

Untersuchung der Expression, Wirkung und Hemmung von IL-3 mit humanen Leu- kozyten – Charakterisierung humanisierter IL-3 Antikörper



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Jan-Niklas Salewski

aus
Bochum

im Jahr
2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

10.06.2020

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Matthias Mack

Unterschrift:

Jan-Niklas Salewski

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Antikörperstruktur	1
1.2 Therapeutische Antikörper	3
1.3 Immunogenität therapeutischer Antikörper	6
1.4 Strategien und Probleme des CDR-Grafting	9
1.5 Das hämatopoetische Zytokin Interleukin-3 (IL-3)	12
1.5.1 Funktion von IL-3	12
1.5.2 Struktur des IL-3-Moleküls	14
1.5.3 Die Rolle des IL-3 bei Tiermodellen	15
1.5.4 Die Rolle des IL-3 bei Erkrankungen des Menschen	16
1.6 Charakterisierung eines humanisierten Antikörpers	17
1.6.1 Durchflusszytometrie	18
1.6.2 ELISA	19
1.6.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)	21
1.6.4 Dynamische Differentialkalorimetrie zur Schmelzpunktbestimmung	23
1.6.5 Oberflächenplasmonresonanzmessung zur Affinitätsbestimmung	24
2. Zielsetzung	28
3. Material	29
3.1 Geräte	29
3.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	30
3.3 Verbrauchsmaterialien	32
3.4 Stimulantien und Antikörper	33
3.5 FACS-Antikörper	35

3.6 Kits	36
3.7 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	37
3.8 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	37
3.9 Pufferzusammensetzung.....	38
3.10 Software	38
3.11 Zelllinien	39
3.12 Humane Proben	39
4. Methoden.....	40
4.1 Generelle Protokolle.....	40
4.1.1 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau.....	40
4.1.2 IL-3-Aktivitätsassay (FACS).....	40
4.1.3 ELISA-Protokolle	41
4.1.5 Intrazelluläres Färbeprotokoll.....	44
4.1.6 Extrazelluläre Färbung.....	45
4.1.7 Depletion von NK- und/oder T-Zellen	46
4.1.8 Größenausschlusschromatographie (SEC) mittels HPLC	47
4.2 IL-3-Effekte und seine Regulation	49
4.2.1 Regulation der IL-3-Rezeptoren CD123 und CD131	49
4.2.2 Regulation von CD131 durch IL-2.....	50
4.2.3 NK-Zell-Depletion	50
4.2.4 NK- und T-Zell-Depletion	50
4.2.5 Charakterisierung von IL-3 produzierenden T-Zellen.....	51
4.3 Strategie der Humanisierung von P8C11	52
4.4 Charakterisierung der humanisierten Variante 9 (V9)	54
4.4.1 Stabilitätscharakterisierung.....	54
4.4.2 Affinitätsbestimmung	56
4.4.3 Schmelzpunktbestimmung mittels VP-DSC.....	59

4.4.4 Epitopmapping.....	60
4.4.5 Bindungsspezifität des humanisierten Antikörpers	62
4.4.6 Bestimmung der Wachstumshemmung von IL-3 abhängigen TF1-Zellen	63
4.4.7 Blockade der Bindung von IL-3 an CD123 auf PBMCs.....	65
4.4.8 Unspezifische Wirkung von V9 auf Blutleukozyten	66
4.5 Herstellung und Charakterisierung von anti-idiotypischen Antikörpern von V9	67
4.5.1 Herstellung der anti-idiotypischen Antikörper	67
4.5.2 Bindung der anti-idiotypischen-Antikörper	67
4.5.3 IL-3-Effekte der anti-idiotypischen-Antikörper.....	69
4.5.4 Antikörper IL-3-Assay der anti-idiotypischen-Antikörper	69
4.6 Detektion von V9 aus humanem Blutplasma.....	70
4.7 Datenauswertung	71
5. Ergebnisse.....	72
5.1 IL-3-Effekte und seine Regulation	72
5.1.1 Regulation der IL-3-Rezeptoren CD123 und CD131 durch IL-3	72
5.1.2 CD131-Expressionsregulation auf Basophilen.....	74
5.1.3 Blockade der IL-3-Effekte	75
5.1.4 NK-Depletion	77
5.1.5 NK- und T-Zell-Depletion	78
5.1.6 Charakterisierung von T-Zellen.....	80
5.2 Entwicklung von V9	87
5.3 Charakterisierung von V9	90
5.3.1 Stabilitätscharakterisierung.....	90
5.3.2 Schmelzpunktbestimmung.....	101
5.3.3 Affinitätsbestimmung	103
5.3.4 Epitopmapping.....	105
5.3.5 Kreuzreaktivität	106

5.3.6 Wachstumshehmung von IL-3 abhängigen TF1-Zellen	107
5.3.7 Blockade der Bindung von IL-3 an CD123 auf PBMCs.....	108
5.3.8 Unspezifische Wirkung auf Blutleukozyten durch V9	109
5.4 Charakterisierung von anti-idiotypischen Antikörpern	114
5.4.1 Bindung der anti-idiotypischen Antikörper	114
5.4.2 IL-3-Effekte der anti-idiotypischen Antikörper	116
5.4.3 IL-3-Aktivitätsassay der anti-idiotypischen Antikörper.....	116
5.5 Detektion von V9 aus humanem Blutplasma.....	117
5.5.1 Theoretische Verteilung der Bindung von IL-3 an V9	117
5.5.2 Gemessene Werte der Konzentrationsbestimmung	119
6. Diskussion	122
6.1 Basophile reagieren höchst sensitiv auf IL-3.....	122
6.2 T-Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-2 induzierter IL-3-Produktion – NK-Zellen produzieren initial ebenfalls IL-3	124
6.3 Die T-Zell-Subpopulationen T _{hm} und T _{te} CD28 ^{hi} sind hauptverantwortlich für die IL-3-Ausschüttung	126
6.4 Die Humanisierung von P8C11 generierte die wirksame V9.....	128
6.5 V9 verfügt über eine hohe Stabilität	130
6.6 V9 verfügt über eine hohe Affinität, Spezifität und Effektivität	132
6.7 V9 besitzt keine unspezifischen Effekte auf Blutleukozyten	134
6.8 Die generierten anti-V9-Ak besitzen blockierende und nichtblockierende Bindungseigenschaften.....	135
6.9 Die Detektion von freiem und gesamtem V9 aus Plasma ist reproduzierbar möglich.....	136
7. Zusammenfassung und Fazit.....	139
Literaturverzeichnis.....	VIII
Danksagung.....	XVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau eines IgG-Antikörpers	2
Abbildung 2: Immunogenität therapeutischer Antikörper.	9
Abbildung 3: Generelle Strategie des <i>CDR-Graftings</i>	12
Abbildung 4: Struktur des IL-3-Moleküls (links) und der Typ I Zytokin-Rezeptorfamilie (rechts).....	14
Abbildung 5: Prinzip der Durchflusszytometrie	19
Abbildung 6: Verschiedene ELISA-Varianten	20
Abbildung 7: Prinzip der Größenausschlusschromatographie	22
Abbildung 8: Prinzipieller Aufbau eines SPR-Detektionssystems nach der Kretschmann-Konfiguration	25
Abbildung 9: Aminosäuresequenz des humanen IL-3	60
Abbildung 10: Regulation des IL-3-Rezeptors CD123 auf Blutleukozyten	72
Abbildung 11: Regulation des IL-3-Rezeptors CD131 auf Blutleukozyten.	73
Abbildung 12: CD131-Rezeptorregulation auf Basophilen durch Zytokine.	74
Abbildung 13: IL-3-Expression von humanen Blutleukozyten nach Zytokinstimulation.	75
Abbildung 14: CD131 Expressionsregulation durch IL-2 auf Basophilen.....	76
Abbildung 15: MACS-Check der CD56-Depletion.....	77
Abbildung 16: Von PBMCs ausgeschüttete Konzentrationen der Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- γ nach CD56-Depletion.	78
Abbildung 17: IL-3-Expression von PBMCs nach NK- oder T-Zell-Depletion.....	79
Abbildung 18: GM-CSF-Expression von PBMCs nach NK- oder T-Zell-Depletion....	80
Abbildung 19: Gating der T-Zell-Charakterisierung am Beispiel von CD8+ T-Zellen	81
Abbildung 20: IL-3+ unstimulierte T-Zellen.	82
Abbildung 21: Zellzahlen der IL-3+ T-Zellen nach anti-CD3-Stimulation.	84
Abbildung 22: Verteilung der IL-3+ T-Zellen innerhalb der Subpopulationen.....	85
Abbildung 23: ELISA der T-Zellen nach IL-2 und anti-CD3-Stimulation.....	86
Abbildung 24: Regressionsgerade der Kalibration der SEC.	91
Abbildung 25: Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der temperaturbehandelten V9-Proben anhand der Inhibition einer IL-3 induzierten Downmodulation von CD131 auf Basophilen.	92
Abbildung 26: IC50-Werte der temperaturbehandelten V9-Probe	93

Abbildung 27: SEC der Referenzprobe von V9.....	94
Abbildung 28: SEC der Probe von V9 75 °C.....	95
Abbildung 29: Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von gelagerten (RT und 4 °C) V9- Proben anhand der Inhibition einer IL-3 induzierten Downmodulation von CD131 auf Basophilen.....	98
Abbildung 30: IC50-Werte der in PBS oder Plasma gelagerten V9-Proben.....	99
Abbildung 31: Isothermale Stabilität von V9 (Originalläufe der VP-DSC-Software)	100
Abbildung 32: Normierter Lauf der Schmelzpunktbestimmung für V9	101
Abbildung 33: Originalfit der Schmelzpunktbestimmung von V9 aus Origin 7 der VP- DSC (bearbeitet).....	102
Abbildung 34: Kinetikfitting von V9 (Original aus Biacore).....	103
Abbildung 35: Affinitätsfitting von V9 (Original aus Biacore).....	104
Abbildung 36: Epitopmapping von V9.....	105
Abbildung 37: Kreuzreaktivität von V9	106
Abbildung 38: Wachstumshemmung von TF1-Zellen durch anti-IL-3-AK.	107
Abbildung 39: Blockade der IL-3-Bindung auf PBMCs durch V9.	108
Abbildung 40: Unspezifische Bindung von V9 auf Blutleukozyten.	109
Abbildung 41: CD11b-Expression nach V9-Inkubation	110
Abbildung 42: Zellzahlen nach Inkubation mit V9.	111
Abbildung 43: Gating der Populationen zur Untersuchung der Rezeptorregulation und Einfluss auf Proliferation durch V9.....	112
Abbildung 44: Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach V9-Inkubation...	113
Abbildung 45: Bindung der anti-idiotypischen Antikörper an V9 – ELISA 1.	114
Abbildung 46: Bindung der anti-idiotypischen Antikörper an V9 – ELISA 2.	115
Abbildung 47: IL-3-Effekte der anti-idiotypischen Antikörper.	116
Abbildung 48: IL-3-Aktivitätsassay der anti-idiotypischen Antikörper.....	117
Abbildung 49: Affinität des IL-2-Rezeptors.....	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug zugelassener monoklonaler Antikörper	4
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	29
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	30
Tabelle 4: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 5: Liste der verwendeten Stimulantien und Antikörper	33
Tabelle 6: Liste verwendeter FACS-Antikörper.....	35
Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits	36
Tabelle 8: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätzen	37
Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	37
Tabelle 10: Pufferzusammensetzung	38
Tabelle 11: Liste der verwendeten Software.....	38
Tabelle 12: Verwendete Proteine zur Kalibrierung der Gelsäule bei der HPLC	48
Tabelle 13: Durchgeführte Zyklen zur Affinitätsbestimmung.....	57
Tabelle 14: IC50-Werte der Varianten a – i.....	88
Tabelle 15: IC50-Werte der Varianten V1 und V2.....	88
Tabelle 16: IC50-Werte der Varianten V3 – V12.....	89
Tabelle 17: IC50-Werte der aufgereinigten und ungereinigten Antikörper	90
Tabelle 18: IC50-Werte der temperaturbehandelten V9-Proben.....	93
Tabelle 19: Ergebnisse der SEC der temperaturbehandelten Proben von V9	95
Tabelle 20: IC50-Werte der pH-behandelten V9-Proben	96
Tabelle 21: Ergebnisse der SEC der pH-behandelten Proben von V9	97
Tabelle 22: IC50-Werte der FTC-Proben von V9.....	97
Tabelle 23: Ergebnisse der SEC der FTC-Proben von V9.....	97
Tabelle 24: Ermittelte Affinitätswerte von P8C11-Chim und V9	104
Tabelle 25: Detektierte V9- (Bestimmung über ELISA gesamte Bindungsarme) und IL-3-Konzentrationen (Bestimmung über ELISA gebundene Bindungsarme)	120
Tabelle 26: Erwartete und tatsächliche Verteilung der Bindungsverhältnisse von V9 und IL-3.....	121

Abkürzungsverzeichnis

β_c	<i>β-common</i>
AAR	<i>Anti-antibody-response</i>
ABTS	<i>2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure</i>
ADA	<i>Anti-drug-antibody</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AK	<i>Antikörper</i>
ALL	<i>Akute lymphatische Leukämie</i>
AML	<i>Akute myelotische Leukämie</i>
Anti-ID	<i>Anti-idiotypic</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
AU	<i>Absorbance unit</i>
BPDCN	<i>Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>Complementarity determining regions</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
C _H X	<i>Constant heavy</i>
CIA	<i>Collagen-induced-arthritis</i>
C _L	<i>Constant light</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
Da	<i>Dalton</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNS	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EAE	<i>Experimentelle autoimmun Enzephalitis</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>Antigen binding fragment</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>

Fc	<i>Crystallisable fragment</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	<i>Framework region</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
FTC	<i>Freeze-Thaw-Cycle</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HACA	<i>Human-anti-chimeric-antibody</i>
HAHA	<i>Human-anti-humanized-antibody</i>
HAMA	<i>Human-anti-murine-antibody</i>
HCl	Salzsäure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
hGM-CSF	<i>Human granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HMW	<i>High-molecular weight</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-X	Interleukin-X
IRA	<i>Innate response activator</i>
k _a	Assoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid
k _d	Dissoziationskonstante
KD	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LMW	<i>Low-molecular-weight</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MS	Multiple Sklerose
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Multi-CSF	<i>multi colony-stimulating factor</i>

MW	<i>Molecular weight</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
PE	Phycoerythrin
PMT	<i>Photo multiplier tube</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance unit</i>
SDR	<i>Specificity-determining residues</i>
SEC	<i>Size-exclusion-chromatography</i>
SLE	Systemischer <i>Lupus erythematoses</i>
SNP	<i>Single nucleotid polymorphism</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
T _{reg}	T _{regulatory}
USA	<i>United States of America</i>
V(D)J	<i>Variable (V), joining (J), diversity (D) gene segments</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
V _H	<i>Variable heavy</i>
V _L	<i>Variable light</i>

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Antikörperstruktur

Antikörper stellen einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems des Menschen dar und sorgen mit ihrer spezifischen Bindung von Fremdstoffen dafür, dass der Mensch auf Pathogene und sonstige Fremdkörper reagieren kann. Insgesamt kommen im menschlichen Körper fünf verschiedene Antikörperklassen (Immunglobuline) vor (Immunglobulin (Ig) A, D, E, G, M) [1].

Die am häufigsten vorkommende Antikörperklasse ist das IgG, welche über eine molekulare Masse von ca. 150 kDa verfügt. In seiner Grundstruktur ist IgG aus zwei identischen schweren, sowie zwei identischen leichten Ketten aufgebaut. Die leichten Ketten können unterteilt werden in Kappa (κ) und Lambda (λ), abhängig von ihrem Kodierungsort (κ auf Chromosom 2 und λ auf Chromosom 22). Allerdings besteht ein Antikörper immer aus Ketten desselben Typs leichter Ketten [2, 3].

Ebenfalls existiert innerhalb des Antikörpers eine Gelenkregion („*hinge*“), in welcher die schweren Ketten über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Je eine leichte und schwere Kette sind auch über eine Disulfidbrücke verbunden. Mit Hilfe der Enzyme Papain oder Pepsin lässt sich der Antikörper in funktionelle Untereinheiten aufspalten. Papain spaltet den Antikörper oberhalb und Pepsin unterhalb der Disulfidbrücken der „*hinge*“-Region. Im Falle des Papains erhält man zwei Fab-Fragmente (*antigen-binding-fragment*), welche spezifisch das Antigen binden und ein Fc-Fragment (*crystallisable-fragment*), welches für die Bindung an natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und phagozytierende Zellen zuständig ist [4].

Zudem lassen sich sowohl schwere als auch leichte Ketten in mehrere Domänen unterteilen. Leichte Ketten bestehen aus einer variablen Domäne (*variable light*, V_L) und einer konstanten Domäne (*constant light*, C_L) und schwere Ketten aus einer variablen Domäne (*variable heavy*, V_H) und drei konstanten Domänen (*constant heavy*, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) [5].

An der Bindung eines Antigens durch den Antikörper sind lediglich die variablen Domänen der leichten und schweren Kette beteiligt. Innerhalb der variablen Domänen liegen vier Frameworkregionen (FR1, FR2, FR3, FR4) vor, die in ihrer Aminosäuresequenz stark konserviert sind und nur eine geringe Variabilität aufweisen. Je zwei FR

umgeben eine der drei „*complementarity determining regions*“ (CDR1, CDR2, CDR3) und bilden so eine Gerüststruktur für diese. Die CDRs werden auch als hypervariable Regionen bezeichnet und weisen eine sehr hohe Sequenzvariabilität auf. Sie bilden Schleifen aus und treten direkt mit den Antigenen in Kontakt. Dies begründet die Fähigkeit des Antikörpers Antigene zu binden. Teile der FR (insbesondere FR3) unterstützen die Antigenbindung. Der vom Antikörper gebundene Bereich des Antigens wird auch als Epitop bezeichnet [6, 7].

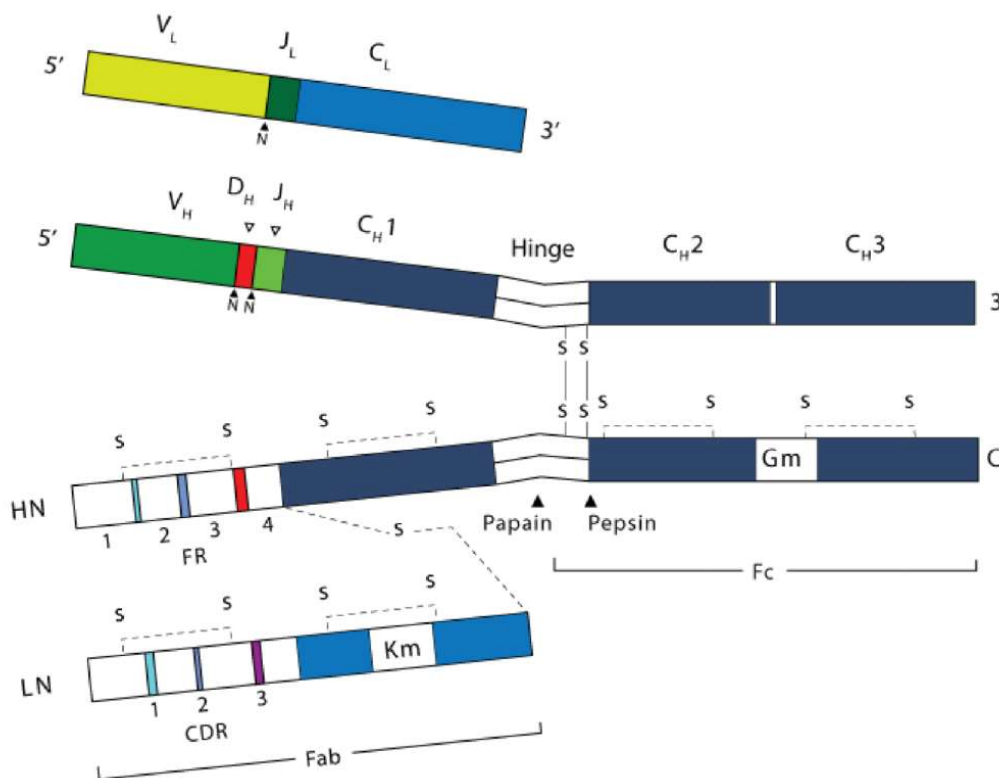


Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau eines IgG-Antikörpers [5]

Die hohe Sequenzvariabilität der variablen Regionen entsteht durch die V(D)J-Umlagerung. Die Sequenzen für die entstehenden variablen Regionen der Antikörper sind nicht fest im Genom kodiert, sondern entstehen aus der Kombination verschiedener V-Segmente, D-Segmente und J-Segmente, welche im Genom kodiert sind (Die genaue Anzahl variiert dabei je nach Quelle). Die variable Domäne einer leichten Kette besteht aus einem V- und J-Segment und die einer schweren aus einem V-, D- und J-Segment. Im Laufe der Antikörperentwicklung werden die Segmente durch somatische Rekombination zufällig zu einer variablen Domäne zusammengefügt, sodass sich ca. 10^6 verschiedene Möglichkeiten ergeben. Die Anzahl der möglichen Antikörper wird außerdem durch die Kombination von verschiedenen leichten und schweren Ketten,

der Sequenzvariabilität an den Verknüpfungsstellen der Segmente und somatische Mutationen auf 10^{11} erhöht [8].

Durch die hohe Sequenzvariabilität der Antikörper ist das menschliche Immunsystem in der Lage, gegen nahezu jeden Fremdstoff eine Immunreaktion auszulösen. Antikörper werden von B-Zellen gebildet. Während einer Immunantwort werden verschiedene Antikörper gebildet, welche gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, jedoch unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen. Eine B-Zelle bzw. Klon einer B-Zelle bilden hierbei immer identische Antikörper, welche gegen ein spezifisches Epitop des Antigens gerichtet sind. Aufgrund der Tatsache, dass sie vom selben Klon stammen, werden solche Antikörper als monoklonal bezeichnet. Die Gesamtheit aller Antikörper gegen ein Antigen stammt von verschiedenen B-Zellen und ist polyklonal [5].

Die Tatsache, dass gegen sämtliche Stoffe (auch körpereigene z.B. bei Autoimmunerkrankungen) Antikörper gebildet werden können und lediglich einige Aminosäuren (CDRs + einige FR) zur Antigenbindung notwendig sind, hat Antikörper zu einer vielversprechenden Option bei der Therapie von Krankheiten gemacht.

1.2 Therapeutische Antikörper

Ziel einer Therapie sollte immer die Behandlung der Symptome bzw. der Krankheit sein, unter Auftreten von möglichst wenigen Nebenwirkungen. Oftmals ist dies aufgrund fehlender Therapiealternativen nicht möglich. Deshalb werden bei bakteriellen Infektionen Breitbandantibiotika verschrieben, welche nicht nur die Pathogene abtöten, sondern darüber hinaus ebenfalls nützliche Mikroorganismen der Darmflora [9]. Insbesondere bei verschiedenen malignen Erkrankungen und Leukämien bleibt als *ultima ratio* häufig der Einsatz von Zytostatika, welche zwar effektiv gegen die sich schnell teilenden malignen Zellen wirken, allerdings auch auf gesunde Zellen des Organismus und zu schweren Nebenwirkungen führen können [10]. Auch bei Autoimmunerkrankungen konzentriert sich die Behandlung der Symptome oft auf eine breite Reduktion der Immunantwort, ohne spezifisch die zugrundeliegende Problematik zu fokussieren.

Diesen Behandlungsmethoden ist gemein, dass sie nicht zielgerichtet gegen ein alleiniges Charakteristikum der Erkrankung sind, sondern ein breites Wirkungsspektrum besitzen und ebenfalls gesunde Strukturen oder förderliche Zellen negativ beeinflussen.

Aufgrund dessen wird seit Jahren die Entwicklung von zielgerichteten (*targeted therapies*) forciert, die charakteristische Eigenheiten von Krankheiten analysieren wollen und im Optimalfall nur an diesen Strukturen wirken. Ein unverzichtbares Werkzeug der „*targeted therapies*“ sind, aufgrund ihrer Spezifität gegen ein einzelnes Epitop, monoklonale Antikörper [11]. Den Grundstein zur Erzeugung monoklonaler Antikörper definierter Spezifität legten Köhler und Milstein, welche erstmals die zur Erzeugung notwendige Hybridomtechnologie beschrieben, bei welcher eine Myelomzelllinie mit B-Zellen verschmolzen wird [12].

Ausgehend von dieser Entdeckung hat sich die Technologie der Antikörperentwicklung in den letzten Jahren rasant entwickelt und mit Hilfe gentechnischer Methoden sind Modifizierungen der Stabilität, Spezifität und Affinität der erzeugten Antikörper möglich. Aktuell ist die Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper einer der am stärksten expandierenden Bereiche der Arzneimittelforschung [11, 13]. Alleine in den USA wurden durch die FDA (*Food and Drug Administration*) zwischen den Jahren 2015-2017 27 neue monoklonale Antikörper zugelassen [13]. In Deutschland sind es aktuell (Stand: 10.06.2020) 95 monoklonale Antikörper (inklusive Biosimilars) [14]. Eingesetzt werden die Antikörper zumeist bei der Therapie von Krebsbehandlungen, Autoimmunerkrankungen und der Vermeidung von Transplantatabstossungen. Auch die Entwicklung von Antibiotika mit gekoppelten Antikörpern zur zielgerichteten Behandlung von Pathogenen wird erwogen [9]. Die Zielstrukturen der Antikörper sind vielfältig und umfassen, neben Interleukinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, auch Oberflächenproteine auf den Zielzellen. Einige Beispiele sind in Tabelle 1 dargestellt [13]:

Tabelle 1: Auszug zugelassener monoklonaler Antikörper

Antikörper	Handelsname	Zielstruktur	Anwendung u.a.
Adalimumab	Humira	TNF- α	Rheumatoide Arthritis
Alemtuzumab	Lemtrada	CD52	Multiple Sklerose
Bevacizumab	Avastin	VEGF	Darm,-Brustkrebs
Cetuximab	Erbix	EGF-Rez.	Darmkrebs
Inotuzumab-Ozogamycin	Besponsa	CD22	B-Vorläufer-ALL

Ofatumumab	Arzerra	CD20	CLL
Reslizumab	Cinqaero	IL-5	Asthma
Rituximab	MabThera	CD20	Non-Hodgkin-Lymphom
Tocilizumab	RoActemra	IL-6-Rez.	Rheumatoide Arthritis
Trastuzumab	Herceptin	HER2/neu-Rez.	Brustkrebs
Ustekinumab	Stelara	IL-12/23	Plaque-Psoriasis

Soll ein monoklonaler Antikörper zur Behandlung einer Krankheit generiert werden, ist die Analyse des Mechanismus der zugrundeliegenden Krankheit elementar, um den Antikörper möglichst effektiv zu gestalten und den Angriffspunkt festlegen zu können. Ein grundlegender Wirkmechanismus besteht in der Aktivierung und Stimulierung der körpereigenen Immunantwort. Dieses Prinzip wird insbesondere bei der Therapie maligner Erkrankungen angewendet, weil bei diesen Erkrankungen meistens nur ein Zelltyp betroffen ist [11]. Hierbei bindet der Antikörper auf spezifischen Rezeptoren der Zielzellen und wird anschließend von körpereigenen Immunzellen detektiert, welche wiederum die markierten Zellen bekämpfen. Die Antikörper besitzen folglich keine eigene Wirkung, sondern wirken unterstützend durch Aktivierung körpereigener Zellen. Dieses funktioniert z.B. bei Rituximab, welches an CD20 auf B-Zellen bindet. Durch Induzierung von Apoptose, sowie der Aktivierung der „*complement-dependent cytotoxicity*“ (CDC) und „*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*“ (ADCC), kommt es zur Depletion der CD20+ B-Zellen bei Non-Hodgkin-Lymphomen [15].

Eine weitere indirekte Wirkweise kann über eine Konjugation mit einem Wirkstoff wie Ozogamycin erfolgen. Bei einem Antikörper wird der CD22-Antikörper Inotuzumab an Ozogamycin gekoppelt, welches ein Derivat des Calicheamicins ist. Dieses ist wiederum zelltoxisch. Eingesetzt bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) der B-Vorläuferzellen bindet der Antikörper spezifisch an das Oberflächenprotein CD22 der B-Zellen und wird im Anschluss in die Zellen aufgenommen, wo es zur Abspaltung des Calicheamicins kommt. Dieses führt zu Doppelstrangbrüchen der DNA und schließlich zur Apoptose, wodurch spezifisch die Zellen der ALL abgetötet werden können. Gegenüber der Standardbehandlung führt der Einsatz des Antikörperkonjugats zu einer

deutlich erhöhten Remission (73,8 % zu 30,9 %) [16]. Bei dieser Methodik wirkt der Antikörper lediglich als Marker um die toxische Wirkung an den richtigen Zellen zu entfalten, ohne selber eine Wirkung zu haben.

Der indirekten Wirkung von Antikörpern steht die direkte Wirkung grundlegend gegenüber. Die Wirkung beruht bei diesem Mechanismus auf der Blockade einer Rezeptor/Ligandeninteraktion [11].

Anders als bei malignen Erkrankungen existiert eine Vielzahl an Krankheiten, bei welchen die Symptomatik nicht auf einzelne Zelltypen beschränkt ist oder eine Depletion der Zellen nicht ohne schwerwiegende Nebenwirkungen möglich ist. Diese Krankheiten werden häufig durch proinflammatorische Zytokine aktiviert und aufrechterhalten, sodass der Ansatzpunkt der Therapie die Blockade der Zytokineffekte ist.

Auch beim Zytokin Interleukin-3 (IL-3) besteht der Verdacht, dass einige Krankheiten durch IL-3 hervorgerufen werden, allerdings keine alleinige Zellpopulation depletiert werden kann, sodass ein blockierender Antikörper sinnvoll erscheint (IL-3 siehe 1.5). Beispiele für eine funktionierende Therapie durch blockierende Antikörper sind z.B. Reslizumab und Adalimumab. Reslizumab bindet an das dem IL-3 verwandten IL-5, welches ein Wachstumsfaktor für eosinophile Granulozyten (zukünftig Eosinophile genannt) darstellt. Durch die Blockade der Bindung von IL-5 an seinen Rezeptor wird die Anzahl an Eosinophilen reduziert, wodurch die Schwere des Asthmas gelindert werden kann [17]. Der Antikörper Adalimumab bindet an TNF- α und verhindert die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und wird unter anderem bei rheumatoider Arthritis angewendet, wo es zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheit kommt [18].

1.3 Immunogenität therapeutischer Antikörper

Als Immunogenität bezeichnet man die Eigenschaft eines Stoffes eine Immunreaktion beim Menschen hervorzurufen. Klassischerweise werden therapeutische Antikörper meistens durch die Immunisierung von Mäusen mit dem gewünschten Target generiert. Die auf diese Weise erzeugten Antikörper weisen zwar eine hohe Affinität zu ihrem Target auf, aber ebenfalls einen hohen Anteil an nicht-humanen Aminosäuresequenzen, wodurch es zur Entwicklung einer starken Abwehrreaktion kommen kann, welche als HAMA-Reaktion bekannt ist (*human-anti-mouse-antibody*). In Folge der HAMA-Reaktion können durch das Immunsystem „*anti-drug-antibodies*“ (ADA) gegen den therapeutischen Antikörper gebildet und seine Wirkung neutralisiert werden, was

in einem Versagen der Therapie resultieren kann. Allgemein werden solche Reaktionen auch als „*anti-antibody-response*“ (AAR) bezeichnet [19].

Zur Verringerung des Anteils der Immunogenität-vermittelnden murinen Aminosäuresequenzen wurden verschiedene Methoden beschrieben.

Einen ersten Schritt stellen chimäre Antikörper dar. Bei diesen werden, mit Hilfe rekombinanter DNS-Techniken, die Gene für die konstanten Regionen der leichten und schweren Ketten eines humanen Antikörpers mit den Genen der variablen Region eines Target-spezifischen murinen Antikörpers kombiniert. Die kombinierten Gene können durch Transfektion z.B. in eine murine Myelomzelllinie eingebracht und produziert werden [20]. Ein derartig generierter Antikörper ist zu etwa 70-75 % human und seine Immunogenität und Nebenwirkungen sind deutlich reduziert. Allerdings lassen sich auch bei chimären Antikörpern „*human anti-chimeric-antibody*“-Reaktionen feststellen (HACA) [11, 19].

Insbesondere die CDR-Regionen innerhalb der variablen Regionen eines Antikörpers machen seine Fähigkeit zur Antigenbindung aus. Jones et al. beschrieben erstmalig den Ansatz lediglich die CDR-Regionen eines murinen Antikörpers in ein humanes Antikörpergerüst zu übertragen, um einen humanisierten Antikörper zu generieren [21]. Die als „*CDR-grafting*“ bezeichnete Methodik führt beim Antikörper zu einer Reduktion seiner Immunogenität unter Beibehaltung seiner Spezifität. Jedoch führt die alleinige Übertragung der CDRs in ein humanes Antikörpergerüst oftmals zu einem Verlust der Affinität, sodass häufig zusätzlich Aminosäuren innerhalb der FR vom murinen Antikörper beibehalten werden müssen, da diese die richtige Bildung der hypervariablen „*loops*“ innerhalb des Antikörpers unterstützen können. Insgesamt erhält man mit dieser Methodik einen Antikörper der zu rund 90 % human ist [11, 22, 23].

Es wird angenommen, dass lediglich 20-33 % der Aminosäuren der CDRs tatsächlich an der Antigenbindung beteiligt sind [24]. Daher wurde eine weitere Verfeinerung des „*CDR-graftings*“ entwickelt, welches als „*SDR-grafting*“ (*specificity-determining residues*) bezeichnet wird. Bei dieser Methode werden nicht die gesamten CDRs übertragen, sondern nur die für die Antigenbindung essentiellen Aminosäuren innerhalb der CDRs. Auch bei humanisierten Antikörpern kann es weiterhin zur Bildung von ADAs kommen und die zugrundeliegende Reaktion wird als HABA (*human anti-humanized antibody*) bezeichnet [19, 25].

Mittlerweile besteht die Möglichkeit vollständig humane Antikörper zu generieren. Mit Hilfe der *Phage-Display*-Technologie lassen sich große Antikörperbibliotheken erstellen und in kurzer Zeit die Bindung auf ein bestimmtes Antigen überprüfen. Bei dieser Technik werden für Antikörper codierende Gene in den Genabschnitt eingebracht, welcher bei den Phagen für das Hüllprotein codiert. Dies hat zur Folge, dass der Phänotyp des resultierenden Antikörpers auf der Phagenoberfläche präsentiert wird und gleichzeitig der genetische Code für den Antikörper in dem Phagen vorliegt. An ein zu untersuchendes Antigen bindende Phagen werden vervielfältigt und der genetische Code des Antikörpers aus den Phagen isoliert [26, 27].

Ebenfalls ist dies mit transgenen Mäusen möglich, bei welchen die Gensequenzen, welche für Antikörper codieren, durch humane Sequenzen ersetzt wurden. Eine Immunisierung der Maus mit einem Antigen führt zur Produktion eines 100 % humanen Antikörpers [28]. Auch Antikörper, die ausschließlich humane Aminosäuresequenzen enthalten, können eine Immunogenität aufweisen [19].

Erstmals postuliert wurde dies durch Jerne et. al im Jahre 1974 mit seiner „*Network theory of the immune system*“. Aufgrund der enormen Variabilität des humanen Immunsystems und seiner Anpassungsfähigkeit, können auch die neu generierten CDR/SDR-Regionen eines therapeutischen Antikörpers, welche sich gegen körpereigene Strukturen richten und daher ursprünglich nicht im Organismus vorkommen, fremd für das Immunsystem des Patienten erscheinen [29].

Problematisch für den Therapieerfolg ist hierbei, dass insbesondere die charakteristischen variablen Regionen eines Antikörpers, welche auch als Idiotyp bezeichnet werden, als fremd erkannt werden. Daher unterscheidet man zwischen ADAs, welche nicht anti-idiotypisch sind und die Aktivität des Antikörpers nicht beeinflussen und ADAs die gleichzeitig „*anti-idiotypic*“ (anti-ID) - Antikörper sind und die Wirkung des Antikörpers neutralisieren. Die Rate der gebildeten ADAs schwankt stark abhängig vom Humanisierungsgrad und therapeutischen Antikörper zwischen 0 und 44 % [30]. Hwang et al. werteten verschiedene Quellen aus und stellten sowohl Antikörper mit 0 % als auch welche mit 100 % fest [19]. Entscheidend ist der Anteil an anti-ID-Antikörpern.

Bei Adalimumab stellten van Schouwenburg et al. fest, dass alle detektierten ADA auch neutralisierend wirkten [31]. Neueste Ansätze versuchen daher die Bildung von anti-IDs durch Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz zu vermeiden.

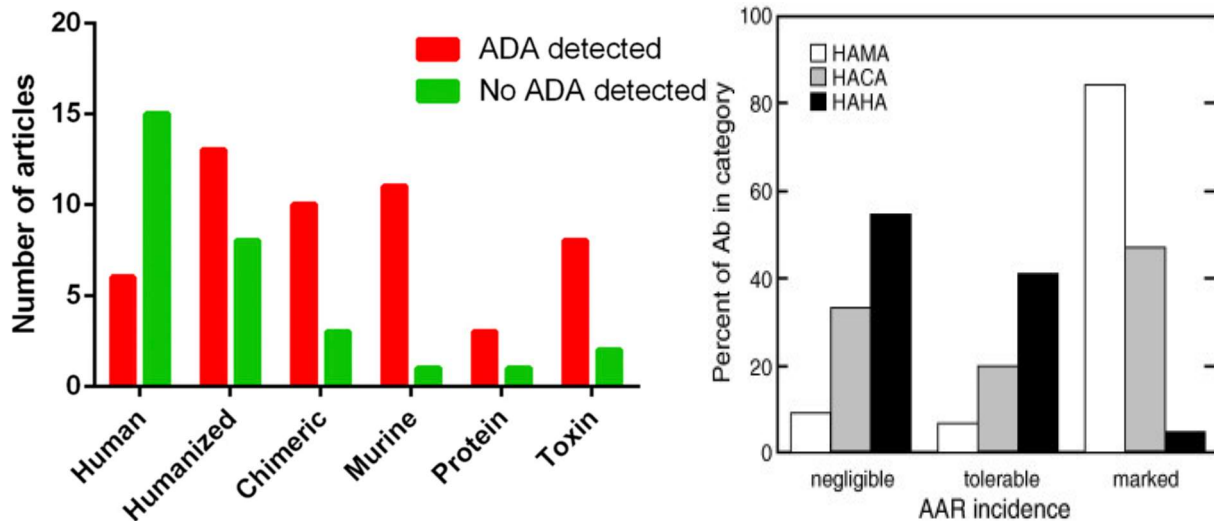


Abbildung 2: Immunogenität therapeutischer Antikörper

Links: Anzahl an publizierten ADAs bei therapeutischen Biologicals [32], rechts: Anzahl und Schwere an AAR [19]

Wie in Abbildung 2 dargestellt konnten van Brummelen et al. eine abnehmende Häufigkeit an gebildeten ADAs mit zunehmender Humanisierung feststellen [32]. Allerdings kommen weitere Untersuchungen auch zu anderen Ergebnissen. Hwang et al. konnten eine deutliche Reduktion der Immunogenität zwischen chimärisierten/humanisierten Antikörpern im Vergleich zu murinen Antikörpern feststellen. Die reine Anzahl an AAR hingegen zwischen chimärisierten und humanisierten Antikörpern änderte sich kaum. Allerdings verringerte sich die Schwere der AAR und weniger AAR wurden als „marked“ kategorisiert (Abbildung 2, rechts) [19].

1.4 Strategien und Probleme des CDR-Grafting

In der Theorie werden durch humanisierte Antikörper, welche durch „*CDR-Grafting*“ generiert werden, Antikörper erhalten, die sowohl keine Immunogenität als auch eine gleichbleibende Affinität aufweisen. In der Praxis hingegen ist zwar eine Reduktion der Immunogenität zu beobachten, jedoch eine vollständige Vermeidung aufgrund der CDRs bei den meisten Antikörpern nicht zu erzielen (vergleiche 1.3). Auch ein Verlust der Affinität ist bei den meisten Antikörpern unumgänglich. Dieses hängt unmittelbar mit den die CDRs umgebenden Frameworkregionen (FR) zusammen, welche häufig direkt oder über indirekte Effekte (z.B. Stabilisierung der „loop“-Bildung) an der Bindung der Antigene beteiligt sein können. Aus diesem Grund ist die alleinige Übertragung der CDRs in ein humanes Antikörpergerüst meist nicht zufriedenstellend und

weitere Aminosäuren der FR müssen beibehalten werden. Allerdings vergrößert ein erhöhter Anteil an murinen Sequenzen das Risiko der Bildung von AAR [22, 23].

Das Design der variablen Regionen eines humanisierten Antikörpers ist ein entscheidender Prozess für die spätere Wirksamkeit des Antikörpers und hat zudem Einfluss auf die spätere Stabilität [33].

Aufgrund dieser Begebenheiten und weiterer Vorteile gegenüber anderer Methoden zur Generierung humaner Antikörper (kein Aufbau einer eigenen Phagenbibliothek notwendig, kostenintensive transgene Mäuse), wurde das „*CDR-Grafting*“ als Methode zur Humanisierung ausgewählt, welche im Folgenden genauer beschrieben werden soll.

In Abbildung 3 ist der grundlegende Ablauf der Entwicklung eines humanisierten Antikörpers dargestellt. Ausgehend von einem meist murinen monoklonalem Antikörper besteht der erste Schritt in der Klonierung und Sequenzierung der für die variablen Regionen codierenden cDNA (mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion) [34].

Als Zwischenschritt vor der Humanisierung wird meist ein chimärer Antikörper erzeugt. Mit diesem kann überprüft werden, ob die richtige funktionelle cDNA aus dem Mausantikörper isoliert wurde. Die ausgewählte konstante Region wird ebenfalls für alle humanisierten Varianten verwendet. Die variable Region wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen in einen Vektor eingebracht, welcher bereits die Sequenzen der konstanten Region enthält. Der Vektor enthält zudem einen CMV-Promoter und *Enhancer* (humane Cytomegalovirus) um die Transkription zu erhöhen. Weitere Bestandteile des Vektors sind Selektionsgene (z.B. Neomycin-Resistenz). Mit Hilfe des Vektors werden bevorzugt Säugetierzelllinien wie HEK (*human embryonic kidney*) oder CHO (*chinese hamster ovary*) transient transfiziert. Diese produzieren die chimären Antikörper [34, 35].

Bei zufriedenstellenden Ergebnissen folgt in einem nächsten Schritt die Humanisierung. Zunächst muss ein passendes humanes „*Framework*“ für die CDRs in der variablen Region ausgewählt werden. Mit Hilfe von Datenbanken werden humane variable Sequenzen ausgesucht, die mindestens 65 % Homologie mit den zugrundeliegenden murinen variablen Sequenzen aufweisen [35].

In einem nächsten Schritt wird versucht, ein Minimum an verbleibenden Mausamino-säuren zu erzielen. Mit Hilfe von verschiedenen 3D-Modellen und Homologiemodellen werden „*Numberings*“ der Aminosäuren hinsichtlich ihres Einflusses zur Ausbildung

und Aufrechterhaltung der Antigenbindung erstellt. Auf diese Art und Weise soll vorhergesagt werden, welche Aminosäuren potentiell durch humane Sequenzen ersetzbar sind und welche essentiell vom murinen FR verbleiben müssen [36]. Bekannte „*Numbering*“-Systeme sind unter anderem die Systeme nach Kabat [37], Chothia [38] und Martin [39].

Zu Aminosäuren, die nicht ersetzt werden sollten, zählen Aminosäuren, welche in unmittelbarer Nähe zu den CDRs liegen oder Wasserstoffbrückenbindungen mit ihnen ausbilden oder die aufgrund ihrer Lage wahrscheinlich direkt an der Bindung beteiligt sind. Aminosäuren hingegen, die atypisch für variable Regionen von humanen Antikörpern sind (vorkommend in unter 20 % aller Antikörper), sollten dringend ausgetauscht werden, da sie potentiell der Immunogenität förderlich sind. Weiter zu beachten sind mögliche Glykosilierungssignale im murinen Antikörper, welche potentiell zur Antikörperbindung beitragen könnten. Das Design der variablen Sequenz erfordert somit immer ein Abwägen zwischen Reduktion an murinen Aminosäuren/Verringerung der Immunogenität und eventuellem gleichzeitigem Verlust an Affinität. Oftmals ist eine schrittweise Humanisierung mit zwischenzeitlicher Überprüfung der Effekte auf Wirksamkeit zielführend. Auch andersherum ist eine Verbesserung mit Hilfe der Strategien des „*CDR-Graftings*“ möglich. Ausgehend von einem humanen Antikörper erzielten Sun et al. mit Hilfe von „*CDR-Grafting*“ auf ein humanes Grundgerüst eine höhere Thermostabilität und Affinität [34, 35, 40, 41]

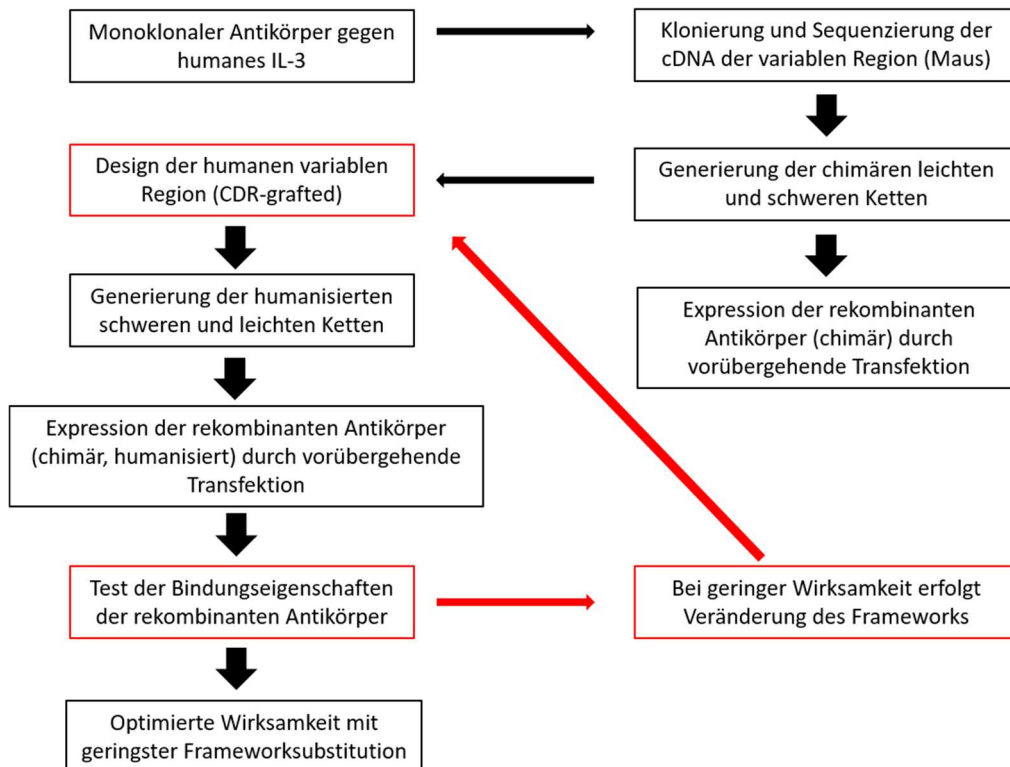


Abbildung 3: Generelle Strategie des „CDR-Graftings“. Angelehnt an [34]

1.5 Das hämatopoetische Zytokin Interleukin-3 (IL-3)

Die folgenden Abschnitte sollen zeigen, dass IL-3 vielfältige Effekte auf Blutleukozyten hat und deshalb bei verschiedenen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, aber auch nicht notwendigerweise im gesunden Organismus benötigt wird. Hierfür werden sowohl die IL-3-Produzenten als auch Träger des IL-3-Rezeptors und die Zellen auf welches es wirkt betrachtet. Zusammengefasst soll dieses verdeutlichen, weshalb die Generierung eines blockierenden IL-3-Antikörpers ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Therapie von Krankheiten sein könnte.

1.5.1 Funktion von IL-3

Humanes IL-3 gehört zu den hämatopoetischen Zytokinen und reguliert die Produktion und Funktion einer Vielzahl verschiedener hämatopoetischer Zellen, weswegen es auch unter dem Namen multi-CSF (*multi-lineage colony stimulating factor*) bekannt ist [42].

IL-3 wird von aktivierten T-Zellen gebildet. Insbesondere bei Entzündungen und durch Parasiten ausgelösten Infektionen findet eine vermehrte Ausschüttung von IL-3 statt [43-45]. Aktivierte immunregulierende Treg-Zellen produzieren ebenfalls IL-3 [46].

Neben T-Zellen sezernieren, durch ihren IgE-Rezeptor aktivierte, Mastzellen IL-3 in Folge allergischer Stimuli [47]. Weitere IL-3-Produzenten sind basophile Granulozyten (zukünftig Basophile genannt), welche sich zudem durch IL-3 autokrin stimulieren und „*innate response activator*“ (IRA) –B-Zellen [48, 49].

Aufgrund seines weiten Wirkspektrums an Zellen verfügt IL-3 über eine Vielzahl an immunmodulatorischen Effekten und hat Einfluss auf das Zellüberleben, Proliferation und Aktivierung. IL-3 wirkt auf hämatopoetische Vorläuferzellen und stimuliert die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen [50].

Insbesondere als Reaktion auf infektiöse und inflammatorische Stimuli spielt IL-3 eine wichtige Rolle. Es reguliert die Proliferation und das Überleben von Basophilen und Mastzellen. Die Aktivierung und Regulation ihrer Degranulierung erfolgt über die Bindung an den Oberflächenrezeptor CD123. Die ausgeschütteten Zytokine wie IL-4/IL-13 oder Histamin werden mit allergischen Reaktionen assoziiert [44, 51, 52]. Aufgrund der Sekretion von IL-3 durch Tregs, können Basophile nicht durch Tregs supprimiert werden [46].

In Kombination mit IL-4 aktiviert IL-3 Monozyten und fördert ihre Differenzierung in dendritische Zellen [53]. Darüber hinaus erhöht IL-3 das Überleben von Eosinophilen und ist notwendig für die Aktivierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (*plasmacytoid dendritic cells*, pDC) während einer viralen Infektion. Die Produktion von Typ I Interferonen durch pDCs hängt hierbei unmittelbar vom IL-3- und Interferon- (IFN)- λ -Signal ab [54, 55].

Insgesamt bewirken die Effekte von IL-3 eine Aufrechterhaltung der Immunreaktion, insbesondere durch die autokrine Wirkweise der Basophilen.

Trotz der zahlreichen Effekte des IL-3 auf die Entwicklung verschiedener Zellen, inklusive der hämatopoetischen Stammzellen, besitzen IL-3 defiziente Mäuse keinen auffälligen Phänotyp und IL-3 ist nicht notwendig für die Hämatopoese [56, 57].

1.5.2 Struktur des IL-3-Moleküls

IL-3 bildet zusammen mit humanem „*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*“ (GM-CSF) und humanem IL-5 die „ β -common“ (β c) Zytokinfamilie, welche Teil der Typ I Zytokinrezeptor-Superfamilie ist. Namensgebend für die β c-Zytokinfamilie sind heterodimere Oberflächenrezeptoren auf ihren Zielzellen, die aus einer für das Zytokin spezifischen α -Untereinheit und einer gemeinschaftlichen β c-Untereinheit aufgebaut sind (siehe Abbildung 4, rechts). Die α -Untereinheit des IL-3-Rezeptors (CD123) weist zwar eine hohe Spezifität für IL-3 auf, aber eine geringe Affinität ($K_D = 100$ nM), wohingegen die β c-Untereinheit (CD131) alleine keine Affinität zu IL-3 hat. Erst die Bildung des heterodimeren Rezeptors aus α - und β c-Untereinheit lässt die Affinität auf hohe $K_D = 100$ pM ansteigen. Dieser Umstand konnte bis jetzt nicht eindeutig erklärt werden [58-60].

Das humane IL-3 besteht aus 133 Aminosäuren und wird als kurzkettiges Zytokin, zugehörig zur helikalen Zytokinsuperfamilie, charakterisiert. Innerhalb des IL-3-Moleküls kommen vier α -Helices vor, die wiederum durch „*loops*“ untereinander verbunden sind (siehe Abbildung 4, links). Die biologische Aktivität des IL-3 und seine Bindung an β c wird insbesondere durch Glutamat an Position 22 in Helix A bestimmt. Zudem gibt es bekannte Mutationen (z.B. an Position 116 von Lysin zu Tryptophan), welche die Affinität des IL-3 gegenüber seinem Rezeptor verstärken können [60, 61].

