

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Direktor: Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

## **Entwicklung und Testung neuer polyklonaler Antikörper in der Myelom-Therapie**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Aneta Schieferdecker  
aus Ostrava, Tschechische Republik

Hamburg 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.02.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. med. Francis Ayuk Ayuketang**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. med. Djordje Atanackovic**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Multiple Myelom.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese .....	2
1.1.3	Klinik .....	3
1.1.4	Prognose.....	4
1.1.5	Therapie .....	5
1.1.5.1	Konventionelle Therapie.....	5
1.1.5.2	Autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	6
1.1.5.3	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	7
1.1.6	Fazit .....	7
<b>1.2</b>	<b>Hämatopoetische Stammzelltransplantation.....</b>	<b>8</b>
1.2.1	Autologe vs. allogene Stammzelltransplantation.....	8
1.2.2	Graft-versus-Host-Disease.....	9
1.2.3	Graft-versus-Tumor-Effekt.....	10
<b>1.3</b>	<b>Das Anti-Thymozyten-Globulin.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Antikörper-Therapie.....</b>	<b>12</b>
1.4.1	Polyklonale Antikörper.....	12
1.4.2	Monoklonale Antikörper.....	13
1.4.3	Antikörper-Therapie .....	14
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung/Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Chemikalien und Medien.....	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.3	Geräte.....	20
2.1.4	Zelllinien.....	20
2.1.5	Antikörper und Chemotherapeutika.....	21
2.1.5.1	Anti-Myelom-Gobuline (AMG-8226 und AMG-12-BM).....	21
2.1.5.2	Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera (AMAG-Sera).....	21
2.1.5.3	Weitere.....	22
2.1.6	Durchflusszytometrie-Reagenzien.....	22
2.1.7	Software .....	22
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Zellbiologie.....	23
2.2.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	23
2.2.1.2	Kultivierung von Suspensionszellen.....	23
2.2.1.3	Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen .....	23
2.2.1.4	Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung mittels Trypanblau.....	24
2.2.1.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	24
2.2.1.6	Gewinnung von primären T- und NK-Zellen .....	24
2.2.1.7	Gewinnung von aktivem humanen Serum (Komplement) .....	25
2.2.2	Zytotoxizitätsassays .....	25

2.2.2.1	Zytotoxizität auf Myelom-Zelllinien .....	25
2.2.2.2	Zytotoxizität auf primäre T-Zellen .....	26
2.2.2.3	Zytotoxizität auf nicht-hämatopoetische Zellen .....	27
2.2.2.4	Kombinationsversuche.....	27
2.2.2.5	Zytotoxizität der AMAG-Sera .....	28
2.2.3	Blockierungsassays .....	29
2.2.3.1	CD38-Blockierung auf KMS-12-BM-Zellen.....	29
2.2.3.2	CD19, CD38, CD40 Blockierung auf Raji-Zellen.....	29
2.2.4	Chromium-Release-Assay .....	30
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	31
2.2.5.1	Allgemeines zur Methode.....	31
2.2.5.2	Färbungen .....	32
2.2.5.3	Messung und Auswertung .....	32
2.2.6	Statistische Auswertung.....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Teil I - Die zytotoxische Wirkung der Anti-Myelom-Globuline .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Die Zytotoxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf Myelom-Zelllinien .....	38
	a) Komplement-unabhängige Zytotoxizität .....	38
	b) Komplement-abhängige Zytotoxizität.....	41
3.1.2	Die Zytotoxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf primären T-Zellen .....	46
3.1.3	Die Blockierung des Oberflächen-Antigens CD38 durch AMG und ATG.....	48
3.1.4	Die Zytotoxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf humanen nicht-hämatopoetischen Zellen .....	51
<b>3.2</b>	<b>Teil II - Wirkmechanismen .....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Komplement-vermittelte Zytotoxizität .....	54
3.2.2	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität.....	56
3.2.3	Kombinationseffekte der polyklonalen Antikörper mit Substanzen aus der Myelom-Therapie .....	58
<b>3.3</b>	<b>Teil III - Neue polyklonale Antikörper .....</b>	<b>62</b>
3.3.1	Die Zytotoxizität der Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera.....	62
3.3.2	Die Blockierung der Oberflächenantigene CD19, CD38 und CD40 durch AMAG-Sera im Vergleich zu Wildtyp-Sera .....	65
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Anti-Myelom-Globuline .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Komplement-unabhängige Toxizität, Komplement-vermittelte Zellyse (CDC) und Antikörper-vermittelte zelluläre Zelltoxizität (ADCC).....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Kombinationseffekte mit Chemotherapeutika .....</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera.....</b>	<b>77</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>78</b>
4.5.1	In-vitro-Versuche.....	78
4.5.2	Klinischer Einsatz polyklonaler Antikörper in der Myelomtherapie.....	78
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>

<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>99</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Multiple Myelom

#### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Multiple Myelom (Synonyme: Plasmozytom, M. Kahler) zählt zu den B-Non-Hodgkin-Lymphomen. Es handelt sich dabei um eine lymphoproliferative Erkrankung mit klonaler Expansion terminal differenzierter B-Lymphozyten, der Plasmazellen. Das Multiple Myelom (MM) bildet 1% aller Neoplasien und 13% aller hämatologischer Neoplasien (Raab et al. 2009, Palumbo und Anderson 2011). Die Inzidenz variiert mit Alter, Geschlecht und mit geografischen bzw. ethnischen Unterschieden. In Mitteleuropa liegt die Inzidenz bei 4-5/100.000/Jahr (DGHO Leitlinie 2010), in China bei 1/100.000/Jahr und bei den US-Afroamerikanern bei 9/100.000/Jahr (Durie 2011). Mit dem Alter steigt die Inzidenz. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60.-70. Lebensjahr, wobei vor dem 40. Lebensjahr ein Multiples Myelom selten auftritt (Raab et al. 2009). Weltweit erkranken Männer häufiger als Frauen, im Verhältnis 3:2 (Durie 2011).

Die entarteten Plasmazellen infiltrieren diffus oder multilokulär das Knochenmark. Es kommt zur Beeinträchtigung der Blutbildung und zur Schädigung des Knochens. Selten bildet sich ein solitärer ossärer oder extraossärer Tumor aus Plasmazellen, das sogenannte Plasmozytom. Die klonale Plasmazellvermehrung führt des Weiteren zur Bildung von funktionslosen monoklonalen Immunglobulinen der Klasse IgG, IgA oder IgD und/oder der Leichtketten kappa oder lambda, den sog. Serum- bzw. Urin-Paraproteinen (Bence-Jones-Proteine). Der Nachweis im Serum und Urin gelingt mittels Gelelektrophorese, Immunfixation und Leichtketten-Assays.

Von dem Krankheitsbild des symptomatischen Myeloms ist das asymptomatische Myelom sowie die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) abzugrenzen (siehe Tab. 1).

Die MGUS ist ein asymptomatisches Krankheitsbild mit einem Anstieg einer Immunglobulinklasse im Serum wobei die Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms nicht erfüllt werden. Die Inzidenz ist relativ hoch und beträgt 3% der über 70-Jährigen (Kyle und Rajkumar 2002). Werden die Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms (Nachweis von monoklonalen Proteinen im Serum und/oder im Urin und einen Plasmazellanteil im Knochenmark > 10%) erfüllt, ohne dass Endorganschäden bzw. Symptome auftreten, spricht man von einem asymptomatischen Myelom, dem sog. „smouldering Myeloma“. Treten neben den Diagnosekriterien Myelom-bedingte Endorganschäden/Symptome auf, so liegt ein symptomatisches Myelom vor. Myelom-bedingte Endorganschäden/Symptome können sich als Hyperkalziämie (**C**) mit  $\text{Ca}^{2+} > 10 \text{ mg/dl}$ , renale Insuffizienz (**R**) mit Kreatinin  $> 2 \text{ mg/dl}$ , Anämie (**A**) mit Hämoglobin  $< 10 \text{ g/dl}$  und

Knochenläsionen (**B**) manifestieren. Zusammenfassend spricht man von den sog. **CRAB**-Kriterien (Durie 2011).

**Tabelle 1: International Myeloma Working Group (IMF 2003)**

<b>MGUS</b>	- Monoklonales Protein im Serum < 3 g/dl
	- Klonale Plasmazellen im Knochenmark < 10%
	- Keine Endorganschäden
<b>Asymtomatisches Myelom</b>	- Monoklonales Protein im Serum $\geq$ 3 g/dl und
	- Klonale Plasmazellen im Knochenmark $\geq$ 10%
	- Keine Endorganschäden
<b>Symptomatisches Myelom</b>	- Monoklonales Protein im Serum und/oder Urin
	- Klonale Plasmazellen im Knochenmark $\geq$ 10%
	- Myelom-assoziiertes Endorganschaden

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist bisher nicht geklärt. Verschiedene Ursachen wie genetische Faktoren und Umwelteinflüsse werden diskutiert (Raab et al. 2009).

Postuliert wird eine Multistep-Entwicklung von der MGUS über das asymptomatische Myelom zum symptomatischen Myelom bzw. zur Plasmazell-Leukämie (Hallek et al. 1998). Klinisch zeigt sich eine maligne Transformationsrate vom MGUS zum symptomatischen Myelom von 1-2% pro Jahr, vom asymptomatischen Myelom zum symptomatischen Myelom von 10% pro Jahr (Landgren et al. 2011). Chromosomale Untersuchungen zeigen vor allem Translokationen im Lokus der Immunglobulin-Schwerkette auf dem Chromosom 14. Diese liegen in 50% der MGUS, in 65% der Multiplen Myelome und in 90% der Myelom-Zelllinien vor (Kyle und Rajkumar 2004, Nishida et al. 1997, Bergsagel et al. 1996). Folge dieser Translokationen ist eine Überexpression von Onkogenen. Weitere Genmutationen führen zur Hemmung von Tumorsuppressoren sowie zur Aktivierung weiterer Onkogene, zum Beispiel des RAS-Onkogens (Hallek et al. 1998, Kuehl und Bergsagel 2002, Fonseca et al. 2004, Bergsagel und Kuehl 2005).

Eine essentielle Rolle bei der Entwicklung, Proliferation, Erhaltung, Migration und Medikamentenresistenz des Myeloms spielt die Interaktion der Myelomzellen mit dem Knochenmarksmilieu. Zum einen kommt es zu Zell-Zell-Interaktionen zwischen den Myelomzellen untereinander und der Myelomzellen mit den Stroma-Zellen, zum anderen kommt es zu Zelladhäsion an Extrazellulärproteinen, beispielsweise dem Fibronectin (Roodman 2002). Dabei werden eine Vielzahl von Zytokinen, wie zum Beispiel IL-6, und Wachstums- bzw. Angiogenese-Faktoren, wie zum Beispiel VEGF, zur para- und autokrinen Stimulation gebildet (Dankbar et al. 2000). Die Stimulation von Osteoklasten durch die von den MM-Zellen

sezernierten Osteoklasten-aktivierende-Faktoren, sowie die gleichzeitige Hemmung der Osteoblasten durch Osteoblasten-inhibierende-Faktoren, führt zur Knochendestruktion.

### 1.1.3 Klinik

Das Multiple Myelom ist der häufigste Tumor von Knochen und Knochenmark. Nahezu 80% aller Myelompatienten entwickeln Knochenläsionen (Kyle et al. 2003). Damit verbunden können Knochenschmerzen sowie pathologische Frakturen auftreten. Bei 73% der Patienten kommt es zur Anämie (Kyle et al. 2003). Diese lässt sich durch die Infiltration des Knochens durch Plasmazellen und/oder durch eine Myelom-bedingte Niereninsuffizienz erklären. In etwa 20% der Fälle tritt eine Niereninsuffizienz als Folge von Protein-Exzess, Hyperkalzämie, Dehydratation und Therapie mit nephrotoxischen Medikamenten auf (Kyle et al. 2003). Hyperkalzämie tritt in ca. 13% der Fälle auf (Kyle et al. 2003). Als weitere Symptome können eine B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), ein Antikörpermangelsyndrom mit Infektanfälligkeit, ein Hyperviskositäts-Syndrom, eine Amyloidose und/oder eine Polyneuropathie auftreten.

Zur Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung entwickelten 1975 Salmon und Durie eine klinische Einteilung nach Blutparametern (Hb, Serum-Ca und Konzentration der monoklonalen Ig und Bence-Jones-Proteine in Serum und Urin) und Röntgenbefund der Osteolysen (Durie und Salmon 1975). Die Einteilung erfolgt in Stadien I-III (siehe Tab. 2). Da eine schlechte Nierenfunktion einen prognostisch schlechten Faktor darstellt wird zusätzlich eine Unterteilung in A und B nach dem Kreatinin-Wert vorgenommen.

**Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (1975)**

<b>Stadium I</b>	- Hb > 10g/dl
(Erfüllung aller Kriterien)	- Normales Kalzium
	- Knochenläsionen: keine bis eine
	- Serum-Paraprotein: IgG < 5 g/dl, IgA < 3 g/dl
	- Leichtketten im Urin < 4 g/24h
<b>Stadium II</b>	weder Stadium I noch Stadium III
<b>Stadium III</b>	- Hb < 8.5g/dl
(mind. ein Kriterien erfüllt)	- Kalzium > 12 mg/dl
	- Knochenläsionen: drei oder mehr
	- Serum-Paraprotein: IgG > 7g/dl, IgA > 5 g/dl
	- Leichtketten im Urin > 12g/24h
<b>A</b>	Serum-Kreatinin < 2 mg/dl (< 177 µmol/l)
<b>B</b>	Serum-Kreatinin > 2 mg/dl (> 177 µmol/l)

Im Jahre 2005 hat die International Myeloma Working Group (IMWG) ein auf den Serumkonzentrationen von  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Albumin basierendes vereinfachtes Prognosesystem generiert, das International Staging System, kurz ISS (Greipp et al. 2005). Demnach korrelieren ein hohes Serum- $\beta_2$ -Mikroglobulin und ein erniedrigtes Serum-Albumin mit einer schlechten Prognose (siehe Tab. 3). Das mittlere Überleben beträgt im Stadium I 62 Monate, im Stadium II 44 Monate und im Stadium III 29 Monate (Raab et al. 2009).

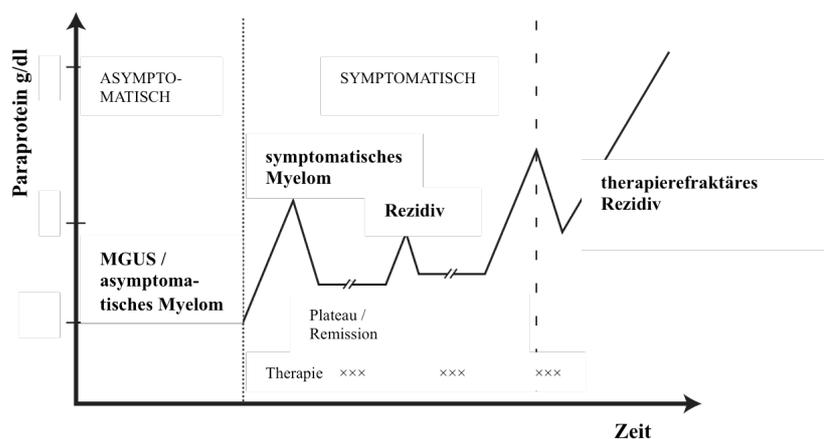
**Tabelle 3: Stadieneinteilung nach ISS (2005)**

<b>Stadium I</b>	- $\beta_2$ -Mikroglobulin < 3.5 mg/l
	- Albumin $\geq$ 3.5 g/dl
<b>Stadium II</b>	- $\beta_2$ -Mikroglobulin < 3.5 mg/l und Albumin < 3.5 g/dl oder
	- $\beta_2$ -Mikroglobulin 3.5 mg/l - 5.5 mg/l unabhängig vom Albumin
<b>Stadium III</b>	- $\beta_2$ -Mikroglobulin $\geq$ 5.5 mg/l

Zusätzlich müssen noch Hoch-Risiko-Faktoren berücksichtigt werden, die sich negativ auf die Prognose auswirken. Zu diesen zählen die Hypodiploidie und die chromosomalen Anomalien del13, del17p, t(4;14), t(14;16) und t(14;20) (Kyle und Rajkumar 2009, Kumar et al. 2009, Rajkumar 2011). Positive Auswirkungen auf die Prognose haben hingegen Hyperdiploidie und die Translokation t(11;14) (Ludwig et al. 2010). Die Risikostratifizierung differenziert zwischen Standardrisiko und Hochrisiko und dient als Leitstruktur zur Therapieentscheidung.

#### 1.1.4 Prognose

Die Überlebenszeit schwankt und ist von Diagnosezeitpunkt, Erkrankungsstadium, Prognosefaktoren und Art der Therapie abhängig. Abhängig von der Risikostratifizierung beträgt die mittlere Überlebenszeit bei einem Standardrisiko-Patienten 6-7 Jahre und bei einem Hochrisiko-Patienten 2-3 Jahre (Rajkumar und Kyle 2005). Ein großes Problem besteht in der Entwicklung von Rezidiven und später von therapierefraktären Rezidiven (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Krankheitsphasen des Multiplen Myeloms, modifiziert nach Durie (Durie 2011).** MGUS = Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz.

### 1.1.5 Therapie

Bei der MGUS und dem asymptomatischen Myelom erfolgt keine primäre Therapie, sondern eine engmaschige Kontrolle nach dem „watch and wait“-Prinzip, da ein Benefit einer frühen konventionellen Therapie bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Kyle et al. 2010). Indikation zur Therapie ist das Vorliegen eines symptomatischen Myeloms. Solitäre Plasmazytome sollten lokaltherapeutischen Maßnahmen wie einer chirurgischen Resektion und/oder einer Radiatio zugeführt werden.

