklonale Antikörper ..... 14

1.6. Wirkmechanismen therapeutischer EGFR-Antikörper ..... 15

1.6.1. Fab-vermittelte direkte Mechanismen ..... 15

1.6.2. Fc-vermittelte indirekte Mechanismen..... 15

1.6.2.1. Komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) ..... 16

1.6.2.2. Zellvermittelte Effekte (ADCC und ADCP) ..... 16

1.7. Die Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen ..... 18

1.7.1. Das Tumormikromilieu ..... 18

1.7.2. Immunologische Kontrollpunkte ..... 19

1.7.3. CD47 und SIRP $\alpha$  als Kontrollpunkte des angeborenen  
Immunsystems ..... 19

1.8. Hypothesen und Ziele ..... 21

2. Material und Methoden..... 23

2.1. Antikörper..... 23

2.2. Zelllinien..... 23

## Inhalt

2.3.	CD47 siRNA-vermittelter Knock-down .....	25
2.4.	Analysen im Durchflusszytometer .....	25
2.5.	Präparation humaner Effektorzellen .....	27
2.5.1.	Präparation polymorphkerniger Granulozyten .....	27
2.5.2.	Erzeugung von Makrophagen .....	28
2.6.	Messung der Zytotoxizität .....	29
2.7.	Datendarstellung und -verarbeitung, statistische Analysen .....	32
3.	Ergebnisse .....	33
3.1.	Bindungsverhalten EGFR-gerichteter IgG1- und IgG2-Antikörper .....	33
3.2.	Makrophagen als Effektorzellen .....	35
3.2.1.	Vergleich von Oberflächenmerkmalen zwischen M1- und M2-ähnlichen Makrophagen .....	35
3.2.2.	IgG-vermitteltes zytotoxisches Potenzial von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen .....	37
3.3.	Granulozyten als Effektorzellen .....	40
3.3.1.	Fc-Rezeptor-Expression humaner Granulozyten .....	40
3.3.2.	Auswirkung der EGFR-Expression auf die Zytotoxizität von PMN .....	42
3.3.3.	Abhängigkeit der PMN-vermittelten Zytotoxizität von Antikörper- und Effektorzellkonzentration .....	46
3.3.4.	Einfluss des Epitops .....	47
3.4.	Einfluss von CD47 auf die antikörpervermittelte Zytotoxizität myeloischer Effektorzellen .....	49
3.4.1.	CD47- und SIRP $\alpha$ -Expression .....	49
3.4.2.	CD47 reguliert die Zytotoxizität von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen .....	51
3.4.3.	CD47 reguliert die PMN-Aktivität .....	52
3.4.4.	PMN-vermittelte ADCC gegen Zelllinien mit unterschiedlich hoher CD47-Expression .....	54

## Inhalt

4.	Diskussion .....	56
4.1.	EGFR-gerichtete IgG1- und IgG2-Antikörper in der klinischen Praxis .....	56
4.2.	Effektorfunktionen von EGFR-gerichteten IgG1- und IgG2-Antikörpern .....	57
4.2.1.	Direkte Antikörpereffekte .....	57
4.2.2.	NK-Zellen vs. myeloische Effektorzellen .....	58
4.3.	Immunkontrollpunkt-Inhibitoren in der Tumorthherapie .....	60
4.3.1.	CD47 als „Tarnkappe“ bei der Tumorentstehung und -progression .....	62
4.4.	Ausblick: Kombination von IgG2-Antikörpern mit der CD47/SIRP $\alpha$ -Blockade .....	63
5.	Zusammenfassung .....	65
6.	Literaturverzeichnis .....	67
7.	Anhang .....	81
7.1.	Zelllinien .....	81
7.2.	Materialliste .....	82
8.	Danksagung .....	87
9.	Eigene Veröffentlichungen .....	89

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>51</sup> Cr	Chrom-51
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
ADCP	Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (engl. <i>antibody-dependent cell-mediated phagocytosis</i> )
Ak	Antikörper
Akt	Engl. <i>AKR thymoma</i> (AKR = bestimmte Mauslinie)
ANOVA	Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variance</i>
BH3	Bcl-2 Homologie Domäne 3
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
Bq	Becquerel
CD	System zur Ordnung der Oberflächenproteine (engl. <i>cluster of differentiation</i> , „Unterscheidungsgruppen“)
CDC	Komplementabhängige Zytotoxizität (engl. <i>complement-dependent cytotoxicity</i> )
CDK	Cyclinabhängige Kinase (engl. <i>cyclin-dependent kinase</i> )
CDR	Engl. <i>complement determining regions</i>
C <sub>H</sub>	Konstante Domäne der schweren Kette (engl. <i>constant domain of the heavy chain</i> )
C <sub>i</sub>	Curie
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Kette (engl. <i>constant domain of the light chain</i> )
c-MET	Hepatozytenwachstumsfaktorrezeptor (engl. <i>mesenchymal-epithelial transition factor</i> )
cpm	Zählimpulse pro Minute (engl. <i>counts per minute</i> )
CRISPR/Cas	Engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Crispr associated protein</i>
CTLA-4	Engl. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>

## Abkürzungsverzeichnis

DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen
E:T-Ratio	Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis (engl. <i>effector-to-target cell ratio</i> )
EC50	Mittlere effektive Konzentration
ECACC	Engl. <i>eu</i> ropean <i>c</i> ollection of <i>a</i> uthenticated <i>c</i> ell <i>c</i> ultures
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ErbB	Engl. <i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
ERK	Engl. <i>extracellular signal regulated kinase</i>
Fab	Antigenbindendes Fragment (engl. <i>fragment antigen binding</i> )
FACS	Engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	Kristallisierbares Fragment (engl. <i>fragment crystallizable</i> )
Fc(α/γ/ε)R	Fc-Rezeptor für IgA/IgG/IgE
FCS	Fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FDA	Arzneimittelbehörde der USA (engl. <i>US food and drug administration</i> )
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i> )
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )
GPI	Glykophosphatidylinositol
Grb2	Engl. <i>growth factor receptor bound-2</i>
gRNA	Engl. <i>guide ribonucleic acid</i>
Her2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor (engl. <i>hepatocyte growth factor</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

Hi	Scharnierregion (engl. <i>hinge region</i> )
HP-SEC	Engl. <i>high performance size-exclusion</i>
IAP	Integrin-assoziiertes Protein (Synonym für CD47)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
ITAM	Tyrosinbasiertes Aktivierungsmotiv der Immunrezeptoren (engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> )
ITIM	Tyrosinbasiertes Inhibierungsmotiv der Immunrezeptoren (engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> )
Kd	Engl. <i>knock-down</i>
kDa	Kilodalton (= Maßeinheit für Molekülmasse)
Ko	Engl. <i>knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAk, mAb	Monoklonaler Antikörper (engl. <i>monoclonal antibody</i> )
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MDSC	Myeloide Suppressorzelle (engl. <i>myeloid-derived suppressor cell</i> )
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (engl. <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MNC	Mononukleäre Zellen (engl. <i>mononuclear cells</i> )
mTOR	Engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
mut	mutiert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PanNET	Neuroendokrine Tumoren des Pankreas
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase

## Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphatgepufferte Saline (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PD-1	Programmierter Zelltod (engl. <i>programmed cell death 1</i> )
PD-L1	Engl. <i>programmed cell death ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PKB	Proteinkinase B (Synonym für AKT)
Raf	Ras-aktivierbarer Faktor
Ras	Engl. <i>rat sarcoma</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RPMI-1640	Engl. <i>Roswell park memorial institute 1640</i>
scr	Engl. <i>scrambled</i>
SDS/PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SEM	Engl. <i>standard error of the mean</i>
SH2	Engl. <i>src-homology 2</i>
SHC	Engl. <i>src-homology-2-containing</i>
SHP	<i>Src-homology 2</i> -Domäne enthaltende Phosphatase
siRNA	Engl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>
SIRP $\alpha$	Engl. <i>signal regulatory protein <math>\alpha</math></i>
src	Src-Tyrosinkinase (engl. <i>sarcoma</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i> )
STAT5	Engl. <i>signal transducer and activator of transcription-5</i>
syk	Syk-Tyrosinkinase (engl. <i>spleen tyrosine kinase</i> )
TGF $\alpha$	Engl. <i>transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TRQ	Türkis (engl. <i>turquoise</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

U	Enzymeinheit (engl. <u>units</u> )
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <u>vascular endothelial growth factor</u> )
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Kette (engl. <u>variable domain of the heavy chain</u> )
V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Kette (engl. <u>variable domain of the light chain</u> )
Wt	<u>Wildtyp</u>

### 1. Einleitung

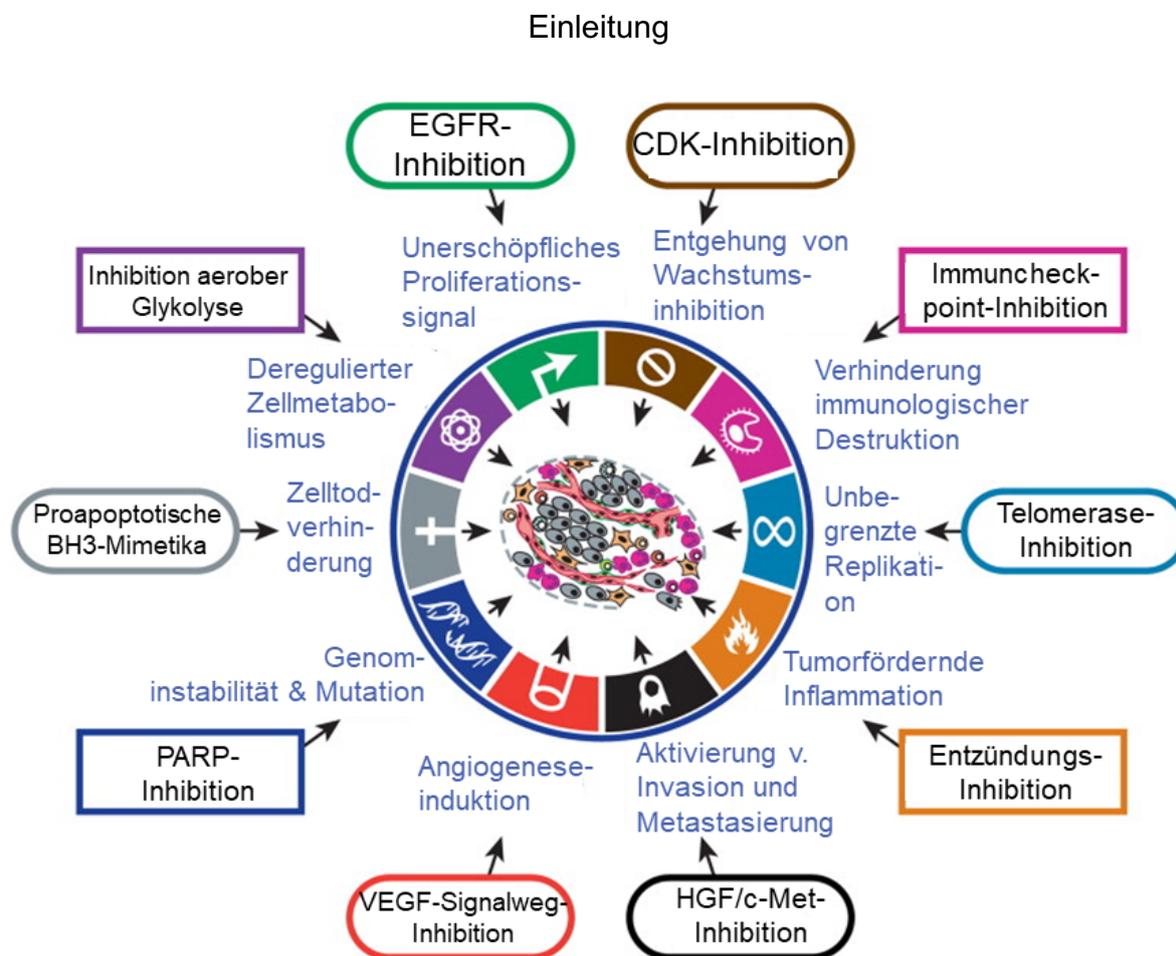
Annähernd eine halbe Million Menschen erkranken jährlich in Deutschland an Krebs. Dies geht aus dem zuletzt 2021 erschienenen Bericht „Krebs in Deutschland für 2017/2018“ des Robert Koch-Instituts hervor [1]. Ein Großteil dieser Neuerkrankungen sind Tumoren epithelial differenzierter Gewebe, sogenannte Karzinome. Bei epidemiologisch besonders relevanten Karzinomentitäten wie Darm-, Lungen- und Kopf-Hals-Tumoren ist zwar eine rückläufige Sterblichkeit zu beobachten, nichtsdestotrotz liegt das 5-Jahres-Überleben für Darmkrebs und Kopf-Hals-Tumoren bei knapp 50-60 %, für Lungenkrebs bei nur ca. 20 % (Stand 2017/18). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass mehr als ein bzw. zwei Drittel der KrebspatientInnen trotz bestmöglicher Therapie nicht geheilt werden können. Zielgerichtete Therapien gewinnen daher stetig an Bedeutung.

#### 1.1. Die „*Hallmarks of Cancer*“ als Basis moderner Tumorforschung

Die heutige Sichtweise auf die Biologie und die Therapie maligner Tumoren wurde maßgeblich von Douglas Hanahan und Robert Weinberg geprägt. Diese stellten im Jahr 2000 mit den „*Hallmarks of Cancer*“ einen Kanon aus sechs grundlegenden biologischen Merkmalen zusammen, welche allen Tumoren gemein seien. Diese Merkmale beschreiben einen ganzheitlichen Blick auf die Entstehung und das Wachstum von Krebs [2]. 2011 wurden die sechs initialen „*Hallmarks of Cancer*“ um vier weitere Charakteristika ergänzt (Abb. 1): hinzu kamen der deregulierte Zellmetabolismus, die erhöhte Genominstabilität, ein tumorbegünstigendes Entzündungsgeschehen, und die Umgehung der immunologischen Abwehr [3]. Zwei der Kennzeichen finden sich als Gegenstand dieser Arbeit wieder: der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) als potentes Wachstumssignal und dessen Inhibition als therapeutische Strategie, und die Verhinderung der Tumordestruktion durch aktive Unterdrückung des Immunsystems. An den zehn „*Hallmarks of Cancer*“ zeigen die Autoren beispielhaft die modernen, spezifischen Ansätze in der Tumorthherapie auf. Dahinter steht ein detailliertes Verständnis maligner Tumoren und deren wechselseitigen Beziehungen mit ihrer Umgebung. Ein Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre ist die Tumorimmunologie,

## Einleitung

die längst Eingang in das therapeutische Spektrum gefunden hat. Auf diesem Gebiet etablierte sich die Antikörpertherapie, die 1997 mit der Zulassung von Rituximab für die Lymphomtherapie durch die US Food and Drug Administration (FDA) enormen Aufschwung erhielt [4]. Seit 2003 findet die Immuntherapie mit der FDA-Zulassung des gegen den EGFR gerichteten monoklonalen Antikörpers (mAk) Cetuximab beim metastasierten kolorektalen Karzinom auch Anwendung bei nichthämatologischen Neoplasien. Mit dem Vordringen in die Schnittpunkte zwischen Tumor und Immunsystem werden zunehmend Mechanismen aufgedeckt, welche die Zerstörung des Tumors durch das Immunsystem verhindern, die sogenannten *Immune Escape-Mechanismen* [5]. Therapeutisch schlägt sich dieser Fortschritt in der wachsenden Anzahl zugelassener „Immunkontrollpunkt (*immune checkpoint*)-Inhibitoren“ nieder [6, 7]. Die moderne Tumorthherapie, wie sie in den „*Hallmarks of Cancer*“ skizziert wird, kann letztlich als ein im Vergleich zur konventionellen Therapie zunehmend gezielteres Eingreifen in Schlüsselpositionen zellulärer Malignität verstanden werden, das sich entweder die Inhibierung tumorbegünstigender „*Hallmarks*“ zunutze macht, oder aber tumorunterdrückende Mechanismen aktiviert. Beide Aspekte liegen auch dieser Arbeit zugrunde.



**Abbildung 1. Die „Hallmarks of Cancer“.** Die 2011 publizierten „*Hallmarks of Cancer*“ fassen den Stand der modernen Tumorforschung und der gezielten Tumorthherapie zusammen. Adaptiert nach Hanahan und Weinberg [3].

## 1.2. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor als Angriffspunkt für die zielgerichtete Tumorthherapie

### 1.2.1. Biologie und Struktur des EGFR

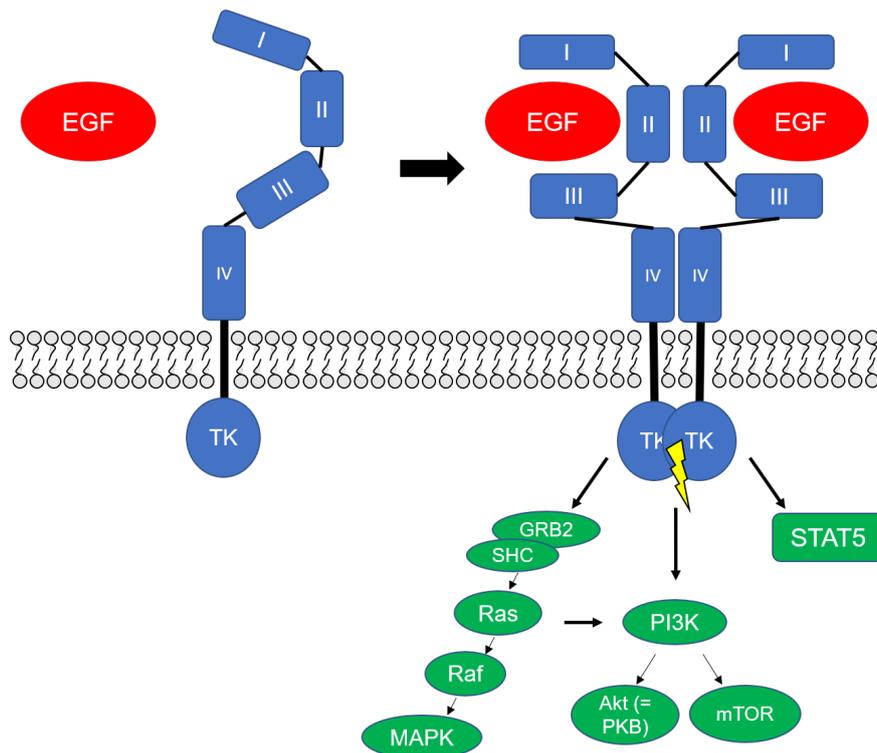
Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist ein Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität und gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren (engl. *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*). Neben dem EGFR (ErbB1) bzw. Her1 (engl. *human epidermal growth factor receptor 1*) gehören noch die Rezeptoren Her2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) und Her4 (ErbB4) dazu [8]. Her1 ist der Rezeptor für EGF und den transformierenden Wachstumsfaktor  $\alpha$  (engl. *transforming growth factor  $\alpha$* , TGF $\alpha$ ), an Her3 und Her4 binden die sog. Neureguline. Für Her2 sind keine Liganden

## Einleitung

bekannt, er kann als bevorzugter Korezeptor auch ohne Ligandenbindung dimerisieren (s.u.) [9].

Der EGFR besteht aus vier extrazellulären Domänen (I-IV), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (Abb. 2). Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne III führt zu einer Konformationsänderung und zur Zusammenlagerung entweder mit einem weiteren EGFR-Molekül (Homodimerisierung) oder mit einem anderen Rezeptor der ErbB-Familie (Heterodimerisierung). Dadurch werden die Tyrosinkinasedomänen beider Partner in räumliche Nähe zueinander gebracht und es erfolgt eine wechselseitige Autophosphorylierung an definierten Tyrosinresten. An die Phosphotyrosinreste können nun Signalproteine mittels ihrer SH2-Domäne binden und eine Vielzahl kurz- und langfristiger Effekte auslösen. So kann über die Phospholipase C- $\gamma$  der zelluläre Kalziumspiegel beeinflusst werden. Für die Änderung der Genexpression relevant ist über Zwischenstationen die Aktivierung des G-Proteins RAS (engl. *rat sarcoma*) und des RAS-aktivierbaren Faktors (RAF). Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der MAP-Kinase (engl. *mitogen-activated protein kinase*, syn. engl. *extracellular signal regulated kinase*, ERK) und letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Änderungen des Zellverhaltens. Weitere wichtige EGFR nachgeschaltete Substrate sind STAT-5 (engl. *signal transducer and activator of transcription-5*) und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche die Proteinkinase B (synonym zu Akt, engl. *AKR-thymoma*) aktivieren kann [10, 11].

## Einleitung



**Abbildung 2. Schematische Darstellung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors.**

Die Ligandenbindung wird über die Domäne III vermittelt und erfolgt über eine „Tasche“, die durch die Domänen I-III gebildet wird. Durch Homo- oder Heterodimerisierung und wechselseitiger Phosphorylierung der Tyrosinkinasedomänen (= TK) kann die Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren erfolgen. Dies vermittelt u.a. Überleben, DNA-Synthese und Zellwachstum [11].

### 1.2.2. Die Rolle des EGFR in der Tumorgenese

Die klinische Relevanz des EGFR erklärt sich durch sein ubiquitäres Vorkommen auf Karzinomen. Seine Rolle als (Proto-)Onkoprotein beschränkt sich hierbei nicht nur auf Proliferations- und Überlebenssignale, sondern trägt auch zur Angiogenese oder Metastasierung bei [12]. Schon früh war bekannt, dass der EGFR sich in größerer Menge auf Karzinomen als auf normalem Gewebe findet und eine hohe Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht [8, 13]. Die Überexpression geschieht über eine Genamplifikation (Lokus: 7p11.2) und ist häufig in plattenepithelialen Lungen-, kolorektalen und Kopf-Hals-Tumoren zu finden. EGFR-Mutationen treten gehäuft bei Hirntumoren und Adenokarzinomen der Lunge auf [10]. Die Rezeptorliganden EGF und TGF $\alpha$  kommen hierbei von der Tumorzelle selbst

(autokrine Stimulation), oder von benachbarten Tumorzellen oder dem umgebenden Stroma (parakrine Stimulation) [14]. Zudem sind Mutationen der Ligandenbindungs- und der Kinasedomäne bekannt, die den Rezeptor in einen konstitutiv aktiven Zustand versetzen. Das therapeutische Ziel der EGFR-Signalunterdrückung kann über zwei Strategien erreicht werden: die Hemmung mit niedrigmolekularen Inhibitoren oder mit monoklonalen Antikörpern.

### **1.2.3. EGFR-gerichtete Tyrosinkinase-Inhibitoren**

Zu den in Europa zugelassenen, EGFR-gerichteten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) gehören u.a. Erlotinib (Tarceva®, Roche, Zulassung 2005), Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca, Zulassung 2009), Afatinib (Giotrif®, Boehringer-Ingelheim, Zulassung 2013), sowie Osimertinib (Tagrisso®, AstraZeneca, Zulassung 2016). Die Substanzen sind für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom sowie das Pankreaskarzinom (nur Erlotinib) zugelassen. Sie konkurrieren mit dem für die Phosphorylierung notwendigen Adenosintriphosphat (ATP) und besetzen dessen Bindestelle am Rezeptor, die Phosphorylierung wird reversibel (Erlotinib, Gefitinib) bzw. irreversibel (Afatinib, Osimertinib) gehemmt [8].

### **1.2.4. EGFR-gerichtete Antikörper**

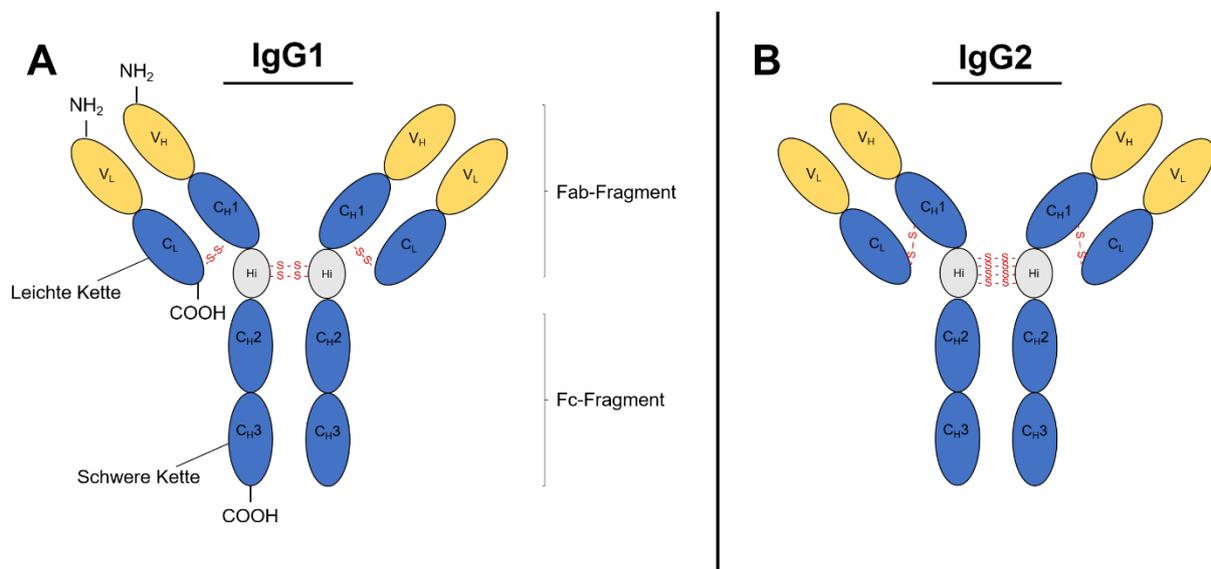
Den niedrigmolekularen TKI gegenüber stehen die EGFR-gerichteten Antikörper, die ihre wachstumshemmende Wirkung über direkte und indirekte Mechanismen ausüben (s.u.). In dieser Klasse existieren bis dato drei in Europa klinisch zugelassene Medikamente. Necitumumab (Portrazza®, Eli Lilly) ist ein humaner IgG1-Antikörper und seit 2016 für das Plattenepithelkarzinom der Lunge in Kombination mit den konventionellen Chemotherapeutika Gemcitabin und Cisplatin zugelassen [15]. Cetuximab (Erbix®, Merck/Bristol-Myers Squibb) ist ein chimärer (murin-human) IgG1-Antikörper und der erste zugelassene EGFR-Antikörper (EU-Zulassung 2004). Seine Zulassung erfolgte ursprünglich als Spätlinientherapie beim metastasierten, EGFR+ kolorektalen Karzinom aufgrund positiver Phase-II-Studien [16]. Hierauf basierend gab es wachsende Evidenz, dass der K-RAS-Mutationsstatus für das klinische Ansprechen maßgeblich ist. K-RAS gehört zur Familie der oben erwähnten

## Einleitung

RAS G-Proteine und ist zentral im Signalweg des EGFR. Findet sich hier eine aktivierende Mutation (KRAS<sub>mut</sub>), ist die Inhibierung des EGFR-Signals wirkungslos. Dementsprechend führte die CRYSTAL-Studie, die den K-RAS-Mutationsstatus im Rahmen einer Phase-III-Studie untersuchte, zur Anpassung der Zulassung, und zwar nun auch als Erstlinientherapie und nur bei Wildtyp-K-RAS (KRAS<sub>wt</sub>) [17]. Die Effektivität des Antikörpers erwies sich auch bei fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zusammen mit Strahlentherapie oder platinbasierter Chemotherapie, sodass 2006 bzw. 2008 die Zulassung für die Kombination mit den jeweiligen Therapieregimen erfolgte [18, 19]. Der dritte zugelassene EGFR-Antikörper Panitumumab (Vectibix®, Amgen) ist ein humaner IgG2-Antikörper. Die Zulassung erfolgte 2007 als Monotherapie beim therapierefraktären metastasierten kolorektalen Karzinom aufgrund einer Phase-III-Studie, in der Panitumumab der bestmöglichen Supportivtherapie überlegen war. Wie bei Cetuximab ergab eine post-hoc Analyse der Daten eine Limitierung des Effekts auf das Kollektiv der KRAS<sub>wt</sub>-Patienten [20]. Studien belegten den positiven Effekt sowohl bei Kombination mit irinotecan- als auch platinbasierten Chemotherapien, dies jeweils ausschließlich beim KRAS<sub>wt</sub>-Kollektiv [21, 22]. Es folgte daraufhin die Zulassung beim metastasierten KRAS<sub>wt</sub>-Kolonkarzinom. Bei KRAS<sub>mut</sub>-Patienten zeigte die Kombination aus Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin mit Panitumumab hingegen ein verkürztes progressionsfreies Überleben. Dieser negative Effekt wurde auch bei Kombination mit Bevacizumab gesehen, einem angiogenesehemmenden Antikörper gegen VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) [23]. In einer später erschienenen Studie wurde diese Beobachtung auch für Cetuximab gemacht [24]. Die Autoren der Studien erklärten den negativen Effekt auf das Überleben durch eventuelle pharmakodynamische Interaktionen und verstärkter Toxizität bei Hinzunahme eines weiteren Antikörpers. Eine prospektive Phase-III-Studie, die Cetuximab vs. Panitumumab als Monotherapie verglich, zeigte als primären Endpunkt die Nichtunterlegenheit von Panitumumab. Es kam hier bei Cetuximab als chimärem Antikörper zu einer höheren Rate schwerer Infusionsreaktionen, Panitumumab zeigte häufiger Hypomagnesiämien. Die häufigsten Nebenwirkungen beider Antikörper waren Hautreaktionen und abdominelle Beschwerden [25]. Eine Besonderheit von Cetuximab und Panitumumab ist, dass beim metastasierten kolorektalen Karzinom das Auftreten einer höhergradigen Hauttoxizität mit einem verbesserten Gesamtüberleben und einer langsameren Progression korreliert [26].