Der IL-3-Rezeptor wird auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen, Basophilen und pDCs und einigen B-Zellen exprimiert [58].

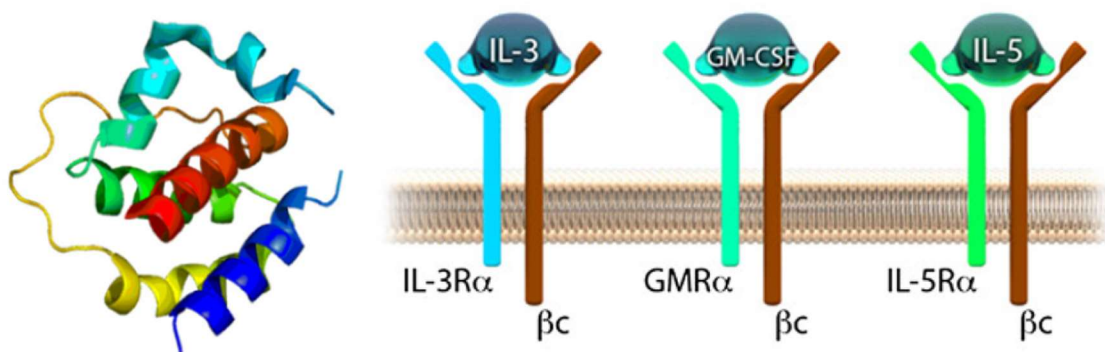


Abbildung 4: Struktur des IL-3-Moleküls (links) [62] und der Typ I Zytokin-Rezeptorfamilie (rechts) [63]

1.5.3 Die Rolle des IL-3 bei Tiermodellen

Durch Effekte auf eine Vielzahl von Zellen konnte ein Einfluss von IL-3 in mehreren Krankheitsmodellen aufgezeigt werden.

In einem Krankheitsmodell der allergischen Atemwegsentzündung entwickelten IL-3 defiziente Mäuse keine Überempfindlichkeit der Atemwege. Wurden jedoch aus Wildtypmäusen Basophile transferiert, welche durch IL-3 aktiviert wurden, kam es zur Überempfindlichkeit. Basophile hingegen aus IL-3 Knockout-Mäusen konnten aufgrund der fehlenden IL-3-Aktivierung keine Überempfindlichkeit hervorrufen [64].

In Modellen zur Hypersensitivität führte eine Blockade von IL-3 zu einer teilweisen Verbesserung von Kontakthypersensitivität bei Applikation von Trinitrochlorbenzol [65]. Die Depletion von IL-3 in Mäusen zeigte die Notwendigkeit von selbigem bei der Entstehung einer Hapten-spezifischen Kontakthypersensitivität [57].

In einem Modell der Lupusnephritis in MRL/lpr Mäusen konnten Renner et al. durch die Gabe von IL-3 eine Steigerung der Nierenfibrose, der Leukozyteninfiltration und der Ablagerung von Antikörpern aufzeigen. Eine Inhibition des IL-3 mittels eines blockierenden Antikörpers hingegen reduzierte die Schwere des Krankheitsverlaufs [66].

Studien im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Lee et al. konnten in einer kleinen Anzahl an Mäusen keinen signifikanten Einfluss von IL-3 auf die Autoimmunität erkennen, während Renner et al. eine erhöhte Infiltration von T-Zellen in das Gehirn und eine Verstärkung durch Injektion von rekombinanten IL-3 feststellen konnten, sowie eine Verbesserung bei Blockade oder genetischer Defizienz von IL-3 [67, 68].

Im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*, CIA) führte eine Applikation von IL-3 während der frühen Phase der Krankheit zur einer signifikanten Steigerung des Schweregrades der Entzündung und eine Blockade von IL-3 zur Verbesserung der Krankheitsparameter [69].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in einem Modell der akuten Sepsis IRA B-Zellen Hauptproduzenten von IL-3 gewesen sind, wodurch die Myelopoese verstärkt und ein Zytokinsturm ausgelöst wurde. Depletion oder Blockade von IL-3 schützte die Mäuse vor der Entwicklung einer Sepsis [70, 71].

1.5.4 Die Rolle des IL-3 bei Erkrankungen des Menschen

Einige der in Tiermodellen beobachteten IL-3-Effekte konnten bereits beim Menschen nachgewiesen werden.

Bei Patienten mit einer Sepsis war ein erhöhter IL-3-Plasmawert mit einem größeren Risiko des Organversagens und einer daraus resultierenden erhöhten Mortalitätsrate assoziiert. IL-3 könnte bei einsetzender Sepsis als prognostischer Biomarker dienen [71, 72].

Zudem konnte eine Korrelation zwischen einem „*single-nucleotid-polymorphism*“ (SNP) im Promoter von IL-3 und rheumatoider Arthritis festgestellt werden [73]. Auch bei 16 Patienten mit systemischer *Lupus erythematoses* (SLE) konnten im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten erhöhte Werte nachgewiesen werden [74].

Bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) erhöhte sich die IL-3-Expression durch T-Zellen signifikant, die während eines Schubes detektiert werden konnte [68].

IL-3 dient bei verschiedenen Formen der Leukämie (z.B. akute myeloische Leukämie (AML)) zudem als Wachstumsfaktor und bei der blastischen plasmazytoiden dendritischen Zellneoplasie (*blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm*, BPDCN) als Überlebenssignal. Darüber hinaus ist die Expression des IL-3-Rezeptors CD123 erhöht. Neueste Ansätze beschäftigen sich daher mit CD123 als Target für einen möglichen Therapieansatz [75-77].

1.6 Charakterisierung eines humanisierten Antikörpers

Innerhalb der letzten Jahre trugen monoklonale und humanisierte Antikörper eine immer entscheidendere Rolle bei der Behandlung verschiedenen malignen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen.

Ein Einsatz als Therapie erfordert jedoch eine vorherige genaue Charakterisierung und Validierung hinsichtlich entscheidender Eigenschaften. Diese lassen sich in drei große Gebiete unterteilen: die molekulare und strukturelle Charakterisierung, die Überprüfung der funktionellen Eigenschaften, sowie die Analyse der Effektorfunktionen [78, 79].

Für alle Gebiete haben sich im Verlauf der fortschreitenden Antikörpertechnologie standardmäßige Methoden zur Überprüfung etabliert. Mit aufkommender Genauigkeit der Massenspektrometrie ist diese zur standardmäßigen Methode der strukturellen Charakterisierung geworden. Hierzu zählen die Bestimmung der Primär-, Sekundär- und höheren Antikörperstrukturen, die Überprüfung des Glykosilierungsstatus und Heterogenität. Zur Überprüfung von möglichen Aggregationen und Fragmentierungen hat sich die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) als Standardmethode etabliert [79].

Die Überprüfung funktioneller Eigenschaften mittels zellbasierter und ligandbasierter Assays und Analyse der Effektorfunktionen (wie ADCC, CDC) umfasst Methoden wie *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance* SPR), Immunhistochemie, Western-Blot, Durchflusszytometrie, dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry* (DSC) und weitere [78-80].

Nur nach einer gründlichen Charakterisierung eines Antikörpers kann darüber entschieden werden, ob ein Einsatz bei einer Therapie möglich ist. Deshalb soll im Nachfolgenden der theoretische Hintergrund der für die Erstellung der vorliegenden Arbeit wichtigsten Methoden dargestellt werden, welche zur schlussendlichen Bewertung des Antikörpers geführt haben.

1.6.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Methode der Durchflusszytometrie ist die genaue Bestimmung der Anzahl an Zellen und ihre Charakterisierung bezüglich der Größe, Granularität, Expression von Oberflächenmarkern und Produktion intrazellulärer Zytokine aus Einzelzellsuspensionen möglich. Hierfür werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, welche an die für sie spezifischen Antigene auf den Zellen binden, weswegen die Methode auch als „*fluorescence activated cell sorting*“ (FACS) bezeichnet wird. Abbildung 5 zeigt den grundlegenden Aufbau des Messprinzips eines Durchflusszytometers. Das System lässt sich in das Flüssigkeitssystem, das optische System und das elektronische System unterteilen. Das Flüssigkeitssystem sorgt dafür, dass die in einer Trägerflüssigkeit enthaltenen Zellen einer Probe mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln und nacheinander durch Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen geführt und von diesen angeregt werden [81-83]. Je nach Aufbau kann ein Durchflusszytometer über bis zu sechs verschiedene Anregungslaser verfügen [84].

Das eigentliche Messprinzip der Durchflusszytometrie basiert auf dem optischen System und der Eigenschaft von Fluorochromen, Licht einer bestimmten Anregungswellenlänge zu absorbieren (Extinktion), um einen Teil als höherwelliges Licht zu emittieren (Emission). Nach Anregung wird für jede Zelle ein charakteristisches Fluoreszenzsignal erzeugt. Mittels Filter und Spiegel des optischen Systems werden die verschiedenfarbigen Anteile des Signals voneinander getrennt und durch „*photo multiplier tubes*“ (PMT) verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt (elektronisches System). Vom Licht des blauen Lasers mit der Anregungswellenlänge 488 nm werden zusätzlich das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bei 180° und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) bei 90° gemessen. Das FSC zeigt die Zellgröße an, während das SSC ein Maß für die Granularität der Zelle ist. Hierdurch lassen sich ohne Fluoreszenz z.B. in einer humanen Blutprobe, bereits erste Populationen voneinander abgrenzen (vergleiche Abbildung 5 rechts unten) [81-83].

Die Fluoreszenzsignale werden, wie das SSC, ebenfalls in einem Winkel von 90° gemessen. Die Intensität des Signals (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Fluorochroms und somit Anzahl der exprimierten Antigene durch die Zelle [81].

Bei der Charakterisierung von Antikörpern wird die Durchflusszytometrie insbesondere zur Bestimmung von Zytotoxizität (z.B. ADCC) der Antikörper verwendet. Hierfür werden klassische mit Aktivierung assoziierte Oberflächenmarker analysiert [78, 85].

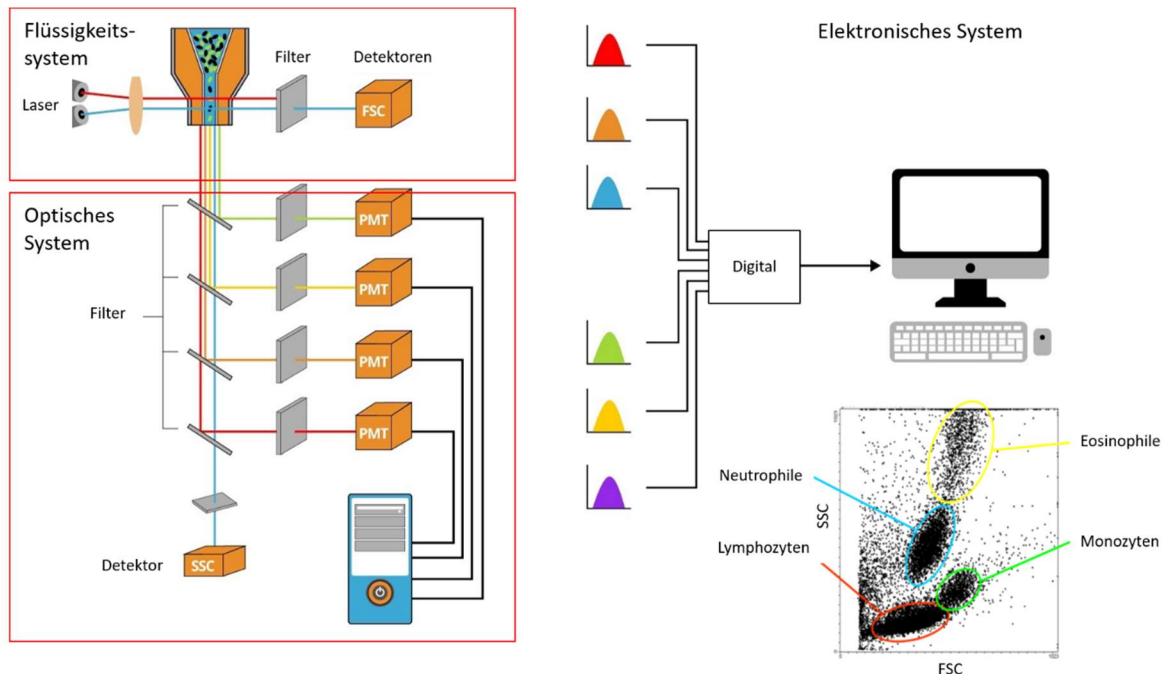


Abbildung 5: Prinzip der Durchflusszytometrie. Modifiziert nach [86]

1.6.2 ELISA

Beim ELISA handelt es sich um einen hochsensitiven Immunoassay, welcher sowohl den qualitativen als auch den quantitativen Nachweis eines Analyten ermöglicht.

Die Bindungsspezifität gegen den Analyten wird über einen spezifischen Antikörper vermittelt. Dieser Antikörper ist direkt oder indirekt mit einem Enzym gekoppelt, welches die Methode des Nachweises bestimmt und zu einer Amplifizierung des Signals führt. Durch Zugabe eines Substrats wird dieses durch das gekoppelte Enzym verstoffwechselt und in ein detektierbares Signal umgewandelt, welches kolorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch bestimmt werden kann. Beschrieben wurde die Methode erstmals 1971 [87, 88].

Eines der häufigsten gekoppelten Enzyme ist Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), welches die Reduktion von H_2O_2 katalysiert. Wird als Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugeben, wird das TMB über ein blaues Radi-

kalkation hin zu 3,3',5,5'-tetramethylbenzidindiimin oxidiert. Die Zugabe von Schwefelsäure stoppt die Reaktion und ändert die Farbe zu Gelb. Die Absorption kann dann bei 450 nm gemessen werden [89].

Durch den Aufbau eines ELISA mit einer Enzym-gekoppelten Reaktion misst die Methode nur indirekt die Antikörperbindung. Eine quantitative Aussage über die Menge des Analyten erfordert daher immer die gleichzeitige Messung eines Standards bekannter Konzentrationen [90].

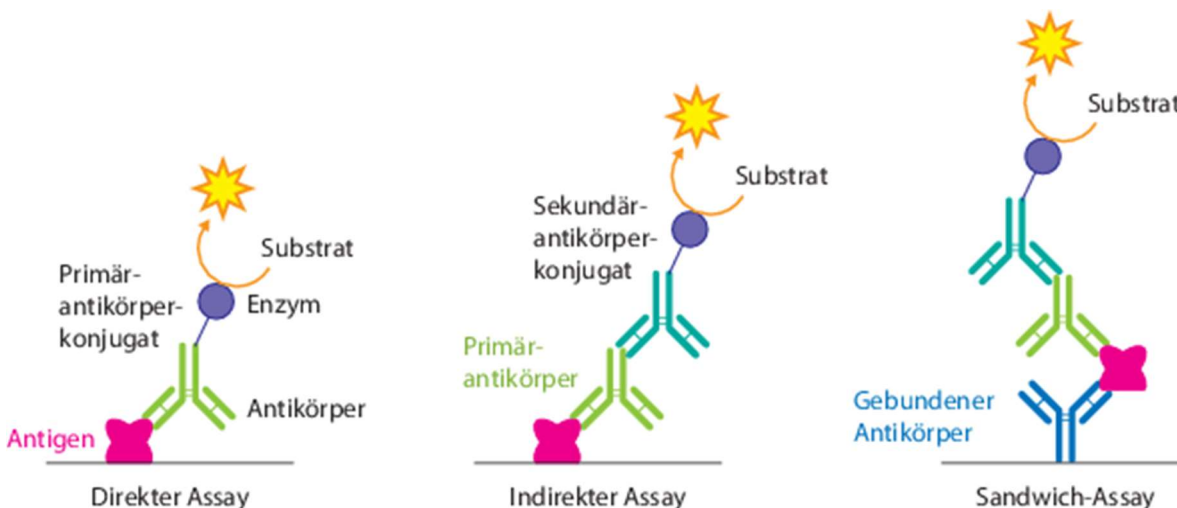


Abbildung 6: Verschiedene ELISA-Varianten [90]

Mittels eines ELISA sind je nach Fragestellung verschiedene Messmethoden möglich, welche in Abbildung 6 dargestellt sind. Die Zugabe des Analyten und der Antikörper erfolgt schrittweise. Zwischen den Schritten werden ungebundene Bestandteile durch Waschschritte entfernt. Man unterscheidet zwischen einem direkten Assay, bei welchem der gegen den Analyten gerichtete Antikörper direkt konjugiert ist und indirektem Assay, bei welchem der Antikörper selbst durch einen konjugierten Detektionsantikörper detektiert wird. Bei beiden Varianten wird der Analyt direkt auf einer Mikrotiterplatte passiv immobilisiert [88, 91].

Eine weitere Variante stellt der Sandwich-ELISA dar. Bei diesem werden zwei für den Analyten spezifische Antikörper verwendet, welche jeweils ein anderes Epitop des Analyten binden. Einer der beiden Antikörper wird auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert („Fängerantikörper“). Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit einer den Analyten enthaltenden Probe und abschließend die Inkubation mit dem zweiten Antikörper („Detektionsantikörper“). Der Detektionsantikörper kann direkt oder indirekt an ein Enzym gekoppelt sein [92].

Eine letzte Variante stellt der kompetitive ELISA dar, bei welchem nicht der Antikörper markiert wird, sondern ein zusätzliches, dem Analyten ähnliches, markiertes Antigen zugegeben wird. Analyt und Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen am Antikörper. Je stärker das detektierte Signal ist, desto weniger Analyt ist vorhanden [88, 91]. Bei der Antikörpercharakterisierung wird die Methode des ELISA insbesondere zur Bestimmung der Spezifität bzw. Ausschluss einer Kreuzreaktivität, der Detektion aus Proben und Bestimmung von ADAs und der Affinitätsbestimmung verwendet. Letzteres wird häufig durch die Methode der Oberflächenplasmonresonanz ersetzt [93, 94].

1.6.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC) ist die Auftrennung von Molekülen innerhalb einer Lösung hinsichtlich ihrer Größe möglich. Dies erfolgt in einer Säule, welche mit porösen Partikeln (100 – 250 µm) gefüllt ist und als stationäre Phase gilt. Häufig verwendete Stoffe sind Dextran, Agarose oder auch quervernetzte Polyacrilamide. Wird die Säule an ein automatisches SEC-System angeschlossen, sorgt eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC)-Pumpe dafür, dass die Säule von der mobilen Phase mit einer konstanten Flussrate durchströmt wird. Die mobile Phase besteht aus einem Laufpuffer und enthält die aufzutrennende Molekülprobe [95, 96].

Die Trennleistung der Säule soll einzig auf der Größe und nicht den chemischen Eigenschaften der Moleküle basieren, sodass eine Bindung der Moleküle an die stationäre Phase unbedingt ausgeschlossen werden muss, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden.

Das Trennprinzip der SEC ist in Abbildung 7 dargestellt. Nach Einströmen der Probe (A) wandern die Moleküle durch die Säule (B-C). Hierbei stehen den Molekülen, abhängig von ihrer Größe, unterschiedliche Volumina zur Verfügung. Große Moleküle können nicht in die Poren der Beads eindringen und ihnen steht nur das Volumen außerhalb der Beads als Strömungsweg zur Verfügung. Sie eluieren somit schneller als kleine Moleküle, welche in die Poren der Beads strömen können. Ihnen steht neben dem Volumen des Raumes außerhalb der Beads auch das Volumen innerhalb der Beads zur Verfügung, wodurch sich ihre Retentionszeit in der Säule verlängert (D) [97]. Jede Säule besitzt eine charakteristische „Cut-off“-Größe. Diese gibt die maximale Größe eines Moleküls an, bei der noch ein Eindringen in die Poren der Beads möglich

ist. Alle Größen darüber eluieren ungehindert als V_0 , dem „Void“-Volumen, welches das minimale Retentionsvolumen darstellt. Das maximale Retentionsvolumen wird als „Total“-Volume (V_T) bezeichnet und gibt die größte Molekülgröße an, bei welcher ein Eindringen in alle Poren der Beads möglich ist. Die Säule muss entsprechend der Fragestellung und der erwarteten Molekülgrößen so gewählt werden, dass die Elutionsvolumina V_E der Bestandteile der Probe zwischen V_T und V_0 liegen. Mittels SEC wird nicht direkt die Molekülgröße gemessen, sondern lediglich die Verweildauer innerhalb der Säule. Daher ist immer ein Kalibrierlauf mit Molekülen bekannter Größe notwendig, um aus den Retentionsvolumina der Probe die resultierenden Molekulargrößen/Molekulargewichte zu bestimmen. Darüber hinaus wird bei Proteinen die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm in „Absorbance units“ (AU) gemessen um die prozentuale Verteilung der einzelnen Fraktionen ermitteln zu können [95, 98, 99].

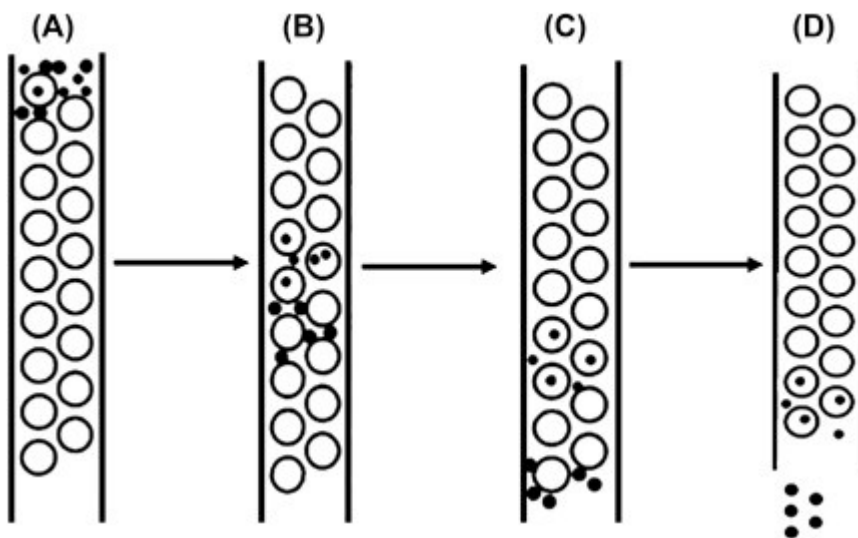


Abbildung 7: Prinzip der Größenausschlusschromatographie [97]

Innerhalb der Antikörpercharakterisierung wird die SEC zur Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Die häufigste Anwendung bei therapeutischen Antikörpern bleibt jedoch die schnelle Bestimmung möglicher Antikörperaggregate oder Fragmentierungen des Antikörpers während des Produktionsprozesses. Dieses gibt Aufschluss über die Stabilität eines Antikörpers und ist wichtig, da zwar die Aktivität eines Antikörpers bestehen bleiben kann, aber die Aggregatbildung bei einer potentiellen Therapie eine verstärkte Immunreaktion auslösen könnte [100, 101].

1.6.4 Dynamische Differentialkalorimetrie zur Schmelzpunktbestimmung

Bei der dynamischen Differentialkalorimetrie (DSC) wird die Wärmekapazität einer Probe als kontinuierliche Funktion der Temperatur bestimmt. Zur Bestimmung wird ein Kalorimeter verwendet, welches über zwei Messzellen verfügt, eine Probenzelle und eine Referenzzelle. Die Probenzelle enthält eine Protein-Antikörperlösung und die Referenzzelle die identische protein-antikörperfreie Lösung. Wärmeenergie wird in beide Messzellen appliziert und es findet eine kontrollierte Temperaturerhöhung statt, während die Menge der aufgenommenen Wärme detektiert wird. Da beide Messzellen unterschiedliche Lösungen enthalten und das Protein Wärme absorbiert, insbesondere durch einsetzende Entfaltung, wird für beide Messzellen ein Temperaturdifferential erhalten, welches durch Sensoren detektiert wird. Um die Temperaturdifferenz zwischen den Messzellen zu kompensieren und um die gleichmäßige Aufheizrate zu gewährleisten, muss der Probenmesszelle mehr Energie zugeführt werden. Die notwendige Energie wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und zeigt direkt den Unterschied der Wärmekapazität an [102-104].

Mit zunehmender Entfaltung des Proteins steigen der Anteil an absorbierter Energie und die Differenz der Wärmekapazität bis zum Erreichen eines Maximums an. Danach fällt das Signal ab. Das Maximum zeigt die vollständige Entfaltung einer Domäne und wird auch als Schmelzpunkt T_m bezeichnet. Der Verlauf gilt für Proteine mit einer einzelnen Domäne [105].

Monoklonale Antikörper hingegen verfügen über mehrere Domänen und besitzen mehrere Schmelzpunkte. [33, 101].

Die Bestimmung der Schmelzpunkte stellt eine schnelle Möglichkeit dar, um eine Abschätzung der voraussichtlichen Stabilität des Antikörpers zu erhalten. Geringe T_m weisen auf eine unzureichende Stabilität hin und eine Änderung der Aminosäuresequenz sollte in Erwägung gezogen werden [33].

1.6.5 Oberflächenplasmonresonanzmessung zur Affinitätsbestimmung

Neben der inhibitorischen Aktivität und Spezifität eines therapeutischen Antikörpers gegenüber seinem Target, ist zudem seine Affinität von entscheidender Bedeutung für den erfolgreichen Einsatz.

Eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Affinität bei Antikörpern ist die Oberflächenplasmonenresonanzmessung (SPR). Gegenüber der Affinitätsmessung mittels ELISA bietet diese Methode den Vorteil, dass neben der Bindungsstärke (K_D , Affinität), auch separat die Assoziationskonstante k_a und die Dissoziationskonstante k_d in Echtzeit bestimmt werden, womit sich die Geschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Komplexbildung und sein resultierender Zerfall beurteilen lassen [106]. Ursprünglich wurde das Phänomen der SPR von Ritchie [107] beobachtet, jedoch zeigten erst die Arbeiten von Otto [108], Kretschmann und Raether [109] das Potenzial zur Anwendung bei biochemischen Analysen wie der Antikörpercharakterisierung auf. Die meisten heutigen SPR-Geräte (z.B. BIACORE, GE-Healthcare) arbeiten nach der Kretschmann-Anordnung, bei welcher im Gegensatz zur Otto-Anordnung kein Luftspalt zwischen Prisma und Metallfilm gelassen wird, sondern der Metallfilm direkt auf das Prisma aufgebracht wird [106].

Das Detektionsprinzip beruht auf dem Phänomen der Bildung von oszillierenden Plasmawellen durch freie Leitungselektronen an der Grenzfläche von leitenden Metallen wie z.B. Gold und einem Medium (z.B. Luft). Da gemäß dem Welle-Teilchen-Dualismus eine Welle auch Eigenschaften von Partikeln aufweist, werden diese Plasmawellen auch als Oberflächenplasmon bezeichnet [106, 110].

Trifft ein p-polarisierter Lichtstrahl auf die Grenzfläche zweier nicht absorbierender Medien wie ein Glasprisma und einen Puffer, so kann es in einem bestimmten Winkel zur Totalreflexion des eingestrahltten Lichtes kommen. Voraussetzung hierfür ist, dass Medium 1 (Prisma) einen höheren Brechungsindex aufweist, als Medium 2 (Puffer). Zwar wird sämtliches Licht reflektiert, jedoch erzeugen die eingestrahltten Photonen ein elektrisches Feld, welches mit zunehmender Distanz abgeschwächt und daher als evaneszentes Feld bezeichnet wird. Wird an der Grenzfläche der beiden Medien eine Schicht eines leitenden Materials wie Gold aufgebracht, dringt das Feld in die Schicht ein und kann dort Oberflächenplasmonen anregen, wodurch die evaneszente Welle

verstärkt wird. Zudem reicht das elektrische Feld, welches von den Oberflächenplasmonen generiert wird, bis zu 300 nm in den angrenzenden Puffer hinein und reagiert deshalb höchst sensitiv auf Veränderungen des Brechungsindexes des Puffers [106, 110].

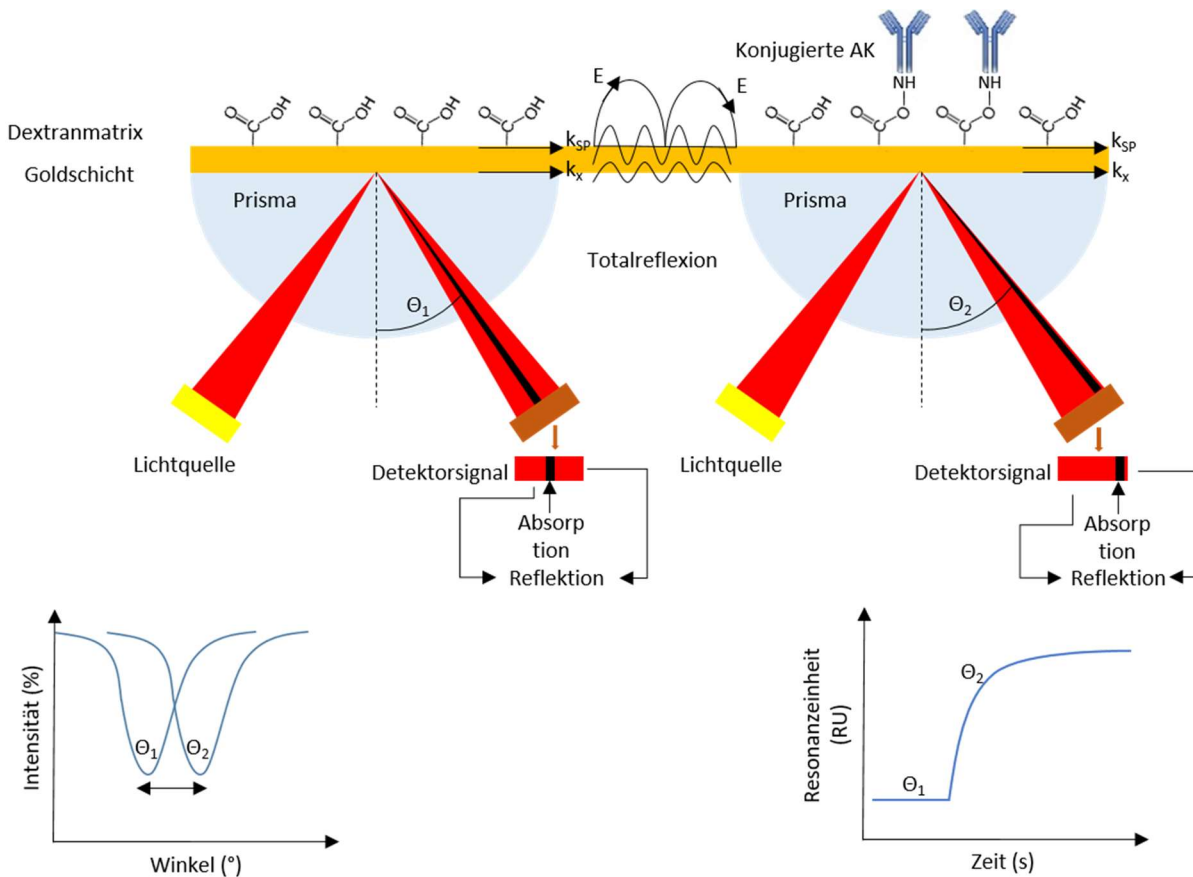


Abbildung 8: Prinzipieller Aufbau eines SPR-Detektionssystems nach der Kretschmann-Konfiguration

Im Winkel der Totalreflexion kommt es zur Oberflächenplasmonresonanz, bei welcher der Wellenvektor des durch die Oberflächenplasmonen erzeugten Feldes mit dem Wellenvektor des durch den Lichtstrahl erzeugten evaneszenten Feldes übereinstimmt.

$$k_x = k_{SP} \quad (1)$$

Dies hat zur Folge, dass die eingestrahnten Photonen in Oberflächenplasmonen umgewandelt werden und optische Energie auf die Goldoberfläche übertragen wird. Ge-

mäß dem Energieerhaltungssatz resultiert dieser Vorgang in einer Reduktion der reflektierten Lichtintensität, welche mit Hilfe eines Detektors gemessen wird. Folglich ist der Resonanzfall abhängig von:

$$k_x = k_0 \times n_{Prisma} \times \sin \theta \quad (2)$$

$$k_{SP} = k_0 \sqrt{\frac{n_{Metall} \times n_{Puffer}}{n_{Metall} + n_{Puffer}}} \quad (3)$$

mit:

$$k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (4)$$

Hierbei sind λ die Wellenlänge des eingestrahltten Lichts, $\sin \theta$ der eingestrahltte Winkel des Lichts und n die Brechungsindizes der verschiedenen Medien. Bei den Parametern n_{Metall} bzw. n_{Gold} und n_{Prisma} handelt es sich um konstante Werte. Darüber hinaus wird zudem die Wellenlänge des Lichts konstant gewählt, sodass als Variablen der eingestrahltte Winkel des Lichts und der Brechungsindex des Puffers verbleiben [111].

Innerhalb einer Dextranmatrix können Antikörper kovalent gebunden werden. Die Dextranmatrix ist zudem auf der Goldschicht aufgebracht. Wie bereits zuvor erwähnt, reagiert das elektrische Feld der Oberflächenplasmonen höchst sensitiv auf Veränderungen innerhalb des Puffers und damit einhergehende Veränderungen des Brechungsindex. Wird ein Puffer, welcher das Target des Antikörpers enthält, über die sich auf dem Gold befindende Dextranmatrix mit gebundenen Antikörper geströmt, führt eine Bindung des Targets an den Antikörpern zu einer Zunahme der Schichtdicke und somit zu einer Veränderung des Brechungsindex des Puffers und des Wellenvektors der Oberflächenplasmonen. Dies hat zur Folge, dass der Winkel, in welchem die Totalreflexion stattfindet und somit der Wellenvektor des eingestrahltten Lichts gleich dem der Oberflächenplasmonen ist, sich verändert. Die Veränderung des Winkels kann unter Bezugnahme einer Referenzmesszelle, in welcher lediglich der verwendete Puffer ohne Target über die Dextranmatrix geströmt wird, in Echtzeit gemessen und in

Resonanzeinheiten (RU) angegeben werden [106, 110-112]. Hierbei entspricht eine RU einer Winkelveränderung von $0,0001^\circ$ bzw. einer Oberflächenkonzentrationsänderung von 1 pg/mm^2 . Die Veränderung der RU wird in einem Sensorgram dargestellt und erlaubt die Bestimmung der Assoziationskonstanten, Dissoziationskonstanten und dem resultierenden K_D -Wert, womit die Affinität eines Antikörpers genau bestimmt werden kann. Zudem ist auch die Bestimmung der Konzentration des gebundenen Targets möglich [112].

2. Zielsetzung

IL-3 ist ein wichtiger Regulator von Inflammationsprozessen und beeinflusst die Proliferation vieler Zellen der myeloiden Linie. Zudem stimuliert es Zellen zur Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Dies hat zur Folge, dass IL-3 einen erheblichen Anteil an der Entwicklung und dem Fortbestand bei entzündlichen Erkrankungen zu haben scheint. Beispielsweise ist die rheumatoide Arthritis durch eine erhöhte IL-3-Produktion charakterisiert. Ergebnisse aus Tiermodellen zu Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, *Lupus Nephritis* oder auch Sepsis haben gezeigt, dass eine Neutralisation von IL-3 zu einer Blockade des Krankheitsverlaufs oder zumindest zu einer Abmilderung dessen führt. Diese Beobachtungen machen IL-3 zu einem interessanten Ansatzpunkt bei der Therapie von entzündlichen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen beim Menschen.

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit ist es, aus einem murinen anti-human IL-3-Antikörper P8C11, humanisierte Antikörpervarianten zu erzeugen und diese hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität zu untersuchen, um die beste humanisierte Variante zu selektieren. Mittels eines entwickelten IL-3-Antikörper-Assays konnte während des Entwicklungsprozesses dieser Parameter überprüft werden und zur besten Variante führen.

Nach erfolgter Selektion der geeigneten humanisierten Variante sollte diese hinsichtlich ihrer Parameter charakterisiert werden. Hierzu zählten insbesondere die Affinität, Bindungsspezifität, inhibitorische Aktivität, Stabilität und nichtvorhandene Zytotoxizität gegenüber humanen Blutleukozyten, um eine mögliche therapeutische Anwendung in Betracht ziehen zu können.

Neben der Entwicklung und Charakterisierung einer humanisierten Variante von P8C11 stellte die Charakterisierung des Targets IL-3 einen weiteren thematischen Schwerpunkt dar. Die Regulation der IL-3-Produktion und seines Rezeptors, sowie der Einfluss von IL-3 auf die Blutleukozyten wurden mit Hilfe geeigneter Assays untersucht. Die IL-3-Produzenten sollten zudem hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker identifiziert und bestimmt werden.

Beide Themenschwerpunkte zusammen sollten abschließend zu einer schlüssigen Bewertung des Einsatzes der humanisierten Variante als möglicher Arzneimittelkandidat führen.

3. Material

3.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Laborgerät	Hersteller
ÄKTA micro	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Autosampler A-905	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Brutschränke	Thermo Fisher Scientific, Dreieich; Heraeus, Hanau
DSC System "Microcal-VP-DSC"	Malvern Pananalytical, Malvern, GB
DSC Entgasung "Microcal-Thermovac"	Malvern Pananalytical, Malvern, GB
Durchflusszytometer „FACS Canto II“	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop „Axiovert 25“	Zeiss, Jena
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Hamilton-Spritze (2,5 ml)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Magnetrührer „MR 3001“	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipetten „Transferpette“ (5-50µl, 2-200µl)	Brand, Wertheim
Microplate Reader „Infinite M200 PRO“	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate Washer "Wellwash Versa"	Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland
Neubauer-Zählkammer "Neubauer improved"	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
pH-Meter „HI2020 edge“	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrigen
pH-Sonde „HI11310“	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrigen

Pipettierhilfe „Accu-jet pro“	Brand, Wertheim
Pipette „Multipette plus“	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten “Pipetman” (P10,P20,P100,P200,P1000)	Gilson, Limburg-Offheim
Schüttelgerät „REAX 2000“	Heidolph, Schwabach
Schüttelgerät „Vortex Genie 2“	Scientific Industries, New York, USA
SPR System Biacore X100	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Sterilbank Jouan MSC 12	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Stickstofftank	German Cryo, Jüchen
Vakuummexsikator	Duran Group, Wertheim
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, München
Zentrifuge (Megafuge 16R)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg

3.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Chemikalien	Bezugsquelle
ABTS-Tabletten	Sigma Aldrich, Taufkirchen
AccuCheck Counting Beads für Durchflusszytometrie	Life Technologies, Carlsbad, USA
Antikörper-Puffer	Evitria AG, Zürich, Schweiz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Lysing Solution, FACS Clean, FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque TM PLUS	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Glycin-HCl (10 mM, pH 1,5)	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
MACS-Puffer	Selbst hergestellt, siehe Pufferzusammensetzung
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Permash (Intracellular Staining Permash Buffer)	BioLegend, San Diego, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Set)	BioLegend, San Diego, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Merck Millipore, Darmstadt

3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Abdeckfolie für Mikrotestplatten	Roth, Karlsruhe
Combitips 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Platte F96 Maxisorp	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kryoröhrchen (1ml)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kryoröhrchen CryoPure (1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
LD-Säulen	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach
Mikrotester Rundbodenplatte 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen	Roth, Karlsruhe
Petrischale (verschiedene Größen)	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettenspitzen ohne Filter (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettieraufsätze für „Multipette plus“	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometrie (5ml)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Reaktionsgefäße für Biacore X100 1,5 ml	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5; 2,0 und 5,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly 21G 200 mm	Sarstedt, Nümbrecht
SEC-Säule Superdex 200 Increase	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Sensorchip CM5-Protein A	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA

Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/Luhe
S-Monovette 7,5 ml Serum	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette 7,5 ml Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette 2,7; 9 ml EDTA KE	Sarstedt, Nümbrecht
Thermomixer "compact"	Eppendorf, Hamburg
VersaTouch Handschuhe	Ansell Europe, Brüssel, Belgien
Verschlusskappen für Biacore-Reaktionsgefäße	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
Zellkulturflaschen „Cellstar“ T25 und T75	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten „Cellstar“ Rundboden 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht

3.4 Stimulantien und Antikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten Stimulantien und Antikörper

Stimulantien und Antikörper	Bezugsquelle
Anti-APC-Beads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach
Anti-human CD3 (Klon OKT3)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Anti-idiotypische Antikörper (gegen Variante 9) 3F9 und 5F11	AG Mack, Regensburg; InVivo Biotech Services, Henningsdorf
Anti-PE-Beads	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach
ChromPure Mouse IgG, whole molecule	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
GM-CSF Antikörper, LEAF, rat-anti-mouse, Klon BVD2-23B6	BioLegend, San Diego, USA
HRP-conjugated AffinePure F(ab)2 goat-anti-human	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

IL-3 Antikörper, humanisiert anti-human, Variante a-i; Variante 1-8; 10-12	AG Mack, Regensburg; Evitria AG, Zürich, Schweiz
IL-3-Antikörper AK-13-HRP	AG Mack, Regensburg
IL-3 Antikörper, Variante 9, humanisiert anti-human (gereinigt und ungereinigt)	AG Mack, Regensburg; Evitria AG, Zürich, Schweiz
IL-3 Antikörper, mouse-anti-human, Klon P8C11	AG Mack, Regensburg; Evitria AG, Zürich, Schweiz
IL-3 Antikörper, chimär anti-human Klon P8C11-Chim (gereinigt und ungereinigt)	AG Mack, Regensburg; Evitria AG, Zürich, Schweiz
IL-3 Antikörper mouse-anti-human, Klon 4806	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-3 Antikörper mouse-anti-human, Klon 4815	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-3 Antikörper rat-anti-human, Klon BVD8-3G11	BioLegend, San Diego, USA
IL-3-Rezeptor alpha (CD123) Antikörper, mouse-anti-human, MAB301 (Kl. 32703)	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-3-Peptide	EZBiolab Inc., Parsippany, USA
InVivoMAb human IgG1 Isotypkontrolle	BioXCell, West-Lebanon, USA (Hölzel diagnostika, Köln)
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Mausserum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Mouse IgG1k isotype control (Klon MOPC-21)	BioXCell, West-Lebanon, USA (Hölzel diagnostika, Köln)
PE-F(ab)2 goat-anti-human IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Rabbit-anti-mouse-HRP (P0260)	DAKO A/S, Dänemark (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn)
Rekombinantes human GM-CSF	Peptotech, Hamburg
Rekombinantes human IFN- α 2	BioLegend, San Diego, USA
Rekombinantes human IL-2	Peptotech, Hamburg

Rekombinantes human IL-3	BioLegend, San Diego, USA
Rekombinantes rhesus IL-3	Biomol GmbH, Hamburg
Rekombinantes human IL-4	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-5	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-12 p70	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-15	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-18	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes human IL-23	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes human IL-27	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes human IL-35 Fc Chimär	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes IFN- λ 1-3 (IL-29, IL-28A, IL-28B)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes human TNF- α	Peprotech, Hamburg

3.5 FACS-Antikörper

Tabelle 6: Liste verwendeter FACS-Antikörper

Target	Fluorochrom (Kanal)	Klon	Hersteller
HLA-DR	FITC	L243	Biolegend
CD3	FITC	OKT3	eBioscience
	APC-Cy7	SK7	eBioscience
	APC	SK7	eBioscience
CD4	PerCP-Cy5.5 (PerCP)	RPA-T4	eBioscience
	V500	RPA-T4	BD Bioscience
CD8	APC eFluor 780 (APC-Cy7)	RPA-T8	eBioscience
	PE-Cy7	SK1	Biolegend
	PE-Cy7	M1/70	Biolegend
CD14	V500 (Amcyan)	M ϕ P9	BD Bioscience
CD16	PacificBlue	3G8	Biolegend
CD19	APC-Cy7	HIB19	Biolegend

CD28	PacificBlue	CD28.2	Biolegend
CD45RA	V500 (Amcyan)	HI100	BD Bioscience
	PE	CMSSB	eBioscience
CD116	FITC	4H1	Biolegend
CD123	PE-Cy5 (PerCP)	9F5	BD Bioscience
CD131	PE	1C1	Biolegend
CD203c	FITC	NP4D6	Biolegend
	PE	NP4D6	Biolegend
CD304	APC	12C2	Biolegend
CCR7	PE-Cy7	G043H7	Biolegend
IL-3	AK-13 PE-gelabeled		
GM-CSF	APC	BVD2-21C11	Biolegend
	PacificBlue	BVD2-21C11	Biolegend
IFN- γ	FITC	4S.B3	eBioscience

3.6 Kits

Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits

Kit	Bezugsquelle
ELISA-Kit „DuoSet“ GM-CSF, TNF α , IFN- γ	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-3 „Fluorokine“-Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Lightning-Link HRP Labeling Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching bei München
MTT-Zellproliferations-Assay-Kit	ATCC Bioproducts (LGC Standards GmbH), Wesel
SEC LMW Kalibrationskit	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
SEC HMW Kalibrationskit	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA

3.7 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Tabelle 8: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätzen

Zellkulturmedien und -zusätze	Bezugsquelle
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert 1h bei 56 °C)	PAA, Cölbe
L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

3.8 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Einfriermedium für PBMCs	40 ml iFCS, 20 % DMSO (10 ml)
Kulturmedium für PBMCs	500 ml RPMI Medium 1640, 10 % iFCS (55 ml), 1 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (5,5 ml)
Standardmedium für Blutinkubationen	500 ml RPMI Medium 1640
Medium für Verdünnungen mit IL-3	500 ml RPMI Medium 1640 + 10 % iFCS (55 ml)
Kulturmedium TF-1-Zellen	500 ml RPMI Medium 1640, 10 % iFCS (50 ml), 1 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (5,5 ml), 5,5 ml L-Glutamin, 5 ng/ml hIL-3

3.9 Pufferzusammensetzung

Tabelle 10: Pufferzusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS (für ELISA-Waschpuffer 1:10 verdünnt)	11,5 g Na ₂ HPO ₄ , 80g NaCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 2 g KCl (in H ₂ O)
Antikörperpuffer V9	PBS + 100 mM L-Arginin
Block- und Verdünnungspuffer für ELISA	1 % BSA in PBS
Block- und Verdünnungspuffer für ELISA mit anti-V9 Antikörpern	2 % BSA in PBS
Block- und Verdünnungspuffer für ELISA zur Detektion von V9 aus Plasma	2 % BSA in PBS + 0,05 % Tween 20
Laufpuffer für Biacore X100	Entgastes PBS + 0,05 % Tween 20
MACS-Puffer	0,5 % BSA in PBS + 2 mM EDTA
Waschpuffer für ELISA	0,05 % Tween 20 in PBS

3.10 Software

Tabelle 11: Liste der verwendeten Software

Software	Herausgeber
Biacore X100 Evaluierungssoftware 2.0.1	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA
FACS Diva Version 8.0.1.	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microplate Reader Software i-control TM	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2016	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, Redmont, USA
Origin 7	OriginLab Corporation, Northampton, USA

3.11 Zelllinien

Für die Versuche der Hemmung der Proliferation von IL-3 abhängigen Zellen wurde die TF-1-Zelllinie der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH verwendet.

3.12 Humane Proben

Für Versuche mit humanem Blut und/oder Plasma wurden Blutproben gesunder Spender verwendet. Diese wurden entweder im Labor entnommen und direkt verwendet (Blutproben/Serumproben) oder von Blutspendern aus der Transfusionsmedizin Regensburg erhalten (Plasmaspender).

4. Methoden

4.1 Generelle Protokolle

4.1.1 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau

Zur Zellzahlbestimmung wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet. Trypanblau ist ein polyanionischer Farbstoff, der ausschließlich von toten Zellen aufgenommen wird und dort an die Zellproteine bindet, sodass die Zellen unter dem Lichtmikroskop dunkelblau erscheinen. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran schließen den Farbstoff aus und erscheinen unter dem Lichtmikroskop weiß [113].

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer mit 10 µl der zuvor hergestellten Zellsuspension-Trypanblau-Verdünnung befüllt und anschließend alle vier Großquadrate ausgezählt (nur vitale Zellen). Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus dem Mittelwert aller vier Großquadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, dem Volumen der gesamten Zellsuspension, sowie dem Faktor 10^4 .

4.1.2 IL-3-Aktivitätsassay (FACS)

Der IL-3-Aktivitätsassay wurde standardmäßig zur Überprüfung der inhibitorischen Aktivität der verwendeten Antikörper durchgeführt. Insbesondere während der Entwicklung von P8C11-Chim hin zur besten Variante und zur Klassifizierung der Stabilität der besten Variante V9 unter verschiedenen Bedingungen (Lagerstabilität, Plasmastabilität etc.).

Zuerst wurde humanes IL-3 (Biolegend) in „*Roswell park memorial institute*“ (RPMI) 1640 (+10 % „*fetal calve serum*“, FCS) mit einer Konzentration von 0,8 ng/ml angesetzt -> IL-3 Ansatz genannt. Die standardmäßige Konzentration der zu untersuchenden Antikörper oder Antikörperproben betrug 40 µg/ml (angesetzt im IL-3-Ansatz). Anschließend erfolgte der Ansatz einer Verdünnungsreihe in 1:4-Schritten bis hin zu 1:4096 (in IL-3-Ansatz), sodass die Konzentration von 0,8 ng/ml IL-3 überall erhalten blieb. Danach wurden je 20 µl einer Probe (Doppelwerte) in ein FACS-Polystyrolröhrchen überführt, die Proben zugedeckt und für 1 h bei 37 °C im Brutschrank präinkubiert.

Nach Abschluss der Präinkubation schloss sich die Zugabe von je 60 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Vollblut zu allen Proben an. Erneut folgte eine Inkubation der Proben für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Durch die Zugabe des Blutes ergaben sich die finalen Konzentrationen für das IL-3 (0,2 ng/ml) und die Antikörper (10 µg/ml - 0,0024 µg/ml).

Nach Abschluss der Inkubation ist zu allen Proben 20 µl eines Antikörper-Mastermixes bestehend aus CD203c FITC (1:100), CD131 PE (1:100) und CD123 PE-Cy 5.5 (1:30) zugegeben und für 20 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert worden. Nachfolgend wurden alle Proben mit 4 ml Natriumchlorid (NaCl) (0,9 %) versetzt und die Polystyrolröhrchen für 7 min und 1800 „*revolutions per minute*“ (rpm) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und je 1 ml FACS-*Lysing-Solution* hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 10 min (im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT)). Nach Lyse der Erythrozyten folgte eine Zugabe von 3 ml „phosphatgepufferter Salzlösung“ (*phosphate buffered saline*, PBS) pro Probe und eine erneute Zentrifugation (7 min, 1800 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Proben mit Hilfe des BD FACS Canto 2 für 35 s auf dem Messmodus „*high*“ vermessen. Mit Hilfe der Software FACS Diva Software 8.0.2 erfolgte die Analyse der Daten. Die erzeugten Daten wurden mit Hilfe der Software „Excel 2016“ weiter ausgewertet. Die Auswertung fand auf Basis des Medians der CD131-Expression auf CD123+ Zellen (Basophile) statt. Die ermittelten Werte wurden benutzt um die Konzentration der Antikörper zu bestimmen, bei der eine 50 % Hemmung der IL-3-Wirkung erzielt werden konnte (IC50-Wert). Zusätzlich wurde die benötigte Konzentration als Vielfaches der benötigten Referenzkonzentration angegeben.

4.1.3 ELISA-Protokolle

Die folgenden ELISA wurden mit Hilfe der DuoSet-ELISA von R&D angefertigt. Hierbei wurden weitestgehend, mit Änderungen bezüglich der eingesetzten Volumina/Well, sowie Inkubationszeiten, die mitgelieferten Protokolle befolgt. Die vorgenommenen Anpassungen hatten keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit oder Verlässlichkeit der Ergebnisse.

GM-CSF, IL-6, TNF- α , IFN- γ

Die Inkubation mit dem „*Capture-Antibody*“ fand bei einer Verdünnung von 1:120 in PBS über Nacht bei RT in einer 96-Well-Platte statt (55 μ l/Well). Am nächsten Tag musste die Platte dreimal mit 300 μ l/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschschritt vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte → sämtliche weitere Waschschrte fanden in identischer Weise statt) und anschließend mit 1 % „*bovine serum albumin*“ (BSA) in PBS für 1 h bei RT geblockt (200 μ l/Well) werden. Es folgte ein weiterer Waschschritt. Danach wurden die Proben und Standards mit 55 μ l/Well aufgegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Bei den Proben erfolgte gegebenenfalls und bei den Standards immer eine Vorverdünnung mit 1 % BSA in PBS. Nachfolgend sind die Vorverdünnungen der Standards aufgeführt:

GM-CSF: → 1000 pg/ml → 1:145

IL-6: → 1000 pg/ml → 1:300

Tumornekrosefaktor (TNF)- α : → 1000 pg/ml → 1:135

IFN- γ : → 1000 pg/ml → 1:190

Von den Standards wurde jeweils eine 1:2 Verdünnungsreihe in 1 % BSA/PBS angefertigt (insgesamt 7 Werte). Zusätzlich wurde noch ein achter Wert zur Ermittlung des Blanks (1 % BSA/PBS) angefertigt.