Seit der Einführung von Melphalan als erstes Therapeutikum 1962 wurden viele Kombination von Chemotherapeutika sowie die Möglichkeiten einer Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer oder allogener hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) untersucht. Da die Wahl der Chemotherapeutika von einer möglichen Stammzellsammlung des Patienten abhängt, ist im vornherein grundlegend zu klären, ob eine konventionelle Chemotherapie oder eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender HSZT in Frage kommt. Diese Entscheidung hängt vom Alter, dem gesundheitlichen Zustand des Patienten, seinen Komorbiditäten sowie seiner persönlichen Präferenz ab. Viele Fragen zur Dosierung, zum Zeitpunkt, zur Dauer und vor allem zur Auswahl der besten Kombination sind noch nicht abschließend geklärt (DGHO Leitlinie 2010, Ludwig et al. 2010, Durie 2011).

#### 1.1.5.1 Konventionelle Therapie

Seit den 1960iger Jahren werden Melphalan (Bergsagel et al. 1962) und Kortikosteroide (Salmon et al. 1967) als Therapeutika in der MM-Therapie eingesetzt. Das traditionelle Regime aus Melphalan und Prednison wurde 1969 durch eine randomisierte Studie von Alexanian et al. etabliert (Alexanian et al. 1969). In den letzten Jahrzehnten sind viele neue Substanzen getestet worden.

Neue Medikamente wie der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib (Velcade®) und die antiangiogenetischen bzw. immunmodulatorischen Substanzen Thalidomide und Lenalidomide haben sich als sehr gute Substanzen in der Behandlung des MM herausgestellt (Kumar et al. 2008). Die zurzeit am meisten eingesetzten und empfohlenen Regime sind Kombinationen des traditionellen Melphalan-Prednison-Regimes nach Alexanian mit einer dieser neuen Substanzen (Kyle und Rajkumar 2008, Palumbo et al. 2009, Durie 2011). Beispiele:

Abk.	Substanzen	Quellen
MPT	Melphalan + Prednison + Thalidomide	Facon et al. 2007, Hulin et al. 2009
VMP	Melphalan + Prednison + Bortezomib	Mateos et al. 2006, San Miguel et al. 2008

Neben der Chemotherapie spielt die supportive Therapie eine entscheidende Rolle. Bestandteile dieser sind unter anderem eine suffiziente Schmerztherapie, eine antibiotische/antivirale Prophylaxe, die Gabe von Bisphosphonaten zur Hemmung der Osteoklasten und eine adäquate Hydrierung und Diurese zur Prävention einer Niereninsuffizienz.

### 1.1.5.2 Autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die autologe hämatopoetische Stammzelltherapie (HSZT) in der Myelom-Therapie geht auf Barlogie et al. zurück (Barlogie et al. 1987). Bei jungen Patienten (< 65. Lebensjahr) und Patienten mit gutem Allgemeinzustand ist eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer HSZT die Therapie der ersten Wahl (Stewart et al. 2009), da gezeigt werden konnte, dass sich durch die autologe HSZT das mittlere Überleben um ca. 12 Monate verlängert (Attal et al. 1996, Child et al. 2003, Kumar et al. 2003). Andere Studien konnten jedoch keinen Benefit nachweisen (Blade et al. 2005, Femand et al. 2005, Barlogie et al. 2006). Mittlerweile werden durch neue Substanzen in der konventionellen Therapie ähnliche Ansprechraten und Zeiten eines progressionsfreien Überlebens erzielt (Durie 2011, Kumar et al. 2008). Dies birgt die Möglichkeit einer Verschiebung der autologen HSZT bis zum ersten Rezidiv.

In der autologen Stammzelltherapie erfolgt zunächst eine Induktions-Chemotherapie. Diese induziert eine Remission, d.h. eine Reduktion der Tumorlast. Die Wahl der Chemotherapeutika unterliegt dabei der Berücksichtigung des Risikoprofils des Patienten sowie der Nebenwirkungen, der Kosten und des erwarteten Nutzens. Das sogenannte VAD-Regime nach Alexanian, bestehend aus Vincristin, Adriamycin und Dexamethason (Alexanian et al. 1990), war über viele Jahre die Standartinduktionstherapie. Die heutigen am meisten eingesetzten und empfohlenen Induktionstherapien sind eine Kombination aus Dexamethason mit einer der neuen Substanzen Thalidomide, Lenalidomide oder Bortezomib (Kyle und Rajkumar 2008). Im Anschluss an die

Induktionstherapie werden die eigenen Stammzellen gesammelt und kryokonserviert. Zu einem späteren Zeitpunkt wird eine myeloablative Chemotherapie (Konditionierung), meist mit Melphalan, durchgeführt und anschließend die eigenen Stammzellen transplantiert. Die SZT dient dabei der Rekonstitution des Knochenmarks. Danach kann eine Erhaltungstherapie mit Interferonen oder mit Prednison erfolgen (Durie 2011). Auch in der Erhaltung ist der Einsatz der neuen Substanzen Thalidomide, Lenalidomide oder Bortezomib vielversprechend (Rajkumar 2011). Möglicherweise lohnt sich eine Wiederholung der Transplantation als sogenannte Tandem-Transplantation (Attal et al. 2003, Cavo et al. 2007).

Obwohl das Ansprechen auf die Therapie und das Überleben bei einer Hochdosistherapie mit autologer SZT besser ist, ist dieser Ansatz nicht kurativ. 90% der Patienten erleiden ein Rezidiv (Durie 2011).

### **1.1.5.3 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation**

Der einzige kurative Therapieansatz in der Myelom-Therapie ist die allogene SZT (Gahrton et al. 1987, Kröger et al. 2002a/b, Einsele et al. 2003, Rosinol et al. 2008, Kröger et al. 2010). Die Vorteile sind zum einen, dass das Transplantat frei von Myelom-Zellen ist und zum anderen, dass ein immunologischer Graft-vs-Myeloma-Effekt (GvM) eintreten kann (Tricot et al. 1996). Die Rezidivrate liegt dennoch bei etwa 7% pro Jahr (Durie 2011, Gahrton et al. 1995, Bensinger et al. 1996).

Ein großes Problem stellt die hohe Morbidität und Mortalität aufgrund der Toxizität der Hochdosis-Chemotherapie, der Spender-gegen-Wirt-Reaktion und möglicher Infektionen im Rahmen der immunsuppressiven Therapie dar. Die Transplantations-assoziierte-Mortalität (Transplant-related-mortality, TRM) liegt selbst in sehr erfahrenen Transplantationszentren bei ca. 15-30%, im Vergleich zur autologen SZT mit < 5% (Durie 2011).

Mit dem Ziel, die Toxizität zu senken, wurde neben der myeloablativen Konditionierung das Prinzip der intensitätsreduzierten Konditionierung (reduced-intensity-conditioning, RIC) eingeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die TRM sinkt, jedoch auch die Rezidivrate steigt (Crawley et al. 2007). Wurde Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) im Rahmen der RIC eingesetzt, konnte bei geringerer TRM eine gleichbleibende Effektivität erreicht werden (Kröger et al. 2002a, Nagler et al. 2001, Ayuk et al. 2008b/c).

### **1.1.6 Fazit**

Bis heute ist das Multiple Myelom mit konventionellen Therapieverfahren nicht heilbar. Das mittlere Überleben mit konventioneller Chemotherapie beträgt 3-4 Jahre und mit autologer Stammzelltransplantation 5-7 Jahre (Raab et al. 2009). Durch die neuen Substanzen Thalidomide, Lenalidomide und Bortezomib werden in der konventionellen Therapie ähnliche Ansprechraten

und Zeiten eines progressionsfreien Überlebens erzielt, die auch mit der autologen HSZT erreicht werden (Durie 2011, Kumar et al. 2008). Die Rolle der allogenen HSZT muss noch besser definiert werden. In einigen Studien konnte ein Benefit im Vergleich zur autologen HSZT nachgewiesen werden (Bruno et al. 2007, Björkstrand et al. 2011), in anderen nicht (Björkstrand et al. 1996, Arora et al. 2005, Kuruvilla 2007). Festzuhalten ist, dass die allogene HSZT die zurzeit einzige potentiell kurative Therapieoption darstellt.

## 1.2 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist die Applikation von hämatopoetischen Stammzellen nach einer Konditionierung mit dem Ziel das hämatopoetische System des Empfängers zu rekonstituieren.

Die HSZT stellt für viele Patienten mit hämatologischen Neoplasien sowie angeborenen und erworbenen nicht-maligne Störungen der Hämatopoese, die einzige zur Verfügung stehende kurative Therapie dar. Indikationen sind maligne hämatopoetische Erkrankungen (ALL, CLL, AML, CML, MDS/MPS und maligne Lymphome) sowie nicht-maligne Erkrankungen (Blutbildungsstörungen, immunologische Erkrankungen, angeborene Stoffwechseldefekte und Autoimmunerkrankungen). Aufgrund zahlreicher Komplikationen ist die Morbidität und Mortalität immer noch relativ hoch.

### 1.2.1 Autologe versus allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Stammen die bei der HSZT übertragenen hämatopoetischen Stammzellen vom Patienten selbst, spricht man von einer **autologen HSZT**. Dabei werden vor der Verabreichung einer Hochdosischemotherapie Stammzellen gesammelt und kryokonserviert. Die therapeutische Wirkung wird durch den zytotoxischen Effekt der Hochdosis-Chemotherapie erzielt. Die anschließende autologe HSZT dient der Rekonstitution des blutbildenden Systems. Da autologe Zellen verabreicht werden, besteht keine bzw. sehr geringe Gefahr immunologischer Prozesse, wie beispielsweise einer Transplantatabstoßung oder einer Spender-gegen-Wirt-Krankheit (siehe Graft-versus-Host-Disease). Der Nachteil liegt in einer möglichen Tumorzellkontamination des Transplantats und in dem Fehlen eines Immuneffekts gegen die malignen Zellen (siehe Graft-versus-Leukemia-Effekt). Dies geht mit einer hohen Rezidivrate einher.

Bei der **allogenen HSZT** werden die Stammzellen von einem genetisch kompatiblen Spender auf den Patienten übertragen. Dabei können Immunreaktionen der Spenderlymphozyten gegen den Empfängerorganismus im Sinne einer Spender-gegen-Wirt-Krankheit (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) oder eines Spender-gegen-Tumor-Effekts (Graft-versus-Leukemia-Effekt, Graft-versus-

Myeloma-Effekt) auftreten. Die therapeutische Wirkung wird zum einen durch den zytotoxischen Effekt der zuvor applizierten Chemo-/Radiotherapie und zum anderen durch eine immunologische Spender-gegen-Tumor-Reaktion vermittelt. Die immunologischen Reaktionen erfordern jedoch auch meist eine vorübergehende immunsuppressive Therapie. Insgesamt geht die allogene HSZT mit einer vergleichsweise höheren Transplant-assoziierten Mortalität (Transplant-related mortality, TRM) einher.

**Tabelle 4: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der autologen und der allogenen HSZT**

	<b>Autologe HSZT</b>	<b>Allogene HSZT</b>
<b>Potentielle Vorteile</b>	- keine bzw. geringe Gefahr immunologischer Prozesse, wie einer Abstoßungsreaktion oder einer Spender-gegen-Wirt-Krankheit	- Spender-gegen-Tumor-Effekt - keine Tumorzellkontamination des Transplantats - geringere Rezidivrate
	- keine immunsuppressive Therapie nötig	
	- relativ niedrige TRM (< 5%, Durie 2011)	
<b>Potentielle Nachteile</b>	- mögliche Tumorzellkontamination des Transplantats	- Spender-gegen-Wirt-Krankheit
	- kein Spender-gegen-Tumor-Effekt	- Immunsuppressive Therapie
	- hohe Rezidivrate	- relativ hohe TRM (15-30%, Durie 2011)

Bei der Spendersuche im Rahmen der allogenen SZT ist das wichtigste Kriterium die immunologische Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Diese wird anhand der Übereinstimmung humaner Leukozytenantigene (HLA), der sog. Major Histocompatibility Complex (MHC) gemessen. Man unterscheidet zwei Klassen: zum einen die MHC Klasse I (HLA-A,-B,-C), die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und zum anderen die MHC Klasse II (HLA-DR,-DP,-DQ), die auf allen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden. Beide Klassen dienen zur Selbsterkennung als auch über eine Antigen-Präsentation zur Stimulierung des Immunsystems. Spender der ersten Wahl sind HLA-identische Geschwisterspender.

### 1.2.2 Graft-versus-Host-Disease

Die Spender-gegen-Wirt-Krankheit, die sog. Graft-versus-Host-Disease (GvHD) ist neben den Infektionen die häufigste Komplikation und eine der Hauptursachen für Transplantations-bedingte Morbidität und Mortalität in Rahmen der allogenen HSZT. Sie beruht auf einer Immunreaktion der Spenderlymphozyten gegen den Empfängerorganismus. Die Inzidenz korreliert mit dem *mismatch-*

Grad von Spender und Empfänger (Ferrara et al 2009). Man unterscheidet zwischen der akuten GvHD (< 100 Tage post SZT, selten danach) und der chronischen GvHD (> 100 Tage post SZT, selten davor).

Bei der akuten GvHD (aGvHD) sind die epithelialen Gewebe im Sinne einer Dermatitis (81%), Enteritis (54%) und/oder Hepatitis (50%) betroffen (Martin et al. 1990). Je nach dem klinischen Ausmaß wird die aGvHD nach Glucksberg in die Stadien I-IV (Glucksberg et al. 1974) eingeteilt. Das Langzeitüberleben liegt im Stadium IV bei etwa 5% (Cahn et al. 2005). Bei der chronischen GvHD (cGvHD) sind v. a. die mesenchymalen Gewebe betroffen. Es handelt sich um einen bisher wenig verstandenen fibrosierenden, chronisch-entzündlichen Prozess in Haut und inneren Organen, der zu einem bunten klinischen Bild führt.

Um die Inzidenz der akuten sowie der chronischen GvHD zu senken ist es wichtig, die Spender-Empfänger-Faktoren (z. B.: HLA-Kompatibilität, Alter) zu optimieren sowie eine pharmakologische Immunsuppression bzw. eine Lymphozyten-Depletion durchzuführen (Ferrara et al. 2009). Die prophylaktische pharmakologische Immunsuppression kann zum einen unspezifisch durch relativ breit-wirkendene Immunsuppressiva wie Kortikosteroide, Methotrexat und Cyclophosphamid erfolgen. Zum anderen kann durch die Gabe von Calcineurininhibitoren (Ciclosporin A und FK506) oder de-novo-Purinsynthese-Hemmern (Mycophenolatmofetil) eine spezifischere Hemmung der T-Zellen erzielt werden. Eine Verringerung der T-Zellen im Transplantat kann zudem entweder *ex vivo* durch physikalische Negativselektion der T-Zellen und Positivselektion der CD34-positiven Stammzellen oder *in vivo* durch die Gabe von Anti-CD52-Antikörper (Campath) oder Anti-Thymozyten-Gobulinen (ATG) erreicht werden.

Die Primärtherapie der akuten GvHD erfolgt mit Prednison unter Fortführung der prophylaktischen Immunsuppression, z. B. mit Calcineurininhibitoren (Ferrara et al. 2009). ATG hat sich in der Primärtherapie der akuten GvHD nicht durchsetzen können.

### 1.2.3 Graft-versus-Tumor-Effekt

Der sog. Graft-versus-Tumor-Effekt wurde erstmals 1956 als Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL) von Barnes in einem Tierversuch beschrieben (Barnes et al. 1956). Analog zur GvHD handelt es sich hierbei um eine Immunreaktion im Rahmen der allogenen HSZT, bei der Spenderlymphozyten gegen die maligne Zellen des Empfängerorganismus reagieren. Dabei spielen als Antigene bei HLA-*mismatch*-Transplantationen die humanen Leukozytenantigene (HLA) und bei HLA-*match*-Transplantationen die Minor-Histocompatibilitäts-Antigene sowie die allo-Antigene und tumorspezifische Antigene eine Rolle (Ringden et al. 2009). Der GvL-Effekt wird dabei durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sowie durch NK-Zellen vermittelt und durch Zytokine wie IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF verstärkt (Ringden et al. 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass der GvL-Effekt assoziiert mit der GvHD auftritt (Odom et al. 1978, Weiden et al. 1979, Weiden et al. 1981). Je weniger Lymphozyten sich im Transplantat befanden, desto weniger stark war die GvHD und der postulierte GvL-Effekt und umso mehr traten Rezidive auf (Goldman et al. 1988, Horowitz et al. 1990).

Aufgrund dieses immuntherapeutischen Potentials der Lymphozyten entwickelte Kolb das Konzept der Spender-Lymphozyten-Infusion (Donor-Lymphozyten-Infusion, DLI). Er konnte nachweisen, dass diese den GvL-Effekt der allogenen HSZT verstärken (Kolb et al. 1990). Auch bei Patienten mit Myelom-Rezidiv nach SZT konnte eine Remission durch DLI-Gabe erreicht werden (Aschan et al. 1996, Tricot et al. 1996, Verdonck et al. 1996, Lokhorst et al. 2000, Ayuk et al. 2004, Kröger et al. 2009).