### 1.3. Antikörper-Isotypen und Subklassen

Die fünf humanen Antikörperisotypen sind, absteigend nach ihrem Anteil an der Gesamtserummenge, IgG (75 %), IgA (15 %), IgM (10 %), IgD (0,5 %) sowie IgE (0,01 %). Bei dem IgG-Isotyp unterscheidet man die vier Subklassen (in absteigender Serumhäufigkeit) IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Der IgA-Isotyp besitzt mit dem IgA1 und IgA2 zwei Subklassen [27]. Die Isotypen der Antikörper werden durch die Gene der schweren Kette, die in einer Serie von Exonen auf Chromosom 14 liegen, bestimmt (s.u.). Im Folgenden wird ausschließlich auf die IgG-Isotypen eingegangen. Allen Isotypen gemein ist der prinzipielle Aufbau, welcher schematisch anhand eines IgG1-Moleküls aus Abbildung 3A zu entnehmen ist.



**Abbildung 3. Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.** In Blau abgebildet sind die konstanten Regionen, in Gelb die variablen Regionen. **(A)** Ein Immunglobulin G (IgG)-Molekül setzt sich aus zwei mit Disulfidbrücken (rotes „S-S“) verbundenen Dimeren zusammen. Diese werden wiederum aus je einer schweren und einer leichten Kette über eine Disulfidbrücke gebildet. Nach enzymatischer Verdauung mit Papain entstehen zwei antigenbindende (= Fab) - Fragmente sowie ein kristallisierbares (= Fc) - Fragment.  $V_L$ ,  $V_H$  = variable Regionen der leichten (L) bzw. schweren (H) Kette;  $C_L$ ,  $C_H$  = konstante Regionen der leichten (L) bzw. schweren (H) Kette;  $H_i$  = Scharnierregion;  $COOH$  = carboxyterminales Ende;  $NH_2$  = aminoterminal Ende. **(B)** Das IgG2-Molekül unterscheidet sich vom IgG1-Subtyp in der Anzahl der Disulfidbrücken und Aminosäuren in der Scharnierregion ( $H_i$ ) sowie in der Konstitution der Disulfidverbindung zwischen schwerer und leichter Kette. Nach [27, 28].

## Einleitung

Grundsätzlich setzt sich ein Antikörperprotein aus jeweils zwei identischen schweren Ketten (engl. *heavy chain*, H) mit einer Molekülmasse von je etwa 50 kDa und zwei identischen leichten Ketten (engl. *light chain*, L) mit einer Masse von je 25 kDa zusammen [29]. Das N-terminale Ende jeder Kette wird als variable Region (V) bezeichnet, die sich nach carboxyterminal anschließenden Domänen als konstante Regionen (C). Die schwere Kette besitzt neben der aminoterminalen variablen Domäne ( $V_H$ ) insgesamt drei konstante Domänen ( $C_{H1-3}$ ). Bei IgG-Antikörpern befindet sich zwischen den Domänen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$  die sogenannte Scharnierregion (engl. *hinge region*,  $H_i$ ). Die leichte Kette tritt in zwei funktionell gleichwertigen Isotypen (kappa,  $\kappa$  und lambda,  $\lambda$ ) auf und besteht aus einem variablen ( $V_L$ ) und einem konstanten Segment ( $C_L$ ). Die konstante Region der leichten Kette dient der Befestigung an der  $C_{H1}$ -Region der schweren Kette mittels einer Disulfidbrücke und ermöglicht so die Formierung eines Heterodimers aus einer schweren und einer leichten Kette (HL). Zwei dieser HL-Dimere verbinden sich schließlich zu einem IgG-Molekül ( $H_2L_2$ ). Dies geschieht durch die Ausbildung einer je nach IgG-Subklasse unterschiedlichen Anzahl an Disulfidbrücken im Scharniersegment sowie nonkovalenter Wechselwirkungen im  $C_{H3}$ -Segment [28]. Die wichtigsten Unterschiede zwischen den IgG-Subtypen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1. Eigenschaften der verschiedenen IgG-Subtypen (nach [28, 29]).**

Subtyp	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Molekülmasse (Kilodalton)	146	146	165	146
Aminosäuren in der Scharnierregion	15	12	62	12
Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten	2	4	11	2
Mittlerer Serumspiegel beim Erwachsenen (in mg/ml)	9	3	1	0,5
Serumhalbwertszeit (in Tagen)	21	20	7	21

Verdaut man einen IgG-Antikörper mit dem Enzym Papain, welches den Antikörper aminoterminal der Disulfidbrücken in der Scharnierregion spaltet, so erhält man zwei identische antigenbindende Fragmente (engl. *fragment antigen binding*, Fab) sowie

## Einleitung

ein kristallisierbares Fragment (engl. *fragment crystallizable*, Fc) [29]. Das Fab-Fragment beinhaltet die variablen Regionen der beiden Ketten. Diese sind, anders als die konstanten Regionen, deutlich weniger konserviert. Sie besitzen definierte hypervariable Bereiche, sog. *complementary determining regions* (CDR), deren Grundlage eine große, teils zufallsgemäße genetische Variabilität ist. Sie repräsentieren jenen Teil des Antikörpers, der spezifisch ein Antigen bindet. Die Bindestelle des Antigens nennt man Epitop, die komplementaritätsbestimmenden Regionen des Antikörpers Paratop. Schätzungen zufolge beträgt die Antikörperdiversität eines Menschen mindestens  $10^{11}$  Moleküle [29]. Die Aminosäuresequenzen der Fc-Fragmente aller vier IgG-Subklassen zeigen über 90 % Homologie. Am zahlreichsten und bedeutsamsten sind die Unterschiede in der Gelenk- und C<sub>H</sub>2-Region (Abb. 3 und Tabelle 1). Insbesondere der an die Gelenkregion angrenzende Bereich von C<sub>H</sub>2 determiniert die spezifischen Effektorfunktionen der einzelnen Subklassen [28]. Die funktionelle Diversität erklärt sich biologisch dadurch, dass die Art des Antigens präferenziell bestimmte Subklassen induziert. IgG1- und IgG3-Moleküle entstehen als Antwort auf (virale) Proteinantigene, während IgG2 und weniger IgG4 nach Kontakt mit Polysacchariden, z.B. bakteriellen Kapselantigenen, produziert werden [27]. Für IgG-Antikörper relevant sind die Effektorfunktionen der Neutralisierung, Opsonierung, Komplementaktivierung sowie Immunzellaktivierung. Bei der Neutralisierung wird ein Antigen, etwa ein Toxin oder ein Virus, durch die alleinige Bindung des Antikörpers unschädlich gemacht, dazu sind alle IgG-Klassen gleichermaßen in der Lage. Opsonierung bedeutet die Markierung einer Zielzelle und anschließende Aktivierung von Phagozyten. Diese Funktion wird im allgemeinen IgG1 und IgG3 zugeschrieben. Gleiches gilt für die Aktivierung anderer Immunzellen, meist Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Den Vorgang der antikörpervermittelten Zelldestruktion nennt man antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC), im Falle der Phagozytose antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (engl. *antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*, ADCP). Zur komplementabhängigen Zytotoxizität (engl. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC) sind ebenfalls vor allem IgG1 und IgG3 befähigt, weniger auch IgG2 (IgG3 > IgG1 > IgG2) [29].

#### 1.4. Systematik und Eigenschaften humaner Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren bilden eine spezialisierte Proteinfamilie, über die eine Immunzelle mit einem Antikörper über dessen C<sub>H</sub>2-Domäne des Fc-Teils interagiert [28]. Die Rezeptoren, die spezifisch an IgA binden, heißen Fcα-Rezeptoren (FcαR), diejenigen, die an IgE binden, Fcε-Rezeptoren (FcεR) und diejenigen, die an IgG-Moleküle binden, Fcγ-Rezeptoren (FcγR). Man unterteilt die Fc-Rezeptoren aufgrund von Strukturhomologien in zwei Gruppen, wobei der größte Anteil der sog. Immunglobulin-Superfamilie zuzurechnen ist, während es sich bei der kleineren Gruppe um sog. Lektine handelt [30]. Die Immunglobulin-Superfamilie beinhaltet einige wiederkehrende Bausteine, welche unter anderem im T-Zell-Rezeptor, in Antikörpern oder bei Integrinliganden zu finden sind [29]. Schematisch bestehen Fcγ-Rezeptoren aus einer extrazellulären Domäne, der α-Kette, die den Antikörper nichtkovalent bindet, und einer intrazellulären Domäne, welche die Signaltransduktion initiiert (Abb. 4). Die intrazelluläre Domäne ist entweder eine γ-Kette, die sich nichtkovalent mit der α-Kette zusammenlagert, wie beim FcγRI und FcγRIII (s.u.), oder, wie beim FcγRII, eine spezialisierte, γ-artige Domäne der α-Kette. Die γ-Kette trägt eine aktivierende konservierte Aminosäuresequenz, genannt ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Der intrazelluläre Teil der α-Kette kann rezeptorabhängig ein aktivierendes ITAM tragen (FcγRIIa) oder aber ein inhibierendes ITIM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*; FcγRIIb) [29]. Im Falle der ITAMs führt die Bindung eines IgG-Antikörpers zur Phosphorylierung von Tyrosinresten durch src-Tyrosinkinase (engl. *sarcoma*). Dies ermöglicht die Rekrutierung von Kinasen der syk-Familie (engl. *spleen tyrosine kinase*), welche u.a. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Die PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in der Plasmamembran zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) und erzeugt so Bindestellen für weitere Kinasen wie die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) und die Phospholipase C-γ (PLC-γ). Deren Produkte bewirken u.a. einen intrazellulären Kalziumanstieg und Rekrutierung weiterer Kinasen und beeinflussen die Zellmotilität, die Proteinexpression sowie Überleben und Differenzierung der Zelle [31, 32]. Das ITIM ermöglicht die Rekrutierung der *Src-homology 2*-haltigen Phosphatase (SHP) sowie der SH2-haltigen Inositolphosphatase und kann die Effekte der ITAMs inhibieren [29]. Wichtig für die Immunregulation ist die Kreuzvernetzung vieler Fc-Rezeptoren

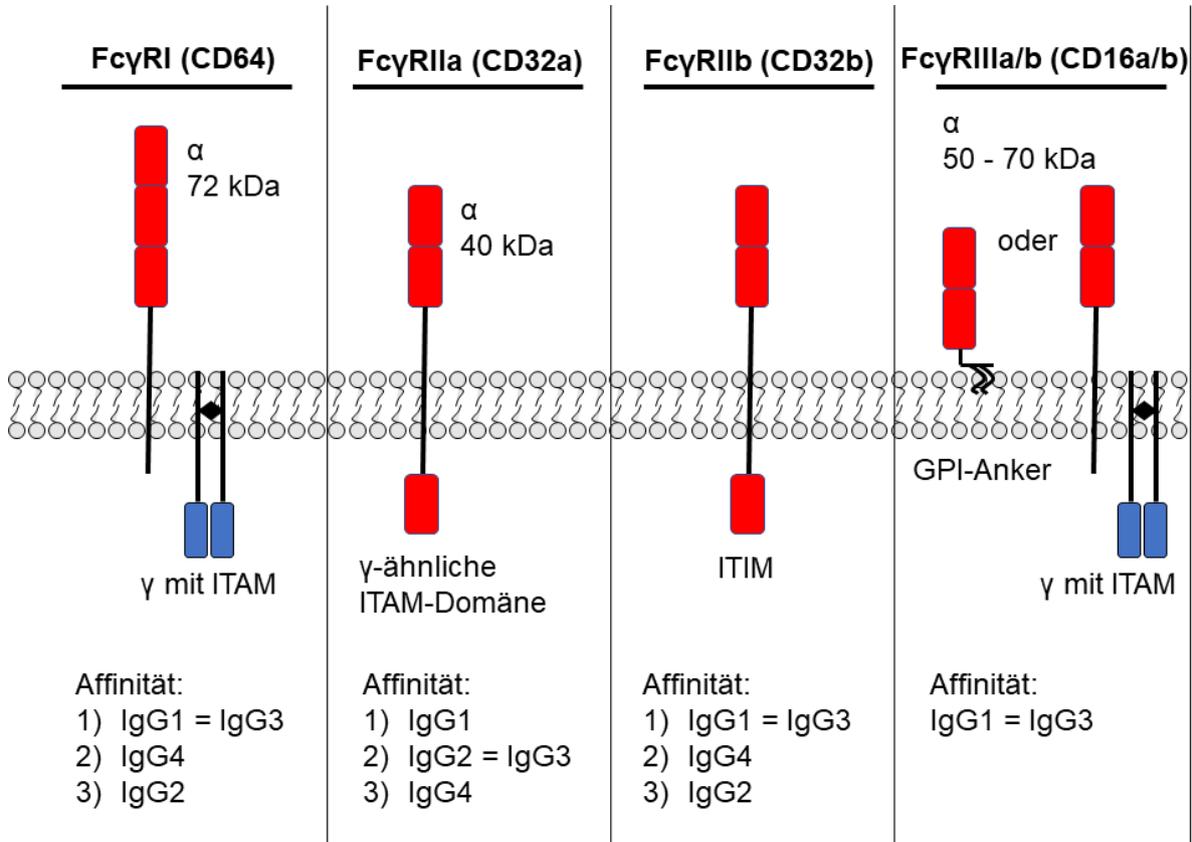
## Einleitung

durch Antigene, an denen mehrere Antikörper mit ihrem Fab-Teil binden, sog. Immunkomplexe, und gleichzeitig mit ihren Fc-Teilen eine Zusammenlagerung der Fc-Rezeptoren ermöglichen. Da jeder Fc-Rezeptor nur jeweils einen Antikörper binden kann, ist dieser Schritt der lokalen Konzentration essenziell für die Aktivierung der oben beschriebenen Kaskaden [33].

Alle IgG-spezifischen Fc-Rezeptoren gehören zur Ig-Superfamilie und befinden sich in einem Gencluster auf Chromosom 1 [34]. Man unterscheidet anhand von Struktur, Vorkommen auf den Immunzellentypen und Bindeaffinität drei Gruppen von Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Der Fc $\gamma$ RI (CD64, engl. *cluster of differentiation*) wird auch als hochaffiner Fc $\gamma$ -Rezeptor bezeichnet, er kann im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen auch monomeres IgG (außer IgG2) binden, das nicht in Immunkomplexen vorliegt [35]. Er findet sich vornehmlich auf Monozyten und Makrophagen, induzierbar auch auf Neutrophilen. Die niedrigaffine Gruppe des Fc $\gamma$ RII besteht aus dem aktivierenden Fc $\gamma$ RIIa (CD32a), der auf myeloischen Zellen zu finden ist, dem inhibierenden Fc $\gamma$ RIIb (CD32b), welcher vor allem bei B-Zellen und selten bei myeloischen Zellen auftritt, sowie dem aktivierenden Fc $\gamma$ RIIc (CD32c), der bei 20 % der Population auf NK-Zellen, Monozyten und Neutrophilen vorkommt [34]. Der Fc $\gamma$ RIIa ist der einzige Fc-Rezeptor, der IgG2 bindet. Bei dem niedrigaffinen Fc $\gamma$ RIII unterscheidet man den Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) und den Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b). Der Fc $\gamma$ RIIIa ist der wichtigste aktivierende Fc-Rezeptor auf NK-Zellen, kommt aber auch auf Makrophagen vor. Er bindet IgG1 und IgG3 [35]. Der Fc $\gamma$ RIIIb kommt auf neutrophilen Granulozyten am zahlreichsten aller Fc-Rezeptoren vor. Der Rezeptor besitzt statt einer intrazellulären Signaldomäne einen Membrananker aus Glykophosphatidylinositol (GPI-Anker) und dient wahrscheinlich als „Signalverstärker“, kann aber ohne Fc $\gamma$ RIIa-Koaktivierung keine ADCC vermitteln [36–38]. Bekannt sind zudem einige Polymorphismen der extrazellulären Domäne von Fc-Rezeptoren, die z.B. mit rheumatischen Erkrankungen und verändertem Ansprechen auf die Antikörpertherapie bei Tumoren in Verbindung gebracht werden [35, 39]. Am relevantesten in diesem Kontext ist zum einen ein Polymorphismus des Fc $\gamma$ RIIa an Aminosäureposition 131, genannt „low responder“ (H<sub>131</sub>) und „high responder“ (R<sub>131</sub>), der im Falle des H131-Allels zu geringerer IgG1- und verstärkter IgG2-Bindung führt [40]. Zum anderen weist der Fc $\gamma$ RIIIa einen

## Einleitung

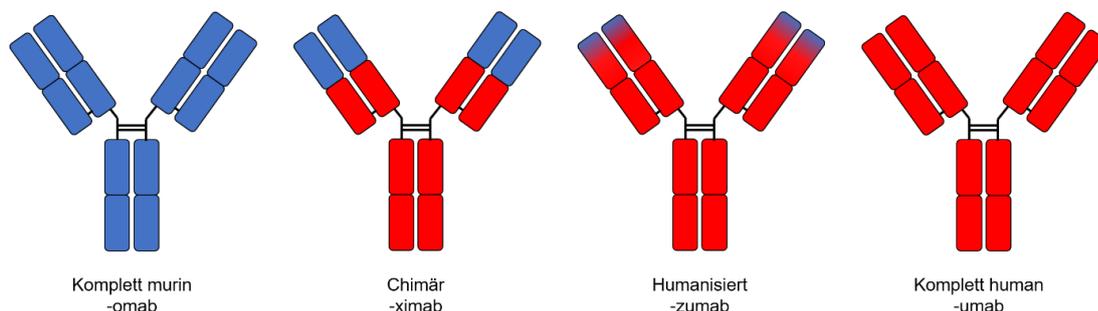
Polymorphismus an Position 158 auf, genannt  $V_{158}$  und  $F_{158}$ , wobei das  $V_{158}$ -Allel eine höhere Affinität zu IgG1 und IgG3 aufweist [41].



**Abbildung 4. Schematische Darstellung der humanen Fcγ-Rezeptoren (FcγR).** Die drei Gruppen weisen zueinander ein molekular variables Erscheinungsbild auf. So besitzt der FcγRI drei extrazelluläre Untereinheiten (α-Kette) und assoziiert mit einer intrazellulären γ-Kette mit aktivierenden Tyrosinmotiven (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM). Die restlichen Fcγ-Rezeptoren besitzen jeweils zwei extrazelluläre Untereinheiten, wobei die α-Kette intrazellulär mit ihrer aktivierenden ITAM oder inhibierenden ITIM-Region (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) die Funktion der γ-Kette übernimmt. Der FcγRIII kann mit einer γ-Kette assoziieren (FcγRIIIa) oder mit einem Anker aus Glykophosphatidylinositol (GPI) (FcγRIIIb) ohne Signalgebung. Darunter aufgestellt sind die Affinitäten zu den IgG-Subklassen in absteigender Reihenfolge (nach [29]). kDa = Kilodalton.

## 1.5. Monoklonale Antikörper

Natürlicherweise induziert ein Krankheitserreger eine Mischung verschiedener Antikörperklassen gegen unterschiedliche Epitope, selbst Antikörper gegen das gleiche Epitop können sehr unterschiedlich sein. Antikörper, die das gleiche Antigen binden, aber aus verschiedenen B-Zell-Klonen stammen, nennt man polyklonal. Den meisten wissenschaftlichen und medizinischen Zwecken genügen polyklonale Antikörper aufgrund qualitativer und quantitativer Limitationen nicht. Georges Köhler und Cesar Milstein gelang mit der Hybridomtechnik der entscheidende Schritt in der Massenproduktion monoklonaler Antikörper. Hierbei fusioniert man B-Zellen aus einer gegen ein bestimmtes Antigen immunisierten Maus mit einer murinen Myelomzelllinie. In den entstandenen sogenannten Hybridomzellen erfüllen die Milzzellen die Funktion der Antikörperproduktion und die Myelomzellen verleihen der Zelllinie Immortalität. In einem Selektionsmedium selektioniert man die fusionierten Hybridomzellen, vereinzelt und selektioniert dann die Klone, die den Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzieren. Den gewünschten Klon gibt man in Kultur und kann den monoklonalen Antikörper aus dem Überstand aufreinigen [42]. Da sich diese Technik für humane Antikörper als insuffizient herausgestellt hat, greift man zunehmend auf gentechnische Verfahren zurück, die sich mit der Hybridomtechnik überlappen. Aufgrund hoher Immunogenität artfremder Eiweiße ist es hierbei vorteilhaft, einen möglichst geringen murinen Anteil am produzierten Antikörper zu erreichen. Nach diesem Anteil richtet sich auch die Nomenklatur monoklonaler Antikörper (Abb. 5) [29].



**Abbildung 5. Die Nomenklatur monoklonaler Antikörper.** Sie richtet sich nach dem murinen Anteil (in Blau). Beim chimären Antikörper bestehen die kompletten variablen Regionen aus murinem Protein, beim humanisierten Antikörper lediglich die hypervariablen Regionen (nach [29]).

### **1.6. Wirkmechanismen therapeutischer EGFR-Antikörper**

Therapeutische Antikörper können über zwei grundsätzliche Mechanismen ihre Wirkung vermitteln: zum einen über die Bindung an ihr Epitop mittels des Fab-Teils, zum anderen über zelluläre und nichtzelluläre Effektormechanismen, die durch ihren Fc-Teil vermittelt werden. Mit unterschiedlicher Wichtung in Abhängigkeit ihres Isotyps werden beide Mechanismen für die Wirkung der EGF-gerichteten Antikörper diskutiert [43].

#### **1.6.1. Fab-vermittelte direkte Mechanismen**

Bei CD20-Antikörpern (z.B. Rituximab) ist bekannt, dass die Bindung an das Antigen und eine folgende Kreuzvernetzung mehrerer CD20-Moleküle den programmierten Zelltod einleiten kann [44]. Auch die Effekte der Immunkontrollpunkt-Inhibitoren wirken über die Bindung des Antikörpers an bestimmte immunologische „Bremsen“ (s.u.) [45]. Die direkten Effekte EGFR-gerichteter Antikörper beruhen auf der Inhibition der ligandenabhängigen Signaltransduktion (Abb. 6 links). Die Epitope von Cetuximab und Panitumumab befinden sich beide auf der Ligandenbindungsdomäne III. Sie sind nicht identisch, zeigen aber überlappende Bereiche zueinander und auch zur Bindungsdomäne des Liganden EGF [46]. Dadurch, dass die Antikörper mit höherer Affinität (Panitumumab > Cetuximab) als EGF an den EGFR binden, wird die Rezeptoraktivierung und somit die Signaltransduktion verhindert. Matuzumab, ein weiterer EGFR-Antikörper, der nicht klinisch zugelassen ist, bindet nicht an der EGF-Bindedomäne, sondern verhindert die Rezeptordimerisierung. Vermutlich kommt es nach Antikörperbindung zur Internalisierung des EGFR-Antikörper-Komplexes und damit zu einer Reduktion der EGFR-Moleküle auf der Zelloberfläche. Durch Inhibierung der Phosphorylierungskaskaden nach intrazellulär können die zentralen Kinasewege nicht aktiviert werden. Konsekutive Effekte sind Zellzyklusarrest und Apoptose sowie die Verhinderung von Angiogenese und Metastasierung [43].

#### **1.6.2. Fc-vermittelte indirekte Mechanismen**

Über ihren Fc-Teil sind gebundene Antikörper in der Lage, die Elimination der Zielzelle über zwei Mechanismen einzuleiten. Zum einen kann ein Antikörper das

## Einleitung

Komplementsystem rekrutieren (CDC). Zum anderen können über Fc-Rezeptoren diverse Effektorzellen aktiviert werden, welche opsonierte Zellen durch Ausschüttung toxischer Substanzen (ADCC) oder Phagozytose (ADCP) unschädlich machen (Abb. 6) [43].

### 1.6.2.1. *Komplementabhängige Zytotoxizität (CDC)*

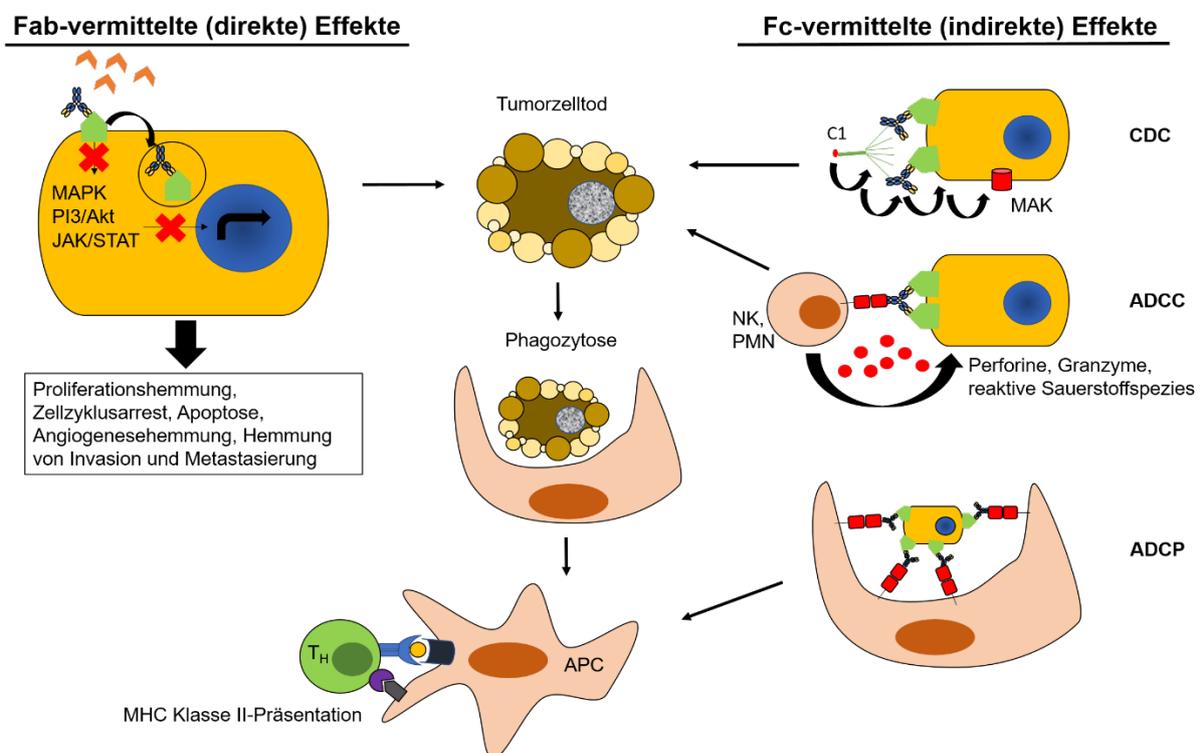
Das Komplementsystem besteht aus >30 im Serum befindlichen Faktoren, die überwiegend von der Leber sezerniert werden und als inaktive Vorstufen (sog. Zymogene) im Blut zirkulieren. Deren Aktivierung basiert wie die Gerinnungskaskade auf proteolytischen Amplifikationsschritten. Die Aktivierung des Komplementsystems durch Bindung des Faktors C1 an den Fc-Teil des Antikörpers ermöglicht die Formierung des membranangreifenden Komplexes aus C5-C9, der Poren in die Zellmembran setzt und dadurch die Lyse der Zelle hervorruft [29]. Das Komplementsystem wird zwar zum angeborenen Immunsystem gezählt, dennoch weist es funktionelle Verbindungen zum Immunsystem auf: einige Komponenten der Komplementkaskade können – ähnlich wie ein Antikörper – von Komplementrezeptoren auf Phagozyten erkannt werden und die Phagozytose einleiten oder als sogenannte Anaphylatoxine weitere Immunzellen anlocken. Theoretisch sind IgG1 und IgG2 imstande, Komplement zu aktivieren, wobei in früheren Untersuchungen nur IgG1 einen relevanten Effekt zeigte [47]. Bei den EGFR-gerichteten Antikörpern ist die klinische Relevanz der CDC nicht geklärt.

### 1.6.2.2. *Zellvermittelte Effekte (ADCC und ADCP)*

Dem Komplementsystem gegenüber stehen die zellvermittelten indirekten Effekte. Für die ADCC und ADCP relevant sind v.a. die Zellen der angeborenen Immunabwehr, also NK-Zellen und polymorphkernige Leukozyten (PMN bzw. Neutrophile) sowie Makrophagen [29]. NK-Zellen gehören der lymphatischen Zellreihe an und können Tumorzellen durch Ausschüttung zytotoxischer Granula abtöten. Sie zerstören die Zellmembran der Tumorzelle und leiten die Apoptose ein. PMN und Makrophagen sind Zellen der myeloischen Zellreihe. Für Makrophagen ist die Phagozytose von Tumorzellen (ADCP) als Mechanismus beschrieben worden [48]. Aufgenommene

## Einleitung

Zellen werden durch ein in Granula gespeichertes Gemisch aus reaktiven Sauerstoffprodukten und Enzymen lysiert, die Inhalte der Granula können auch sezerniert werden [29]. Die Mechanismen der PMN-vermittelten Zytotoxizität sind unklarer. Es zeigte sich, dass opsonierte Tumorzellen nicht mittels freigesetzter toxischer Stoffe lysiert werden, sondern über einen neuartigen Zelltodmechanismus namens „Trogoptose“. Diese basiert auf dem Konzept der Trogozytose, ein Mechanismus zum Membrantransfer zwischen Zellen. Bei der Trogoptose kommt es zur Bildung einer Integrin-vermittelten immunologischen Synapse zwischen Tumorzelle und Granulozyt, Zerstörung der Plasmamembran der Zielzelle und konsekutivem Zelltod [49, 50].