Nach 2 h Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschritt. Die anschließende Inkubation des „*Detection-Antibody*“ (Verdünnung 1:60 in 1 % BSA/PBS) fand für 1 h bei RT statt (55 μ l/Well). Es schloss sich ein erneuter Waschschritt an. Jedes Well wurde mit 55 μ l Streptavidin-HRP (1:40 in 1 % BSA/PBS) für 20 min bei RT im Dunklen inkubiert und anschließend ein letztes Mal gewaschen.

Zur Detektion wurde als Substrat 100 μ l/Well TMB verwendet, welches im Mischungsverhältnis 1:1 aus den TMB Substraten A und B angemischt worden ist. Die Inkubationszeit betrug 20 min in Dunkeln. Um die Inkubation abzustoppen, erfolgte die Zugabe von 50 μ l/Well 12,5 % Schwefelsäure (H₂SO₄). Im Anschluss musste die Absorption mit Hilfe des Tecan-Mikroplattenreaders bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm bestimmt werden.

Der IL-3-ELISA wurde nicht mit Hilfe eines Kits von R&D durchgeführt, sondern wurde selbstständig entwickelt und optimiert.

IL-3

Als „*Capture-Antibody*“ wurde P8C11 mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet (in PBS). Die Inkubation fand über Nacht bei RT in einer 96-Well-Platte statt (55 µl/Well). Am nächsten Tag musste die Platte dreimal mit 300 µl/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschschritt vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte → sämtliche weitere Waschschrte fanden in identischer Weise statt) und anschließend mit 1 % BSA/PBS für 1 h bei RT geblockt (200 µl/Well) werden. Es folgte ein weiterer Waschschritt. Danach wurden die Proben und Standards mit 55 µl/Well aufgegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Humanes IL-3 (Biolegend) stellte den Standard dar und es erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe (1:2 Schritte) in 1 % BSA/PBS mit einer höchsten Konzentration von 500 pg/ml (insgesamt 7 Werte + Blank 1 % BSA/PBS).

Nach 2 h Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschritt. Die anschließende Inkubation des „*Detection-Antibody*“ (Klon 13.4.4-HRP mit 400 ng/ml in 1 % BSA/PBS) fand für 1 h bei RT statt (55 µl/Well). Abschließend wurde erneut gewaschen.

Zur Detektion wurde als Substrat 100 µl/Well TMB verwendet, welches im Mischungsverhältnis 1:1 aus den TMB Substraten A und B angemischt worden ist. Die Inkubationszeit betrug 20 min in Dunkeln. Um die Inkubation abzustoppen, erfolgte die Zugabe von 50 µl/Well 12,5 % H₂SO₄. Im Anschluss musste die Absorption mit Hilfe des Tecan-Mikroplattenreaders bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm bestimmt werden.

4.1.4 Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden Blutkegel der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg verwendet und mittels Ficoll-Dichtezentrifugation behandelt.

Das Blut wurde mit der doppelten Menge an sterilem PBS in 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. In weiteren 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml der Ficoll-Lösung vorgelegt und anschließend vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet unter Vermeidung der Mischung von Blut und Ficoll-Lösung. Es folgte eine Zentrifugation ohne Bremse um eine Durchmischung zu vermeiden (25 min, 800 g und 18 °C).

Nach Abschluss der Zentrifugation musste die oberste Schicht abgesaugt werden. Anschließend konnten aus der mittleren trüb erscheinenden Schicht (Interphase) die PBMCs mittels einer Pipette abgesaugt und in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden (Auffüllen der Zentrifugenröhrchen mit PBS).

Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 4 °C, 150 g). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in RPMI 1640 Medium resuspendiert und erneut für 10 min bei 4 °C und 150 g zentrifugiert. Erneut konnte der Überstand verworfen und eine Resuspension der Zellen in Nährmedium (RPMI 1640 + 10 % FCS) vorgenommen werden. Anschließend wurde dasselbe Volumen an Einfriermedium (FCS + 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) zugegeben und die Zellen auf Kryoröhrchen verteilt. Das Einfrieren erfolgte in Kryoboxen bei einer Abkühlrate von 1°C pro Minute bei -80 °C. Nach vollständigem Frieren wurden die Proben in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-190 °C) überführt.

4.1.5 Intrazelluläres Färbeprotokoll

Das folgende allgemeine Färbeprotokoll fand Anwendung bei den intrazellulären Färbungen von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen. Die verwendeten FACS-Antikörper sind unter den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

Nach Kultivierung der Zellen auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde die Platte bei 2400 rpm für 4 min und 4 °C zentrifugiert und anschließend so viel Überstand pro Well abgenommen, dass lediglich 20 µl im Well verblieben. Die Überstände wurden verworfen oder auf eine neue Platte überführt und bei -20 °C eingefroren.

Zu jedem Well wurden 80 µl „*Cell Stimulation Cocktail*“ (*plus protein transport inhibitor*) (eBioscience) hinzugegeben, welcher mit warmen Medium (RPMI 1640 + 10 % FCS)

zu einer Endverdünnung von 1:500 verdünnt wurde. Die Inkubationsdauer betrug 3 h bei 37 °C im Brutschrank.

Nach der Inkubation folgte ein Zentrifugationsschritt der Platte bei 2400 rpm und 4 °C für 4 min. Der Überstand wurde durch Invertierung der Platte verworfen (Sämtliche folgenden Zentrifugationen wurden in identischer Weise durchgeführt). Anschließend musste jedes Well mit 200 µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert werden. Es folgte die extrazelluläre Färbung für 20 min im Kühlschrank. Hierfür wurden 10 µl der FACS-Antikörper pro Well zugegeben, welche mit NaCl (0,9 %) verdünnt wurden. Es folgte ein erneuter Wasch- (200 µl PBS/Well) und Zentrifugationsschritt.

Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen schloss sich eine Inkubation von 20 min im Kühlschrank mit Zytofix/Zytoperm (150 µl/Well) an. Anschließend wurde wieder zweimal gewaschen (mit darauffolgender Zentrifugation). Einmal unter Zugabe von 50 µl Permashpuffer pro Well und einmal mit 200 µl Permashpuffer pro Well. Der Permashpuffer musste aus einem 10x-Stock 1:10 mit Millipore-H₂O verdünnt werden.

Nach dem zweimaligen Waschen erfolgte ein Fc-Block mit 10 µl mouse IgG (100 µg/ml) pro Well, welcher im Permashpuffer verdünnt wurde. Die Inkubationsdauer betrug 15 min bei RT.

Für die intrazelluläre Färbung wurden je 10 µl des Antikörper-Mastermixes (20 µl Endvolumen pro Well) pro Well zugegeben. Die Verdünnung der Antikörper musste in Permashpuffer stattfinden. Abermals schlossen sich zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte an (150 µl bzw. 200 µl Permashpuffer pro Well). Zuletzt wurde der Überstand verworfen und die Pellets wurden in 100 µl PBS/Well resuspendiert. Es folgte die Überführung der Proben in FACS-Polystyrolröhrchen und die Zugabe von je 20 µl Counting-Beads pro Probe. Die Proben wurden für 60 s auf „high“ am FACS Canto II aufgenommen.

4.1.6 Extrazelluläre Färbung

Die extrazellulären Färbungen von humanem Blut erfolgten im FACS-Polystyrolröhrchen. Vor Zugabe der Antikörper mussten die Proben für 7 min bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert und die Überstände mit einer Pipette abgenommen werden. Je nach Fragestellung wurden diese verworfen oder auf eine Platte überführt und bei -20 °C eingefroren.

Es folgte die Antikörperfärbung mit den in den Versuchen angegebenen Antikörpern und Verdünnungen für 20 min bei 4 °C und im Dunkeln. Nach erfolgter Inkubation wurden 4 ml NaCl (0,9 %) zu jeder Probe gegeben und erneut zentrifugiert (7 min bei 4 °C, 2000 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und alle Proben in ihrem verbleibenden Überstand resuspendiert. Anschließend mussten zur Lyse der Erythrozyten je Probe 1 ml *FACS-Lysing-Solution* zugegeben werden. Die Inkubationsdauer betrug 10 min im Dunkeln bei RT. Nach Abschluss der Erylyse wurde zu jeder Probe 3 ml PBS gegeben und erneut für 7 min bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und pro Probe wurden 20 µl *Counting Beads* hinzupipetiert. Die Proben wurden abschließend für 60 s auf „high“ am FACS Canto II vermessen und mittels der FACS Diva Software ausgewertet. Die erhaltenen Daten wurden mittels Excel weiter ausgewertet.

4.1.7 Depletion von NK- und/oder T-Zellen

Für die Versuche wurden in flüssigem Stickstoff (ca. -190 °C) gelagerte PBMCs verwendet. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer „*Laminar-Flow*“ oder in sterilen verschlossenen Behältnissen durchgeführt. Das verwendete Medium war RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep. Nach Entfernung der PBMCs erfolgte der Auftauvorgang im Wasserbad bei 37 °C. Anschließend mussten die Zellen umgehend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 20 ml Medium versetzt werden. Die Zellen wurden für 7 min und 2400 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt (Sämtliche folgenden Zentrifugationen wurden in identischer Weise durchgeführt). Anschließend wurden die Zellen über einen sterilen Filter in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Hierfür aktivierte man zunächst den Filter mit 1 ml „*magnetic activated cell sorting*“ (MACS)-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit 7 ml MACS-Puffer resuspendiert und ebenfalls über den Filter gegeben. Nachfolgend spülte man das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 1 ml MACS-Puffer und gab dieses über den Filter. Abschließend wurde erneut 1 ml MACS-Puffer über den Filter gegeben.

Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt an und das Pellet musste in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert werden. Nach Bestimmung der Zellzahl gemäß 4.1.1 konnten die Zellen hinsichtlich der erwarteten Zellzahlen nach Depletion aufgeteilt werden. Als Kontrolle diente immer eine Scheindepletion.

Zur Depletion von NK-Zellen erfolgte eine Färbung mit CD56 PE (1:50), zur Depletion von T-Zellen mit CD3 APC (1:80). Die Inkubationsdauer der Färbung betrug 15 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Proben der Scheindepletion wurden nicht gefärbt. Anschließend wurden alle Proben mit 5 ml MACS-Puffer versetzt. Erneut folgte ein Zentrifugationsschritt und die Proben mussten in MACS-Puffer + anti-PE Beads (für NK-Depletion) bzw. anti-APC Beads (T-Zell-Depletion) von Miltenyi resuspendiert werden. Für die Scheindepletion wurden ebenfalls anti-PE Beads eingesetzt. Pro eingesetzter Zellzahl von 10^7 Zellen wurden 80 µl MACS-Puffer und 20 µl Beads für das Resuspendieren eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 4 °C im Dunkeln.

Anschließend wurden pro Probe 10 ml MACS-Puffer hinzugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt folgte das Resuspendieren der Proben in je 500 µl MACS-Puffer. Für die Depletion kamen LD-Säulen der Firma Miltenyi zum Einsatz. Diese wurden in einem MACS-Seperator eingespannt und mit 5 ml MACS-Puffer equilibriert. Anschließend wurden die 500 µl Probe über die Säulen gegeben, die Zentrifugenröhrchen mit 1 ml MACS-Puffer ausgespült und über die Säulen gegeben. Zuletzt musste jede Säule mit dreimal 1 ml MACS-Puffer nachgespült werden.

Die Durchflüsse wurden erneut zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Zellpellets in je 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte gemäß 4.1.1. Für jede Probe wurde mit Medium eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml angesetzt.

Die Ansätze für die verschiedenen Stimulationen erfolgten auf einer 96-Wellplatte. Um die Proben wurde jeweils ein Rand mit je 200 µl PBS/Well pipettiert. Pro Ansatz wurden 500.000 Zellen pro Well angesetzt (100 µl) und 100 µl der Stimulation zugegeben.

4.1.8 Größenausschlusschromatographie (SEC) mittels HPLC

Zur Stabilitätscharakterisierung des ausgewählten Antikörpers erfolgte, neben der Überprüfung der noch vorhandenen Funktionalität, in ausgewählten Fällen auch eine Bestimmung des Monomergehalts mit Hilfe einer SEC mittels HPLC.

Das verwendete Gerät war das System „ÄKTA micro“ der Firma GE Healthcare LifeScience, inklusive des Autosamplers A-905. Zur Trennung kam die Agarose-basierte Gelfiltrationssäule „Superdex 200 Increase“ zum Einsatz. Diese besitzt einen Innendurchmesser von 10 mm und eine Länge von 300 mm. Das daraus resultierende Säulenvolumen beträgt 24 ml.

Sämtliche Messungen wurden mit einer Flussrate von 0,3 ml/min und mit sterilfiltriert und entgastem PBS als Laufpuffer durchgeführt. Das verwendete Samplevolumen betrug 50 µl, wobei durch den Autosampler ein Volumen von 100 µl aufgenommen worden ist. Von diesen wurden 50 µl auf die Säule aufgegeben.

Bevor die Messungen durchgeführt werden konnten, musste die Säule kalibriert werden. Hierfür wurden Proteine bekannter Konzentration verwendet und deren Retentionsvolumen zur Erstellung einer Regressionsgeraden genutzt.

Insgesamt wurden drei Kalibrationsläufe durchgeführt, um die Bereiche „*low-molecular-weight*“ (LMW) und „*high-molecular weight*“ (HMW) abzudecken und zusätzlich ein Lauf mit Blue Dextran, um die Funktionalität der verwendeten Säule zu verifizieren. Folgende Proteine wurden verwendet:

Tabelle 12: Verwendete Proteine zur Kalibrierung der Gelsäule bei der HPLC

Substanz	MW (Da)	Konz. (mg/ml)	Retentionsvolumen (ml)
Aprotinin	6500	3	19,2
Ribonuklease A	13700	3	17,58
Carboanhydrase	29000	3	16,23
Ovalbumin	43000/44000	4	14,87
Conalbumin	75000	3	14,06
Aldolase	158000	4	12,76
Ferritin	440000	0,3	10,59
Thyroglobulin	669000	5	9,4
Blue Dextran	2000000	1	7,83

Anhand der ermittelten Retentionsvolumina konnte, durch das Auftragen gegen den Logarithmus des Molekulargewichts, eine Regressionsgerade ermittelt werden. Nach erfolgter Kalibrierung fand die Vermessung der Proben statt. Durch Einsetzen der er-

haltenen Retentionsvolumina in die Regressionsgerade konnte das MW ermittelt werden. Außerdem wurden die Peakflächen ermittelt, um den prozentualen Monomergehalt zu bestimmen.

4.2 IL-3-Effekte und seine Regulation

4.2.1 Regulation der IL-3-Rezeptoren CD123 und CD131

Versuch 1

Die Expression der IL-3-Rezeptoren CD123 und CD131 wurde mittels einer FACS-Analyse ermittelt.

Pro Probe wurde 100 µl Heparinblut in FACS-Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 200 µl RPMI 1640 Medium versetzt. Proben nur mit Medium (+ Blut) dienten als Kontrolle, zudem wurden Proben mit einer Endkonzentration von LPS mit 1 µg/ml oder Zytokinen mit 20 ng/ml angesetzt (je 2x Werte). Folgende Zytokine wurden verwendet: IL-3, GM-CSF, IL-5, IL-4, IL-2, TNF- α .

Die Inkubation der Proben erfolgte zugedeckt für 1 h oder 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Nach Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Proben gemäß 4.1.6 behandelt und analysiert.

Für die Färbung wurden die folgenden Antikörper eingesetzt: CD116 FITC (1:40), CD123 PE-Cy 5.5 (1:30), CD131 PE (1:100), CD304 APC (1:40), CD19 APC-Cy7 (1:100), CD11b PE-Cy7 (1:100), CD16 PacificBlue (1:100), CD14 V500 (1:100).

Versuch 2

In einem weiteren Versuch wurden zusätzliche Zytokine überprüft. Die Durchführung entsprach Versuch 1, allerdings erfolgte nur eine Inkubation für 24 h. Die erhaltenen Überstände wurden nicht verworfen, sondern bei -20 °C eingefroren und ein IL-3-ELISA durchgeführt gemäß 4.1.3 (IL-3-ELISA).

Verwendet wurden neben LPS mit 1 µg/ml die Zytokine IL-2, IL-4, IL-15, IL-18, IFN- α , IFN- λ 1-3, IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35 mit jeweils 20 ng/ml. Die Färbung entsprach der von Versuch 1.

4.2.2 Regulation von CD131 durch IL-2

Es wurde die Regulation von CD131 auf Basophilen durch IL-2 mittels FACS-Analyse überprüft.

Pro Probe wurden 100 µl Heparinblut in FACS-Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 200 µl RPMI 1640 Medium versetzt. Als Proben wurden Medium und IL-2 (20 ng/ml) mit je 10 µg/ml eines anti-IL-3-Rezeptor-Antikörpers, V9 (anti-IL-3-Antikörper), anti-GM-CSF-Antikörper, einer Kombination aus V9 und anti-GM-CSF-Antikörper oder Medium (jeweilige Endkonzentrationen) angesetzt. Als Kontrolle der Wirksamkeit des eingesetzten IL-2 dienten mit IL-2 mit 0,8; 4; 20 und 100 ng/ml angesetzte Proben.

Die Inkubation der Proben erfolgte zugedeckt für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Nach Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Proben gemäß 4.1.6 behandelt und analysiert. Für die Färbung wurden die folgenden Antikörper eingesetzt: CD116 FITC (1:40), CD123 PE-Cy 5.5 (1:30), CD131 PE (1:100), CD304 APC (1:40), CD19 APC-Cy7 (1:100), CD11b PE-Cy7 (1:100), CD16 PacificBlue (1:100), CD14 V500 (1:100).

4.2.3 NK-Zell-Depletion

Die Depletion der NK-Zellen wurde gemäß 4.1.7 durchgeführt. Die erhaltenen Zellen wurden für 24 h kultiviert. Die Stimulation der scheindepletierten und der CD56- Zellen fand mit Medium; IL-2 (10 ng/ml) + Medium/IL-12 (50 ng/ml)/IL-18 (50 ng/ml) oder IL-2 (100 ng/ml) + Medium/IL-12 (50 ng/ml)/IL-18 (50 ng/ml) statt. Nach der Inkubation wurden von den Überständen IL-3-, GM-CSF- und IFN-γ-ELISA gemäß 4.1.3 durchgeführt.

Die Überprüfung der erfolgreichen Depletion erfolgte mittels eines MACS-Checks. Hierfür wurden 500.000 Zellen gemäß 4.1.6 gefärbt. Folgende Antikörper wurden verwendet: CD3 FITC (1:100), CD56 PE (1:40), CD16 APC (1:100).

4.2.4 NK- und T-Zell-Depletion

Die Depletion der NK- und T-Zellen wurde gemäß 4.1.7 durchgeführt. Die erhaltenen Zellen wurden für 24, 72 und 120 h kultiviert. Die Stimulation der scheindepletierten CD3- und CD56- Zellen fand mit Medium; IL-2 (100 ng/ml) oder IL-2 (100 ng/ml) +

IL-18 (25 ng/ml) statt. Nach Inkubation wurden von den Überständen IL-3- und GM-CSF-ELISA gemäß 4.1.3 durchgeführt.

Die Überprüfung der erfolgreichen Depletion erfolgte mittels eines MACS-Checks. Hierfür wurden 500.000 Zellen gemäß 4.1.6 gefärbt. Folgende Antikörper wurden verwendet: CD3 FITC (1:100), CD56 PE (1:40), CD16 APC (1:100).

4.2.5 Charakterisierung von IL-3 produzierenden T-Zellen

Für die Versuche wurden in flüssigem Stickstoff (ca. -190 °C) gelagerte PBMCs verwendet. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer „*Laminar-Flow*“ oder in sterilen verschlossenen Behältnissen durchgeführt. Das verwendete Medium war RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep. Nach Entfernung der PBMCs erfolgte der Auftauvorgang im Wasserbad bei 37 °C. Anschließend mussten die Zellen umgehend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 20 ml Medium versetzt werden. Die Zellen wurden für 7 min und 2400 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt (Sämtliche folgenden Zentrifugationen wurden in identischer Weise durchgeführt). Anschließend wurden die Zellen über einen sterilen Filter in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Hierfür aktivierte man zunächst den Filter mit 1 ml Medium. Anschließend wurden die Zellen mit 7 ml Medium resuspendiert und ebenfalls über den Filter gegeben. Nachfolgend spülte man das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 1 ml Medium und gab dieses über den Filter. Abschließend musste 1 ml Medium über den Filter gegeben werden.

Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde gemäß 4.1.1 bestimmt.

Versuch 1

Es folgte direkt die Färbung gemäß 4.1.5. Verwendet wurden folgende Antikörper: CD3 FITC (1:100), CD4 PerCp (1:20), CD8 APC-Cy7 (1:40), CD45RA V500 (1:40), CCR7 PE-Cy7 (1:80), CD28 PacificBlue (1:100), IL-3 PE (1:200)

Versuch 2

Es wurden je 500.000 Zellen/Well (96-Wellplatte, 5x-Werte) mit je drei verschiedenen Ansätzen angesetzt. Die Inkubationen erfolgten jeweils im Brutschrank bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden 180 µl Überstand abgenommen, auf eine neue Platte

überführt und bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde gemäß 4.1.5 gefärbt. Verwendet wurden folgende Antikörper: CD3 FITC (1:100), CD4 PerCp (1:20), CD8 APC-Cy7 (1:40), CD45RA V500 (1:40), CCR7 PE-Cy7 (1:80), CD28 PacificBlue (1:100), IL-3 PE (1:200), GM-CSF APC (1:20).

Ansatz 1: Stimulation mit Medium + anti-CD3 (5 µg/ml) oder IL-2 (100 ng/ml) + anti-CD3 (5 µg/ml) für 48 h.

Ansatz 2: Stimulation mit Medium oder IL-2 (100 ng/ml) für 120 h.

Ansatz 3: Stimulation mit Medium oder IL-2 (100 ng/ml) für 72 h. Anschließend wurde zentrifugiert bei 2400 rpm, 4 min und 4 °C und 180 µl Überstand abgenommen und auf eine neue Platte überführt. Diese wurde bei -20 °C eingefroren. Folgend wurden 200 µl PBS/Well zugegeben und bei 2400 rpm, 4 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jeweils 200 µl Medium + anti-CD3 (5 µg/ml) zugegeben und erneut für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Von allen Überständen wurde ein IL-3-, GM-CSF- und IFN-γ-ELISA durchgeführt. Mit anti-CD3 inkubierte Ansätze wurden 1:80 verdünnt. Ohne anti-CD3 inkubierte Ansätze wurden 1:5 (IL-3, GM-CSF) oder 1:25 (IFN-γ) verdünnt.

4.3 Strategie der Humanisierung von P8C11

Während der Humanisierung von P8C11 hin zur besten Variante wurde der IL-3-Aktivitätsassay (siehe 4.1.2) zur Überprüfung der inhibitorischen Aktivität der erzeugten Varianten verwendet. Unter Beibehaltung der murinen Sequenzen der CDRs des Antikörpers, fand eine schrittweise Humanisierung der restlichen Anteile des Antikörpers statt.

Ausgehend vom murinen anti-human IL-3-AK P8C11 wurde zunächst ein chimärer anti-human IL-3-AK (P8C11-Chim) generiert, bei welchem die konstanten Regionen des Antikörpers durch humane Sequenzen ersetzt wurden. Nachdem eine vergleichbare inhibitorische Aktivität zwischen P8C11 und P8C11-Chim verifiziert werden konnte, wurde P8C11-Chim für alle weitere Entwicklungsschritte als Referenzantikörper verwendet.

Ausgehend von P8C11-Chim erfolgte die Generierung der ersten humanisierten Varianten (Variante a - i). Bei diesen wurden zusätzlich die variablen Anteile (mit Ausnahme der CDRs) der Antikörper durch humane Sequenzen ersetzt. Eine Kombination von je drei verschiedenen leichten und drei verschiedenen schweren Ketten ergab insgesamt neun Varianten. Keine der neun Varianten erreichte eine zufriedenstellende inhibitorische Aktivität. Aus diesem Grund erfolgte im weiteren Verlauf eine schrittweise Humanisierung, um problematische Anteile der Humanisierung zu entdecken: Zuerst wurde nur die schwere und im Anschluss nur die leichte Kette humanisiert, um die inhibitorische Aktivität analysieren zu können. Die schwere Kette konnte als Problem der Humanisierung identifiziert werden (Variante 1 + 2). Zur weiteren Eingrenzung wurde die leichte Kette humanisiert und innerhalb der schweren Kette wurden nur einzelne Frameworks, unter Beibehaltung der murinen Sequenzen innerhalb der anderen Frameworks, humanisiert (Variante 3 - 5). Durch diese Varianten konnte die Frameworkregion identifiziert werden, welche für die abnehmende Aktivität verantwortlich gewesen ist.

Im nächsten Schritt wurden alle Anteile des Antikörpers humanisiert, mit Ausnahme der problematischen Frameworkregion. Diese wurde in drei Untereinheiten unterteilt. Es wurden drei verschiedene Varianten erzeugt, in welchen jeweils nur eine Untereinheit humanisiert wurde (Variante 6 - 8). Anhand der inhibitorischen Aktivität konnte die beste Variante ausgewählt werden, aus welcher wiederum vier neue Varianten generiert wurden (Variante 9 - 12).

Bei diesen fand in den verbleibenden beiden Untereinheiten der Frameworkregion eine Substituierung einzelner Aminosäuren statt, um den Anteil an murinen Sequenzen weiter zu reduzieren. Die Durchführung des IL-3-Aktivitätsassays führte zur Identifizierung von Variante 9 als beste Variante. Diese Variante wurde, ebenso wie P8C11-Chim, in einer aufgereinigten Variante ohne Bestandteile der produzierenden Zellkultur produziert. Als abschließender Test wurden sowohl Variante 9 als auch P8C11-Chim jeweils in ihren gereinigten und ungereinigten Varianten hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität getestet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, sodass Variante 9 für die Charakterisierung ausgewählt worden ist.

4.4 Charakterisierung der humanisierten Variante 9 (V9)

4.4.1 Stabilitätscharakterisierung

Sämtliche Überprüfungen der noch vorhandenen Funktionalität und somit inhibitorischen Aktivität von V9 wurden mit Hilfe des IL-3-Aktivitätsassays durchgeführt (siehe 4.1.2). Aus den erhaltenen Werten wurden mittels Regressionsgerade die IC₅₀-Werte bestimmt und zusätzlich bezogen auf die Referenzprobe als Vielfaches der Referenz angegeben. Die Überprüfung des Monomergehalts bzw. etwaiger Aggregatbildung erfolgte mit Hilfe von SEC (siehe 4.1.8). Die Messung der Proben erfolgte immer gegen eine Referenzprobe, welche bei -20 °C gelagert wurde.

Langzeitstabilität

Zur Überprüfung der Langzeitstabilität wurden Aliquots von V9 (7,6 mg/ml) entweder bei RT oder bei 4 °C gelagert. Zum Ausschluss des Einflusses von Lichtintensität erfolgte diese Lagerung im Dunklen. Die Proben wurden für 1, 2, und 6 Monate gelagert.

Kurzfristige Temperaturstabilität

Zur Überprüfung der kurzfristigen Temperaturstabilität wurden Proben von V9 (7,6 mg/ml) für 3 h auf 45 °C, 55 °C, 65 °C oder 75 °C erhitzt und anschließend wieder abgekühlt.

Isothermale Langzeitstabilität

Eine Probe von V9 (7,6 mg/ml) wurde für 100 h bei 55 °C im VP-DSC gelagert. Zusätzlich erfolgte hier die Analyse mit Hilfe der VP-DSC. Die Durchführung der isothermalen Messung geschah gemäß 4.4.3 mit folgenden Änderungen: Sämtliche Durchläufe fanden ohne Aufheizrate, sondern bei einer konstanten Temperatur von 55 °C statt. Ein Durchlauf dauerte 3 h. Bevor der nächste Durchlauf gestartet wurde, folgte eine 10 min Ruhephase (insgesamt 31 Durchläufe). Während der Ruhephase betrug die Temperatur ebenfalls 55 °C. Es erfolgte kein Kurvenfitting.

Stabilität bei wiederholtem Einfrier- und Auftauvorgängen („Freeze-Thaw-Cycle“, FTC)

Die Proben durchliefen 1, 2, 5 oder 10 FTC. Alle Proben wurden bei -20 °C eingefroren und in der entsprechenden Anzahl bei RT aufgetaut und anschließend bei -20 °C wieder vollständig eingefroren. Alle Proben wurden mit einer Konzentration von 7,6 mg/ml verwendet.

pH-Stabilität

Die Stabilität bei den pH-Werten 2, 3, 4, 5, 6 wurde überprüft. Alle Proben wurden mit Salzsäure (HCl) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und anschließend für 2 h bei RT ruhen gelassen. Danach wurden die Proben mit Natriumhydroxid (NaOH) wieder auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Die Einstellung wurde folgendermaßen durchgeführt:

pH 4-6:

Verdünnung von V9 (7,6 mg/ml) mit H₂O auf 1,52 mg/ml mit einem Gesamtvolumen von 4 ml. Einstellen mit 0,2 M HCl

pH 6: + 25 µl -> 1,3 ml des Volumens entnommen

pH 5: + 4,0 µl -> 1,3 ml des Volumens entnommen

pH 4: + 5,0 µl

Neutralisation mit 0,2 M NaOH auf pH 7

pH 6: 7,0 µl

pH 5: 9,0 µl

pH 4: 11,0 µl

→ Angenommene Endkonzentration: 1,52 mg/ml

pH 2 und 3:

Verdünnung von V9 (7,6 mg/ml) mit H₂O auf 1,52 mg/ml mit einem Gesamtvolumen von 4 ml.

pH 3: + 108 µl 0,2 M HCl -> pH: 3,08 -> 2 ml des Volumens entnommen

pH 2: + 220 µl 0,2 M HCl -> pH: 2,04

Neutralisation auf pH 7:

pH 3: + 10 µl 10 M NaOH + 40 µl 0,2 M HCl

pH 2: + 6 µl 10 M NaOH + 14 µl 0,2 M HCl

→ Endkonzentration pH 2: 1322,99 µg/ml

→ Endkonzentration pH 3: 1443,9 µg/ml

Plasma/Serumsstabilität

Die Proben von V9 wurden für 24 h, 48 h, 8 Tage (8 d) oder 28 Tage (28 d) in Heparin-Plasma, EDTA-Plasma, Serum oder PBS bei 37 °C im Brutschrank gelagert (verdünnt auf 500 µg/ml) und anschließend eingefroren.

4.4.2 Affinitätsbestimmung

Die Affinitätsbestimmung von V9 erfolgte durch SPR mit Hilfe der Biacore X100 (GE Healthcare). Als Referenz wurde ebenfalls der chimäre Antikörper P8C11-Chim mittels SPR vermessen. Die Messungen erfolgten jeweils separat.

Durchgeführt wurden die Versuche mit dem Sensorchip Protein A, bei welchem bereits rekombinantes Protein A kovalent an die Dextranmatrix gebunden ist. An das Protein A können die Antikörper gebunden werden. Der verwendete Laufpuffer bestand aus entgastem PBS mit 0,05 % Tween 20. Um das PBS zu entgasen, wurde es in eine 1 l Schottflasche umgefüllt und in einem Vakuumexsikkator über eine Vakuumpumpe für 30 min entgast. Die Entgasung erfolgte unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer und mit einem Rührfisch. Anschließend musste Tween 20 hinzugegeben werden. Sämtliche Verdünnungen der Proben (IL-3 und Antikörper) erfolgten ebenfalls im Laufpuffer. Die Antikörperkonzentration betrug 1,5 µg/ml und die eingesetzten IL-3-Konzentrationen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Die Messungen der Affinität erfolgten nach der „*Multi-Cycle*“-Methode. Bei dieser Methode wurde der Antikörper an den Chip gebunden und mit einer Konzentration seines Targets überströmt. Nach Aufnahme der Kurven, musste der Chip regeneriert werden. Hierbei wurden der Antikörper und sein Target komplett vom Chip entfernt, bevor der nächste Zyklus mit identischer Antikörperkonzentration, aber wechselnder Targetkonzentration starten konnte. In Tabelle 13 sind die verschiedenen Zyklen aufgelistet:

Tabelle 13: Durchgeführte Zyklen zur Affinitätsbestimmung

Zyklus	IL-3-Konzentration (µg/ml)
1 (Startup-Zyklus)	0
2 (Startup-Zyklus)	0
3	0
4	0,001
5	0
6	0,01
7	0
8	0,025
9	0
10	0,05
11	0
12	0,066
13	0
14	0,08
15	0
16	0,12
17	0
18	0,15
19	0
20	0,25
21	0
22	0,08

Alle Proben wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen entsprechend ihrer angegebenen Konzentration mit Laufpuffer angesetzt und im Rack des Biacore platziert. Die Software des Biacore gab die Position der Reaktionsgefäße vor und gab auch das Mindestvolumen der einzelnen Proben an. Alle Reaktionsgefäße mussten mit Kunststoffkappen verschlossen werden, um eine Verdunstung während des Versuches zu verhindern. Die Nadel des Biacore war jedoch in der Lage durch die Kappen zu stechen. Nach

Starten des Experiments durchlief das Biacore selbstständig alle Zyklen nach einem ihm vorgegebenen Programm.

Zunächst erfolgte das „*Primen*“ des Systems mit Laufpuffer. Anschließend wurden die 22 Zyklen bearbeitet. Die ersten beiden Zyklen (Start-Up-Zyklus) dienten dazu, etwaige noch vorhandene Störfaktoren zu entfernen. Jeder Zyklus folgte vier identischen Phasen, die wie folgt abliefen:

Capture: In der Capturephase fand die Immobilisierung der Antikörper auf dem Chip statt. Hierzu wurde der Antikörper mit einer konstanten Flussrate von 5 µl/min für 45 s lediglich über Flusszelle 2 (Messzelle) geströmt, gefolgt von einer Stabilisierungsphase von 300 s.

Sample: In der Samplephase wurde das IL-3 mit einer Flussrate von 15 µl/min für 360 s über beiden Flusszellen (Messzelle und Referenzzelle) geströmt. Im Anschluss musste eine Dissoziationszeit von 600 s abgewartet werden.

Die anschließende erforderliche Regeneration des Chips erfolgte in zwei Schritten.

Regeneration: Zuerst wurde 10 mM Gly-HCl pH 1,5 über beide Flusszellen für 30 s mit einer Flussrate von 30 µl/min appliziert und es erfolgte ein Waschschrift mit Laufpuffer. Im Anschluss wurde 10x PBS pH 7,4 für 60 s mit einer Flussrate von 40 µl/min über beide Flusszellen geströmt. Erneut erfolgte ein Waschschrift mit Laufpuffer.

Nach Durchlauf der vier Schritte startete der nächste Zyklus nach demselben Programm. Die Auswertung der Versuche wurde mit der Biacore X100 Evaluierungssoftware 2.0.1 durchgeführt. Das Affinitätsfitting wurde nach dem Modell „*Steady-state-affinity*“ und das Kinetikfitting nach dem Modell „*1:1-binding*“ durchgeführt.

4.4.3 Schmelzpunktbestimmung mittels VP-DSC

Für die Schmelzpunktbestimmung von V9 wurde die Methode der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) verwendet. Die verwendeten Geräte waren das „Microcal VP-DSC“ der Firma Malvern und zur Entgasung der Proben die „Microcal Thermovac“ der Firma Malvern. Die Entgasung fand unter Rühren mit einem Magnetrührfisch und unter Anlegen eines Vakuums statt.

Nach Inbetriebnahme der „Microcal-VP-DSC“ wurde zunächst eine Messung von Wasser gegen Wasser durchgeführt, um etwaige Verunreinigungen ausschließen zu können. Hierfür mussten sowohl die Messzelle als auch die Referenzzelle mit entgastem Wasser befüllt werden. Zur Befüllung der Zellen wurde eine gasdichte 2,5 ml Hamilton-Spritze mit langer Kanüle verwendet. Nach Befüllung der Spritze wurde diese in die Messzelle eingeführt und die Spitze möglichst 1-2 mm über dem Boden der Zelle platziert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zelle langsam, ohne die Spritze zu bewegen, befüllt wurde. Der Austritt von Flüssigkeit an der oberen Öffnung zeigte die vollständige Befüllung an. Das Volumen einer Messzelle betrug 511 µl. Um noch etwaig enthaltene Luftblasen zu entfernen, wurden mehrere kurze Auffüll- und Entleervorgänge (~ 0,25 ml) mit der Spritze durchgeführt. Abschließend musste der Druck durch das Verschließen der Messzellen mit dem Schraubverschluss aufgebaut werden.

Der Messvorgang wurde im Temperaturbereich von 25 – 130 °C und mit einer Aufheizrate von 1 °C pro Minute durchgeführt. Nach erfolgreichem „Wasserlauf“ musste als nächstes ein Lauf mit dem Antikörperpuffer gestartet werden. Dieser Puffer besteht aus PBS mit 100 mM L-Arginin.

Beide Messzellen wurden, wie oben beschrieben, mit Puffer befüllt. Anschließend führte man mehrere Durchläufe gemäß den Parametern des „Wasserlaufes“ durch (erhitzen auf 130 °C und anschließend abkühlen auf 25 °C und dann erneut). Nach Stabilisierung der Signale konnte einer der Läufe als Baselinelauf verwendet werden.

Die Messung des Antikörpers fand mit Hilfe der „*on-the-fly*“-*filling-procedure* statt. Hierbei musste die Messzelle, welche die Probe enthalten sollte, während des Abkühlvorgangs entleert und mit dem Antikörper befüllt werden. Die Antikörperkonzentration betrug 7,6 mg/ml. Anschließend wurden beide Messzellen wieder verschlossen und während des nächsten Aufheizzyklus wurde der Antikörper vermessen.

Nach erfolgter Messung fand die Schmelzpunktbestimmung mit Hilfe von Origin 7 statt. Zuerst wurde die erhaltene Schmelzkurve auf die Konzentration normiert, anschließend erfolgte die Subtraktion der gemessenen Baseline (Puffer/Puffer-Lauf). Abschließend erfolgte das Kurvenfitting. Es wurde ein „*kubic fit*“ mit 3 Maxima durchgeführt. Basierend auf diesem Fitting erfolgte die Bestimmung der drei Schmelzpunkte Tm1, Tm2, Tm3.

4.4.4 Epitopmapping

Zur Bestimmung des genauen Epitops von V9 wurde, basierend auf den Ergebnissen von P8C11, ein Epitopmapping mittels ELISA durchgeführt. Zum Einsatz kamen Peptide, welche verschiedene Abschnitte der Aminosäuresequenz von IL-3 abdeckten. In Abbildung 9 ist die komplette Aminosäuresequenz des humanen IL-3 dargestellt, welche 152 Aminosäuren umfasst. Die Aminosäuren 1-19 stellen die Sequenz des Signalpeptids dar und wurden für die Zählweise nicht berücksichtigt, sodass lediglich die gelb unterlegten Aminosäuren gezählt wurden. Somit beginnt die Zählung bei Aminosäure 20, welche für den Versuch die Aminosäure 1 darstellt. Während des Epitopmappings wurden folgende Peptide getestet:

IL-3 26-48: HLKQPPLPLLDFFNNLNGEDQDIL

IL-3 28-48: KQPPLPLLDFFNNLNGEDQDIL

IL-3 30-48: PPLPLLDFFNNLNGEDQDIL

IL-3 22-42: EIITHLKQPPLPLLDFFNNLNG

IL-3 22-44: EIITHLKQPPLPLLDFFNNLNGED

IL-3 22-46: EIITHLKQPPLPLLDFFNNLNGEDQD

IL-3 22-48: EIITHLKQPPLPLLDFFNNLNGEDQDIL

10	20	30	40	50
MSRLPVLLLL	QLLVRPGLQA	PMTQTTS�KT	SWVNCNMIID	EIITHLKQPP
60	70	80	90	100
LPLLDFFNSLN	GEDQDILMEN	NLRRPNLEAF	NRAVKSLQNA	SAIESILKNL
110	120	130	140	150
LPCLPLATAA	PTRHPPIHKD	GDWNEFRRKL	TFYLKTLENA	QAQQTTLSLA

IF

Abbildung 9: Aminosäuresequenz des humanen IL-3

Getestet wurden neben dem murinen Ausgangsantikörper P8C11 und dem humanisierten Antikörper V9 auch drei weitere IL-3-Antikörper. Zwei „*mouse-anti-human*“ IL-3 Antikörper von R&D (Klone 4806 und 4815) und der *rat-anti-human* IL-3 Antikörper BVD8-3G11 von Biolegend. Zuletzt 1 % BSA/PBS als Negativkontrolle.

Das „*Coating*“ der Peptide und PBS als Negativkontrolle fand in PBS bei RT und über Nacht statt. Die Konzentration betrug 10 µg/ml (60 µl/Well). Am nächsten Tag wurden die Platten zunächst dreimal mit 300 µl/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschriff vollständige Entleerung der Wells durch Invertierung der Platte → sämtliche weitere Waschschriffe fanden in identischer Weise statt) und für 2 h bei RT mit 1 % BSA/PBS (200 µl/Well) geblockt.

Es folgte ein erneuter Waschriff. Die Konzentration aller IL-3-Antikörper betrug 10 µg/ml (in 1 % BSA/PBS). Jeder der Antikörper wurde als Doppelwert auf alle *Coatings* gegeben und mit 60 µl/Well für 1 h bei RT inkubiert. Als Kontrolle und zur Ermittlung des Blankwertes diente 1 % BSA/PBS.

Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend mit einem erneuten Waschriff entfernt und gebundene Antikörper mit sekundären Antikörpern detektiert. Als sekundäre Antikörper wurden ein „*polyclonal rabbit anti-mouse*“ Ig-HRP (Dako P0260) mit einer Verdünnung von 1:2000 für die murinen/*rat* Antikörper und ein „*HRP-conjugated AffinePure fragment goat anti-human* IgG (Jackson Immuno Research) mit einer Verdünnung von 1:5000 für V9 verwendet. Die Verdünnung erfolgte mit 1 % BSA/PBS und die Inkubationsdauer betrug 1 h bei RT mit 60 µl/Well.

Abschließend wurde erneut gewaschen und 100 µl 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) pro Well zugegeben. Das Ablesen der Absorption erfolgte nach 30-40 min am Tecan „infinite 200pro“ bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 490 nm).

4.4.5 Bindungsspezifität des humanisierten Antikörpers

Zur Überprüfung der Bindungsspezifität und keiner vorliegenden Kreuzreaktivität von V9 wurde ein ELISA durchgeführt.

Die ELISA-Platte wurde über Nacht mit humanem-IL-3, rhesus-IL3, GM-CSF, IL-5 oder PBS mit einer Konzentration von 1 µg/ml und 60 µl/Well gecoatet. Am nächsten Tage wurde die Platte zunächst dreimal mit 300 µl/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschriff vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte → sämtliche weitere Waschschriffe fanden in identischer Weise statt) und anschließend mit 200 µl 2 % BSA/PBS pro Well für 2 h bei RT geblockt. Es folgte ein erneuter Waschriff. Als nächstes konnten die Proben von V9, P8C11-Chim und dem Antikörper-Puffer aufgegeben werden. Die Verdünnung der Proben fand in 2 % BSA/PBS statt. Ihre Konzentration betrug jeweils 30 µg/ml und 3 µg/ml. Im Falle des Puffers wurde die Höchrsmenge des verwendeten Puffers, basierend auf der geringsten Verdünnung der eingesetzten Antikörper, verwendet (P8C11-Chim wurde weniger stark verdünnt, daher wurde diese Menge als Höchrsmenge beim Puffer verwendet). Jede der Proben wurde in Doppelwerten auf jedes *Coating* gegeben und zusätzlich auf jedes *Coating* ein Doppelwert von 2 % BSA/PBS zur Ermittlung des Backgrounds. Das eingesetzte Volumen betrug 60 µl/Well und die Inkubation 1 h bei RT.

Im Anschluss musste die Platte erneut gewaschen werden. Als sekundärer Antikörper wurde ein HRP-conjugated-AffinePure Fragment *goat anti-human IgG* verwendet (Jackson Immuno Research), welcher mit einer Verdünnung von 1:5000 (in 2 % BSA/PBS) eingesetzt worden ist. Erneut betrug die Inkubationszeit 1 h bei RT und einem eingesetzten Volumen von 60 µl/Well. Abschließend musste erneut gewaschen und in jedes Well 100 µl ABTS zugegeben werden. Nach ca. 15 min konnte die Absorption am Mikroplattenreader bei 405 nm abgelesen werden (Referenzwellenlänge 490 nm).

4.4.6 Bestimmung der Wachstumshemmung von IL-3 abhängigen TF1-Zellen

Bei der TF-1-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Patienten gewonnen wurde, welcher an einer Erythroleukämie litt. Die Besonderheit der Zelllinie ist ihre komplette Wachstumsabhängigkeit von IL-3 und/oder GM-CSF. Hierdurch ist es möglich die inhibitorische Aktivität des IL-3-Antikörpers in Korrelation zum TF-1-Zellwachstum zu setzen [114].

Auftauen der TF-1-Zelllinie

Die TF-1-Zellen lagerten bei -190 °C im Stickstofftank. Um sie aufzutauen und für die Zellkultivierung nutzen zu können, wurden sie im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und umgehend unter der Sterilbank in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1800 rpm für 6 min. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 20 ml Medium resuspendiert und nach demselben Schema erneut gewaschen. Erneut konnte der Überstand abgesaugt und die Zellen anschließend in 1 ml Medium resuspendiert werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte gemäß 4.1.1. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in einer 75 cm² Zellkulturflasche in 20 ml Kulturmedium eingesät (RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + Glutamin (1:100) + 5 ng/ml hIL-3) und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Kulturbedingungen der TF-1-Zelllinie

Nach dem Einsäen der Zellen mussten diese zunächst zwei Wochen lang kultiviert werden, bevor sie in Versuchen eingesetzt werden konnten. Alle 3-4 Tage mussten die Zellen gesplittet und neues Medium zugesetzt werden (Das Kulturmedium wurde immer frisch angesetzt). Je nach Zelldichte und erkennbarem Mediumsverbrauch wurden die Zellen im Splitverhältnis 1:3 – 1:8 auf neue 75 cm² Zellkulturflaschen aufgesplittet. Hierfür wurden die Zellen zunächst samt Medium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 6 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend erfolgten die Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und ein geeignetes Splitverhältnis in 25 ml frischem Kulturmedium.

Bestimmung der Wachstumshemmung mittels MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays ist die Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen und somit auch ihrer Viabilität möglich. Der gelbe, wasserlösliche Farbstoff MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium wird zum wasserunlöslichen, violetten Formazan umgewandelt. Dies geschieht durch mitochondriale Dehydrogenasen. Mit Hilfe eines ELISA-Readers kann anschließend die optische Dichte (OD) abgelesen werden [115].

Am Vortag des Ansatzes mussten die TF-1-Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und mit 25 ml frischem Kulturmedium angesetzt werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen weitere zweimal gewaschen. Dazu wurden sie in 20 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + Glutamin (1:100) resuspendiert und mit Hilfe von Trypanblau und der Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt (gemäß 4.1.1). Anschließend erfolgte mit diesem Medium die Einstellung einer Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml.

Pro Well einer 96-Well-Platte wurden 100 µl der Zellsuspension ausgesät (entspricht 10.000 Zellen/Well). Des Weiteren wurde RPMI 1640 Medium (+ 10 % FCS + 1 % Pen/Strep + Glutamin (1:100)) angesetzt mit hIL-3 10 ng/ml. Mit diesem Medium wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der Antikörper P8C11-Chim und V9 angesetzt, beginnend mit 60 µg/ml und den Verdünnungsschritten 1:3 bis zur niedrigsten Verdünnung 1:2187, sodass die IL-3-Konzentration, bei abnehmender Antikörperkonzentration, konstant bei 10 ng/ml blieb. Die Proben aus hIL-3 und Antikörpern mussten für 60 min bei 37 °C im Brutschrank präinkubiert werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl der Proben (Dreifachwerte) zu je 100 µl der vorgelegten Zellsuspension auf der 96-Well-Platte. Die Endkonzentrationen betrugen somit 5 ng/ml für IL-3 und maximal 30 µg/ml für die Antikörper. Als Positivkontrolle diente IL-3 ohne Antikörper und als Negativkontrolle Medium ohne IL-3.

Die Inkubationsdauer der Platte betrug 5 Tage bei 37 °C im Brutschrank. Nach 5 Tagen wurden pro Well 100 µl Medium abgenommen, ohne dabei Zellen abzunehmen. Anschließend wurden 10 µl MTT Solution hinzugegeben und die Platte für weitere 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Abschließend gab man pro Well 100 µl MTT Solvent hinzu. Eine erneute Inkubation der Platte über Nacht und bei RT im Dunkeln schloss

sich an. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der OD am Mikroplattenreader bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

4.4.7 Blockade der Bindung von IL-3 an CD123 auf PBMCs

Es wurde das „Fluorokine biotinylated human IL-3“-Kit von R&D Systems verwendet, um die erfolgreiche Blockade der Bindung von IL-3 an CD123 durch V9/P8C11-Chim zu quantifizieren. Dieses Kit stellte ein biotinyliertes humanes IL-3, Avidin- konjugiertes FITC, eine negative Kontrolle sowie den erforderlichen Waschpuffer zur Verfügung. Die Konzentration der Antikörper V9/P8C11-Chim betrug 100 µg/ml in 10 µl 1 % BSA/PBS. Von beiden musste eine Verdünnungsreihe in 1 % BSA/PBS in 1:3 Schritten mit der größten Verdünnung von 1:27 hergestellt werden. Zusätzlich wurde der Puffer, in welchem sich die Antikörper befanden (AK-Puffer), in der höchsten eingesetzten Menge verwendet und nach demselben Schema eine Verdünnungsreihe angefertigt (Einfachwerte).

Je 10 µl der Proben wurden in einem FACS-Polystyrolröhrchen vorgelegt und je 10 µl des biotinylierten IL-3 (1 µg/ml) hinzugegeben. Als Positivkontrolle dienten 10 µl 1 % BSA/PBS + 10 µl biotinyliertes IL-3 (Dreifachwert), als Negativkontrolle 10 µl der Negativkontroll-Reagenz + 10 µl 1 % BSA/PBS (Doppelwert). Es folgte eine Präinkubation von 30 min auf Eis und im Dunkeln. Nach Zugabe von je 60 µl EDTA-Blut ergaben sich die Endkonzentrationen von 0,125 µg/ml (IL-3) und 12,5 µg/ml (Antikörper). Die folgende Inkubation der Proben fand für 1 h auf Eis und im Dunkeln statt.

Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von je 20 µl Avidin-FITC, 3,33 µl CD123 PE-Cy 5.5 (1:30), sowie 1 µl CD203c PE (1:100) pro Probe und eine erneute Inkubation von 30 min im Dunkeln auf Eis.

Anschließend wurden die Proben zweimal mit 2 ml des im Kit inkludierten Waschpuffers gewaschen (zentrifugieren bei 1600 rpm, 6 min, 4 °C, Überstand absaugen) und die Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml FACS-Lysing-Solution lysiert. Die Inkubationszeit der Lysing-Solution betrug 10 min im Dunkeln bei RT. Abschließend wurden die Proben mit 3 ml PBS gewaschen und bei 1600 rpm und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels des BD FACS Canto II für 60 s auf dem Messmodus „high“.

4.4.8 Unspezifische Wirkung von V9 auf Blutleukozyten

Mit Hilfe von FACS-Analysen und ELISA wurden unspezifische Wirkungen von V9 auf Blutleukozyten untersucht. Zum einen wurde die direkte Bindung von ungebundenem V9 analysiert zum anderen Regulation von Oberflächenmarkern. Außerdem wurde die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen analysiert. Verglichen wurde jeweils mit einer humanen IgG1 Isotyp-Kontrolle.