### 1.3 Das Anti-Thymozyten-Globulin

Das Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) ist ein polyklonaler Antikörper der Gruppe der „Anti-Lymphozyten-Globuline“. Teilweise werden beide Begriffe in der Literatur synonym verwendet. Es handelt sich um ein aufgereinigtes IgG-Serum, das durch Immunisierung von Tieren (Kaninchen, Pferd) mit humanen Zellen (Thymozyten, T-Lymphozyten) hergestellt wird.

Das Anti-Thymozyten-Globulin wird aufgrund der starken immunmodulatorischen Wirkung in der Therapie der Transplantatabstoßung von soliden Organen, in der Konditionierung im Rahmen der allogenen HSZT und der Therapie der GvHD eingesetzt. Zurzeit sind folgende Präparate auf dem europäischen Markt erhältlich:

<b>Präparat</b>	<b>Art</b>	<b>Zur Immunisierung verwendete Zellen</b>
ATG-Fresenius	Kaninchen	Jurkat-Zelllinie (T-ALL)
Thymoglobulin	Kaninchen	Humane Thymozyten
ATGAM	Pferd	Humane Thymozyten

Die immunmodulatorische Wirkung des ATG wird durch ein weites Spektrum von Antikörpern vermittelt, das die Interaktion mit verschiedenen Zellpopulationen ermöglicht: T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen sowie auch dendritische Zellen (Mohty 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Immunisierung bzw. Produktionsweisen enthalten die einzelnen ATG-Präparate eine unterschiedliche Bandbreite und Anzahl an Antikörpern (Bonney-Berard et al. 1991, Raefsky et al. 1986, Bourdage et al. 1995)

Durch den Einsatz des immunsuppressiven ATG im Rahmen der Konditionierung der allogenen SZT konnte die Inzidenz der immunologisch vermittelten GvHD verringert werden (Zander et al.

1999, Finke et al. 2000, Bacigalupo et al. 2001). Zu befürchten war, dass unter der Senkung der GvHD-Rate, und damit des Graft-versus-Tumor-Effekts, die Rezidiv-Rate steigen könnte (siehe Kap. GvHD). Interessanter Weise konnte gezeigt werden, dass es unter ATG nicht zu einem Rezidiv-Anstieg kommt (Lowsky et al. 2005, Ayuk et al. 2008b/c). Es muss daher ein Antitumoreffekt des ATG postuliert werden. Dieser konnte bereits auf T-Zell-Malignitäten (Yoshimi et al. 2005), auf B-Zell-Malignitäten (Bonney-Berard et al. 1992 u. 1994, Zand et al. 2005, Zand et al. 2006b, Ayuk et al. 2008a) und auf Myelomzellen (Ayuk et al. 2005, Zand et al. 2006a, Timm et al. 2006, Ayuk et al. 2009a/b) konkretisiert werden.

Die Wirkung des ATG wird dabei durch Apoptose, komplementabhängige Zellyse (complement-dependent cytotoxicity, CDC), AK-abhängige Zell-vermittelte-Zellyse (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity, ADCC) und Opsonierung mit anschließender Phagozytose durch Makrophagen vermittelt (Bonney-Berard und Revillard 1996, Zand et al. 2005, Ayuk et al. 2005).

## **1.4 Antikörper-Therapie**

Antikörper sind lösliche Immunglobuline (Ig) des Blutplasmas. In Wirbeltieren werden fünf Hauptklassen IgG, IgM, IgA, IgE und IgD aufgrund ihrer schweren Kette unterschieden. Das IgG besteht aus vier Untereinheiten, von denen jeweils zwei identisch sind: zwei schwere Ketten (sog. „heavy chains“, H-Ketten) und zwei leichte Ketten (sog. „light chains“, L-Ketten). Man unterscheidet des Weiteren konstante und variable Regionen. Die variablen Domänen beinhalten die jeweils Epitop-spezifischen Paratope des Antikörpers.

Die enzymatische Spaltung ermöglicht eine weitere Unterteilung in verschiedene Fragmente. Unter Zugabe von Papain entstehen zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die Fab-Fragmente vermitteln die spezifische Antigenbindung. Das Fc-Fragment vermittelt die Effektorfunktion, zum Beispiel die Aktivierung des Komplementsystems und die Bindung von Effektorzellen.

### **1.4.1 Polyklonale Antikörper**

Polyklonale Antikörper (AK) werden von unterschiedlichen Plasmazellklonen produziert und erkennen und binden somit verschiedenen Epitope eines Antigen bzw. mehrerer Antigene.

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper benötigt man ein geeignetes Antigen und eine geeignete Spezies zur Immunisierung. Als Antigene dienen Proteine, Peptide, Polysaccharide, Polynukleotide oder Lipide. Diese können synthetisch oder nativ sein, zum Beispiel Zellen oder Zellfragmente. Ein Problem bei der Immunisierung mit Zellen oder Zellfragmenten ist allerdings, dass damit mehrere Antigene zur gleichen Zeit appliziert werden und die spätere Zusammensetzung der gewonnenen

AK unklar ist. Als Spezies zur Immunisierung können zum Beispiel Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege, Schaf und Pferd dienen, wobei polyklonale Seren meist in Kaninchen erzeugt werden.

Die Applikation der Antigene kann mit Zugabe von Adjuvantien, die eine Immunantwort zusätzlich provozieren, erfolgen. Man differenziert zwischen Immunisierung und Boosterung. Die Primärinjektion, die eigentliche Immunisierung, erfolgt meist subcutan an schlecht durchbluteten Stellen. Es bildet sich ein Depot, das durch langsame AG-Abgabe zur Bildung von Memory-Zellen führt. Mehrmalige anschließende Boosterungen, die meist intramuskulär an gut durchbluteten Stellen, oder auch intravenös, durchgeführt werden, aktivieren die Memory-Zellen zur AK-Produktion. Die AK befinden sich in der Serumphase, sodass zunächst nach Gewinnung des Blutes das Serum isoliert werden muss. Dies geschieht durch Gerinnung für einige Stunden bei RT oder über Nacht im Kühlschrank. Nach Zentrifugation kann das Serum abgenommen werden. Danach kann es entweder in dieser Form als Antiserum verwendet werden oder weiter mittels Präzipitationsmethoden, Affinitätschromatographie und anderer Chromatographien (Ladung, Löslichkeit, Molekularmasse, Hydrophobizität) aufgereinigt werden. Nachteil des Antiserums ist erfahrungsgemäß die Vielzahl von Antikörpern. Mit der Entnahme eines sogenannten Präimmunserums verfügt man über eine relative Kontrolle. Nachteile der Aufreinigung sind zusätzlicher Aufwand und Kosten.

Polyklonale AK haben den Vorteil der schnellen, unkomplizierten Immunisierung und der günstigen Produktion in großen Mengen. Nachteile hingegen sind die chargenabhängige Schwankungen, die „Sterblichkeit“ der Produzenten und die Unspezifität durch Kreuzreaktion. Da es sich um artfremde Proteine handelt, kann es bei Verabreichung dieser zu allergischen Reaktionen kommen.

#### **1.4.2 Monoklonale Antikörper**

Monoklonale AK sind monospezifisch, das heißt sie erkennen und binden lediglich ein Epitop eines Antigens und werden von identischen Plasmazellklonen produziert.

Grundlage zur Herstellung monoklonaler AK ist die Fusion von Plasmazellen und malignen Myelomzellen zu Hybridomazellen (Köhler und Milstein 1975). Dabei wird zunächst eine Maus mit dem gewünschten Antigen immunisiert. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Bildung von Plasmazellen. Da die Plasmazellproduktion in der Milz am größten ist, wird diese entnommen und daraus diejenige Plasmazelle isoliert, die den gewünschten Antikörper produziert (z. B. durch ELISA). Anschließend wird diese mit einer Myelomzelle zur Hybridomazelle fusioniert und in einer Gewebekultur gehalten. Die Hybridomazellen besitzen somit zum einen die Fähigkeit der Plasmazelle zur AK-Produktion und zum anderen die Fähigkeit der Tumorzelle sich unbegrenzt zu teilen.

Ein Vorteil in der Herstellung monoklonaler AK ist vor allem die Immortalität der Produzenten. Daher können große Mengen an AK gleichbleibender Qualität aus dem Überstand der Kultur gewonnen werden. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Kreuzreaktivität, da monoklonaler AK nur ein Epitop erkennen. Nachteile sind die aufwendige Herstellung und die reduzierten potentiellen Bindungsstellen.

Ein wesentliches Problem besteht darin, dass es sich bei monoklonalen AK in der Regel um art-fremde Proteine, meist Mausproteine, handelt. Dabei kann es im Patienten zur Bildung von Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern, den sog. Human Anti-Mouse-Antibodies (HAMA), kommen. Diese können die therapeutischen AK binden und damit den therapeutischen Effekt reduzieren. Des Weiteren ist es möglich, dass Fc-Rezeptoren humaner Effektorzellen den murinen Fc-Teil der Antikörper nicht erkennen können und somit ein Teil der Antikörper-Wirkung verloren geht (Ober et al. 2001).

Um diese Probleme zu reduzieren und damit die AK-Wirkung zu verstärken, wurden monoklonale AK für die klinische Anwendung modifiziert: *Chimäre Antikörper* (-ximab) besitzen nur noch die murinen variablen Regionen zur AG-Bindung. Alle konstanten Regionen sind humanen Ursprungs (Boulianne et al. 1984, Morrison et al. 1984). Bei den *Humanisierten Antikörpern* (-zumab) sind alle Aminosäuren-Sequenzen der Maus ersetzt, mit Ausnahme der Complementary Determing Region (CDR), die für die AG-Bindung verantwortlich sind (Jones et al. 1986, Riechmann et al. 1988). Die *Humanen Antikörper* (-umab) sind mittels der Phage-Display-Methodik (McCafferty et al. 1990, Marks et al. 1991) oder mittels der Technik Transgener Mäuse (Green et al. 1994, Lonberg et al. 1994) vollständig human.

### **1.4.3 Antikörper-Therapie**

Die Wirkung von Antikörpern ist abhängig von ihrer Affinität und Spezifität gegenüber dem Antigen und der Fähigkeit Effektor-Mechanismen zu triggern. Sie greifen bioregulatorisch ein, indem sie an Rezeptoren oder Liganden binden und damit entweder Wachstum hemmen oder Apoptose induzieren. Weitere Mechanismen werden durch das Fc-Fragment der AK vermittelt: zum einen kommt es durch die Aktivierung von Komplement zur Komplement-vermittelten Zytotoxizität, der sog. *complement-dependent cytotoxicity* (CDC) (Gelderman et al. 2004), und zum anderen durch die Bindung von NK-Zellen und Makrophagen über ihren Fc-Rezeptor zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität, der sog. *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) (Casadevall und Pirofski 2003). Eine weitere Möglichkeit sind Konjugate aus AK mit toxischen Agenzien, wie zum Beispiel Toxine, Zytostatika oder Radioisotope.

Für eine erfolgreiche Antikörper-Therapie benötigt man ein geeignetes Antigen, das entweder sehr spezifisch oder sehr stark auf den Zielzellen exprimiert werden (Di Bernardo et al. 2010). Mögliche

Targets in der Therapie des MM sind zum einen die Zellen selbst und zum anderen die Interaktion der Myelomzellen untereinander und mit ihrer Umgebung (Richardson et al. 2011, Di Bernardo et al. 2010). Auch die Vielzahl von Zytokinen (z. B. IL-6) und Wachstums- bzw. Angiogenese-Faktoren (z. B. VEGF), die dabei zur para- und autokrinen Stimulation gebildet werden, sind potentielle Zielantigene.

Ein wesentliches Problem der Myelomzelle selbst als Therapie-Target liegt in der großen Heterogenität der Oberflächen-Antigene auf Myelomzellen: Die Myelomzellen exprimieren normalerweise die Plasmazellantigene CD38 und CD138 und zeichnen sich durch den Verlust von B-Zell-Antigenen wie zum Beispiel CD19 und durch die Expression von Adhensionsmolekülen wie zum Beispiel CD56 aus (Fruehauf et al. 2001, Bataille et al. 2006, Tuffaha 2008).

Aber es gibt Untersuchungen, die gezeigt haben, dass Myelomzellen heterogen bzgl. ihres Wachstumsverhaltens und ihres Phänotyps sind (Huff und Matsui 2008). Dabei zeigen einige Arbeiten, dass zwar der Hauptteil der Myelom-Zellen aus terminal differenzierten CD138<sup>pos</sup> Myelom-Plasmazellen (Drewinko et al. 1981) besteht, jedoch ein kleiner Teil von sogenannte „Myelom-Stammzellen“ gebildet wird. Letztere besitzen die Eigenschaft, sich selbst zu replizieren und sich in Plasmazellen zu differenzieren und erfüllen damit die Definition einer Tumor-Stammzelle (Lobo et al. 2007). Matsui et al postulierten hier eine CD138<sup>neg</sup> - Population, die sich des Weiteren durch die Koexpression der B-Gedächtniszell-Antigene CD19 und CD27 auszeichnet (Matsui et al. 2004, Matsui et al. 2008, Ghosh und Matsui 2009). Diese Zellen unterscheiden sich somit eindeutig von den „normalen“ CD138<sup>pos</sup> Myelom-Zellen, die sich durch den Verlust des B-Zell-Antigens auszeichnen. Interessanter Weise hat sich diese neu postulierte Population als therapieresistent herausgestellt (Matsui et al. 2008).

Weitere Arbeiten haben sog. „clonogenic B-cells“ detektiert. Diese Zellen sind zwar klonal zu Myelom-Plasmazellen, exprimieren jedoch B-Zellantigene, wie zum Beispiel CD19, CD20, CD22, CD45 (Szczepek et al. 1998, Berenson et al. 1995, Billadeau et al. 1993, Jensen et al. 1992, Matsui et al. 2004, Ghosh und Matsui 2009, Bakkus et al. 1994, Bergsagel et al. 1995, Chen und Epstein 1996). Somit unterscheiden sie sich ebenfalls von den „normalen“ Myelom-Zellen.

Insgesamt stellt die beschriebene Heterogenität die monoklonale AK-Therapie vor eine große Herausforderung.

Der chimäre Anti-CD20-Antikörper Rituximab revolutionierte nach seiner Zulassung 1997 die Behandlung CD20-positiver B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (Dillman 2011). Obwohl das Multiple Myelom zu der Gruppe der B-Zell-NHL gehört, konnte eine Rituximab-Therapie nicht an diese Erfolge anschließen und in der Myelom-Therapie etabliert werden (Treon et al. 2002, Zojer et al. 2006, Richardson et al. 2011, Kapoor et al. 2008). Ein Problem stellt die niedrige

Expressionsrate dar: nur ein kleiner Teil der Patienten, etwa 14% haben Myelomzellen, die CD20 exprimieren (Bataille et al. 2006).

Zurzeit werden verschiedene monoklonale Antikörper in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit überprüft: unter anderem Anti-CD38-AK, Anti-CD40-AK, Anti-CD56-AK, Anti-CD138-AK sowie Antikörper gegen IL-6 und VEGF (Richardson et al. 2011). Bisher konnten keine hohen Ansprechraten durch monoklonale AK allein erzielt werden. Vermutlich liegt das Potential monoklonaler AK im Rahmen einer konventionellen Kombinationstherapie in der Überwindung von Therapieresistenzen (Richardson et al. 2011).

### 1.5 Fragestellung/Zielsetzung

Die Therapie des Multiplen Myeloms ist außerordentlich unbefriedigend. Ein wesentliches Problem stellt dabei die Entwicklung von Rezidiven und Therapieresistenzen dar. Daher ist die Entwicklung neuer Therapiekonzepte, die zum einen die Rezidivrate senken und zum anderen Therapieresistenzen überwinden dringend notwendig.

Eine mögliche Lösung ist der Einsatz therapeutischer Antikörper. Jedoch konnten bisher monoklonale Antikörper in der Behandlung des Multiplen Myeloms nicht an die Erfolge des Rituximabs in der Lymphom-Therapie anschließen. Aufgrund der großen Heterogenität der Myelom-Zellen sollten daher polyklonale Antikörper entwickelt und auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden. Dies ist der Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Das polyklonale Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) hat sich bereits *in vitro* als wirksam gegen Myelom-Zellen erwiesen (Ayuk et al. 2005, Zand et al. 2006a, Timm et al. 2006). Wird ATG *in vivo*, im Rahmen reduzierter Konditionierungs-Regime allogener SZT eingesetzt, so kann die Transplantations-assoziierten Mortalität gesenkt werden, ohne dass es zu einem Anstieg der Rezidivrate kommt (Nagler et al. 2001, Kroger et al. 2002, Ayuk et al. 2008b).

Damit stellt ATG einen möglichen polyklonalen Antikörper in der Myelom-Therapie dar. Ein Problem besteht jedoch in seinem weiten Wirkungsspektrum, der damit verbundenen Unspezifität und den daraus resultierenden Nebenwirkungen. Vor diesem Hintergrund wurden analog zu ATG-Fresenius (ATG) polyklonale Anti-Myelom-Globuline (AMGs) generiert, indem zur Immunisierung von Kaninchen Myelom-Zelllinien verwendet wurden. Die ersten Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lauten daher (Teil I):

- Haben die zu ATG analog generierten Anti-Myelom-Globuline eine höhere Aktivität gegen Myelom-Zellen als ATG?
- Wie ist die Toxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf andere hämatopoetische Zellen wie beispielsweise den T-Zellen?
- Werden dabei Immunzell-Marker wie CD38 stärker von AMG als von ATG gebunden?
- Falls die Wirkung der AMGs stärker ist als von ATG: Kann eine unspezifisch höhere Toxizität, zum Beispiel auf nicht-hämatopoetische Zellen, ausgeschlossen werden?