**Abbildung 6. Wirkmechanismen von Antikörpern.** Sowohl die direkten als auch die indirekten Effekte von Tumorantikörpern führen zum Tod der Tumorzelle und können eine körpereigene, T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort auslösen (unten Mitte), APC = antigenpräsentierende Zelle, T<sub>H</sub> = T-Helferzelle). Die direkten Effekte (links) führen über Verhinderung der Ligandenbindung und Herabregulation des Rezeptors zur Hemmung zentraler Signalwege. Dies führt zum Zyklusarrest und zur Apoptose, es werden zudem Angiogenese und Tumorprogress verhindert.

**Abb. 6 ff.** Bei den indirekten Effekten (rechts) unterscheidet man die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC), die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), und die antikörperabhängige Phagozytose (ADCP). CDC: Bindung des Faktors C1 an den Antikörper startet eine proteolytische Kaskade, die zur Bildung des porenbildenden Membranangriffskomplexes (MAK) führt. ADCC: Die Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunabwehr (PMN = polymorphkernige Neutrophile; NK = Natürliche Killerzellen) über Fc-Rezeptoren führt zur Ausschüttung zytotoxischer Substanzen, es werden aber auch andere Mechanismen diskutiert. Zudem kann die Opsonierung der Tumorzellen zur Phagozytose durch Makrophagen führen (ADCP). Nach [43, 45].

## 1.7. Die Rolle des Immunsystems bei Tumorerkrankungen

### 1.7.1. Das Tumormikromilieu

Harold F. Dvorak, der den VEGF entdeckte, bezeichnete solide Tumoren als „Wunden, die nicht heilen“ [51]. Ähnlich wie die Wunde ist ein Tumor von einer Matrix aus zellulären und azellulären Bestandteilen umgeben, welche man das Tumormikromilieu (engl. *tumor microenvironment*) nennt [52]. Neben Fibroblasten, Endothelzellen, Fibrin und Wachstumsfaktoren haben daran Immunzellen einen großen Anteil. Diese erkennen und vernichten normalerweise in der sog. Eliminierungsphase entartete Zellen (engl. *immune surveillance*). Dadurch entsteht ein Selektionsdruck und bestimmte Mutationen können einen Überlebensvorteil bilden (Gleichgewichtsphase). Gelingt es den Tumorzellen, der Immunüberwachung zu entkommen, treten sie in die Entkommensphase ein und können sich ungehindert ausbreiten [29]. Dazu tragen „*Escape-Mechanismen*“ genannte Alterationen bei (s.u.). In Assoziationsstudien von Genexpression und Prognose betraf das größte Cluster involvierter Gene solche, die an der Immunantwort beteiligt sind [53]. Makrophagen werden seit Längerem als wichtige Immunzellen bei Entstehung, Wachstum und Erhalt maligner Tumoren diskutiert [54, 55]. Gleichzeitig ist bekannt, dass sie im Rahmen der Antikörpertherapie zahlreicher Neoplasien auch als Effektorzellen fungieren können [48, 56]. Welche Stellung Makrophagen hier einnehmen, ist im Wesentlichen von der Zytokinausstattung innerhalb des Tumormilieus abhängig. Grob unterteilt werden zwei Makrophagenpopulationen: die klassisch durch Interferon- $\gamma$  aktivierten M1-Makrophagen, denen ein proinflammatorisches Potenzial zugeordnet wird, sowie die

über Interleukin (IL)-4 und IL-10 aktivierten M2-Makrophagen, bei denen eher regulatorische Eigenschaften vermutet werden und die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [57]. Für PMN wird eine ähnliche Polarisierung in N1- und N2-Neutrophile angenommen [58].

### **1.7.2. Immunologische Kontrollpunkte**

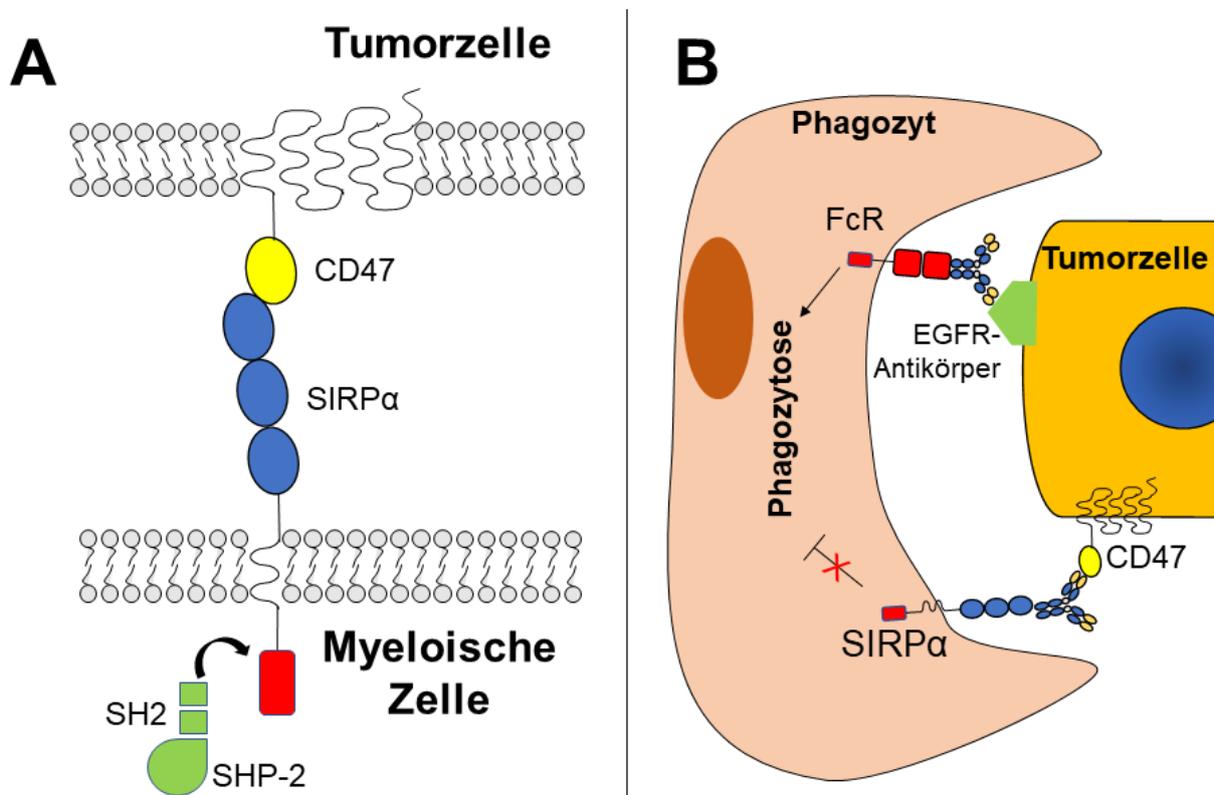
Auf den Immunzellen haben die Oberflächenmarker PD-1 (engl. *programmed cell death 1*) bzw. dessen Ligand PD-L1 sowie CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), welches an CD80/86 bindet, wichtige Funktionen. PD-1 befindet sich auf aktivierten Lymphozyten, B-Zellen und NK-Zellen und hat seine Funktion im peripheren Gewebe. PD-L1 wird bei Inflammation hochreguliert und limitiert so den Gewebeschaden, kann aber auch auf Tumoren als *Escape*-Mechanismus vermehrt exprimiert werden [59]. CTLA-4 befindet sich auf zytotoxischen und T-Helferzellen. Es bindet kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen und unterbindet so die Aktivierung der naiven T-Zelle. Aus dem neuen Wissen über die reziproke Beziehung zwischen Krebs und dem Immunsystem leitete man neue Therapiestrategien ab. Antikörper, die gegen negative Kontrollpunkte des Immunsystems gerichtet sind und somit deren inhibitorische Wirkung aufheben können, sind in der Forschung wie auch in der klinischen Anwendung weit etabliert [60]. Derzeit zugelassene Antikörper agieren ausschließlich auf dem Gebiet der T-Zell-vermittelten Immunität [61]. Es existieren Antikörper gegen PD-1, PD-L1 und CTLA-4, die insbesondere für fortgeschrittene solide Tumoren zugelassen sind [62].

### **1.7.3. CD47 und SIRPα als Kontrollpunkte des angeborenen Immunsystems**

Wie das adaptive Immunsystem unterliegt die angeborene Abwehr einer positiven und negativen Regulation. Als positives (= phagozytisches) Signal ist seit einiger Zeit Calreticulin bekannt, das normalerweise im endoplasmatischen Retikulum vorkommt. Bei Zellstress oder Apoptose erscheint es vermehrt auf der Oberfläche und stimuliert Makrophagen zur Phagozytose der Zelle [63]. Da Tumorzellen einem hohen genetischen Stress ausgesetzt sind, zeigen diese eine hohe Konzentration von Calreticulin auf ihrer Oberfläche [64]. Anders als normale Zellen zeigen sie hierbei eine

## Einleitung

Koexpression von CD47 (alternativ Integrin-assoziiertes Protein, IAP), das als negatives Signal durch Bindung an den Liganden SIRP $\alpha$  (engl. *signal regulatory protein  $\alpha$* ) auf myeloischen Zellen die Phagozytose verhindert. Beide sind, wie die Fc-Rezeptoren, Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie [29]. Während CD47 ein ubiquitär im Körper exprimiertes Protein ist, findet sich SIRP $\alpha$  restringiert auf myeloischen Zellen und Neuronen. SIRP $\alpha$  besitzt drei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche (engl. *immunoglobulin superfamily; IgSF*) Domänen, eine Transmembrandomäne sowie zwei ITIMs, die wie beim Fc $\gamma$ RIIb über SH2-Phosphatasen die inhibitorische Wirkung vermitteln (Abb. 7A). Die Gruppe der SIRP besteht neben SIRP $\alpha$  noch aus SIRP $\beta$ 1, SIRP $\beta$ 2, SIRP $\gamma$  und dem löslichen SIRP $\delta$ , die sich in ihrer Verteilung auf die Gewebe, der Affinität zu CD47 und der intrazellulären Signaldomäne unterscheiden. CD47 besteht aus einer extrazellulären IgSF-Domäne, fünf Transmembrandomänen sowie einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Abb. 7A). Dieser besitzt keine Signaldomäne, kann aber lateral mit Integrinen, Rezeptoren und Signalmolekülen assoziieren [65].



**Abbildung 7. CD47/SIRP $\alpha$ -Interaktion. (A)** CD47 besteht aus fünf Transmembrandomänen und einer extrazellulären Immunglobulinsuperfamilie (IgSF)-Domäne (gelb), intrazellulär ist keine Signaldomäne vorhanden.

## Einleitung

**Abb. 7 ff.** SIRP $\alpha$  (engl. signal regulatory protein  $\alpha$ ) besitzt extrazellulär drei IgSF-Domänen (blau), eine transmembranäre Domäne und intrazellulär eine tyrosinbasierte Inhibierungsmotiv-haltige Domäne (= ITIM), über die es *Src-homology 2*-haltige Phosphatasen (= SHP-2) rekrutiert. **(B)** Funktionsprinzip CD47-blockierender Antikörper im EGFR-Kontext (grün). Der Antikörper verhindert die Interaktion zwischen CD47 und SIRP $\alpha$ , dadurch entfällt das inhibierende Signal. Bei Kombination mit einem EGFR-gerichteten Antikörper kann über den Fc-Rezeptor (= FcR) ein zusätzliches prophagozytisches Signal gegeben werden. Ggf. kann dies auch über den Fc-Teil des an das CD47-Molekül gebundenen Antikörpers selbst geschehen. Nach [56, 66].

CD47 fungiert protektiv als antiphagozytisches „Iss-mich-nicht“-Signal, zum Beispiel als Schutz von Erythrozyten vor vorzeitiger Phagozytose in der Milz [67]. Ist es, wie bei vielen malignen Tumoren, überexprimiert, übernimmt es diese Funktion auch hier. Dies geht mit einem schlechtem Ansprechen auf Antikörper- und Chemotherapie sowie mit einer schlechten Prognose einher [68]. Daher leitet sich das therapeutische Interesse an der Blockade der Achse zwischen CD47 und SIRP $\alpha$  ab (Abb. 7B). Präklinisch konnte ein positiver Effekt *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. So konnte man eine verbesserte Effektivität in Kombination mit verschiedenen Tumorantikörpern, darunter auch EGFR-Antikörpern, nachweisen. Dies assoziierte man v.a. mit einer gesteigerten ADCP durch Makrophagen [68–70]. Für PMN als weitere SIRP $\alpha$ -exprimierende Zellentität gibt es ebenfalls Evidenz für einen inhibitorischen Einfluss von CD47 auf die ADCC gegenüber Zellen, die mit dem Her2-Antikörper Trastuzumab opsoniert waren [50, 69]. Es befinden sich gegenwärtig mehrere gegen CD47 oder SIRP $\alpha$  gerichtete Therapeutika in der klinischen Erprobung, z.B. der humane IgG4 CD47-Antikörper Magrolimab (hu5FU-G4) in Phase II-Studien bei der akuten myeloischen Leukämie und diversen soliden Tumoren [71].

### 1.8. Hypothesen und Ziele

Die antikörperbasierte Tumorthherapie befindet sich seit mehr als 20 Jahren in der klinischen Anwendung. Die Anwendungsgebiete und Angriffspunkte tumorgerichteter Antikörper haben seitdem stetig zugenommen. Jedoch spricht nicht jeder Patient auf eine Antikörpertherapie an. Ein Grund hierfür sind große biologische Unterschiede selbst innerhalb einer Tumorentität sowie teils noch unverstandene *Escape-*

## Einleitung

Mechanismen. Mit der Entdeckung von CTLA-4 und PD-1/PD-L1 als negative Regulatoren lymphozytärer Abwehrmechanismen hielt zuletzt die Strategie der Immuncheckpoint-Inhibition Einzug in die klinische Praxis. Bei den Karzinomen hat der EGFR als Angriffspunkt für die gezielte Therapie Aufmerksamkeit erfahren. Neben Tyrosinkinaseinhibitoren als sog. *small molecules*, die vor allem beim Lungenkrebs eingesetzt werden, haben sich die Antikörper Cetuximab sowie Panitumumab insbesondere beim metastasierten kolorektalen Karzinom etabliert. Antikörper haben den Vorteil, dass sie über ihren Fc-Teil Immunzellen zur Tumorzelldestruktion rekrutieren können. Dieses Attribut wird gemeinhin den IgG1-Antikörpern aufgrund ihrer Fähigkeit zur NK-Zell-Aktivierung zugeschrieben, wohingegen IgG2-Antikörper als immunologisch weitestgehend inert angesehen werden und bevorzugt dann gewählt werden, wenn keine Immunzellaktivierung erwünscht ist. In klinischen Studien erwiesen sich Cetuximab (IgG1) und Panitumumab (IgG2) im direkten Vergleich als ebenbürtig bei vergleichbarem Nebenwirkungsprofil [25]. Präklinische Untersuchungen konnten zeigen, dass das Ansprechen auf eine Antikörpertherapie von immunologischen Mechanismen beeinflusst wird und beschrieben ferner eine Involvierung von myeloischen Zellen [39, 72]. In diesem Kontext zeigte sich Panitumumab in Vorstudien als potenter Induktor von ADCC [73].

Somit geht der erste Teil dieser Arbeit dem direkten Vergleich der beiden klinisch zugelassenen EGFR-Antikörper Cetuximab und Panitumumab hinsichtlich ihrer myeloischen Effektorfunktionen nach. Im zweiten Abschnitt geht es um die Charakterisierung regulatoriver Elemente bei der zellvermittelten Zytotoxizität. Es wird hier zum einen der Einfluss der EGFR-Expressionsdichte und des Epitops auf den Tumorzellen untersucht, sowie die Abhängigkeit der effektiven Zelllyse von der Antikörpermenge und Effektorzellzahl analysiert. Des Weiteren wird der Einfluss von CD47 auf die Effektorzellrekrutierung behandelt. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Wirkmechanismen von EGFR-gerichteten Antikörpern beitragen. In Anbetracht wachsender Tendenzen in Richtung Präzisionsmedizin dürfte der Stellenwert dieser Kenntnisse im Hinblick auf neue Therapiestrategien in Zukunft noch zunehmen.

## 2. Material und Methoden

Versuche, die mit menschlichem Material durchgeführt wurden, wurden durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gemäß der Deklaration von Helsinki genehmigt. Blutspenden im Rahmen der Versuche erfolgten von zufällig ausgesuchten, gesunden Freiwilligen nach entsprechender schriftlicher Aufklärung und Einwilligung.

### 2.1. Antikörper

Die bereits zugelassenen EGFR-Antikörper Cetuximab (chimärer humaner IgG1, Synonym: 225; Erbitux®) und Panitumumab (humaner IgG2, Synonym: E7.6.3; Vectibix®) wurden von Merck KGaA (Darmstadt, DE) bzw. Amgen Europe B.V. (Breda, NL) bezogen. Die humanen IgG1- und IgG2-Varianten der nicht zugelassenen Antikörper Zalutumumab (2F8) und Matuzumab (H452) und die murinen Varianten von Rituximab und Matuzumab wurden von den Kooperationspartnern Genmab (Utrecht, NL) und der Universität Southampton (Cancer and Vaccine Group, Cancer Sciences, University of Southampton, UK) produziert. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper befindet sich im Anhang (Kapitel 7.2.).

### 2.2. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien A431, Kyse-30 sowie Kyse-150 wurden zwischen 2011 und 2016 von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DE) bezogen. Die A431 scr (engl. *scrambled control*) sowie die A431 CD47 Ko (engl. *knock-out*) Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Timo van den Berg (Sanquin Research and Landsteiner Laboratory, Amsterdam, NL) überlassen. Die Zelllinien SCC-25 und SAT stammten aus dem Bestand von Prof. Dr. M. Binder (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, Hamburg, DE). Die Zelllinie A1207

## Material und Methoden

wurde über das National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) bezogen. Eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien und Kulturbedingungen befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.).

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien erfolgte im Inkubator (HeraCell 240, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Verhinderung bakterieller Kontamination wurde allen Kulturmedien 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin („Pen/Strep“, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) beigesetzt. Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen einem Mykoplasmen-Test unterzogen (MycoAlert™, Lonza, Walkersville, MD, US). Bei Mykoplasmenbefall wurden die Zellen entweder verworfen oder einer 14-tägigen Behandlung mit Gentamicin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) unterzogen. Die Passage der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich in einem Aufteilungsverhältnis von 1:5 bis 1:20. Die Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) wurden max. fünfmal wiederverwendet und die Zelllinien nach max. 20 Passagen verworfen. Passage und Verwendung der Zellen erfolgte unter streng sterilen Bedingungen mit sterilen Einmalprodukten unter der Reinluftbank (Hera Safe, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US). Dafür wurde das verbrauchte Medium entnommen, die Zellen mehrfach mit 1x PBS gewaschen und schließlich unter Verwendung von 0,05 % Trypsin/EDTA (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) abgelöst. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen der Zellkulturflasche entnommen, bei 1600 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US) und in einer definierten Menge Kulturmedium aufgenommen. War die Ermittlung der Zellzahl erforderlich, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau-Färbelösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) verdünnt (1:5) und unter der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{ermittelte Zellzahl}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten Zählkammer}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$$

### 2.3. CD47 siRNA-vermittelter Knock-down

Für den CD47 Knock-down mittels siRNA (engl. *small interfering RNA*) wurde das Lipofectamine® 2000 Transfektionsreagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) gemäß Herstellerprotokoll verwendet, vorher wurde durch Titration des Transfektionsreagenzes und der siRNA die optimale Effizienz mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der CD47-Expression ermittelt. Für die Transfektion wurden  $0,25 \times 10^6$  Zielzellen in eine 6-Well (engl. für Vertiefung) - Platte (Sarstedt, Nümbrecht, DE) mit serum- und antibiotikafreiem OptiMEM® Medium (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) ausgesät. Am Folgetag wurden siRNA sowie Negativkontrolle (beide Invitrogen, Carlsbad, CA, US) entsprechend Protokoll in Eppendorfhütchen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) diluiert, das Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde dann das serumfreie Medium durch das entsprechende Zellkulturmedium ersetzt. Die Verwendung der Zellen erfolgte 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion.

### 2.4. Analysen im Durchflusszytometer

In der Durchflusszytometrie können große Zellzahlen in kurzer Zeit lichtoptisch anhand ihrer Oberflächeneigenschaften charakterisiert werden. Hierbei wird die Probe in eine dünne Glasröhre gesogen. In der Küvette entsteht ein Flüssigkeitsstrom, der pro Zeiteinheit je nur eine Zelle am Laserstrahl passieren lässt, welcher die Zelle optisch anregt. Im Detektor können nun das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) als Indikator für die Zellgröße sowie das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) als Korrelat für die Zellgranularität bestimmt werden. Des Weiteren können auf den Zellen spezifisch gegen Zelloberflächenmoleküle gerichtete, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper binden (direkte Immunfluoreszenz). Die Menge des gebundenen Farbstoffes kann ebenfalls vom Detektor quantifiziert werden und korreliert mit der Menge des jeweiligen Oberflächenmarkers. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet an den primären Antikörper ein weiterer sog. Sekundärantikörper, an den der Farbstoff gekoppelt ist. Da an einen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden können, erreicht man so eine Signalamplifikation.

## Material und Methoden

Für die Bestimmung des Bindungsverhaltens der EGFR-Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden A431 CD47 Ko-Zellen unmittelbar vor der Verwendung mit Trypsin/EDTA abgelöst, gezählt und auf eine adäquate Zellzahl/ml eingestellt.  $0,15 \times 10^6$  der Zellen wurden dann in eine konische 96-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, DE) gegeben, 5 Minuten bei 4 °C und 1600 rpm zentrifugiert und anschließend in 100 µl FACS-Puffer (1x PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin und 0,01 % Natriumazid) aufgenommen. Nach Zugabe des jeweiligen humanen EGFR-Antikörpers in der gewünschten Konzentration wurden die Zellen 1 Stunde auf Eis inkubiert. Der CD20-Antikörper Rituximab (Mabthera®, Hoffmann-La Roche, Basel, CH) diente als Kontrollantikörper, da Karzinomzelllinien das Oberflächenantigen nicht besitzen. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Zellen dreifach durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgekippt und die Zellen auf Eis in frischem kalten FACS-Puffer resuspendiert. Dann wurden 50 µl des Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Sekundärantikörpers (Ziege anti-human Kappa-Leichtkette, Southern Biotech, Birmingham, AL, US) in der Verdünnung 1:100 hinzugegeben und 30 Minuten inkubiert. Es erfolgte erneut dreimalig der oben beschriebene Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, in Messröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) überführt und im Durchflusszytometer (Epics® oder Navios®; Beckman Coulter, Fullerton, CA, US) gemessen.

Die Quantifizierung der EGFR- und CD47-Expression der Tumorzelllinien erfolgte wie oben beschrieben mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierbei dienten die murine Variante von Matuzumab (m425, EGFR, Prof. Dr. Marc Cragg, Southampton, UK) bzw. der murine CD47-Antikörper B6H12 (BioXCell, West Lebanon, NH, US) in der Konzentration 20 µg/ml als primäre Antikörper bzw. ein muriner CD20-Antikörper (Labor Prof. Dr. Marc Cragg, Southampton, UK) als Kontrolle. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, US) in der Verdünnung 1:50 verwendet. Für die Kontrolle des CD47 Knock-downs wurde ein Phycoerythrin (PE)-konjugierter CD47-spezifischer Antikörper und der entsprechende nichtbindende Kontrollantikörper aus der Maus (beide Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE) in 1:10-Verdünnung verwendet.

Die Analyse der Oberflächenmarker auf den Effektorzellen wurde mittels direkter Immunfluoreszenz mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII), CD64 (FcγRI) (alle Beckman Coulter, Brea, CA, US) bzw. gegen SIRPα,

CD80 und CD163 (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE) sowie mit einer nichtbindenden Kontrolle (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE), jeweils 1:10 verdünnt, durchgeführt. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die Immunzellen vorab 30 Minuten mit 1:50 verdünntem, humanen polyklonalen IgG (Intratect®, Biotest, Dreieich, D) inkubiert.

Die quantitative Analyse der Ergebnisse erfolgte durch Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI), welche den arithmetischen Mittelwert abbildet und sich aus der Fluoreszenzintensität (FI) berechnet. Das normalisierte Bindungsverhalten berechnete sich durch die Formel:

$$\frac{FI \text{ spezifischer Antikörper} - FI \text{ Isotypkontrolle}}{100}$$

### 2.5. Präparation humaner Effektorzellen

Alle verwendeten humanen Effektorzellen stammten aus dem peripheren Blut freiwilliger gesunder Spender.

#### 2.5.1. Präparation polymorphkerniger Granulozyten

Die Isolation humaner polymorphkerniger Granulozyten (PMN) erfolgte durch Zentrifugation über Polymorphprep™ (Progen, Heidelberg, DE) nach Protokoll des Herstellers bei Raumtemperatur. Hierfür wurden 7 ml frisches Zitratblut in einem 15 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) vorsichtig auf 7 ml der Polymorphprep™-Flüssigkeit geschichtet und anschließend 30 Minuten bei 500 x g ohne Bremse zentrifugiert (Abb. 8). Nach Zentrifugation finden sich unter der Blutplasmaschicht in dem Röhrchen zwei Banden, wobei die obere Bande die mononukleären Zellen (MNC) repräsentiert und die untere Bande die PMN. Nach Abnahme und Verwurf der MNC und danach der Plasmaschicht konnte anschließend die PMN-Bande isoliert werden. Jeweils ca. 15 ml des PMN-Gemisches wurden dann in einem 50 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt und anschließend 5 Minuten mit Bremse bei 400 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreifach durchgeführt und

## Material und Methoden

anschließend die Zellpellets vereint. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten. Dafür wurden die PMN pelletiert und in einer geringen Menge 1x PBS resuspendiert. Im Anschluss wurden 45 ml eiskaltes destilliertes Wasser (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) hinzugegeben und nach 30 Sekunden die Lyse durch Hinzugabe von 5 ml 10x PBS (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation von 5 Minuten bei 400 x g wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium (in Abhängigkeit von der im Folgenden verwendeten Tumorzelllinie) resuspendiert und anschließend die Zellzahl nach der in Abschnitt 2.2 aufgezeigten Formel via Trypanblau-Exklusion bestimmt. Die Reinheit der isolierten PMN wurde anschließend durchflusszytometrisch (FSC/SSC) bestimmt, der Gehalt an MNC betrug in der Regel  $\leq 5\%$ .

### 2.5.2. Erzeugung von Makrophagen

Die Erzeugung von Makrophagen erfolgte nach der sog. Adhärenzmethode. Zur Gewinnung humaner MNC wurden 10 ml antikoaguliertes Blut in einem 50 ml Röhrchen auf 20 ml Separationsmedium (Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare, Chicago, IL, US) aufgeschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation ohne Bremse bei 400 x g für 30 Minuten. Der entstandene MNC-Gradient wurde dann vorsichtig abpipettiert, die Zellen mehrfach wie oben beschrieben gewaschen und die Zellpellets vereint. Die Bestimmung der Zellzahl wurde nach Trypanblaufärbung ermittelt. Die Makrophagen wurden aus den MNC durch Adhärenz unter Verwendung des *Monocyte Attachment* Mediums (PromoCell, Heidelberg, DE) generiert. Dazu wurden die Zellen erneut pelletiert und jeweils  $40 \times 10^6$  Zellen in 1 ml *Attachment* Medium aufgenommen. In 25 cm<sup>2</sup> Nunc™-Kulturflaschen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US) wurden 4 ml des *Monocyte Attachment* Mediums vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension hinzugegeben. Nach 30 Minuten bei 37 °C im Inkubator wurden die nun adhärenzten Monozyten mehrfach mit 1x PBS gewaschen, um nicht adhärenzte Zellen (NK-Zellen, Lymphozyten) zu entfernen. Dann wurde 5 ml serumfreies X-Vivo™-Medium (Lonza, Walkersville, MD, US) hinzugegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und verworfen, die Zellen dreifach mit 1x PBS gewaschen, und frisches X-Vivo™-Medium zugesetzt. Dem Medium wurden außerdem die Zytokine für die Polarisierung der Makrophagen

## Material und Methoden

hinzugefügt. M1-ähnliche Makrophagen wurden generiert durch Inkubation mit 10 ng/ml GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) für 6 Tage und ab Tag 7 zusätzlich 20 ng/ml Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) plus 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) für 2 weitere Tage. Die Polarisierung zu M2-ähnlichen Makrophagen erfolgte durch Inkubation mit 50 ng/ml M-CSF (engl. *macrophage colony-stimulating factor*) und ab Tag 7 zusätzlich noch 20 ng/ml Interleukin-4 (IL-4). Alle Zytokine wurden von Peprotech (Cranbury, NJ, US) bezogen. Nach 8 Tagen wurde zum Ablösen der polarisierten Makrophagen das Medium abgenommen und verworfen, die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen, und anschließend 5 ml enzymfreiers Dissoziationspuffer (*Cell Dissociation Buffer*, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, US) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Puffer samt gelöster Makrophagen abgenommen und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Verbliebene Zellen wurden sanft mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, DE) abgelöst. Nach Zentrifugation bei 400 x g für 5 Minuten wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit der Trypanblau-Methode bestimmt.