Unspezifische Bindung von nicht IL-3 gebundenem V9

Die Konzentration der Antikörper V9 und IgG1 Isotyp-Kontrolle betrug 200 µg/ml in RPMI 1640. Von beiden musste eine Verdünnungsreihe in RPMI 1640 in 1:5 Schritten hergestellt werden (größte Verdünnung von 1:625). Zudem wurde für beide Antikörper eine separate Negativkontrolle hergestellt. In FACS-Polystyrolröhrchen wurden 50 µl Heparin-Blut vorgelegt und anschließend mit je 50 µl Antikörperansatz versetzt (Doppelwerte). Die resultierende höchste Konzentration betrug somit 100 µg/ml. Die Inkubation der Proben erfolgte für 1 h auf Eis. Anschließend wurde mit 3 ml NaCl (0,9 %) gewaschen und bei 1800 rpm und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Der Überstand konnte abgesaugt und verworfen werden. Es folgte eine zweimalige Wiederholung des Waschschrittes. Anschließend konnten der Detektionsantikörper PE-F(ab)2 goat-anti-human IgG in einer Verdünnung 1:400 zugegeben werden. Die Inkubationsdauer betrug 30 min auf Eis. Anschließend wurde erneut dreimal mit 3 ml NaCl (0,9 %), wie obenstehend beschrieben, gewaschen und der Überstand verworfen. Zuletzt mussten die Proben mit 10 % Mausserum geblockt (10 min, auf Eis) und ohne folgenden Waschschritt gemäß 4.1.6 mit folgenden Antikörpern gefärbt werden: CD19 APC-Cy7 (1:100), CD8 PE-Cy7 (1:40), CD4 V500 (1:40), CD123 PE-Cy5 (1:40), CD304 APC (1:40), CD116 FITC (1:40), CD16 PacificBlue (1:150).

Rezeptorregulation und Einfluss auf Proliferation durch V9

Zur Untersuchung einer möglichen Rezeptorregulation auf Blutleukozyten durch V9 wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Es wurde ebenfalls ein Einfluss auf die Zellzahl einzelner Population untersucht.

Pro Probe wurden 50 µl Heparinblut in FACS-Polystyrolröhrchen vorgelegt und mit 100 µl RPMI 1640 Medium versetzt. Proben nur mit Medium dienten als Kontrolle, zudem wurden Proben mit einer Endkonzentration von V9 mit 1 µg/ml oder 10 µg/ml

angesetzt (je 4x Werte). Die Inkubation der Proben erfolgte zugedeckt für 24 h bei 37 °C im Brutschrank.

Nach der Inkubation konnte der Überstand abgenommen und mit diesem ELISA durchgeführt werden (siehe **Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine**). Die Analyse der Proben mittels FACS erfolgte gemäß 4.1.6.

Verwendete Antikörper: HLA-DR FITC (1:100), CD123 PE-Cy 5.5(1:40), CD203c PE (1:100), CD304 APC (1:40), CD3 APC-Cy7 (1:40), CD11b PE-Cy7 (1:100), CD16 PacificBlue (1:150), CD14 V500 (1:100).

Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine

Eine mögliche Produktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aufgrund einer Inkubation mit V9 wurde mittels ELISA überprüft.

Untersucht wurden die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-6. Die Durchführung erfolgte gemäß 4.1.3.

4.5 Herstellung und Charakterisierung von anti-idiotypischen Antikörpern von V9

Zur Detektion des humanisierten Antikörpers V9 aus humanem Blut bzw. Plasma wurden anti-idiotypische Antikörper generiert. Diese wurden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften (blockierend, nichtblockierend) und Wirkung auf Blutleukozyten getestet. Überprüft wurden die Antikörper 3F9 und 5F11.

4.5.1 Herstellung der anti-idiotypischen Antikörper

Die Herstellung der anti-idiotypischen Antikörper erfolgte innerhalb der AG Mack in BALB/c-Mäusen gegen V9.

4.5.2 Bindung der anti-idiotypischen-Antikörper

Eigenschaft der Bindung an V9 – Versuch 1

Mittels ELISA wurde untersucht, ob es sich bei den beiden Antikörpern um blockierende oder nichtblockierende Antikörper für V9 handelt.

Hierfür wurde eine 96-Well-Platte über Nacht bei RT mit 2 μ g/ml IL-3 in PBS gecoatet (55 μ l/Well). Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit 300 μ l/Well Waschpuffer

(0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschriff vollständige Entleerung der Wells durch Invertierung der Platte → sämtliche weitere Waschschriffe fanden in identischer Weise statt) und anschließend mit 2 % BSA/PBS für 2 h bei RT geblockt (200 µl/Well).

Für die Proben wurden 2 % BSA/PBS oder V9 mit 0,111; 0,333 oder 1 µg/ml jeweils mit 2 % BSA/PBS, 3F9 bzw. 5F11 (je 10 µg/ml) in 2 % BSA/PBS angesetzt und für 1 h bei RT präinkubiert.

Nach abgeschlossenem Blocken der Platten musste die Platte erneut gewaschen werden. Es folgte die Zugabe der Proben mit 55 µl/Well auf beide Hälften der Platte und eine Inkubation für 2 h bei RT (Doppelwerte). Nach der Inkubation schloss sich ein weiterer Waschriff an. Die eine Hälfte der Platte wurde mit dem Detektionsantikörper *goat-anti-human-IgG*-HRP (1:5000 in 2 % BSA/PBS) und die andere Hälfte mit dem Detektionsantikörper *rabbit-anti-mouse* P0260 (1:2000 in 2 % BSA/PBS) für 1 h bei RT versetzt (55 µl/Well). Abschließend musste erneut gewaschen und pro Well 100 µl ABTS für 20 min aufgegeben werden. Die Messung der Absorption erfolgte am Tecan-Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm.

Eigenschaft der Bindung an V9 – Versuch 2

Es wurden zwei 96-Well-Platten über Nacht bei RT mit 2 µg/ml IL-3 in PBS gecoatet (55 µl/Well). Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit 300 µl/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschriff vollständige Entleerung der Wells durch Invertierung der Platte → sämtliche weitere Waschschriffe fanden in identischer Weise statt) und anschließend mit 2 % BSA in PBS für 1 h bei RT geblockt (200 µl/Well). Für die Proben wurde 2 % BSA/PBS oder V9 mit 0,111; 0,333 oder 1 µg/ml in 2 % BSA/PBS angesetzt.

Nach abgeschlossenem Blocken der Platten musste erneut gewaschen werden. Es folgte die Zugabe der Proben mit 55 µl/Well auf beide Platten und eine Inkubation für 1 h bei RT (Doppelwerte). Nach der Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen.

Platte A:

Auf alle Proben wurde 2 % BSA/PBS oder 3F9 (10 µg/ml) oder 5F11 (10 µg/ml) aufgegeben und für 1 h bei RT inkubiert (55 µl/Well). Es folgte ein Waschschrift und die Zugabe des Detektionsantikörpers *rabbit-anti-mouse* P0260 (1:2000 in 2 % BSA/PBS) in alle Wells mit 55 µl/Well. Die Inkubationsdauer betrug 1 h bei RT. Abschließend erfolgte erneut ein Waschschrift und die Zugabe von 100 µl ABTS/Well für 20 min. Die Messung der Absorption erfolgte am Tecan-Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm.

Platte B:

In alle Wells wurde der Detektionsantikörper *goat-anti-human* IgG1-HRP (1:5000 in 2 % BSA/PBS) mit 55 µl/Well gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend erfolgte erneut ein Waschschrift und die Zugabe von 100 µl ABTS/Well für 20 min. Die Messung der Absorption erfolgte am Tecan-Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm.

4.5.3 IL-3-Effekte der anti-idiotypischen-Antikörper

Mit Hilfe des Antikörper IL-3-Assays wurde überprüft ob die anti-idiotypischen Antikörper IL-3-Effekte besitzen und auf Blutleukozyten wirken.

Der Versuch wurde, wie in 4.1.2 beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt: Es wurde Medium ohne IL-3 verwendet und es erfolgte somit keine Präinkubation der Antikörper (3F9 und 5F11), sondern eine direkte Inkubation von 20 µl AK-Ansatz mit EDTA-Blut.

4.5.4 Antikörper IL-3-Assay der anti-idiotypischen-Antikörper

Der Versuch wurde, wie in 4.1.2 beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt: Es war ein zusätzlicher Präinkubationsschritt für 1 h bei RT notwendig mit folgenden Ansätzen: V9 mit 0; 2 oder 8 µg/ml mit 3F9 oder 5F11 oder RPMI 1640 + 10 % FCS in RPMI 1640 + 10 % FCS. Die Konzentrationen von 3F9 und 5F11 betrugen 80 µg/ml mit 1:4 Verdünnungen bis hin zu 1/1024. Nach der 1-stündigen Präinkubation wurden

die Ansätze 1:1 mit IL-3 0,8 ng/ml in RPMI 1640 + 10 % FCS versetzt und je 20 µl in FACS-Polystyrolröhrchen übertragen. Es folgte eine Präinkubation für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Abschließend musste zu allen Ansätzen je 60 µl EDTA-Blut zugegeben werden. Die resultierenden Konzentrationen betrugen für V9 0; 0,25; 1 µg/ml, IL-3 0,1 ng/ml und 3F9/5F11 maximal 10 µg/ml.

4.6 Detektion von V9 aus humanem Blutplasma

Zur Detektion des V9 aus humanem Blutplasma wurde über mehrere Vorversuche ein ELISA mit drei verschiedenen Standards zur Detektion des freien, des IL-3 gebundenen und des gesamten V9 entwickelt. Darüber hinaus sollte der ELISA das gebundene IL-3 detektieren. Verwendet wurden die beiden anti-idiotypischen Antikörper 3F9 und 5F11, sowie der Antikörper AK13, der gegen IL-3 gerichtet ist, allerdings ein anderes Epitop bindet als V9. Zur möglichst genauen Nachahmung einer Gewinnung des Plasmas aus Probanden, fand die Durchführung des ELISA wie folgt statt:

Es wurde frisch gewonnenes EDTA-Blut eines gesunden Probanden verwendet. Pro Probe wurden 2 ml EDTA-Blut in einem 5 ml Reagiergefäß vorgelegt und insgesamt neun verschiedene Proben generiert um alle Kombinationen von V9 und IL-3, die möglicherweise im Plasma eines Patienten vorliegen könnten, abzudecken. Basierend auf dem gesundheitlichen Status des Probanden wurde ein Hämatokritwert von 50 % angenommen, resultierend in einem angenommenen Wert von 1 ml Plasma. Die angesetzten Konzentrationen von V9 und IL-3 wurden auf diesen Wert berechnet und direkt in den Blutproben angesetzt. Die neun verwendeten Proben waren: 10 µg/ml V9 + 1; 10; 100 ng/ml IL3; 0,1 µg/ml V9 + 0,1; 1; 10 ng/ml IL-3 und 0,01 µg/ml V9 + 0,1; 1; 10 ng/ml IL-3. Nach Zugabe von V9 und IL-3 wurden die Proben bei 4 °C und 2000 g für 10 min zentrifugiert und das Plasma abgenommen und umgehend bei -20 °C eingefroren. Vor Durchführung der ELISA wurden die Proben aufgetaut und für 10 min bei 10000 rpm (5417R) und 4 °C zentrifugiert.

Für den ELISA wurde je eine Platte mit 5 µg/ml 5F11 (freier V9), 5 µg/ml K13 (gebundener V9) oder je 5 µg/ml K13 und 5F11 (gesamter V9) in PBS bei 4 °C über Nacht mit 100 µl/Well gecoatet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit 300 µl/Well Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen (nach letztem Waschriff vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte → sämtliche

weitere Waschschritte fanden in identischer Weise statt) und mit 2 % BSA/PBS 0,05 % Tween 20 für 2 h bei RT geblockt (200 µl/Well). Während des Blockens konnten die Proben angesetzt werden.

Von allen Proben musste eine Verdünnungsreihe in 1:4 Schritten bis zu einem Minimum von 1/16384 mit 2 % BSA/PBS 0,05 % Tween 20 hergestellt werden. Es folgte eine Präinkubation der Proben für 1 h bei RT. Für die 5F11 gecoatete Platte wurde als Standard V9 mit 50 ng/ml in 2 % BSA/PBS 0,05 % Tween 20 verwendet und für die anderen beiden Platten V9 100 ng/ml + IL-3 3 ng/ml in 2 % BSA/PBS 0,05 % Tween 20. Von den Standards mussten Verdünnungsreihen in 1:2 Schritten bis 1/64 erstellt werden.

Nach dem Blocken folgte ein weiterer Waschschritt und die Aufgabe der Proben in Einzelwerten und der Standards in Doppelwerten (100 µl/Well für 45 min bei RT). Nach der Inkubation schloss sich ein weiterer Waschschritt an und die Detektionsantikörper mussten zugegeben werden (1 h bei RT mit 100 µl/Well). Die Konzentration aller Detektionsantikörper betrug 0,5 µg/ml in 2 % BSA/PBS 0,05 % Tween 20. Für die AK13 gecoatete Platte wurden 3F9-HRP + 5F11-HRP verwendet, für die anderen beiden Platten 3F9-HRP.

Nach der Inkubation folgte ein weiterer Waschschritt und die Zugabe von 100 µl TMB (1:1 aus Substrat A und B) pro Well. Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei RT im Dunkeln. Abgestoppt wurde mit 12,5 % H₂SO₄ mit 50 µl pro Well und die Absorption konnte anschließend am Tecan-Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm abgelesen werden.

4.7 Datenauswertung

Alle erhaltenen Daten aus FACS-Analysen wurden mittels der FACS-Diva Software 8.0.2 analysiert und in verwertbare Daten umgewandelt. Die Auswertung der VP-DSC-Daten erfolgte mit Origin 7, die Biacore-Daten wurden mit der Biacore Evaluierungssoftware 2.0.1 ausgewertet.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Software Excel 2016 durchgeführt. Je nach Anzahl der Proben wurden die Mittelwerte + „*standard deviation*“ (SD) oder Mittelwerte + „*standard error mean*“ (SEM) berechnet. Sämtliche Graphen, sofern es keine Originale aus einer anderen Auswertesoftware sind, wurden mit der Software GraphPad Prism 8.0.1 erstellt.

5. Ergebnisse

5.1 IL-3-Effekte und seine Regulation

5.1.1 Regulation der IL-3-Rezeptoren CD123 und CD131 durch IL-3

Die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse zeigen einen Unterschied der Regulation des Oberflächenmarkers CD123 in Abhängigkeit der Zellpopulation.

Eine Hochregulation des Markers auf Eosinophilen findet, mit Ausnahme der Stimulation mit IL-3, bei allen Stimulationen im geringen Umfang statt (maximale Steigerung von 18.230 ± 962 auf 20.510 ± 438 MFI bei GM-CSF). Bei pDCs führt eine 1-stündige Inkubation mit IL-3, GM-CSF und TNF- α zu einer deutlichen Erhöhung (8985 ± 1377 auf 19920 ± 1025 , 21.507 ± 914 bzw. 17.741 ± 741 MFI) und mit LPS zu einer moderaten (auf 14.339 ± 179 MFI) der Markerexpression.

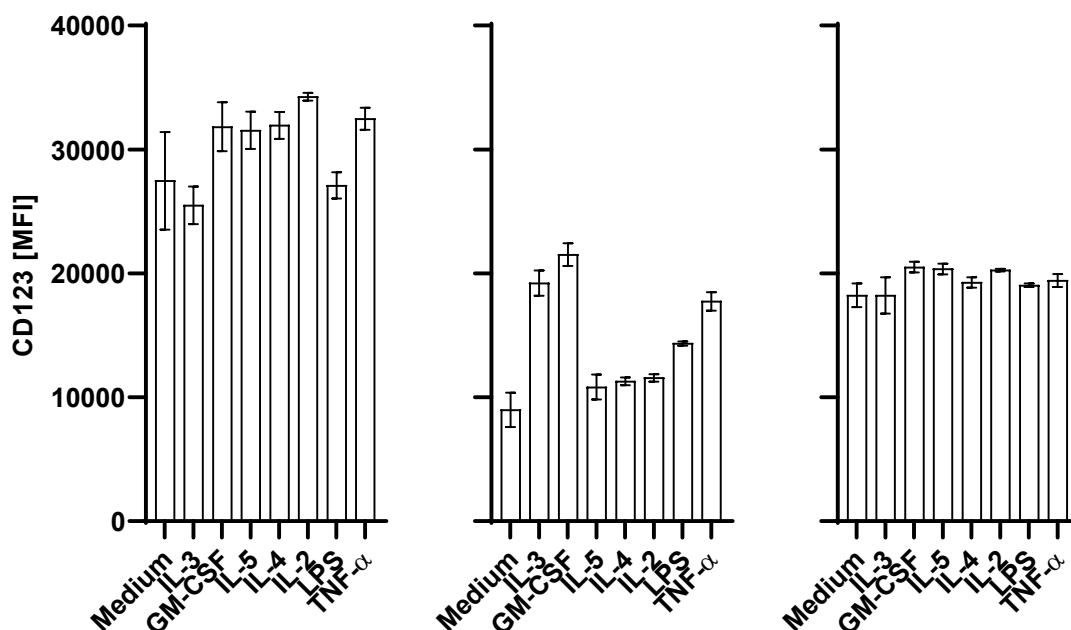


Abbildung 10: Regulation des IL-3-Rezeptors CD123 auf Blutleukozyten

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit Medium (RPMI 1640), Zytokinen (20 ng/ml) oder LPS (1 μ g/ml) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD123-Expression aller Zellen der Zellpopulationen Basophile (links), pDC (Mitte) und Eosinophile (rechts) per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der Medianwerte + SD (n=2).

Der Einfluss bei Basophilen ist nicht im selben Maße ausgeprägt wie bei pDCs. GM-CSF, IL-5, IL-4, IL-2 und TNF- α führen zu einer moderaten Steigerung (von

27.470 ± 3937 auf maximal 34.255 ± 315 MFI bei IL-2) und IL-3 zu einem Absinken der Expression (25.488 ± 1520 MFI).

Die Regulation des Markers CD131 zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der gewählten Zellpopulation. Bei pDCs und Eosinophilen führt die Inkubation mit sowohl IL-3 als auch GM-CSF zu einer Reduktion der Expression. Innerhalb der Zellpopulation der pDCs ist ein fast vollständiges Absinken zu detektieren (1400 ± 42 auf 43 ± 5 bzw. 35 ± 10 MFI). Bei Eosinophilen hingegen sinkt die CD131-Expression weniger stark ab (2294 ± 106 auf 1396 ± 101 bzw. 1131 ± 61 MFI).

Eine Inkubation mit IL-3 ruft eine fast vollständige Reduktion der CD131-Expression bei Basophilen hervor (6631 ± 132 auf 509 ± 23 MFI). Durch GM-CSF und LPS konnte ebenfalls eine geringere Reduktion der Expression erzielt werden (4903 ± 76 respektive 4597 ± 52 MFI). Eine Reproduktion dieser Ergebnisse war für verschiedene Spen-der möglich.

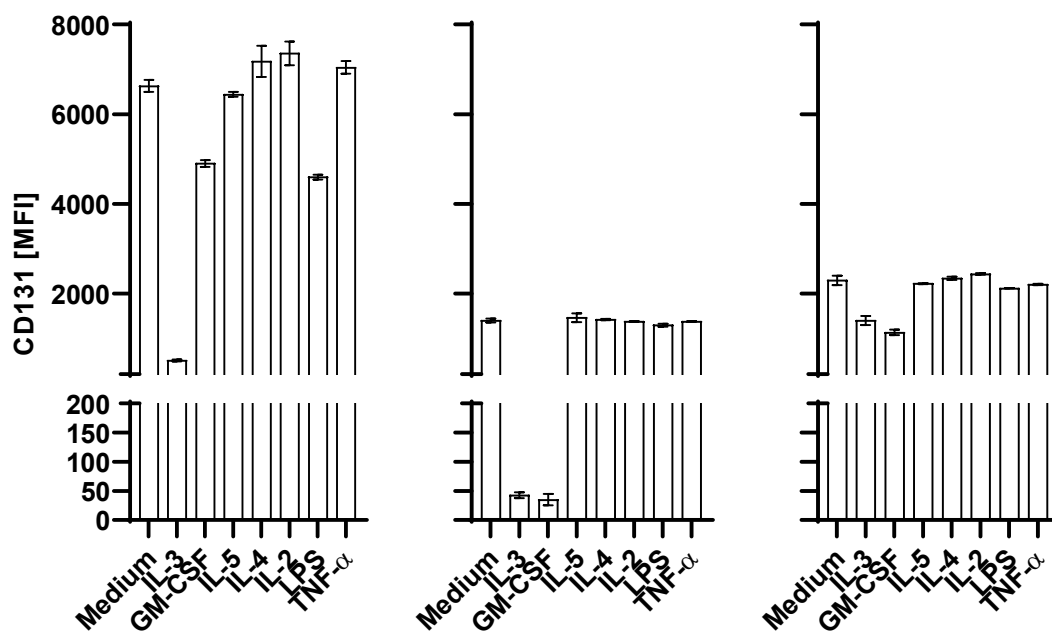


Abbildung 11: Regulation des IL-3-Rezeptors CD131 auf Blutleukozyten

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit Medium (RPMI 1640), Zytokinen (20 ng/ml) oder LPS (1 µg/ml) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Zellen der Zellpopulationen Basophile (links), pDC (Mitte) und Eosinophile (rechts) per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der Medianwerte + SD (n=2).

5.1.2 CD131-Expressionsregulation auf Basophilen

Eine 24 h-Inkubation mit den in Abbildung 12 aufgeführten Zytokinen führt zu einer Regulation und einer deutlichen Expressionsreduktion des Markers CD131 auf Basophilen.

Eine Stimulation mit IL-4, IL-18 oder der Kombination IFN- λ 1+ λ 2+ λ 3 führt zu einer geringfügigen Reduktion der Expression von 5046 MFI auf 4292, 4109 bzw. 4313 MFI.

Die Stimulation mit den Zytokinen IL-12, IL-23, IL-27 oder IL-35 zeigt keinen Einfluss auf die Rezeptorregulation. Jedoch die Stimulation mit IL-2, IL-15, IFN- α oder LPS reduzieren die Expression. IL-2 und IL-15 senken die Expression am stärksten auf 1484 bzw. 1272 MFI. IFN- α und LPS auf 2077 bzw. 1764 MFI.

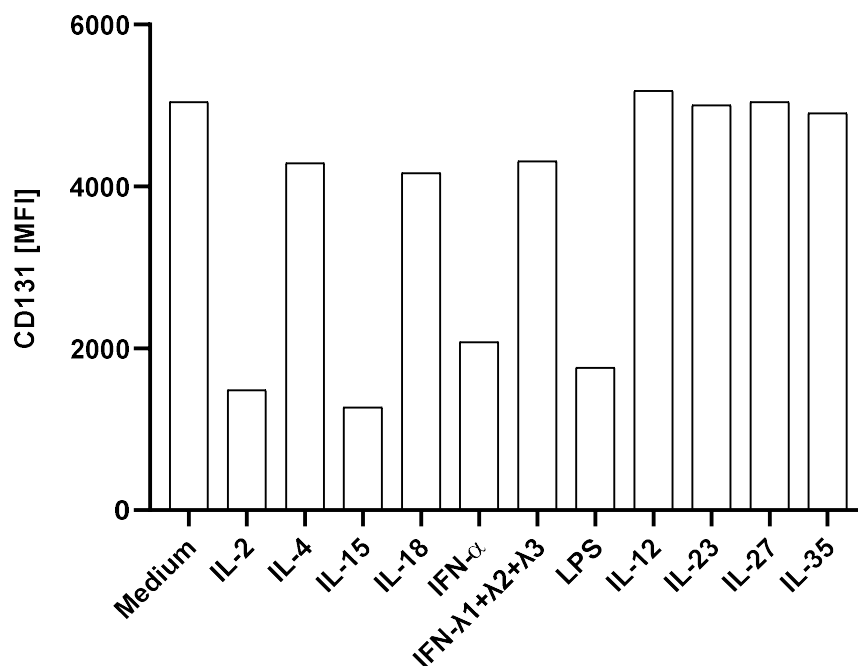


Abbildung 12: CD131-Rezeptorregulation auf Basophilen durch Zytokine

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit Medium (RPMI 1640), Zytokinen (20 ng/ml) oder LPS (1 μ g/ml) für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Basophilen per FACS-Analyse. Einzelwerte.

Darüber hinaus bewirkt die Inkubation mit IL-2 und IL-15 eine IL-3-Ausschüttung von 15 respektive 11,2 pg/ml. Die Stimulation mit LPS (2,3 pg/ml) und IL-27 (2,9 pg/ml) führt ebenfalls zu einer IL-3-Expression im niedrigen Picogramm-Bereich. Zudem sind bei IFN- α und IL-23 kleinste Mengen IL-3 zu detektieren (0,41 bzw. 1,06 pg/ml). Da Zytokine wie IL-2 und IL-15 nicht direkt mit CD131 interagieren, sondern wie oben

beschrieben eine Freisetzung von IL-3 induzieren, ist die Herunterregulation von CD131 als von IL-3 vermittelter indirekter Effekt anzusehen.

Alle anderen Stimulationen bewirken keine Ausschüttung von IL-3 (Abbildung 13).

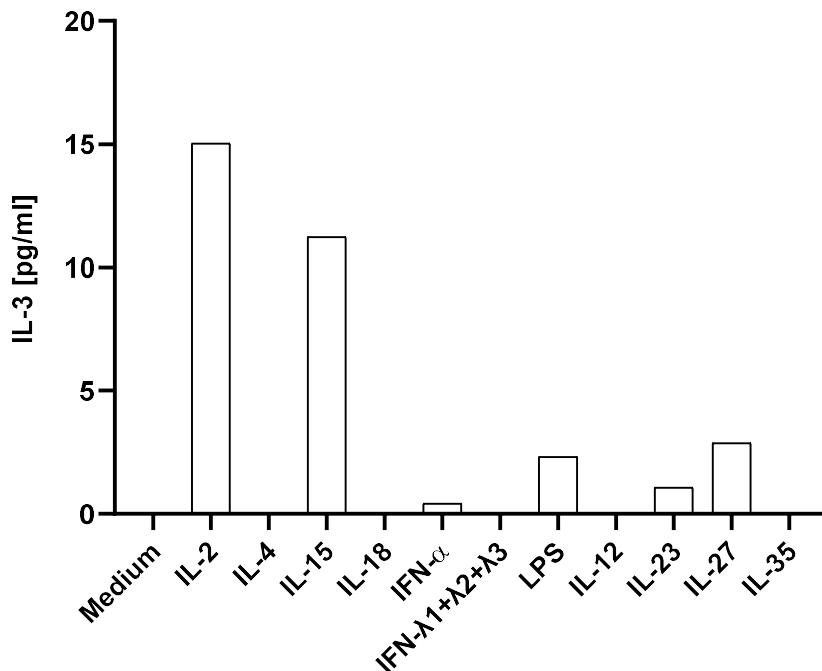


Abbildung 13: IL-3-Expression von humanen Blutleukozyten nach Zytokinstimulation
Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit Medium (RPMI 1640), Zytokinen (20 ng/ml) oder LPS (1 µg/ml) für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände und die Ermittlung der IL-3-Konzentration mittels IL-3-ELISA (siehe 4.1.3). Einzelwert.

5.1.3 Blockade der IL-3-Effekte

Bei der positiven Kontrolle, welche mit IL-3 durchgeführt wurde, kann mit zunehmender IL-3-Konzentration eine abnehmende CD131-Expression auf Basophilen mit einem Minimum bei 250 pg/ml von $886,5 \pm 0,5$ MFI beobachtet werden (Mediumskontrolle 4515 ± 105 MFI).

Eine Inkubation mit dem anti-IL-3R Antikörper MAB 301, der Variante V9, einem anti-GM-CSF oder einer Kombination aus V9 und anti-GM-CSF führt zu keiner Regulation von CD131.

Die Stimulation mit 20 ng/ml IL-2 hingegen reduziert die detektierte Expression auf 1274 ± 21 MFI. Wurde unter Stimulation mit IL-2 gleichzeitig die Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor CD123 entweder durch die Blockade von IL-3 (V9) oder des Rezeptors (MAB 301) inhibiert, reduziert sich die erzielte Expressionsverringerng deutlich

auf 3254 ± 36 bzw. 3509 ± 12 MFI. Eine Blockade von GM-CSF hat ebenfalls eine geringere Inhibition der Regulation auf 1682 ± 102 MFI (IL-2 1274 ± 21 MFI) zur Folge. Die Kombination aus V9 und anti-GM-CSF blockiert die durch IL-2-Stimulation erzielte Regulierung von CD131 vollständig (Abbildung 14). Die Ergebnisse wurden durch reproduzierbare Ergebnisse mit weiteren Spendern verifiziert.

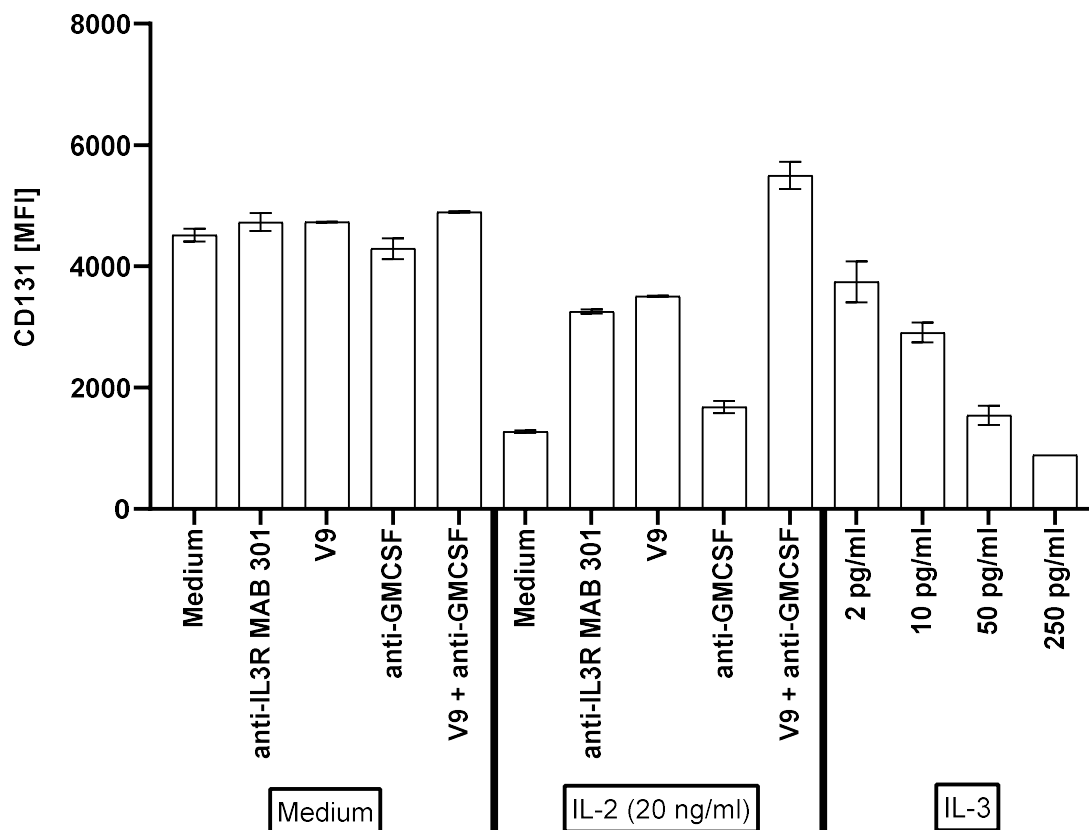


Abbildung 14: CD131 Expressionsregulation durch IL-2 auf Basophilen

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit Medium (RPMI 1640) + blockierende Antikörper (10 μ g/ml), IL-2 (20 ng/ml) + blockierende Antikörper (10 μ g/ml) oder IL-3 für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Alle Antikörper wurden mit 10 μ g/ml eingesetzt. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Basophilen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=2).

5.1.4 NK-Depletion

Die CD56-Depletion wurde mit einem MACS-Check überprüft. Der Vergleich zwischen Scheindepletion und CD56-Depletion ist in Abbildung 15 dargestellt und zeigt eine vollständige Depletion von CD56+ Zellen. Erkennbar ist dies am vollständigen Verschwinden der beiden CD56+ Populationen, welche zwischen 1000 (10^3) – 10.000 (10^4) oder 10.000 (10^4) – 100.000 (10^5) liegen. Die Depletion der CD56+ Zellen liegt bei $\geq 99\%$. Nach Depletion der CD56+ Zellen sinkt die Ausschüttung von GM-CSF deutlich ab (von $202,4 \pm 32,1$ (IL-2 10 ng/ml + IL-18 50 ng/ml); $77,5 \pm 5,9$; $114,8 \pm 4,3$; $406,3 \pm 42,8$ pg/ml (IL-2 100 ng/ml + Medium; IL-12 50 ng/ml; IL-18 50 ng/ml) auf 0 ± 0 ; $1,94 \pm 1,94$; $1,16 \pm 1,07$; $1,94 \pm 1,94$ pg/ml).

IL-3 ist nur noch in Spuren zu detektieren, ausgehend von einem maximalen Wert von $13,68 \pm 9,6$ pg/ml bei IL-2 100 ng/ml + IL-18 50 ng/ml. Auch die Expression von IFN- γ verringert sich erheblich und kann nur noch bei IL-2 100 ng/ml + IL-12/IL-18 50 ng/ml detektiert werden. Die Werte verringern sich von ca. $4830 \pm 274,8$ bzw. $3000 \pm 660,7$ auf $705 \pm 28,5$ bzw. $64 \pm 59,8$ pg/ml.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass IL-3 auch von NK-Zellen exprimiert werden kann, wenn diese stimuliert werden. Hochdosierte IL-2 oder die Kombination aus IL-2 und IL-18 sind dabei besonders effektiv. Für GM-CSF ist seit längerem bekannt und gut untersucht, dass eine Expression durch NK-Zellen stattfinden kann. Für IL-3 ist dies bisher nicht so beschrieben und stellt eine wichtige Information für unser Verständnis der IL-3-Biologie dar.

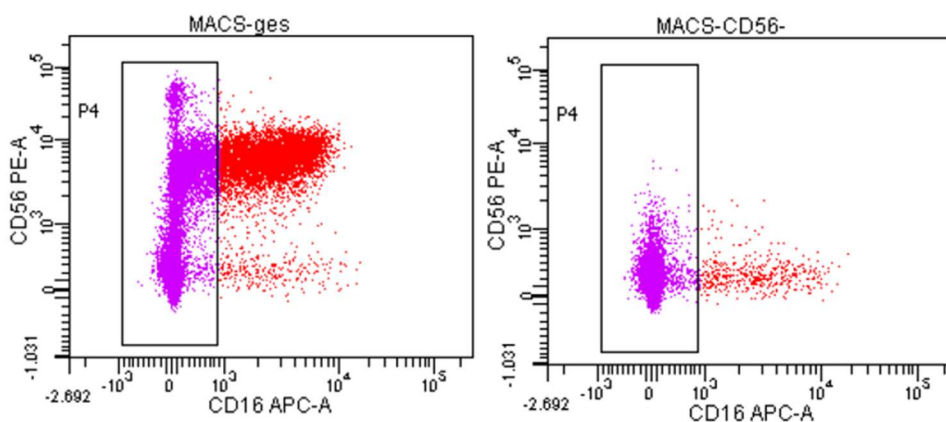


Abbildung 15: MACS-Check der CD56-Depletion

Mit Hilfe von anti-PE-Beads wurden CD56+ Zellen, welche zuvor mit PE-konjugierten CD56-Antikörpern gefärbt worden sind, aus PBMCs depletiert. Die Ermittlung der Anzahl CD56+ Zellen erfolgte per FACS-Analyse. Links: Scheindepletion; rechts: CD56-Depletion.

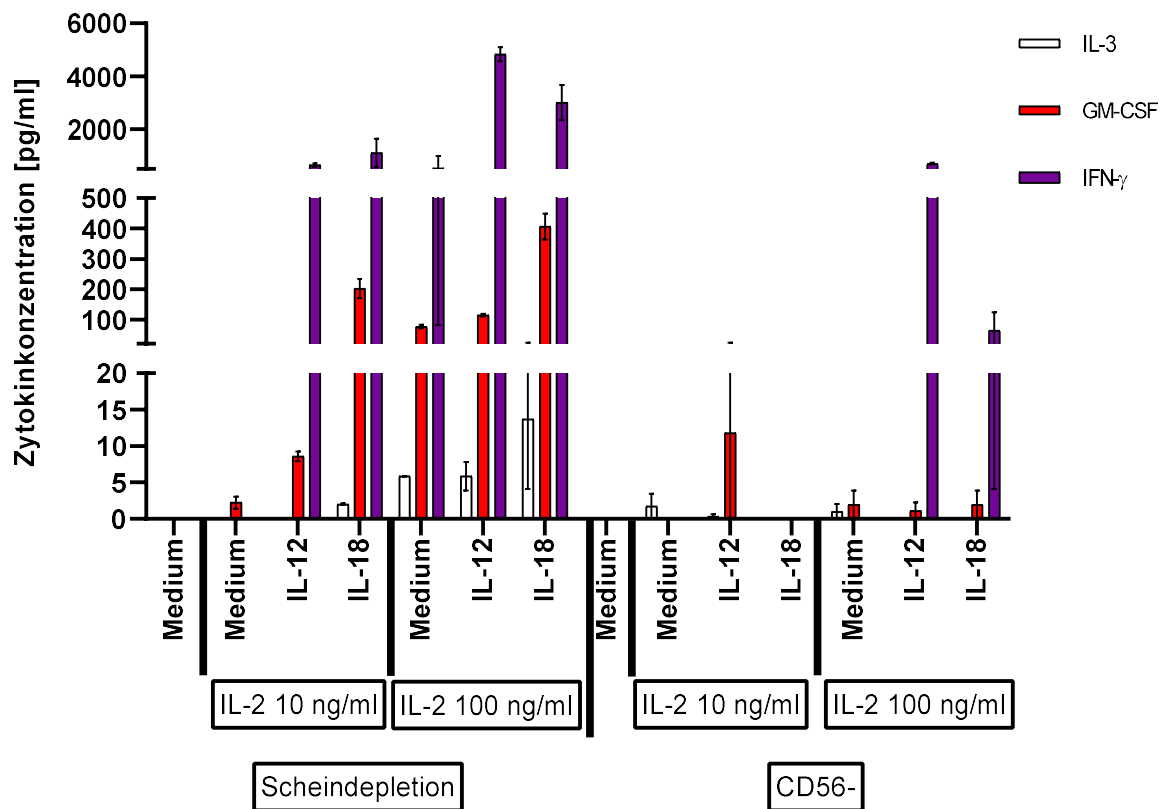


Abbildung 16: Von PBMCs ausgeschüttete Konzentrationen der Zytokine IL-3, GM-CSF und IFN- γ nach CD56-Depletion

Nach durchgeführter Depletion wurden die scheindepletierten oder CD56- Zellpopulationen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank unter Stimulation mit Medium oder den angegebenen Kombinationen aus IL-2 + Medium; IL-12 (50 ng/ml); IL-18 (50 ng/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände und die Ermittlung der Konzentration der in der Legende aufgeführten Zytokine mittels ELISA (siehe 4.1.3). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=2).

5.1.5 NK- und T-Zell-Depletion

Die erfolgreiche Depletion von CD3- oder CD56-Zellen konnte mit Hilfe eines MACS-Checks verifiziert werden.

Mit ansteigender Inkubationsdauer steigen auch die detektierten IL-3-Konzentrationen von $29,28 \pm 17,79$ pg/ml auf $120,67 \pm 8,43$ pg/ml (Scheindepletion, Medium). Dieser Trend kann bei der Scheindepletion und CD56-Depletion bei allen Stimulationen beobachtet werden. Eine Inkubation mit IL-2 verringert die IL-3-Konzentration und die Kombination aus IL-2 und IL-18 verringert die IL-3-Konzentration weiter (Beispiel: CD56- 5d: von $221,4 \pm 19,48$ über $146 \pm 2,4$ auf $113,4 \pm 27,9$ pg/ml). Dieses gilt ebenfalls für die Scheindepletion und CD56-Depletion.

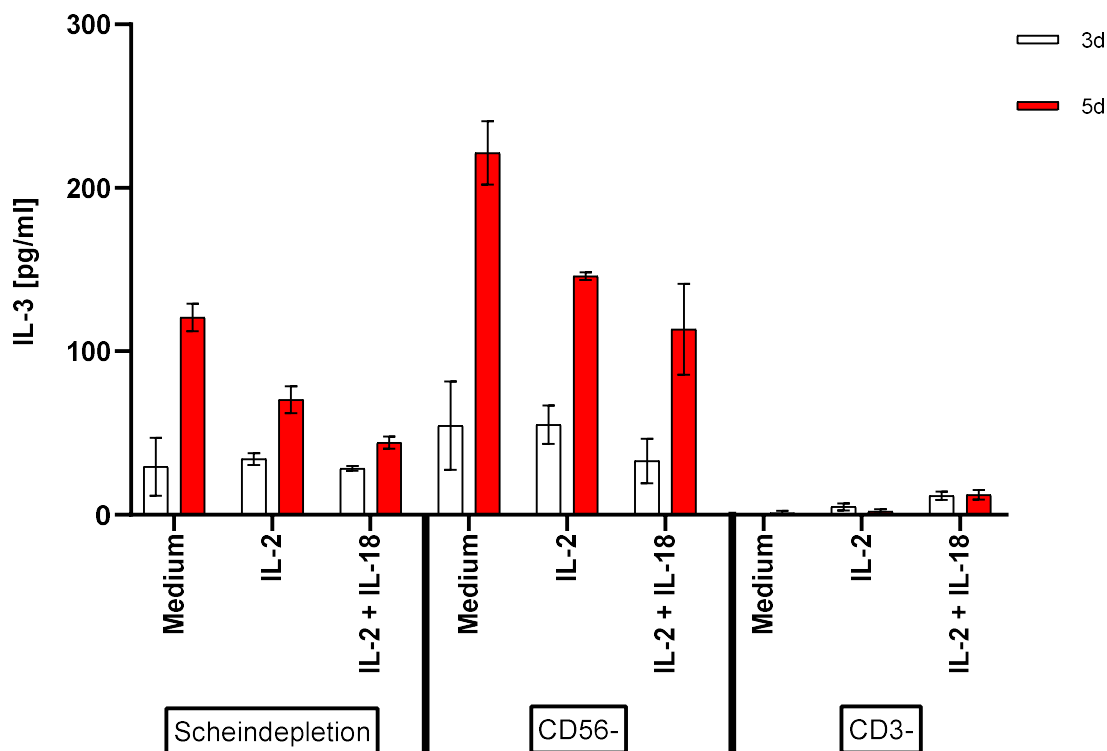


Abbildung 17: IL-3-Expression von PBMCs nach NK- oder T-Zell-Depletion

Nach durchgeführter Depletion wurden die scheindepletierten, CD56- oder CD3- Zellpopulationen für 3 oder 5 Tage (3 oder 5 d) bei 37 °C im Brutschrank unter Stimulation mit Medium, IL-2 (100 ng/ml) oder IL-2 (100 ng/ml) + IL-18 (25 ng/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände und die Ermittlung der IL-3-Konzentration mittels ELISA (siehe 4.1.3). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=3).

Generell betrachtet sind bei CD56- höhere IL-3-Konzentrationen zu detektieren als in der Scheindepletion. Wurden die CD3-Zellen depletiert, erhöhen sich die detektierten IL-3 Werte nur geringfügig und betragen maximal $12,1 \pm 3$ pg/ml.

Die Verläufe der Scheindepletion und der CD3-Depletion ähneln sich bei der GM-CSF-Expression nur teilweise. Eine reine Stimulation mit Medium führt zu keiner GM-CSF-Produktion. Die Stimulation mit IL-2 führt zur Ausschüttung von GM-CSF und die GM-CSF-Ausschüttung wird maximal bei einer Stimulation mit IL-2 + IL-18, wobei die Konzentration nach drei Tagen ca. doppelt so hoch ist wie nach einem Tag (Scheindepletion: $1117 \pm 74,5$ auf $2041,4 \pm 218,4$ pg/ml und CD3-: $1079,5 \pm 55,4$ auf $2077,4 \pm 122$ pg/ml).

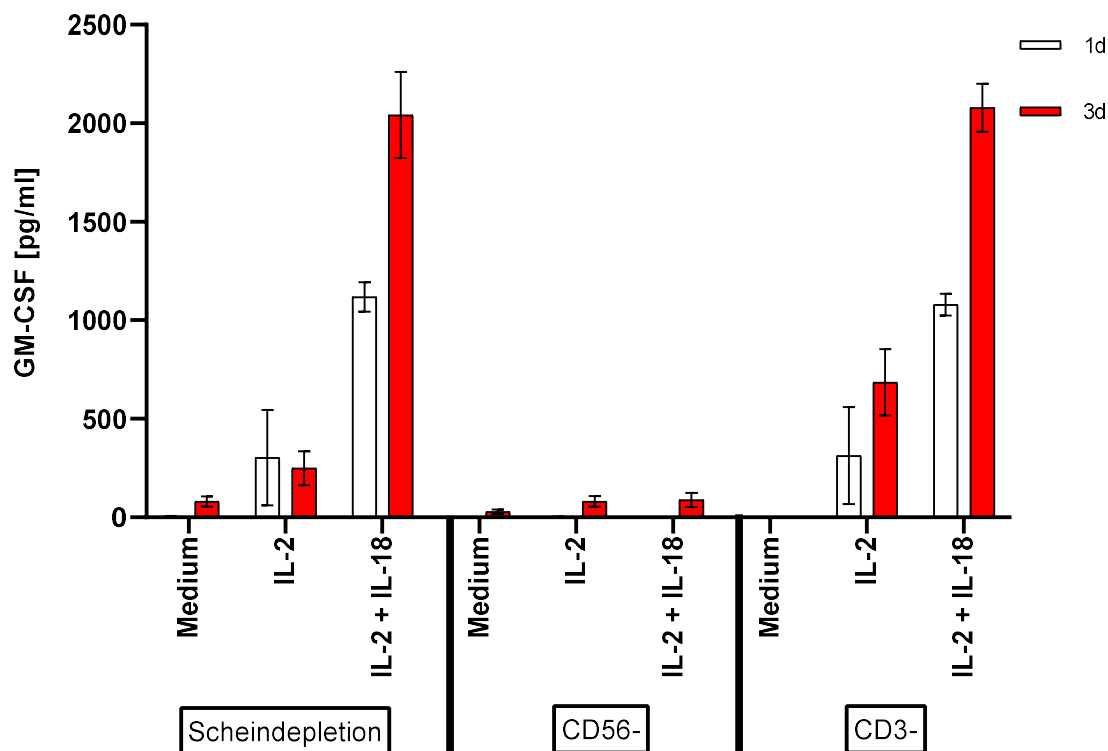


Abbildung 18: GM-CSF-Expression von PBMCs nach NK- oder T-Zell-Depletion

Nach durchgeführter Depletion wurden die scheindepletierten, CD56- oder CD3- Zellpopulationen für 1 oder 3 Tage (1 oder 3 d) bei 37 °C im Brutschrank unter Stimulation mit Medium, IL-2 (100 ng/ml) oder IL-2 (100 ng/ml) + IL-18 (25 ng/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände und die Ermittlung der GM-CSF-Konzentration mittels ELISA (siehe 4.1.3). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=3).

Werden die CD56-Zellen depletiert, kann IL-2 oder IL-2 + IL-18 keine wesentliche Freisetzung von GM-CSF mehr induzieren, was darauf hindeutet, dass der Großteil des GM-CSF von NK-Zellen stammt. T-Zellen tragen auch nach drei Tagen Inkubation nicht wesentlich zur GM-CSF-Expression bei. Dies steht im Gegensatz zur IL-3-Expression (Abbildung 18).

5.1.6 Charakterisierung von T-Zellen

Die Unterteilung der T-Zellen in Subpopulationen ist in Abbildung 19 beispielhaft für CD8+ T-Zellen in Versuch 2 dargestellt. Aus allen einzelnen Lymphozyten (ohne Zelldebris) werden über CD4 und CD8 die CD4+ und CD8+ T-Zellen ermittelt. Bei Versuch 1 erfolgt vor diesem Schritt ein Gating auf alle CD3+ Zellen, welches bei Versuch 2 nach Stimulation mit anti-CD3 nicht mehr möglich war. Anhand der Marker CCR7 und CD45RA erfolgt die Unterteilung in T_n (*naive*), T_{cm} (*central memory*), T_{em} (*effector*

memory) und Tte (*terminal effector*). Mit Hilfe von CD28 wird bei Tem eine Unterteilung in Tem und Ttm (*transitional memory*) und bei Tte in CD28 hi und lo vorgenommen.

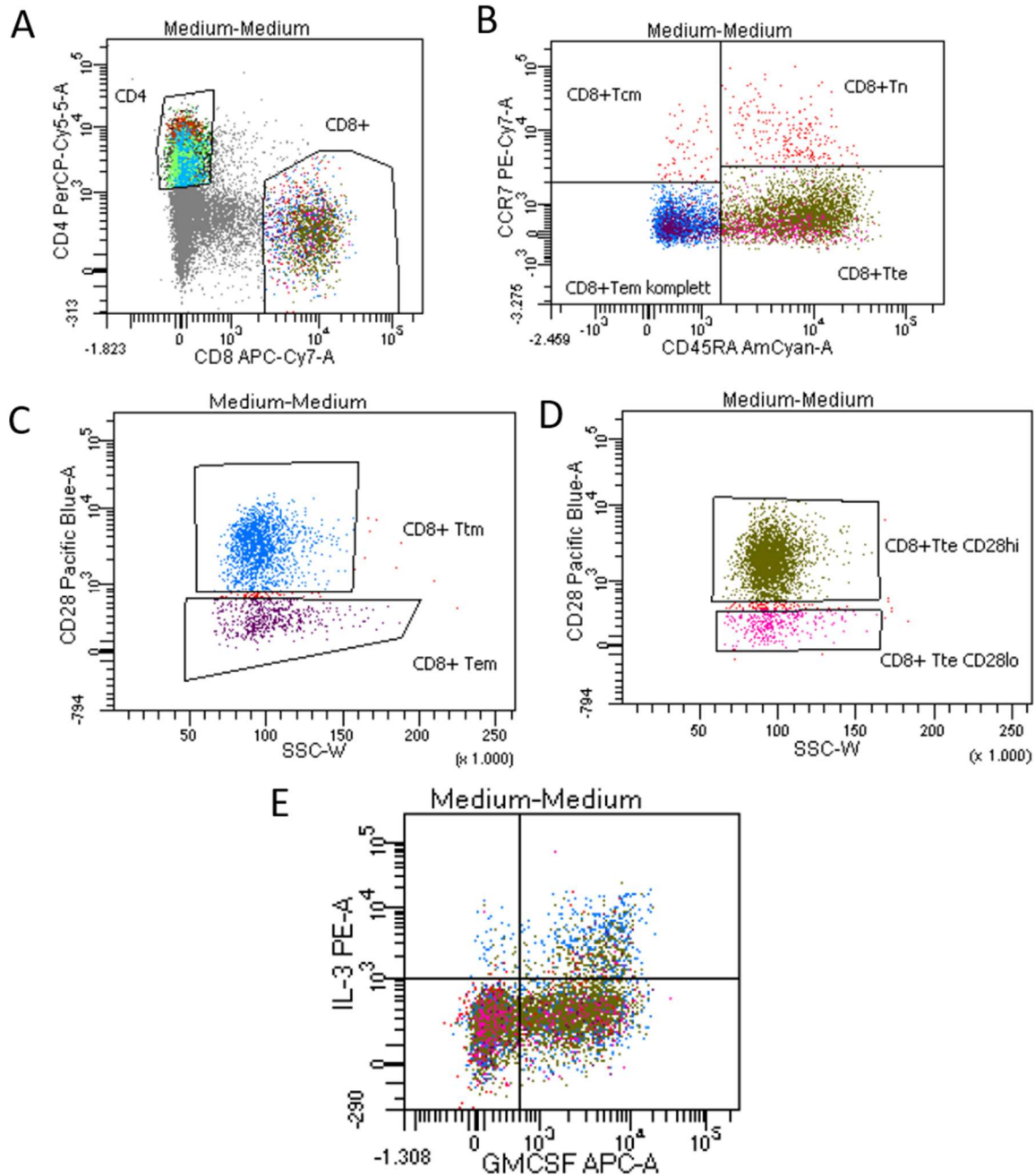


Abbildung 19: Gating der T-Zell-Charakterisierung am Beispiel von CD8+ T-Zellen

A: Unterteilung in CD8+ und CD4+ T-Zellen; B: Unterteilung in Tn, Tcm, Tem und Tte anhand von CCR7 und CD45RA; C: Unterteilung von Tem in Ttm und Tem anhand von CD28; D: Unterteilung in Tte CD28 hi und lo anhand von CD28; E: Darstellung aller CD8+ Zellen hinsichtlich ihrer IL-3 und/oder GM-CSF-Expression.

IL-3+ unstimulierte T-Zellen

Versuch 1 wurde ohne jedwede vorherige Stimulation durchgeführt. Somit sollte eine normale IL-3-Expression von T-Zellen untersucht werden. Diese zeigt unterschiedliche Verhältnisse bei CD4+ und CD8+ Zellen. Bei CD4+ Zellen wurde nur zwischen CD45RA positiv und negativ unterschieden. CD45RA ist damit assoziiert, dass die tragenden Zellen keine Effektorfunktionen aufweisen. Bei CD8+ T-Zellen zeigt sich die Population T_{hm} als Hauptproduzent von IL-3. Je nach Spender waren 0,5-1 % der T_{hm}-Zellen IL-3+. Alle anderen Populationen bleiben unabhängig vom Spender deutlich darunter. Bei CD4+ Zellen machen CD45RA- Zellen den größten Teil an IL-3+ Zellen aus.