In der zytotoxischen Wirkung der ATGs wurden bereits verschiedene Mechanismen beschrieben. Um zu untersuchen, ob diese auch bei den AMGs vorliegen, wurden in der vorliegenden Arbeit weiterhin folgende Wirkungsmechanismen untersucht (Teil II):

- Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC)
- Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Lyse (ADCC)
- synergistische Effekte mit alten (z. B. Melphalan) und neuen Substanzen (z. B. Bortezomib) aus der Myelom-Therapie.

Im Abschluss (Teil III) soll eine Perspektive einer neuen Generation von polyklonalen Antikörpern aufgezeigt werden. Es handelt sich um polyklonale Antikörper, die zum einen breit genug wirken, um die Heterogenität der Myelom-Zellen abzudecken, zum anderen aber spezifisch genug sind, um deutlich weniger unerwünschte Wirkungen zu verursachen.

Dazu wurde von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B. Fehse ein neues Konzept zur Generierung von polyklonalen Antikörpern entwickelt: Geeignete Spezies, wie z. B. Kaninchen, werden mit *genetisch veränderten* allopathen bzw. speziesverwandten Zellen immunisiert. Auf diese Weise wurden polyklonale Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera sog. AMAG-Sera hergestellt (Entwicklung: PD Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse; Herstellung: Prof. DDr. Drs. h.c. G. Brem). Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte dabei mittels genmodifizierten Mauslymphozyten mit ektoher Expression der humanen Antigene CD19, CD38, CD40 und CD138 (Herstellung: S. Kessner, AG Prof. Dr. B. Fehse). In der vorliegenden Arbeit soll nun gezeigt werden, inwieweit diese Generierung erfolgreich war. Daher wird die

- zytotoxische Wirkung der AMAG-Sera und ihre
- Bindungskapazität der Zielantigene untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Medien

Chemikalien	Hersteller
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG , Berlin, Germany
Chromium-51, Cr-RA-8	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Germany
DMEM Medium mit 1g/l D-Glu, L-Glutamin, Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
DMSO, Dimethylsulphoxid	Sigma, Steinheim, Germany
Ethanol 80% (Desinfektinsmittel)	Walter CMP GmbH, Kiel, Germany
Foetal bovine Serum	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Human T Cell Enrichment Cocktail, RosetteSep <sup>®</sup>	StemCellTechnologiesInc,Köln, Germany
Human NK Cell Enrichment Cocktail, RosetteSep <sup>®</sup>	StemCellTechnologiesInc,Köln, Germany
PBS, Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
10.000 U/ml Penicillin, 10.000µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
TritonX100 2%	Sigma Aldrich, Hamburg, Germany
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Trypsin EDTA .05%	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Chromium-51	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Germany

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cryo tubes	Nunc, Langenselbold, Germany
Eppendorf Safe Lock Tubes "Eppi`s"	Eppendorf, Hamburg, Germany
Falcon tubes 15ml, 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Handschuhe, Peha-soft satin powderfree	Hartmann AG, Heidenheim, Germany
Neubauer Zählkammer, improved	Assistent, Sondheim, Germany
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Chicago, USA
Pipetten steril 5ml, 10ml, 25ml, Falcon <sup>®</sup>	BD Labware, Heidelberg, Germany
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf, Germany

Rundbodenröhrchen ohne Deckel, 5 ml, PS	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf, Germany
Rundbodenröhrchen mit Deckel, 5 ml, PS	BD Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Weißdeckel tubes, Röhrchen PS 30ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Zellkulturflaschen, cellstar® tissue culture flasks	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
white filter cap, PS, 50 ml/250ml	- für Suspensionszellen
red filter cap, PS, 50 ml/250ml	- für adhären wachsende Zellen
96-TC-Platte, V-shape, cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany

### 2.1.3 Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Absauggerät Miniport		Hassheider Medizintechnik, Köln, Germany
Brutschrank	HERA cell® 150l	Heraeus, Hamburg, Germany
Durchflussszytometer	BD-FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
γ-Counter	1470 Wallac Wizard	PerkinElmer, Waltham, USA
Freezing Container		Nalgene Labware, Roskilde, Denmark
Kühlgefrier-Kombi		Liebherr, Ochsenhausen, Germany
Mikroskop	Olympus CKX41	Olympus, Hamburg, Germany
Multipette® plus		Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipetboy acu		IBS Integra Biosciences, Chur, Switzerland
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Germany
Vortexer	Reax 1	Heidolph Instruments, Schwabach, Germany
Wasserbad	GFL Typ 1003	GFL, Hannover, Germany
Werkbank	HS18	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau Germany
Zentrifugen	Eppendorf 5702R Sigma 6K10	Eppendorf, Hamburg, Germany Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany

### 2.1.4 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Nummer	Zelltyp
RPMI-8226	DSMZ	ACC 402	human multiple myeloma
KMS-12-BM	DSMZ	ACC 551	human multiple myeloma
OPM-2	DSMZ	ACC 50	human multiple myeloma

HaCat*	CLS		humane Keratinozyten
PANC-1	ATCC	CRL-1469	human pancreas carcinoma
MIA PaCa-2	ATCC	CRL-1420	human pancreas carcinoma
RAJI**	DSMZ	ACC 319	human Burkitt lymphoma

ATCC - American Type Culture Collection, [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org), Manassas, USA

CLS - Cell Lines Service, [www.cell-lines-service.de](http://www.cell-lines-service.de), Eppelheim, Germany

DSMZ - Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de), Braunschweig, Germany

\* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, aktuelle Ansprechpartnerin: PD Dr. Johanna Brandner

\*\* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ellen Preuß, Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder e.V., Frankfurt am Main

## 2.1.5 Antikörper und Chemotherapeutika

### 2.1.5.1 Anti-Myelom-Gobuline (AMG-8226 und AMG-12-BM)

Zur Herstellung der polyklonalen Anti-Myelom-Globuline wurden je fünf Kaninchen mit den DSMZ-Myelom-Zelllinien RPMI-8226 und KMS-12-BM nach dem ATG-Fresenius-Protokoll immunisiert. Zur Gewinnung der nach den Zelllinien benannten Antikörper wurden die Sera immunologisch und proteinchemisch aufgereinigt. Die Konzentration beträgt für AMG-8226 14,94 mg/ml und für AMG-12-BM 15,28 mg/ml.

(Herstellung: Fresenius Biotech GmbH, Gräfelfing, Germany)

### 2.1.5.2 Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera (AMAG-Sera)

Zur Herstellung der polyklonalen Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera, der sog. AMAG-Sera, wurden je vier Kaninchen mit genmodifizierten oder unmodifizierten Mauslymphozyten immunisiert. Diese Zellen exprimierten ektope die humanen Antigene CD19, CD38, CD40, CD138. Die Genmodifikation wurde mittels Transduktion der Zielzellen durch klonierte lentivirale Vektoren erzielt (durchgeführt von S. Kessner, AG Prof. Dr. B. Fehse). Eine Kontrollgruppe von vier Kaninchen wurde zur Herstellung der Wildtypsera mit unmodifizierten Mauslymphozyten immunisiert. Aus allen Tieren wurde vor der Immunsierung Präimmunisierungssera zur Kontrolle gewonnen. Alle Sera wurden nicht speziell aufgereinigt.

(Entwicklung: PD Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse; Herstellung: Prof. DDr. Drs. h.c. G. Brem, Agrobiogen GmbH Biotechnologie, Hilgertshausen, Germany)

**2.1.5.3 Weitere**

ATG-Fresenius S (20 mg/ml)	Ch-B: U 01A -1, Fresenius Biotech GmbH, Gräfelfing, Germany
Rabbit IgG-UNLB (5mg/ml)	REF 731642, BD Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Melphalan (10 mM)	BioChemika, 63648 Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bortezomib (1mg/ml)	Velcade <sup>®</sup> , Ch-B: 7HZT200, Janssen-Cilag, High Wycombe, Buckinghamshire, UK

**2.1.6 Durchflusszytometrie-Reagenzien**

Reagenz	Nummer	Hersteller
7AAD	Cat 51-68981 E (559925)	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Anti-A,B, BioClone <sup>®</sup>	REF 711528,	Ortho-Clinical Diagnostics Inc, Neckargemünd, Germany
Anti-Human CD3-PE	REF A07747, Klon: UCHT1	IOtest <sup>®</sup> , BeckmanCoulter, Krefeld, Germany
Anti-Human CD56-PE	REF A07788, Klon: N901	IOtest <sup>®</sup> , BeckmanCoulter, Krefeld, Germany
Anti-Human CD19-PE	REF A07769, Klon: J4.119	IOtest <sup>®</sup> , BeckmanCoulter, Krefeld, Germany
Anti-Human CD40-PE	PM IM1936U, Klon: MAB89	IOtest <sup>®</sup> , BeckmanCoulter, Krefeld, Germany
Anti-Human CD38-PE	REF 345806, Klon: HB7	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Anti-Human CD138-PE	Cat 552026, Klon: MI15	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Mouse-IgG1-PE	REF 345816, Klon: X40	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Mouse-IgG1-PE	REF A07796, Klon: 679.1Mc7	IOtest <sup>®</sup> , BeckmanCoulter, Krefeld, Germany
Caltag counting beads	PCB-100	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

**2.1.7 Software**

CalcuSyn, Version 2.1.	Biosoft, Cambridge, UK
BD FACSDiva Software 2008, Version 6.1.2.	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Microsoft <sup>®</sup> Office Professional Edition 2003	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft <sup>®</sup> Office 2008 für Mac, Version 12.1.0.	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Wilcoxon-Rangsummen-Test:

<http://faculty.vassar.edu/lowdry/wilcoxon.html> [Stand 08.08.2012, 10:14Uhr]

[http://www.socr.ucla.edu/htmls/SOCR\\_Analyses.html](http://www.socr.ucla.edu/htmls/SOCR_Analyses.html) [Stand 08.08.2012, 10:14Uhr]

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologie

#### 2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Es wurden nur sterile Lösungen, Kulturmedien und Materialien verwendet. Alle Arbeiten fanden unter der Werkbank statt. Um eine mikrobielle Kontamination auszuschließen, wurden die Zellen regelmäßigen Kontrollen unter dem Mikroskop unterzogen. Die Kultivierung der Zellen fand in dem jeweiligen Medium und in Kulturflaschen mit Gas-permeablen Verschlüssen im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> statt.

#### 2.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Da sich diese Zellen in Suspension befanden, wurde die Kultur nach dem Durchmischen einfach geteilt und ein Teil davon verworfen bzw. in eine neue Kulturflasche umgesetzt. Durch die Zugabe von frischem, zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmtem Medium, wurde eine Endkonzentration von ca. 0,3 - 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml erreicht. Die Häufigkeit, mit der das Medium erneuert wurde, richtete sich nach der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität der jeweiligen Zelllinie.

<b>Zelllinien</b>	<b>Medium</b>
RPMI-8226	RPMI 1640, 10% FBS, 1% Pen/Strep
KMS-12-BM	RPMI 1640, 20% FBS, 1% Pen/Strep
OPM-2	RPMI 1640, 10% FBS, 1% Pen/Strep
Raji	RPMI 1640, 10% FBS, 1% Pen/Strep

#### 2.2.1.3 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Zunächst mussten die Zellen bei jedem Umsetzen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst werden. Hierfür wurde zunächst das Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde vorgewärmtes Trypsin 0,05% auf die Zellen gegeben und das Ganze für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Der Prozess des Ablösens der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Nach erfolgreicher Ablösung wurde die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Nährmediums gestoppt und die Zellsuspension in Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (7 min, 1400 revolutions per minute (rpm), Raumtemperatur (RT)) wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen anschließend im gewünschten Verhältnis in neue Flaschen umgesetzt.

<b>Zelllinien</b>	<b>Medium</b>
HaCat	DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep
Panc-1	DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep
Mia PaCa-2	DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep

#### **2.2.1.4 Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung mittels Trypanblau**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl gut durchmischter Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau versetzt (Verhältnis von 1:5). Ein Teil davon wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Das Auszählen der Zellen erfolgte dann unter Zuhilfenahme eines Mikroskops. Dabei wurden nur die vitalen Zellen gezählt, die auf Grund ihrer intakten und dadurch für Trypanblau undurchlässigen Membran hell erscheinen. Die Anzahl an vitalen Zellen in allen vier großen Quadranten entspricht dabei der Anzahl von Zellen in 0,4 µl Volumen (Volumen der Zählkammer). Daraus resultiert:

Anzahl der gezählten Zellen :  $0,4 \times 1000 \times \text{Verdünnungsfaktor } 5 = \text{Anzahl der Zellen/ml}$

Gleichzeitig konnte der Prozentsatz der vitalen Zellen, das heißt der nicht gefärbten Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt werden.

#### **2.2.1.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Die dauerhafte Aufbewahrung von Zellen erfolgte im flüssigen Stickstoff. Für die Konservierung wurden die Zellen auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und dann durch einen Zentrifugationsschritt (7 min, 1400 rpm, RT) pelletiert. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Einfriermedium (90% FBS, 10% DMSO) auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und rasch auf 1 ml *cryo tubes* verteilt ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml/Tube). Das schonende Einfrieren erfolgte in einem *freezing container* über 24h bei  $-80^\circ\text{C}$ . Danach erfolgte die Überführung in den flüssigen Stickstoff.

Beim Auftauen der Zellen wurde die eingefrorene Kultur zügig aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 15 ml vorgelegtem warmen Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (7 min, 1400 rpm, RT) wurde das Pellet im frischen Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Die Zellkultur wurde unter Standardbedingungen kultiviert und vor weiterer Verwendung zunächst zweimal passagiert.

#### **2.2.1.6 Gewinnung von primären T- und NK-Zellen**

Die T-Zellen und NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen, die freundlicher Weise von der Zellseparation des Instituts für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt wurden. *Buffy Coats* entstehen bei der Verarbeitung von Vollblutspenden zu

Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten als Nebenprodukt und bestehen hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen und Blutplättchen. Die Spender haben sich zuvor mit der Verwendung für Forschungszwecke einverstanden erklärt.

In einem Falcon-Röhrchen wurde pro ml *Buffy Coat* 50 µl RosetteSep<sup>®</sup> Human T Cell bzw. NK Cell Enrichment Cocktail hinzu gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1:2 Verdünnung mit dem gleichen Volumen an PBS. In einem neuen Falcon-Röhrchen wurde 1/3 Biocoll vorgelegt und zu 2/3 mit der verdünnten Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Es erfolgte eine 20-minütige Dichtegradienten-Zentrifugation bei 2000 rpm, RT und ausgeschaltener Bremse. Der entstandene Leukozytenring zwischen der Biocollschicht und der Plasmaschicht wurde mit einer 1000 µl Pipette evakuiert, mit 10 ml PBS verdünnt und zentrifugiert (7 min, 1400 rpm, RT). Dieser Waschvorgang wurde wiederholt und das Zellpellet anschließend in vorgewärmten RPMI 1640 Medium mit 10% FBS und 1% Pen/Strep aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in eine Kulturflasche für Suspensionszellen überführt und mindestens 1h bis zur Verwendung in den Brutschrank gelegt oder kryokonserviert. Die Isolation der Zellen wurde stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### **2.2.1.7 Gewinnung von aktivem humanen Serum (Komplement)**

Von fünf verschiedenen Spendern (schriftliche Einverständniserklärung liegt vor) wurden jeweils fünf Serumröhrchen Blut gewonnen. Die 25 Serumröhrchen wurden zunächst bei 2000 rpm und bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Serumüberstand in ein Falcon-Röhrchen überführt und nochmals bei 2000 rpm und bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde aliquotiert und bei -80°C kryokonserviert.

### **2.2.2 Zytotoxizitätsassays**

#### **2.2.2.1 Zytotoxizität auf Myelom-Zelllinien**

Für Testung der Antikörper (AK) wurden die zur Immunisierung verwendeten Zelllinien RPMI-8226 und KMS-12-BM sowie eine „neutrale“ Myelomzelllinie OPM-2 eingesetzt. Als Kontrolle zur Erfassung der unspezifischen Toxizität durch Kaninchenantikörper diente das rabbit-Immunglobulin-G (rIgG). Die Testung der AK erfolgte jeweils in zwei Ansätzen: einmal mit und einmal ohne Komplement (K). Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 10, 50, 100, 200 und 500 µg/ml. Für die Negativ-Kontrollen wurden jeweils die AK-Verdünnungen durch Medium ersetzt.

Ansatz mit 50% K:	50 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 100 µl Komplement
Ansatz ohne K:	50 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 100 µl Medium
Kontrolle:	50 µl Zellsuspension + 50 µl Medium + 100 µl Komplement/Medium

Zunächst wurden die Zellen auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und dann jeweils 50 µl (=  $2 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Röhrchen überführt. Die AK wurden in der vierfachen Konzentration angesetzt, da anschließend im Versuchsansatz eine 1:4 Verdünnung erfolgte. Die höchste gewünschte Konzentration ( $500 \mu\text{g/ml} \times 4 = 2000 \mu\text{g/ml}$ ) wurde mit PBS eingestellt (Endkonzentration \* Endvolumen = gegebene Konzentration \* x) und in einer Verdünnungsreihe 2:5, 1:2, 1:2, 1:5 mit PBS auf die anderen Konzentrationen verdünnt (800, 400, 200, 40 µg/ml). Anschließend wurde je 50 µl / Probe in die FACS-Röhrchen mit Zellsuspension überführt.