### 2.6. Messung der Zytotoxizität

Die Messung der ADCC erfolgte im sogenannten Chromfreisetzungsversuch (engl. *chromium release assay*). Hierbei macht man sich zunutze, dass das radioaktive Chromisotop  $^{51}\text{Cr}$  bei Inkubation in die Zielzellen aufgenommen wird. Bei Lyse der Zelle wird das Chrom wieder freigesetzt und erzeugt in einer speziellen Szintillationsflüssigkeit Lichtblitze. Diese Ereignisse pro Minute (engl. *counts per minute*, cpm) können mit einem Szintillationsdetektor gemessen werden und sind proportional zum Ausmaß der Zelllyse. Sämtliche Arbeitsschritte sind in Abb. 8 dargestellt. Dazu wurden in eine 96-Well-Rundbodenplatte (Sarstedt, Nümbrecht, DE) Zellmedium und die gewünschte Antikörpermenge pipettiert. Dann wurden die präparierten Effektorzellen im jeweiligen Zellmedium hinzugegeben. PMN wurden ggf. vor der Verwendung mit 10 ng/ml GM-CSF für eine Stunde vorinkubiert. Die Menge der Effektorzellen variierte je nach angegebenem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis. Die Zielzellen wurden mit 0,05 % Trypsin-EDTA (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA,

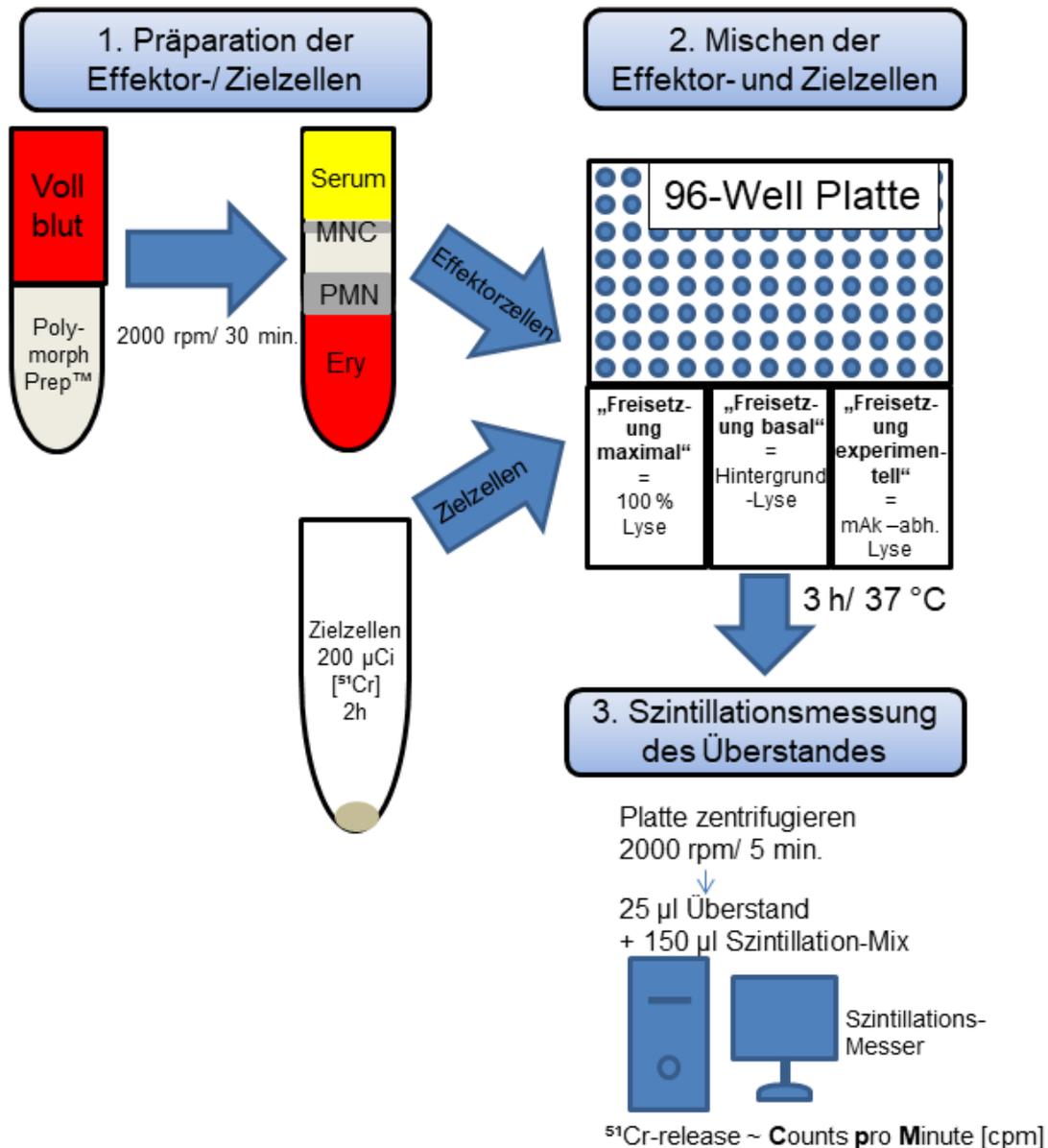
## Material und Methoden

US) abgelöst, gezählt und so eingestellt, dass sich am Schluss  $5 \times 10^3$  Zielzellen in jedem Testwell befinden. Sie wurden anschließend mit  $200 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$  (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D) für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Kulturmedium gewaschen, indem sie jeweils für 5 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert wurden. Der Versuch wurde durch Zugabe der Zielzellen in die Testplatte gestartet. Nach drei (PMN) bzw. zwölf Stunden (Makrophagen) Inkubation im Brutschrank wurde die Platte bei  $700 \times g$  zentrifugiert. Dann wurden je  $25 \mu\text{l}$  des Überstandes zu vorher vorgelegten  $150 \mu\text{l}$  der Szintillationsflüssigkeit (*Optiphase Super Mix*, Perkin Elmer, Waltham, MA, US) in einer speziellen 96-Well-Probenplatte (Perkin Elmer, Waltham, MA, US) gegeben und im Szintillationsmesser (*MicroBeta® Trilux*, Perkin Elmer, Waltham, MA, US) gemessen. Jeder Ansatz wurde als Triplikat angelegt. Der ADCC-Prozentsatz berechnet sich anhand folgender Formel:

*Spezifische Lyse* [%]

$$= \frac{\text{Freisetzung experimentell [cpm]} - \text{Freisetzung basal [cpm]}}{\text{Freisetzung maximal [cpm]} - \text{Freisetzung basal [cpm]}} \times 100$$

Hierbei stellt die maximale Freisetzung die maximal erreichbare Zelllyse dar, welche durch Auflösung der Zellmembranen mit  $100 \mu\text{l}$  einer 4 %igen Lösung des Detergens Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) erreicht wurde. Die basale Freisetzung repräsentiert die Hintergrundlyse der Zellen in Abwesenheit spezifischer Antikörper bzw. der Effektorzellen.



**Abbildung 8. Arbeitsgang zur Messung der Zytotoxizität.** Als erster Schritt steht die Präparation der Effektorzellen, in diesem Falle Neutrophile (= PMN), an. In einer bestimmten Trennlösung separiert man durch Zentrifugation die PMN von den Erythrozyten (Ery), den mononukleären Zellen (MNC) und dem Plasma. Gleichzeitig werden die Ziel-Tumorzellen mit radioaktivem Chrom inkubiert. Anschließend werden in einer 96-Well-Platte (jeweils in Triplets) die Tumorzellen mit den Effektorzellen für 3 Stunden inkubiert. Für die Bestimmung der maximalen Chrom-Freisetzung gibt man eine zelllysierende Substanz hinzu, für die basale Freisetzung lässt man die spezifischen Antikörper weg. Die experimentelle Freisetzung ergibt sich aus der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC).

**Abbildung 8 ff.** Anschließend wird die Platte zentrifugiert, der Überstand mit einer szintigrafischen Substanz gemischt und über Nacht im Szintillationszähler gemessen. Die ADCC verhält sich proportional zur gemessenen Szintillation.

### 2.7. Datendarstellung und -verarbeitung, statistische Analysen

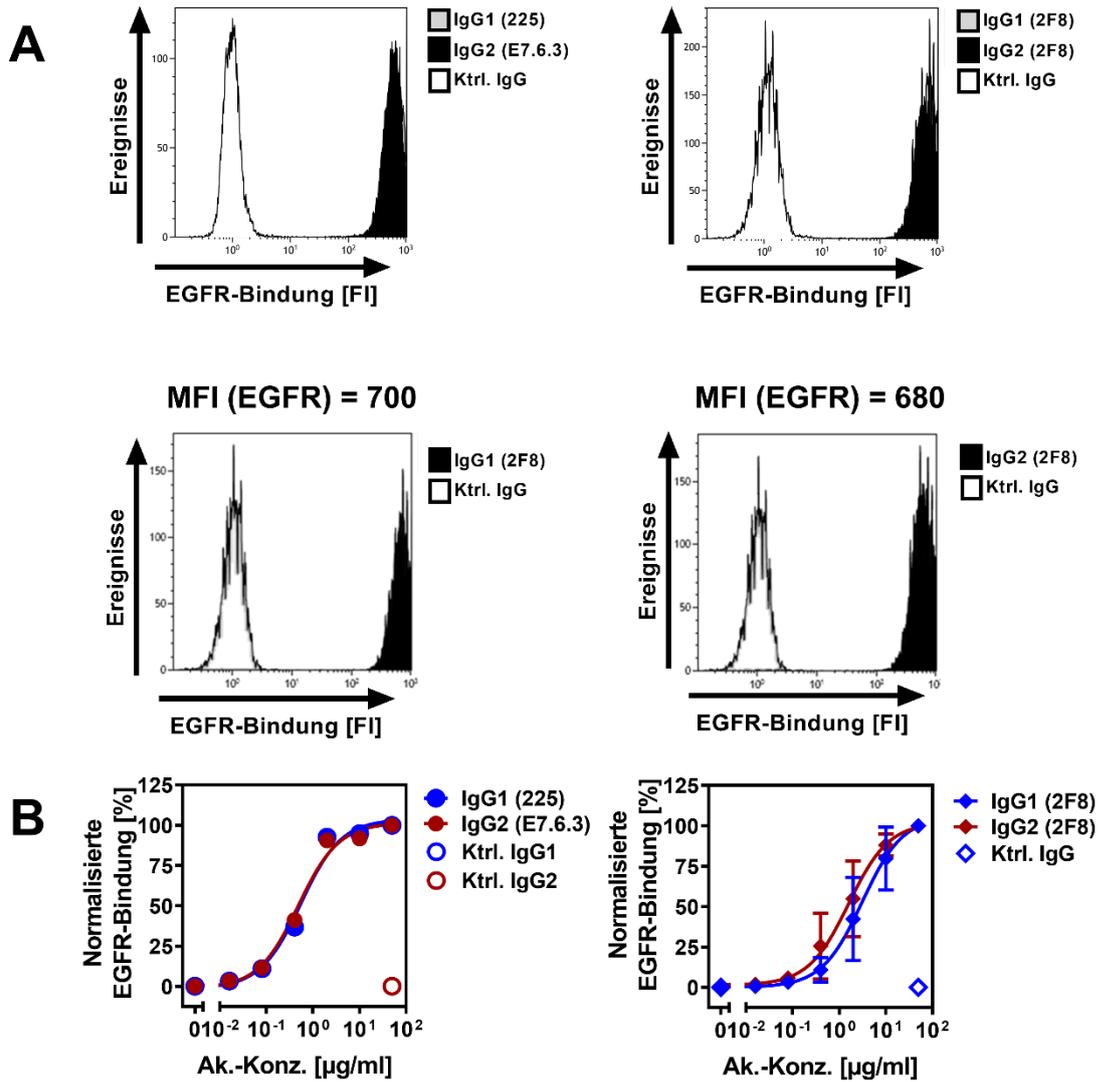
Jede Versuchsreihe bestand aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Soweit humane Effektorzellen verwendet wurden, stammten diese von verschiedenen Probanden. Die Messwerte der Zytotoxizitätstests wurden durch die 1450 MicroBeta Workstation Software (Perkin Elmer, Waltham, MA, US) automatisiert protokolliert und anschließend mittels Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, US) aufbereitet. Durchflusszytometrische Messungen wurden mit der FACS-Analysesoftware Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, US) analysiert und ggf. histogrammisch dargestellt. Die grafische Aufarbeitung der Ergebnisse sowie die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad (Versionen 4, 5, 7, 8, 9) (Graphpad, La Jolla, CA, US). Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde anhand einer ein- oder zweiseitigen Varianzanalyse und einer Bonferroni-Korrektur für multiples Testen errechnet. Als statistisch signifikant gilt in diesem Zusammenhang ein p-Wert  $\leq 0,05$  und ist dann mit einem [\*] gekennzeichnet. Die  $EC_{50}$ -Werte wurden anhand der Dosiskurven bestimmt und sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bindungsverhalten EGFR-gerichteter IgG1- und IgG2-Antikörper

Wie unter Kapitel 1.2. beschrieben, weisen die einzelnen IgG-Antikörperklassen etwa 90 % Homologie in der Primärstruktur zueinander auf. Dennoch unterscheiden sie sich in den die spezifischen Effektorfunktionen determinierenden Bereichen, vor allem in der CH2-Domäne nahe der Scharnier-Region [28]. Aus diesem Grunde war der erste Schritt die Evaluation des Bindungsverhaltens der nachfolgend verwendeten Antikörper. Bei jeweils gleicher Antikörperkonzentration zeigten sich in der durchflusszytometrischen Messung auf A431-Zellen nahezu identische Histogramme, was ein quantitativ gleiches Bindevverhalten anzeigt (Abb. 9A). Dies galt nicht nur für die Antikörper Cetuximab (Syn. 225) und Panitumumab (Syn. E7.6.3), welche gegen verschiedene Epitope gerichtet sind [74]. Auch die IgG1- und IgG2-Isotypen des Antikörpers Zalutumumab (Syn. 2F8), also gegen das gleiche Epitop, unterschieden sich nicht in der Bindung. Somit konnte ein Einfluss des Epitops oder des Isotyps auf die Antikörperbindung ausgeschlossen werden. Um die Bindung in Abhängigkeit der Antikörperkonzentration zu bestimmen, wurde das Bindungsverhalten anhand einer Bindungskurve von 0,016 µg/ml bis 50 µg/ml bestimmt (Abb. 9 B). Zur Übersichtlichkeit wurden die Fluoreszenzintensitäten (FI) normalisiert und als Prozentwert vom Bindungsmaximum angegeben. Hier unterschieden sich die Bindungskurven der korrespondierenden IgG1- und IgG2-Antikörper nicht signifikant voneinander. Auch die mittlere effektive Konzentration, in der ein Antikörper in halbmaximaler Sättigung bindet, die sogenannte  $EC_{50}$ , unterschied sich nicht signifikant: sie lag für Cetuximab bzw. Panitumumab bei  $0,5 \pm 1,7$  µg/ml und  $0,5 \pm 1,1$  µg/ml sowie für Zalutumumab-IgG1 bzw. -IgG2 bei  $3,1 \pm 0,7$  µg/ml und  $1,6 \pm 0,7$  µg/ml.

## Ergebnisse



**Abbildung 9. Bindungsverhalten der EGFR-Antikörper auf A431-Zellen. (A)** Die Antigenbindung zeigt bei fester Konzentration von 5 µg/ml der EGFR-Antikörper Cetuximab (225), Panitumumab (E7.6.3), und Zalutumumab (2F8) unabhängig vom Isotyp das gleiche Bindeverhalten. **(B)** Das Bindungsverhalten der Antikörper in der Dosiskurve zeigt keinen signifikanten Unterschied. Beide Abb.: Messung mittels indirekter Immunfluoreszenz mit FITC-konjugierten Ziege anti-human Kappa-Leichtketten Sekundärantikörpern (Southern Biotech, Birmingham, AL, US) [n=2]. Erstellung der Histogramme mit Kaluza-Analyseprogramm (Beckman Coulter, Brea, CA, US). Statistische Analyse durch zweiseitige Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) mit Graphpad 7 (Graphpad, La Jolla, CA, US). FI = Fluoreszenzintensität, Ktrl = Kontrolle.

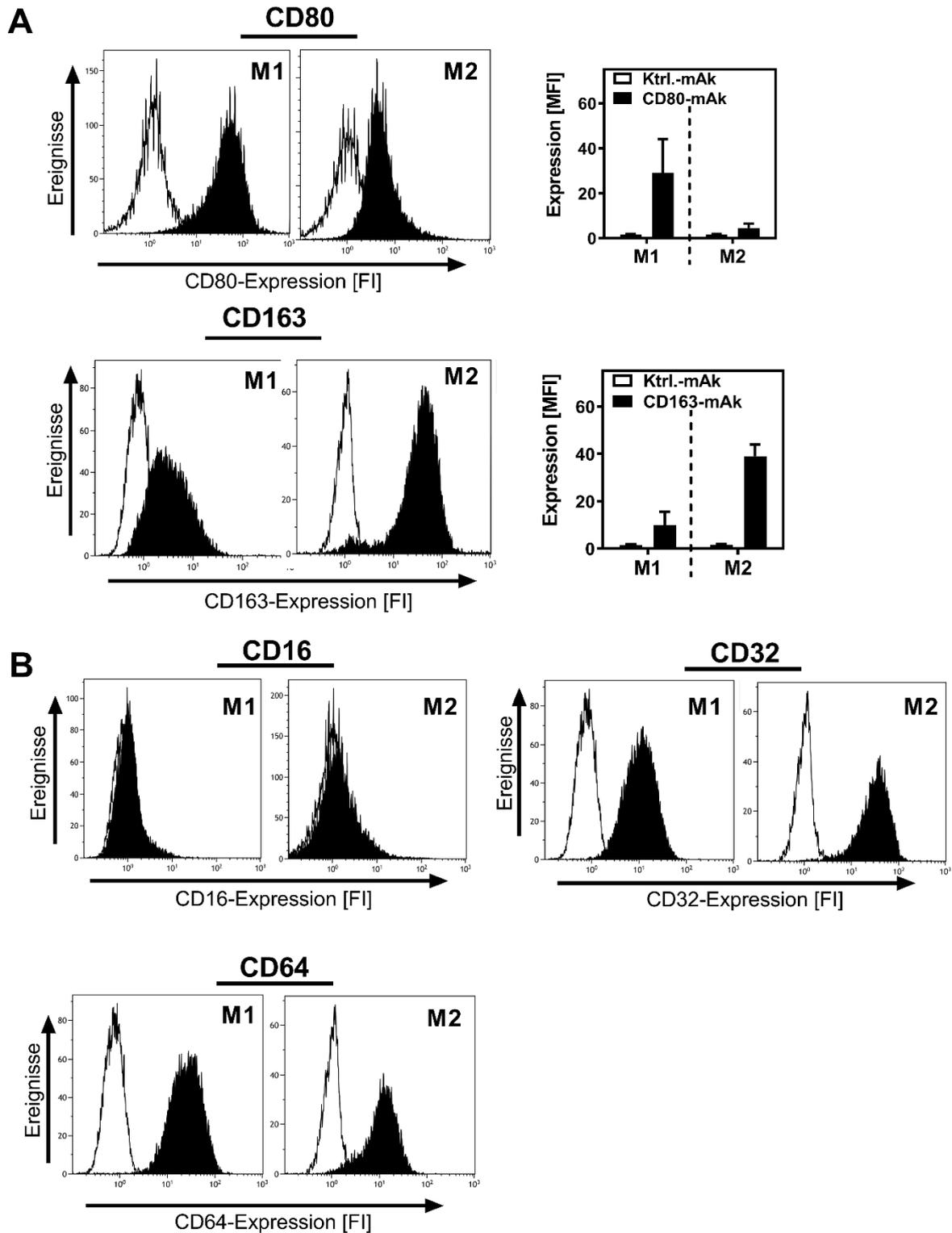
### 3.2. Makrophagen als Effektorzellen

Im Folgenden wurde das Vermögen von M1- sowie M2-ähnlichen Makrophagen, ADCC zu induzieren, untersucht. Dazu wurden, wie oben beschrieben, Makrophagen *in vitro* durch Hinzugabe bestimmter Zytokine polarisiert. Der M1-Phänotyp wurde durch sequentielle Stimulation mit GM-CSF, Interferon- $\gamma$  sowie LPS erzeugt, wohingegen der M2-Phänotyp mit M-CSF sowie IL-4 stimuliert wurde [56]. Da die Polarisierung unter artifiziellen, kontrollierten Bedingungen erfolgte, wird auf die beiden Populationen nachfolgend als M1-ähnliche und M2-ähnliche Makrophagen Bezug genommen.

#### 3.2.1. Vergleich von Oberflächenmerkmalen zwischen M1- und M2-ähnlichen Makrophagen

Um zu untersuchen, ob die Polarisierung zwei phänotypisch distinkte Makrophagen-Populationen hervorbrachte, wurden im Durchflusszytometer zunächst die Oberflächenmerkmale CD80 und CD163 bestimmt. CD80 ist in diesem Zusammenhang als typischer Marker von klassisch aktivierten (M1-)Makrophagen beschrieben worden, während CD163 als Marker von alternativ aktivierten (M2-)Makrophagen bekannt ist [75]. Diese Verteilung zeigte sich auch in den im Rahmen der Arbeit generierten Makrophagenpopulationen (Abb. 10A). Somit konnte von einer erfolgreichen Differenzierung ausgegangen werden. Wichtig im Zusammenhang mit der Interaktion der Effektorzellen mit verschiedenen Antikörpersubtypen ist das Vorhandensein der drei wichtigsten Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Die Makrophagenpopulationen wurden daher durchflusszytometrisch auf die quantitative Verteilung von CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa), CD32 (Fc $\gamma$ RIIa) sowie CD64 (Fc $\gamma$ RI) untersucht. Festzuhalten ist, dass M1-ähnliche Makrophagen eine höhere CD64-Expression aufwiesen (Abb. 10B). M2-ähnliche Makrophagen zeigten eine höhere Expression des CD32-Moleküls. CD16 konnte auf keiner der Populationen nachgewiesen werden.

# Ergebnisse



**Abbildung 10. Oberflächenmarkerexpression von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen.**  
**(A)** Unterschiedliche Expression von CD80 und CD163: CD80 ist hier ein Marker M1-ähnlicher Makrophagen, CD163 von M2-ähnlichen Makrophagen. Bestimmung durch direkte Immunfluoreszenz in drei unabhängigen Versuchen.

## Ergebnisse

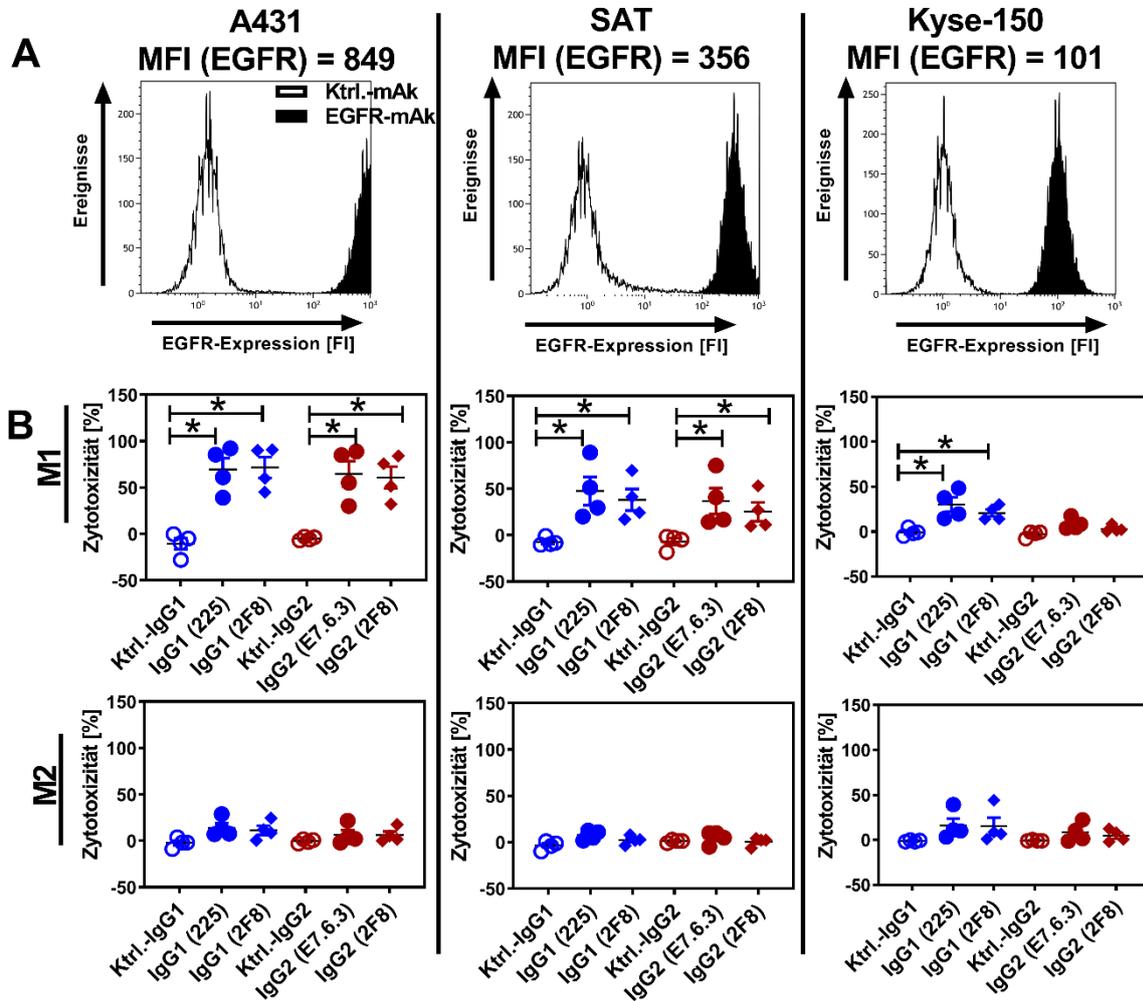
**Abb. 10 ff. (B)** M1-ähnliche Makrophagen zeigen eine höhere Expression des Fc $\gamma$ -Rezeptors I (CD64), während M2-Makrophagen mehr Fc $\gamma$ -Rezeptor II (CD32) exprimieren. Bestimmung durch direkte Immunfluoreszenz, gezeigt werden repräsentative Histogramme. In weiß dargestellt ist der jeweilige Kontrollantikörper (Ktrl.), in schwarz der spezifische Antikörper. Histogramme wurden mit Kaluza, die Grafen mit GraphPad erstellt. Grafen zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM. FI = Fluoreszenzintensität, mAk = monoklonaler Antikörper.

### **3.2.2.** *IgG-vermitteltes zytotoxisches Potenzial von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen*

Nach Erzeugung und Verifizierung eines artifiziellen Modells für M1- bzw. M2-ähnliche Makrophagen war der nächste Schritt die Bestimmung und der Vergleich des zytotoxischen Potenzials dieser Populationen in Anwesenheit EGFR-gerichteter IgG1- und IgG2-Antikörper. Als Zielzellen wurden hierfür drei Zelllinien mit unterschiedlich hoher EGFR-Expression ausgewählt. A431-Zellen stellen hier die Zielzellen mit hoher EGFR-Expression (MFI 849) dar, SAT-Zellen die mit mittlerer Expressionsstärke (MFI 356), und die Kyse-150-Zelllinie haben eine niedrige EGFR-Expression (MFI 101) (Abb. 11A). In Anwesenheit von M1-ähnlichen Makrophagen war Zellyse mit sowohl IgG1- Antikörpern (225; 2F8-IgG1) als auch IgG2-Antikörpern (E7.6.3; 2F8-IgG2) möglich. Eine Ausnahme bildete die Kyse-150-Zelllinie, bei dieser induzierten die IgG2-Isotypen keine signifikante ADCC (Abb. 11B). Bei gleichem Epitop und unterschiedlichem Isotyp (2F8-IgG1/2F8-IgG2) zeigte sich ein Unterschied in der Lyserate zugunsten des IgG1-Isotyps (Tab. 2). Innerhalb von Antikörpern des gleichen Isotyps war die Lyserate hingegen ähnlich, war also vom Epitop der benutzten Antikörper unbeeinflusst. Auf den A431-Zellen mit der höchsten EGFR-Expression zeigte sich die ADCC am höchsten, auf den anderen beiden Zelllinien mit geringerer EGFR-Expression fiel sie jeweils geringer aus. Interessanterweise konnte weder bei den IgG1- noch den IgG2-Antikörpern mit den gemeinhin als regulatorisch beschriebenen M2-ähnlichen Makrophagen eine signifikante Lyse gesehen werden (Tab. 3). Dass die Zellyse spezifisch ist, also von Anwesenheit eines spezifischen Antikörpers und von Effektorzellen abhängig ist, ist daran ersichtlich, dass bei Hinzugabe von CD20-gerichteten Antikörpern keine ADCC gemessen wurde. Dies war auch bei Zugabe der EGFR-Antikörper ohne Anwesenheit der Effektorzellen der Fall (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass zwar beide

## Ergebnisse

untersuchten IgG-Isotypen EGFR-gerichteter Antikörper in der Lage sind, Makrophagen als myeloische Effektorzellen zu akquirieren, dies jedoch entscheidend davon abhängig ist, welcher Typ von Makrophagen (M1 oder M2) vorliegt.



**Abbildung 11. EGFR-Expression und antikörperabhängige Makrophagen-vermittelte Zytotoxizität. (A)** EGFR-Expressionsstärken der Zelllinien A431, SAT und Kyse-150 (hoch/mittel/niedrig). Messung mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierbei diente die murine Variante von Matuzumab (m425) als primärer Antikörper gegen den EGFR bzw. ein muriner CD20-Antikörper als Kontrolle (beide Antikörper von Prof. Dr. Marc Cragg, Southampton, UK). Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, US) verwendet. **(B)** M1-polarisierte Makrophagen induzieren effektiv ADCC, M2-polarisierte Makrophagen induzieren keine Lyse der Zielzellen. Durchführung bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml und einer Effektor- zu Zielzell-Ratio von 10:1. Die Messung erfolgte nach 12 Stunden Inkubation. Wiederholung in vier unabhängigen Versuchen mit Makrophagen aus Vollblut unterschiedlicher Spender.