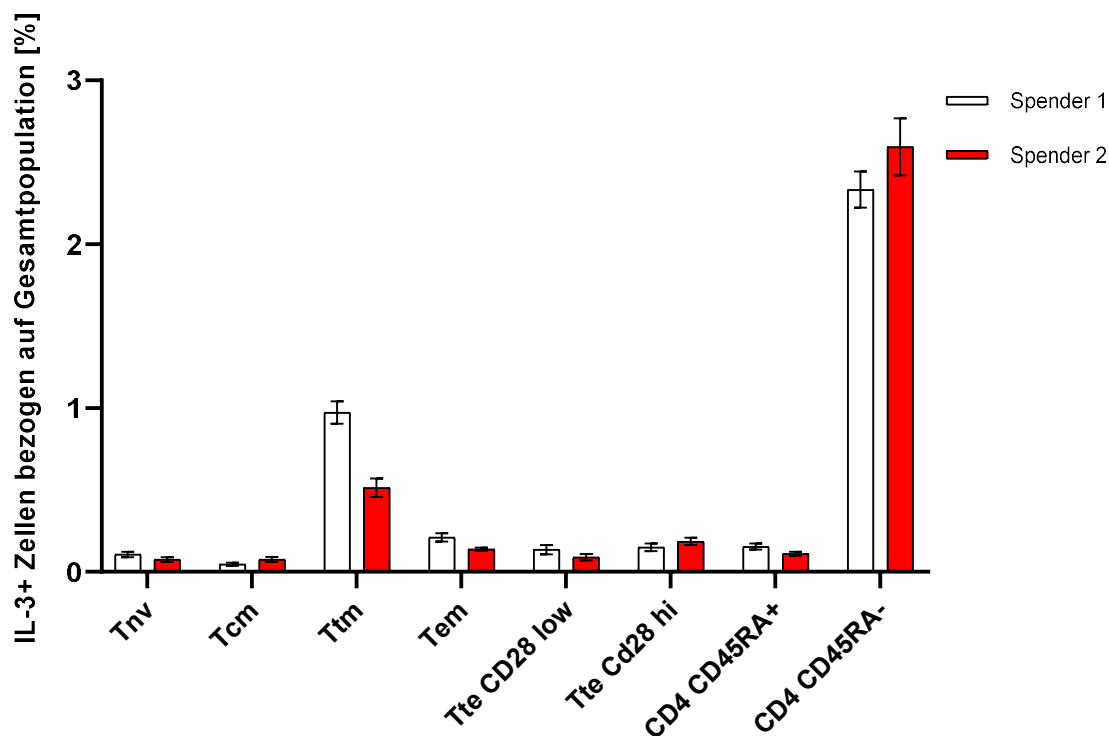


Abbildung 20: IL-3+ unstimulierte T-Zellen

Ohne vorherige Stimulation wurden die PBMCs mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und die Zellzahlen der Populationen per FACS-Analyse ermittelt. Ermittelt wurde der Anteil an IL-3+ T-Zellen der einzelnen T-Zell-Populationen an der Gesamtheit aller T-Zellen. CD8+ Subpopulationen wurden auf alle CD8+ T-Zellen als Gesamtpopulation und CD4+ Subpopulationen auf alle CD4+ T-Zellen als Gesamtpopulation bezogen Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=4).

IL-3-Produktion stimulierter T-Zellen

In Abbildung 21 sind die totalen IL-3+ Zellzahlen der einzelnen T-Zell-Subpopulationen pro μl dargestellt. Sowohl bei CD8+ als auch CD4+ T-Zellen erhöht die zweitägige Stimulation mit IL-2 100 ng/ml + anti-CD3 5 $\mu\text{g/ml}$ die gesamte Zellzahl deutlich ($10,71 \pm 0,99$ auf $40,97 \pm 4,59$ Zellen/ μl bzw. $30,43 \pm 2,08$ auf $46,6 \pm 3,59$ Zellen/ μl). Bei einer dreitägigen Stimulation mit IL-2 und folgender zweitägigen anti-CD3-Stimulation kommt es nur bei CD8+ T-Zellen zu einer leichten Steigerung, wohingegen die Zellzahlen bei CD4+ T-Zellen nahezu gleichbleibend sind. Den größten Anteil der IL-3+ Zellen machen bei CD8+ Zellen die Populationen T_{tm} und T_{te} CD28^{hi} aus, genau wie bei den CD4+ T-Zellen. Die Populationen T_{cm}, T_n und T_{em} sind bei beiden nur in geringer Zellzahl vorhanden (unter 2,5 Zellen/ μl). Die Zellzahlen der Populationen steigen bei den CD8+ Zellen durch eine dreitägige Stimulation, gefolgt von einer zweitägigen anti-CD3-Stimulation leicht an, wohingegen sie bei den CD4+ T-Zellen leicht sinken. Eine Regulation der Zellzahlen ist, wie bei der Gesamtzellzahl, insbesondere bei einer zweitägigen Stimulation von IL-2 und anti-CD3 zu beobachten. Bei den CD8+ T-Zellen steigt die Zahl der T_{te} CD28^{hi} von $3,49 \pm 0,48$ auf $26,84 \pm 3,91$ Zellen/ μl an. Steigerungen sind auch bei T_{tm} (CD8+ und CD4+) zu detektieren.

Insgesamt steigt der Anteil an IL-3+ bei einer zweitägigen Stimulation mit IL-2 und anti-CD3 bei CD8+ T-Zellen von $5,5 \pm 0,45$ auf $18,45 \pm 1,02$ % und bei CD4+ T-Zellen von $5,86 \pm 0,34$ auf $9,11 \pm 0,43$ %. Bei einer dreitägigen Stimulation mit IL-2, gefolgt von einer zweitägigen anti-CD3-Stimulation, wird dies nicht beobachtet. Hier sinken die Werte von $10,98 \pm 1,05$ auf $9,69 \pm 0,36$ % bei den CD8+ T-Zellen und bei den CD4+ T-Zellen stärker von $5,56 \pm 0,4$ auf $3,83 \pm 0,34$ %.

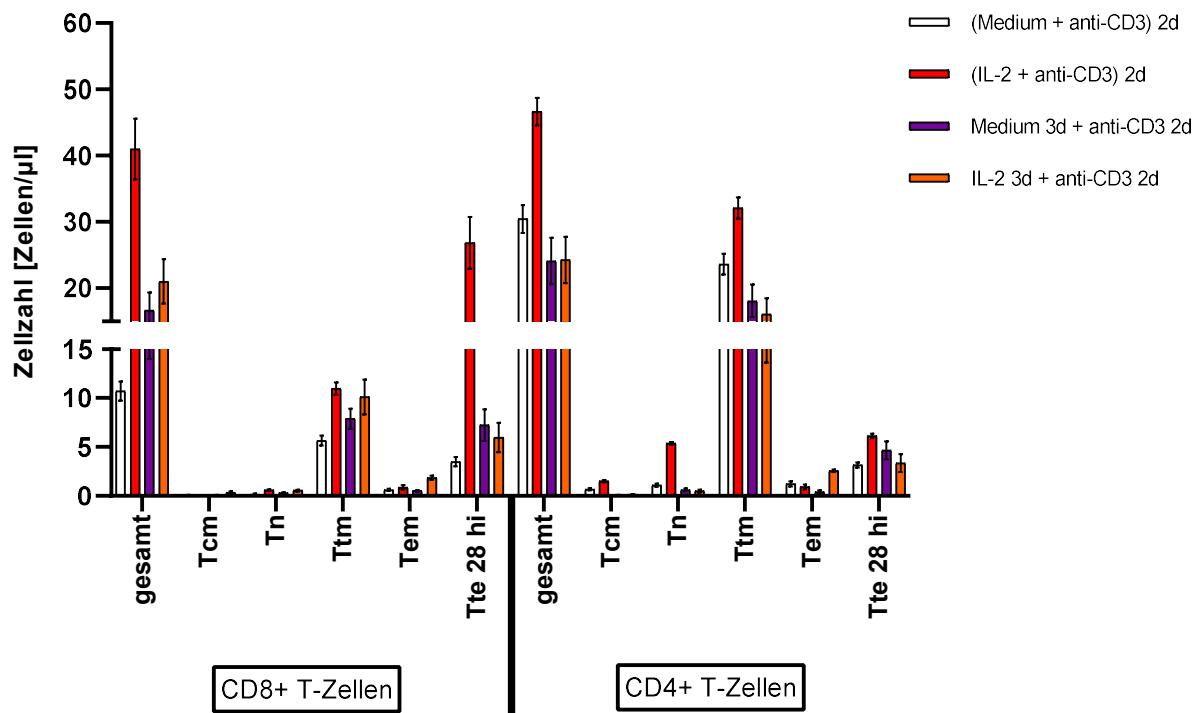


Abbildung 21: Zellzahlen der IL-3+ T-Zellen nach anti-CD3-Stimulation

PBMCs wurden für insgesamt 2 oder 5 d entsprechend der Legende bei 37 °C im Brutschrank stimuliert (IL-2 100 ng/ml), anti-CD3 5 µg/ml). Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörpern und die Ermittlung der Zellzahlen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=5).

Die zahlenmäßig größten Subpopulationen machen auch den größten Anteil an den IL-3+ Zellen aus. Bei den CD8+ T-Zellen sind dies die Populationen Ttm und Tte CD28hi. Rund 50 % der IL-3+ T-Zellen entfallen auf die Population Ttm. Eine Ausnahme bildet IL-2 + anti-CD3 für zwei Tage. Hier sinkt der Anteil auf $27,01 \pm 2,06$ %. Gleichzeitig steigt der Anteil der Tte CD28hi auf $65,27 \pm 2,47$ % an. Ansonsten beträgt der Anteil dort 30-40 %.

Bei den CD4+ T-Zellen ist die Population Ttm die größte Quelle der IL-3+ Zellen und macht rund 70 % aus. Ohne IL-2 beträgt der Anteil sogar 75-77 %. Der restliche Anteil entfällt, wie bei den CD8+ T-Zellen, größtenteils auf die Tte CD28hi-Population mit ca. 10-12 % und $19,25 \pm 1,73$ % bei der Kontrolle der dreitägigen Stimulation mit Medium, gefolgt von einer zweitägigen anti-CD3-Stimulation.

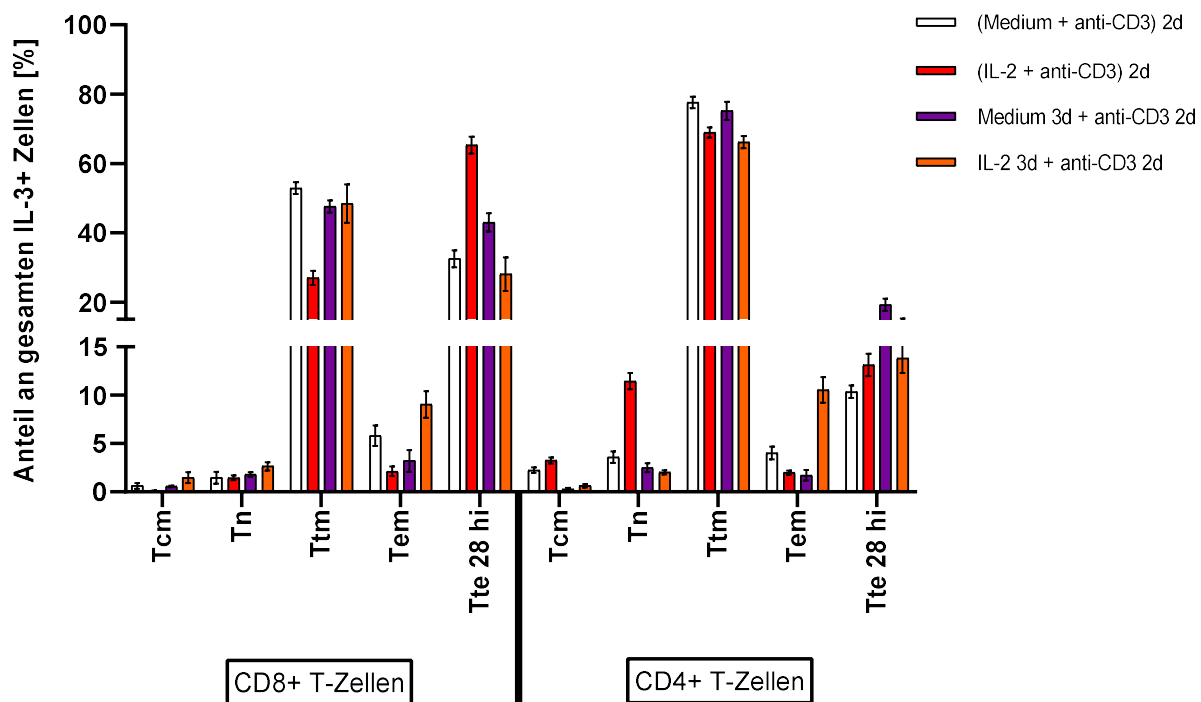


Abbildung 22: Verteilung der IL-3+ T-Zellen innerhalb der Subpopulationen

PBMCs wurden für insgesamt 2 oder 5 d entsprechend der Legende bei 37 °C im Brutschrank stimuliert (IL-2 100 ng/ml), anti-CD3 5 µg/ml). Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörpern und die Ermittlung der Zellzahlen per FACS-Analyse. Ermittelt wurde der Anteil an IL-3+ T-Zellen der einzelnen T-Zell-Populationen an der Gesamtheit aller T-Zellen. CD8+ Subpopulationen wurden auf alle CD8+ T-Zellen als Gesamtpopulation und CD4+ Subpopulationen auf alle CD4+ T-Zellen als Gesamtpopulation bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=5).

Die Ergebnisse des ELISA sind in Abbildung 23 dargestellt. Die fünftägige Stimulation mit IL-2 (100 ng/ml) führt lediglich zu einer geringen Ausschüttung von IL-3 mit $132,29 \pm 46,22$ pg/ml bei Spender 1 und liegt somit unter der von der Kontrolle mit $174,59 \pm 51,82$ pg/ml. Ein ähnlicher Verlauf und Wert wird auch für Spender 2 beobachtet. Die GM-CSF Ausschüttung wird bei beiden Spendern erhöht, vor allem bei Spender 2 von $117,56 \pm 35,25$ pg/ml auf $778,91 \pm 246,24$ pg/ml.

Eine zweitägige Stimulation mit IL-2 und anti-CD3 führt ebenfalls zu einer geringen IL-3-Ausschüttung bei Spender 1, allerdings mit hoher Fehlerabweichung ($186,47 \pm 228,38$ pg/ml bei einer Kontrolle mit $336 \pm 527,27$ pg/ml). Der Verlauf für Spender 2 ist mit geringeren Werten ähnlich. Die Ausschüttung von GM-CSF erhöht sich bei beiden Spendern mit einer IL-2 Stimulation bei Spender 1 von 0 auf $302 \pm 281,85$ pg/ml und Spender 2 von $370,78 \pm 209$ auf $1195,96 \pm 201,04$ pg/ml.

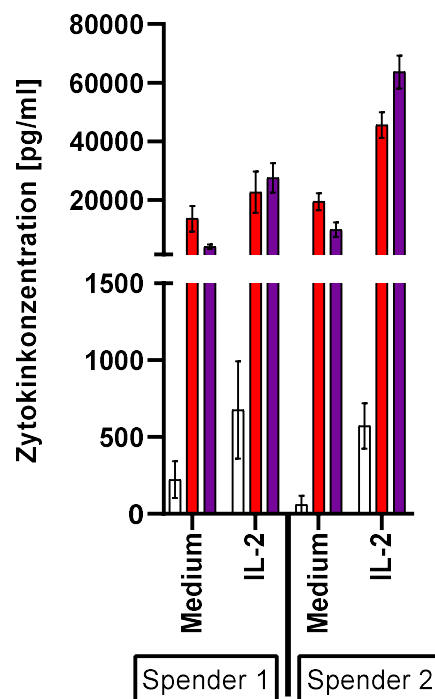
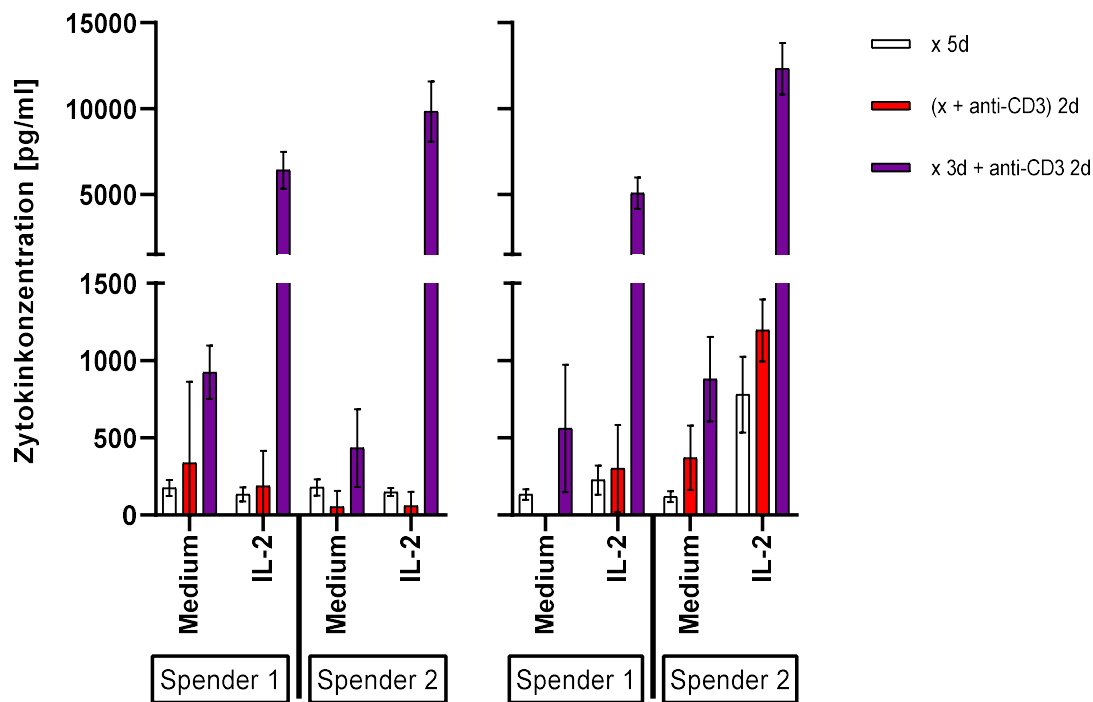


Abbildung 23: ELISA der T-Zellen nach IL-2 und anti-CD3-Stimulation

PBMCs wurden für insgesamt 2 oder 5 d entsprechend der Legende bei 37 °C im Brutschrank stimuliert mit Medium, IL-2 (100 ng/ml) und anti-CD3 (5 µg/ml) (x entspricht der Angabe der X-Achse). Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände und die Ermittlung der Konzentration der Zytokine IL-3 (oben links), GM-CSF (oben rechts) und IFN-γ (unten) mittels ELISA (siehe 4.1.3). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=5).

Die insgesamt fünftägige Stimulation (dreitägig IL-2 gefolgt von zweitägig anti-CD3) führt zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von IL-3 und GM-CSF. Bereits bei Medium werden bei Spender 2 für IL-3 $432,97 \pm 252,49$ pg/ml und für GM-CSF $879,39 \pm 272,48$ pg/ml detektiert. Durch zusätzliche Stimulation mit IL-2 erhöht sich die Ausschüttung der beiden Zytokine erheblich auf $9836,16 \pm 1748,94$ pg/ml bzw. $12.321,03 \pm 1497,86$ pg/ml. Bei Spender 1 kann dieser Verlauf ebenfalls beobachtet werden, mit etwas geringeren maximalen Werten. Vergleicht man die zweitägigen Inkubationen der PBMCs mit anti-CD3 (mit oder ohne vorausgeschalteter dreitägiger „Ruhephase“ in Medium oder IL-2), so zeigt sich vor allem für IL-3 die massive Zunahme der IL-3-Expression durch die vorausgeschaltete „Ruhephase“. Dies gilt weniger ausgeprägt für GM-CSF und praktisch nicht für IFN- γ . Bei GM-CSF zeigt sich konsistent zu den oben dargestellten Ergebnissen, eine starke Expression durch NK-Zellen bei IL-2-Stimulation für fünf Tage. Dies gilt auch in Abwesenheit einer T-Zell-Stimulation mit anti-CD3.

5.2 Entwicklung von V9

Die Überprüfung des Erfolges der Entwicklung hin zu V9 wurde mittels des IL-3-Aktivitätsassays (4.1.2) durchgeführt und über den IC50-Wert bzw. ein Vielfaches der benötigten Referenzkonzentration zur Erzielung einer 50 %igen Hemmung angegeben.

P8C11 und P8C11-Chim

Ein Vergleich des ursprünglichen murinen anti-human-IL-3 Antikörpers P8C11 und seiner chimärisierten Variante ermittelte einen IC50-Wert für P8C11-Chim von 0,6x der benötigten Referenzkonzentration von P8C11. Ausgehend von P8C11-Chim wurden die weiteren Varianten entwickelt und P8C11-Chim fortan als Referenzantikörper verwendet.

Varianten a - i

Sämtliche zuerst generierten humanisierten Varianten mit verschiedenen leichten und schweren Ketten wiesen keine zufriedenstellende inhibitorische Aktivität auf (Tabelle 14). Von der besten Variante g wurde noch das 17,4x der Referenzkonzentration benötigt um den IC50-Wert zu erreichen. Daher folgte im weiteren Verlauf eine schrittweise Humanisierung.

Tabelle 14: IC50-Werte der Varianten a – i

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
P8C11-Chim	0,46	1,0
Variante a	35,0	76,1
Variante b	82,6	180
Variante c	115,6	251,3
Variante d	1044,3	2270,2
Variante e	287,5	625
Variante f	118,9	258,5
Variante g	8,0	17,4
Variante h	8,1	17,6
Variante i	10,3	22,4

Variante 1 und 2

Die Humanisierung der variablen Anteile nur der leichten oder nur der schweren Kette zeigte deutliche Auswirkungen auf die erhaltene inhibitorische Aktivität des Antikörpers. Wurde die schwere Kette des Antikörpers humanisiert, resultierte dieses in einem Anstieg auf die 39,5x Referenzkonzentration zur Erzielung einer 50 %igen Hemmung (Tabelle 15). Die Humanisierung der leichten Kette hingegen hatte keinen Einfluss auf den IC50-Wert, weshalb die schwere Kette im Verlauf schrittweise humanisiert wurde.

Tabelle 15: IC50-Werte der Varianten V1 und V2

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
P8C11-Chim	0,004	1,0
V1	0,003	0,75
V2	0,158	39,5

Varianten V2 – V12

Durch die Humanisierung von jeweils nur einer der drei Frameworkregionen FR1-3 wurden drei Varianten erzeugt 1, 2, 3. Es wurde innerhalb der schweren Kette die FR

identifiziert, welche im weiteren Verlauf weiter angepasst wurde. Während die Humanisierung von zwei FR zu einer Reduktion der benötigten Referenzkonzentration führte (0,67x respektive 0,5x), zeigte sich eine FR problematisch und der Wert stieg auf das 10,8x an. Die problematische FR wurde in drei Anteile unterteilt und jeweils nur einer humanisiert. Die Variante V7 wies mit 14x der Referenzkonzentration einen deutlich schlechteren Wert auf als die beiden Varianten V6 und V8 mit 0,93x bzw. 1,67x. Aufgrund des geringeren murinen Sequenzanteils wurde V8 als Grundlage zur Generierung von weiteren Varianten ausgewählt.

Tabelle 16: IC50-Werte der Varianten V3 – V12

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
P8C11-Chim (V3-V5)	0,06	1,0
V3	0,04	0,67
V4	0,65	10,8
V5	0,03	0,50
P8C11-Chim (V6-V8)	0,015	1,0
V6	0,014	0,93
V7	0,21	14,0
V8	0,025	1,67
P8C11-Chim (V9-V12)	0,33	1,0
V9	0,61	1,85
V10	2,79	8,45
V11	1,22	3,70
V12	1,49	4,52

Innerhalb der neu generierten Varianten wies die Variante V9 die beste inhibitorische Aktivität auf und mit 1,85x der Referenzkonzentration einen zufriedenstellenden Wert. Die anderen Varianten erzielten mit minimal 3,7x deutlich zu hohe Werte. Die Variante V9 wurde basierend auf diesen Ergebnissen als finale Variante ausgewählt.

Aufgereinigte und ungereinigte Antikörper

Nach Festlegung auf V9 als finale Variante, wurden sowohl P8C11-Chim als auch V9 in einer aufgereinigten Variante (innerhalb eines Puffers) ohne Zellkulturüberstände produziert. Diese wurden erneut untersucht, um einen Verlust der Aktivität auszuschließen. Die aufgereinigte Variante von P8C11-Chim wies, bezogen auf die ungereinigte Variante von P8C11-Chim, einen besseren IC50-Wert auf und es wurde nur 0,75x der Referenzkonzentration benötigt. Bei V9 war ebenfalls die gereinigte Variante inhibitorisch aktiver und der IC50-Wert war geringfügig besser (0,1 µg/ml zu 0,11 µg/ml, resultierend in 0,91x Konzentration). Bezogen auf ihre jeweiligen Referenzproben (gereinigt zu gereinigt, ungereinigt zu ungereinigt) ergaben sich für V9 ungereinigt 1,38x und für V9 gereinigt 1,67x und somit vergleichbare Werte. Durch die Produktion in einer aufgereinigten Variante kam es zu keinem Verlust der inhibitorischen Aktivität. Alle weiteren Tests mit V9 wurden daher mit der aufgereinigten Variante durchgeführt.

Tabelle 17: IC50-Werte der aufgereinigten und ungereinigten Antikörper im Vergleich

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
P8C11-Chim ungereinigt	0,08	1,0
P8C11-Chim gereinigt	0,06	0,75
V9 ungereinigt	0,11	1,38
V9 gereinigt	0,10	1,67

5.3 Charakterisierung von V9

5.3.1 Stabilitätscharakterisierung

Im folgenden Abschnitt sind die Stabilitätsuntersuchungen von V9 hinsichtlich verschiedener physikalischer Einflüsse wie pH, Temperatur, Lagerung etc. dargestellt. Die Ergebnisse der Schmelzpunkte sind in 4.4.3 zu finden.

Untersucht wurde die inhibitorische Aktivität des Antikörpers V9 anhand seiner Fähigkeit eine durch IL-3 induzierte Downregulation des Markers CD131 auf Basophilen zu inhibieren. Die Detektion erfolgte mittels FACS. Bei ausgewählten Parametern fand

zudem die Bestimmung des Monomergehalts innerhalb der Antikörperprobe nach physikalischen Einflüssen durch SEC statt. Für alle Untersuchungen mit SEC lag die aus der Kalibration ermittelte Regressionsgerade in Abbildung 24 zugrunde.

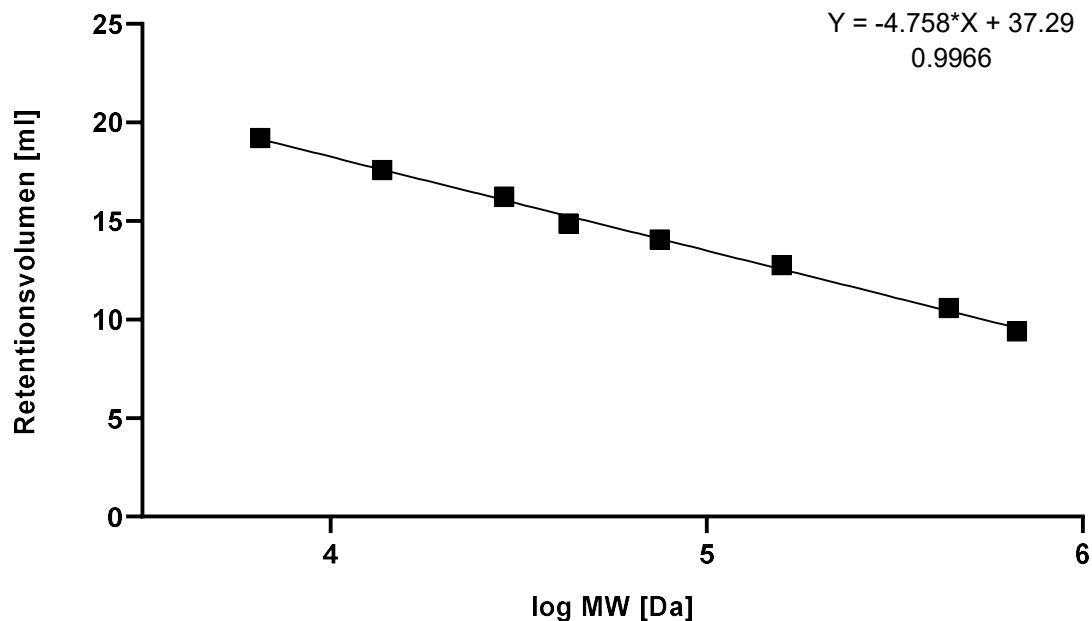


Abbildung 24: Regressionsgerade der Kalibration der SEC

Die Regressionsgerade wurde mittels Proteine mit bekanntem Molekulargewicht generiert. Verwendet wurden (aufsteigendes Molekulargewicht) Aprotinin (6,5 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43/44 kDa), Conalbumin (78 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (440 kDa) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min und der „Superdex 200 Increase“ Säule.

Temperaturstabilität

Die Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität von V9 nach Temperatureinfluss sind in Abbildung 25 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass mit einer Konzentration von 10 µg/ml eine vollständige Inhibition von 0,2 ng/ml IL-3 erzielt werden kann, erkennbar an der Blockade der Regulation der CD131-Expression. Auch bei einer Verdünnung von 1/4096 und einer Konzentration von 0,0024 µg/ml wird die Wirkung von IL-3 noch entscheidend gehemmt. Die Proben von V9, die bei einer Temperatur von 45-65 °C behandelt worden sind, weisen, abgesehen von kleinen Schwankungen, ein vergleichbares inhibitorisches Potenzial wie die Referenz auf. Bei der mit 75 °C behandelten Probe hingegen ist ein deutlicher Verlust an inhibitorischer Aktivität zu erkennen.

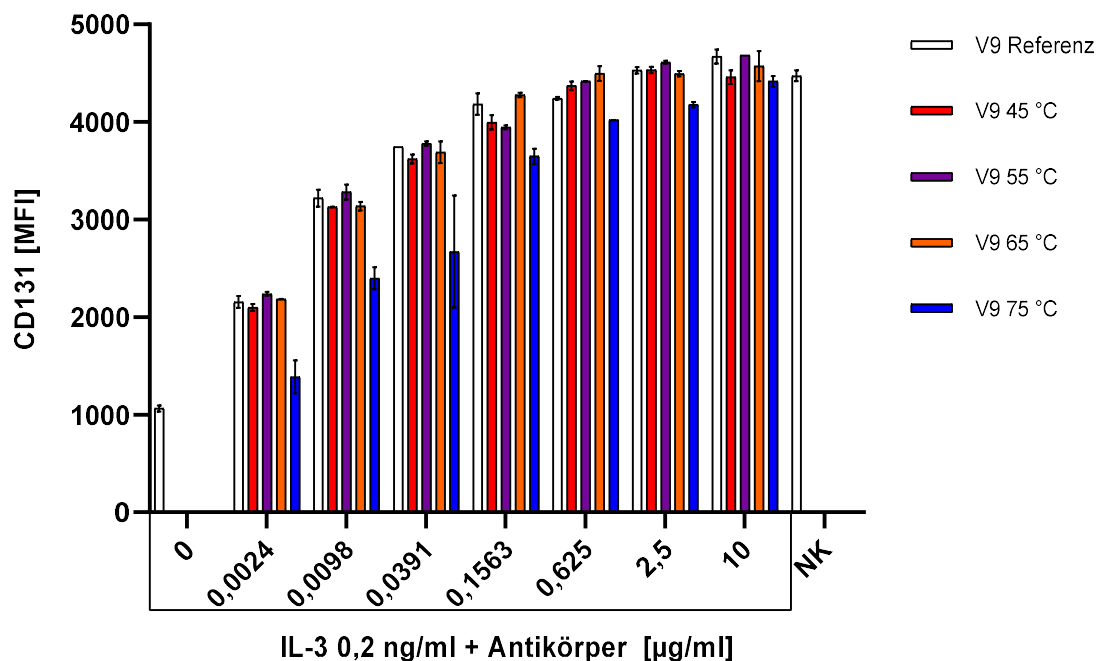


Abbildung 25: Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der temperaturbehandelten V9-Proben anhand der Inhibition einer IL-3 induzierten Downmodulation von CD131 auf Basophilen
V9-Proben (oder als Negativkontrolle (NK) nur Medium) und IL-3 wurden für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde frisches humanes Vollblut (60 µl/Probe, EDTA) zugegeben und erneut für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es ergaben sich die angegebenen Endkonzentrationen für die V9-Proben und 0,2 ng/ml für IL-3. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Basophilen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der Medianwerte + SD (n=2).

Anschaulicher wird dies anhand der in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse, welche auch als resultierende IC₅₀-Werte in Tabelle 18 erfasst sind. Die Werte der Proben 45-65 °C schwanken mit 1,17; 0,83 und 1x der benötigten Referenzkonzentration um den Wert von x1 der Referenz. Somit kann kein wesentlicher Einfluss der Temperatur für eine Inkubation für 3 h innerhalb dieses Temperaturbereichs festgestellt werden. Für die Probe, welche mit 75 °C behandelt worden ist, wird hingegen mehr als die fünffache Menge an Antikörpern benötigt (5,83x) um eine vergleichbare Wirkung zu erzielen. Die Behandlung mit dieser Temperatur führt folglich zu einem deutlichen Verlust der Aktivität.

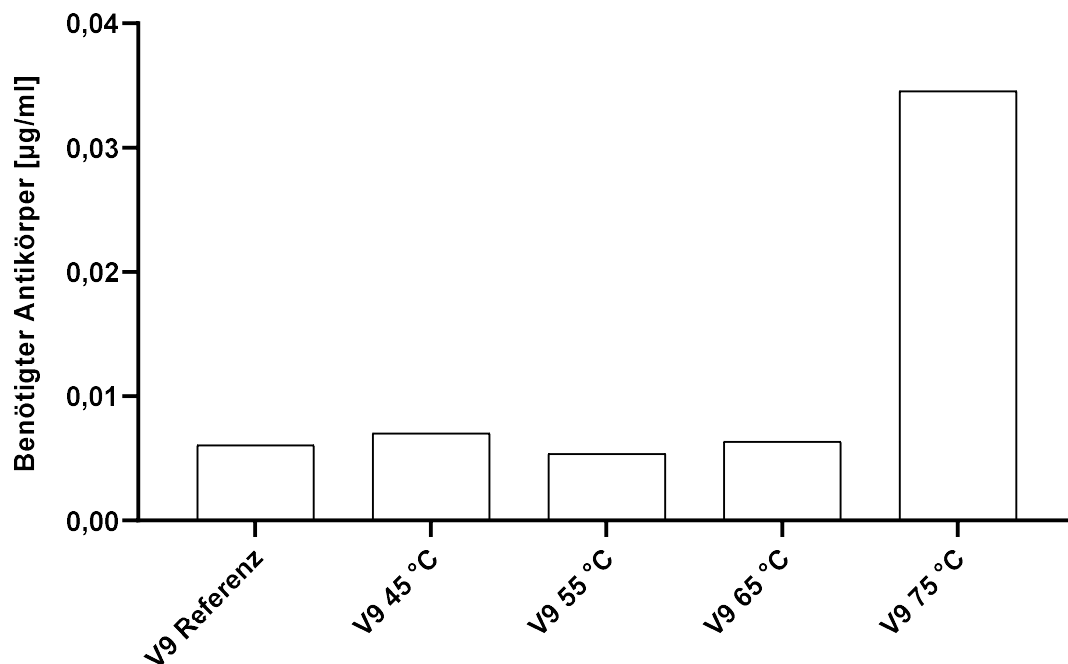


Abbildung 26: IC50-Werte der temperaturbehandelten V9-Probe
Die dargestellten Konzentrationen geben an, mit welcher Konzentration von temperaturbehandelten V9-Proben, eine halbmaximale Inhibition der durch 0,2 ng/ml IL-3 induzierten Downmodulation des Markers CD131 auf Basophilen erzielt werden konnte.

Tabelle 18: IC50-Werte der temperaturbehandelten V9-Proben

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
V9 Referenz	0,006	1,0
V9 45 °C	0,007	1,17
V9 55 °C	0,005	0,83
V9 65 °C	0,006	1,0
V9 75 °C	0,035	5,83

Die mittels SEC ermittelten Daten spiegeln die Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität wieder (vergleiche Tabelle 19). Bei den Proben von 45 °C und 55 °C gibt es kaum Unterschiede im Bezug auf die Peakhöhe (263; 260,2 mAU mit Referenz 258,7 mAU), die Area/Total (98,3; 98,6 % mit Referenz 97,9 %) und dem Monomergehalt = Area/Peak (99,2; 99,5 % mit Referenz 99,1 %). Die Probe 65 °C weist bei allen Daten geringfügig kleinere Werte auf und verfügt über einen Monomergehalt von 97,7 % (Referenz 99,1%).

Bei der bereits in der inhibitorischen Aktivität abfallenden Probe 75 °C konnten per Auge bereits feste Bestandteile entdeckt werden, welche durch die Zentrifugation entfernt wurden. Es kommt zu einer abnehmenden Konzentration und Peakhöhe (41,5 zu 258,7 mAU). Vergleicht man die SEC-Diagramme der Referenz und 75 °C (Abbildung 27 und Abbildung 28), fallen bei 75 °C weitere große Peaks bei einem Retentionsvolumen von ca 9,5 ml und 10,71 auf. Zusätzlich nimmt der Monomergehalt auf 65,7 % ab (verglichen mit 99,1% der Referenz).

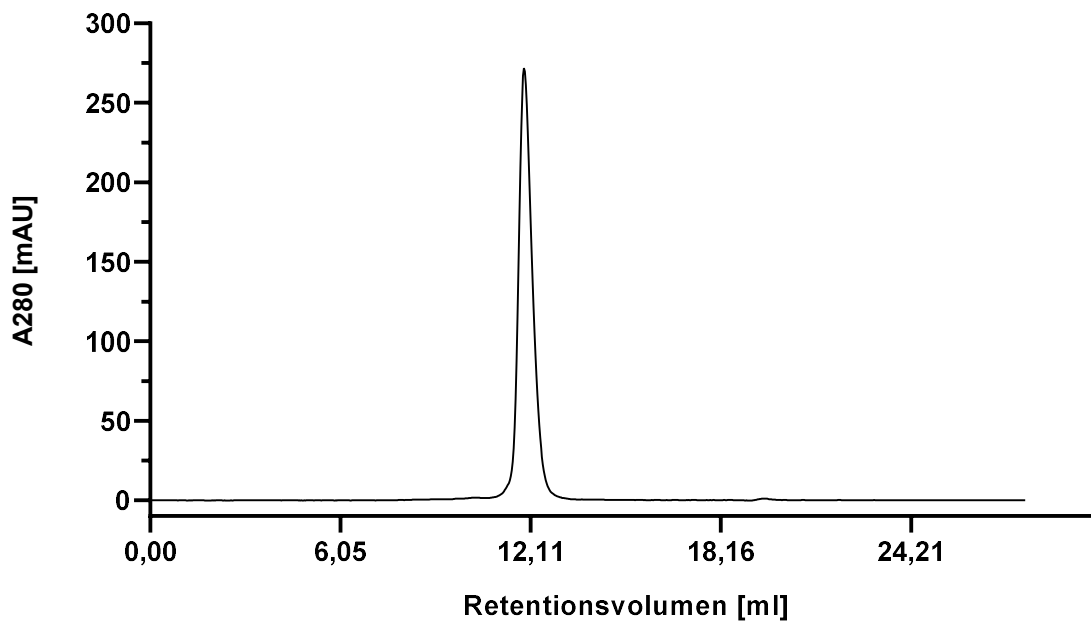


Abbildung 27: SEC der Referenzprobe von V9

Die unbehandelte Probe von V9 wurde mit einer Konzentration von 7,6 mg/ml eingesetzt. Die SEC wurde bei einer Flussrate von 0,3 ml/min und mit der Säule „Superdex 200 Increase“ durchgeführt.

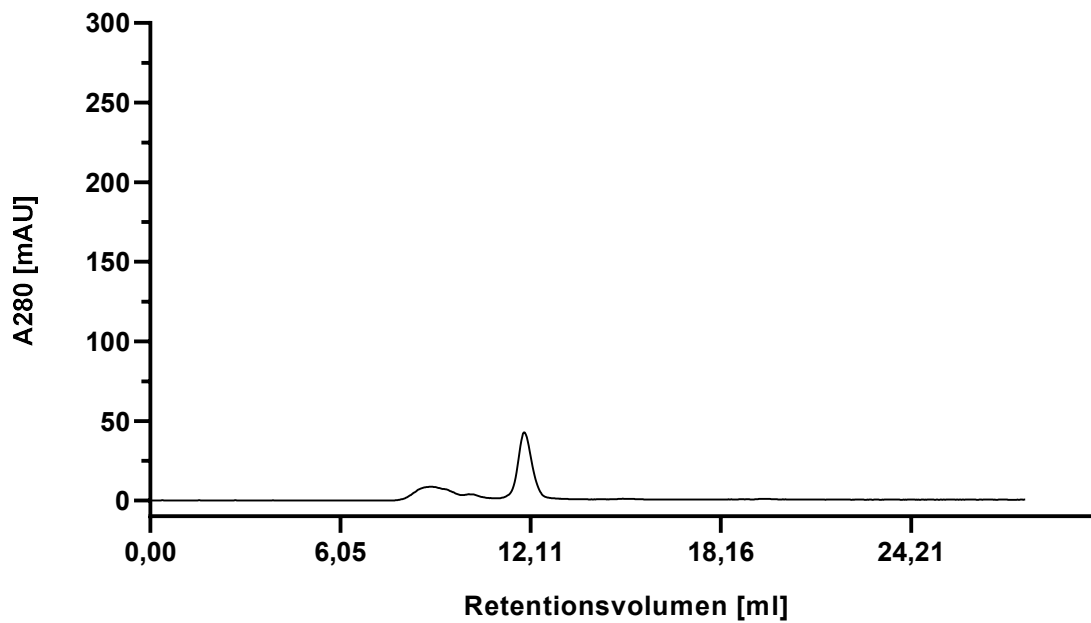


Abbildung 28: SEC der Probe von V9 75 °C

Die Probe von V9 wurde für 3 h einer Temperatur von 75 °C ausgesetzt und mit einer Konzentration von 7,6 mg/ml eingesetzt. Die SEC wurde bei einer Flussrate von 0,3 ml/min und mit der Säule „Superdex 200 Increase“ durchgeführt.

Mittels des Retentionsvolumens der Referenzprobe und der Regressionsgerade lässt sich das zugrundeliegende Molekulargewicht von V9 mit 158,1 kDa berechnen (theoretisches MW von V9 anhand der Aminosäuresequenz: 145,3 kDa)

Tabelle 19: Ergebnisse der SEC der temperaturbehandelten Proben von V9

	Retentionsvolumen (ml)	Peakhöhe (mAU)	Area/Total (%)	Area/Peak (%)
V9 Referenz	12,55	258,7	97,9	99,1
V9 45 °C	12,55	263	98,3	99,2
V9 55 °C	12,55	260,2	98,6	99,5
V9 65 °C	12,55	254,1	96,7	97,7
V9 75 °C	12,57	41,5	63,6	65,7

pH-Stabilität

Die pH-Proben von pH 4-6 und pH 2-3 wurden getrennt voneinander vermessen. Deshalb gibt es für beide eine eigene mitvermessene Referenzprobe. Innerhalb der Proben pH 4-6 schwanken die Werte mit 1,33x für pH 4; 0,96x für pH 5 und 0,81x der benötigten Referenzkonzentration für pH 6 um x1 der Referenz und zeigen keine deutliche Zu- oder Abnahme der inhibitorischen Aktivität.

Bei den Proben pH 2 und 3 konnten bereits per Auge deutliche Ausflockungen und Feststoffe festgestellt werden. Trotzdem sinkt pH 3 auf 0,6x ab. Die Probe von pH 2 hingegen steigt auf 4,5x der benötigten Referenzkonzentration und zeigt einen deutlichen Verlust an Aktivität (Tabelle 20).

Tabelle 20: IC50-Werte der pH-behandelten V9-Proben

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
V9 Referenz 1	0,027	1,0
V9 pH 6	0,022	0,81
V9 pH 5	0,026	0,96
V9 pH 4	0,036	1,33
V9 Referenz 2	0,01	1,0
V9 pH 3	0,006	0,6
V9 pH 2	0,045	4,5

Aufgrund der enthaltenen Feststoffe wurde auf die Durchführung einer SEC bei den Proben pH 2 und pH 3 verzichtet. Die erhaltenen Daten für pH 4-6 sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Die deutlich geringeren Peakhöhen der pH-Proben sind darauf zurückzuführen, dass bei der Erstellung der Proben eine Vorverdünnung und somit Konzentrationserniedrigung durchgeführt wurde. Vergleicht man die Area/Total, wurden geringere Werte bei den pH-Proben erzielt. Dies hängt allerdings insgesamt mit dem verringerten Signal zusammen, wodurch kleinere Schwankungen als Peak gewertet werden. Die Area/Peak fasst nur die 20 stärksten Peaks zusammen. Die Daten der pH-Proben zeigen dort keinen signifikanten Unterschied zur Referenz und betragen 98 % für pH 5 und 6, sowie 98,2 % für pH 4 verglichen mit 99,1 % für die Referenz. Es kommt zu keiner signifikanten Abnahme des Monomergehalts.

Tabelle 21: Ergebnisse der SEC der pH-behandelten Proben von V9

	Retentionsvolu- men (ml)	Peakhöhe (mAU)	Area/Total (%)	Area/Peak (%)
V9 Referenz	12,55	258,7	97,9	99,1
V9 pH 6	12,59	44,8	90,7	98
V9 pH 5	12,59	44,8	90,7	98
V9 pH 4	12,59	42,4	90,7	98,2

Freeze-Thaw-Cycle-Stabilität (FTC)

Anhand der in Tabelle 22 aufgeführten Werte kann kein wesentlicher Einfluss auf die inhibitorische Aktivität von V9 durch FTCs innerhalb der untersuchten Wiederholungen von 10x festgestellt werden. Die Werte von FTC 2x-10x schwanken um x1 der Referenz mit minimal 0,98x bei FTC 5x und maximal 1,56x der benötigten Referenzkonzentration bei FTC 2x.

Tabelle 22: IC50-Werte der FTC-Proben von V9

	IC50 (µg/ml)	x Referenz
V9 Referenz	0,043	1,0
V9 FTC 2x	0,068	1,56
V9 FTC 5x	0,042	0,98
V9 FTC 10x	0,056	1,28

Die mittels SEC generierten Ergebnisse unterstreichen die Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität. Beim ermittelten Monomergehalt der Proben (minimal 98,8 % FTC 10x und maximal 99,1 % bei FTC 5x) sind keine relevanten Abweichungen vom Monomergehalt der Referenz mit 98,9 % festzustellen. FTC bis zu 10x haben keinen Einfluss auf den Monomergehalt von V9 und führen nicht zu einer Aggregatbildung.

Tabelle 23: Ergebnisse der SEC der FTC-Proben von V9

Retentionsvolu- men (ml)	Peakhöhe (mAU)	Area/Total (%)	Area/Peak (%)
-------------------------------------	---------------------------	---------------------------	--------------------------

V9 Referenz	12,56	271,4	98	99
V9 FTC 1x	12,56	271,9	97,7	98,9
V9 FTC 2x	12,57	271,3	97,3	98,6
V9 FTC 5x	12,57	269,4	98	99,1
V9 FTC 10x	12,57	268,6	94,6	98,8

Lagerstabilität

Eine Lagerung des Antikörpers bei Raumtemperatur führt zu keinem Verlust an inhibitorischer Aktivität. Die Werte von 1, 2 und 6 Monaten nähern sich mit 0,98; 0,97 bzw. 1,1x der Referenzkonzentration stark der Referenz von 1,0 an.

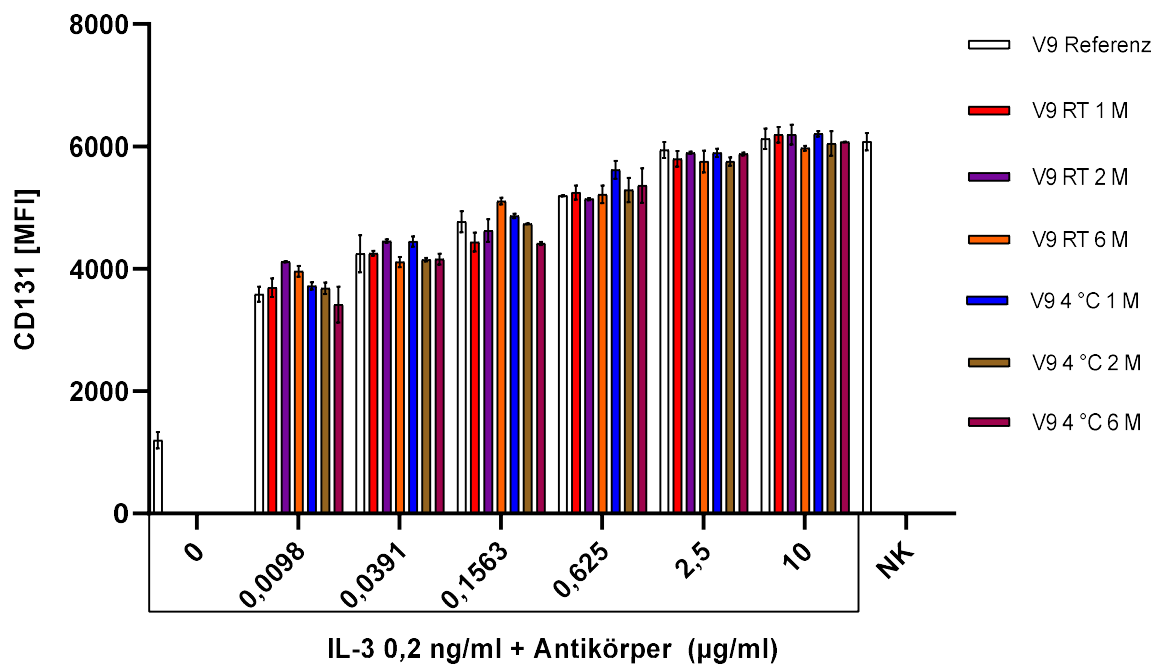


Abbildung 29: Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von gelagerten (RT und 4 °C) V9-Proben anhand der Inhibition einer IL-3 induzierten Downmodulation von CD131 auf Basophilen. V9-Proben (oder als Negativkontrolle (NK) nur Medium) und IL-3 wurden für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde frisches humanes Vollblut (60 µl/Probe, EDTA) zugegeben und erneut für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es ergaben sich die angegebenen Endkonzentrationen für die V9-Proben und 0,2 ng/ml für IL-3. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Basophilen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der Medianwerte + SD (n=2).

Eine Lagerung bei 4 °C führt, unabhängig von der Länge der Lagerung, bei allen Proben zu einer Schwankung innerhalb der CD131-Expression. Eine signifikante Erhöhung der benötigten Referenzkonzentration kann nicht detektiert werden (vergleiche Abbildung 29).

Plasmastabilität

Eine Lagerung des Antikörpers in Plasma führt innerhalb von 48 h zu keiner deutlichen Veränderung der inhibitorischen Aktivität. Die Werte sinken minimal auf 0,85x bei Lagerung in EDTA-Plasma ab und steigen maximal auf 1,11x der benötigten Referenzkonzentration bei Lagerung in Serum an (Abbildung 30).

Bei Lagerung von 8 d steigen alle benötigten Konzentrationen in ähnlicher Weise auf 1,43x für PBS und Hep.-Plasma, 1,35 für EDTA-Plasma und 1,46x für Serum an.

Nach einer 4-wöchigen Lagerung von 28 d zeigen sich erste größere Veränderungen der benötigten Konzentrationen. PBS steigt moderat auf das 1,56x an. Der Wert für Hep.-Plasma verdoppelt sich fast auf 1,98x und die benötigten Konzentrationen für EDTA-Plasma und Serum steigern sich auf das ca. 2,5x (EDTA Plasma 2,48x; Serum 2,56x).