Im Komplement-abhängigen Ansatz wurden zügig 100 µl des schnell aufgetauten humanen Serums in jede Probe pipettiert und dann 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Ansatz ohne Komplement wurden je 100 µl Medium/Probe hinzugefügt. Die Inkubation in diesem Ansatz erfolgte für 20-24 h bei 37°C im Brutschrank.

Nach der Inkubation wurden alle Ansätze mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert (1400 rpm, 7 min, RT) und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert. Es erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender FACS-Analyse.

#### 2.2.2.2 Zytotoxizität auf primäre T-Zellen

Zur Testung der Antikörper wurden fünf verschiedene T-Zell-Proben verwendet. Vor jedem Versuch wurden die T-Zellen mittels einer CD3-Färbung in einer FACS-Analyse quantifiziert. Die Testung der AK erfolgte jeweils in zwei Ansätzen: mit Komplement (K) in den Konzentrationen 12,5-25-50-100 µg/ml und ohne Komplement in den Konzentrationen 50-100-200-500 µg/ml. Für die Negativ-Kontrollen wurden jeweils die AK-Verdünnungen durch Medium ersetzt.

Ansatz mit 50% K:	50 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 100 µl Komplement
Ansatz ohne K:	50 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 100 µl Medium
Kontrolle:	50 µl Zellsuspension + 50 µl Medium + 100 µl Komplement/Medium

Zunächst wurden die Zellen auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und jeweils 50 µl (=  $2 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Röhrchen überführt. Die AK wurden in der vierfachen Konzentration angesetzt, da anschließend im Versuchsansatz eine 1:4 Verdünnung erfolgte. Die höchste gewünschte Konzentration wurde mit PBS eingestellt (Endkonzentration \* Endvolumen = gegebene Konzentration \* x) und in einer Verdünnungsreihe mit PBS zu den anderen Konzentrationen verdünnt. Anschließend wurden je 50 µl/Probe in die FACS-Röhrchen mit Zellsuspension

überführt. Im Komplement-abhängigen Ansatz wurde zügig 100 µl des schnell aufgetauten humanen Serums in jede Probe pipettiert und 45min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Ansatz ohne Komplement wurden je 100 µl Medium /Probe hinzugefügt. Die Inkubation in diesem Ansatz erfolgte für 20-24 h bei 37°C im Brutschrank. Nach der Inkubation wurden alle Ansätze mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Es erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender FACS-Analyse.

### 2.2.2.3 Zytotoxizität auf nicht-hämatopoetische Zellen

Die Testung der Antikörper (AK) auf nicht-hämatopoetische Zellen erfolgte Komplement-abhängig (K) auf den Zelllinien Hacat, Mia PaCa-2 und Panc-1 in den Konzentrationen 50, 100, 200, 400 und 800 µg/ml. Für die Negativ-Kontrolle wurde die AK-Verdünnung durch Medium ersetzt.

Ansatz: 50 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 100 µl K  
 Kontrolle: 50 µl Zellsuspension + 50 µl Medium + 100 µl K

Zunächst wurden die Zellen auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und jeweils 50 µl ( $= 2 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Röhrchen überführt. Die AK wurden in der vierfachen Konzentration angesetzt, da anschließend im Versuchsansatz eine 1:4 Verdünnung erfolgte. Die höchste gewünschte Konzentration wurde mit PBS eingestellt (Endkonzentration \* Endvolumen = gegebene Konzentration \* x ) und in einer Verdünnungsreihe mit PBS zu den anderen Konzentrationen verdünnt. Anschließend wurden je 50 µl/Probe in die FACS-Röhrchen mit Zellsuspension überführt. Das humane Serum wurde schnell aufgetaut und zügig 100 µl in jede Probe pipettiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden alle Ansätze mit 3ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in je 100 µl PBS resuspendiert. Es erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender FACS-Analyse.

### 2.2.2.4 Kombinationsversuche

Die Konzentrationen der Antikörper (AK) sowie der Chemotherapeutika (CT) wurde so gewählt, dass die alleinige maximale Toxizität zwischen 40% und 60% lag. Damit ist auch eine Beobachtung steigender Toxizität bei Kombinationen der höheren Konzentrationen möglich. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

ATG	1500, 750, 375 µg/ml
AMG-8226	200, 100, 50 µg/ml
Melphalan	40, 20, 10 µM
Bortezomib	20, 10, 5 ng/ml

Ansätze: 100 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 50 µl Medium  
 100 µl Zellsuspension + 50 µl Medium + 50 µl CT-Verdünnung  
 100 µl Zellsuspension + 50 µl AK-Verdünnung + 50 µl CT-Verdünnung  
 Kontrolle: 100 µl Zellsuspension + 100 µl Medium

Alle Substanzen wurden einzeln sowie in Kombination (je ein AK mit einem CT) getestet. Zunächst wurden die Zellen auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl (=  $2 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Röhrchen überführt. Die AK wurden in der vierfachen Konzentration angesetzt, da anschließend im Versuchsansatz eine 1:4 Verdünnung erfolgte. Die höchste der gewünschten Konzentrationen wurde mit PBS eingestellt (Endkonzentration \* Endvolumen = gegebene Konzentration \* x ) und in einer Verdünnungsreihe zweimal 1:2 mit PBS zu den anderen Konzentrationen verdünnt. Anschließend wurden je 50 µl/Probe in die FACS-Röhrchen mit Zellsuspension überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank für 24h. Nach der Inkubation wurden alle Ansätze mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Es erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender FACS-Analyse.

### 2.2.2.5 Zytotoxizität der AMAG-Sera

Zur Herstellung polyklonaler Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera (AMAG-Sera) wurden vier Kaninchen mit genmodifizierten Mauslymphozyten immunisiert. Diese exprimierten ektop die humanen Antigene CD19, CD38, CD40, CD138. Zur Herstellung von Wildtypsera wurde eine Kontrollgruppe von vier Kaninchen mit unmodifizierten Mauslymphozyten immunisiert. Aus allen Tieren wurde vor der Immunsierung Präimmunsierungs-Sera zur Kontrolle gewonnen (Herstellerangaben s.o.)

Alle vier AMAG-Sera und Wildtyp-Sera sowie deren Präimmun-Sera wurden untersucht. Um eine größere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden immer zwei Wildtyp-Sera, zwei AMAG-Sera sowie zwei Präimmun-Sera zur gleichen Zeit getestet. Die Wahl der Zelllinie wurde nach der Antigen-Präsentation getroffen. Da eine  $CD19^+CD38^+CD40^+CD138^+$  Myelomzelllinie nicht zur Verfügung stand, wurde für die Versuche die  $CD19^+CD38^+CD40^+$  Zelllinie Raji ausgewählt.

Da die gewonnen Sera alle noch Komplement enthielten, wurden diese zuvor 1h bei 56°C inaktiviert und wieder bei -80°C kryokonserviert. So konnten verschiedene Volumina des Serums verwendet werden, ohne dass sich die Menge an Komplement zwischen den Ansätzen unterschied. Es wurden jedem Ansatz 40 µl aktives humanes Serum (Komplement) hinzugefügt. Für die Negativ-Kontrolle wurde die AK-Verdünnung durch Medium ersetzt.

Ansatz: 10 µl Zellsuspension + 50 µl Serum-Verdünnung + 40 µl Komplement  
 Kontrolle: 10 µl Zellsuspension + 50 µl Medium + 40 µl Komplement

Zunächst wurden die Zellen auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und jeweils  $10 \mu\text{l}$  ( $= 2 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Röhrchen überführt. Die Sera wurden in einer Verdünnungsreihe viermal 1:2 mit PBS verdünnt um eine Konzentrationsreihe von 1:1 bis 1:16 zu erhalten. Je  $50 \mu\text{l}$  wurden in die FACS-Röhrchen mit Zellsuspension überführt. Das humane Serum wurde schnell aufgetaut und zügig  $40 \mu\text{l}$  in jede Probe pipettiert. Das Verhältnis von Serum zum Gesamtansatz betrug somit 1:2 bis 1:32. Nach einer Inkubation von 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank wurden alle Ansätze mit 4 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in je  $100 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Es erfolgte eine 7-AAD-Färbung und eine anschließende FACS-Analyse.

### 2.2.3 Blockierungsassays

#### 2.2.3.1 CD38-Blockierung auf KMS-12-BM-Zellen

Die KMS-12-BM-Zellen wurden in einem Weißdeckelröhrchen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 10% mit AB-Serum (1:2 mit PBS verdünnt) 30 min lang bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Zellpellet im gleichen Volumen wieder aufgenommen und je  $100 \mu\text{l}$  in  $500 \mu\text{l}$  Eppendorf Safe Lock Röhrchen pipettiert. Die Antikörperdosis wurde für jede Konzentration einzeln berechnet (Endkonzentration \* Endvolumen = gegebene Konzentration \* x), hinzu gegeben, gut gemischt und 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Zellpellet in  $100 \mu\text{l}$  PBS wieder aufgenommen und mit  $10 \mu\text{l}$  Anti-human-CD38-PE-AK bzw. Mouse-IgG1-PE 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift wurden die Proben in  $200 \mu\text{l}$  resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und einer FACS-Analyse unterzogen. Folgende AK-Konzentrationen wurden verwendet:

ATG: 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$

AMG-8226: 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$

#### 2.2.3.2 CD19, CD38, CD40 Blockierung auf Raji-Zellen

Vor dem Versuch wurden alle verwendeten Seren 1h lang bei  $56^\circ\text{C}$  Komplement-inaktiviert und anschließend wieder bei  $-80^\circ\text{C}$  kryokonserviert. Für den Versuch wurden  $\text{CD19}^+\text{CD38}^+\text{CD40}^+$  Raji-Zellen in einem Weißdeckelröhrchen auf  $10 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 10% 1:2 verdünntem AB-Serum für 20 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Zellpellet im gleichen Volumen wieder aufgenommen und je  $20 \mu\text{l}$  ( $= 2 \times 10^5$  Zellen) in FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde nach folgendem Schema jedes inaktivierte Serum pipettiert:

2:1 Serum-Ansatz-Verhältnis	20 µl Zellsuspension + 40 µl Serum
1:1 Serum-Ansatz-Verhältnis	20 µl Zellsuspension + 20 µl Serum
1:2 Serum-Ansatz-Verhältnis	20 µl Zellsuspension + 10 µl Serum + 10 µl PBS

Nach gutem Durchmischen der Proben wurden diese für 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert. Dann erfolgte eine Inkubation mit 3 µl der jeweiligen Fluoreszenz-AK IgG1, CD19, CD38, CD40 für 20 min bei 4°C. Nach einem abschließenden Waschen mit 3ml PBS wurden die Proben im FACS analysiert.

#### 2.2.4 Chromium-Release-Assay

Das Chromium-Release-Assay wurde durchgeführt, um AMG und ATG auf eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, sog. *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), zu untersuchen. Dazu wurde die radioaktive Strahlung, die bei der Lyse von Chrom<sup>51</sup>-markierten Zielzellen austritt, im Überstand gemessen. Alle Arbeiten mit radioaktiver Strahlung wurden den Vorschriften gemäß im Isotopenlabor durchgeführt.

Zunächst wurden die RPMI-8226 Zielzellen mit 100 µCi <sup>51</sup>Cr pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen 1,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit 10 ml frischem Medium gewaschen. NK-Zellen und <sup>51</sup>Cr-RPMI-Zellen wurden im 5:1 (25.000:5000) Verhältnis in 96-V-Platten vorgelegt und anschließend mit den verschiedenen AK-Konzentrationen 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die minimal spontane <sup>51</sup>Cr-Freisetzung wurde durch Zugabe von 100 µl Medium und die maximale <sup>51</sup>Cr-Freisetzung durch Zugabe von 100 µl 2% Triton-X-100 (gelöst in PBS) bestimmt. Die Ansätze im Überblick:

Hintergrund:	200 µl Medium
Max-Ktr:	100 µl Zellsusp. + 100 µl Triton-X-100 2%
Min-Ktr:	100 µl Zellsusp. + 100 µl Medium
Neg-Ktr:	100 µl Zellsusp. + 50 µl NK-Zellsusp. + 50 µl Medium
Ansätze ohne NK-Zellen:	100 µl Zellsusp. + 50 µl AK-Verdünnung + 50 µl Medium
Ansätze mit NK-Zellen:	100 µl Zellsusp. + 50 µl AK-Verdünnung + 50 µl NK-Zellsusp.

Nach erfolgter Inkubation wurde 100 µl des Überstandes vorsichtig abpipettiert und in  $\gamma$ -Counter-Tubes überführt. Die davon ausgehende radioaktive Strahlung wurde in einem

Radioaktivitätsmessgerät, dem  $\gamma$ -Counter gemessen. Die prozentuale spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$100 \times (\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) / (\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) = x$$

## 2.2.5 Durchflusszytometrie

Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurde der FACS-CantoII von BD verwendet. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der BD FACSDiva Software.

### 2.2.5.1 Allgemeines zur Methode

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (Rothe 2007) besteht in der Analyse von Einzelzellen auf Grund von Streulicht und Fluoreszenzsignalen. Das Gerät besteht aus einem optischen System und einem Flüssigkeitssystem. Die in der Probe befindliche Zellsuspension wird durch Druck über eine Kapillare in eine Messküvette eingebracht. Dort wird der Probenstrom durch einen Hüllstrom fokussiert und gestreckt, so dass die Zellen einzeln eine im rechten Winkel befindliche Lichtquelle passieren. Zwei Effekte entstehen: Das auftreffende Laserlicht wird zunächst hauptsächlich in zwei Richtungen gestreut und dort gemessen. Das Licht wird zum einen in Vorwärtsrichtung in einem kleinen Winkel zum Anregungsstrahl gemessen und als Vorwärtslichtstreuung (*forward light scatter*, FSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgröße. Zum anderen befindet sich im rechten Winkel zum Laserstrahl der Streulichtdetektor für die Seitwärtslichtstreuung (*side scatter*, SSC). Die Seitwärtsstreuung gilt als Maß für die Granularität und Binnenstruktur der Zellen. Somit hat jede Zellpopulation (Lymphozyten, Myelomzellen usw.) eine definierte Lage im Vorwärts- und Seitwärts-scatter.

Des Weiteren regt das auftreffende Laserlicht fluoreszierende Marker an. Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Phycoerythrin (PE) für die Immunfluoreszenz oder 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) zur DNA-Färbung emittieren nach Anregung durch einen Laser in die für die einzelnen Substanzen charakteristische Wellenlängen (PE  $\lambda$ -max = 576 nm, 7-AAD  $\lambda$ -max = 660 nm). Diese Emissionsmaxima werden von mehreren Detektoren simultan registriert. Da sich die Emissionsspektren teilweise überschneiden, muss dies bei der Fluoreszenzanalyse mehrerer Substanzen berücksichtigt werden. Dies geschieht durch die sogenannte Kompensation. Alle Lichtsignale werden quantifiziert und als multiparametrische Messung für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben. In einem weiteren Schritt werden die Daten auf eine bestimmte Fragestellung hin ausgewertet.

### 2.2.5.2 Färbungen

#### *7-AAD-Färbung in Zytotoxizitätsassays*

Bei der Apoptose kommt es zu einem Verlust des asymmetrischen Aufbaus der Zellmembran, die somit ihre Integrität verliert. 7-Aminoactinomycin (7-AAD) dringt in die Zelle ein und interkaliert mit der DNA. 7-AAD ist somit ein Avitalfarbstoff. Jeder Messprobe ( $2 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l) wurden 4  $\mu$ l 7-AAD zugesetzt und das Ganze gut durchmischt. Die Inkubation erfolgte bei RT im Dunkeln für 5 min.

#### *Färbung mit Anti-CD-Fluoreszenz-Antikörpern*

Um eine unspezifische Bindung der Fluoreszenz-AK zu vermeiden, wurde jede Messprobe, bestehend aus  $2 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l, zuvor mit 10  $\mu$ l AB-Serum (1:2 mit PBS verdünnt) für 20 min bei RT präinkubiert. Anschließend erfolgte die eigentliche Färbung mit 10  $\mu$ l der Fluoreszenz-AK (Laborstandard nach Titration). Die Proben wurden gut durchmischt und bei 4°C für 20 min inkubiert. Das Auswaschen von überschüssigen Fluoreszenz-AK erfolgte mit 3 ml PBS und einem Zentrifugationsschritt (1400 rpm, RT, 7 min). Die Probe wurde anschließend mit PBS resuspendiert.