## Ergebnisse

**Abb. 11 ff.** Statistische Analyse mittels zweiseitiger ANOVA. Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  SEM, statistische Signifikanzen ( $p \leq 0,05$ ) sind mit einem [\*] gekennzeichnet. FI = Fluoreszenzintensität, mAk = monoklonaler Antikörper, 225 = Cetuximab, E7.6.3 = Panitumumab, 2F8 = Zalutumumab.

**Tabelle 2. Mittlere Lyseraten und Standardfehler (SEM) bei M1-ähnlichen Makrophagen (n = 3).**

Antikörper	A431		SAT		Kyse-150	
	Mittl. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)	Mittl. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)	Mittl. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)
225 (IgG1)	69,4	12,2	47,4	15,3	30,1	7,8
2F8-IgG1	71,4	11,4	38,0	11,7	20,7	4,0
E7.6.3 (IgG2)	64,7	13,8	36,6	14,1	8,5	3,2
2F8-IgG2	60,8	11,8	25,1	10,1	3,1	1,8

**Tabelle 3. Mittlere Lyseraten und Standardfehler (SEM) bei M2-ähnlichen Makrophagen (n = 3).**

Antikörper	A431		SAT		Kyse-150	
	Mittl. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)	Mittl. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)	Mittl. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)
225 (IgG1)	13,9	5,1	7,5	2,6	16,0	8,0
2F8-IgG1	11,3	5,0	2,2	2,4	15,2	9,8
E7.6.3 (IgG2)	6,2	5,2	4,9	3,5	8,3	5,3
2F8-IgG2	6,0	4,0	0,5	2,4	4,8	3,3

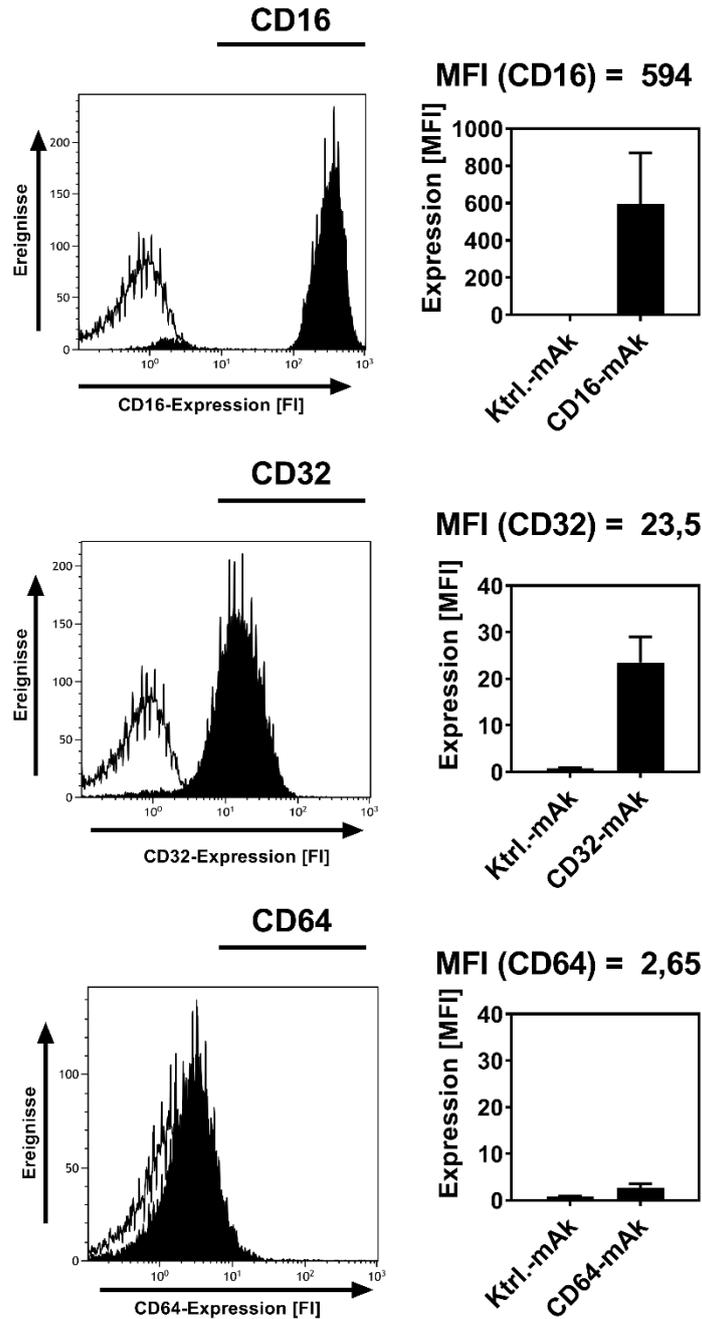
### 3.3. Granulozyten als Effektorzellen

Im Gegensatz zu Makrophagen wurde anderen Zellen der myeloischen Reihe im Zusammenhang maligner Tumoren kaum Beachtung zuteil. Seit der Jahrtausendwende allerdings wurde auch die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Tumorentstehung und -progression näher untersucht. Ähnlich wie bei den Makrophagen ist mittlerweile bekannt, dass auch PMN eine aktive Rolle in der Umgebung maligner Gewebe einnehmen, insbesondere die Angiogenese fördern und gar mit einer schlechteren Prognose korrelieren [76]. Andererseits weiß man auch, dass PMN durchaus in der Lage sind, als Effektorzellen zu fungieren [73]. Um diese Beobachtungen genauer zu quantifizieren, wurde im Folgenden das zytotoxische Potenzial von PMN unter Variierung verschiedener Parameter untersucht.

#### 3.3.1. *Fc-Rezeptor-Expression humaner Granulozyten*

Wie bei den Makrophagen erfolgte auch bei den isolierten PMN eine Charakterisierung der Fc-Rezeptor-Expression mittels Immunfluoreszenz (Abb. 12). Im Vergleich zu den Makrophagen zeigte sich bei den PMN ein nahezu entgegengesetztes Fc-Rezeptor-Profil. So besitzen die Zellen auf ihrer Oberfläche vor allem den Fc $\gamma$ -Rezeptor IIIb (CD16). Sie exprimieren ebenfalls den Fc $\gamma$ -Rezeptor IIa (CD32), dies aber um ca. eine  $\log_{10}$ -Stufe weniger. Der Fc $\gamma$ RIa (CD64) ist im Vergleich dazu nur in geringer Menge exprimiert.

## Ergebnisse



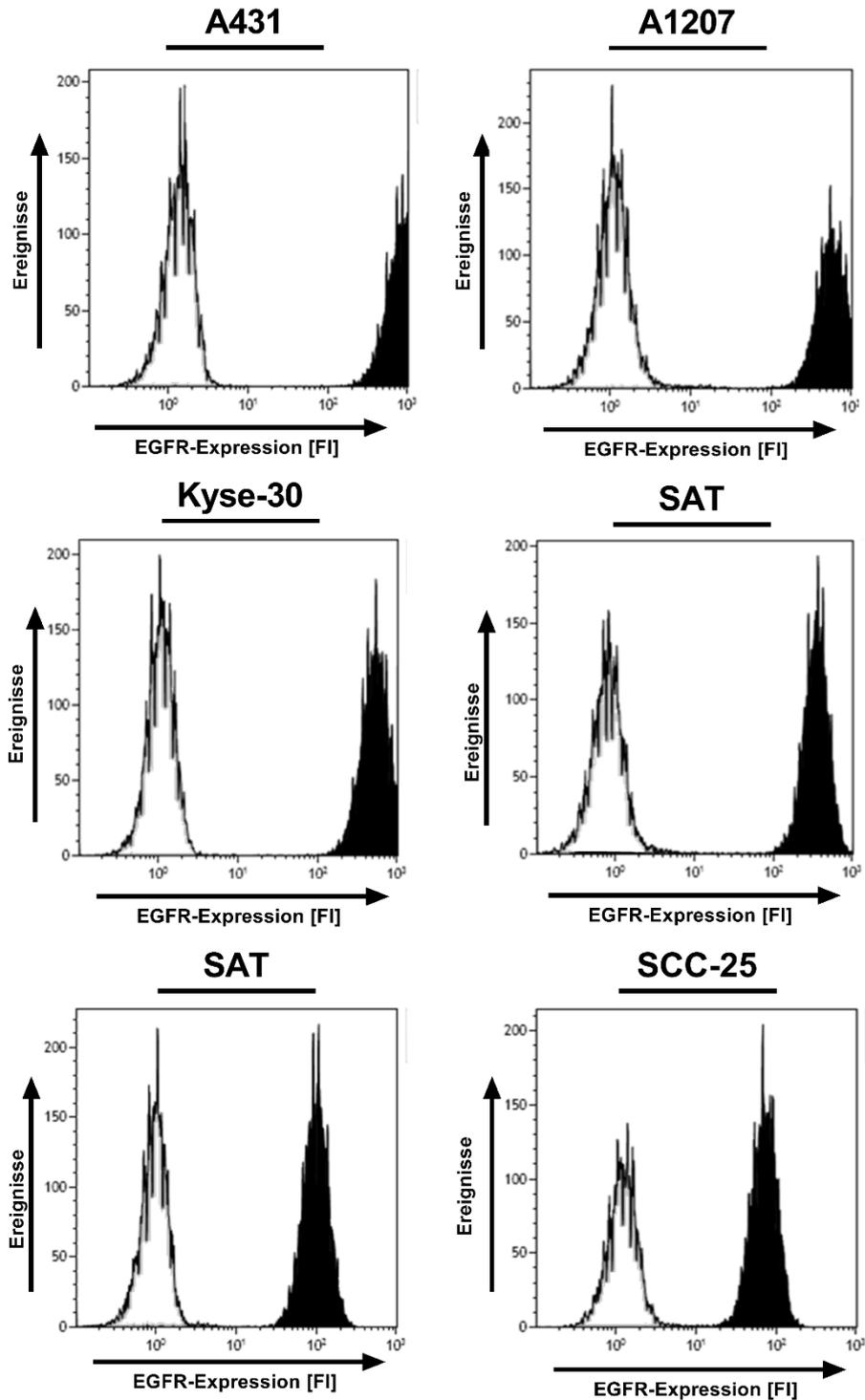
**Abbildung 12. FcR-Expression humaner Granulozyten.** Humane Granulozyten exprimieren hohe Mengen an CD16 (FcγRIII), mittlere Mengen an CD32 (FcγRII) und niedrige Mengen an CD64 (FcγRI). Bestimmung durch direkte Immunfluoreszenz in drei unabhängigen Messungen mit Granulozyten verschiedener Spender. Repräsentative Histogramme sowie eine grafische Auswertung mit den MFI-Mittelwerten ± SEM sind gezeigt. Die Histogramme wurden mit Kaluza, die Grafen mit GraphPad erstellt. FI = Fluoreszenzintensität, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, mAk = monoklonaler Antikörper.

## Ergebnisse

### 3.3.2. Auswirkung der EGFR-Expression auf die Zytotoxizität von PMN

Der Einfluss der EGFR-Expression der Zielzellen auf die antikörperabhängige Zytotoxizität von Granulozyten sollte näher untersucht werden. Aus vorherigen Untersuchungen gab es zwar Hinweise auf eine Korrelation, jedoch nicht im Zusammenhang mit IgG-Antikörpern [77]. Es wurden hierzu Zelllinien solider Tumoren ausgewählt, die den EGFR in unterschiedlichem Ausmaß auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die EGFR-Expression variierte mit MFI-Werten von knapp über 800 bei A431-Zellen bis zu MFI-Werten von 80 bei der Zelllinie SCC-25 innerhalb einer  $\log_{10}$ -Stufe (Abb. 13). Mit sinkender Expression des Zielantigens nahm auch die antikörperabhängige Zytotoxizität der Granulozyten ab (Abb. 14). Bei der Zelllinie A431 mit der höchsten EGFR-Expression zeigte sich beispielsweise eine antikörperabhängige Zelllyse von 59,5 % (IgG1) bzw. 68,6 % (IgG2). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Isotypen nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie SAT aus dem Bereich der mittleren EGFR-Expression zeigten sich niedrigere Lyseraten von 13,8 % (IgG1) vs. 26,1 % (IgG2). Bei den SCC-25-Zellen mit der niedrigsten EGFR-Expression wurde eine entsprechend niedrige Zelllyse von 6,3 % (IgG1, nicht signifikant gegenüber der Kontrolle) sowie von 15,3 % (IgG2) erreicht. Überdies ging hervor, dass der IgG2-Antikörper Panitumumab (E7.6.3), mit Ausnahme der A431-Linie, auf allen Zelllinien eine signifikant höhere Lyse als der IgG1-Antikörper Cetuximab (225) induzierte. Dies galt umso mehr für Zelllinien, die den EGFR im mittleren bis niedrigen Bereich exprimierten. So konnte Cetuximab, im Gegensatz zu Panitumumab, auf den beiden Zelllinien Kyse-150 und SCC-25 mit der niedrigsten EGFR-Expression keine signifikante Zelllyse mehr induzieren.

## Ergebnisse



**Abbildung 13. EGFR-Expression verschiedener humaner Karzinomzelllinien.** Dargestellt sind die in den Folgeversuchen verwendeten Tumorzelllinien, von links oben nach rechts unten absteigend anhand ihrer EGFR-Expression sortiert. Es werden repräsentative Histogramme gezeigt. Die Bestimmung der EGFR-Expression erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz wie unter Abb. 11 beschrieben. Die Histogramme wurden mit Kaluza erstellt. FI = Fluoreszenzintensität.

## Ergebnisse

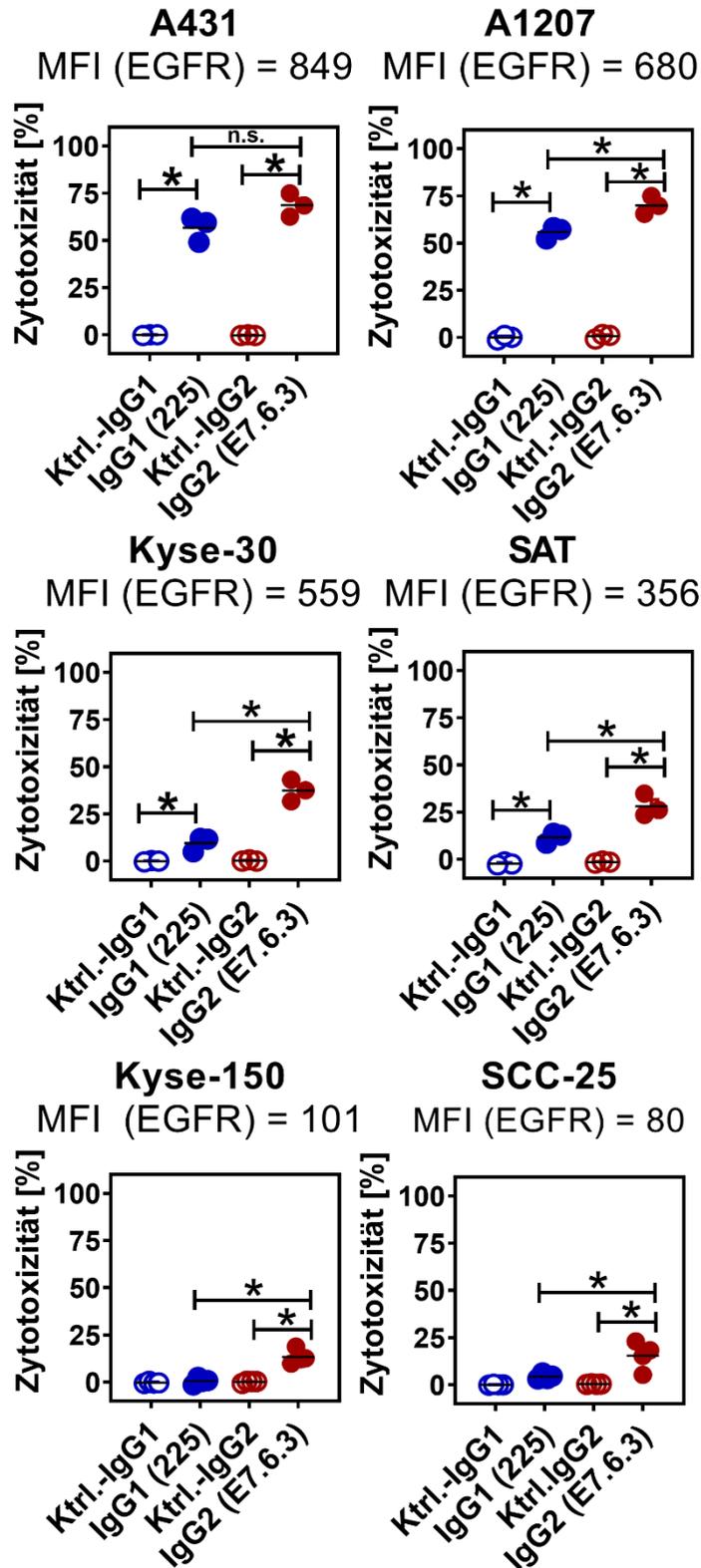


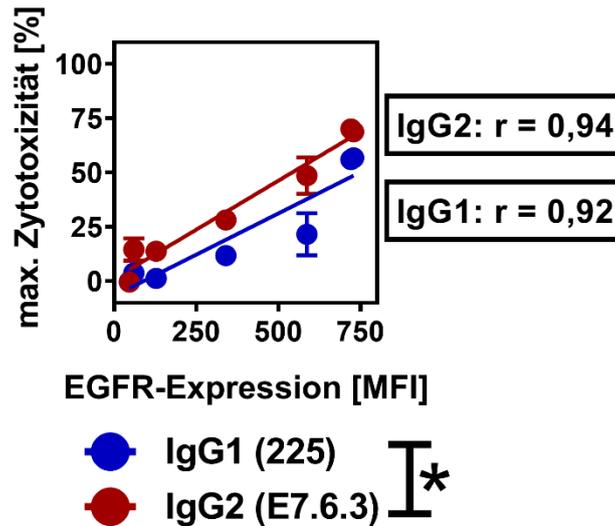
Abbildung 14. Die Höhe der antikörpervermittelten Tumorzelllyse mit PMN als Effektoren hängt von der Höhe der EGFR-Expression der Zielzellen ab.

## Ergebnisse

**Abbildung 14 ff.:** Die EGFR-Expression wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt, angegeben ist die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Der IgG2-Antikörper Panitumumab (E7.6.3) vermittelt signifikant höhere ADCC als der IgG1-Antikörper Cetuximab (225) bei Zellen mit niedriger bis mittlerer EGFR-Expression. Bei niedriger EGFR-Expression (Kyse-150, SCC-25) zeigt der IgG1-Antikörper keine signifikante Aktivität mehr, wohingegen der IgG2-Antikörper im Vergleich zum Kontrollantikörper signifikant Lyse induziert. Die Zelllyse wurde im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest bei einer E:T-Ratio von 80:1 und einer Antikörperkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt. Die PMN wurden vorher mit GM-CSF stimuliert. Die Bestimmung der Zelllyse erfolgte in drei unabhängigen Versuchen. Die Lyseraten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die Statistik und grafische Aufbereitung erfolgten mit GraphPad. N. s. = nicht signifikant.

Um diese Beobachtungen statistisch zu verifizieren, wurde zudem eine lineare Regression der prozentualen Zytotoxizität gegenüber der EGFR-Expression durchgeführt und anschließend mittels des Pearson-Koeffizienten  $r$  der lineare Zusammenhang bestimmt. Es zeigte sich eine positive Korrelation für den IgG1-Antikörper von  $r = 0,92$  (95% Konfidenzintervall 0,63 – 0,99) sowie  $r = 0,94$  (95% Konfidenzintervall 0,70 – 0,99) für den IgG2-Antikörper (Abb. 15). Der IgG2-Antikörper vermittelte auch in dieser Darstellung eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zum IgG1-Antikörper.

## Ergebnisse



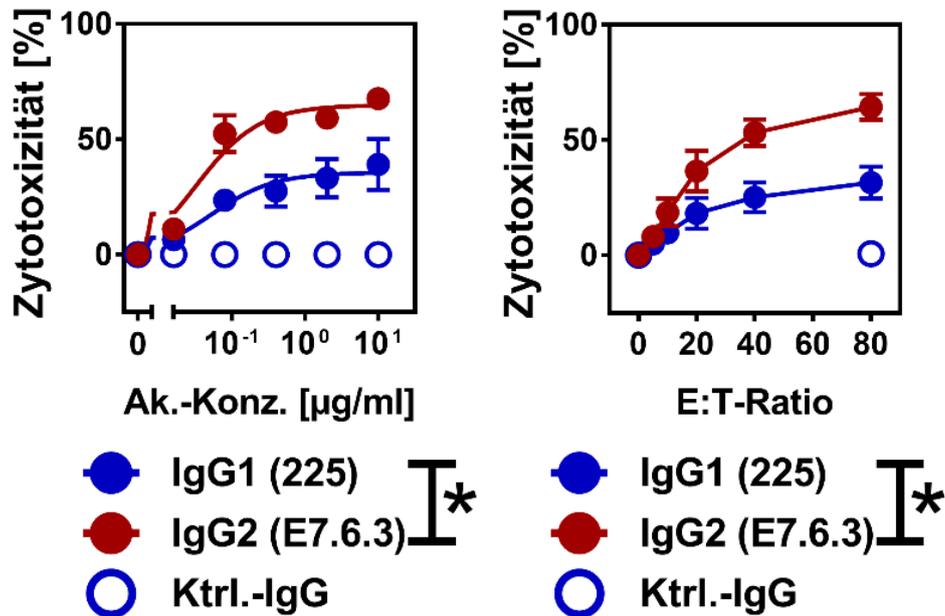
**Abbildung 15. Das Ausmaß der Tumorzelllyse korreliert positiv mit der Höhe der EGFR-Expression.** Die prozentuale Zytotoxizität wurde in dieser Darstellung gegenüber der EGFR-Expression aufgetragen. Anhand der linearen Regression konnte anschließend der Pearson-Koeffizient als Maß der positiven oder negativen Korrelation bestimmt werden. Es ergab sich eine positive Korrelation von  $r = 0,92$  für den IgG1-Antikörper sowie  $r = 0,94$  für den IgG2-Antikörper, wobei auch hier der IgG2 eine statistisch signifikante höhere Aktivität zeigte als der IgG1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die Statistik und grafische Aufbereitung erfolgten mit GraphPad. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, 225 = Cetuximab, E7.6.3 = Panitumumab.

### 3.3.3. Abhängigkeit der PMN-vermittelten Zytotoxizität von Antikörper- und Effektorzellkonzentration

Gegenstand der folgenden Versuche war, inwiefern die zytotoxische Aktivität der Granulozyten von der Antikörperkonzentration und dem Verhältnis von Ziel- zu Effektorzellen abhängt. Hierzu wurde die Kyse-30-Zelllinie aus dem mittleren Bereich der EGFR-Expression ausgewählt und der IgG1-Ak Cetuximab (225) mit dem IgG2-Ak Panitumumab (E7.6.3) verglichen. Es zeigte sich, dass der IgG2-Antikörper hier in beiden Szenarios signifikant höhere Lyseraten induzierte als der IgG1-Antikörper (Abb. 16). Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass zur Aktivierung von PMN signifikant geringere Konzentrationen des IgG2-Antikörpers benötigt werden, als von dem IgG1-Antikörper. Zudem ist für eine effiziente Tumorzelllyse eine geringere Anzahl an Effektorzellen pro Zielzelle erforderlich. So beträgt die Antikörperkonzentration, bei der

## Ergebnisse

ein halbmaximaler Effekt zu beobachten ist, die sogenannte mittlere effektive Konzentration (= EC<sub>50</sub>) für Cetuximab (225) 0,051 µg/ml, während sie für Panitumumab (E7.6.3) bei 0,032 µg/ml liegt.



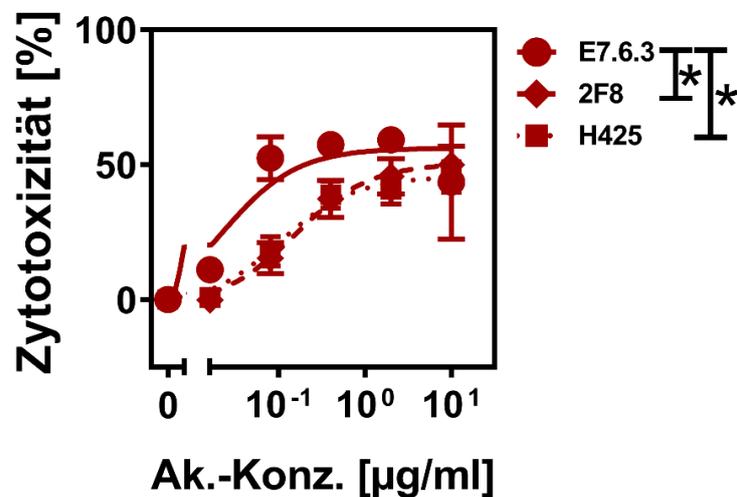
**Abbildung 16. PMN-vermittelte Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration sowie des Effektor- zu Zielzell-Verhältnisses (E:T-Ratio).** Der IgG2-Antikörper Panitumumab (E7.6.3) erreicht signifikant höhere Lyseraten als der IgG1-Antikörper Cetuximab (225) und benötigt für eine effektive Induktion von Zytotoxizität niedrigere Antikörperkonzentrationen (links) sowie ein geringeres Effektor-Zielzell-Verhältnis (rechts). Kyse-30 dienten als Zielzellen im Chromfreisetzungsversuch. Die Effektorzellen wurden vor Versuchsbeginn mit GM-CSF inkubiert. Die Antikörpertitration erfolgte bei einer E:T-Ratio von 80:1, die E:T-Ratio-Titration bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die grafische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad.

### 3.3.4. Einfluss des Epitops

Nachdem gezeigt wurde, dass IgG2-Antikörper gegen den EGFR effektiv Tumorzelllyse mittels PMN vermitteln, wurden die Antikörper Panitumumab (E7.6.3), Zalutumumab-IgG2 (2F8), sowie Matuzumab-IgG2 (H425) hinsichtlich ihres

## Ergebnisse

Potenzials, Kyse-30-Zellen zu lysieren, in verschiedenen Konzentrationsstufen miteinander verglichen. Diese Antikörper richten sich jeweils gegen ein anderes Epitop [78]. Kyse-30 ist eine Zelllinie mit vergleichsweise hoher EGFR-Expression (MFI-Wert 557). Bei diesen Zellen war Panitumumab am effektivsten in der Induktion von ADCC, insbesondere bei niedrigeren Antikörperkonzentrationen (Abb. 17 und Tab. 4). Insgesamt aber waren alle drei EGFR-Antikörper in der Lage, eine effiziente Zellyse durch PMN herbeizuführen. Die  $EC_{50}$  betrug in diesem Fall 0,022  $\mu\text{g/ml}$  für Panitumumab (E7.6.3), 0,153  $\mu\text{g/ml}$  für 2F8 sowie 0,103  $\mu\text{g/ml}$  für H425.



**Abbildung 17. PMN-vermittelte ADCC mit verschiedenen EGFR-gerichteten IgG2-Antikörpern.** Kyse-30 dienten als Zielzellen, die E:T-Ratio betrug 80:1, und die Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,016 – 10  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Die Effektorzellen wurden vor Versuchsbeginn mit GM-CSF stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ . Statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die grafische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad. E7.6.3 = Panitumumab, 2F8 = Zalutumumab, H425 = Matuzumab.