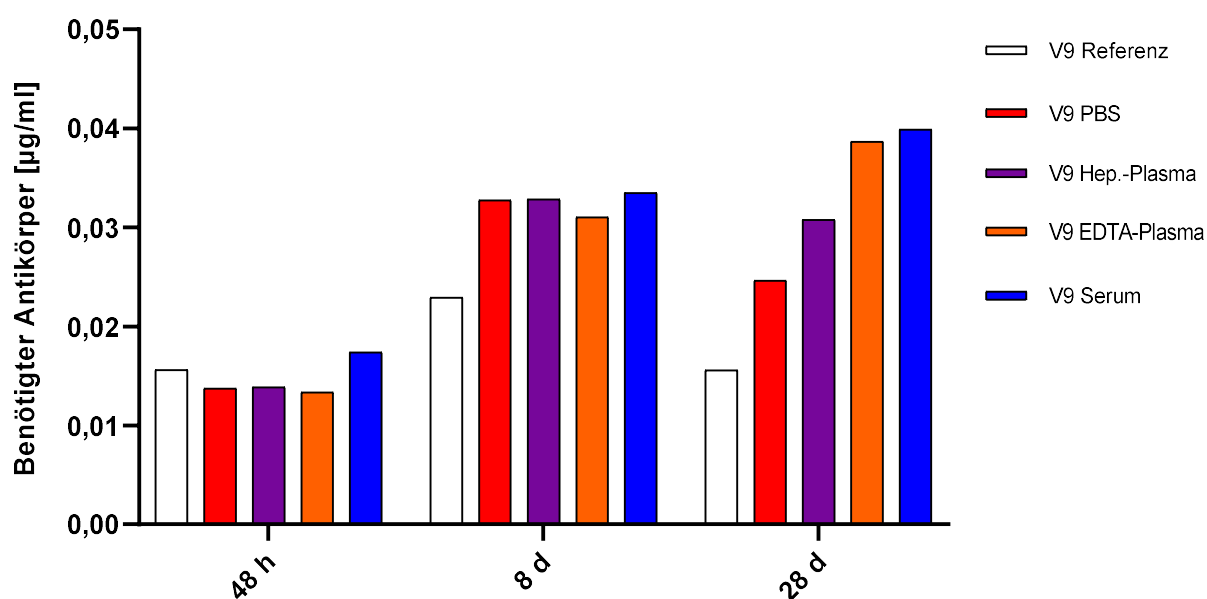


Abbildung 30: IC50-Werte der in PBS oder Plasma gelagerten V9-Proben

Die dargestellten Konzentrationen geben an, mit welcher Konzentration von in PBS oder Plasma gelagerten (48 h – 28 d) V9-Proben, eine halbmaximale Inhibition der durch 0,2 ng/ml IL-3 induzierten Downmodulation des Markers CD131 auf Basophilen erzielt werden konnte.

Isothermale Stabilität

In Abbildung 31 sind sämtliche isothermalen Läufe von V9 dargestellt. In keinem der Läufe wurden Minima oder Maxima erfasst. Zudem schwanken die Signale der einzelnen Läufe nur in einem Bereich von 0,21-0,219 mCal/min. Bei diesen Schwankungen handelt es sich lediglich um interne Geräteschwankungen, die in diesem geringen

Maße üblich und unvermeidbar sind. Eine Entfaltung von V9 kann nicht festgestellt werden.

Der IC₅₀-Wert der inhibitorischen Aktivität weist mit 1,28x der benötigten Referenzkonzentration nur eine geringfügige Steigerung auf.

Die Ergebnisse der SEC zeigen eine geringere Peakhöhe von 215,5 mAU im Vergleich zu 271,38 mAU der Referenz. Auch der Monomergehalt liegt mit 95,61 % unter dem Wert der Referenz (98,64 %).

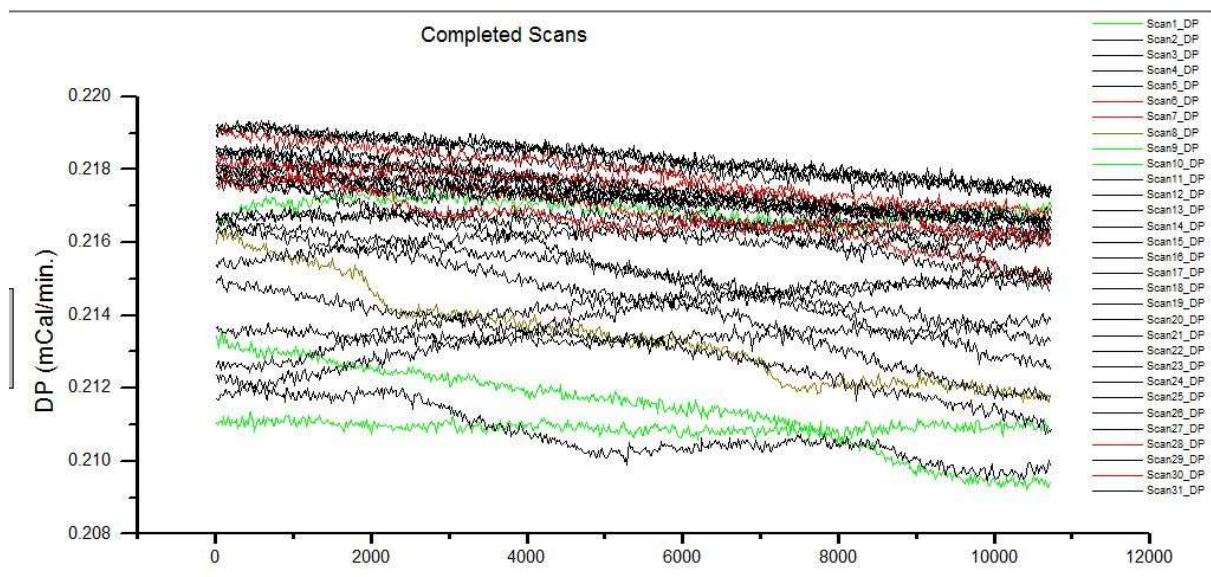


Abbildung 31: Isothermale Stabilität von V9 (Originalläufe der VP-DSC-Software)
Eine V9-Probe (7,6 mg/ml) wurde für 100 h in der VP-DSC gelagert bei einer konstanten Temperatur von 55 °C. Insgesamt erfolgten 31 Durchläufe die in der Abbildung dargestellt sind.

5.3.2 Schmelzpunktbestimmung

Mittels VP-DSC wurde der bzw. die Schmelzpunkte des Antikörpers V9 ermittelt. In Abbildung 32 ist der Lauf als normiertes und um die Referenz korrigiertes Ergebnis dargestellt. Dieses zeigt eine zunehmende Wärmekapazität C_P mit zunehmender zugeführter Energie in Form der Temperatur, mit einem Maximum bei ca. 70 °C, einem Sattelpunkt bei ca. 80 °C und einem Maximum bei ca. 90 °C. Danach fällt das Signal auf 0 zurück.

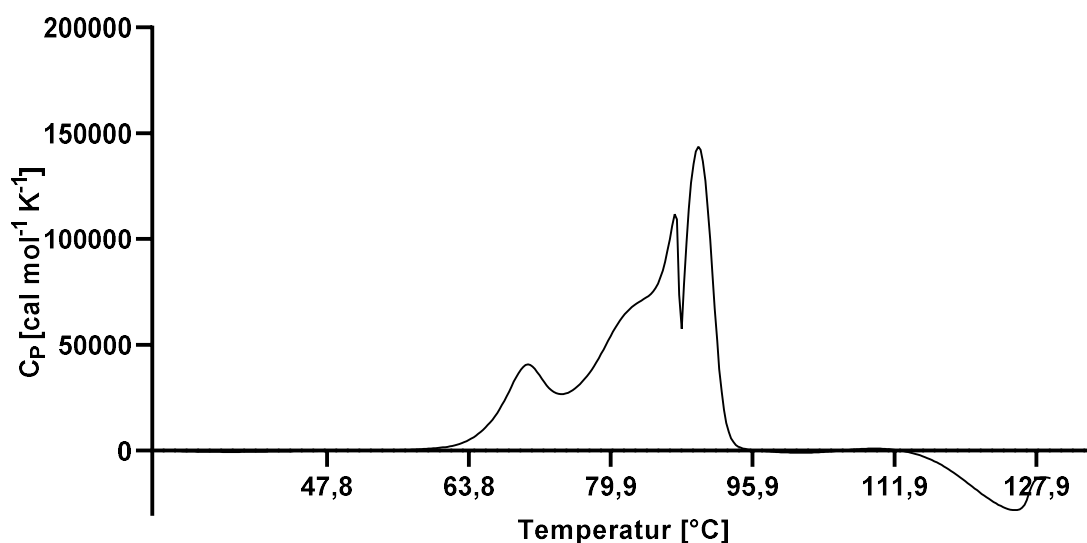


Abbildung 32: Normierter Lauf der Schmelzpunktbestimmung für V9

Die Bestimmung der Schmelzpunkte fand im Temperaturbereich von 25-130 °C mit einer konstanten Aufheizrate von 1 °C/min statt. V9 wurde mit einer Konzentration von 7,6 mg/ml eingesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis nach Baselinekorrektur und Normierung auf die AK-Konzentration.

Ausgehend von den Ergebnissen aus Abbildung 32 wurde mit Hilfe von Origin 7 der VP-DSC ein Fitting zur genauen Bestimmung der Schmelzpunkte durchgeführt (Abbildung 33). Die Extrempunkte (Maxima, Sattelpunkt) charakterisieren die Schmelzpunkte, sodass ein Fitting mit drei Extrempunkten durchgeführt wurde. Hieraus ergeben sich die Schmelzpunkte $T_{M1} = 71\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{M2} = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $T_{M3} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ für V9. Der zwischenzeitliche Einbruch des Signals vor Erreichen des Schmelzpunktes T_{M3} erklärt sich durch die einsetzende vollständige Entfaltung des Antikörpers.

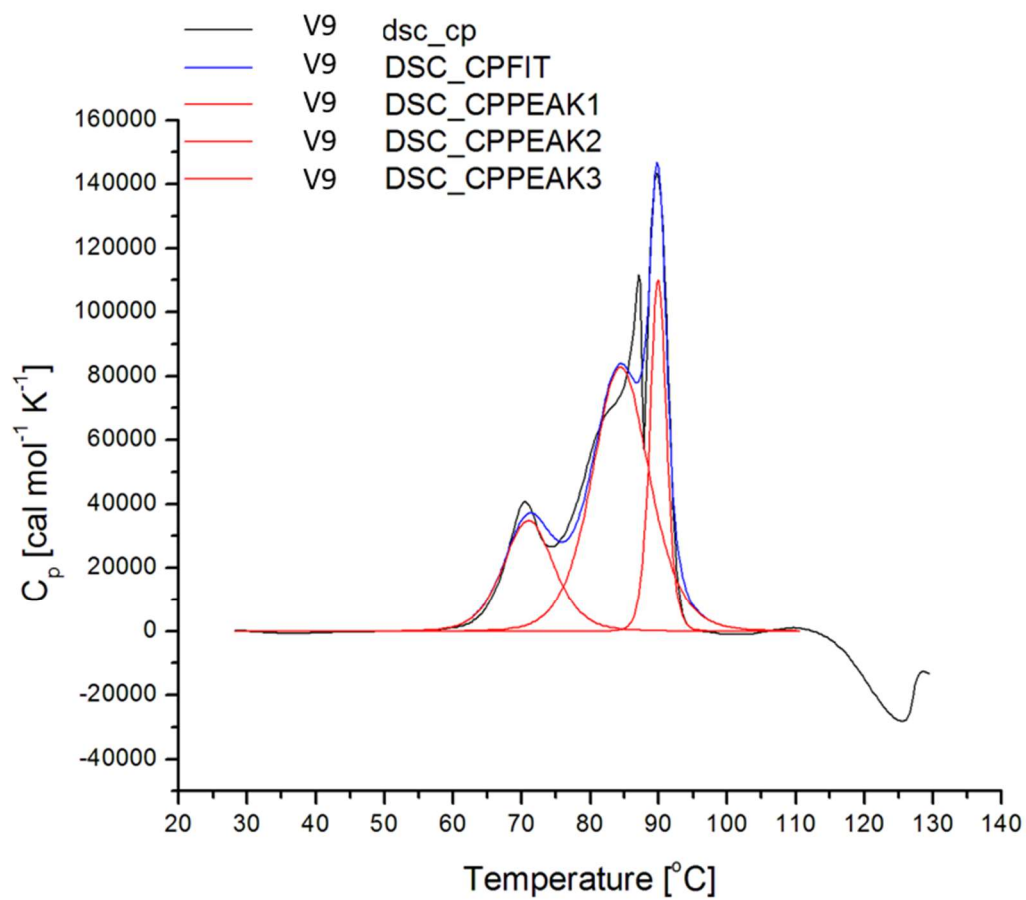


Abbildung 33: Originalfit der Schmelzpunktbestimmung von V9 aus Origin 7 der VP-DSC (bearbeitet)
Die Abbildung zeigt das Fitting der Schmelzpunkte für den Antikörper V9 (7,6 mg/ml) nach Baselinekorrektur und Normierung auf die AK-Konzentration. Es wurde ein „kubic fit“ mit drei Maxima durchgeführt.

5.3.3 Affinitätsbestimmung

Mit Hilfe der Biacore X100 (GE Healthcare) erfolgte die Affinitätsbestimmung von V9 und P8C11-Chim durch SPR.

Beispielhaft sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 mit der Evaluierungssoftware erstellte Auswertekurven für das Kinetik- und Affinitätsfitting für den Antikörper V9 dargestellt.

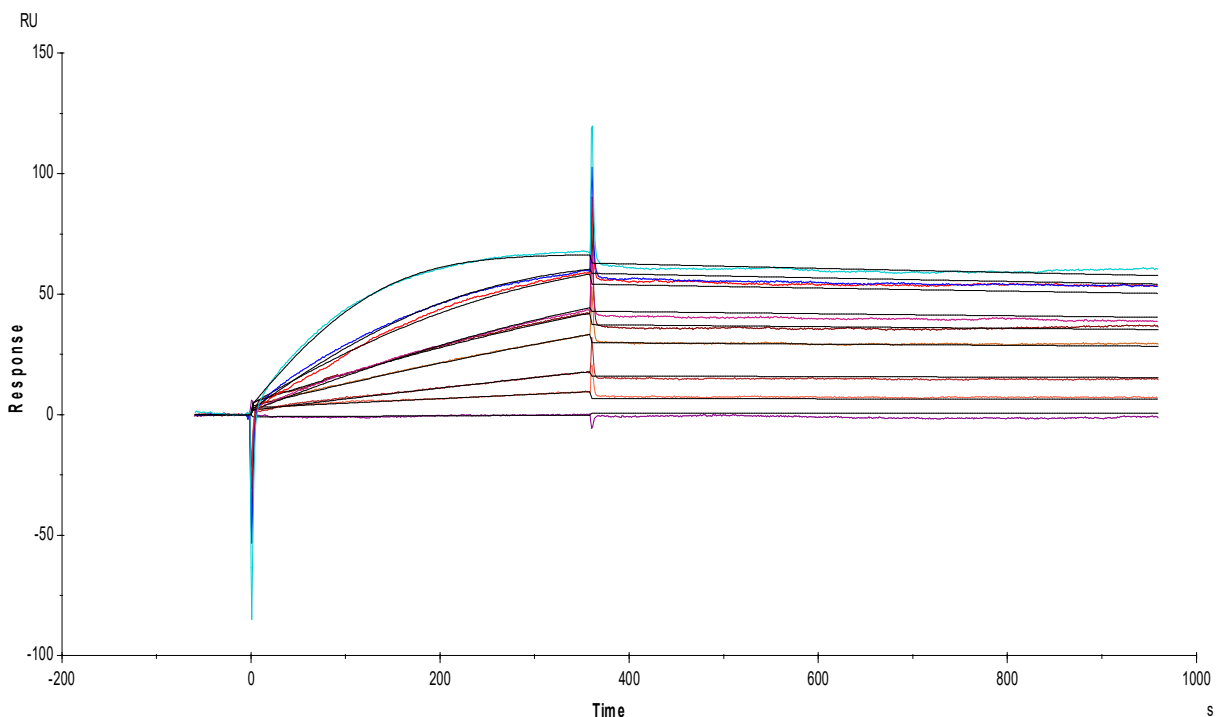


Abbildung 34: Kinetikfitting von V9 (Original aus Biacore)

V9 wurde mit einer Konzentration von 1,25 µg/ml eingesetzt, die vermessenen IL-3-Konzentrationen betrugen 0,001; 0,01; 0,025; 0,05; 0,066; 0,08; 0,12; 0,15 und 0,25 µg/ml. Durchgeführt wurde die Messung mit der Methode „Multi-Cycle“. Das anschließende Kinetikfitting wurde nach dem Modell „steady-state-affinity“ durchgeführt.

Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 24 aufgeführt. Zwar unterscheiden sich V9 und P8C11-Chim hinsichtlich ihrer durch Kinetikfitting ermittelten Assoziationskonstanten k_a und ihrer Dissoziationskonstanten k_d ($1,1 \cdot 10^6$ zu $7,9 \cdot 10^5$ 1/Ms bzw. $1,6 \cdot 10^{-5}$ zu $1,1 \cdot 10^{-4}$ 1/s), aber die resultierende Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D sind mit $1,4 \cdot 10^{-10}$ M identisch und somit verfügen beide Antikörper über eine identische Affinität im picomolaren Bereich.

Das ermittelte χ^2 weist darüber hinaus auf ein genaues Fitting hin.

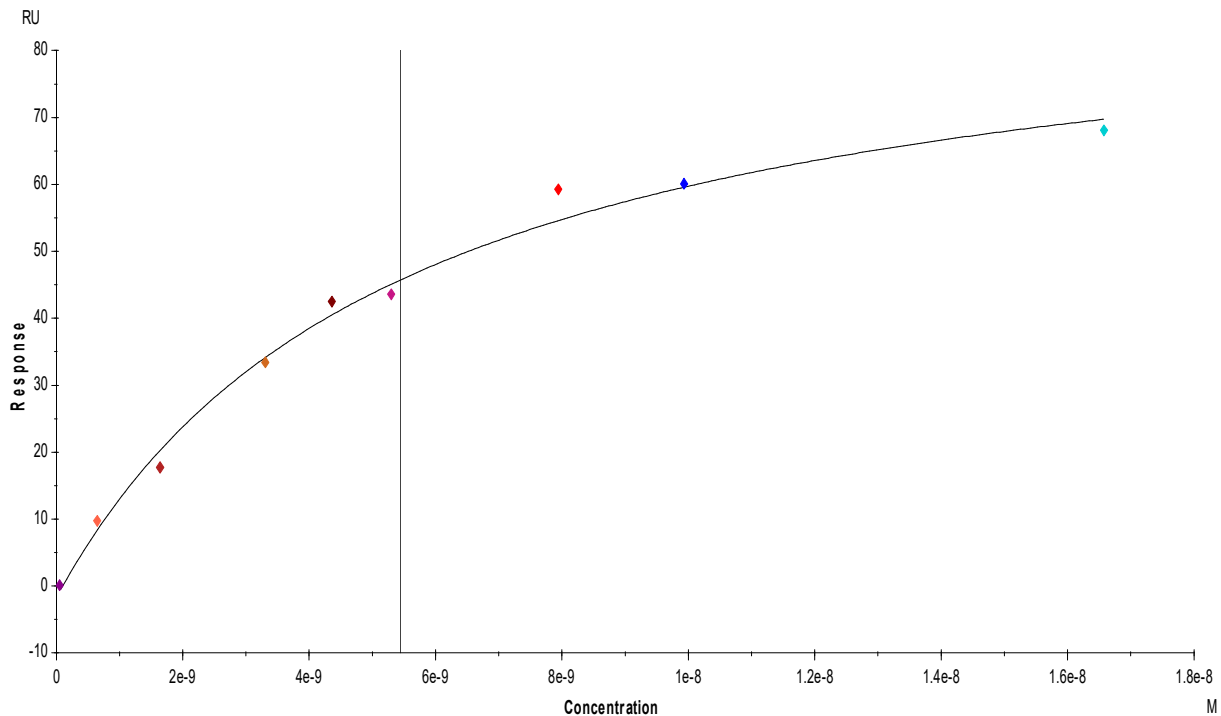


Abbildung 35: Affinitätsfitting von V9 (Original aus Biacore)

V9 wurde mit einer Konzentration von 1,25 µg/ml eingesetzt, die vermessenen IL-3-Konzentrationen betrugen 0,001; 0,01; 0,025; 0,05; 0,066; 0,08; 0,12; 0,15 und 0,25 µg/ml. Durchgeführt wurde die Messung mit der Methode „Multi-Cycle“. Das anschließende Affinitätsfitting wurde nach dem Modell „1:1-binding“ durchgeführt.

Die mittels des Affinitätsfittings ermittelten Werte für die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D sind zwar um eine 10er-Potenz größer und liegen im niedrigen nanomolaren Bereich, allerdings sind auch hier die ermittelten Werte mit $5,4 \cdot 10^{-9}$ bzw. $3,2 \cdot 10^{-9}$ M vergleichbar.

Tabelle 24: Ermittelte Affinitätswerte von P8C11-Chim und V9

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M) KF*	χ^2 (RU²)	K_D (M) AF*
P8C11-Chim	$7,9 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-10}$	7,8	$3,2 \cdot 10^{-9}$
V9	$1,1 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-10}$	7,8	$5,4 \cdot 10^{-9}$

*: KF: Kinetic-fitting, AF: Affinity-fitting

5.3.4 Epitopmapping

Anhand des Epitopmappings wurde die Aminosäuresequenz bestimmt, an welche die Antikörper P8C11 und V9 binden. Dargestellt sind in Abbildung 36 die Bindungsstärken, an die in der Legende angegebenen Peptide, durch die resultierenden OD-Werte im ELISA.

Allgemein bindet V9 seine Peptide stärker als P8C11. Sowohl P8C11 als auch V9 binden die Peptide 26-48, 28-48 und 22-48. Das Peptid 28-48 wird am schwächsten gebunden mit einer OD von $0,31 \pm 0,005$ bei P8C11 und $0,55 \pm 0,007$ bei V9. Das längere Peptid 26-48 mit $0,48 \pm 0,02$ bei P8C11 und $1,04 \pm 0,036$ bei V9.

Am stärksten wird von beiden das längste Peptid 22-48 gebunden. P8C11 bindet mit einer OD von $0,8 \pm 0,028$ und V9 mit $1,33 \pm 0,097$. Dies entspricht der Aminosäuresequenz EIITHLKQPPLPLLDFFNNLNGEDQDIL.

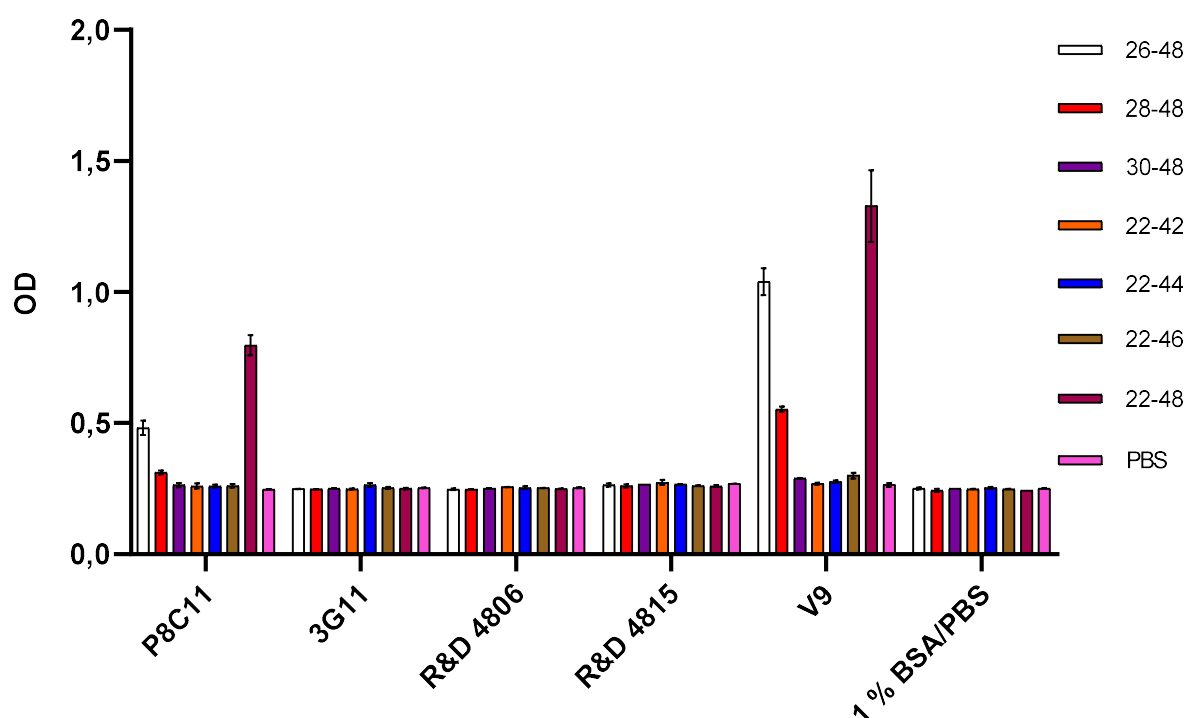


Abbildung 36: Epitopmapping von V9

ELISA-Platten wurden mit den in der Legende angegebenen Peptiden (Aminosäurenummern ohne Signalpeptid) über Nacht bei RT gecoatet und geblockt. Die Konzentration betrug bei allen $10 \mu\text{g/ml}$. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern ($10 \mu\text{g/ml}$) für 1 h bei RT. Als Detektionsantikörper wurde der „*polyclonal rabbit anti-mouse*“ Ig-HRP (1:2000) für alle Antikörper außer V9 verwendet. Für V9 wurde „*HRP-conjugated AffinePure fragment goat anti-human IgG*“ eingesetzt (1:5000). Jeweils für 1 h bei RT. Als Substrat wurde ABTS für 20 min verwendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD bei 405 nm (Referenz 490 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD ($n=2$).

Die IL-3-AK 3G11, R&D 4806 und R&D 4815 binden keine der getesteten Peptide, womit P8C11 und V9 ein anderes Epitop besitzen als kommerziell erwerbbar andere humane IL-3-AK. Das Ergebnis wurde durch die Wiederholung des Versuchs bestätigt.

5.3.5 Kreuzreaktivität

Durch einen ELISA wurde die Kreuzreaktivität des chimären P8C11-Chim und von V9 zu IL-3 verwandten Zytokinen getestet.

Sowohl P8C11-Chim als auch V9 zeigen keine Bindung und somit Kreuzreaktivität zu den Zytokinen GM-CSF und IL-5, sowie Rhesus-IL-3.

Beide Antikörper zeigen zudem ein vergleichbares Bindungsverhalten zu humanem IL-3 bei 30 µg/ml ($1,14 \pm 0,15$ P8C11 und $1,16 \pm 0,14$ V9) und 3 µg/ml ($0,76 \pm 0,036$ P8C11 und $0,74 \pm 0,089$ V9).

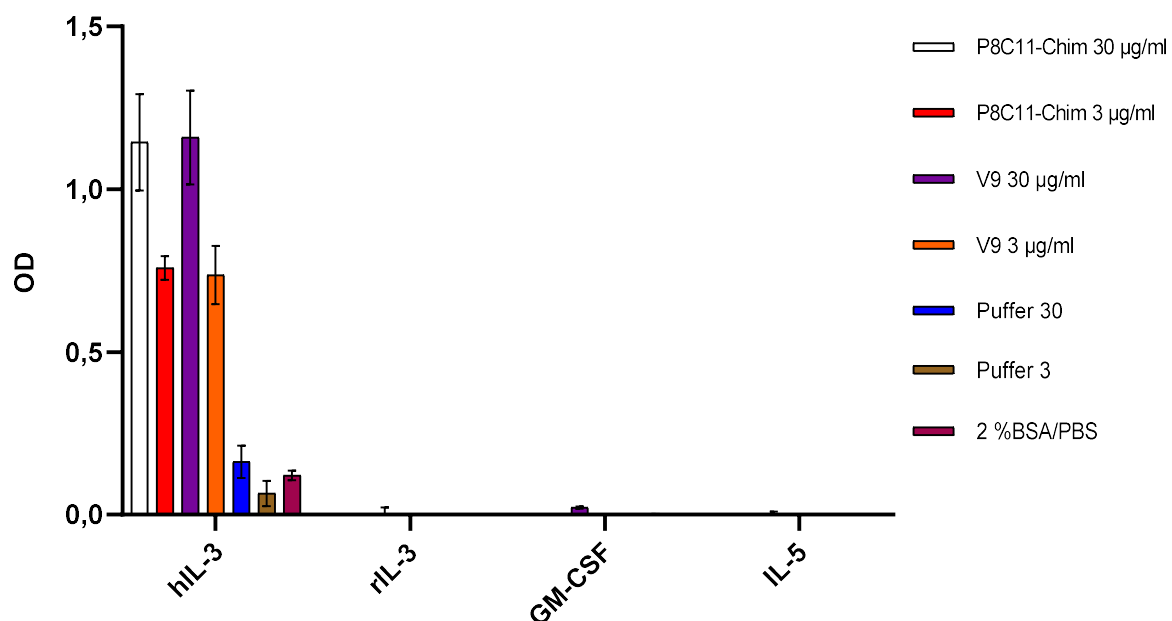


Abbildung 37: Kreuzreaktivität von V9

Eine ELISA-Platte wurden mit den Zytokinen (1 µg/ml) über Nacht bei RT gecoatet und geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den in der Legende angegebenen Antikörpern (oder Puffer für 1 h bei RT. Als Detektionsantikörper wurde HRP-conjugated AffinePure fragment goat anti-human IgG eingesetzt (1:5000) für 1 h bei RT. Als Substrat wurde ABTS für 20 min verwendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD bei 405 nm (Referenz 490 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (n=4).

5.3.6 Wachstumshemmung von IL-3 abhängigen TF1-Zellen

Mit Hilfe der Zelllinie TF1 und eines MTT-Assays wurde die inhibitorische Aktivität von V9 aufgrund der Wachstumshemmung der Zelllinie untersucht (Abbildung 38).

Bis zu einer Konzentration von 0,37 µg/ml zeigen die Antikörper P8C11-Chim und V9 eine ähnliche Blockadewirkung gegen IL-3. Bei dieser Konzentration sinkt die Proliferation auf $59,8 \pm 10,5$ % für P8C11-Chim bzw. $57,2 \pm 5,5$ % bei V9 ab. Bei der niedrigsten untersuchten Konzentration steigt die Proliferation bei P8C11-Chim bis über den Referenzwert ($111,2 \pm 8,4$ %).

Mit der höchsten untersuchten Konzentration von 30 µg/ml können beide Antikörper die Proliferation der Zelllinie auf unter 10 % absenken ($7,1 \pm 1,9$ bzw. $6,3 \pm 3,3$ %). Die große Ähnlichkeit der beiden Antikörper hinsichtlich ihrer Effektivität zeigte sich insbesondere in den resultierenden IC₅₀-Werten. Diese liegen mit 0,85 µg/ml für P8C11 und 0,67 µg/ml für V9 nah beieinander.

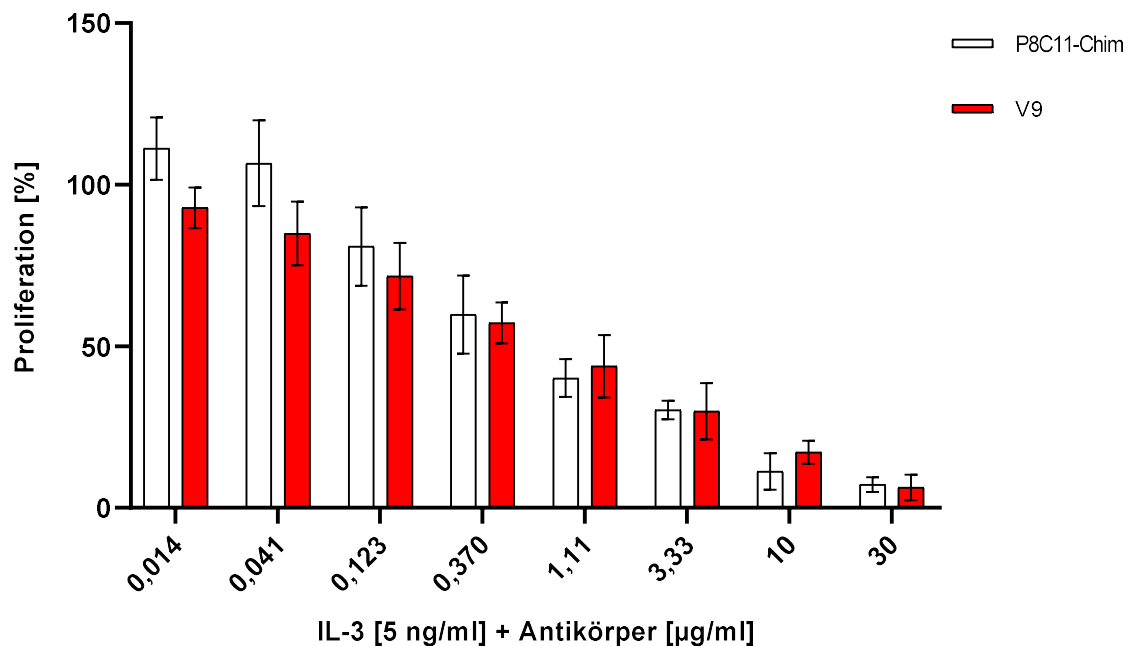


Abbildung 38: Wachstumshemmung von TF1-Zellen durch anti-IL-3-AK

Die Antikörper wurden mit IL-3 für 1 h bei 37 °C im Brutschrank präinkubiert und anschließend zu den TF-1-Zellen zugegeben. Somit ergaben sich die angegebenen Endkonzentrationen der Antikörper und 5 ng/ml für IL-3. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Abnahme von 100 µl Überstand und die Zugabe der MTT Solution und Inkubation für 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Abschließend wurde MTT Solvent zugegeben und über Nacht inkubiert bei RT im Dunkeln. Die OD wurde bei 570 nm (Referenz 670 nm) bestimmt. Anhand der OD wurde die Abnahme der Zellproliferation bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM n=4 Versuche (einzelne Versuche n=3).

5.3.7 Blockade der Bindung von IL-3 an CD123 auf PBMCs

Unterstützend zu 5.3.6 wurde untersucht, ob nicht nur die Wirkung von IL-3, sondern darüber hinaus auch seine Bindung an PBMCs durch V9 effektiv unterbunden wurde. In Abbildung 39 ist der Anteil an IL-3+ innerhalb der CD123+ Zellen dargestellt. Der die Antikörper enthaltene Puffer selbst hat keine Fähigkeit die Bindung zu unterbinden. V9 reduziert bereits in einer Konzentration von 0,463 µg/ml den Wert auf 66,7 % bezogen auf die Positivkontrolle. Mit zunehmender Konzentration wird dieser Wert auf 8,6 % bei 12,5 µg/ml reduziert. P8C11 reduziert den Wert maximal auf 13,2 % bei derselben Konzentration. Die IC50-Werte beider Antikörper betragen 1,13 µg/ml bei P8C11 und 1,1 µg/ml bei V9 und unterschieden sich nur marginal.

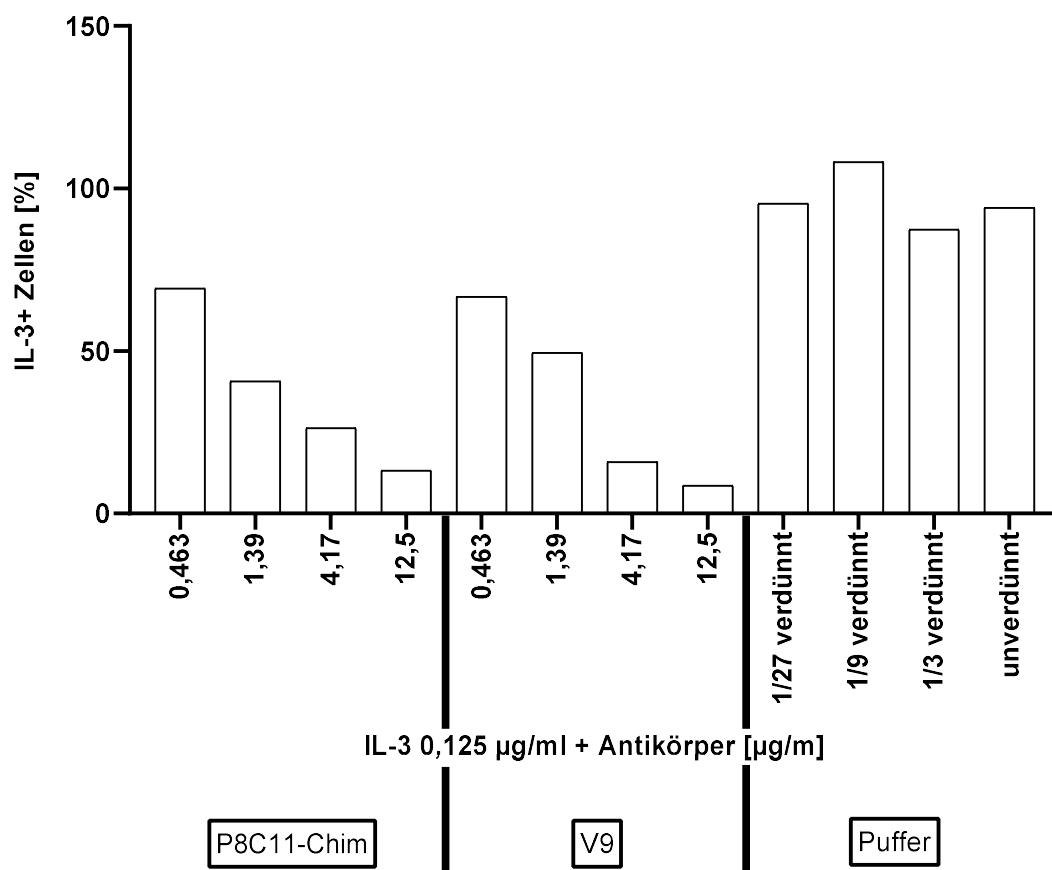


Abbildung 39: Blockade der IL-3-Bindung auf PBMCs durch V9.

Die Antikörper wurden für 30 min auf Eis mit biotinyliertem IL-3 präinkubiert. Anschließend wurde frisches humanes Vollblut (60 µl/Probe, EDTA) zugegeben und erneut für 1 h auf Eis inkubiert. Es ergaben sich die angegebenen Endkonzentrationen für die AK-Proben und 0,125 ng/ml für IL-3. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (inklusive Avidin-FITC) und die Ermittlung des Anteils der FITC+ Basophilen per FACS-Analyse. Einzelwerte.

5.3.8 Unspezifische Wirkung auf Blutleukozyten durch V9

Unspezifische Bindung auf Blutleukozyten

Mittels FACS-Analyse konnte, verglichen mit einer IgG1 Isotyp-Kontrolle, keine vermehrte unspezifische Bindung von V9 an Blutleukozyten festgestellt werden.

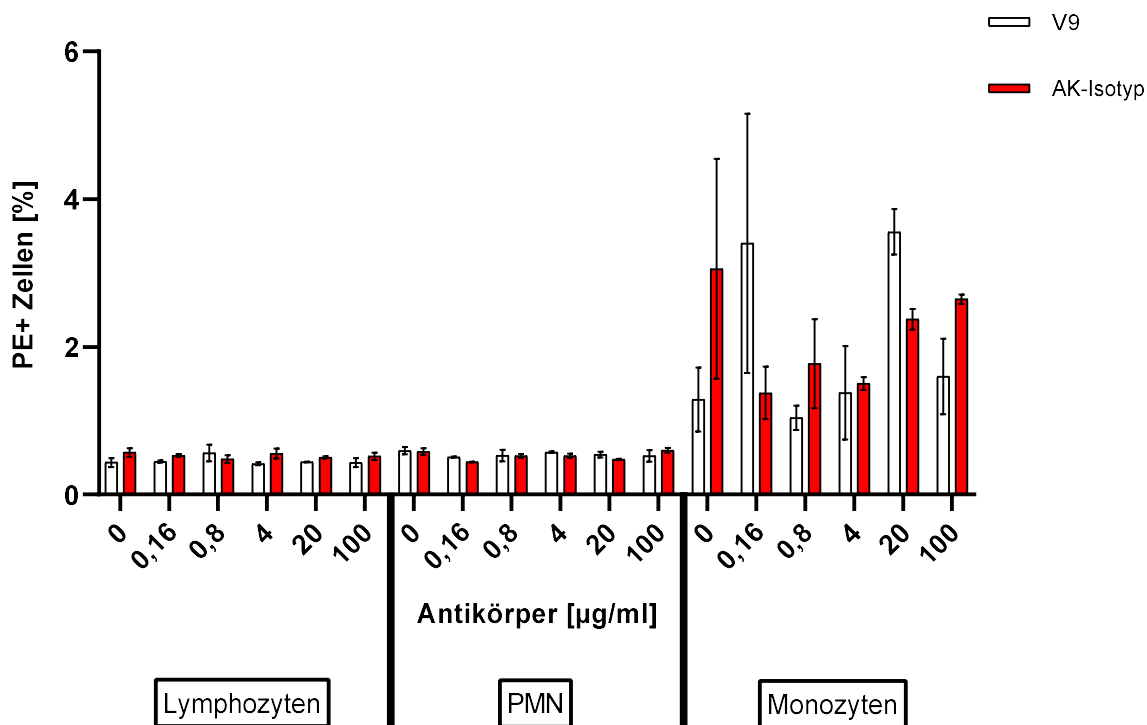


Abbildung 40: Unspezifische Bindung von V9 auf Blutleukozyten

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit den Antikörpern in den angegebenen Konzentrationen für 1 h auf Eis. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (inklusive PE-F(ab)₂ goat-anti-human) und die Ermittlung des Anteils an PE+ Zellen an den dargestellten Zellpopulationen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=2).

Die Detektion der Antikörper erfolgte über einen PE-konjugierten anti-human IgG1 Antikörper. Innerhalb der Zellpopulationen von Lymphozyten und PMNs liegt der Anteil an PE+-Zellen sowohl bei V9 als auch der Kontrolle, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, bei ca. 0,5 %. Die ermittelten Werte innerhalb der Monozyten schwanken zwischen den untersuchten Konzentrationen und weisen eine teils hohe Standardabweichung auf (V9 0 µg/ml $3,4 \pm 1,8$ %, 0,16 µg/ml $1,3 \pm 0,5$ %; AK-Iso 0 µg/ml $3,0 \pm 1,5$ %). Zwischen V9 und dem Isotyp werden keine Unterschiede festgestellt. Nicht dargestellt sind die Ergebnisse der einzelnen Populationen wie B-Zellen, T-Zellen etc. Die Werte der PE+ Zellen unterscheiden sich zwar teils erheblich (B-Zellen ca.

15 % PE+ Zellen, CD8+ T-Zellen ca. 0,4 %), jedoch können keine Unterschiede zwischen V9 und dem Isotyp detektiert werden.

Rezeptorregulation und Einfluss auf Proliferation durch V9

Eine Inkubation mit V9 führt bei beiden untersuchten Konzentrationen innerhalb der Basophilen und pDCs zu geringen Erhöhungen und Erniedrigungen der Expression des Aktivierungsmarkers CD11b.

Innerhalb der Neutrophilen führt eine Inkubation mit V9 zu einer verringerten Expression (Medium 32.353 ± 6048 zu 22.634 ± 3129 MFI für 1 $\mu\text{g/ml}$ und 23.675 ± 5253 MFI bei 10 $\mu\text{g/ml}$). Innerhalb der Monozyten hingegen steigt die Expression von 59.453 ± 3559 auf 70520 ± 7375 MFI bei V9 10 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 41).

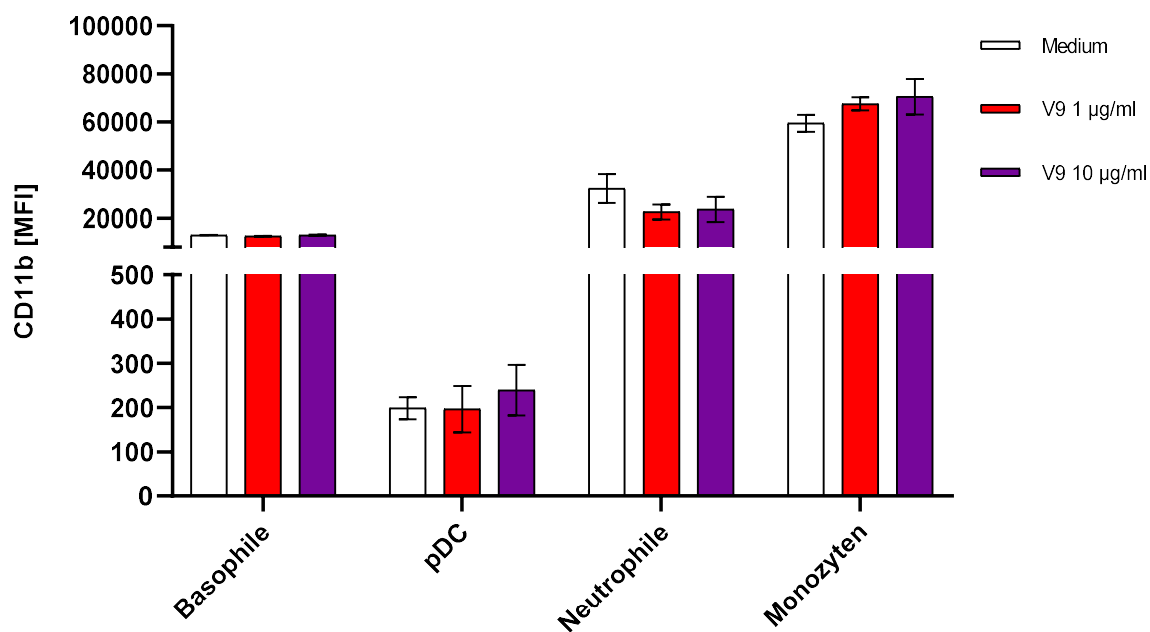


Abbildung 41: CD11b-Expression nach V9-Inkubation

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit V9 (oder Medium) in den angegebenen Konzentrationen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung der Expression des Oberflächenmarkers CD11b auf den dargestellten Zellpopulationen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der Medianwerte + SD (n=4).

In Abbildung 42 sind die ermittelten Zellzahlen nach einer Inkubation mit V9 dargestellt. In keiner der untersuchten Populationen kann eine Veränderung der Zellzahlen festgestellt werden, welche über die Abweichung des SEM hinausgeht. Eine Inkubation

mit V9 mit den verwendeten Konzentrationen hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

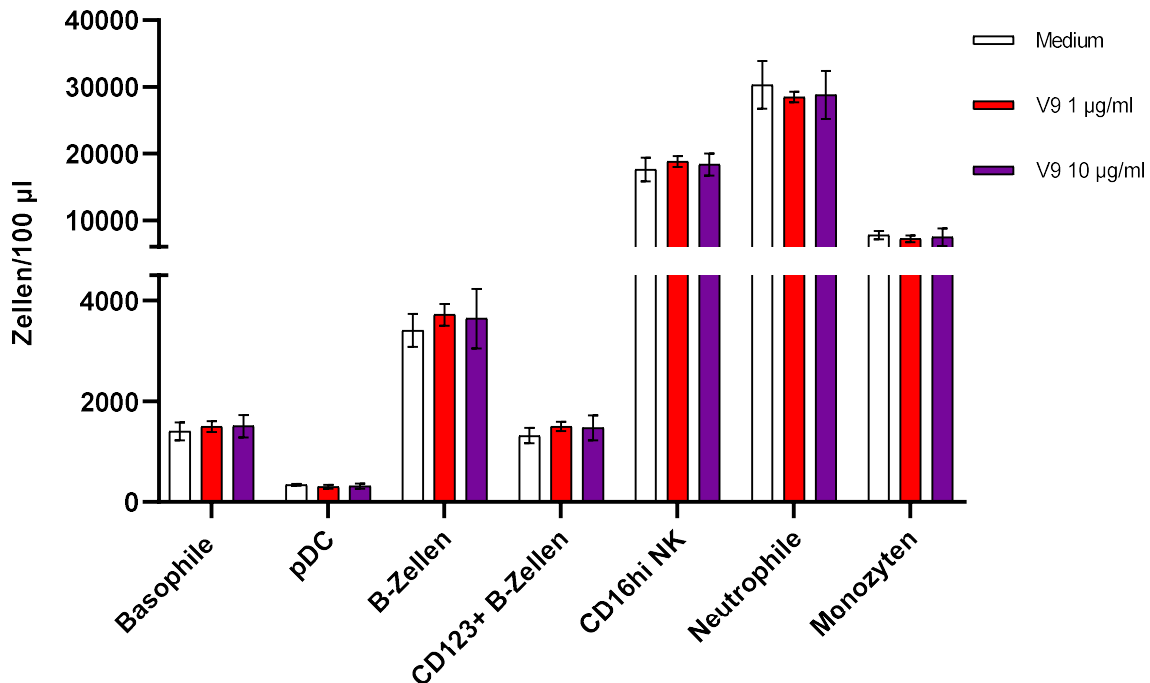


Abbildung 42: Zellzahlen nach Inkubation mit V9

Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit V9 (oder Medium) in den angegebenen Konzentrationen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung der Zellzahlen der dargestellten Zellpopulationen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=4).

In Abbildung 43 ist das Gating des Versuches dargestellt. Anhand des *Forward*- und *Side Scatters* wurden die großen Zellpopulationen Lymphozyten, Monozyten und PMNs voneinander separiert (A).

Mittels der verschiedenen Oberflächenmarkern erfolgte dann aus den einzelnen Populationen das Gating in Subpopulationen.

Aus dem Monozyten-Gate wurden die Monozyten über HLA-DR und CD14 eingegrenzt (B). Anhand der Expression von CD123 konnten Basophile und pDCs separiert werden. Die Zellpopulation pDC verfügt hingegen über mehr CD304 als Basophile (C). B-Zellen wurden mit Hilfe der Expression der Marker CD11b und HLA-DR aus dem Lymphozytengate bestimmt (D). Des Weiteren erfolgte die Unterteilung in CD123+ und CD123- B-Zellen (E). Die Neutrophilen wurden aus dem Gate PMN durch die Marker CD14 (-) und CD16 (+) abgegrenzt.

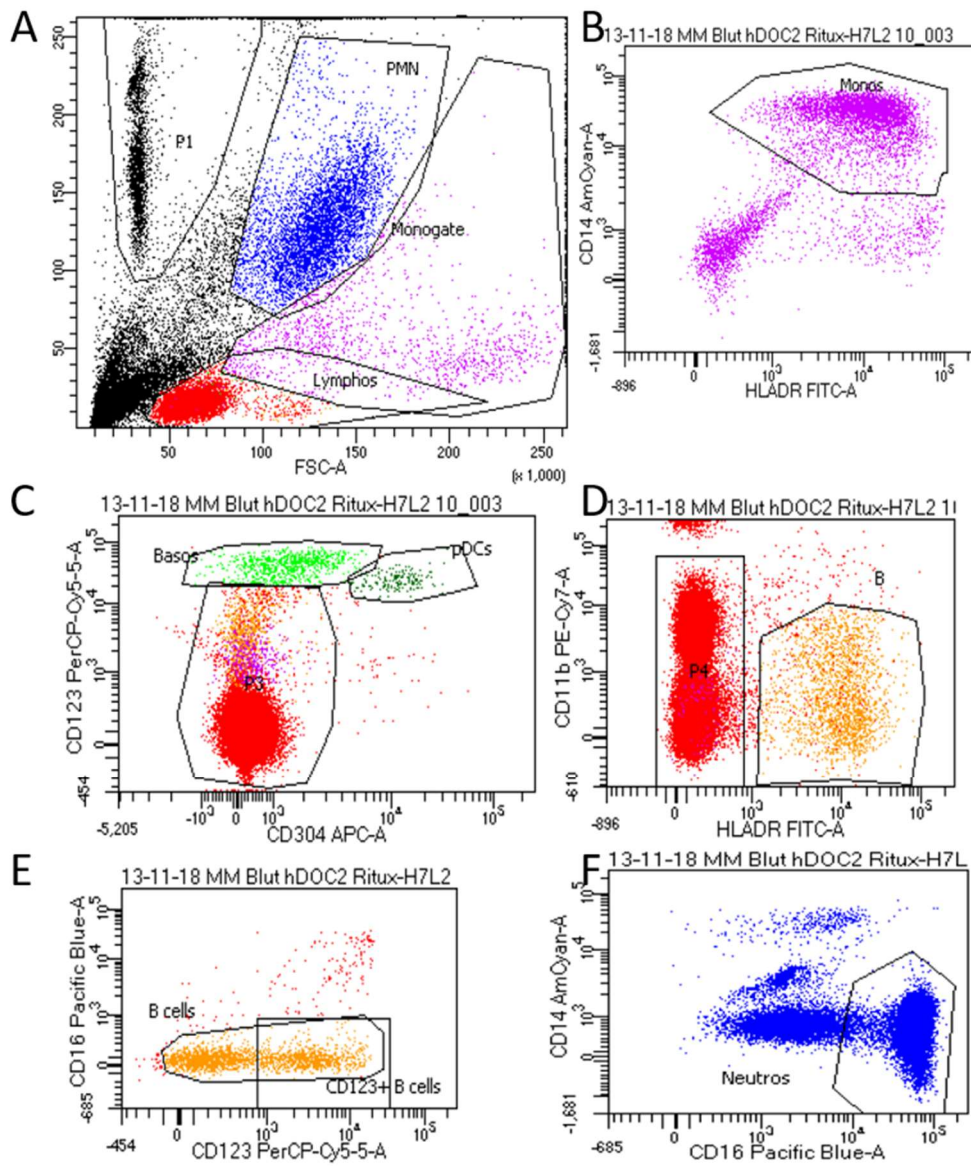


Abbildung 43: Gating der Populationen zur Untersuchung der Rezeptorregulation und Einfluss auf Proliferation durch V9

A: Gating mittels Forward- und Sidewardscatter; B: Monozyten; C: Basophile und pDCs; D: B-Zellen; E: CD123+ B-Zellen; F: Neutrophile

Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine

Abbildung 44 zeigt, dass es durch eine Inkubation über 24 h mit V9 bei Konzentrationen von 1 µg/ml und 10 µg/ml zu keiner vermehrten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF-α oder IFN-γ kommt.