### 2.2.5.3 Messung und Auswertung

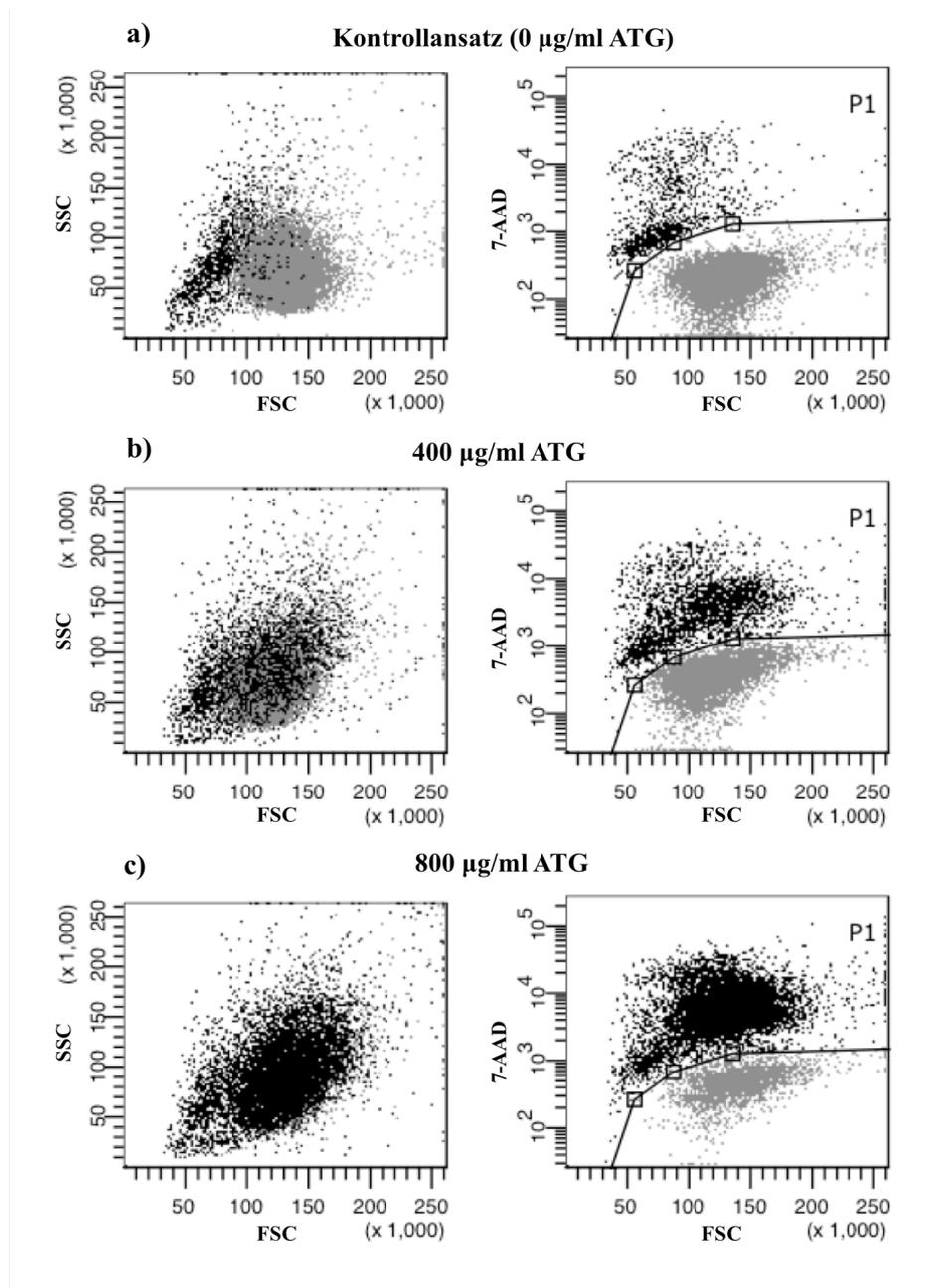
Nach der Färbung der Zellen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Einstellung des Vorwärts-/Seitwärtsscatter erfolgte durch die Messung der Negativ- und Positiv-Kontrollen. Die Zellen wurden so eingestellt, dass die Zelldebris gerade noch zu erkennen waren und die zu betrachtende Zellpopulation gut abzugrenzen war (siehe Abb. 2). Bei der Datenaufnahme wurden 10.000 Zellen pro Ansatz mit einer Aufnahmezeit < 2000 Zellen/Sekunde gemessen. Hierdurch sollte eine unerwünschte simultane Messung mehrerer Zellen vermieden werden.

Die Analyse der Fluoreszenz erfolgte anschließend mit Hilfe von Punktdiagrammen oder Histogrammen. Das Punktdiagramm, das sogenannte Dot Plot, wird auch als Zweiparameterdarstellung bezeichnet. Bei dieser Art der Darstellung werden zwei Parameter miteinander korreliert, zum Beispiel Vorwärts- und Seitwärts-Scatter. Das Histogramm wird auch als Einparameterdarstellung bezeichnet. Hierbei wird ein Parameter gegen die Zellzahl angezeigt.

**Beispiel: Auswertung der Zytotoxizität der Antikörper mittels 7-AAD-Färbung**

Für die Auswertung der Zytotoxizität wurden je Probe zwei Dot Plots gewählt: ein Dot Plot, das das Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) zeigt (in Abb. 2 links) und ein Dot Plot das das Vorwärtsstreulicht (FSC) und die Fluoreszenz des Avitalarbstoff 7-AAD zeigt (in Abb. 2 rechts). Anschließend wurde ein Analysefenster (*gate*) um die 7-AAD positive Zellpopulation gelegt und daraus die relative Zytotoxizität in Bezug auf die Kontrolle (Ansatz ohne Antikörper bzw. Serum) wie folgt berechnet:

$$\frac{[(\text{Probe} - \text{Kontrolle}) / (100 - \text{Kontrolle})] \times 100}{\text{in Bezug auf die Kontrolle}} = \text{relative Zytotoxizität}$$



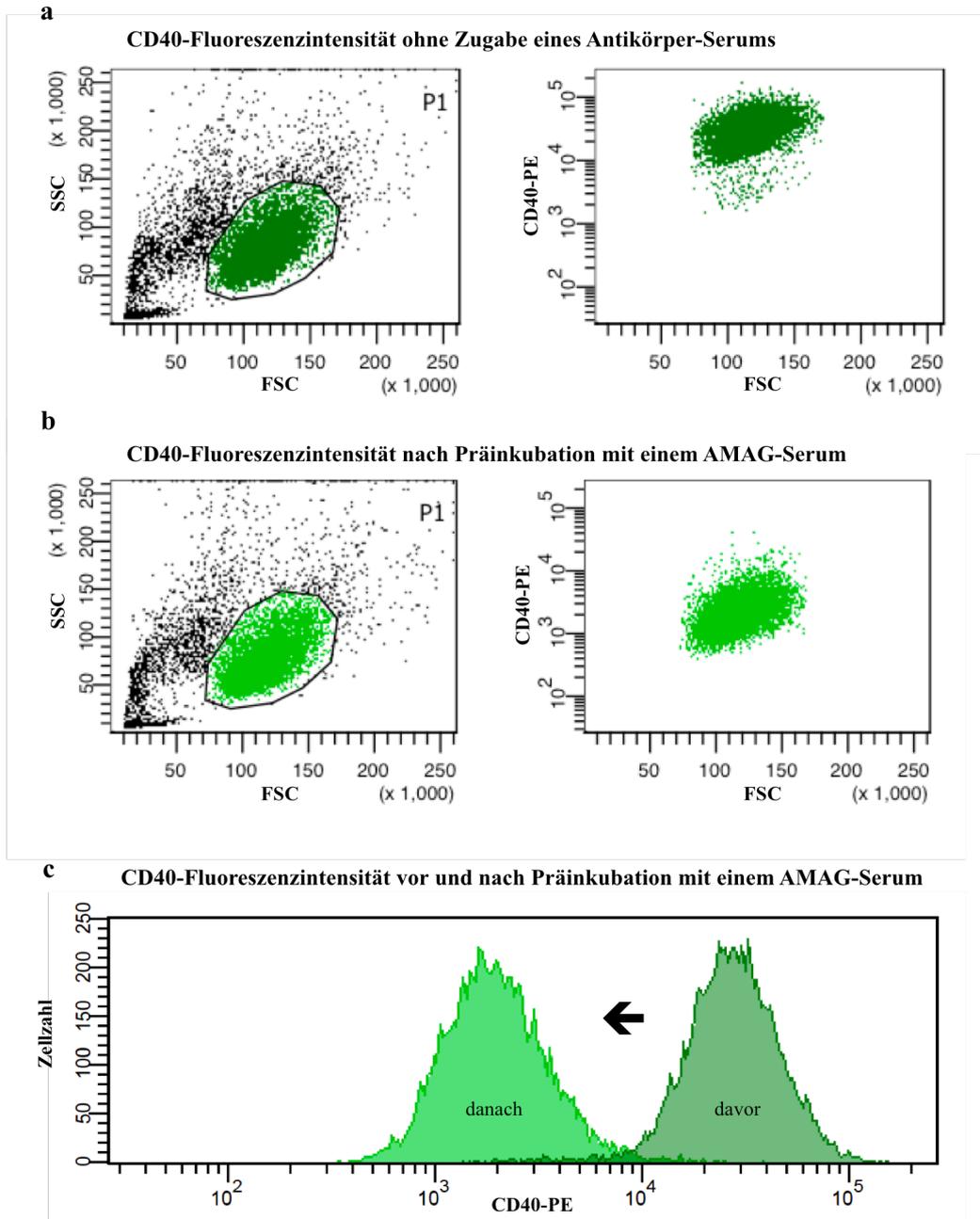
**Abb. 2: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zytotoxizität mittels 7-AAD.** Hier gezeigt anhand der ATG-Wirkung auf Myelomzellen (KMS-12-BM). a) Kontrollansatz: keine Zugabe von ATG b) 400 µg/ml ATG c) 800 µg/ml ATG. Unter steigender ATG-Konzentration ist eine Zunahme der avitalen 7-AAD-positiven Zellen (hier schwarz) und eine Abnahme vitalen 7-AAD-negativen Zellen (hier grau) zu beobachten.

**Beispiel: Auswertung der Fluoreszenz-Abnahme bestimmter Zielantigene unter Zugabe von polyklonalen Antikörpern (Blockierungsversuche)**

Für die Auswertung der Blockierungsversuche wurden je Probe zwei Dot Plots gewählt: ein Dot Plot, das das Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) zeigt (in Abb. 3 links) und ein Dot Plot, das das Vorwärtsstreulicht (FSC) und die mittlere Fluoreszenzintensität des Antigens zeigt (in Abb. 3 rechts). Zu jeder Probe wurde eine Isotyp-Kontrolle des Fluoreszenz-Antikörpers durchgeführt. Um die „vitalen“ Zellen wurde ein Analysefenster gelegt (in Abb. 2 links) und dann die mittlere Fluoreszenzintensität des Antigens bestimmt (in Abb. 3 rechts). Anschließend wurden die Werte aus den Proben mit ihrer Isotyp-Kontrolle verrechnet und auf die Kontrolle (Ansatz ohne Antikörper bzw. Serum) bezogen:

$$\frac{[(\text{Probe} - \text{Isotyp-Kontrolle der Probe}) / (\text{Kontrolle} - \text{Isotyp-Kontrolle der Kontrolle})]}{\times 100} = \text{relative Fluoreszenz des Antigens in Bezug auf die Kontrolle}$$

Im Histogramm wird die Fluoreszenzabnahme durch die Blockierung des Zielantigens deutlich sichtbar.



**Abb. 3: Antigen-Blockierung durch polyklonale Antikörper.** Hier gezeigt anhand der CD40-Blockierung durch ein AMAG-Serum. Hierzu wurde zunächst im FSC/SSC ein Analysefenster um die „vitalen“ Zellen gelegt (siehe Abb. links) und anschließend die mittlere Antigen-Fluoreszenzintensität dieser Population bestimmt (siehe Abb. rechts). Dargestellt ist in a) die Fluoreszenzintensität vor und in b) nach Zugabe eines AMAG-Serums. Im Histogramm c) wird die Abnahme der Fluoreszenzintensität des CD40-Antigens unter der Präinkubation mit einem AMAG-Serum deutlich sichtbar.

### 2.2.6 Statistische Auswertung

Bei Mehrfachmessungen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen mit Microsoft® Excel bestimmt und im Folgenden angegeben.

Um die Signifikanz eines Wirkungsunterschieds zweier Substanzen angeben zu können, wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test, ein sog. nicht-parametrischer Test für nicht-normal verteilte verbundene Stichproben durchgeführt (Wilcoxon 1945). Dazu wurden die Daten der Einzelexperimente verwendet und dabei die Ergebnisse der einzelnen Konzentrationen von Substanz a mit der von Substanz b direkt verglichen. Im Test liegt eine Signifikanz vor, wenn der p-Wert  $\leq 0,05$  ist.

Um die Wirkung einer Kombination zweier Substanzen bezüglich Synergismus und Antagonismus quantitativ zu bestimmen, wurde das Software-Programm CalcuSyn verwendet. Dieses basiert auf der Methode von T.C. Chou und P. Talalay (Chou und Talalay 1983, 1984), indem ein Kombinationsindex (CI) bestimmt wird. Dabei entspricht ein  $CI \approx 1$  einem additiven, ein  $CI < 1$  einem synergistischen und ein  $CI > 1$  einem antagonistischen Effekt (Chou 2006):

Kombinationsindex	Effekt
< 0,1	sehr stark synergistisch
0,1 - 0,3	stark synergistisch
<b>0,3 - 0,7</b>	<b>synergistisch</b>
0,7 - 0,85	mäßig synergistisch
0,85 - 0,9	gering synergistisch
<b>0,9 - 1,1</b>	<b>additiv</b>
1,1 - 1,2	gering antagonistisch
1,2 - 1,45	mäßig antagonistisch
<b>1,45 - 3,3</b>	<b>antagonistisch</b>
3,3 - 10	stark antagonistisch
>10	sehr stark antagonistisch

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Teil I - Die zytotoxische Wirkung der Anti-Myelom-Globuline

Analog zu ATG-Fresenius (ATG) wurden die polyklonalen Anti-Myelom-Globuline AMG-8226 und AMG-12-BM generiert. Zur Immunisierung von Kaninchen wurden dabei die Myelom-Zelllinien RPMI-8226 und KMS-12-BM verwendet.

Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der zytotoxischen Wirkung der AMGs im Vergleich zum ATG. Zunächst erfolgte die Testung auf verschiedenen Myelom-Zelllinien.

#### 3.1.1 Die Zytotoxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf Myelom-Zelllinien

In diesem Versuch wurde die Komplement-unabhängige und die Komplement-abhängige Zytotoxizität des AMG-8226 und des AMG-12-BM im Vergleich zum ATG auf verschiedenen Myelom-Zelllinien untersucht. Dafür wurden zwei Myelom-Zelllinien gewählt, die schon zur Generierung der AMGs verwendet wurden (RPMI-8226 und KMS-12-BM) und eine davon unabhängige, „neutrale“ Myelom-Zelllinie (OPM-2). Als Kontrollantikörper zur Erfassung der unspezifischen Toxizität von Kaninchen-Antikörpern diente das rabbit-Immunglobulin-G (rIgG).

- Im Komplement-unabhängigen Ansatz wurden die Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit den jeweiligen Antikörpern (Dosisbereich 10-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 20-24 h bei 37°C inkubiert.
- Im Komplement-abhängigen Ansatz wurden die Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit den jeweiligen Antikörpern (Dosisbereich 10-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und unter Zugabe von 50% aktivem Serum (Komplement) für 45 min bei 37°C inkubiert.

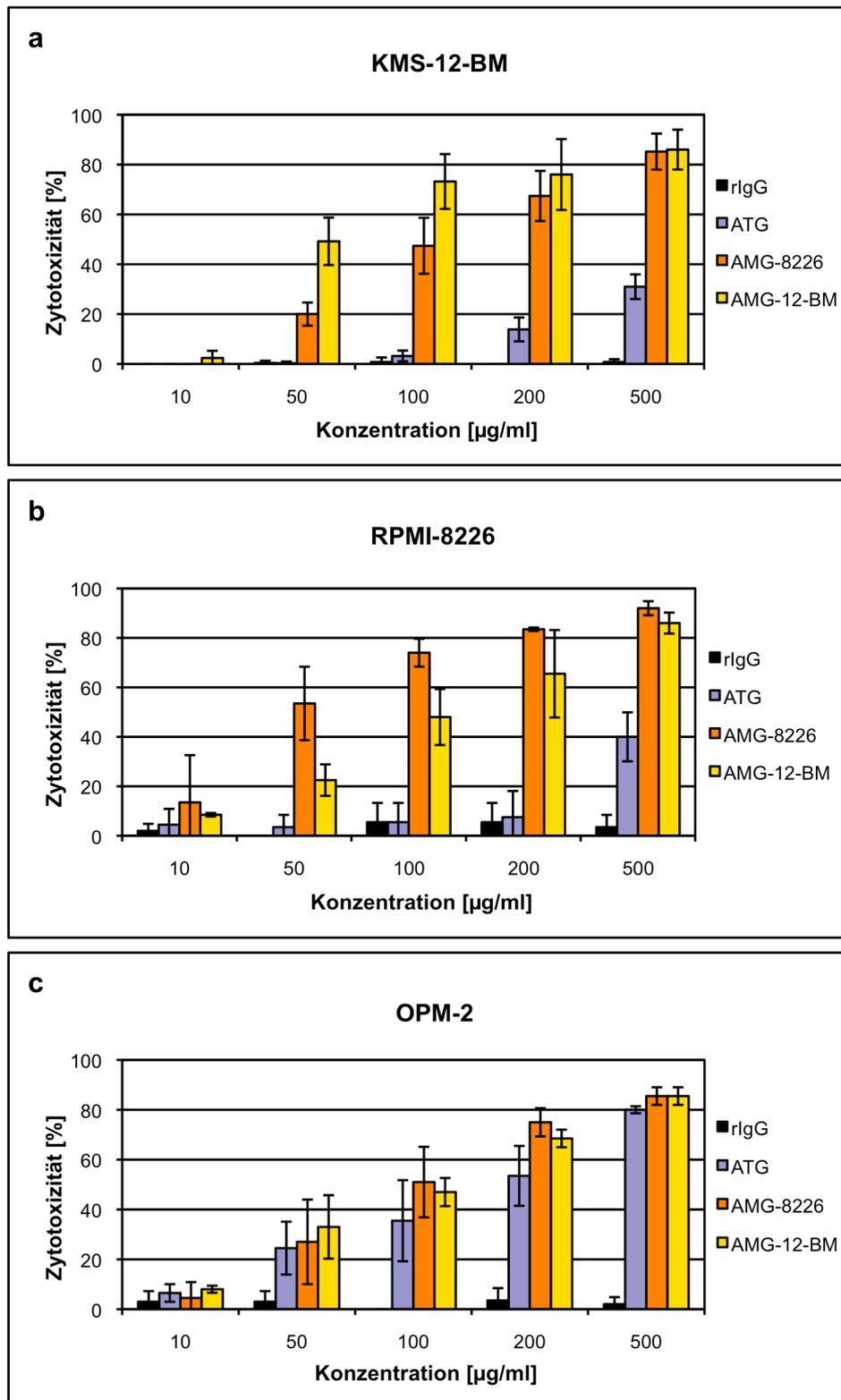
Anschließend wurde die Zytotoxizität mit einer 7-AAD-Färbung am Durchflusszytometer quantifiziert. Berechnet wurde die relative Zytotoxizität in Bezug auf die Negativ-Kontrolle, in der die Zielzellen mit Medium bzw. Medium und Komplement ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert wurden.