**Tabelle 4. Maximale PMN-vermittelte Zytotoxizität und Standardfehler (SEM) mit IgG2-Antikörpern gegen verschiedene EGFR-Epitope.**

Antikörper	Zielzellen: Kyse-30	
	Max. Lyse (%)	$\pm$ SEM (%)
E7.6.3 (Panitumumab)	59,3	2,2
2F8-IgG2 (Zalutumumab)	49,9	6,6
H425-IgG2 (Matuzumab)	45,5	5,7

### **3.4. Einfluss von CD47 auf die antikörpervermittelte Zytotoxizität myeloischer Effektorzellen**

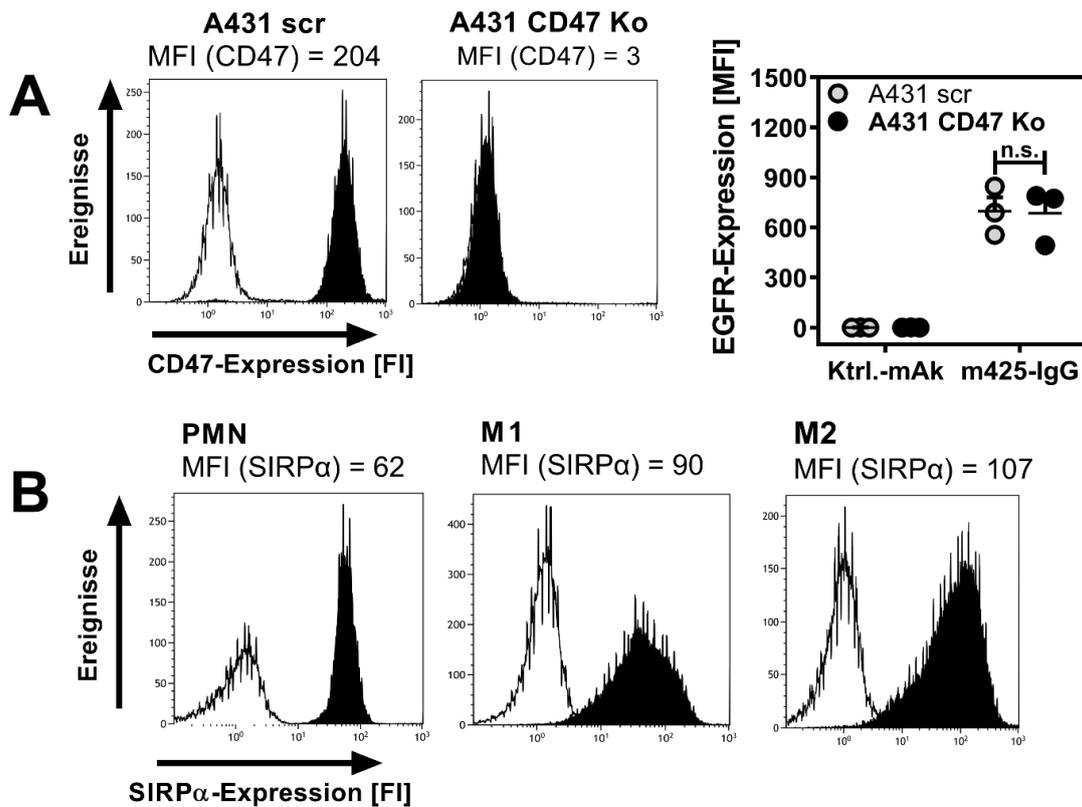
Durch die Einführung der sogenannten Immunkontrollpunkt-Inhibitoren bekam die Tumorthherapie enormen Schub. Die klinische Anwendung beschränkt sich bis dato auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Weniger untersucht ist die Regulierung von myeloischen Zellen durch Positiv- und Negativsignale. In diesem Zusammenhang ist SIRP $\alpha$  ein wichtiger bekannter Negativregulator. SIRP $\alpha$  befindet sich auf myeloischen Zellen und bindet an CD47. Letzteres ist auf Tumorzellen häufig hochreguliert. Die Interaktion von SIRP $\alpha$  und CD47 unterdrückt die Immunantwort myeloischer Zellen im Sinne eines antiphagozytären Signals („*don't eat me*“) [68]. Im Folgenden wird der regulatorische Einfluss von CD47 im Kontext EGFR-gerichteter Antikörper auf die Aktivierung myeloischer Effektorzellen untersucht und hinsichtlich des Effekts auf IgG1- bzw. IgG2-Isotypen verglichen.

#### **3.4.1. CD47- und SIRP $\alpha$ -Expression**

Um den Einfluss der CD47/SIRP $\alpha$ -Interaktion auf die antikörperabhängige ADCC durch myeloische Zellen zu untersuchen, wurden als Zielzellen eine CD47-Knock-out-Variante (kurz: CD47 Ko) der A431-Linie verwendet. Diese kann das CD47-Protein nicht mehr exprimieren und wurde mittels des gentechnischen Verfahrens CRISPR/Cas9 erzeugt. Um Effekte der CRISPR/Cas9-Behandlung auszuschließen, dienten zur Kontrolle A431-Zellen, welche nach gleichem Protokoll, allerdings mit einer unspezifischen Vektorsequenz behandelt wurden (A431 „*scrambled control*“, kurz scr). Im Vergleich der beiden A431-Varianten hinsichtlich der CD47- und der EGFR-Expression mittels Immunfluoreszenz zeigte sich, dass die CD47 Ko-Zelllinie, im Gegensatz zu den A431 scr-Zellen, kein CD47 mehr auf der Oberfläche trägt (Abb. 18A links). Die EGFR-Expression beider Varianten wurde durch die Behandlung nicht signifikant beeinflusst (Abb. 18A rechts). Zudem wurde die SIRP $\alpha$ -Expression auf GM-CSF-behandelten PMN, sowie auf M1- und M2-polarisierten Makrophagen bestimmt (Abb. 18B). Wie erwartet war SIRP $\alpha$  auf allen drei Zelltypen vorhanden. Die höchste Expression wiesen die M2-ähnlichen Makrophagen auf (MFI = 107), wohingegen M1-

## Ergebnisse

Makrophagen eine niedrigere Expression zeigten (MFI = 90). Die niedrigste SIRP $\alpha$ -Expression wurde auf den PMN nachgewiesen (MFI = 62).



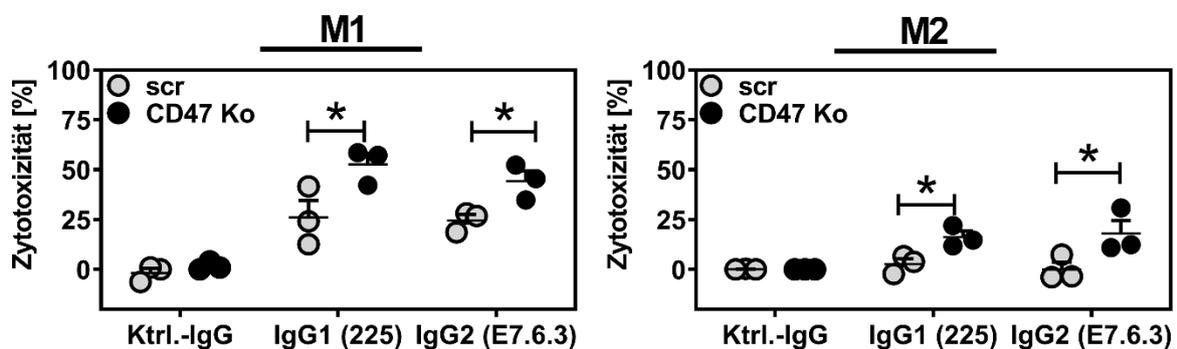
**Abbildung 18. Expression von CD47, EGFR, und SIRP $\alpha$  auf Tumor- und Effektorzellen.**

**(A)** Im Gegensatz zur Kontrollzelllinie A431 scrambled control (scr) zeigen die CD47 Knock-out-Zellen (CD47 Ko) keine CD47-Expression. Die Bestimmung erfolgte mittels direkter Immunfluoreszenz, der spezifische Antikörper ist schwarz, die Isotypkontrolle weiß dargestellt. Die EGFR-Expression unterschied sich nicht signifikant. Die EGFR-Expression wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einer murinen Variante des Antikörpers Matuzumab (m425, Konz. 5  $\mu$ g/ml) und einem Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (1:40 Verdünnung) in 3 unabhängigen Messungen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt. **(B)** Expression von SIRP $\alpha$  auf verschiedenen myeloischen Zellreihen. Die Messung erfolgte mit direkter Immunfluoreszenz, der spezifische Antikörper ist schwarz, die Isotypkontrolle weiß dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Histogramme, erstellt mit Kaluza. FI = Fluoreszenzintensität, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, mAk = monoklonaler Antikörper, n. s. = nicht signifikant.

## Ergebnisse

### 3.4.2. CD47 reguliert die Zytotoxizität von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen

Wie unter Punkt 3.2. bereits gezeigt werden konnte, induzieren sowohl IgG1- als auch IgG2-Antikörper in Anwesenheit proinflammatorisch polarisierter M1-ähnlicher Makrophagen effektiv ADCC. Als regulatorisch geltende M2-ähnliche Makrophagen vermittelten keine Tumorzelllyse. Vertiefend sollte analysiert werden, inwiefern die Zytotoxizität der Makrophagen durch die CD47/SIRP $\alpha$ -Achse inhibiert wird. Dazu wurden die CD47-exprimierenden und die CD47 Ko A431-Varianten als Zielzellen im ADCC eingesetzt. Sowohl M1- als auch M2-ähnliche Makrophagen erreichten in Abwesenheit von CD47 signifikant höhere Lyseraten als bei den Kontrollzellen (Abb. 19 und Tab. 5). Interessanterweise waren in dieser Konstellation auch die M2-polarisierten Makrophagen zur Induktion von ADCC in der Lage. Es erreichte kein Antikörperisotyp eine signifikant höhere Lyse als der jeweils andere. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die Makrophagenaktivierung durch IgG1 und auch IgG2 über die Interaktion von CD47 und SIRP $\alpha$  inhibiert wird.



**Abbildung 19. Makrophagenvermittelte Zytotoxizität von EGFR-Antikörpern gegen A431-Zellen.** Fällt die Inhibition durch CD47 und SIRP $\alpha$  weg (CD47 Ko), erreichen beide Antikörperisotypen (225 = Cetuximab, E7.6.3 = Panitumumab) sowohl mit M1- als auch mit M2-ähnlichen Makrophagen eine signifikant höhere Tumorzelllyse. Der ADCC wurde bei einer Effektor- zu Zielzell-Ratio von 10:1 und einer Antikörperkonzentration von 10  $\mu$ g/ml durchgeführt, die Messung erfolgte nach 12 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die Grafen wurden mit GraphPad erstellt. scr = engl. *scrambled control*, CD47 Ko = engl. *CD47 Knock-out*.

## Ergebnisse

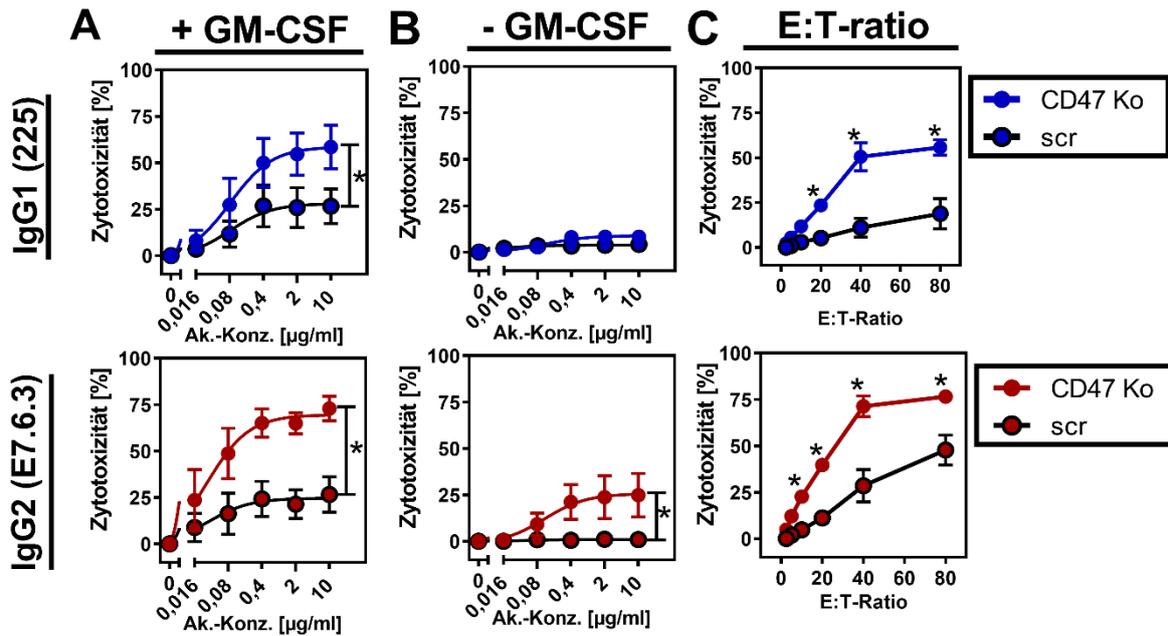
**Tabelle 5. Makrophagenvermittelte Zytotoxizität der EGFR-Antikörper Cetuximab (225) und Panitumumab (E7.6.3).** Als Zielzellen wurden die Zelllinie A431 mit CD47-Expression (scr) und ohne CD47-Expression (Ko) verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler (SEM) von 3 unabhängigen Experimenten.

	A431 scr		A431 CD47 Ko	
	Mittl. Lyserate (%)	± SEM (%)	Mittl. Lyserate (%)	± SEM (%)
<b>M1-Makrophagen</b>				
225 (Cetuximab)	26,1	8,4	52,7	5,2
E7.6.3 (Panitumumab)	24,6	3,0	44,2	5,1
<b>M2-Makrophagen</b>				
225 (Cetuximab)	2,7	2,6	16,2	3,1
E7.6.3 (Panitumumab)	0,033	3,7	18,1	6,4

### 3.4.3. CD47 reguliert die PMN-Aktivität

Für die Untersuchung zum Einfluss von CD47 auf die antikörpervermittelte Aktivierung von Granulozyten wurden die Effektorzellen vor Testeinsatz mit GM-CSF stimuliert oder blieben unbehandelt. Es zeigte sich, dass bei Präsenz des Negativsignals CD47 weder Cetuximab (225) noch Panitumumab (E7.6.3) ADCC gegenüber A431-Zellen induzierten (Abb. 20 B). Fiel CD47 als Inhibitor der PMN-Aktivierung weg, so war einzig der IgG2-Antikörper in der Lage, Zellyse zu vermitteln. Bei Zugabe von GM-CSF zeigten beide Isotypen auch in Anwesenheit von CD47 Tumorzellyse (Abb. 20 A). Dabei fiel die ADCC auf den CD47 Ko-Zellen bei beiden Antikörpern signifikant höher aus als auf den scr-Kontrollzellen. Bei veränderlichem Effektor- zu Tumorzellverhältnis wies der IgG1 bis zu einem Verhältnis von 20:1 signifikant höhere Lyseraten auf der CD47 Ko-Zelllinie im Vergleich zu A431scr-Zellen auf (Abb. 20 C). Für den IgG2 galt dies bis zu einem Verhältnis von 10:1. Zusammenfassend lässt sich für beide Isotypen ein starker inhibitorischer Einfluss von CD47/SIRP $\alpha$  auf die antikörpervermittelte Aktivierung von Neutrophilen feststellen. Die Anwesenheit von GM-CSF zeigte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Aktivierung von PMN. Insgesamt erreichte der IgG2-Antikörper in diesem Zusammenhang ein größeres zytotoxisches Potenzial.

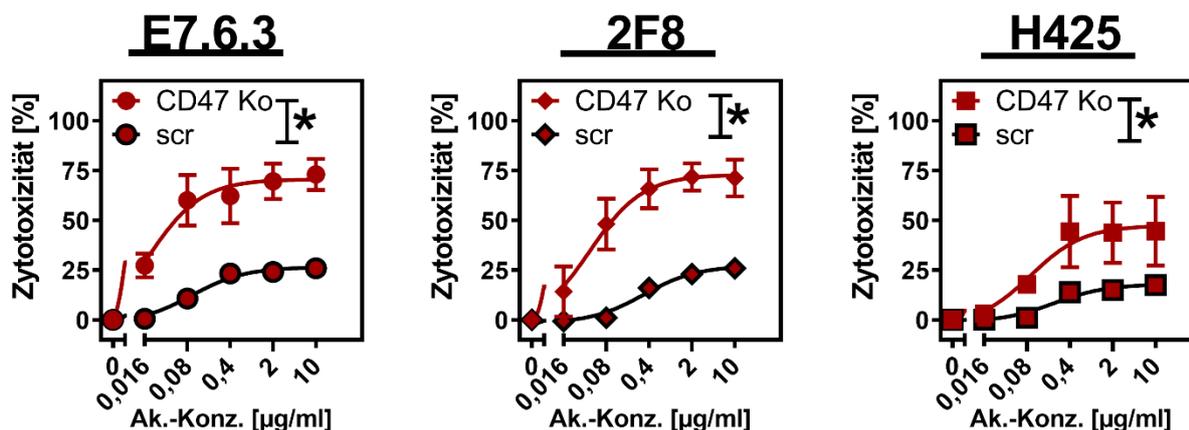
## Ergebnisse



**Abbildung 20. PMN-vermittelte ADCC mit EGFR-Antikörpern auf CD47-positiven und CD47-Knockout A431-Zellen.** Die durch IgG1 und IgG2 vermittelte zytotoxische Aktivität von Granulozyten wird in Abwesenheit der inhibitorischen Interaktion von CD47 und SIRP $\alpha$  verstärkt. (A) GM-CSF fungiert als zusätzliches, positives Signal. (B) ADCC mit unstimulierten PMN. Signifikante Lyse erreicht nur der IgG2-Antikörper in Abwesenheit von CD47. (C) Der IgG2-Antikörper erreicht signifikante Lyse bei niedrigerer Effektor- zu Tumorzell (E:T)-Ratio im Vergleich zum IgG1-Antikörper. Die Antikörper Titration erfolgte bei einer E:T-Ratio von 80:1, die E:T-Ratio-Titration bei einer Antikörperkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die Grafen wurden mit GraphPad erstellt. 225 = Cetuximab, E7.6.3 = Panitumumab, scr = engl. *scrambled control*, CD47 Ko = engl. *CD47 Knock-out*.

Um auszuschließen, dass die hohe Zytotoxizität auf Panitumumab beschränkt ist, wurden noch die IgG2-Antikörper Zalutumumab (2F8) und Matuzumab (425) untersucht. Alle drei Antikörper induzierten bei Wegfall des inhibitorischen Signals von CD47 signifikant höhere ADCC als auf den CD47-positiven Kontrollzellen (Abb. 21). Panitumumab und Zalutumumab waren hierbei gleich effektiv, Matuzumab zeigte niedrigere Lyseraten.

## Ergebnisse



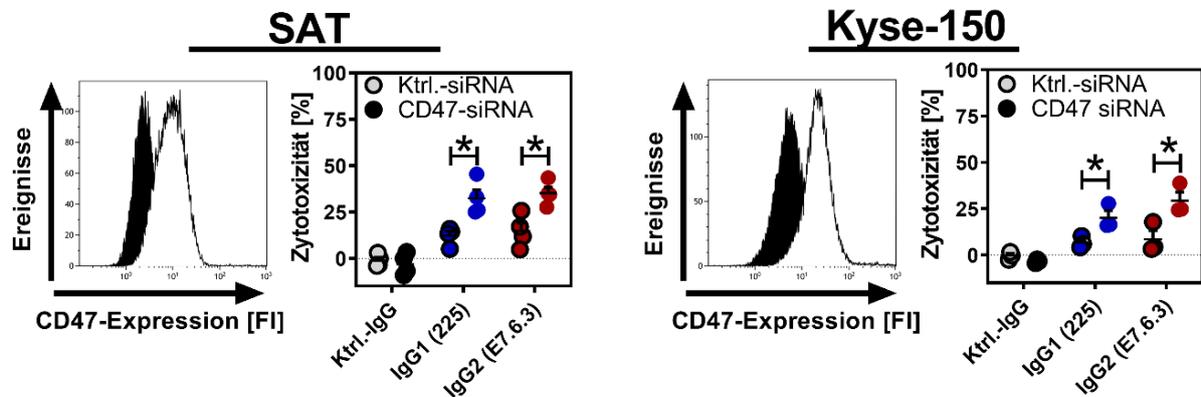
**Abbildung 21. Der Einfluss von CD47 auf die IgG2-vermittelte Zytotoxizität von PMN ist unabhängig vom Epitop.** Durchführung des Tests bei einer E:T-Ratio von 80:1 und mit GM-CSF-stimulierten PMN. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 Experimenten. Die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. Die Grafen wurden mit GraphPad erstellt. E7.6.3 = Panitumumab, 2F8 = Zalutumumab, H425 = Matuzumab, scr = engl. *scrambled control*, CD47 Ko = engl. CD47 *Knock-out*.

### 3.4.4. PMN-vermittelte ADCC gegen Zelllinien mit unterschiedlich hoher CD47-Expression

Um den Einfluss von CD47 auf die PMN-vermittelte ADCC auf Tumorzelllinien mit verschieden hoher EGFR-Expression untersuchen, wurden die Zelllinie SAT mit mittlerer und Kyse-150 mit niedriger Expression des Zielantigens ausgewählt. Des Weiteren wurde die CD47-Expression in beiden Zelllinien mit spezifischer, inhibitorischer small-interfering RNA (siRNA) inhibiert. Diese kleinen RNA-Sequenzen interferieren nach Transfektion mit der Expression bestimmter Gene. Es handelt sich nicht um ein komplettes Ausschalten (Knock-out), sondern um eine Reduktion der Expression des Zielmoleküls (Knock-down). Auch hier gab es neben der CD47-spezifischen siRNA eine Kontroll-siRNA, um Effekte durch die Transfektion auszuschließen. Nach Transfektion der Tumorzelllinien mit CD47-spezifischer siRNA wurde eine etwa 50- bis 60 %ige Reduktion der CD47-Expression erreicht (s. Histogramme, Abb. 22). Die EGFR-Expression wurde ebenfalls nach Transfektion evaluiert und unterschied sich nicht von der Expression auf den Kontrollzellen (nicht abgebildet). Es zeigte sich, dass bei den Zellen mit reduzierter CD47-Expression eine

## Ergebnisse

höhere ADCC sowohl mit Cetuximab als auch Panitumumab erzielt wurde als bei den Kontrollzellen. Die Lyseraten waren bei den Zellen mit höherer EGFR-Expression insgesamt höher als bei Zellen mit niedriger Expression (Tab. 6).



**Abbildung 22. PMN-vermittelte ADCC auf den Tumorzelllinien SAT und Kyse-150 mit unterschiedlicher CD47-Expression.** Die Histogramme jeweils links zeigen die Expression von CD47 nach Transfektion mit inhibitorischen RNA-Molekülen (weiß = Kontrolle, schwarz = CD47-siRNA). Die Grafen jeweils rechts zeigen die PMN-vermittelten Lyseraten für beide Antikörper-Isotypen (225 = Cetuximab, E7.6.3 = Panitumumab). Die Chromfreisetzungstests wurden bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml und einer E:T-Ratio von 80:1 in 4 (SAT) bzw. 3 (Kyse-150) unabhängigen Versuchen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) wurde mittels zweiseitiger ANOVA bestimmt und ist als [\*] gekennzeichnet. siRNA = engl. *small interfering RNA*, FI = Fluoreszenzintensität.

**Tabelle 6. PMN-vermittelte Zytotoxizität gegenüber siRNA-transfizierten SAT- und Kyse-150-Zellen.** Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler (SEM) von IgG1- (225) und IgG2- (E7.6.3) Antikörpern auf den Zelllinien mit normaler (Ktrl.-siRNA) sowie reduzierter (CD47 – siRNA) CD47-Expression. siRNA = engl. *small interfering RNA*.

SAT	Ktrl. - siRNA		CD47 - siRNA		
	Mittlere Lyse (%)	± SEM (%)	Mittlere Lyse (%)	± SEM (%)	
225 (Cetuximab)	12,1	2,4	32,4	4,7	
E7.6.3 (Panitumumab)	14,8	4,4	35,1	3,2	
Kyse-150	Mittlere Lyse (%)	± SEM (%)	Mittlere Lyse (%)	± SEM (%)	
	225 (Cetuximab)	6,8	1,8	20,1	3,9
	E7.6.3 (Panitumumab)	8,5	4,7	29,3	4,8

## 4. Diskussion

### 4.1. EGFR-gerichtete IgG1- und IgG2-Antikörper in der klinischen Praxis

Seit ihrer Einführung in die klinische Praxis vor gut 20 Jahren haben monoklonale Antikörper eine enorme Ausweitung ihres Anwendungsspektrums erlebt. Damit einher geht das immer profundere Verständnis der Immunbiologie, welches schließlich translational Eingang in die Klinik finden kann. Cetuximab und Panitumumab sind für sich genommen selbst Ergebnis dieses Verständnisses: Cetuximab als erster klinisch zugelassener Antikörper gegen den EGFR, und Panitumumab als erster IgG2-Antikörper auf diesem Gebiet. In der Praxis zählt die klinische Wirksamkeit beider Therapeutika, die trotz immanenter biologischer Unterschiede vergleichbar ist. Für das metastasierte kolorektale Karzinom, für welches beide Antikörper zugelassen sind und daher ein Vergleich möglich ist, existiert eine umfangreiche Studienlage mit teils widersprüchlichen Ergebnissen [17, 79]. Eine Metaanalyse aller vorliegenden klinischen Studien der Cochrane Collaboration (London, UK) aus dem Jahr 2017 kam zu dem Ergebnis, dass die Hinzunahme eines EGFR-Antikörpers zur Standardchemotherapie sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben verbessert [80]. Damit verbunden war allerdings auch die Einsicht, dass für die klinische Wirksamkeit sowohl von Cetuximab als auch von Panitumumab ein negativer Mutationsstatus von *KRAS* maßgeblich ist [17, 20]. Kollektive mit mutiertem *KRAS*-Status profitierten nicht von den Antikörpern. Interessanterweise zeigte sich in der Metaanalyse kein signifikanter Überlebensvorteil bei Hinzunahme eines Tyrosinkinaseinhibitors statt eines EGFR-Antikörpers, was auf die Bedeutung der indirekten Effekte dieser Antikörper hinweisen könnte. IgG2-Antikörper wurden im Allgemeinen keine Fc-vermittelten Effekte zugeschrieben. Daher kam Panitumumab bisher zum Einsatz, wenn diese nicht erwünscht waren [81], man erhoffte sich davon eine geringere Nebenwirkungsrate [82]. Einzig der IgG1-Antikörper Cetuximab galt als effektiv in der zellvermittelten Zytotoxizität. Noch in der Erstbeschreibung von Panitumumab bzw. E7.6.3 wurde die Effektivität des Antikörpers auf die direkten Effekte zurückgeführt [83]. Im direkten Vergleich von Cetuximab und Panitumumab im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie schnitten beide Antikörper gleich gut ab

[25]. Das Dosierungsschema richtete sich hier jedoch nach der Empfehlung der Hersteller, daher kann keine pharmakokinetische Äquivalenz vorausgesetzt werden. Allerdings deuten vergleichende Untersuchungen darauf hin, dass sich die Antikörper hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik kaum unterscheiden [84]. Anders als der KRAS-Mutationsstatus, korrelierten weder die Höhe der EGFR-Expression noch die Anzahl EGFR-positiver Tumorzellen mit der klinischen Ansprechrate und mit dem Gesamtüberleben [85]. Insofern wirft dies die Frage auf, worauf die vergleichbare Effektivität bei scheinbar unterschiedlichen pharmakodynamischen „Startbedingungen“ zurückzuführen ist. Zugleich ist die Frage nach der Wichtung von indirekten und direkten Effekten im Kontext der EGFR-Antikörper unbeantwortet. Vor diesem Hintergrund zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit das Potenzial auf, das eine gesteigerte Aktivierung myeloischer Zellen gerade für IgG2-Antikörper bedeuten kann.

### **4.2. Effektorfunktionen von EGFR-gerichteten IgG1- und IgG2-Antikörpern**

#### *4.2.1. Direkte Antikörpereffekte*

Obwohl Cetuximab und Panitumumab beide gegen den EGFR gerichtet sind, unterscheiden sie sich nicht nur im Isotyp, sondern auch im Epitop. Diese überlappen sich zwar, sind jedoch nicht identisch [73]. Für die indirekten Effekte wurde bereits gezeigt, dass Unterschiede im Epitop, etwa die Nähe zur Zellmembran, sowohl die komplement- als auch die zellvermittelten Effekte wesentlich beeinflussen [86]. Daher stellt sich die Frage, ob Isotyp und Epitop auch die direkten Effekte beeinflussen. In vitro konnte zwischen verschiedenen, gegen EGFR gerichteten IgG1- und IgG2-Antikörpern, so auch bei Cetuximab und Panitumab in der vorliegenden Arbeit, kein signifikanter Unterschied in der EGFR-Bindung gefunden werden. Hinsichtlich der direkten Effekte zeigte sich der IgG1-Antikörper Zalutumumab effektiver in der Wachstumsinhibition von A431-Zellen als der IgG2-Antikörper Panitumumab [73]. Für CD20-Antikörper ist hingegen beschrieben worden, dass der IgG2-Isotyp effektiver Apoptose induziert als der IgG1-Antikörper [87]. Speziell für die IgG2-Antikörper ist seit längerem bekannt, dass diese wie kein anderer IgG-Isotyp in der Konfiguration der Disulfidbrücken ihrer Scharnier- und C<sub>H</sub>1-Region variieren können. Man unterscheidet hier zwischen der flexibleren IgG2A- und der rigideren IgG2B-Isoform [88]. Vermutlich

können IgG2-Antikörper, abhängig von den Redoxbedingungen, zwischen beiden Isoformen wechseln. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Konformation von IgG2-Antikörpern unmittelbaren Einfluss auf deren direkte Effekte hat [89]. Für das Oberflächenantigen CD40 wurde gezeigt, dass die Wahl des Epitops kombiniert mit dem Vorliegen der IgG2B-Isoform großen Einfluss auf die direkten Effekte des jeweiligen Antikörpers haben kann [90]. Für klinische Implikationen kann dies lediglich als Hinweis dienen: im EGFR-Kontext ist der Stellenwert dieser Befunde noch nicht untersucht und die Produktion therapeutischer Antikörper unterliegt diesbezüglich bisher keinerlei Standardisierung. In Anbetracht der Tatsache, dass die klinische Effektivität, insbesondere von Panitumumab, auf dessen direkte, EGFR blockierende Wirkung zurückgeführt wird, gibt es auf diesem Gebiet noch viele offene Fragen.