Eine Ausschüttung von IFN-γ ist weder in der Kontrolle noch bei V9 zu detektieren. Die Konzentrationen von IL-6 und TNF-α befinden sich im niedrigen Picogramm-Bereich und somit nahe der Quantifizierungsgrenze.

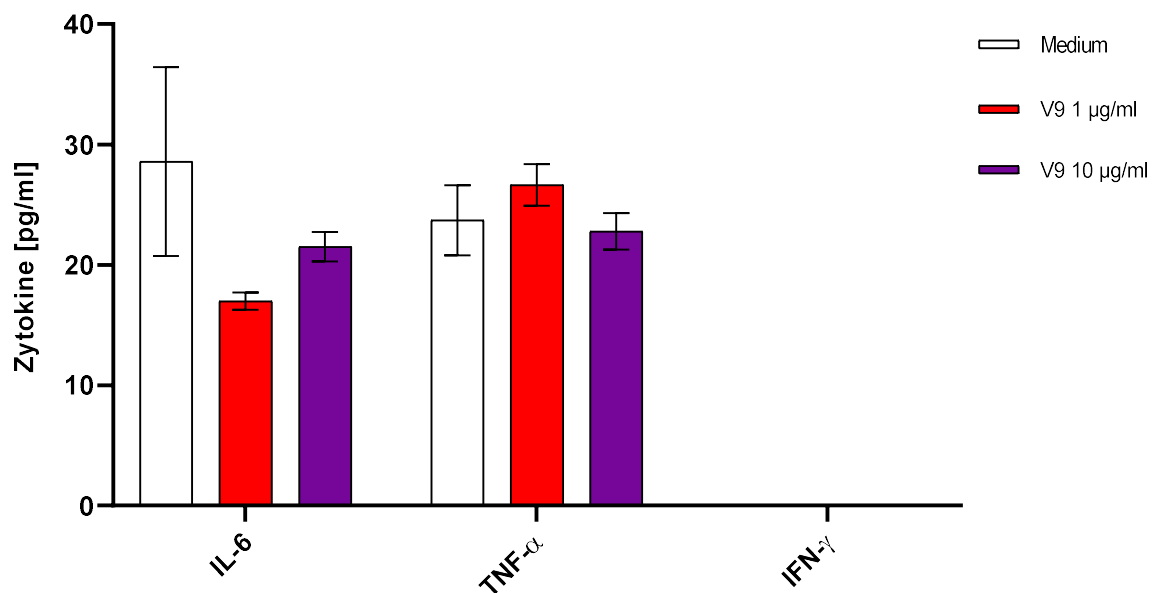


Abbildung 44: Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach V9-Inkubation
Inkubation von frischem humanem Vollblut (Lithium-Heparin) mit V9 (oder Medium) in den angegebenen Konzentrationen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Abnahme der Überstände und die Ermittlung der Konzentrationen der Zytokine IL-6, TNF-α und IFN-γ mittels ELISA (siehe 4.1.3). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (n=4).

5.4 Charakterisierung von anti-idiotypischen Antikörpern

5.4.1 Bindung der anti-idiotypischen Antikörper

Nachdem V9 mit 3F9 präinkubiert worden ist, kann im ELISA weiterhin eine Bindung von V9 an IL-3 durch den Detektionsantikörper *goat-anti-human*-HRP festgestellt werden. Das Signal nimmt mit steigender Konzentration zu und ist vergleichbar zur Signalstärke der Kontrolle (Präinkubation mit 2 % BSA/PBS).

Die stattgefundenene Bindung des murinen anti-idiotypischen Antikörpers 3F9 an V9 kann durch die erfolgreiche Detektion mit dem Detektionsantikörper *rabbit-anti-mouse*-HRP verifiziert werden (siehe Abbildung 45, rechte Seite).

Im Gegensatz zu 3F9, kann nach einer Präinkubation von V9 mit 5F11 im ELISA kein Signal mehr detektiert werden.

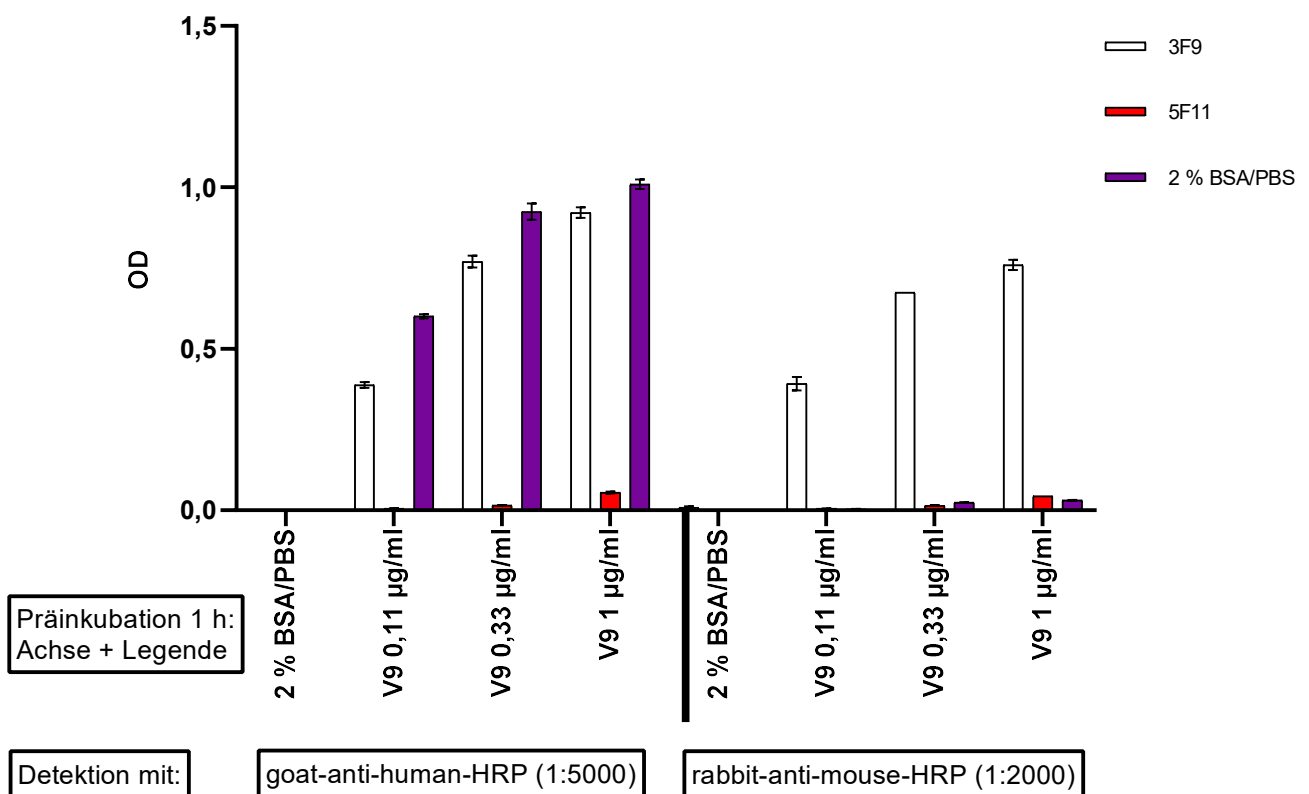


Abbildung 45: Bindung der anti-idiotypischen Antikörper an V9 – ELISA 1

Eine ELISA-Platte wurde mit 2 µg/ml IL-3 über Nacht bei 4 °C gecoatet und geblockt. V9 wurde in den angegebenen Konzentrationen mit 3F9/5F11 (10 µg/ml) oder 2 % BSA/PBS 1 h bei RT präinkubiert. Die Inkubation der Proben dauerte 2 h bei RT, die Detektion mit den Detektionsantikörpern 1 h bei RT. Als Substrat wurde ABTS für 20 min verwendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD bei 405 nm (Referenz 490 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=2).

Die durch ELISA 2 erhaltenen Daten unterstützen die Ergebnisse von ELISA 1. Die Ergebnisse in Abbildung 46 zeigen, dass die durch 3F9 erzeugte OD einzig vom zur Verfügung stehenden V9 abhängt. Die Signalstärke nimmt mit zunehmenden V9 zu und weist eine vergleichbare OD zu ELISA 1 auf. Die Signalstärke bei 5F11 nimmt ebenfalls zu, die Stärke der Signale liegt allerdings deutlich unter denen von 3F9, da nur die freien (d.h. nicht an IL-3 gebundenen) Bindungsstellen von V9 detektiert werden. Mit zunehmenden IL-3 Konzentrationen im Verhältnis zur V9-Konzentration tendiert die Signalstärke bei 5F11 gegen die Signalstärke der Kontrolle (0,1 zu 0,04 bei V9 von 0,11 µg/ml).

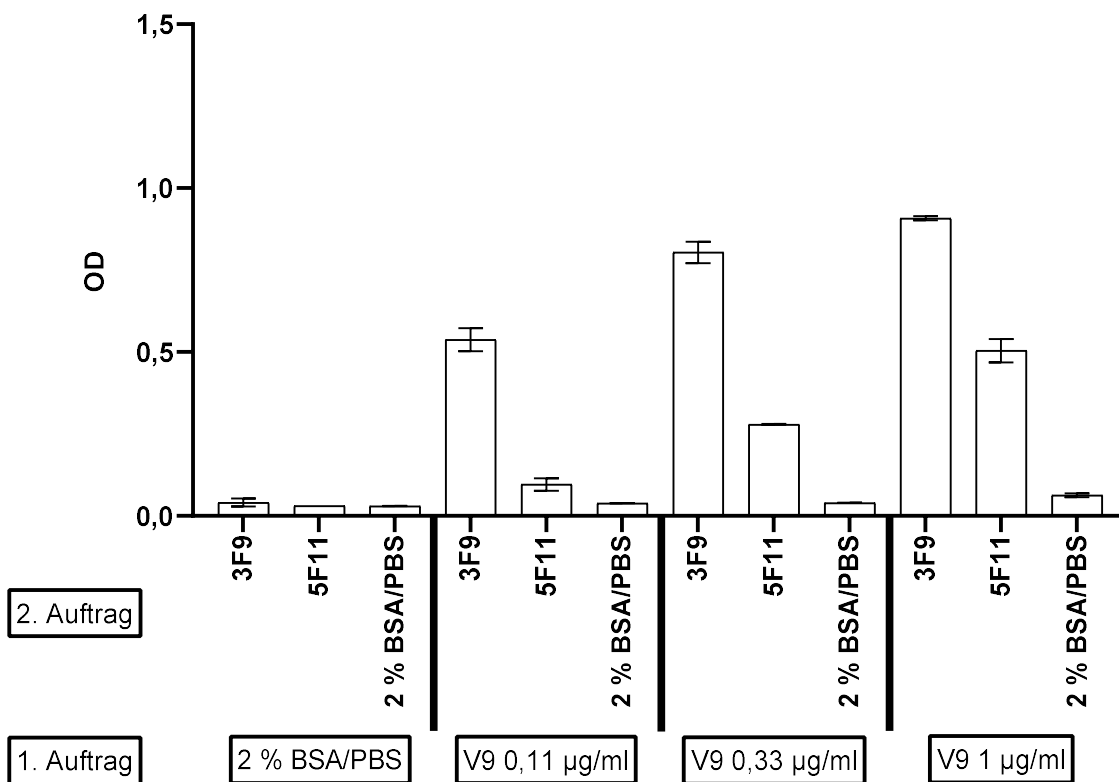


Abbildung 46: Bindung der anti-idiotypischen Antikörper an V9 – ELISA 2

Eine ELISA-Platte wurde mit 2 µg/ml IL-3 über Nacht bei 4 °C gecoatet und geblockt. V9 wurde in den angegebenen Konzentrationen für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 3F9/5F11 (10 µg/ml) oder 2 % BSA/PBS für 1 h bei RT und die Detektion mit dem Detektionsantikörper *rabbit-anti-mouse-HRP* (1:2000) für 1 h bei RT. Als Substrat wurde ABTS für 20 min verwendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD bei 405 nm (Referenz 490 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=2).

5.4.2 IL-3-Effekte der anti-idiotypischen Antikörper

Abbildung 47 zeigt, dass die anti-idiotypischen Antikörper 3F9 und 5F11 selbst bei den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Regulation des Markers CD131 auf Basophilen haben. Die Expression des Markers bleibt auf dem Niveau der Negativkontrolle.

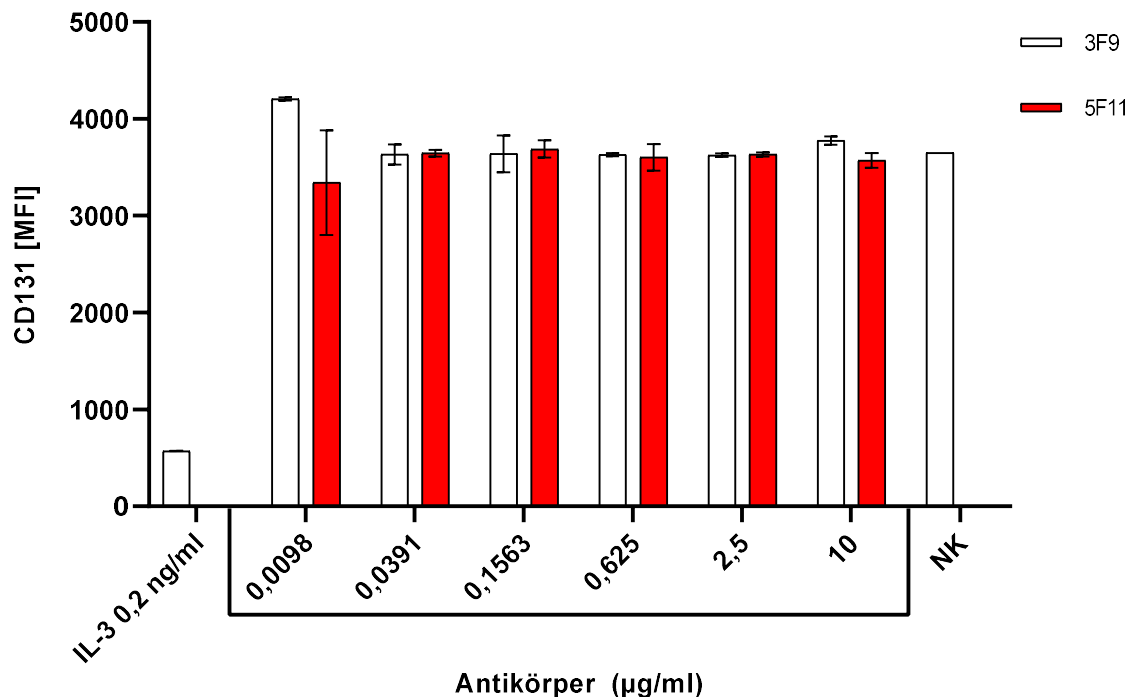


Abbildung 47: IL-3-Effekte der anti-idiotypischen Antikörper

3F9 oder 5F11 (oder als Negativkontrolle (NK) nur Medium bzw. als Positivkontrolle nur IL-3) wurden mit frischem humanem Vollblut (60 µl/Probe, EDTA) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es ergaben sich die angegebenen Endkonzentrationen für die AK-Proben und 0,2 ng/ml für IL-3. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Basophilen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der Medianwerte + SD (n=2).

5.4.3 IL-3-Aktivitätsassay der anti-idiotypischen Antikörper

Der IL-3-Aktivitätsassay zeigt, dass 3F9 nicht die Aktivität von V9 beeinflusst. In allen verwendeten Konzentrationen von 3F9 führt eine Präinkubation mit V9 nicht zu einer Regulation der CD131-Expression auf Basophilen (Abbildung 48).

Der Antikörper 5F11 beeinflusst die inhibitorische Aktivität von V9 (beide Konzentrationen) in den Konzentrationen von 2,5 und 10 µg/ml und die CD131-Expression sinkt mit IL-3 0,1 ng/ml auf den Wert der Positivkontrolle. Bei einer Konzentration von 0,625 µg/ml findet keine Beeinflussung der inhibitorischen Aktivität von V9 durch 5F11

mehr statt (V9 1 µg/ml). Bei einer Konzentration von V9 mit 0,25 µg/ml hingegen, wird CD131 nicht mehr herunterreguliert.

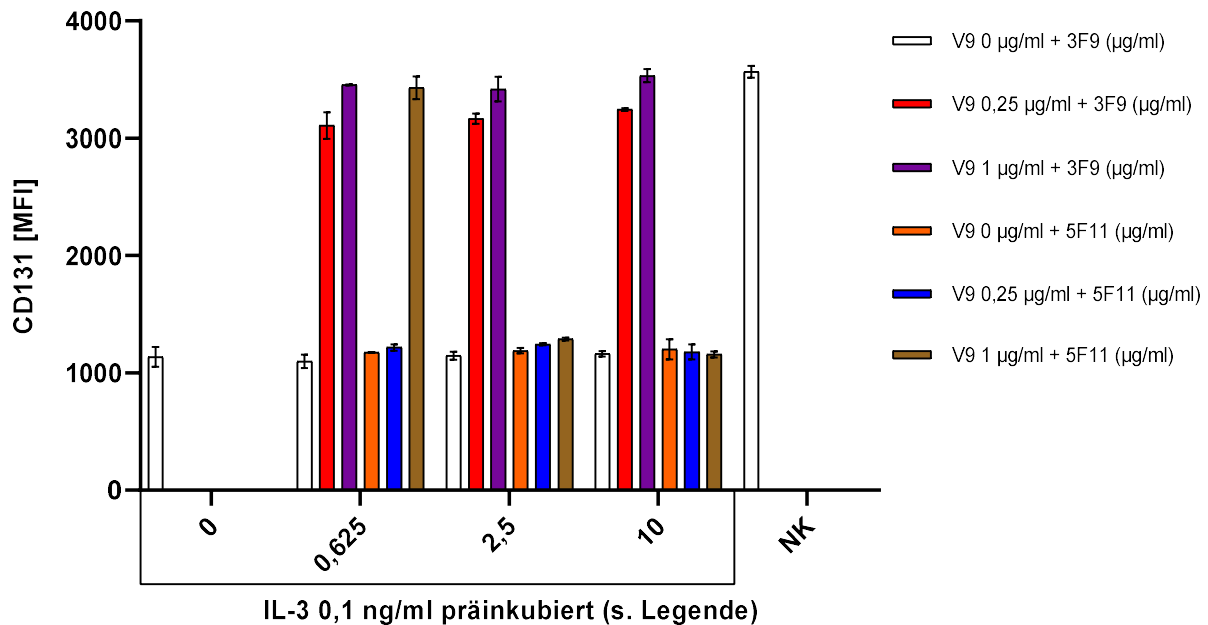


Abbildung 48: IL-3-Aktivitätsassay der anti-idiotypischen Antikörper
V9-Proben wurden für 1 h mit 3F9/5F11 in den angegebenen Konzentrationen für 1 h bei 37 °C im Brutschrank präinkubiert. Es folgte die Präinkubation der Proben (oder als Negativkontrolle (NK) nur Medium) mit IL-3 für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde frisches humanes Vollblut (60 µl/Probe, EDTA) zugegeben und erneut für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es ergaben sich die angegebenen Endkonzentrationen für die V9/AK-Ansätze und 0,2 ng/ml für IL-3. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und die Ermittlung des Medianwertes der CD131-Expression aller Basophilen per FACS-Analyse. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD (n=2).

5.5 Detektion von V9 aus humanem Blutplasma

5.5.1 Theoretische Verteilung der Bindung von IL-3 an V9

Jeder Antikörper besitzt zwei Bindungsstellen für sein Antigen. Über einen statistischen Ansatz lässt sich unter Annahme bestimmter Voraussetzungen die Verteilung von freiem/ungebundenem AK (0x), einarmig gebundenem AK (1x) und doppelt gebundenem AK (2x) bestimmen.

In einem Eppendorf-Cup liegt eine bestimmte Anzahl ($1/2 \cdot z$) Antikörpermoleküle vor, die über z Arme verfügen. Gleichzeitig befindet sich in diesem Eppendorf-Cup eine bestimmte Anzahl an Antigenen mit xz ($0 \leq x \leq 1$). Würde der Antikörper über eine unendlich hohe Affinität verfügen, so würde sich für die Arme im Gleichgewichtszustand folgendes ergeben:

Freie Arme: $z - xz = z(1-x)$ Gebundene Arme: xz Gesamte Arme: z

Zwar existiert keine unendlich hohe Affinität, allerdings verfügt V9 mit $1,4 \cdot 10^{-10}$ M über eine extrem hohe Affinität und sollte somit IL-3 komplett binden.

Für die Berechnung der Verteilung von Antikörpern mit 0 / 1 / 2 Antigenen in Abhängigkeit von x und z wird die Wahrscheinlichkeit für das „zufällige Ziehen zweier Arme“ herangezogen:

Wahrscheinlichkeit für Antikörper mit 0 Antigenen (Frei * Frei):

$$\frac{z(1-x) \times z(1-x)}{zz} = (1-x)(1-x) \quad (5)$$

Wahrscheinlichkeit für Antikörper mit 1 Antigen (Frei * Gebunden + Gebunden * Frei):

$$\frac{2z(1-x) \times xz}{zz} = 2(1-x)x \quad (6)$$

Wahrscheinlichkeit für Antikörper mit 2 Antigenen (Gebunden * Gebunden):

$$\frac{xz \times xz}{zz} = xx \quad (7)$$

Mit den Formeln lässt sich für jedes Verhältnis von Antikörperarmen und IL-3 ausrechnen, welcher Prozentsatz der Antikörper frei, 1x oder 2x gebunden ist.

V9 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa und IL-3 von ca. 15 kDa. Da V9 über zwei Bindungsarme besitzt, wird davon ausgegangen, dass V9 vollständig bei einer IL-3-Konzentration beladen ist, welche 1/5 der eingesetzten V9-Konzentration entspricht.

5.5.2 Gemessene Werte der Konzentrationsbestimmung

In Tabelle 25 sind die tatsächlich detektierten Konzentrationen von V9 und IL-3 den eingesetzten Konzentrationen gegenübergestellt.

Bei einem der ELISA wurden durch *Coating* mit dem blockierenden Antikörper 5F11 (benötigt IL-3-Bindungsstelle zum Binden an V9) und Detektion mit dem nichtblockierenden 3F9 (Bindung an V9 unabhängig von IL-3-Bindungsstelle) nur V9-Antikörper detektiert, die einen oder zwei freie Bindungsarme aufweisen, da nach Bindung an IL-3 keine Bindung mehr an 5F11 möglich ist. Die Bindung von 3F9 wird hingegen nicht beeinflusst (= **ELISA für freie Bindungsarme**).

Bei einem weiteren ELISA wurden durch *Coating* mit dem IL-3-Antikörper AK13 (bindet IL-3 auch nach Bindung an V9) und Detektion über 3F9 und 5F11 nur V9 Antikörper detektiert, welche an einem oder beiden Armen IL-3 gebunden haben. Andernfalls findet eine Bindung an AK13 nicht statt (= **ELISA gebundene Bindungsarme**). Ebenfalls lässt sich mit diesem ELISA die Menge des gebundenen IL-3 bestimmen.

Zur Detektion des gesamten V9 wurde mit 5F11 + K13 geccoatet und erneut mit 3F9 detektiert. 5F11 bindet die freien Arme und K13 die gebundenen Arme von V9 (= **ELISA gesamte Bindungsarme**).

Subtrahiert man die detektierte Menge aus dem **ELISA der freien Bindungsarme** von der detektierten Menge aus dem **ELISA für alle Bindungsarme**, erhält man die Menge an **doppelt gebundenem V9**. Eine Subtraktion dieser Menge von der detektierten Menge aus dem **ELISA der gebundenen Bindungsarme** ergibt wiederum die Menge des **einfach gebundenen V9**. Den Anteil des ungebundenen V9 kann man durch Subtraktion der detektierten Menge an **einfach gebundenem V9** von der detektierten Menge des **ELISA für freie Bindungsarme** ermitteln. Zur Überprüfung der Funktionalität der entwickelten ELISA wurde mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsrechnung eine theoretische Verteilung der Bindungsverhältnisse bestimmt und mit den detektierten Werten verglichen.

Bei den hohen Konzentrationen von V9 werden sowohl V9 als auch IL-3 mit hoher Genauigkeit entsprechend ihren eingesetzten Konzentrationen detektiert. Bei V9 liegen alle detektierten Werte höher als ursprünglich eingesetzt, befinden sich allerdings in derselben Größenordnung und weichen maximal um 30,77 % ab (10.000 ng/ml zu detektierten 13.077 ng/ml). IL-3 wird genauer detektiert und weicht maximal um 4,46 % ab (100 ng/ml zu detektierten 95,54 ng/ml).

Ähnliches gilt für V9 mit 100 ng/ml. Die maximal detektierte Abweichung beträgt 19,41 % (100 ng/ml zu detektierten 119,41 ng/ml). IL-3 hingegen wird innerhalb derselben Größenordnung detektiert, allerdings beträgt die Abweichung 190 % (0,1 ng/ml zu detektierten 0,29 ng/ml).

Bei einer Konzentration von 1:1, zwischen V9 und IL-3 (rot markiert), werden deutlich fehlerbehaftete Werte detektiert, sowohl für V9 und insbesondere für IL-3 (0,64 ng/ml detektiert anstatt der eingesetzten 10 ng/ml). Die weiteren detektierten Konzentrationen bei einer V9-Konzentration von 10 ng/ml befinden sich ebenfalls in derselben Größenordnung, wie die eingesetzten Konzentrationen und ähneln in ihren Abweichungen denen von 100 ng/ml.

Tabelle 25: Detektierte V9- (Bestimmung über ELISA gesamte Bindungsarme) und IL-3-Konzentrationen (Bestimmung über ELISA gebundene Bindungsarme) (Mittelwerte)

V9 (ng/ml) + IL-3 (ng/ml)	Det. V9 (ng/ml)	Det. IL-3 (ng/ml)
10.000 + 100	12591	95,54
10.000 + 10	13077	10,12
10.000 + 1	11277	0,93
100 + 10	119,41	6,31
100 + 1	89,5	0,85
100 + 0,1	98,91	0,29
10 + 10	6,42	0,64
10 + 1	8,53	0,75
10 + 0,1	9,04	0,28

Vergleicht man die theoretisch berechnete und tatsächliche Verteilung, wird deutlich, dass die theoretischen Werte den reellen Werten, insbesondere bei den V9-Konzentrationen von 10.000 ng/ml und 100 ng/ml, nahekommen (vergleiche Tabelle 26).

Die Abweichungen bewegen sich bis maximal 23 % (1x geb. bei V9 10.000 ng/ml + IL-3 100 ng/ml) bei V9 10.000 ng/ml, wobei dort kein doppelt gebundener V9 detektiert werden konnte, obwohl 0,3 % erwartet worden sind.

Bei kleiner werdenden V9-Konzentrationen werden die Unterschiede zwischen reellen und theoretischen Werten größer, sobald sich IL-3 in seiner Konzentration der Konzentration von V9 annähert. Bei V9 100 ng/ml + IL-3 10 ng/ml werden keine doppelt

gebundenen V9-Antikörper detektiert obwohl 25 % erwartet wurden. Hingegen wurden deutlich mehr ungebundene Antikörper detektiert (47,17 statt 25 %). Bei sinkenden IL-3-Konzentrationen stimmen die erwarteten und theoretischen ermittelten Werte für 0x und 1x gebunden gut überein. Doppelt gebundener V9 wird allerdings nicht detektiert obwohl es erwartet wurde (V9 100 ng/ml + IL-3 1 ng/ml) oder detektiert obwohl es nicht erwartet wurde (V9 100 ng/ml + IL-3 0,1 ng/ml)

Bei einer Konzentration von 1:1, zwischen V9 und IL-3 (rot markiert), können ebenfalls keine verwertbaren Werte mehr erzielt werden. Insgesamt wird die Übereinstimmung der theoretischen und reell ermittelten Werte mit sinkender V9-Konzentration unzuverlässig und hohe Abweichungen werden detektiert (z.B. V9 10 ng/ml + IL-3 1 ng/ml 0x gebunden werden anstatt 25 nur 12,13 % detektiert oder bei V9 10 ng/ml + IL-3 0,1 ng/ml 1x gebunden werden anstatt 9,5 sogar 25,9 % detektiert).

Tabelle 26: Erwartete und tatsächliche Verteilung der Bindungsverhältnisse von V9 und IL-3

V9 (ng/ml) + IL-3 (ng/ml)	0x geb. (%)	0x geb. erwartet (%)	1x geb. (%)	1x geb. erwartet (%)	2x geb. (%)	2x geb. erwartet (%)
10.000 + 100	92,41	90,3	7,59	9,50	0	0,3
10.000 + 10	99,23	99	0,77	1,00	0	0
10.000 + 1	99,92	99,9	0,08	0,10	0	0
100 + 10	47,17	25	52,83	50,00	0	25
100 + 1	90,51	90,3	9,49	9,50	0	0,3
100 + 0,1	97,0	99	1,74	1,00	1,25	0
10 + 10	0	-	48,93	-	51,1	-
10 + 1	12,13	25	87,87	50,00	0	25
10 + 0,1	68,6	90,3	25,90	9,50	5,5	0,3

6. Diskussion

6.1 Basophile reagieren höchst sensitiv auf IL-3

Die zelluläre Reaktion auf IL-3 oder GM-CSF wurde gemessen anhand der Downregulation der IL-3-Rezeptor „ *β -common*“-Untereinheit CD131, welche ebenfalls die „ *β -common*“-Untereinheit für GM-CSF darstellt (vergleiche 1.5.2). Diese wird nach Inkubation mit IL-3 oder GM-CSF internalisiert und proteolytisch abgebaut. Im Gegensatz dazu wird die IL-3-Rezeptor α -Kette CD123 und die GM-CSF-Rezeptor α -Kette CD116 nicht internalisiert [116]. Die Untersuchungen von IL-3-Effekten auf Blutleukozyten zeigten, dass Basophile und pDCs höchst sensitiv auf IL-3 reagieren. Bei Basophilen zeigte sich nach einstündiger Inkubation mit IL-3 eine konzentrationsabhängige, fast vollständige Downmodulation von CD131, während GM-CSF nur schwach aktiv war. Die Expression sank mit IL-3 auf unter 10 % (6631 ± 132 im Vergleich zu 509 ± 23 MFI). GM-CSF und LPS führten zu einer deutlich geringeren Regulation von CD131 und einem Absinken um ca. 25 %. Basophile waren die einzige Zellpopulation, welche ein derartiges Verhalten aufwies, weitere untersuchte und nicht dargestellte Populationen zeigten ein Verhalten, welches denen von pDCs oder Eosinophilen ähnelte. Bei Eosinophilen führte eine einstündige Inkubation zur Herunterregulation des „ *β -common*“-Rezeptors CD131 durch IL-3 und GM-CSF auf rund 50 %. Bei pDCs regulierten IL-3 und GM-CSF den Rezeptor CD131 annähernd komplett herunter (ca. 40 MFI bei einer Kontrolle von 1400 ± 42 MFI).

Dies zeigt, dass Basophile stark auf IL-3 und nur sehr schwach auf GM-CSF reagieren, während pDCs sowohl auf IL-3 als auch GM-CSF reagieren. Interessanterweise wurde die IL-3-Rezeptor α -Kette CD123 sowohl durch IL-3 als auch durch GM-CSF auf pDCs um ca. 50 % erhöht. Auch durch LPS und TNF- α wurde eine Erhöhung von CD123 festgestellt. Basophile zeigten bei CD123 ein ähnliches Verhalten wie Eosinophile und nur eine geringfügige Regulation.

Die Ergebnisse offenbarten ein sehr starkes Ansprechen von Basophilen auf IL-3-Stimulation durch Regulation von CD131, allerdings ohne gleichzeitige Regulation vom IL-3-Rezeptor CD123. Dies machte Basophile zum idealen Kandidaten zur Entwicklung eines IL-3-Aktivitätsassays. Hierfür wurden verschiedenlange Stimulationen und

verschiedene Konzentrationen von IL-3 untersucht, um die beste Kombination zu ermitteln. Die Ergebnisse resultierten im IL-3-Aktivitätsassay, welcher zur Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der humanisierten Varianten und zu deren Stabilitätscharakterisierung nach physikalischen Einflüssen in dieser Arbeit verwendet worden ist (4.1.2).

Ein Screening von Zytokinen bei einer 24-stündigen Inkubation offenbarte auch andere Zytokine, welche eine Regulation von CD131 auf Basophilen hervorriefen. IFN- α und LPS reduzierten die Expression von CD131 auf 2077 bzw. 1764 MFI im Vergleich zu 5046 MFI der Kontrolle. Eine stärkere Regulation wurde sowohl durch IL-2 und IL-15 erreicht und eine Reduktion auf 1484 bzw. 1272 MFI. Gleichzeitig wurden die Überstände mit einem ELISA auf eine Expression von IL-3 untersucht um festzustellen, ob die Zytokine direkt oder indirekt die Regulation von CD131 auf Basophilen beeinflussen. Im Falle von LPS und IFN- α konnte kein IL-3 detektiert werden, welches darauf hindeutet, dass diese direkt die CD131-Expression beeinflussen oder über einen nicht bekannten indirekten Effekt. Sowohl bei IL-2 als auch IL-15 hingegen konnte eine Expression von IL-3 im niedrigen Picogramm-Bereich festgestellt werden (15 bzw. 11,2 pg/ml), welches im Zuge des humanisierten IL-3-Antikörpers V9 von besonderem Interesse gewesen ist.

Zur weiteren Verifikation wurde der Effekt von IL-2 untersucht. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von IL-2 und IL-15 [117] wurde beschlossen, sich auf IL-2 alleine zu konzentrieren.

Bei einer 24-stündigen Inkubation von Blutleukozyten mit IL-2 konnte der zuvor beobachtete IL-2-Effekt verifiziert werden und die CD131-Expression auf Basophilen sank von 4515 ± 105 auf 1274 ± 21 MFI. Benötigt wurden hierfür 20 ng/ml IL-2. Ein ähnlicher Effekt wurde mit 50 pg/ml IL-3 als positiver Kontrolle erhalten und bereits mit 10 pg/ml IL-3 wurde eine deutliche Reduktion auf 2909 MFI detektiert. Entsprechend der zuvor ermittelten Werte für die IL-3-Expression durch 20 ng/ml IL-2, entsprach das Ergebnis den Erwartungen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der durch IL-2 induzierte Effekt auf einer indirekten Wirkung basiert. IL-2 regte die Zellen zur Ausschüttung von IL-3 an, wodurch es zur Rezeptorregulation gekommen ist. Wurde die Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor CD123 durch einen neutralisierenden IL-3-Antikörper, wie V9 oder einen blockierenden anti-CD123-Antikörper unterbunden, wurde auch der Effekt von IL-2 deutlich abgemindert. Die Expressionsverringerung reduzierte sich auf 3254 ± 36

bzw. 3509 ± 12 MFI. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass der IL-2-Effekt vor allem auf einem indirekten Effekt, genauer der Induzierung der IL-3-Produktion, basiert.

6.2 T-Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-2 induzierter IL-3-Produktion – NK-Zellen produzieren initial ebenfalls IL-3

Aufgrund der Ermittlung von IL-2 als indirekter Regulator der CD131-Expression auf Basophilen (5.1.3), sollten in einem nächsten Schritt die durch IL-2 stimulierten IL-3-Produzenten bestimmt werden. Der IL-2-Rezeptor ist aus drei Untereinheiten aufgebaut, der α -, β - und γ -Untereinheit (Abbildung 49). Einen IL-2-Rezeptor mittlerer Affinität besitzen CD8+ T-Zellen und NK-Zellen. Einen IL-2-Rezeptor hoher Affinität hingegen nur aktivierte Zellen [118]. T-Zellen bilden den IL-2-Rezeptor hoher Affinität erst nach erfolgter Aktivierung aus. Betrachtet man die Aktivierung von T-Zellen, ist ein Aktivierungssignal über ihren TCR/CD3-Rezeptor für eine vollständige Aktivierung unerlässlich [119].

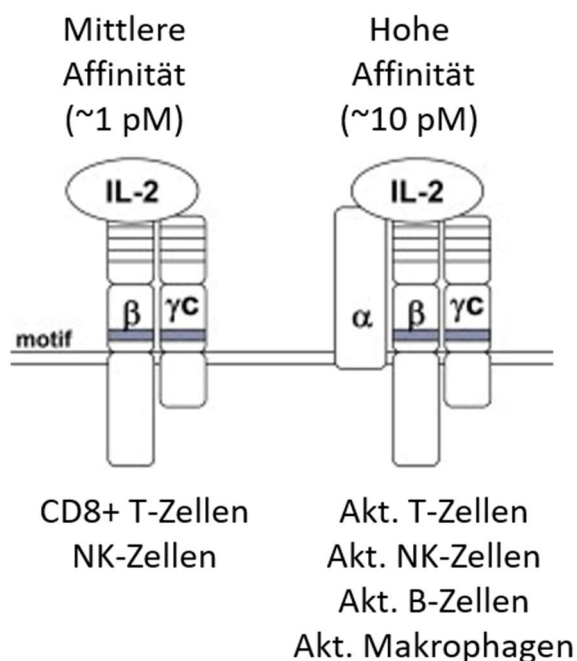


Abbildung 49: Affinität des IL-2-Rezeptors. Modifiziert nach [118]

In den durchgeführten Versuchen, bei welchen der IL-2-Effekt beobachtet werden konnte, fehlte diese Aktivierung des TCR-Rezeptors, weswegen NK-Zellen mit ihrem IL-2-Rezeptor mittlerer Affinität als potentieller IL-3-Produzent erschienen. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass NK-Zellen nach IL-2-Stimulation in der Lage sind GM-CSF zu produzieren, welches mit IL-3 verwandt ist [120].

Eine 24-stündige Stimulation mit IL-2 in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen erhärtete diese Vermutung. Bei einer IL-2-Konzentration von 100 ng/ml waren geringe Mengen von IL-3 zu detektieren (maximal $13,68 \pm 9,6$ pg/ml bei IL-2 (100 ng/ml) + IL-18 (50 ng/ml)). Gleichzeitig waren sowohl IL-3 als auch GM-CSF nach einer Depletion von CD56⁺ Zellen kaum mehr zu detektieren. CD56 gilt als Marker für NK-Zellen [121]. Daher war die Schlussfolgerung, dass NK-Zellen die durch IL-2 stimulierten IL-3-Produzenten sein mussten. In weiteren Versuchen wurden längere Inkubationen mit Medium, IL-2 und IL-18 (für 3 und 5 Tage durchgeführt). Nach Depletion der CD3⁺ Zellen konnte nach 3 und 5 Tagen, trotz IL-2-Stimulation, kaum mehr IL-3 nachgewiesen werden, während es nach Depletion von CD56⁺ Zellen sogar zu einer Steigerung der detektierten IL-3-Konzentration im Vergleich zur Scheindepletion kam. Für GM-CSF wurden deutlich unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Wurden die CD56⁺ Zellen depletiert, sank die detektierte GM-CSF-Konzentration nach 1 oder 3 Tagen gegen null, wohingegen eine Depletion von CD3⁺ Zellen die Ausschüttung von GM-CSF nicht beeinträchtigte.

Dieses Ergebnis lässt folgende Schlussfolgerung zu: Hauptproduzenten von GM-CSF nach IL-2-Stimulation sind CD56⁺ Zellen und somit zumeist NK-Zellen. IL-3 hingegen wird nur initial (bis Tag 1) durch IL-2-Stimulation von NK-Zellen produziert, zu späteren Zeitpunkten (3 und 5 Tage) jedoch zu einem großen Teil von T-Zellen, nachdem sie durch IL-2 stimuliert worden sind.

T-Zellen scheinen in der Lage zu sein, auch ohne vollständige Aktivierung und ausbleibender Aktivierung des TCR-Rezeptors, durch IL-2-Stimulation IL-3 zu produzieren. Möglicherweise reicht der IL-2-Rezeptor mittlerer Affinität auf CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 49) aus, um die IL-3-Produktion zu initiieren. Unter den gegebenen Kulturbedingungen scheinen die T-Zellen eine Art von Autoproliferation durchzumachen, wie es z.B. bei multipler Sklerose schon beschrieben wurde [122].

6.3 Die T-Zell-Subpopulationen T_{tm} und T_{te} CD28^{hi} sind hauptverantwortlich für die IL-3-Ausschüttung

Nachdem die T-Zellen als hauptsächliche IL-3-Produzenten identifiziert wurden, sollte eine genauere Bestimmung der T-Zell-Subpopulation, welche den größten Teil IL-3 produziert, durchgeführt werden. Die FACS-Analysen der T-Zellen zeigten, dass insbesondere die Zellpopulationen T_{tm} und T_{te} CD28^{hi} verantwortlich für eine IL-3 Produktion sind.

Ohne Stimulation bewegte sich der Anteil der IL-3⁺ T-Zellen in einem niedrigen einstelligen Prozentbereich (Maximum bei CD8⁺ T-Zellen lag bei $0,97 \pm 0,07$ % und bei CD4⁺ T-Zellen bei $2,3 \pm 0,1$ %). Die größten Populationen machten T_{tm} bei den CD8⁺ T-Zellen und CD45RA⁻ bei den CD4⁺ T-Zellen aus. Zur genauen Bestimmung der Zellpopulationen erfolgte eine Aktivierung der T-Zellen mit Hilfe von IL-2 und anti-CD3 in zwei unterschiedlichen Ansätzen. Entweder erfolgte eine Stimulation der Zellen für zwei Tage (IL-2 und anti-CD3 kombiniert) oder für insgesamt fünf Tage, wobei einer dreitägigen IL-2 Stimulation eine zweitägige anti-CD3 Stimulation folgte. Unabhängig vom gewählten Ansatz machten sowohl bei den CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen die Populationen T_{tm} und T_{te} CD28^{hi} den größten Anteil an IL-3⁺ Zellen aus. Bei den CD8⁺ T-Zellen betrug der kombinierte Anteil der beiden Populationen minimal 76,5 % (IL-2 3 d + anti-CD3 2d) und maximal 90,6 % (Medium 3 d + anti-CD3 2d) aller IL-3⁺ T-Zellen. Eine Ausnahme war bei der zweitägigen Stimulation mit IL-2 zu beobachten, bei welcher sich das Verhältnis zu Gunsten der T_{te} CD28^{hi} Population verschob. Bei den CD4⁺ T-Zellen stellte die T_{tm} Subpopulation minimal 66,2 % und maximal 77,6 % aller IL-3⁺ Zellen.

Betrachtet man die absoluten Zellzahlen nach einer zweitägigen kombinierten Stimulation, fällt auf, dass sich die Zellzahl aller CD8⁺ T-Zellen und der T_{te} CD28^{hi} deutlich erhöhte (von $10,7 \pm 1,0$ auf $41,0 \pm 4,6$ bzw. $3,5 \pm 0,5$ auf $26,8 \pm 3,9$ Zellen/ μ l). Der resultierende Anteil der Subpopulation T_{te} CD28^{hi} an allen CD8⁺ T-Zellen verschob sich von rund 32,7 % auf fast 65,3 %. Bei der fünftägigen Stimulation hingegen fand eine derartige Verschiebung nicht statt. Auch die Zellzahlen waren vergleichbar zur zweitägigen Stimulation mit Medium + anti-CD3.

Die Tte CD28hi Population stellt eine weiterdifferenzierte und terminal ausdifferenzierte Subpopulation von T-Zellen dar. Werden T-Zellen aktiviert, könne sie sich weiterdifferenzieren hin zu terminal differenzierten T-Zellen. Somit erscheint es plausibel, dass ein kombiniertes Aktivierungssignal aus IL-2 und anti-CD3 die gesteigerte Differenzierung hin zu Tte CD28hi anregt. Wie bereits zuvor beschrieben, benötigen T-Zellen immer eine Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors CD3, z.B. über anti-CD3. Liegt nur ein Signal vor, also IL-2 oder anti-CD3, wie bei der fünftägigen Stimulation, reichte dies nicht aus, um eine gesteigerte Differenzierung und resultierend signifikante Verschiebung der Verteilung innerhalb der Populationen zu erzielen.

Beide hauptsächlichen IL-3+ Subpopulationen verfügen über CD28. CD28 gilt als Kostimulator bei der Aktivierung von T-Zellen. Daher zeigten insbesondere diese zusätzlich aktivierbaren T-Zellen ein hohes Maß an einer Ausschüttung von IL-3.

Bei den zusätzlichen ELISA-Daten wurden überraschende Ergebnisse erhalten. Trotz der deutlich erhöhten Zellzahl bei einer zweitägigen Stimulation mit IL-2 und anti-CD3, konnten dort keine erhöhten Ausschüttungen von IL-3 detektiert werden. Im Gegensatz hierzu wurden erhöhte IL-3 Werte bei einer dreitägigen Stimulation mit IL-2 und folgender zweitägiger anti-CD3 Stimulation detektiert.

Verglichen mit einer zweitägigen kombinierten Stimulation mit IL-2 und anti-CD3, stiegen die detektierten Konzentrationen von IL-3 bei Spender 1 um das 19-fache und bei Spender 2 sogar das 192-fache an. Dies könnte zwei Erklärungen haben. Die dreitägige Stimulation mit IL-2 erhöhte zwar die Zellzahl nicht signifikant und änderte auch die Verteilung der Subpopulationen nicht wesentlich, führte aber zu einer Aktivierung der T-Zellen und vor allem bei den Ttm und Tte CD28hi Subpopulationen zu einem „*Priming*“ hin zu einer gesteigerten IL-3 Produktion. Die nachfolgende Aktivierung der T-Zellen über ihren CD3-Rezeptor mittels anti-CD3 startete eine massive IL-3-Ausschüttung. Die IL-3-Ausschüttung hierbei war deutlich erhöht gegenüber der IL-3-Ausschüttung nach einer zweitägigen Stimulation mit anti-CD3. Die große Ausschüttung könnte dazu geführt haben, dass weniger IL-3+ Zellen im FACS bei intrazellulärer Färbung von IL-3 detektiert werden konnten. Bei der zweitägigen Stimulation mit anti-CD3 könnte es auch zu gesteigerter IL-3-Produktion gekommen sein, allerdings noch zu keiner Ausschüttung des IL-3. Hierdurch erschienen zwar deutlich mehr IL-3+ Zellen bei der intrazellulären Färbung und FACS-Auswertung, eine Ausschüttung und somit Detektion im ELISA war aber nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Erzielung einer möglichst hohen IL-3-Produktion durch T-Zellen durch eine vorherige Stimulation mit IL-2 und nachfolgender anti-CD3-Stimulation ein sehr effektives Mittel zu sein scheint. Eine erhöhte Anzahl an IL-3+ Zellen hingegen erhält man durch eine kombinierte Stimulation mit IL-2 und anti-CD3. Insgesamt sind sowohl die IL-3-Produktion durch NK-Zellen und sehr ausgeprägte Stimulation der IL-3-Sekretion durch T-Zellen bisher nicht beschrieben.

6.4 Die Humanisierung von P8C11 generierte die wirksame V9

Ausgehend von dem murinen anti-human IL-3 Antikörper P8C11 fand die Humanisierung hin zu V9 statt. Ein Problem bei der Humanisierung stellt immer die Vermeidung von Immunogenität dar. Selbst bei einem vollständig humanen Antikörper, welcher beispielsweise mit Hilfe von transgenen Mäusen erzeugt worden ist, war meist kein Ausbleiben von AAR zu erzielen. Die Immunogenität der generierten monoklonalen Antikörper basiert dort grundlegend auf ihren CDRs, welche hypermutiert sind und daher potentiell immunogen für das humane Immunsystem sind (vergleiche 1.3).

Neuste Computermodele und Datenbanken erleichtern zwar die Generierung von passenden FR beim *CDR-Grafting*, stellen aber trotzdem nur eine bedingt gültige Vorhersage dar, welche Aminosäuren der FR an der Antigenbindung beteiligt sind (siehe 1.4). Die Komplexität der Vorhersage ist für das *SDR-Grafting* nochmals erhöht, jedoch ist der zusätzliche Nutzen des *SDR-Graftings* gegenüber dem *CDR-Grafting* zweifelhaft und die Gefahr vorhanden, zwar die Immunogenität zu verringern, aber zusätzlich an Affinität zu verlieren. Diese Abwägung führte zu der Entscheidung, dass lediglich ein *CDR-Grafting* und kein *SDR-Grafting* stattfinden sollte. Zudem wurde beschlossen, zunächst über den Zwischenschritt der Chimärisierung zu gehen und somit einen Referenzantikörper für den weiteren Entwicklungsprozess zu erhalten.

Mit den gewählten konstanten Regionen wurde ein zufriedenstellender chimärer Antikörper P8C11-Chim generiert, welcher eine 0,6x Referenzkonzentration von P8C11 benötigte, um eine 50 % Inhibition des IL-3-Effekts auf die Regulation des Rezeptors CD131 auf Basophile zu erzielen (IL-3-Aktivitätsassay).

Es konnte innerhalb der Entwicklung des IL-3-Aktivitätsassays ermittelt werden, dass insbesondere Basophile innerhalb kürzester Zeit (1 h) äußerst sensitiv auf eine Stimu-

lation mit IL-3 reagierten. Bereits 0,2 ng/ml IL-3 reichten aus, um eine eindeutig detektierbare Herrunterregulation von CD131 zu bewirken. Zu beachten ist, dass der IL-3-Aktivitätsassay vor allem dem schnellen Screening von Varianten und Stabilität galt. Die benötigten IC₅₀-Werte schwankten spenderabhängig und bei selben Spendern auch abhängig vom Experiment. Daher wurden zur Abschätzung der inhibitorischen Effektivität nicht die Absolutwerte, sondern das Vielfache der Referenzkonzentration verwendet. Auch diese Werte unterlagen Schwankungen, welche auf die Art der Ermittlung der IC₅₀-Werte zurückzuführen sind. Aus den gemessenen Werten der CD131-Expression auf Basophilen wurde eine Regressionsgerade ermittelt und aus der Geradengleichung die IC₅₀-Werte bestimmt. Da die IC₅₀-Werte teils im niedrigen Nanogramm-Bereich lagen, konnten bereits geringe Abweichungen bei einem der CD131-Expressionswerte zu deutlichen Abweichungen in der Regressionsgerade führen. Aus diesem Grund wurden Abweichungen in einem Spektrum von 0,5x – 2,0 der Referenzkonzentration nicht als signifikante Abweichungen gewertet.

Sämtliche, zunächst erzeugten Varianten a – i, führten zu einem nicht tolerierbaren Verlust der inhibitorischen Aktivität. Wie bereits unter anderem Foote und Winter sowie Makabe et al. feststellten, ist ein einfaches Übertragen der CDR-Regionen in ein humanes FR-Gerüst meist insuffizient, da Anteile der murinen FR direkt oder indirekt an der Antigenbindung partizipieren [22, 23]. Daher wurde beschlossen, eine schrittweise Humanisierung vorzunehmen, um die problematischen Bereiche einzugrenzen.