#### a) Komplement-unabhängige Zytotoxizität

Die Ergebnisse der Untersuchung der Komplement-unabhängigen Zytotoxizität auf Myelom-Zellen sind in Tabelle 5 zusammengefasst und in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

**Tabelle 5: Komplement-unabhängige Zytotoxizität [%] von rIgG, ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf den Myelom-Zelllinien KMS-12-BM, RPMI-8226 und OPM-2 in Mittelwerten +/- Standardabweichung.**

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration (µg/ml)</b>	<b>KMS-12-BM n = 5</b>	<b>RPMI-8226 n = 2</b>	<b>OPM-2 n = 2</b>
<b>rIgG</b>	10	0 +/- 0	2 +/- 3	3 +/- 4
	50	0 +/- 1	0 +/- 0	3 +/- 4
	100	1 +/- 2	6 +/- 8	0 +/- 0
	200	0 +/- 0	6 +/- 8	4 +/- 5
	500	1 +/- 1	4 +/- 5	2 +/- 3
<b>ATG</b>	10	0 +/- 0	5 +/- 6	7 +/- 4
	50	0 +/- 1	4 +/- 5	25 +/- 11
	100	3 +/- 2	6 +/- 8	36 +/- 16
	200	14 +/- 5	8 +/- 11	54 +/- 12
	500	31 +/- 5	40 +/- 10	80 +/- 1
<b>AMG-8226</b>	10	0 +/- 0	14 +/- 19	5 +/- 6
	50	20 +/- 5	54 +/- 15	27 +/- 17
	100	47 +/- 11	74 +/- 6	51 +/- 14
	200	67 +/- 10	84 +/- 1	75 +/- 6
	500	85 +/- 7	92 +/- 3	86 +/- 4
<b>AMG-12-BM</b>	10	2 +/- 3	9 +/- 1	8 +/- 1
	50	49 +/- 10	23 +/- 6	33 +/- 13
	100	73 +/- 11	48 +/- 11	47 +/- 6
	200	76 +/- 14	66 +/- 18	69 +/- 4
	500	86 +/- 8	86 +/- 4	86 +/- 4



**Abb. 4: Komplement-unabhängige Zytotoxizität [%] von ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf Myelom-Zelllinien. a) KMS-12-BM (n=5) b) RPMI-8226 (n=2) und c) OPM-2 (n=2). Als Kontroll-Antikörper wurde das unspezifische rIgG verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.**

Im Komplement-unabhängigen Ansatz erwiesen sich ATG, AMG-8226 sowie AMG-12-BM, im Gegensatz zur rIgG-Kontrolle, auf allen untersuchten Myelom-Zelllinien als dosisabhängig zytotoxisch wirksam (siehe Abb. 4).

Dabei waren beide AMGs auf der Myelom-Zelllinie **KMS-12-BM** stärker zytotoxisch wirksam als ATG. Bei einer Antikörper-Konzentration von 200 µg/ml erreichte das AMG-12-BM eine Toxizität von 76% und das AMG-8226 eine Toxizität von 67%, im Vergleich zum ATG mit 14% und der IgG-Kontrolle mit 0% (siehe Tab. 5). Die statistische Analyse mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Test zeigte, dass beide AMGs signifikant zytotoxischer waren als ATG ( $p = 0,00003$  bzw.  $p = 0,00009$ ; siehe Tab. 6), wobei das AMG-12-BM dem AMG-8226 in der Toxizität auf KMS-12-BM-Zellen überlegen war ( $p = 0,00009$ ; siehe Tab. 6).

Auch bzgl. der Zytotoxizität auf der Myelom-Zelllinie **RPMI-8226** erwiesen sich beide AMGs als signifikant stärker als ATG ( $p = 0,00769$ ; siehe Tab. 6). Dabei war das AMG-8226 dem AMG-12-BM in der Toxizität auf RPMI-8226-Zellen signifikant überlegen ( $p = 0,01660$ ; siehe Tab. 6). Bei einer Antikörper-Konzentration von 200 µg/ml erreichte das AMG-8226-BM eine Toxizität von 84% und das AMG-12-BM eine Toxizität von 66%, im Vergleich zum ATG mit 8% und die der rIgG-Kontrolle mit 6% (siehe Tab. 5).

Die Testung auf der „neutralen“ Zelllinie **OPM-2** zeigte eine dosisabhängige Wirksamkeit aller drei Antikörper, wobei keine signifikanten Wirkungsunterschiede vorlagen (AMG-12-BM vs. AMG-8226  $p = 0,94418$ ; AMG-12-BM vs. ATG  $p = 0,09720$ ; AMG-8226 vs. ATG  $p = 0,20262$ ; siehe Tab. 6).

**Tabelle 6: Komplement-unabhängige Zytotoxizität auf Myelom-Zellen - Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummen-Tests.** Gepaarte Stichproben einer Substanz a und einer Substanz b sind signifikant different wenn  $p < 0,05$ .

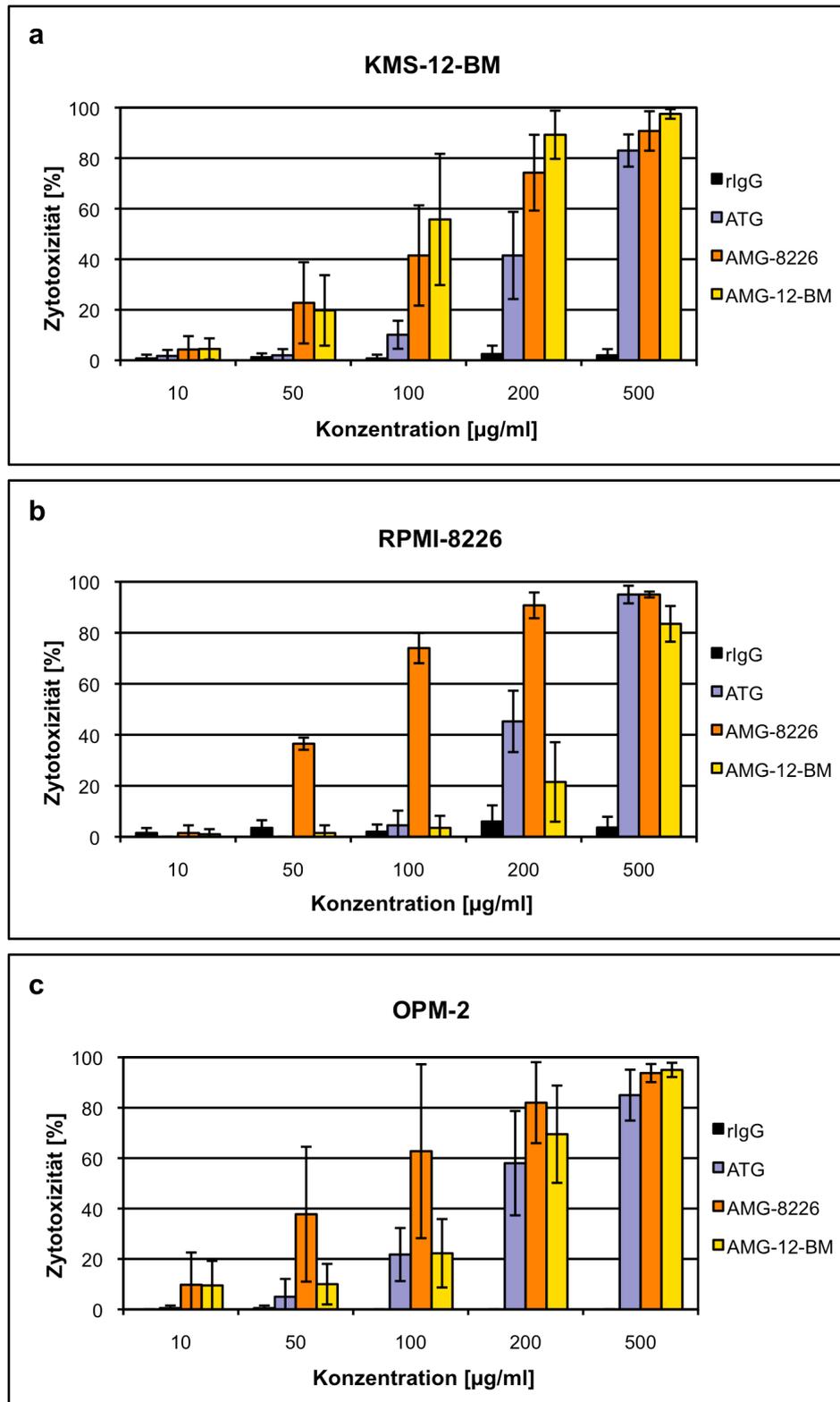
<b>KMS-12-BM</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,00009$	$n = 25$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,00003$	$n = 25$
	AMG-12-BM vs. AMG-8226	$p = 0,00009$	$n = 25$
<b>RPMI-8226</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,00769$	$n = 10$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,00769$	$n = 10$
	AMG-8226 vs. AMG-12-BM	$p = 0,01660$	$n = 10$
<b>OPM-2</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,20262$	$n = 10$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,09720$	$n = 10$
	AMG-8226 vs. AMG-12-BM	$p = 0,94418$	$n = 10$

### b) Komplement-abhängige Zytotoxizität

Die Ergebnisse der Komplement-abhängigen Zytotoxizität auf Myelom-Zellen sind in Tabelle 7 zusammengefasst und in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

**Tabelle 7: Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von rIgG, ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf den Myelom-Zelllinien KMS-12-BM, RPMI-8226 und OPM-2 in Mittelwerten +/- Standardabweichung.**

Antikörper	Konz. (µg/ml)	KMS 12 n = 4	RPMI8226 n = 4	OPM2 n = 4
<b>rIgG</b>	10	1 +/- 2	2 +/- 2	0 +/- 0
	50	1 +/- 2	4 +/- 3	1 +/- 1
	100	1 +/- 2	2 +/- 3	0 +/- 0
	200	3 +/- 3	6 +/- 6	0 +/- 0
	500	2 +/- 2	4 +/- 4	0 +/- 0
<b>ATG</b>	10	2 +/- 2	0 +/- 0	1 +/- 1
	50	2 +/- 2	0 +/- 0	7 +/- 8
	100	10 +/- 6	5 +/- 6	27 +/- 1
	200	42 +/- 17	45 +/- 12	67 +/- 13
	500	83 +/- 6	95 +/- 3	90 +/- 5
<b>AMG-8226</b>	10	4 +/- 5	2 +/- 3	13 +/- 14
	50	23 +/- 16	37 +/- 2	50 +/- 11
	100	42 +/- 20	74 +/- 6	79 +/- 12
	200	74 +/- 15	91 +/- 5	89 +/- 8
	500	91 +/- 8	95 +/- 1	95 +/- 4
<b>AMG-12-BM</b>	10	5 +/- 4	1 +/- 2	13 +/- 9
	50	20 +/- 14	2 +/- 3	13 +/- 6
	100	56 +/- 26	4 +/- 5	29 +/- 2
	200	89 +/- 10	22 +/- 16	79 +/- 7
	500	98 +/- 2	84 +/- 7	96 +/- 3



**Abb. 5: Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf Myelom-Zelllinien.** a) KMS-12-BM b) RPMI-8226 und c) OPM-2. Als Kontroll-Antikörper wurde das unspezifische rIgG verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=4.

Auch im Komplement-abhängigen Ansatz waren ATG, AMG-8226 sowie AMG-12-BM, im Gegensatz zur rIgG-Kontrolle, auf den untersuchten Myelom-Zelllinien dosisabhängig zytotoxisch wirksam (siehe Abb. 5).

Dabei waren erneut beide Anti-Myelom-Globuline in der Zytotoxizität auf der Myelom-Zelllinie **KMS-12-BM** signifikant stärker als ATG ( $p = 0,00029$  bzw.  $p = 0,0002$ ; siehe Tab. 8). Bei einer Antikörper-Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  erreichte das AMG-12-BM bzw. AMG-8226 eine Toxizität von 89% bzw. 74%, im Vergleich zum ATG mit 42% und zur rIgG-Kontrolle mit 3% (siehe Tab. 7). Das AMG-12-BM war dem AMG-8226 in der Komplement-abhängigen Zytotoxizität auf KMS-12-BM-Zellen signifikant überlegen ( $p = 0,01304$ ; siehe Tab. 8).

Auf der Myelom-Zelllinie **RPMI-8226** erreichte das AMG-8226 bei einer Antikörper-Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  eine Toxizität von 91%, im Vergleich zum ATG mit 45% und zum AMG-12-BM mit 22% (siehe Tab. 7). Statistisch erwies sich in der Komplement-abhängigen Zytotoxizität auf RPMI-8226-Zellen das AMG-8226 stärker als ATG ( $p = 0,00089$ ; siehe Tab. 8), und das ATG stärker als AMG-12-BM ( $p = 0,01347$ ; siehe Tab. 8).

Auf der "neutralen" Myelom-Zelllinie **OPM-2** zeigten sich beide AMGs in ihrer zytotoxischen Wirkung signifikant stärker als ATG ( $p = 0,00029$  bzw.  $p = 0,00054$ ; siehe Tab. 8). Bei einer Antikörper-Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  erreichte AMG-8226 bzw. AMG-12-BM eine Toxizität von 89% bzw. 79%, im Vergleich zum ATG mit 67% und zur rIgG-Kontrolle mit 0% (siehe Tab. 7).

**Tabelle 8: Komplement-abhängige Zytotoxizität auf Myelom-Zellen - Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummen-Tests. Gepaarte Stichproben einer Substanz a und einer Substanz b sind signifikant different wenn  $p < 0,05$ .**

<b>KMS-12-BM</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,00029$	$n = 20$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,00020$	$n = 20$
	AMG-12-BM vs. AMG-8226	$p = 0,01304$	$n = 20$
<b>RPMI-8226</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,00089$	$n = 20$
	ATG vs. AMG-8226	$p = 0,01347$	$n = 20$
	AMG-8226 vs. AMG-12-BM	$p = 0,00029$	$n = 20$
<b>OPM-2</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,00029$	$n = 20$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,00054$	$n = 20$
	AMG-8226 vs. AMG-12-BM	$p = 0,00451$	$n = 20$

Zusammenfassend zeigten die Anti-Myelom-Globuline Komplement-unabhängigen sowie Komplement-abhängigen eine höhere Zytotoxizität auf Myelom-Zellen als ATG, wobei in der Komplement-unabhängigen Zytotoxizität auf OPM-2-Zellen zunächst keine signifikant stärkere Wirkung der AMGs im Vergleich zum ATG zu verzeichnen war. Unter Zugabe von Komplement erwiesen sich jedoch beide AMGs auch auf diesen Myelom-Zellen als signifikant stärker.

Die einzige Ausnahme zeigte sich in der Komplement-abhängigen Zytotoxizität auf RPMI-8226-Zellen: hier war das ATG dem AMG-12-BM überlegen.

Des Weiteren erwiesen sich diejenigen Antikörper als stärkste Antikörper auf den Zellen, die mit Hilfe derselben Zellen generiert worden waren: Das AMG-12-BM war der zytotoxisch wirksamste Antikörper auf den KMS-12-BM-Zellen, das AMG-8226 der zytotoxisch wirksamste Antikörper auf den RPMI-8226-Zellen.

*Überleitung:* ATG besitzt einen starken immunmodulatorischen Effekt (siehe Einleitung). Unter anderem kommt es zu einer starken T-Zell-Depletion. Um zu untersuchen, in wie weit die AMGs neben der hier gezeigten Anti-Myelom-Wirkung auch eine zytotoxische Wirkung auf Immunzellen haben, wurde im Folgenden die Komplement-unabhängige sowie die Komplement-abhängige Zytotoxizität auf primären T-Zellen getestet. Exemplarisch für die Anti-Myelom-Globuline wurde das AMG-8226 eingesetzt.