### **4.2.2. NK-Zellen vs. myeloische Effektorzellen**

Erst in den letzten Jahren ist man sich der Bedeutung der ADCC in der Therapie mit EGFR-Antikörpern bewusst geworden. Im Fokus stand dabei die Zytotoxizität durch NK-Zellen: insbesondere für Cetuximab ist umfassend gezeigt worden, dass der IgG1-Antikörper effektiv NK-Zell-ADCC vermitteln kann [73, 91, 92]. Für Panitumumab ist die Datenlage dünner. Wegen der geringen Affinität von IgG2-Antikörpern zu Fc-Rezeptoren nahm man an, dass Panitumumab nur ein geringes ADCC/ADCP-Potenzial besitzt. Mehrheitlich deuten Studien darauf hin, dass IgG2-Antikörper, zumindest im NK-Zell-Kontext, keine oder kaum ADCC induzieren [73, 93]. In Bezug auf myeloische Zellen ist die Bedeutung der ADCC und ADCP bisher kaum untersucht. Veröffentlichungen zu dem Antikörper Rituximab sprechen stark für eine Involvierung des angeborenen Immunsystems [94, 95] und auch für EGFR-Antikörper findet sich wachsende Evidenz [56]. Die Fähigkeit von Panitumumab zur Bindung an den auf Neutrophilen prädominanten FcγRIIIa spiegelte sich darin wieder, dass Panitumumab mit PMN als Effektorzellen gleich hohe Lyseraten aufwies wie ein IgG1-Antikörper (Zalutumumab, 2F8) [73]. Aus Mausmodellen gibt es zudem Daten, dass Neutrophile einen Anteil am Effekt therapeutischer Antikörper haben [96]. Ein direkter Vergleich zu den Verhältnissen im Menschen gestaltet sich jedoch aufgrund speziestypischer Unterschiede schwierig. Dies hat besonders weitreichende Implikationen für

## Diskussion

myeloische Zellen und IgG2-Antikörper: der einzige Fc-Rezeptor, an den IgG2-Antikörper effektiv binden können, ist der FcγRIIa (CD32a) [35]. Genau dieser fehlt Mäusen jedoch [36]. Experimente, bei denen auf menschlichen Neutrophilen der FcγRII blockiert wurde, inhibierten die PMN-vermittelte Zytotoxizität nahezu vollständig, während sich die Aktivität der mononukleären Zellen (v.a. NK-Zellen) nicht signifikant unterschied. Zudem fehlt Mäusen der FcγRIIIb (CD16b), der die IgG1-vermittelte PMN-ADCC inhibierte, nicht aber die NK-Zell-ADCC [36]. IgG2 bindet an den FcγRIIIb nicht mit relevanter Affinität. Es ließe sich also schlussfolgern, dass in Mausexperimenten die Effektivität von IgG1-Antikörpern über- und die von IgG2-Antikörpern unterschätzt wurde. Aus dem Grunde ist der Einfluss der myeloischen Zellen basierend auf Daten, die in Mausexperimenten gewonnen wurden, schwierig einzuschätzen. Eine quantitative Wichtung der Effektivität von IgG1 und IgG2 ist ebenso schwierig.

In der Analyse klinischer Studien erwiesen sich bestimmte Polymorphismen des insbesondere auf NK-Zellen exprimierten FcγRIIIa sowie des vermehrt auf myeloischen Zellen vorhandenen FcγRIIa als positive Marker für das Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie [97–99]. Dies kann als Hinweis auf die Wichtigkeit zellvermittelter Mechanismen in der EGFR-Antikörpertherapie in vivo zu werten sein. Passend zu den eigenen Ergebnissen konnte in vitro für den IgG2-Antikörper Panitumumab ein positiver Einfluss des Polymorphismus R131H des FcγRIIa im PMN-ADCC gezeigt werden, während der IgG1-Antikörper Zalutumumab nicht profitierte [73]. Anders als NK-Zellen rücken PMN jedoch erst allmählich in den Fokus. Neuere Untersuchungen haben etwa für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom herausgefunden, dass Neutrophile die zahlenmäßig größte Immunzellentität innerhalb des Tumors darstellen [100]. Für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom und für das Adenokarzinom des Magens ist ferner bekannt, dass eine hohe Zahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut mit einer schlechten Prognose korreliert [101, 102]. Diese Beobachtung zeigte sich auch bei den intratumoralen PMN bei vielen anderen Tumorentitäten. Bezeichnenderweise ging die Präsenz von Plasmazellen als Vermittler der humoralen Immunität mit einer besonders guten Prognose hervor [53]. Im Lichte der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse drängt sich die Frage auf, ob sich die vorhandenen PMN im Sinne der Antikörpertherapie nutzen lassen. IgG2-Antikörper könnten dann bevorzugt zur Anwendung kommen. Anlass zur Skepsis gibt

die zunehmende Evidenz, dass es sich bei diesen intratumoralen PMN um sogenannte myeloide Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cell*, MSDC) handelt, die sich schwerlich gegen den Tumor richten ließen [103]. Deren Einfluss speziell auf die Tumorimmuntherapie ist aktuell noch nicht untersucht.

### 4.3. Immunkontrollpunkt-Inhibitoren in der Tumorthherapie

Antikörper, die gegen negative Kontrollpunkte des Immunsystems gerichtet sind und somit deren inhibitorische Wirkung aufheben können, sind in der Forschung wie auch in der klinischen Anwendung weit etabliert [60]. Für die Anwendung am Menschen sind ausschließlich Antikörper auf dem Gebiet der T-Zell-vermittelten Immunität zugelassen [61]. Besondere Bekanntheit in diesem Zusammenhang besitzen die Oberflächenproteine *programmed cell death 1* (PD-1) bzw. der Ligand (PD-L1), sowie das *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4). Antikörper gegen diese Proteine unterdrücken deren inhibierende Wirkung auf die T-Zellfunktion und sind insbesondere auf dem Gebiet der soliden Tumoren zugelassen [62]. Für weitere Indikationen und Tumorentitäten wurden in jüngerer Vergangenheit vielversprechende Ergebnisse von Phase III-Studien publiziert, etwa für Brustkrebs und das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom [104, 105]. Mit den Rezeptoren CD47 und SIRP $\alpha$  ist erst ein einziger, für die angeborene Immunität relevanter Immunkontrollpunkt in der klinischen Erprobung. Der Einfluss der CD47/SIRP $\alpha$ -Interaktion ist im Hinblick auf die Aktivierung von Makrophagen sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell gut untersucht. Wurde die Interaktion inhibiert, zeigte sich eine Steigerung der Phagozytoseraten bei einer Reihe von Tumorzelllinien, darunter solchen der akuten myeloischen Leukämie, des Non-Hodgkin Lymphoms und vieler Karzinomentitäten [106]. Als wirksame Strategie erwies sich hierbei sowohl die Blockade von CD47 als auch von SIRP $\alpha$ . Die Blockade von CD47 beim kleinzelligen Bronchialkarzinom inhibierte nicht nur das Tumorwachstum in der Maus, sondern steigerte auch die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine, so dass damit weitere Makrophagen rekrutiert werden könnten [107]. Eine Studie in einem Glioblastom-Xenograftmodell in der Maus ergab, dass bei Gabe eines CD47-Antikörpers der intratumorale Anteil der M1-Makrophagen stark stieg, während in unbehandelten Tieren der M2-Phänotyp

## Diskussion

vorherrschte [108]. Das in der vorliegenden Arbeit gezeigte zytotoxische Potenzial gerade der M1-ähnlichen Makrophagen gewinnt durch diese Beobachtungen eine neue Dimension. Lohnend könnte auch ein näherer Blick auf die Schnittpunkte verschiedener Checkpoint-Inhibitoren sein. Für die CTLA-4-Antikörper weiß man, dass die FcγR-vermittelte Eliminierung regulatorischer T-Zellen (v.a. durch Makrophagen) innerhalb des Tumormikromilieus einen Teil der Wirksamkeit dieser Antikörper ausmacht [109, 110]. Mit Ipilimumab als IgG1-Antikörper und Tremelimumab als IgG2-Antikörper existieren zwei zugelassene CTLA-4-Antikörper verschiedenen Isotyps. In einem Vergleich CTLA-4-blockierender Antikörper in einem Mausmodell mit humanen Fcγ-Rezeptoren konnte für IgG1 und IgG2 eine gleich hohe Antitumoraktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität konnte durch biotechnologisch verbesserte Rezeptoraffinität des Antikörpers noch gesteigert werden und verschwand, wenn man die Affinität verringerte [111]. Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich IgG2-Antikörpern, der CD47-Blockade und deren Kombinationsmöglichkeiten (s.u.) gibt es einige Fragestellungen, die sich daran anknüpfen. Das große Interesse an den Immunkontrollpunkt-Inhibitoren dürfte auch der Erforschung derartiger Systeme für die myeloische Zellreihe Auftrieb geben. Mehrere CD47-inhibierende Therapeutika, darunter auch Antikörper, befinden sich gegenwärtig in frühen klinischen Studien, deren Ergebnisse es abzuwarten gilt [112, 113]. Gebremst werden die enormen Hoffnungen und Erwartungen an diese neue Therapiestrategie jedoch durch die teils hohe Toxizität, die ein Eingriff in die komplexe Regulierung des Immunsystems mit sich bringt [62]. Das ubiquitäre Vorkommen von CD47, unter anderem auch auf Erythrozyten, erwies sich zwischenzeitlich als nachteilig. So mussten zwei frühe Studien wegen des Auftretens von Anämien abgebrochen werden [106]. Gegenwärtig wird an Strategien zur besseren Verträglichkeit gearbeitet. Die durchgeführten Studien verdeutlichen auch, dass viele Patienten nicht auf die Therapie mit Immunkontrollpunkt-Inhibitoren ansprechen oder der Tumor Resistenzen entwickelt [114]. Unter anderem deswegen erreicht man derzeit mit der Hinzunahme einer Immuntherapie zur konventionellen zytoreduktiven Therapie fast ausschließlich einen Tumoregress, nicht aber eine Heilung – und das angesichts der Nebenwirkungen zu einem hohen Preis [115]. Im Hinblick auf künftige Entwicklungen in der Inhibition myeloischer Immunkontrollpunkte ist dies jedoch nicht nur Herausforderung, sondern auch Chance: so ist derzeit noch nicht geklärt, welches

Potenzial die zusätzliche stärkere Aktivierung des angeborenen Immunsystems entfalten könnte.

### **4.3.1. CD47 als „Tarnkappe“ bei der Tumorentstehung und -progression**

CD47/SIRP $\alpha$  ist als negatives Signal für die Aktivierung myeloischer Zellen derzeit für die Tumorthherapie am interessantesten und auch am besten erforscht. Die Implikationen von CD47 reichen indes tiefer als bis zur Nutzung für eine Immunkontrollpunkt-Inhibition. Eine etablierte Vorstellung über die Biologie maligner Tumoren ist die der Krebsstammzellen [116, 117]. Kurz beschrieben geht sie trotz heterogener Zellqualitäten innerhalb eines Tumors von einer Klonalität aller Zellen aus. Analog zum Prinzip der Stammzellen in gesundem Gewebe bleibt stets ein gewisser Bestand an Tumorstammzellen mit uneingeschränktem Replikationspotenzial im Hintergrund erhalten. Dieser vermittelt einen stetigen Nachschub an hierarchisch organisierten Tochterzellen. Nach makroskopischer Elimination im Rahmen der Therapie des Primärtumors können diese Stammzellen persistieren und später ein Lokal- oder Fernrezidiv bilden. Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften sind es letztlich, welche sich im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition aus dem Zellverband lösen und metastasieren können [118]. Interessanterweise konnten Krampitz et al. auf einer stammzellähnlichen Tumorzellpopulation in neuroepithelialen Tumoren des Pankreas (*PanNET*) das CD47-Protein in größerer Menge nachweisen als auf anderen Zellen des gleichen Tumors [119]. Diese Zellen sind sowohl im Initialstadium eines Tumors relevant als auch bei dessen Progress bzw. Metastasierung. Ferner wurde im Mausexperiment anhand eines CD47-blockierenden Antikörpers gezeigt, dass nach Injektion von PanNET-Zellen in das Pankreas sowohl das Wachstum und die Metastasierung verhindert, als auch das Gesamtüberleben der Mäuse verlängert werden konnte [119]. Insofern ergeben sich für die Inhibition des Moleküls CD47 oder von SIRP $\alpha$  – sei es durch einen Antikörper oder neuere rekombinante Verfahren wie etwa lösliche SIRP $\alpha$ -Fc Proteine - wichtige therapeutische Implikationen, die sich z. T. bereits in der klinischen Erprobung befinden. Die Hinweise auf die Bedeutung von CD47 für die Tumorgenese und -metastasierung können auch als Hinweise auf die Bedeutung und das Potenzial des angeborenen Immunsystems bei diesen zentralen Mechanismen aufgefasst werden.

#### **4.4. Ausblick: Kombination von IgG2-Antikörpern mit der CD47/SIRP $\alpha$ -Blockade**

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, könnte die Kombination von CD47/SIRP $\alpha$ -Inhibition und EGFR-Antikörpern künftig eine Option mit tiefgreifenden therapeutischen Effekten darstellen. Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Daten wird ersichtlich, dass der IgG2-Antikörper ein bislang unterschätztes, zytotoxisches Potenzial in Verbindung mit myeloischen Zellen besitzt. Das macht einige Szenarien der Kombination verschiedener Antikörper denkbar. Für das fortgeschrittene maligne Melanom etwa wies in einer Studie die Kombination eines CTLA-4- und eines PD-1-Inhibitors ein längeres progressionsfreies Überleben auf als eine Therapie mit nur je einem der beiden Antikörper [120]. Die Effekte können sich also durchaus addieren. Angeborenes und adaptives Immunsystem sind in der Antikörpertherapie nicht als zwei streng getrennte Systeme zu betrachten. So führte der Einsatz eines CD47-blockierenden Antikörpers in vivo dazu, dass sich die Antwort zytotoxischer T-Zellen auf Tumorzellen deutlich steigern ließ [121]. Dies stellt eine weitere Rationale für die simultane Inhibition verschiedener Immunkontrollpunkte dar: immerhin macht dieser Brückenschlag zwischen Inhibition eines myeloischen Kontrollpunktes und gesteigerter T-Zellantwort eine erworbene Antitumorimmunität denkbar. Insofern ist zu erwarten, dass die therapeutische Verknüpfung mehrerer Angriffspunkte in der Tumorummuntherapie ein vielversprechender Ansatz ist. Klinisch noch nicht erprobt ist die Kombination eines EGFR-Antikörpers mit einem Checkpoint-Inhibitor. In der Studie von Krampitz et al. konnte sowohl für Cetuximab als auch für Panitumumab gezeigt werden, dass im Mausexperiment eine Kombination mit einem CD47-blockierenden Antikörper die Tumormasse stärker reduziert als der jeweilige EGFR-Antikörper oder CD47-Antikörper allein [119]. Eine andere Studie konnte eine verbesserte Phagozytoserate bei Kombination sowohl von Cetuximab als auch Panitumumab mit einem SIRP $\alpha$ -blockierenden Antikörper zeigen [122]. Für die Kombination von Rituximab und einem CD47-Antikörper (Magrolimab, hu5F9-G4) gibt es bereits erste positive Daten [123]. Magrolimab wird derzeit in Kombination mit Cetuximab beim kolorektalen Karzinom und mit dem PD-L1 Inhibitor Avelumab beim Ovarialkarzinom erprobt, sodass es in Zukunft erste Antworten auf die Frage nach der Effektivität

## Diskussion

verschiedener Antikörperkombinationen geben dürfte [124]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erscheint vor allem die Kombination aus einem IgG2-Antikörper und einer Inhibition von CD47 oder SIRP $\alpha$  als spannender Ansatz, um das klinische Repertoire in der Antikörper-Immuntherapie auszuweiten.

Eine weitere Strategie, um die Antikörpertherapie effizienter zu gestalten, ist die Verstärkung der Immunantwort durch aktivierende Signale. In der vorliegenden Arbeit ist exemplarisch GM-CSF zum Einsatz gekommen. Das Zytokin ist sowohl präklinisch als auch in Studien als potenter Aktivator der immunologischen Antitumorantwort erprobt [125–127]. Ein anderer Ansatz, etwa für Lungen- und Pankreaskarzinome, ist die Injektion biotechnologisch modifizierter, GM-CSF-sezernierender Tumorzellen, welche eine adaptive Immunantwort gegen den eigentlichen Tumor anregen sollen [128, 129]. Die für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten effektivste Kombination war die aus IgG2-Antikörper, CD47-Inhibition und GM-CSF-Stimulation. Gerade Neutrophile stellen einen wesentlichen Anteil am Tumormikromilieu und lägen als potenzielle Effektorzellen zahlreich vor [100]. Daher kann auch das Hinzuziehen immunologisch aktivierender Signale ein weiterer Ansatzpunkt sein, um das Ansprechen des Immunsystems auf die Therapie mit immunologischen Verfahren weiter zu verbessern.

### 5. Zusammenfassung

Mit Cetuximab, Necitumumab und Panitumumab sind gegenwärtig drei gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gerichtete Antikörper für die Behandlung epithelialer Karzinome zugelassen. Während Cetuximab und Necitumumab zum Immunglobulin G (IgG)-Isotyp 1 gehören, ist Panitumumab ein IgG2-Antikörper. Nur von IgG1-Antikörpern ist man der Auffassung, dass diese in der Lage seien, mittels spezieller Bindungsstellen die Zerstörung der Tumorzellen vermitteln zu können. Zu diesen indirekten Effekten gehören die Aktivierung des Komplementsystems (komplementvermittelte Zytotoxizität) und die Rekrutierung von Immunzellen (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität). Der IgG2-Isotyp wird hingegen für immunologisch inert gehalten und präferenziell dann ausgewählt, wenn keine der oben erwähnten Effekte gewünscht sind. Entgegen den Annahmen zeigte Panitumumab in Vorstudien jedoch eine starke Aktivierung myeloischer Zellen und erwies sich in vergleichenden klinischen Studien als gleichwertig effektiv wie Cetuximab. Ziel dieser Arbeit war vor diesem Hintergrund eine detaillierte Charakterisierung der immunologischen Effektorfunktionen von gegen den EGFR gerichteten IgG1- und IgG2-Antikörpern. Die Analyse des Bindungsverhaltens der nachfolgend benutzten Antikörper (Cetuximab, Panitumumab, Zalutumumab) erfolgte mittels indirekter Durchflusszytometrie. Auch die Bestimmung relevanter Oberflächenmarker auf Makrophagen, Granulozyten und Zielzelllinien erfolgte im Durchflusszytometer. Die Effektorzellen wurden aus frischem antikoaguliertem Blut freiwilliger Spender gewonnen. Makrophagen wurden zusätzlich nach Adhäsion unter Zytokineinfluss in proinflammatorische M1-ähnliche sowie regulatorische M2-ähnliche Makrophagen differenziert. Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität wurde über die Messung der Freisetzung eines radioaktiven Chrom-Isotops aus den Zielzellen bestimmt, welche vorher mit diesem inkubiert wurden und dessen Freisetzung sich linear zur Zytotoxizität verhält. Der Einfluss von CD47 wurde simuliert, indem Zelllinien verwendet wurden, welche mittels gentechnischer Verfahren entweder kein CD47 oder reduzierte Mengen des Moleküls auf der Oberfläche tragen. Die Bindung der verschiedenen EGFR-Antikörper unterschied sich nicht. IgG1-, aber auch IgG2-Antikörper induzierten effektive Zytotoxizitäten gegenüber Tumorzellen in

## Zusammenfassung

Anwesenheit myeloischer Effektorzellen wie M1-Makrophagen und neutrophile Granulozyten, nicht aber mit M2-Makrophagen. Die Zytotoxizität mittels Granulozyten war bei Zelllinien mit mittlerer bis niedriger Expression des Zielantigens mit dem IgG2-Antikörper im Vergleich zum IgG1-Antikörper signifikant besser. Ferner konnte gezeigt werden, dass das „iss mich nicht“ – Signal des Moleküls CD47 auf der Oberfläche der Zielzellen die Aktivierung sowohl von Makrophagen als auch von Granulozyten durch beide Isotypen stark reguliert. In der Zusammenschau konnte zum einen gezeigt werden, dass, anders als angenommen, auch IgG2-Antikörper effektive indirekte Effektormechanismen vermitteln können. Sie sind potente Aktivatoren myeloischer Effektorzellen und im Vergleich zu IgG1-Antikörpern besser in der Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Die Aktivitäten der myeloischen Effektorzellen werden zudem stark negativ durch CD47 auf den Tumorzellen reguliert. Im Hinblick auf die gleiche klinische Effektivität von Cetuximab (IgG1) und Panitumumab (IgG2) bergen beide Aspekte neue Möglichkeiten für eine zukünftige differenziertere Verbesserung der antikörpervermittelten Tumorthherapie.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg.), Berlin 2021. Abgerufen am 09.07.2022.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57–70.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011): Hallmarks of cancer. The next generation. *Cell* 144(5):646–674.
4. Salles G., Barrett M., Foà R., Maurer J., O'Brien S., Valente N., Wenger M., Maloney D.G. (2017): Rituximab in B-cell hematologic malignancies. A review of 20 years of clinical experience. *Adv. Ther.* 34(10):2232–2273.
5. Chen D.S., Mellman I (2013): Oncology meets immunology. The cancer-immunity cycle. *Immunity* 39(1):1–10.
6. Sharma P., Allison J.P. (2015): The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348(6230):56–61.
7. Chen D.S., Mellman I. (2017): Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541(7637):321-330.
8. Arteaga C.L., Engelman J.A. (2014): ERBB receptors. From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25(3): 282 - 303.
9. Olayioye M.A. (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19(13):3159 – 3167.
10. Citri A., Yarden Y. (2006): EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(7):505 - 516.
11. Schlessinger J. (2002): Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110(6):669 - 672.
12. Ciardiello F., Tortora G. (2001): A novel approach in the treatment of cancer. Targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. Cancer Res.* 7(10):2958-2970.
13. Mendelsohn J. (1997): Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 3(12):2703–2707.

14. Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. (2004): Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432(7015):332 - 337.
15. Portrazza | European Medicines Agency.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/portrazza>. Zugegriffen: 13. Juni 2020.
16. Ciardiello F., Tortora G. (2008): EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.* 358(11):1160–1174.
17. van Cutsem E., Köhne C.-H., Hitre E., Zaluski J., Chang Chien C.-R., Makhson A., D'Haens G., Pintér T., Lim R., Bodoky G., Roh J.K., Folprecht G., Ruff P., Stroh C., Tejpar S., Schlichting M., Nippgen J., Rougier P. (2009): Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 360(14):1408–1417.
18. Bonner J.A., Harari P.M., Giralt J., Azarnia N., Shin D.M., Cohen R.B., Jones C.U., Sur R., Raben D., Jassem J., Ove R., Kies M.S., Baselga J., Youssoufian H., Amellal N., Rowinsky E.K., Ang K.K. (2006): Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 354(6):567–578.
19. Vermorken J.B., Mesia R., Rivera F., Remenar E., Kawecki A., Rottey S., Erfan J., Zabolotnyy D., Kienzer H.-R., Cupissol D., Peyrade F., Benasso M., Vynnychenko I., Raucourt D., Bokemeyer C., Schueler A., Amellal N., Hitt R. (2008): Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 359(11):1116–1127.
20. Amado R.G., Wolf M., Peeters M., van Cutsem E., Siena S., Freeman D.J., Juan T., Sikorski R., Suggs S., Radinsky R., Patterson S.D., Chang D.D. (2008): Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26(10):1626–1634.
21. Peeters M., Price T.J., Cervantes A., Sobrero A.F., Ducreux M., Hotko Y., André T., Chan E., Lordick F., Punt C.J.A., Strickland A.H., Wilson G., Ciuleanu T.-E., Roman L., van Cutsem E., Tzekova V., Collins S., Oliner K.S., Rong A., Gansert J. (2010): Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 28(31):4706–4713.

22. Douillard J.-Y., Oliner K.S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M., Humblet Y., Bodoky G., Cunningham D., Jassem J., Rivera F., Kocáková I., Ruff P., Błasińska-Morawiec M., Šmakal M., Canon J.L., Rother M., Williams R., Rong A., Wiezorek J., Sidhu R., Patterson S.D. (2013): Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 369(11):1023–1034.
23. Hecht J.R., Mitchell E., Chidiac T., Scroggin C., Hagenstad C., Spigel D., Marshall J., Cohn A., McCollum D., Stella P., Deeter R., Shahin S., Amado R.G. (2009): A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27(5):672–680.
24. Tol J., Koopman M., Cats A., Rodenburg C.J., Creemers G.J., Schrama J.G., Erdkamp F.L., Vos A.H., van G.C.J., Sinnige H.A., Richel D.J., Voest E.E., Dijkstra J.R., Vink-Börger M.E., Antonini N.F., Mol L., van K.J.H., Dalesio O., Punt C.J. (2009): Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 360(6):563 - 572.
25. Price T.J., Peeters M., Kim T.W., Li J., Cascinu S., Ruff P., Suresh A.S., Thomas A., Tjulandin S., Zhang K., Murugappan S., Sidhu R. (2014): Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT). A randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.* 15(6):569–579.
26. Petrelli F., Borgonovo K., Barni S. (2013): The predictive role of skin rash with cetuximab and panitumumab in colorectal cancer patients. A systematic review and meta-analysis of published trials. *Target Oncol.* 8(3):173 - 181.
27. Schroeder H.W., Cavacini L. (2010): Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125(2):41-52.
28. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. (2014): IgG subclasses and allotypes. From structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5: 520.
29. Murphy K., Weaver C. (2018): *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg.
30. Pincetic A., Bournazos S., DiLillo D.J., Maamary J., Wang T.T., Dahan R., Fiebiger B.-M., Ravetch J.V. (2014): Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 15(8):707–716.
31. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. (2008): Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8(1):34–47.

32. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. (2016): The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiol. Spectr.* 4(6):1-19.
33. Sobota A., Strzelecka-Kiliszek A., Gładkowska E., Yoshida K., Mrozińska K., Kwiatkowska K. (2005): Binding of IgG-opsonized particles to FcγR is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J. Immunol.* 175(7):4450–4457.
34. van der Heijden J., Breunis W.B., Geissler J., Boer M., van den Berg T.K., Kuijpers T.W. (2012): Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J. Immunol.* 188(3):1318–1324.
35. Bruhns P., Iannascoli B., England P., Mancardi D.A., Fernandez N., Jorieux S., Daëron M. (2009): Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16):3716–3725.
36. Derer S., Glorius P., Schlaeth M., Lohse S., Klausz K., Muchhal U., Desjarlais J.R., Humpe A., Valerius T., Peipp M. (2014): Increasing FcγRIIIa affinity of an FcγRIII-optimized anti-EGFR antibody restores neutrophil-mediated cytotoxicity. *MAbs* 6(2):409–421.
37. Edberg J.C., Kimberly R.P. (1994): Modulation of Fcγ and complement receptor function by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of FcγRIII. *J. Immunol.* 152(12): 5826 - 5835.
38. Bruhns P. (2012): Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119(24):5640–5649.
39. Mellor J.D., Brown M.P., Irving H.R., Zalcborg J.R., Dobrovic A. (2013): A critical review of the role of Fcγ receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J. Hematol. Oncol.* 6(1):2639.
40. Parren P.W., Warmerdam P.A., Boeije L.C., Arts J., Westerdal N.A., Vlug A., Capel P.J., Aarden L.A., van de Winkel J.G. (1992): On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fcγ RIIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J. Clin. Invest.* 90(4):1537–1546.
41. Wu J., Edberg J.C., Redecha P.B., Bansal V., Guyre P.M., Coleman K., Salmon J.E., Kimberly R.P. (1997): A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 100(5):1059–1070.

## Literaturverzeichnis

42. Köhler G., Milstein C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495 - 497.
43. Peipp M., Dechant M., Valerius T. (2008): Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 20(4):436–443.
44. Glennie M.J., French R.R., Cragg M.S., Taylor R.P. (2007): Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 44(16):3823–3837.
45. Weiner L.M., Murray J.C., Shuptrine C.W. (2012): Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell* 148(6):1081–1084.
46. Voigt M., Braig F., Göthel M., Schulte A., Lamszus K., Bokemeyer C., Binder M. (2012): Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by Panitumumab and Cetuximab. *Neoplasia* 14(11):1023–1031.
47. Brüggemann M., Williams G.T., Bindon C.I., Clark M.R., Walker M.R., Jefferis R., Waldmann H., Neuberger M.S. (1987): Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* 166(5):1351–1361.
48. Gül N., van Egmond M. (2015): Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages. A potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res.* 75(23):5008–5013.
49. Joly E., Hudrisier D. (2003): What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat. Immunol.* 4(9):815.
50. Matlung H.L., Babes L., Zhao X.W., van Houdt M., Treffers L.W., van Rees D.J., Franke K., Schornagel K., Verkuijlen P., Janssen H., Halonen P., Lieftink C., Beijersbergen R.L., Leusen J.H.W., Boelens J.J., Kuhnle I., van der Werff Ten Bosch J., Seeger K., Rutella S., Pagliara D., Matozaki T., Suzuki E., van Menke-van der Houven Oordt C.W., van Bruggen R., Roos D., van Lier R.A.W., Kuijpers T.W., Kubes P., van den Berg T.K. (2018): Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Reports* 23(13):3946-3959.
51. Flier J.S., Underhill L.H., Dvorak H.F. (1986): Tumors. Wounds that do not heal. *N. Engl. J. Med.* 315(26):1650–1659.
52. Schäfer M., Werner S. (2008): Cancer as an overhealing wound. An old hypothesis revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(8): 628 - 638.

53. Gentles A.J., Liu C.L., Bratman S.V., Feng W., Kim D., Nair V.S., Xu Y., Khuong A., Hoang C.D., Diehn M., West R.B., Plevritis S.K., Alizadeh A.A. (2015): The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 21(8): 938 - 945.
54. Zou W. (2005): Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5(4):263–274.
55. Nielsen S.R., Schmid M.C. (2017): Macrophages as key drivers of cancer progression and metastasis. *Mediators Inflamm.* 2017:9624760.
56. Weiskopf K., Weissman I.L. (2015): Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 7(2):303–310.
57. Mosser D.M., Edwards J.P. (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8(12):958–969.
58. Eruslanov E.B., Bhojnagarwala P.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Ranganathan A., Deshpande C., Akimova T., Vachani A., Litzky L., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Feldman M., Albelda S.M., Singhal S. (2014): Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J. Clin. Invest.* 124(12):5466–5480.
59. Pardoll D.M. (2012): The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12(4):252–264.
60. Postow M.A., Callahan M.K., Wolchok J.D. (2015): Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 33(17):1974–1982.
61. Granier C., Guillebon E., Blanc C., Roussel H., Badoual C., Colin E., Saldmann A., Gey A., Oudard S., Tartour E. (2017): Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer. *ESMO Open* 2(2).
62. Longo D.L., Postow M.A., Sidlow R., Hellmann M.D. (2018): Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade. *N. Engl. J. Med.* 378(2):158–168.
63. Gardai S.J., McPhillips K.A., Frasch S.C., Janssen W.J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J.E., Bratton D.L., Oldenborg P.-A., Michalak M., Henson P.M. (2005): Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123(2):321–334.