Nach Eingrenzung der Problematik auf die schwere Kette, erfolgte die schrittweise Humanisierung der einzelnen FR. Ein besonderer Fokus lag auf der Identifizierung von FR-Aminosäuren, welche direkten oder indirekten Einfluss auf CDR3 hatten. Mehrere Arbeiten konnten feststellen, dass insbesondere CDR3 der schweren Kette für die Antikörper-Antigen-Bindung verantwortlich ist und CDR3 über die meisten Mutationen, meisten Kontakte mit dem Antigen und über die größte Variabilität der Länge verfügt. Zudem zeigt CDR3 die größte Variabilität bei seiner Konformation auf. Dies führt dazu, dass es mit Hilfe von Computern bis jetzt nicht möglich war, Modelle für den CDR-H3-Loop zu generieren [123-125].

V9 wies schlussendlich, nach schrittweiser Humanisierung, eine zufriedenstellende inhibitorische Aktivität auf mit 1,38x (ungereinigt) bzw. 1,67x (gereinigt) der benötigten Referenzkonzentration auf. Darüber hinaus sind in V9 lediglich zwei murine Aminosäuren innerhalb der FR des ursprünglichen P8C11-Antikörpers enthalten. Der Aufbau

der variablen Domäne trägt unmittelbar zur Stabilität des gesamten Antikörpermoleküls bei [33]. Stabilitätsprobleme deuten deshalb auch immer auf Probleme innerhalb der FR des Antikörpers hin.

6.5 V9 verfügt über eine hohe Stabilität

Überprüft wurde V9 hinsichtlich klassischer zu erwartender physikalischer Einflüsse. Bei sich wiederholenden Freeze-Thaw-Cycles (FTC) im Bereich bis 10x zeigte V9 keine negativen Veränderungen hinsichtlich seiner inhibitorischen Aktivität oder des Monomergehalts.

Auch bei einer üblichen Langzeitlagerung, bei 4 °C oder RT, war V9 stabil und die Abweichungen lagen im tolerierten Bereich. Zur Überprüfung physiologischer Bedingungen erfolgte zudem die Lagerung in Plasma und Serum bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C. Bei diesen Bedingungen wurde erst nach 28 Tagen eine signifikante Reduktion der inhibitorischen Aktivität festgestellt. Sowohl bei EDTA-Plasma als auch Serum steigerte sich die benötigte Referenzkonzentration auf das ca. 2,5x, Heparin-Plasma auf das 1,98x. Dies deutet auf eine hohe Plasmastabilität des Antikörpers hin.

Ein Großteil aller produzierten therapeutischen Antikörper wird in einer Umgebung von pH 5-7 produziert [126]. Eine erste Analyse der pH-Stabilität erfolgte deshalb im Bereich von pH 4-6 und als Vergleich im physiologischen pH von 7,4. Innerhalb dieses Bereich verhielt sich der Antikörper stabil und verlor weder an inhibitorischer Aktivität noch an Monomerität.

Problematisch waren die pH-Werte von 2 und 3. Diese wurden überprüft, da einzelne Schritte der Antikörperherstellung, z.B. Elution aus einer Protein A-Säule unter Virusinaktivierung in diesem Bereich durchgeführt werden [126, 127]. Der Einfluss von pH 2 sorgte für eine deutliche Ausflockung des Antikörpers, vermeintlich durch Aggregation. Diese Problematik ist unter anderem von Mazzer et al. für mehrere Antikörper beschrieben [127]. Ähnliches war in geringerem Umfang für pH 3 zu beobachten. Die gleichzeitige Analyse der inhibitorischen Aktivität hingegen offenbarte, dass es bei pH 3 zu keiner signifikanten Verschlechterung kam, wohingegen eine Abnahme bei pH 2 deutlich zu erkennen war. Die äußerlich sichtbare geringe Ausflockung des Antikörpers könnte zur Folge haben, dass es zwar zu Aggregaten kam, die zur IL-3-Bindung be-

nötigten Antigenbindungsstellen der Antikörper allerdings noch weitestgehend frei waren und IL-3 inhibieren konnten. Bei pH 2 war dies eventuell aufgrund größerer Aggregate in diesem Umfang nicht mehr möglich. Des Weiteren könnte ein niedrigerer pH-Wert auch zur teilweisen Fragmentierung und somit geringeren inhibitorischen Aktivität geführt haben. Durch die Aggregatbildung kommt es zudem zu einer nicht mehr einheitlichen Konzentrationsverteilung, wodurch es ebenfalls zu fehlerhaften Versuchsansätzen gekommen sein könnte. Ein häufig eingesetzter Puffer zur Elution hat einen pH-Wert von 3,3 [127].

Die meisten Antikörper verfügen über eine hohe Thermostabilität von über 70 °C [128]. Auch V9 zeigte eine gute Thermostabilität für kurzzeitige (3 h) Temperatureinflüsse bis 65 °C. Bis zu dieser Temperatur kam es zu keinem Verlust der Stabilität oder Aktivität. Eine Temperatur von 75 °C hingegen reduzierte deutlich den Anteil an monomeren Antikörper. Bei der SEC sank die Peakhöhe von 258,7 auf 41,5 mAU, weil der aggregierte und fragmentierte Antikörper durch Zentrifugation entfernt wurde. Beim verbleibenden Anteil sank der Monomergehalt auf 65,7 % (Referenz 99,1 %). Die zusätzlichen Peaks bei 9,38 und 10,71 ml Retentionsvolumen zeigten eine temperaturinduzierte Aggregation von V9 an. Die benötigte Referenzkonzentration stieg unerwarteterweise jedoch nur auf 5,83x. Im Gegensatz zur SEC wurden bei der Ermittlung der inhibitorischen Aktivität die Aggregationen nicht durch eine vorhergehende Zentrifugation entfernt, sodass, ähnlich wie bei den pH-Proben, die Antigenbindungsstellen weiterhin vorhanden und aktiv gewesen sein könnten. Dies wird durch die Ermittlung der Schmelzpunkte von V9 unterstützt.

Mittels der VP-DSC wurde die thermische Verlaufskurve von V9 bestimmt. Klassischerweise werden für die thermischen Verlaufskurven von Antikörpern zwei oder drei Maxima erhalten. Der geringste T_M zeigt zumeist die C_H2 -Domäne an. Der T_M , welcher den höchsten C_P -Wert besitzt, stellt die Entfaltung der Fab-Domäne dar. Ein möglicher dritter Schmelzpunkt weist auf eine Entfaltung der C_H3 -Domäne hin. Allerdings sind auch zwei oder vier Signale möglich, oder einer der Schmelzpunkte liegt als Sattelpunkt und nicht als Maximum vor. Die Entfaltung der Fab-Domäne verläuft zudem meist in Kombination mit der C_H2 - oder C_H3 -Domäne [33, 101, 104]. Bei V9 lag der Peak mit dem höchsten T_M bei ca. 90 °C und in unmittelbarer Nähe war ein Sattelpunkt bei $T_{M2} = 85$ °C. Dies zeigte die einsetzende Entfaltung der C_H3 -Domäne an. Vor Erreichen von T_{M3} fiel das Signal rapide ab. Dies ist auf die Entfaltung der C_H3 -Domäne zurückzuführen, wodurch schlagartig eine geringere Wärmeaufnahme detektiert

wurde. Die direkt folgende Entfaltung der Fab-Domäne ließ das Signal schließlich schnell wieder ansteigen. Bei einer Temperatur von 75 °C ist bei V9 lediglich die CH2-Domäne entfaltet ($T_{M1} = 70$ °C). Durch die Konformitätsänderung werden Bindungspartner frei und eine Ausbildung von Aggregaten wird ermöglicht [129]. Zwar wird vermutet, dass bei thermischem Stress auch die Fab-Domäne eine Rolle bei der Aggregatbildung spielt, jedoch liegt bei V9 die Schmelztemperatur deutlich über 75 °C [130]. Deshalb ist davon auszugehen, dass die antigenbindende Fab-Domäne bei dieser Temperatur intakt war, wodurch zu erklären ist, dass die benötigte Referenzkonzentration mit 5,83x nur moderat angestiegen ist, trotz Aggregatbildung.

Brader et al. ermittelten für acht verschiedene Antikörper in optimierter Pufferumgebung für T_{M1} Werte für 56,5 – 71,2 °C und für $T_{M2/3}$ Werte zwischen 71,8 und 84,6 °C [131]. Ionescu et al. bestimmten für drei verschiedene Antikörper Werte von ca. 70 °C und 80 °C für T_{M1} und $T_{M2/3}$ [33] und Heads et al. ermittelten eine durchschnittliche Schmelztemperatur von $80,7 \pm 5,4$ °C für die Fab-Domäne, bei einer Auswertung von 22 humanisierten IgG₁ Antikörpern in PBS [132]. Verglichen mit diesen Werten liegt T_{M1} von V9 mit ca. 70 °C je nach Analyse im Durchschnitt oder oberen Bereich der Stabilität. $T_{M2/3}$ hingegen liegt mit 85-90 °C am oberen Ende der betrachteten Antikörper oder sogar darüber, welches auf eine sehr gute Stabilität des Antikörpers hindeutet. Einen sehr stabilen Antikörper generierten auch McConnell et al. Dieser weist eine $T_{M2/3}$ von ca. 90 °C auf und durch zusätzliche Veränderungen wurde T_{M1} ebenfalls auf ca. 90 °C angehoben [133]. Insbesondere Ionescu et al. stellten einen unmittelbaren Einfluss der variablen Domäne auf die Stabilität des Antikörpers fest [33]. Die während der Entwicklung hin zu V9 gewählte und veränderte FR scheint daher gut selektiert worden zu sein.

6.6 V9 verfügt über eine hohe Affinität, Spezifität und Effektivität

Neben einer ausreichenden Stabilität ist die hochaffine und spezifische Bindung seines Targets von elementarer Bedeutung. Die Affinität des Antikörpers wurde sowohl über ein Kinetikfitting als auch ein Affinitätsfitting durchgeführt, wobei die Werte sich unterschieden haben. Der Wert für das Affinitätsfitting lag mit 5,4 nM deutlich über den durch das Kinetik-Fitting ermittelten 0,14 nM. Die Abweichungen sind vor allem in der Fittingmethode begründet. Beim Affinitätsfitting wird aus den für jede einzelne eingesetzte Antigenkonzentration ermittelten R_u -Werten ein Fittinggraph erstellt. Da dieser nur

eine Annäherung darstellt, flacht der Graph auch bei einer Absättigung des Antikörpers mit seinem Antigen nicht vollständig ab und wird weiter verlängert. Hierdurch wird ein höherer maximaler Ru-Wert ermittelt, wodurch sich der ermittelte K_D -Wert verschlechtert. Beim Kinetikfitting war der Antikörper bei der höchsten eingesetzten Antigenkonzentration vollständig abgesättigt. Der resultierende Ru-Wert ist gleichzeitig das Maximum, welches für das Fitting verwendet wird. Dieser Ansatz entspricht am ehesten der Realität, weshalb dieser Wert als Affinität des Antikörpers angenommen wird.

Die Einordnung der Affinitätsstärke ist immer relativ. Generell gelten zumeist Affinitätswerte von <1 nM als hochaffin [134], weshalb sich V9 mit 140 pM als hochaffiner Antikörper einordnen lässt. Sun et al. generierten Antikörper, deren Affinität größtenteils im niedrigen nanomolaren Bereich lagen (10^{-9}) [41]. Einer der am häufig eingesetzten monoklonalen Antikörper, Rituximab, besitzt ebenfalls eine Affinität in diesem Bereich 5,2 nM [135]. Dies zeigt, dass die Affinität alleine kein ausschlaggebendes Kriterium bei der Betrachtung von potentiell zur Therapie einzusetzenden Antikörpern ist. V9 verfügt außerdem über eine höhere Affinität, daher wurde die ermittelte Affinität für V9 als ausreichend angesehen.

IL-3 gehört zu derselben Zytokinfamilie wie IL-5 und GM-CSF. Mittels eines ELISA konnte gezeigt werden, dass V9 keine Kreuzreaktivität zu den verwandten Zytokinen IL-5 und GM-CSF aufweist. Darüber hinaus wurde die Kreuzreaktivität ebenfalls gegenüber IL-3 vom Rhesusaffen getestet und ebenfalls als nicht vorhanden detektiert.

Die Effektivität von V9 bei der Inhibierung der IL-3-Wirkung wurde mit der IL-3 abhängigen TF1-Zelllinie und einem MTT-Assay bestimmt, wodurch gezeigt werden konnte, dass V9 die Aktivität des IL-3 neutralisiert. V9 zeigte sich effektiver als P8C11-Chim. Die notwendigen Konzentrationen für eine 50 %ige Reduktion der TF1-Proliferation betrugen 0,67 $\mu\text{g/ml}$ für V9 und 0,85 $\mu\text{g/ml}$ für P8C1-Chim bei einer IL-3 Konzentration von 5 ng/ml. Kommerziell erwerbliche IL-3- Antikörper, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden, sind Klon 4815 und Klon 4806 von R&D. Diese weisen laut Herstellerangabe IC_{50} -Werte von 0,1-0,3 $\mu\text{g/ml}$ (Klon 4815) und 0,03-0,08 $\mu\text{g/ml}$ (Klon 4806) bei einer IL-3 Konzentration von 1,25 ng/ml auf [136, 137]. Bezieht man die IC_{50} -Werte für alle Antikörper auf 1 ng/ml IL-3 erhält man Werte von 134 ng/ng IL-3

für V9, 80-240 ng/ng IL-3 für Klon 4815 und 24-64 ng/ng IL-3 für Klon 4806. Der benötigte IC50-Wert von V9 liegt mit 134 ng/ng IL-3 somit fast genau beim Mittelwert der betrachteten Antikörper (132 ng/ng IL-3).

V9 neutralisiert nicht nur die Aktivität von IL-3, sondern unterbindet gleichzeitig auch die Bindung an seinen Rezeptor CD123 auf CD123+ Blutleukozyten effektiv und bei geringen Konzentrationen, die deutlich niedriger sind als jene, die für eine Proliferationshemmung bei TF1-Zellen notwendig sind. Der IC50-Wert betrug 1,1 µg/ml V9 bei einer IL-3 Konzentration von 0,125 µg/ml, um ein Absinken von als IL-3+ klassifizierten Zellen zu erzielen. Dies resultiert in einer Menge von 8,8 ng/ng IL-3. Eine Erklärung der geringer ausfallenden benötigten V9-Konzentration, verglichen mit den TF1-Zellen, könnte zum einen in den verschiedenen Zellpopulationen liegen. Die Ermittlung der IL-3+ Zellen wurde im Vollblut mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt, während es sich bei den TF1-Zellen um eine einheitliche Zellpopulation handelt. Zudem war der generelle Aufbau der Versuche bezüglich Dauer der Stimulation und Auswerteparameter divergent, wodurch ein Vergleich der erhaltenen Werte schwer möglich ist.

Der humanisierte Antikörper V9 bindet außerdem an ein anderes Epitop als die kommerziell erwerblichen Antikörper Klon 4815 und Klon 4806 von R&D und BVD8-3G11 von Biolegend. Im ELISA konnte gezeigt werden, dass V9 die Aminosäuresequenz EIITHLKQPPLPLLDFFNNLNGEDQDIL bindet, welche von keinem der getesteten murinen anti-human IL-3 Antikörper erkannt wurde.

6.7 V9 besitzt keine unspezifischen Effekte auf Blutleukozyten

Nach dem Nachweis der Spezifität und der erwünschten Wirksamkeit mussten unspezifische und möglicherweise zytotoxische Effekte auf Blutleukozyten ausgeschlossen werden.

Im Vergleich mit einer Isotyp-Kontrolle (IgG1) fand keine vermehrte Bindung von V9 auf Blutleukozyten statt. Innerhalb der großen Populationen der Lymphozyten und der PMNs lag der Anteil bei ca. 0,5 % der Zellen. Bei den Monozyten schwankte der Anteil zwischen ca. 1-4 %. Ein eindeutiger Trend war allerdings nicht zu erkennen. Bei manchen Populationen, wie z.B. den B-Zellen, lag der Anteil der positiven Zellen (Bindung auf den Zellen hat stattgefunden) bei bis zu 15 %, allerdings ohne Unterschied zur

Isotyp-Kontrolle. Unter anderem B-Zellen besitzen Fc γ -Rezeptoren zur Bindung von IgG1-Antikörpern, wodurch der vermehrte Anteil an positiven Zellen erklärt werden kann [138].

Neben der ausbleibenden unspezifischen Bindung von V9 an Blutleukozyten konnte auch keine Regulation von Aktivierungsmarkern oder proinflammatorischen Zytokinen detektiert werden, welches auf V9-Effekte hingewiesen hätte. Untersucht wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α und IFN- γ , welche von NK- und T-Zellen ausgeschüttet werden und unter anderem Makrophagen aktivieren. Zudem werden weitere Zellen bei der Differenzierung unterstützt [139, 140]. Für IL-6 und TNF- α wurde im ELISA durch Stimulation mit V9 keine zusätzliche Ausschüttung im Vergleich zu Kontrolle ermittelt und insgesamt nur niedrige Werte von 15 – 30 pg/ml. Für IFN- γ wurde keine Ausschüttung detektiert. Eine Aktivierung der Zellen konnte ebenfalls nicht ermittelt werden. Dargestellt wurde nur der Aktivierungsmarker CD11b [141], allerdings konnten auch bei weiteren Markern keine Veränderungen detektiert werden. Darüber hinaus hatte eine Stimulation mit V9 keinen Effekt auf die Zellzahlen der einzelnen Populationen.

Insgesamt konnten bei den untersuchten Parametern keine unspezifischen und/oder ungewollten Effekte von V9 bei Blutleukozyten festgestellt werden.

6.8 Die generierten anti-V9-Ak besitzen blockierende und nicht-blockierende Bindungseigenschaften

Die beiden anti-V9-Antikörper 3F9 und 5F11 besitzen unterschiedliche Epitope für die Bindung an V9. Bei 3F9 handelt es sich um einen nichtblockierenden Antikörper, was durch die ELISA 1 und 2 deutlich gezeigt werden konnte. Eine Präinkubation von V9 mit 3F9 behinderte die Bindung von V9 an IL-3 nicht und die Signalstärke stieg mit steigender V9-Konzentration. Die stattgefundenene Bindung von 3F9 an V9 konnte durch die Detektion mit *rabbit-anti-mouse*-IgG-HRP verifiziert werden (ELISA 1). Des Weiteren war eine Bindung von 3F9 an V9 möglich, auch wenn V9 zuvor bereits IL-3 gebunden hatte (ELISA 2). Die Bindungsstellen für IL-3 und 3F9 an V9 kompetitieren demnach nicht miteinander und die Bindung von 3F9 findet höchstwahrscheinlich in nicht an der IL-3-Bindung beteiligten FR statt.

Für den Antikörper 5F11 war Gegenteiliges festzustellen und es handelt sich um einen anti-idiotypischen Antikörper mit neutralisierender Wirkung auf die Aktivität von V9. Fand eine Präinkubation von V9 mit 5F11 statt, wurde eine Bindung von V9 an IL-3 bei den getesteten Konzentrationen komplett unterbunden (ELISA 1). Nach Bindung von IL-3 an V9 war eine Bindung von 5F11 an V9 erst möglich, wenn die Konzentration von V9 deutlich höher als die von IL-3 gewesen ist. Erst bei dieser Konstellation standen freie Antigenbindungsstellen von V9 für die Bindung von 5F11 zur Verfügung und eine Steigerung der Signalstärke konnte detektiert werden (ELISA 2).

Verifiziert wurden die Ergebnisse durch den IL-3-Aktivitätsassay, bei welchem 3F9 die inhibitorische Aktivität von V9 nicht beeinflusste (Abbildung 48), 5F11 hingegen eine Blockade der IL-3 Effekte durch V9 verhinderte. Erst ein Absinken der Konzentration von 5F11 unter die Konzentration von V9 (0,625 µg/ml zu 1 µg/ml) führte zu einem Verlust der blockierenden Wirkung von 5F11 auf V9.

Mittels des IL-3-Aktivitätsassays wurde zudem gezeigt, dass sowohl 3F9 als auch 5F11 keine IL-3 ähnlichen Effekte aufweisen, da keine auffällige Herunterregulation von CD131 auf Basophilen detektiert werden konnte (bei höchster Konzentration für 3F9 3775 ± 42 und für 5F11 3568 ± 75 MFI bei einer negativen Kontrolle von 3648 ± 0 MFI) (Abbildung 47).

6.9 Die Detektion von freiem und gesamtem V9 aus Plasma ist reproduzierbar möglich

Die Generierung der anti-V9 Antikörper 3F9 und 5F11 erfolgte im Hinblick auf eine mögliche Detektion von V9 aus humanem Blutplasma zur Feststellung der vorliegenden Plasmakonzentration. Notwendig ist dieses im Rahmen von klinischen Studien und zur Entscheidung ob ein Einsatz als Therapeutikum potentiell möglich ist. Relevant ist die Pharmakokinetik, also die Verteilung, Abbau und Freisetzung im Organismus. Nach Möglichkeit soll bei Antikörpern zudem die Unterscheidung zwischen gesamt vorhandenem, gebundenem und teilweise gebundenem Antikörpern umsetzbar sein [142]. Mit Hilfe des nichtblockierenden Antikörpers 3F9, des blockierenden Antikörpers 5F11 und des IL-3-Antikörpers AK13 wurden drei verschiedene ELISA entwickelt, um diese Anforderungen abzudecken.

Über alle getesteten Konzentrationen hinweg, konnte V9 mit einer guten Genauigkeit detektiert werden. Die maximale Abweichung von der tatsächlich eingesetzten Konzentration betrug 30,77 %. Bei IL-3 konnten ebenfalls sehr gute Werte erreicht werden, insbesondere bei der höchsten V9-Konzentration von 10.000 ng/ml. Hier betrug die maximale Abweichung der ermittelten IL-3-Konzentration lediglich 4,46 %. Verringerte sich die V9 Konzentration, verringerte sich auch die Genauigkeit der IL-3 Detektion. Bei der geringsten IL-3-Konzentration von 0,1 ng/ml betrugen die Abweichungen 190 und 200 %, allerdings blieben die ermittelten Konzentrationen in derselben Größenordnung. Übersteigt die IL-3 Konzentration die theoretisch berechnete maximale Konzentration, die zur vollständigen Beladung von V9 notwendig ist, werden keine verwertbaren Ergebnisse mehr erzielt. Dies trifft für 10 ng/ml V9 und 10 ng/ml IL-3 zu. In der Realität ist dieser Fall allerdings nahezu ausgeschlossen, weil therapeutische Antikörper Plasmakonzentrationen von mehreren µg/ml erreichen [143], wohingegen IL-3 meist in einer Konzentration von pg/ml vorliegt. Daher kann diese Problematik vernachlässigt werden.

Insgesamt wird die Gesamtkonzentration von V9 genau und reproduzierbar detektiert. Zwar liegen teilweise Abweichungen von über 30 % vor, allerdings stimmt die detektierte Größenordnung mit der real eingesetzten überein. Darüber hinaus stellt dieser Versuch lediglich eine Nachahmung einer tatsächlichen Applikation von V9 in einen humanen Organismus dar.

Vergleicht man die theoretischen mit den tatsächlich detektierten Werten, wurden für 10.000 ng/ml V9 näherungsweise die theoretischen Bindungsverteilungen erreicht, mit einer maximalen Abweichung von 23 % (1x gebunden bei V9 10.000 ng/ml + IL-3 100 ng/ml). Auch für Konzentrationen von V9 mit 100 ng/ml wurden die theoretischen Werte in Näherung erreicht und die prozentualen Abweichungen entsprechen in etwa denen bei der Betrachtung der Gesamtmenge an V9. Bei einer Überladung von V9 konnten keine verwertbaren Ergebnisse ermittelt werden. Allgemein erhöhten sich die Abweichungen von den theoretischen Werten erheblich bei absinkender V9 Konzentration, da man dort an die Sensitivitätsgrenze gelangt.

Insgesamt stimmen die mit den verschiedenen ELISAs gemessenen Werte bei hohen V9 Konzentrationen und gleichzeitig niedrigen IL-3 Konzentrationen bzw. bei einem großen Abstand der Konzentrationen und einer somit resultierenden geringen Beladung von V9 sehr gut mit den berechneten Werten überein.

Genau dies ist der wahrscheinlichste Fall bei einer Applikation des Antikörpers in einen humanen Organismus, wie bereits zuvor beschrieben wurde. Ein weiteres Problem beim Vergleich von theoretischen und detektierten Werten bei der genauen Ermittlung der Bindungsverteilung existiert. Bei der Durchführung des Versuchs in einem Reaktionsgefäß können sich sowohl IL-3 als auch V9 ungehindert verteilen und eine gleichmäßige Konzentration liegt vor, wodurch die theoretische Verteilung erreicht werden kann. Innerhalb eines Organismus jedoch könnten lokal Konzentrationsunterschiede von IL-3 und V9 vorliegen. Dies könnte zu einem extremen Effekt führen, bei welchem lokal eine höhere IL-3 Konzentration als V9 Konzentration vorliegt. Folglich würden an diesem Ort prozentual mehr V9 Antikörper doppelt mit IL-3 beladen werden, als aufgrund der auf den gesamten Organismus berechneten Konzentration, theoretisch erwartet werden würden. Die Detektion des gesamten V9 wäre hiervon unbeeinflusst, aber die theoretisch ermittelten Werte würden nicht mehr stimmen.

7. Zusammenfassung und Fazit

Die Entwicklung neuartiger therapeutische Antikörper ist einer der sich am stärksten und schnellsten entwickelnden Teilbereiche der modernen Arzneimittelforschung. Antikörper sind hochspezifisch für ihr Antigen und können aufgrund ihrer hohen Sequenzvariabilität theoretisch gegen sämtliche Strukturen (Oberflächenmarker, Zytokine etc.) produziert werden.

Ein interessantes Zytokin ist das hämatopoetische Zytokin IL-3. Dieses wird von verschiedenen Immunzellen gebildet und hat entscheidende Effekte auf eine Vielzahl von Immunzellen zur Etablierung und Aufrechterhaltung einer Immunreaktion. In unterschiedlichen Tiermodellen und Untersuchungen bei Erkrankungen des Menschen wurde ein deutlich stimulierender Einfluss von IL-3 auf die Entstehung von Autoimmunität und Entzündung gefunden. Allerdings scheint eine Blockade oder Depletion von IL-3 keine negativen Effekte hervorzurufen. Diese Kombination macht IL-3 zu einem vielversprechenden Kandidaten, um einen therapeutischen Antikörper zu entwickeln.

Fragestellungen die in dieser Arbeit beantwortet werden sollten, sind die Expression, Wirkung und Hemmung von IL-3 mit humanen Leukozyten. Hierfür wurden die Effekte mittels FACS analysiert und darauf basierend Assays zur Beurteilung entwickelt. Der Schwerpunkt lag auf der Generierung eines humanisierten Antikörpers gegen IL-3, um mit den zuvor entwickelten Assays die Wirksamkeit des Antikörpers zu untersuchen. Zudem musste der Antikörper hinsichtlich wichtiger Parameter wie Stabilität, Affinität und Zytotoxizität charakterisiert werden, um eine potentielle Möglichkeit des Einsatzes als zukünftiges Therapeutikum beurteilen zu können. Hierfür wurden Protokolle für etablierte Methoden wie ELISA, FACS, SEC, SPR und DSC erarbeitet.

Bei den untersuchten Zellpopulationen zeigten sich insbesondere die Basophilen als höchst sensitiv und nahezu exklusiv reagierend auf IL-3, bei Betrachtung des CD131-Rezeptors. Daher konnte mit Hilfe der Basophilen ein geeigneter Assay zur Charakterisierung der humanisierten Antikörpervarianten entwickelt werden. Als Hauptproduzenten wurden die T_{hm} und T_{te} CD28^{hi} Subpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen identifiziert (CD3⁺(CD4⁺/CD8⁺)CCR7⁻(CXD45RA^{+/}-)CD28⁺).

Mit Hilfe des auf Basophilen basierenden IL-3-Aktivitätsassays konnte die humanisierte Variante V9 mit der höchsten inhibitorischen Aktivität gegenüber IL-3 ermittelt werden, welche im weiteren Verlauf charakterisiert wurde. V9 zeigte sich hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität und Aggregatbildung stabil gegenüber Temperatur, Lagerung, pH (Ausnahme stark saure Bereiche) und „freeze-thaw“. Darüber hinaus besitzt V9 ein hochaffines Bindungsverhalten gegenüber seinem Antigen und verfügt über ein robustes Schmelzverhalten mit hohen Schmelzpunkten, welches die Stabilität unterstreicht.

Die ermittelten IC₅₀-Werte für V9 liegen auch in Assays mit der IL-3-abhängig wachsenden TF1-Zelllinie in einem guten Bereich. Außerdem zeigte V9 keine ungewünschten Nebeneffekte wie unspezifische Bindung auf Blutleukozyten, die Regulation von Aktivierungsmarkern oder die Stimulation von Zellen zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Für einen potentiellen Einsatz als Therapeutikum konnten darüber hinaus bereits anti-idiotypische Antikörper generiert werden, mit deren Hilfe ein ELISA zur Konzentrationsbestimmung von V9 aus humanem Plasma etabliert werden konnte.

Insgesamt etablieren die vorliegenden Daten aktivierte T-Zellen als Hauptproduzenten von IL-3. Mit dem generierten Antikörper war in den durchgeführten Experimenten eine komplette Inhibierung der Aktivität von IL-3 möglich, ohne ungewünschte Nebeneffekte zu erzeugen. Die Ergebnisse zeigen, dass V9 als möglicher Kandidat zur Therapie bestimmter Autoimmunerkrankungen, wie *Lupus nephritis*, in Betracht gezogen werden könnte. Hierfür wären allerdings weitergehende Untersuchungen und eine Produktion unter GMP-Bedingungen unabdingbar.

Literaturverzeichnis

1. Hoffman, W., F.G. Lakkis, and G. Chalasani, *B Cells, Antibodies, and More*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2016. **11**(1): p. 137-154.
2. Kawasaki, K., et al., *One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus*. Genome Res, 1997. **7**(3): p. 250-61.
3. Zachau, H.G., *Immunoglobulin genes*. Immunology today, 1989. **10**(8): p. S9-10.
4. Andrew, S.M. and J.A. Titus, *Fragmentation of immunoglobulin G*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 2**: p. Unit 2.8.
5. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
6. Chiu, M.L., et al., *Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics*. Antibodies (Basel, Switzerland), 2019. **8**(4): p. 55.
7. Ryman, J.T. and B. Meibohm, *Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2017. **6**(9): p. 576-588.
8. *Chapter 10 - Antibody Diversity*, in *Immunology for Pharmacy*, D.K. Flaherty, Editor. 2012, Mosby: Saint Louis. p. 79-86.
9. Maxson, T. and D.A. Mitchell, *Targeted Treatment for Bacterial Infections: Prospects for Pathogen-Specific Antibiotics Coupled with Rapid Diagnostics*. Tetrahedron, 2016. **72**(25): p. 3609-3624.
10. Galluzzi, L., et al., *Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents*. Cancer Cell, 2015. **28**(6): p. 690-714.
11. Singh, S., et al., *Monoclonal Antibodies: A Review*. Curr Clin Pharmacol, 2018. **13**(2): p. 85-99.
12. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
13. Tsumoto, K., et al., *Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies*. Immunotherapy, 2019. **11**(2): p. 119-127.
14. Paul-Ehrlich-Institut. Available from: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html>. Letztmals abgerufen: 10.06.2020
15. Manches, O., et al., *In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas*. Blood, 2003. **101**(3): p. 949-954.
16. Kantarjian, H.M., et al., *Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: Final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INO-VATE study*. Cancer, 2019. **125**(14): p. 2474-2487.
17. Murphy, K., et al., *Long-term Safety and Efficacy of Reslizumab in Patients with Eosinophilic Asthma*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2017. **5**(6): p. 1572-1581.e3.
18. Cohen, S., et al., *Efficacy and safety of the biosimilar ABP 501 compared with adalimumab in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, phase III equivalence study*. Ann Rheum Dis, 2017. **76**(10): p. 1679-1687.
19. Hwang, W.Y. and J. Foote, *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. **36**(1): p. 3-10.

20. Morrison, S.L., et al., *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984. **81**(21): p. 6851-6855.
21. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**(6069): p. 522-5.
22. Foote, J. and G. Winter, *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. J Mol Biol, 1992. **224**(2): p. 487-99.
23. Makabe, K., et al., *Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody*, 528. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1156-66.
24. Kashmiri, S.V.S., et al., *SDR grafting—a new approach to antibody humanization*. Methods, 2005. **36**(1): p. 25-34.
25. Gonzales, N.R., et al., *Minimizing immunogenicity of the SDR-grafted humanized antibody CC49 by genetic manipulation of the framework residues*. Mol Immunol, 2003. **40**(6): p. 337-49.
26. Huse, W.D., et al., *Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1275.
27. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 552-4.
28. Lonberg, N., *Human antibodies from transgenic animals*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1117-1125.
29. Jerne, N.K., *Towards a network theory of the immune system*. Ann Immunol (Paris), 1974. **125c**(1-2): p. 373-89.
30. Baker, M.P., et al., *Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges*. Self Nonself, 2010. **1**(4): p. 314-322.
31. van Schouwenburg, P.A., et al., *Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(1): p. 104-9.
32. van Brummelen, E.M., et al., *Antidrug Antibody Formation in Oncology: Clinical Relevance and Challenges*. Oncologist, 2016. **21**(10): p. 1260-1268.
33. Ionescu, R.M., et al., *Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies*. J Pharm Sci, 2008. **97**(4): p. 1414-26.
34. Williams, D.G., D.J. Matthews, and T. Jones, *Humanising Antibodies by CDR Grafting*, in *Antibody Engineering*, R. Kontermann and S. Dübel, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 319-339.
35. Tsurushita, N., P.R. Hinton, and S. Kumar, *Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax*. Methods, 2005. **36**(1): p. 69-83.
36. Dondelinger, M., et al., *Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**(2278).
37. Kabat, E.A., et al., *Sequences of Immunoglobulin Chains: Tabulation and Analysis of Amino Acid Sequences of Precursors, V-regions, C-regions, J-chain and BP-microglobulins*, 1979. 1979: Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health.
38. Chothia, C. and A.M. Lesk, *Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*. J Mol Biol, 1987. **196**(4): p. 901-17.
39. Abhinandan, K.R. and A.C. Martin, *Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains*. Mol Immunol, 2008. **45**(14): p. 3832-9.

40. Apgar, J.R., et al., *Beyond CDR-grafting: Structure-guided humanization of framework and CDR regions of an anti-myostatin antibody*. mAbs, 2016. **8**(7): p. 1302-1318.
41. Sun, W., et al., *Improvement in affinity and thermostability of a fully human antibody against interleukin-17A by yeast-display technology and CDR grafting*. Acta pharmaceutica Sinica. B, 2019. **9**(5): p. 960-972.
42. Metcalf, D., *Hematopoietic cytokines*. Blood, 2008. **111**(2): p. 485-491.
43. Ihle, J.N., *Interleukin-3 and hematopoiesis*. Chem Immunol, 1992. **51**: p. 65-106.
44. Lantz, C.S., et al., *Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 90-93.
45. Ohta, T., et al., *Skin CD4+ Memory T Cells Play an Essential Role in Acquired Anti-Tick Immunity through Interleukin-3-Mediated Basophil Recruitment to Tick-Feeding Sites*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**(1348).
46. Sharma, M., et al., *Regulatory T cells induce activation rather than suppression of human basophils*. Science Immunology, 2018. **3**(23): p. eaan0829.
47. Wodnar-Filipowicz, A., C.H. Heusser, and C. Moroni, *Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation*. Nature, 1989. **339**(6220): p. 150-2.
48. Rauch, P.J., et al., *Innate response activator B cells protect against microbial sepsis*. Science, 2012. **335**(6068): p. 597-601.
49. Schroeder, J.T., K.L. Chichester, and A.P. Bieneman, *Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2432-8.
50. Metcalf, D., et al., *Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice*. Blood, 1986. **68**(1): p. 46-57.
51. Haak-Frendscho, M., et al., *Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 cause basophil histamine release*. J Clin Invest, 1988. **82**(1): p. 17-20.
52. Kim, S., et al., *Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1143-7.
53. Ebner, S., et al., *A Novel Role for IL-3: Human Monocytes Cultured in the Presence of IL-3 and IL-4 Differentiate into Dendritic Cells That Produce Less IL-12 and Shift Th Cell Responses Toward a Th2 Cytokine Pattern*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(12): p. 6199.
54. Esnault, S., et al., *IL-3 Maintains Activation of the p90S6K/RPS6 Pathway and Increases Translation in Human Eosinophils*. J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2529-39.
55. Finotti, G., N. Tamassia, and M.A. Cassatella, *Synergistic production of TNFalpha and IFNalpha by human pDCs incubated with IFNlambda3 and IL-3*. Cytokine, 2016. **86**: p. 124-131.
56. Borriello, F., et al., *Innate Immune Modulation by GM-CSF and IL-3 in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
57. Mach, N., et al., *Involvement of interleukin-3 in delayed-type hypersensitivity*. Blood, 1998. **91**(3): p. 778-83.

-
58. Broughton, S.E., et al., *The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling*. Immunol Rev, 2012. **250**(1): p. 277-302.
 59. Broughton, S.E., et al., *Dual mechanism of interleukin-3 receptor blockade by an anti-cancer antibody*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 410-9.
 60. Broughton, S.E., et al., *A dual role for the N-terminal domain of the IL-3 receptor in cell signalling*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 386.
 61. Klein, B.K., et al., *The receptor binding site of human interleukin-3 defined by mutagenesis and molecular modeling*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22630-41.
 62. Pham, J.V., et al., *A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**(1404).
 63. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 701-21.e1-70.
 64. Rignault-Bricard, R., et al., *IL-3-producing basophils are required to exacerbate airway hyperresponsiveness in a murine inflammatory model*. Allergy, 2018. **73**(12): p. 2342-2351.
 65. Piguet, P.F., et al., *Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 673-9.
 66. Renner, K., et al., *IL-3 contributes to development of lupus nephritis in MRL/lpr mice*. Kidney Int, 2015. **88**(5): p. 1088-98.
 67. Lee, P.W., et al., *IL-3 Is a Marker of Encephalitogenic T Cells, but Not Essential for CNS Autoimmunity*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1255.
 68. Renner, K., et al., *IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis*. JCI Insight, 2016. **1**(16): p. e87157.
 69. Bruhl, H., et al., *Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(5): p. 1352-61.
 70. Chousterman, B.G. and F.K. Swirski, *Innate response activator B cells: origins and functions*. Int Immunol, 2015. **27**(10): p. 537-41.
 71. Weber, G.F., et al., *Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis*. Science, 2015. **347**(6227): p. 1260-5.
 72. Borges, I.N., et al., *Role of interleukin-3 as a prognostic marker in septic patients*. Rev Bras Ter Intensiva, 2018. **30**(4): p. 443-452.
 73. Yamada, R., et al., *Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(3): p. 674-85.
 74. Fishman, P., et al., *Interleukin-3 immunoassay in systemic lupus erythematosus patients: preliminary data*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **100**(3): p. 215-8.
 75. Shi, M., et al., *CD123: A Novel Biomarker for Diagnosis and Treatment of Leukemia*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2019. **19**(3): p. 195-204.
 76. Testa, U., E. Pelosi, and G. Castelli, *CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies*. Cancers (Basel), 2019. **11**(9).
 77. Wu, L.Z., et al., *[Clinical Features of Patients with Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2020. **28**(1): p. 307-313.

78. Taussig, M.J., C. Fonseca, and J.S. Trimmer, *Antibody validation: a view from the mountains*. N Biotechnol, 2018. **45**: p. 1-8.
79. Wang, X., et al., *Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development*. Protein & cell, 2018. **9**(1): p. 74-85.
80. Weis-Garcia, F. and R.H. Carnahan, *Characterizing Antibodies*. Cold Spring Harb Protoc, 2017. **2017**(11): p. pdb.top093823.
81. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow Cytometry and Cell Sorting*, in *Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methods*, A. Kumar, I.Y. Galaev, and B. Mattiasson, Editors. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 19-39.
82. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Current protocols in immunology, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
83. Muirhead, K.A., P.K. Horan, and G. Poste, *Flow Cytometry: Present and Future*. Bio/Technology, 1985. **3**(4): p. 337-356.
84. V., o. *CytoFLEX Flow Cytometer*. 2020; Available from: https://goto.beckman.de/flow-cytometer-und-durchflussszytometer-cytoflex-ideal-fuer-flexible-durchflussszytometrie/?campaign=1486934051&adgroup=54984652302&asset=350416983971&kw=%2Bfacs%20durchflussszytometer&match=b&device=c&gclid=EAlaIQobChMli82nv7LI6AIVBeN3Ch2d2AOtEAAYASAAEgLAKPD_BwE. Letztmals abgerufen: 10.06.2020
85. Yamashita, M., et al., *A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flowcytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 19772.
86. Bosterbio. *Flow Cytometry Fundamental Principle, How FACS Works* Available from: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle>. Letztmals abgerufen: 10.06.2020
87. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
88. Gan, S.D. and K.R. Patel, *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(9): p. e12.
89. Josephy, P.D., T. Eling, and R.P. Mason, *The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3669-75.
90. Fritsche, O., *Mikrobiologische Arbeitsmethoden*, in *Mikrobiologie*, O. Fritsche, Editor. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 311-333.
91. Grange, R.D., J.P. Thompson, and D.G. Lambert, *Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays*. Br J Anaesth, 2014. **112**(2): p. 213-6.
92. Hornbeck, P.V., *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*. Curr Protoc Immunol, 2015. **110**: p. 2.1.1-2.1.23.
93. Heyduk, E., et al., *Peptide ligand-based ELISA reagents for antibody detection*. Anal Biochem, 2018. **559**: p. 55-61.
94. Tada, M., T. Suzuki, and A. Ishii-Watabe, *Development and characterization of an anti-rituximab monoclonal antibody panel*. mAbs, 2018. **10**(3): p. 370-379.
95. Cutler, P., *Size-Exclusion Chromatography*, in *Protein Purification Protocols*, S. Doonan, Editor. 1996, Humana Press: Totowa, NJ. p. 255-267.
96. Duong-Ly, K.C. and S.B. Gabelli, *Chapter Nine - Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins*, in *Methods in Enzymology*, J. Lorsch, Editor. 2014, Academic Press. p. 105-114.

97. Giridhar, G., R.K.N.R. Manepalli, and G. Apparao, *Chapter 3 - Size-Exclusion Chromatography*, in *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, S. Thomas, et al., Editors. 2017, Elsevier. p. 51-65.
98. Fekete, S., et al., *Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **101**: p. 161-173.
99. Gabrielson, J.P., et al., *Quantitation of Aggregate Levels in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody Formulation by Size-Exclusion Chromatography, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation, and Sedimentation Velocity*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(2): p. 268-279.
100. Bansal, R., S. Gupta, and A.S. Rathore, *Analytical Platform for Monitoring Aggregation of Monoclonal Antibody Therapeutics*. Pharmaceutical Research, 2019. **36**(11): p. 152.
101. Melien, R., et al., *Thermodynamic Unfolding and Aggregation Fingerprints of Monoclonal Antibodies Using Thermal Profiling*. Pharm Res, 2020. **37**(4): p. 78.
102. Durowoju, I.B., et al., *Differential Scanning Calorimetry - A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen*. J Vis Exp, 2017(121).
103. Jackson, W.M. and J.F. Brandts, *Thermodynamics of protein denaturation. Calorimetric study of the reversible denaturation of chymotrypsinogen and conclusions regarding the accuracy of the two-state approximation*. Biochemistry, 1970. **9**(11): p. 2294-2301.
104. Temel, D.B., P. Landsman, and M.L. Brader, *Chapter Fourteen - Orthogonal Methods for Characterizing the Unfolding of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Chemical Denaturation, and Intrinsic Fluorescence with Concomitant Static Light Scattering*, in *Methods in Enzymology*, A.L. Feig, Editor. 2016, Academic Press. p. 359-389.
105. Bruylants, G., J. Wouters, and C. Michaux, *Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design*. Current Medicinal Chemistry, 2005. **12**(17): p. 2011-2020.
106. Nguyen, H.H., et al., *Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications*. Sensors (Basel), 2015. **15**(5): p. 10481-510.
107. Ritchie, R.H., *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films*. Physical Review, 1957. **106**(5): p. 874-881.
108. Otto, A., *Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by Method of Frustrated Total Reflection*. European Physical Journal A, 1968. **216**: p. 398-410.
109. Kretschmann, E. and H. Raether, *Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light*. Zeitschrift für Naturforschung A, 1968. **23**.
110. Welford, K., *Surface plasmon-polaritons and their uses*. Optical and Quantum Electronics, 1991. **23**(1): p. 1-27.
111. Mukhtar, W.M., et al., *Angle Shifting in Surface Plasmon Resonance: Experimental and Theoretical Verification*. Journal of Physics: Conference Series, 2013. **431**: p. 012028.
112. Hearty, S., et al., *Measuring Antibody-Antigen Binding Kinetics Using Surface Plasmon Resonance*, in *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, D.

- Nevoltris and P. Chames, Editors. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 421-455.
113. Crowley, L.C., et al., *Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy*. Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(7).
114. Kitamura, T., et al., *Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin*. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 323-34.
115. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
116. Martinez-Moczygamba, M. and D.P. Huston, *Proteasomal regulation of betac signaling reveals a novel mechanism for cytokine receptor heterotypic desensitization*. J Clin Invest, 2001. **108**(12): p. 1797-806.
117. Ikemizu, S., M. Chirifu, and S.J. Davis, *IL-2 and IL-15 signaling complexes: different but the same*. Nature Immunology, 2012. **13**(12): p. 1141-1142.
118. Asao, H., *Interleukin-2* ☆, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, Elsevier.
119. Chtanova, T. and C.R. Mackay, *T Cell Effector Subsets: Extending the Th1/Th2 Paradigm*, in *Advances in Immunology*, F.J. Dixon, Editor. 2001, Academic Press. p. 233-266.
120. Levitt, L.J., et al., *Production of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor by human natural killer cells. Modulation by the p75 subunit of the interleukin 2 receptor and by the CD2 receptor*. The Journal of clinical investigation, 1991. **88**(1): p. 67-75.
121. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-465.
122. Jelcic, I., et al., *Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4(+) T Cells in Multiple Sclerosis*. Cell, 2018. **175**(1): p. 85-100.e23.
123. Regep, C., et al., *The H3 loop of antibodies shows unique structural characteristics: CDR H3 of Antibodies Shows Unique Structural Characteristics*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2017. **85**.
124. Weitzner, B.D., R.L. Dunbrack, Jr., and J.J. Gray, *The origin of CDR H3 structural diversity*. Structure (London, England : 1993), 2015. **23**(2): p. 302-311.
125. Xu, J.L. and M.M. Davis, *Diversity in the CDR3 Region of VH Is Sufficient for Most Antibody Specificities*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 37-45.
126. Wu, H., et al., *Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies*. FEBS Letters, 2014. **588**(6): p. 936-941.
127. Mazzer, A.R., et al., *Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold*. Journal of chromatography. A, 2015. **1415**: p. 83-90.
128. Schaefer, J. and A. Plückthun, *Transfer of engineered biophysical properties between different antibody formats and expression systems*. Protein engineering, design & selection : PEDS, 2012. **25**: p. 485-506.
129. Singla, A., et al., *Aggregation Kinetics for IgG1-Based Monoclonal Antibody Therapeutics*. The AAPS Journal, 2016. **18**(3): p. 689-702.
130. Zhang, A., et al., *Distinct Aggregation Mechanisms of Monoclonal Antibody Under Thermal and Freeze-Thaw Stresses Revealed by Hydrogen Exchange*. Pharmaceutical Research, 2012. **29**(1): p. 236-250.

-
131. Brader, M.L., et al., *Examination of Thermal Unfolding and Aggregation Profiles of a Series of Developable Therapeutic Monoclonal Antibodies*. Molecular Pharmaceutics, 2015. **12**(4): p. 1005-1017.
 132. Heads, J.T., et al., *Relative stabilities of IgG1 and IgG4 Fab domains: influence of the light-heavy interchain disulfide bond architecture*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2012. **21**(9): p. 1315-1322.
 133. McConnell, A.D., et al., *An integrated approach to extreme thermostabilization and affinity maturation of an antibody*. Protein Engineering, Design and Selection, 2012. **26**(2): p. 151-164.
 134. Abcam. Available from: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitative-measurement-of-antibody-affinity>.
Letztmals abgerufen: 10.06.2020
 135. Reff, M.E., et al., *Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20*. Blood, 1994. **83**(2): p. 435-45.
 136. Systems, R.D. *Human IL-3 Antibody MAB603*. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-il-3-antibody-4815_mab603.
Letztmals abgerufen: 10.06.2020
 137. Systems, R.D. *Human IL-3 Antibody MAB203*. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-il-3-antibody-4806_mab203.
Letztmals abgerufen: 10.06.2020
 138. Fridman, W.H., *Regulation of B-cell activation and antigen presentation by Fc receptors*. Current Opinion in Immunology, 1993. **5**(3): p. 355-360.
 139. Popko, K., et al., *Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects*. European journal of medical research, 2010. **15 Suppl 2**(Suppl 2): p. 120-122.
 140. Schroder, K., et al., *Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions*. Journal of Leukocyte Biology, 2004. **75**(2): p. 163-189.
 141. Pilione, M.R., et al., *CD11b is required for the resolution of inflammation induced by Bordetella bronchiseptica respiratory infection*. Cell Microbiol, 2006. **8**(5): p. 758-68.
 142. Kuang, B., L. King, and H.F. Wang, *Therapeutic monoclonal antibody concentration monitoring: free or total?* Bioanalysis, 2010. **2**(6): p. 1125-40.
 143. Ovacik, M. and K. Lin, *Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development*. Clinical and translational science, 2018. **11**(6): p. 540-552.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Mack für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Danken möchte ich Ihm für seine intensive Betreuung und seine stetige Bereitschaft zur Besprechung von Ergebnissen und wissenschaftlichen Diskussionen. Durch sein beeindruckendes Wissen konnte er mir immer neue Denkanstöße vermitteln, wodurch ich fachlich enorm profitiert habe.

Bei Prof. Dr. Hayo Castrop und Prof. Dr. Jens Schloßmann bedanke ich mich für die Übernahme des Fachmentorats seitens der Regensburger Internationalen Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (RIGeL).

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei der gesamten AG Sterner für die Unterstützung bedanken. Insbesondere bei Prof. Dr. Sterner für die Möglichkeit die Ressourcen seiner AG zu benutzen und bei Jeannette bei der Hilfe und Durchführung der SEC. Zuletzt bei Klaus, der mich in die Geheimnisse des Biacore und der VP-DSC eingeweiht und mir bei allen Problemen mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ein großer Dank geht an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der AG Mack: Yvonne, Frederike, Dagmar, Simone, Sophia, Kathrin, Balam und Kerstin. Alle haben mich während meiner gesamten Promotionszeit immer unterstützt.

Sophia, Kathrin, Balam und Kerstin danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Ratschläge bei Versuchsdurchführungen. Simone danke ich für die vielen nützlichen Tipps zur Graduiertenschule, der Erstellung von Postern und GraphPad Prism. Einen herzlichen Dank an Dagmar, die mich auch abseits von fachlichen Fragestellungen fortwährend unterstützt hat.

Ein nicht in Worte zu fassender Dank geht an Yvonne, die gute Seele der AG Mack. Ihre Erfahrung, Fachkenntnis und Organisation waren während meiner Promotion eine unverzichtbare Hilfe. Vermutlich würde ich ohne sie noch immer einige Reagenzien in

den Untiefen unserer Gefrier- und Kühlschränke suchen. Vielen Dank für alle fachlichen Tipps und die vielen interessanten Gespräche auch abseits der Arbeit. Auf Yvonne ist immer Verlass gewesen.

Frederike, bei dir möchte ich mich auch sehr herzlich bedanken. Vielen Dank für dein offenes Ohr, ganz gleich ob bei erfolgreichen oder gescheiterten Versuchen. Wir haben unzählige Stunden gemeinsam auf Veranstaltungen von RIGel, Konferenzen und Fortbildungen verbracht und die Gespräche, die wir auf den Fahrten dorthin und abseits des fachlichen Austausches geführt haben, werde ich vermissen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen meinen Freunden. Eure regelmäßigen Besuche und Anrufe, eure aufmunternden Worte haben erst dafür gesorgt, dass ich immer wieder genügend Kraft sammeln konnte. Eure fortwährende Unterstützung war sehr wichtig für mich und ohne diese wäre an einer Fertigstellung dieser Arbeit nicht zu denken gewesen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Sabine und Hartmut bedanken und auch bei euch, Victor und Nataliya. Ihr alle habt mich in sämtlichen Lebenslagen unterstützt und auf euch war auch in schwierigen Zeiten immer Verlass. Ohne eure Hilfe wäre es mir nicht möglich gewesen meinen bisherigen Lebensweg zu gehen und euch gebührt ein riesiger Anteil an dem was ich erreichen konnte.