64. Chao M.P., Jaiswal S., Weissman-Tsukamoto R., Alizadeh A.A., Gentles A.J., Volkmer J., Weiskopf K., Willingham S.B., Raveh T., Park C.Y., Majeti R., Weissman I.L. (2010): Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2(63):63-94.
65. Soto-Pantoja D.R., Kaur S., Roberts D.D. (2014): CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50(3):212–230.
66. Barclay A.N., van den Berg T.K. (2014): The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu. Rev. Immunol.* 32:25–50.
67. Oldenborg P.A., Zheleznyak A., Fang Y.F., Lagenaur C.F., Gresham H.D., Lindberg F.P. (2000): Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288(5473):2051–2054
68. Matlung H.L., Szilagyi K., Barclay N.A., van den Berg T.K. (2017): The CD47-SIRP $\alpha$  signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol. Rev.* 276(1):145–164.
69. Zhao X.W., van Beek E.M., Schornagel K., van der Maaden H., van Houdt M., Otten M.A., Finetti P., van Egmond M., Matozaki T., Kraal G., Birnbaum D., van Elsas A., Kuijpers T.W., Bertucci F., van den Berg T.K. (2011): CD47–signal regulatory protein- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(45):18342–18347.
70. Chao M.P., Alizadeh A.A, Tang C., Myklebust J.H., Varghese B., Gill S., Jan M., Cha A.C., Chan C.K., Tan B.T., Park C.Y., Zhao F., Kohrt H.E., Malumbres R., Briones J., Gascoyne R.D., Lossos I.S., Levy R., Weissman I.L., Majeti R. (2010): Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142(5):699–713.
71. Chao M.P., Takimoto C.H., Feng D.D., McKenna K., Gip P., Liu J., Volkmer J.-P., Weissman I.L., Majeti R. (2020): Therapeutic targeting of the macrophage immune checkpoint CD47 in myeloid malignancies. *Front. Oncol.* 9:1380.
72. Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., Ravetch J.V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6(4):443–446.

73. Schneider-Merck T., van Lammerts Bueren J.J., Berger S., Rossen K., van Berkel P.H.C., Derer S., Beyer T., Lohse S., Bleeker W.K., Peipp M., Parren P.W.H.I., van de Winkel J.G.J., Valerius T., Dechant M. (2010): 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.* 184(1):512–520.
74. Klausz K., Berger S., van Lammerts Bueren J.J., Derer S., Lohse S., Dechant M., van de Winkel J.G.J., Peipp M., Parren P.W.H.I., Valerius T. (2011): Complement-mediated tumor-specific cell lysis by antibody combinations targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and its variant III (EGFRvIII). *Cancer Sci.* 102(10):1761–1768.
75. Duluc D., Delneste Y., Tan F., Moles M.-P., Grimaud L., Lenoir J., Preisser L., Anegon I., Catala L., Ifrah N., Descamps P., Gamelin E., Gascan H., Hebbar M., Jeannin P. (2007): Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110(13):4319–4330.
76. Gentles A., Newman A., Liu C., Bratman V. S., Feng W., Dongkyoon K., Visman S. N., Xu Y., Khuong A., Hoang C. D., Diehn M., West R., Plevritis S. K., Alizadeh A. A. (2015): The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 21, 938 – 945.
77. Derer S., Bauer P., Lohse S., Scheel A.H., Berger S., Kellner C., Peipp M., Valerius T. (2012): Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *J. Immunol.* 189(11): 5230 - 5239.
78. Dechant M., Weisner W., Berger S., Peipp M., Beyer T., Schneider-Merck T., Bueren J., Lammerts J., Bleeker W.K., Parren P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., Valerius T. (2008): Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res.* 68(13):4998–5003.
79. Maughan T.S., Adams R.A., Smith C.G., Meade A.M., Seymour M.T., Wilson R.H., Idziaszczyk S., Harris R., Fisher D., Kenny S.L., Kay E., Mitchell J.K., Madi A., Jasani B., James M.D., Bridgewater J., Kennedy M.J., Claes B., Lambrechts D., Kaplan R., Cheadle J.P. (2011): Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer. Results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 377(9783):2103–2114.

## Literaturverzeichnis

80. Chan D.L.H., Segelov E., Wong R.S.H., Smith A., Herbertson R.A., Li B.T., Tebbutt N., Price T., Pavlakis N. (2017): Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6(6):CD007047.
81. Carter P.J. (2006): Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* 6(5):343-357.
82. Jakobovits A., Amado R.G., Yang X., Roskos L., Schwab G. (2007): From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 25(10):1134–1143.
83. Yang X.-D., Jia X.-C., Corvalan J.R.F., Wang P., Davis C.G., Jakobovits A. (1999): eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res* 59(6):1236–1243.
84. Ma P., Yang B.-B., Wang Y.-M., Peterson M., Narayanan A., Sutjandra L., Rodriguez R., Chow A. (2009): Population pharmacokinetic analysis of panitumumab in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Pharmacol.* 49(10):1142–1156.
85. Cunningham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I., van Cutsem E. (2004): Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351(4):337–345.
86. Cleary K.L.S., Chan H.T.C., James S., Glennie M.J., Cragg M.S. (2017): Antibody distance from the cell membrane regulates antibody effector mechanisms. *J. Immunol.* 198(10):3999–4011.
87. Könitzer J.D., Sieron A., Wacker A., Enenkel B. (2015): Reformatting rituximab into human IgG2 and IgG4 isotypes dramatically improves apoptosis induction in vitro. *PLoS One* 10(12):e0145633.
88. Dillon T.M., Ricci M.S., Vezina C., Flynn G.C., Liu Y.D., Rehder D.S., Plant M., Henkle B., Li Y., Deechongkit S., Varnum B., Wypych J., Balland A., Bondarenko P.V. (2008): Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J. Biol. Chem.* 283(23):16206-16215.

89. White A.L., Chan H.T., French R.R., Willoughby J., Mockridge C.I., Roghanian A., Penfold C.A., Booth S.G., Dodhy A., Polak M.E., Potter E.A., Ardern-Jones, Verbeek J.S., Johnson P.W., Al-Shamkhani A., Cragg M.S., Beers S.A., Glennie M.J. (2015): Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. *Cancer Cell* 27(1):138 - 148.
90. Yu X., Chan H.C., Orr C.M., Dadas O., Booth S.G., Dahal L.N., Penfold C.A., O'Brien L., Mockridge C.I., French R.R., Duriez P., Douglas L.R., Pearson A.R., Cragg M.S., Tews I., Glennie M.J., White A.L. (2018): Complex interplay between epitope specificity and isotype dictates the biological activity of anti-human CD40 antibodies. *Cancer Cell* 33(4):664-675.
91. Kawaguchi Y., Kono K., Mimura K., Sugai H., Akaike H., Fujii H. (2007): Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 120(4):781–787.
92. López-Albaitero A., Lee S.C., Morgan S., Grandis J.R., Gooding W.E., Ferrone S., Ferris R.L. (2009): Role of polymorphic Fcγ receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 58(11):1853–1862.
93. López-Albaitero A., Ferris R.L. (2007): Immune Activation by Epidermal Growth Factor Receptor–Specific Monoclonal Antibody Therapy for Head and Neck Cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 133(12):1277–1281.
94. Leidi M., Gotti E., Bologna L., Miranda E., Rimoldi M., Sica A., Roncalli M., Palumbo G.A., Introna M., Golay J. (2009): M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J. Immunol.* 182(7):4415–4422.
95. Uchida J., Hamaguchi Y., Oliver J.A., Ravetch J.V., Poe J.C., Haas K.M., Tedder T.F. (2004): The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.* 199(12):1659–1669.
96. Albanesi M., Mancardi D.A., Jönsson F., Iannascoli B., Fiette L., Di Santo J.P., Lowell C.A., Bruhns P. (2013): Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood* 122(18):3160–3164.
97. Ferris R.L., Jaffee E.M., Ferrone S. (2010): Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy. Clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J. Clin. Oncol.* 28(28):4390–4399.

98. Zhang W., Gordon M., Schultheis A.M., Yang D.Y., Nagashima F., Azuma M., Chang H.-M., Borucka E., Lurje G., Sherrod A.E., Iqbal S., Groshen S., Lenz H.-J. (2007): FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 25(24):3712–3718.
99. Bibeau F., Lopez-Crapez E., Di Fiore F., Thezenas S., Ychou M., Blanchard F., Lamy A., Penault-Llorca F., Frébourg T., Michel P., Sabourin J.-C., Boissière-Michot F. (2009): Impact of FcγRIIIa-FcγRIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 27(7):1122–1129.
100. Kargl J., Busch S.E., Yang G.H.Y., Kim K.-H., Hanke M.L., Metz H.E., Hubbard J.J., Lee S.M., Madtes D.K., McIntosh M.W., Houghton A.M. (2017): Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. *Nat. Comm.* 8:14381.
101. Teramukai S., Kitano T., Kishida Y., Kawahara M., Kubota K., Komuta K., Minato K., Mio T., Fujita Y., Yonei T., Nakano K., Tsuboi M., Shibata K., Furuse K., Fukushima M. (2009): Pretreatment neutrophil count as an independent prognostic factor in advanced non-small-cell lung cancer. An analysis of Japan Multinational Trial Organisation LC00-03. *Eur. J. Cancer* 45(11):1950–1958.
102. Yamanaka T., Matsumoto S., Teramukai S., Ishiwata R., Nagai Y., Fukushima M. (2007): The baseline ratio of neutrophils to lymphocytes is associated with patient prognosis in advanced gastric cancer. *Oncology* 73(3-4):215 - 220.
103. Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. (2018): Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* 19(2):108 - 119.
104. Antonia S.J., Villegas A., Daniel D., Vicente D., Murakami S., Hui R., Yokoi T., Chiappori A., Lee K.H., de Wit M., Cho B.C., Bourhaba M., Quantin X., Tokito T., Mekhail T., Planchard D., Kim Y.-C., Karapetis C.S., Hirt S., Ostoros G., Kubota K., Gray J.E., Paz-Ares L., de Castro Carpeño J., Wadsworth C., Melillo G., Jiang H., Huang Y., Dennis P.A., Özgüroğlu M. (2017): Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non–small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 377(20):1919–1929.

## Literaturverzeichnis

105. Schmid P., Adams S., Rugo H.S., Schneeweiss A., Barrios C.H., Iwata H., Diéras V., Hegg R., Im S.-A., Shaw Wright G., Henschel V., Molinero L., Chui S.Y., Funke R., Husain A., Winer E.P., Loi S., Emens L.A. (2018): Atezolizumab and nab-paclitaxel in advancedtriple-negative breast cancer. *N. Eng. J. Med.* 379: 2108-2121.
106. Zhang W., Huang Q., Xiao W., Zhao Y., Pi J., Xu H., Zhao H., Xu J., Evans C.E., Jin H. (2020): Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRP $\alpha$  axis. *Front. Immunol.* 11:18.
107. Weiskopf K., Jahchan N.S., Schnorr P.J. (2016): CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* 126(7): 2610–2620.
108. Zhang M., Hutter G., Kahn S.A., Azad T.D., Gholamin S., Xu C.Y., Liu J., Achrol A.S., Richard C., Sommerkamp P., Schoen M.K., McCracken M.N., Majeti R., Weissman I., Mitra S.S., Cheshier S.H. (2016): Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes M1 polarized macrophages in vivo. *PLoS One* 11(4).
109. Bulliard Y., Jolicoeur R., Windman M., Rue S.M., Ettenberg S., Knee D.A., Wilson N.S., Dranoff G., Brogdon J.L. (2013): Activating Fc  $\gamma$  receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J. Exp. Med.* 210(9):1685-1693.
110. Simpson T.R., Li F., Montalvo-Ortiz W., Sepulveda M.A., Bergerhoff K., Arce F., Roddie C., Henry J.Y., Yagita H., Wolchok J.D., Peggs K.S., Ravetch J.V., Allison J.P., Quezada S.A. (2013): Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210(9):1695-1710.
111. Arce V.F., Furness A.J.S., Litchfield K.(2018): Fc effector function contributes to the activity of human anti-CTLA-4 antibodies. *Cancer Cell* 33(4):649-663.
112. Weiskopf K. (2017): Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP $\alpha$  axis. *Eur. J. Cancer* 76:100–109.
113. Liu X., Kwon H., Li Z., Fu Y.-X. (2017): Is CD47 an innate immune checkpoint for tumor evasion? *J. Hematol. Oncol.* 10:12.
114. Pitt J.M., Vétizou M., Daillère R., Roberti M.P., Yamazaki T., Routy B., Lepage P., Boneca I.G., Chamaillard M., Kroemer G., Zitvogel L. (2016): Resistance mechanisms to immune-checkpoint blockade in cancer: tumor-intrinsic and -extrinsic factors. *Immunity* 44(6):1255–1269.

115. Sharma P., Allison J.P. (2015): Immune checkpoint targeting in cancer therapy. toward combination strategies with curative potential. *Cell* 161(2):205–214.
116. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859):105–111.
117. Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M. (2007): Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67(3):1030–1037.
118. Singh A., Settleman J. (2010): EMT, cancer stem cells and drug resistance. An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29(34):4741–4751.
119. Krampitz G.W., George B.M., Willingham S.B., Volkmer J.-P., Weiskopf K., Jahchan N., Newman A.M., Sahoo D., Zemek A.J., Yanovsky R.L., Nguyen J.K., Schnorr P.J., Mazur P.K., Sage J.I., Longacre T.A., Visser B.C., Poultsides G.A., Norton J.A., Weissman I.L. (2016): Identification of tumorigenic cells and therapeutic targets in pancreatic neuroendocrine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(16):4464–4469.
120. Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R. (2015): Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373(1):23–34.
121. Tseng D., Volkmer J.P., Willingham S.B., Contreras-Trujillo H., Fathman J.W., Fernhoff N.B., Seita J., Inlay M.A., Weiskopf K., Miyanishi M., Weissman I.L. (2013): Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(27): 11103 -11108.
122. Ring N.G., Herndler-Brandstetter D., Weiskopf K., Shan L., Volkmer J.P., George B.M., Lietzenmayer M., McKenna K.M., Naik T.J., McCarty A., Zheng Y., Flavell R.A., Weissman I.L. (2017): Anti-SIRP $\alpha$  antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114(49):10578-10585.
123. Advani R., Flinn I., Popplewell L., Forero A., Bartlett N.L., Ghosh N., Kline J., Roschewski M., LaCasce A., Collins G.P., Tran T., Lynn J., Chen J.Y., Volkmer J.-P., Agoram B., Huang J., Majeti R., Weissman I.L., Takimoto C.H., Chao M.P., Smith S.M. (2018): CD47 blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in non-hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 379(18):1711–1721.

## Literaturverzeichnis

124. Sikic B.I., Lakhani N., Patnaik A., Shah S.A., Chandana S.R., Rasco D., Colevas A.D., O'Rourke T., Narayanan S., Papadopoulos K., Fisher G.A., Villalobos V., Prohaska S.S., Howard M., Beeram M., Chao M.P., Agoram B., Chen J.Y., Huang J., Axt M., Liu J., Volkmer J.-P., Majeti R., Weissman I.L., Takimoto C.H., Supan D., Wakelee H.A., Aoki R., Pegram M.D., Padda S.K. (2019): First-in-human, first-in-class phase I trial of the anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 in patients with advanced cancers. *J. Clin. Oncol.* 37(12):946–953.
125. Hurwitz A.A., Yu T.F.-Y., Leach D.R., Allison J.P. (1998): CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(17):10067–10071.
126. Fong L., Kwek S.S., O'Brien S., Kavanagh B., McNeel D.G., Weinberg V., Lin A.M., Rosenberg J., Ryan C.J., Rini B.I., Small E.J. (2009): Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA4 blockade and GM-CSF. *Cancer Res.* 69(2):609–615.
127. Hodi F.S., Lee S., McDermott D.F., Rao U.N., Butterfield L.H., Tarhini A.A., Leming P., Puzanov I., Shin D., Kirkwood J.M. (2014): Sargramostim plus Ipilimumab vs Ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma. A randomized clinical trial. *JAMA* 312(17):1744–1753.
128. Nemunaitis J., Jahan T., Ross H., Serman D., Richards D., Fox B., Jablons D., Aimi J., Lin A., Hege K. (2006): Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX<sup>®</sup> vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 13(6):555-562.
129. Le D.T., Wang-Gillam A., Picozzi V., Greten T.F., Crocenzi T., Springett G., Morse M., Zeh H., Cohen D., Fine R.L., Onners B., Uram J.N., Laheru D.A., Lutz E.R., Solt S., Murphy A.L., Skoble J., Lemmens E., Grous J., Dubensky T., Brockstedt D.G., Jaffee E.M. (2015): Safety and survival with GVAX pancreas prime and listeria monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 33(12):1325–1333.

## 7. Anhang

### 7.1. Zelllinien

Zelllinie	Tumorentität	Bezogen von	Kulturbedingungen
A1207	Glioblastom	Dr. Aaronson, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, US	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (HI-FCS) + 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep)
A431	Epidermoid-Karzinom der Vulva	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, DE	Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) + 10 % HI-FCS + Pen/Strep
A431 CD47 Ko- Variante	Epidermoid-Karzinom der Vulva	Prof. Dr. Timo van den Berg, Amsterdam, NL	RPMI-1640 + 10 % HI-FCS + Pen/Strep
A431 scr- Variante	Epidermoid-Karzinom der Vulva	Prof. Dr. Timo van den Berg, Amsterdam, NL	RPMI-1640 + 10 % HI-FCS + Pen/Strep
Kyse-30	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, Braunschweig, DE	45 % RPMI-1640 + 45 % Ham's F-12 + 10 % HI-FCS + Pen/Strep
Kyse- 150	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	DSMZ, Braunschweig, DE	49 % RPMI-1640 + 49 % Ham's F-12 + 2 % HI-FCS + Pen/Strep
SAT	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	Prof. Dr. M. Binder, Hamburg, DE	DMEM + 10 % HI-FCS + Pen/Strep
SCC-25	Plattenepithelkarzinom der Zunge	Prof. Dr. M. Binder, Hamburg, DE	DMEM + 20 % HI-FCS + Pen/Strep

## 7.2. Materialliste

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
<b>Reagenzien und Puffer</b>	
<sup>51</sup> Chrom	Hartmann Analytic, Braunschweig, DE
Aqua dest.	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol 99%	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol, vergällt, >99%	Büfa Chemikalien, Hude, DE
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, Chicago, IL, US
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lipopolysaccharid von Escherichia coli O111:B4	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Optiphase Super Mix	Perkin Elmer, Waltham, MA, US
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Phosphat-gepufferte Saline (PBS) 1x/10x	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Polymorhprep™	Progen, Heidelberg, DE
Puromycin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Triton X-100	Merck, Darmstadt, DE
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
<b>Medien/Zellkulturreagenzien</b>	
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Cell Dissociation Buffer	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Geneticin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Gentamicin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Ham's F-12 Medium	Lonza, Walkersville, MD, US
Monocyte Attachment Medium	PromoCell, Heidelberg, DE
OptiMEM™, modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium + HEPES + 2,4 g/l	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
Natriumbicarbonat + L-Glutamin	
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US

## Anhang

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
<b>Medien/Zellkulturreagenzien ff.</b>	
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) + Glutamax-I + 25 mM HEPES	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US
X-Vivo™ 15-Medium	Lonza, Walkersville, MD, US
<b>Proteine</b>	
Bovines Serumalbumin, proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Intratect®, humanes intravenöses Immunglobulin G, 50 g/l	Biotest, Dreieich, DE
Rekombinanter humaner Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Peprotech, Cranbury, NJ, US
Rekombinanter humaner Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF)	Peprotech, Cranbury, NJ, US
Rekombinantes humanes Interferon-γ	Peprotech, Cranbury, NJ, US
Rekombinantes humanes Interleukin-4	Peprotech, Cranbury, NJ, US
Trypsin/EDTA 0,05 %, phenolrot	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, US
<b>Testkits</b>	
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Walkersville, MD, US
Lipofectamine™ 2000 Transfection Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, US
<b>Antikörper</b>	
anti-human CD16, 3G8, murin-IgG1, PE-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, US
anti-human CD20, C2B8, murin-IgG1	Genmab, Utrecht, NL
anti-human CD20, Rituximab/C2B8, chimärer human-/murin IgG1	Hoffmann-La Roche, Basel, CH (über die Apotheke bezogen)
anti-human CD32, 2E1, murin-IgG2a, PE-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, US
anti-human CD47, B6H12, murin-IgG1	BioXCell, West Lebanon, NH, US

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
<b>Antikörper ff.</b>	
anti-human CD47, REA220, human-IgG1, PE-gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
anti-human CD64, 22, murin-IgG1, PE-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, US
anti-human CD80, REA661, human-IgG1, PE-gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
anti-human CD163, REA812, human-IgG1, PE-gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
anti-human SIRP $\alpha$ , REA144, human-IgG1, PE-gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
anti-human EGFR, Cetuximab/225, chimärer human-/murin IgG1	Merck, Darmstadt, DE (über die Apotheke bezogen)
anti-human EGFR, Matuzumab/h425, humanisierter IgG1	Prof. Dr. M. Cragg, Southampton, UK
anti-human EGFR, Matuzumab/m425, murin-IgG1	Prof. Dr. M. Cragg, Southampton, UK
anti-human EGFR, Panitumumab/E7.6.3, humanisierter IgG2	Amgen Europe, Breda, NL (über die Apotheke bezogen)
anti-human EGFR, Zalutumumab/2F8, humanisierter IgG1 sowie IgG2	Genmab, Utrecht, NL
anti-human Kappa-Leichtkette, polyklonaler Ziege-IgG, FITC-gekoppelt	Southern Biotech, Birmingham, AL, US
anti-Maus IgG, polyklonaler Ziege-IgG, FITC-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, US
Isotyp-Kontrollantikörper, human-IgG1, PE-gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
Isotyp-Kontrollantikörper, murin-IgG1 $\kappa$ , PE-gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, DE
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Biosphere Filter Tips steril, farblos (2,5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Combitips® advanced 2,5 ml, steril/unsteril	Eppendorf, Hamburg, DE
FACS-Probenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE

## Anhang

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
<b>Verbrauchsmaterialien ff.</b>	
Filtertips Stackpack 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Flexible Testplatte, 96 Well, PET, unsteril	Perkin Elmer, Waltham, MA, US
Mikro-Schraubröhren (1,5 ml, 2 ml), steril	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotestplatten, 96-Well, flacher Boden, steril	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotestplatten, 96-Well, konischer Boden, unsteril	Greiner, Kremsmünster, AU
Mikrotestplatten, 96-Well, runder Boden, steril	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten, steril (2 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
S-Monovette®, 9NC	Sarstedt, Nümbrecht, DE
TC-Platte, 6-Well, flach, steril	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Tip Systembox	Sarstedt, Nümbrecht, DE
TopSeal™ A Plus	Perkin Elmer, Waltham, MA, US
Verschlussfolie Parafilm®	Bemis, Neenah, WI, US
Zellkulturflasche Nunc™ EasYFlask™ (25 cm², 75 cm², 175 cm²)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US
Zellkulturflaschen, Standard, mit Filter, steril (25 cm², 75 cm², 175 cm²)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellsieb Falcon™ 70 µm	BD Biosciences, Bedford, MA, US
<b>Geräte</b>	
Biologische Sicherheitswerkbank <i>Herasafe™</i>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US
Durchflusszytometer Epics™, Navios™	Beckman Coulter, Brea, CA, US
Eismaschine AF206	Scotsman Ice, Vernon Hills, IL, US
Heraeus™ Megafuge™ 1.0 R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US
Lichtmikroskop (AxioStar Plus, Axiovert 40C)	Zeiss, Oberkochen, DE
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE

## Anhang

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
<b>Geräte ff.</b>	
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Pipettierhilfe Sarpette® automatic	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipette Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Reference® (0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Research® Plus (0,1 – 2,5 µl, 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Szintillationsmesser MicroBeta Trilux	Perkin Elmer, Waltham, MA, US
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, US
Waage XB 120a	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
Wasserbad	Memmert, Schwabach, DE
Zellinkubator Heracell™ 240	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, US
<b>Software</b>	
1450 MicroBeta Workstation Software	Perkin Elmer, Waltham, MA, US
FACS-Analysesoftware Kaluza	Beckman Coulter, Brea, CA, US
Feng Zhang gRNA Design Tool	Labor Feng Zhang, online unter <i><a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a></i>
GraphPad Prism, Versionen 4, 5, 7, 8, 9	Graphpad, La Jolla, CA, US
Microsoft Office, Version 2013, Version 365	Microsoft, Redmond, WA, US

## 8. Danksagung

Als ich 2017 mit dieser Arbeit begann, war ich noch am Anfang des klinischen Studienabschnitts und hatte wenige Berührungspunkte mit der präklinischen Forschung oder der Onkologie. Dass ich nach dem Studium meinen beruflichen Werdegang in genau diesem Fachgebiet begann, daran waren auch die intensiven, positiven Erfahrungen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht unbeteiligt.

Zuallererst bin ich der Klinikdirektorin der Klinik für Hämatologie/Onkologie am UKSH, Campus Kiel, Fr. Prof. Dr. med. Claudia Baldus zum Dank verpflichtet, dass ich an ihrer Klinik promovieren durfte. Dank gilt in diesem Zusammenhang auch dem ehemaligen Direktor des Dr. Mildred-Scheel-Haus, Prof. Dr. med. Martin Gramatzki.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Thomas Valerius: Für die Ermöglichung meines wissenschaftlichen Projekts, für die unzähligen Ratschläge und für die stetige fachliche Begleitung und Steuerung meines Projekts. Fr. PD Dr. Renate Burger danke ich für ihre vielen Hilfestellungen im Laufe meiner Arbeit und vor allem für ihre ausgezeichnete kritische Korrektur am Schluss. Ich danke an dieser Stelle auch allen anderen WissenschaftlerInnen am Mildred-Scheel-Haus, mit denen ich zusammenarbeiten durfte, die mich offen im Team empfangen haben und ohne die mir dieses Projekt nicht halb so viel Spaß gemacht hätte. Namentlich erwähnen möchte ich Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp, PD Dr. Christian Kellner sowie Dr. Anna Kretschmer für die kleinen Flurgespräche, wissenschaftlichen Ratschläge und dem freundschaftlichen Miteinander – unsere traditionellen Kieler Woche „After-Labs“ werden stets mit meiner Laborzeit in Erinnerung bleiben. Ich danke auch den technischen Assistentinnen Fr. Christyn Wildgrube und Yasmin Claußen dafür, dass ihr immer da wart, wenn es brannte.

Ein nicht zu ermessender Dank gilt Herrn Dr. Thies Rösner. Thies, du warst in all den Jahren mein Mentor, stetiger Begleiter, mein Motivations- und Impulsgeber, mein Mentor, und vor allem auch Freund. Unsere regelmäßigen, bereichernden Diskussionen im Rahmen deiner Feierabendzigarette werde ich nie vergessen. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht ansatzweise möglich gewesen. Vom ersten Tag hast du

## Danksagung

mich an die Hand genommen und mich zielsicher bis ans Ende begleitet. Ich freue mich darauf, unseren wissenschaftlichen Austausch auch in Zukunft fortzusetzen.

Für den privaten Rückhalt in all den Jahren danke ich zuallererst meinen Eltern, welche mich von Anfang an in meinem Vorhaben unterstützt haben und es mir ohne zu zögern ermöglicht haben, ein Freisemester zu nehmen. Diese Arbeit widme ich meinem Vater, der leider nicht dabei sein kann, wenn diese Arbeit zu seinem Ende geführt wird. Ich danke meinen Kieler Freunden, denen man sich gegenseitig sein Leid geklagt hat, wenn es mal nicht gut lief. Danke für euer offenes Ohr und dass ihr mich immer wieder motiviert habt

## 9. Eigene Veröffentlichungen

Diese Arbeit ist Teil der wissenschaftlichen Veröffentlichung mit dem Originaltitel „*Immune effector functions of human IgG2 antibodies against EGFR*“.

Rösner T<sup>#</sup>, Kahle S<sup>#</sup>, Montenegro F, Matlung HL, Jansen JHM, Evers M, Beurskens F, Leusen JHW, van den Berg TK, Valerius T. *Immune effector functions of human IgG2 antibodies against EGFR*. Mol Cancer Ther 2019; 18:75-88.

# geteilte Erstautorenschaft

Weitere wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Treffers LW, Ten Broeke T, Rösner T, Jansen JHM, van Houdt M, Kahle S, Schornagel K, Verkuijlen PJH, Prins JM, Franke K, Kuijpers TW, van den Berg TK, Valerius T, Leusen JHW, Matlung HL. *IgA-mediated killing of tumor cells by neutrophils is enhanced by CD47-SIRP $\alpha$  checkpoint inhibition*. Cancer Immunol Res. 2020 Jan;8(1):120-130.

Abstract und Posterpräsentation auf der Studierendentagung der Life Science Nord, Kiel: Kahle S. *Effector functions of IgG2 antibodies*. 2017.