### 3.1.2 Die Zytotoxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf primären T-Zellen

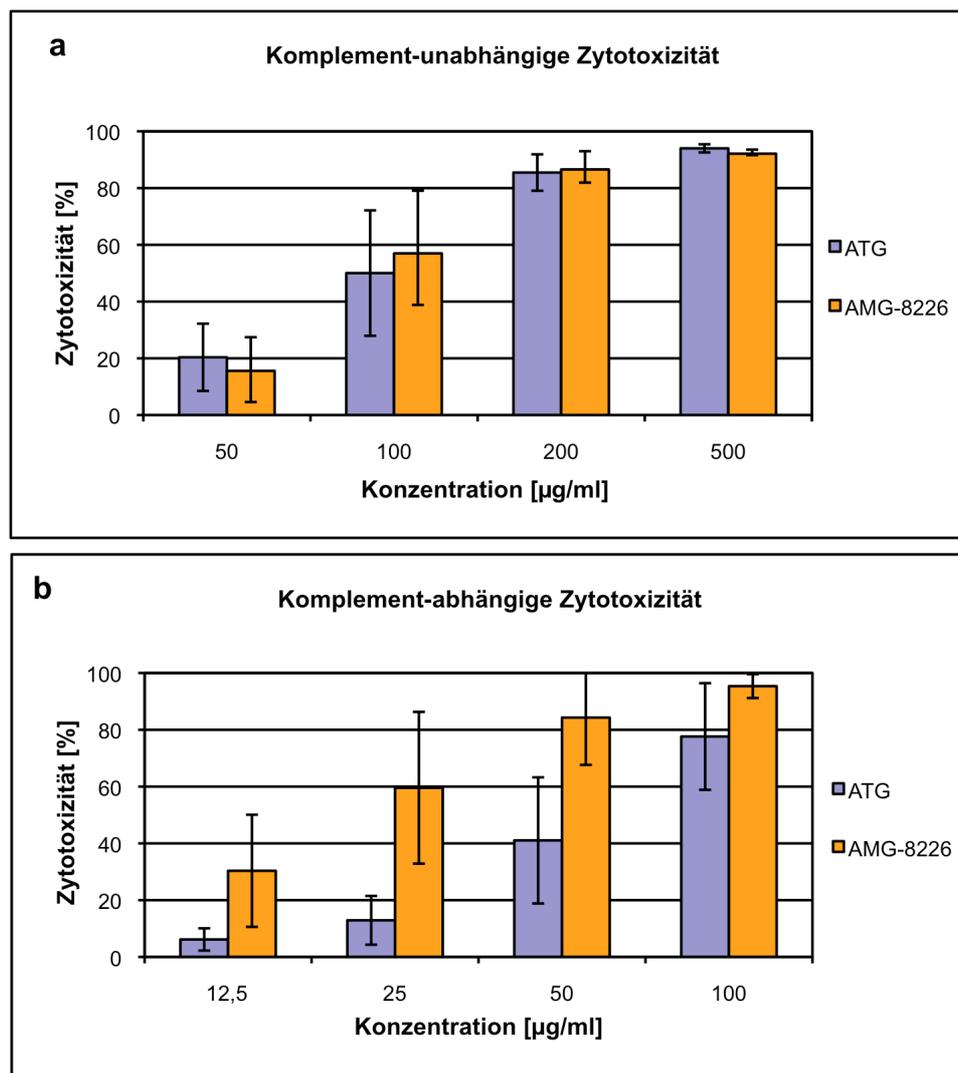
Die primären T-Zellen wurden aus *Buffy Coats* verschiedener Spender mittels RosetteSep-Enrichment und Biocoll-Dichte-Zentrifugation gewonnen. Mittels einer T-Zell-Färbung mit einem Anti-CD3-Antikörper wurde in der Durchflusszytometrie die T-Zell-Anzahl bestimmt (> 96% CD3<sup>+</sup>-Zellen).

- Im Komplement-unabhängigen Ansatz wurden die T-Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit dem jeweiligen Antikörper (Dosisbereich 50-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 20-24 h bei 37°C inkubiert.
- Im Komplement-abhängigen Ansatz wurden die T-Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) mit dem jeweiligen Antikörper (Dosisbereich 12,5-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und unter Zugabe von 50% aktivem Serum (Komplement) für 45 min bei 37°C inkubiert.

Die Quantifizierung der Zytotoxizität erfolgte in beiden Ansätzen mit einer 7-AAD-Färbung am Durchflusszytometer. Berechnet wurde die relative Zytotoxizität in Bezug auf die Negativkontrolle, in der Myelom-Zellen mit Medium bzw. mit Medium und aktivem Serum (Komplement) und ohne Zugabe von Antikörper inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst und in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

**Tabelle 9: Zytotoxizität [%] von ATG und AMG-8226 auf primäre T-Zellen.** Dargestellt sind die in Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = 10.

Antikörper	Konz. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ohne Komplement n = 10	Konz. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	mit Komplement n = 10
<b>ATG</b>	50	20 +/- 12	12,5	6 +/- 4
	100	50 +/- 22	25	13 +/- 9
	200	85 +/- 6	50	41 +/- 22
	500	94 +/- 1	100	78 +/- 19
<b>AMG-8226</b>	50	16 +/- 11	12,5	30 +/- 20
	100	57 +/- 18	25	60 +/- 27
	200	87 +/- 5	50	84 +/- 17
	500	92 +/- 1	100	95 +/- 4



**Abb. 6: Zytotoxizität von ATG und AMG-8226 auf primäre T-Zellen.** a) Komplement-unabhängig b) Komplement-abhängig. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=10.

Beide Antikörper waren im Komplement-unabhängigen sowie im Komplement-abhängigen Ansatz auf primäre T-Zellen dosisabhängig zytotoxisch wirksam (siehe Abb. 6).

Im **Komplement-unabhängigen Ansatz** zeigte kein signifikanter Wirkungsunterschied zwischen AMG-8226 und ATG ( $p = 0,37026$ ; siehe Tab. 10). Bei einer Konzentration von 200 µg/ml beträgt die Zytotoxizität von ATG 85% und von AMG-8226 87% (siehe Tab. 9).

Im **Komplement-abhängigen Ansatz** hingegen erwies sich das AMG-8226 als signifikant stärker als ATG ( $p = 0,00009$ ; siehe Tab. 10). Bei einer Konzentration von 50 µg/ml lag die Toxizität des AMG-8226 bei 84% im Vergleich zu ATG mit 41%. Dabei genügte etwa die Hälfte der AMG-8226-Konzentration aus, um eine stärkere Wirkung als ATG zu erreichen. Mit 50

$\mu\text{g/ml}$  ATG betrug die Toxizität 41%, wohingegen schon mit 25  $\mu\text{g/ml}$  AMG-8226 eine Toxizität von 60% erreicht wurde (siehe Tab. 9). Dieser Wirkungsunterschied war signifikant ( $p = 0,04311$ ; siehe Tab. 10).

Auffällig zudem war, dass im Komplement-abhängigen Ansatz viel niedrigere Antikörper-Konzentrationen als im Komplement-unabhängigen Ansatz benötigt wurden, um eine ähnliche Wirkung zu erzielen. So wurde zum Beispiel eine Toxizität von über 80% im Komplement-unabhängigen Ansatz mit 200  $\mu\text{g/ml}$  AMG-8226 und im Komplement-abhängigen Ansatz bereits mit 50  $\mu\text{g/ml}$  AMG-8226 erzielt.

**Tabelle 10: Zytotoxizität auf primäre T-Zellen - Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummen-Tests.** Gepaarte Stichproben einer Substanz a und einer Substanz b sind signifikant different wenn  $p < 0,05$ .

<b>primäre T-Zellen</b>	ohne Komplement	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,37026$	$n = 20$
	mit Komplement	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,00009$	$n = 20$
		25 $\mu\text{g/ml}$ AMG-8226 vs. 50 $\mu\text{g/ml}$ ATG	$p = 0,04311$	$n = 5$

Zusammenfassend zeigte das Anti-Myelom-Globulin, neben seiner Anti-Myelom-Wirkung, vor allem Komplement-abhängig eine starke zytotoxische Wirkung auf primäre T-Zellen.

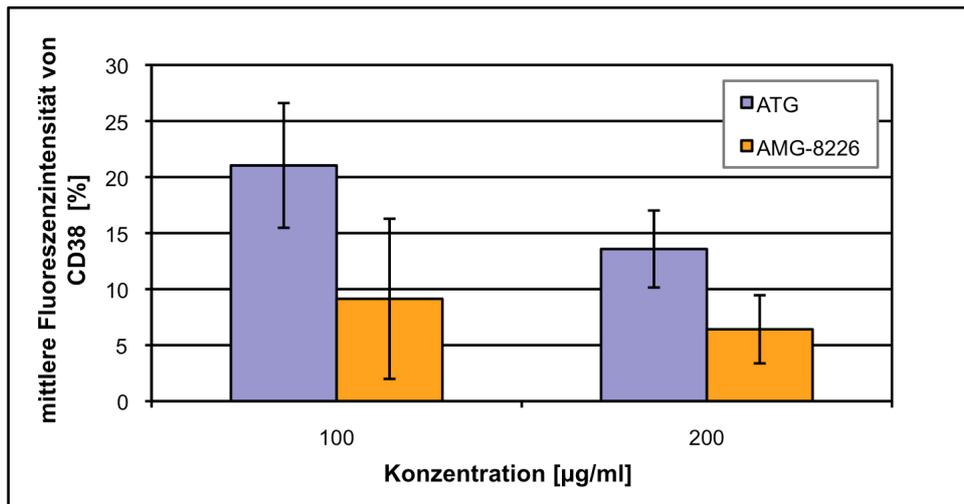
*Überleitung:* Als nächstes wurde ein Blockierungsversuch des CD38-Antigens durchgeführt, um zu untersuchen, ob die beobachtete Wirkung der AMGs im Vergleich zum ATG mit einem höheren Gehalt an spezifischen Antikörpern einhergeht.

### 3.1.3 Die Blockierung des Oberflächen-Antigens CD38 durch AMG und ATG

Für den Blockierungsversuch wurden CD38<sup>+</sup>-Zellen der Myelom-Zelllinie KMS-12-BM ( $1 \times 10^5$  Zellen/100 $\mu\text{l}$ ) zunächst mit AB-Serum für 30 min bei RT inkubiert (Blockade unspezifischer Bindungen) und anschließend mit den Antikörpern ATG bzw. AMG-8226 für 20 min bei 4°C inkubiert. Die noch freien CD38-Antigene wurden mit monoklonalem Anti-CD38-Fluoreszenz-Antikörper gefärbt und anschließend in der Durchflusszytometrie die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Dargestellt ist in den folgenden Abbildungen (Abb. 7 und 8) die relative mittlere Fluoreszenzintensität in Bezug auf die Negativ-Kontrolle, in der die Zellen mit AB-Serum ohne Zugabe von Antikörper inkubiert wurden.

**Tabelle 11: Blockierung des Oberflächen-Antigens CD38 auf CD38-positiven Zellen durch ATG und AMG-8226.** Dargestellt ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität in Mittelwerten +/- Standardabweichung, n = 2.

ATG	mittlere Fluoreszenzintensität [%]	AMG-8226	mittlere Fluoreszenzintensität [%]
100 µg/ml	21 +/- 6	100 µg/ml	9 +/- 3
200 µg/ml	14 +/- 3	200 µg/ml	6 +/- 2



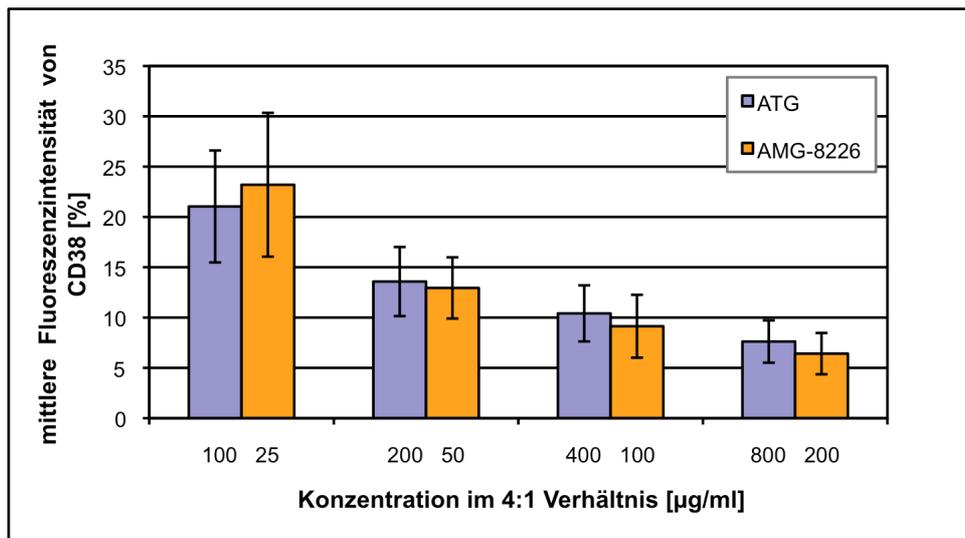
**Abb. 7: Blockierung des Oberflächen-Antigens CD38 durch ATG und AMG-8226.** Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität [%] in Mittelwerten und Standardabweichung, n=2.

Wurden CD38<sup>+</sup>-Zellen mit ATG oder AMG-8226 präinkubiert, nahm mit steigender Konzentration der Antikörper die mittlere Fluoreszenzintensität der anschließenden CD38-Färbung ab (siehe Abb. 7). Das heißt, je höher die Antikörper-Konzentration in der Präinkubation war, desto mehr wurde das CD38-Antigen vorab gebunden und die Fluoreszenzintensität der anschließenden Färbung nahm ab.

Bei beiden Antikörpern sank die mittlere Fluoreszenzintensität beträchtlich, jedoch unter AMG-8226 stärker als unter ATG. Bei einer Antikörper-Konzentration von 100 µg/ml fiel die mittlere Fluoreszenzintensität unter AMG-8226 auf 9% der Ausgangsfluoreszenz, im Vergleich zu unter ATG mit 21% (siehe Tab. 11). Um den gleichen Effekt zu erzielen wie ATG, genügte etwa ein Viertel der AMG-8226-Dosis. Dafür wurde die ATG-Konzentration im 4 zu 1 Verhältnis zur AMG-8226-Konzentration getestet und in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

**Tabelle 12: Blockierung des Oberflächen-Antigens CD38 auf CD38-positiven-Myelomzelllinie KMS-12-BM durch ATG und AMG-8226.** Dargestellt ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität in Mittelwerten +/- Standardabweichung, n = 2.

ATG	mittlere Fluoreszenzintensität [%]	AMG-8226	mittlere Fluoreszenzintensität [%]
100 µg/ml	21 +/- 6	25 µg/ml	23 +/- 7
200 µg/ml	14 +/- 3	50 µg/ml	13 +/- 3
400 µg/ml	10 +/- 3	100 µg/ml	9 +/- 3
800 µg/ml	8 +/- 2	200 µg/ml	6 +/- 2



**Abb. 8: Blockierung des Oberflächen-Antigens CD38 durch ATG und AMG-8226.** Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz [%] in Mittelwerten und Standardabweichung, n=2.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Anti-Myelom-Globulin das CD38-Antigen etwa viermal stärker bindet als das Anti-Thymo-Globulin (siehe Tab. 12 und Abb. 8). Die oben gezeigte stärkere Zytotoxizität des AMG geht somit mit einer höheren Bindungskapazität des CD38-Antigens einher.

*Überleitung:* Um eine unspezifisch höhere Zytotoxizität auszuschließen, wurden im Folgenden die Anti-Myelom-Globuline im Vergleich zum Anti-Thymozyten-Globulin auf humanen, nicht-hämatopoetischen Zellen getestet.

### 3.1.4 Die Zytotoxizität der AMGs im Vergleich zum ATG auf humanen nicht-hämatopoetischen Zellen

Die Testung der Antikörper auf nicht-hämatopoetische Zellen erfolgte an drei unterschiedlichen Zelllinien, den HaCat-Zellen (Keratinocyten), den Panc-1-Zellen (Pankreas-Karzinom-Zellen) und den MiaPaCa-Zellen (Pankreas-Karzinom-Zellen). Für den Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$ /ml mit den Antikörpern im Dosisbereich von 50-800  $\mu\text{g/ml}$  und 50% aktiven Serum (Komplement) für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zytotoxizität mit einer 7-AAD-Färbung am Durchflusszytometer quantifiziert. Berechnet wurde die relative Zytotoxizität in Bezug auf die Negativ-Kontrolle, in der Myelom-Zellen mit Medium und aktivem Serum (Komplement) ohne Zugabe von Antikörper inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst und in den Abbildungen 9 und 10 graphisch dargestellt.

**Tabelle 13: Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf nicht-hämatopoetische Zelllinien HaCat, Panc1 und MiaPaCa2 in Mittelwerten +/- Standardabweichung, n = 2.**

Antikörper	Konz. ( $\mu\text{g/ml}$ )	HaCat n = 2	Panc1 n = 2	MiaPaCa2 n = 2
<b>ATG</b>	50	19 +/- 1	4 +/- 2	0 +/- 0
	100	47 +/- 2	37 +/- 7	12 +/- 0
	200	72 +/- 1	64 +/- 3	15 +/- 1
	400		92 +/- 1	17 +/- 1
	800		94 +/- 1	23 +/- 1
<b>AMG-8226</b>	50	23 +/- 3	3 +/- 1	0 +/- 0
	100	35 +/- 2	2 +/- 0	2 +/- 1
	200	67 +/- 3	10 +/- 4	4 +/- 2
	400		53 +/- 2	12 +/- 0
	800		89 +/- 0	19 +/- 0
<b>AMG-12-BM</b>	50	25 +/- 5	4 +/- 1	16 +/- 4
	100	50 +/- 9	8 +/- 1	15 +/- 1
	200	84 +/- 3	40 +/- 7	15 +/- 1
	400		92 +/- 0	19 +/- 1
	800		93 +/- 0	19 +/- 1

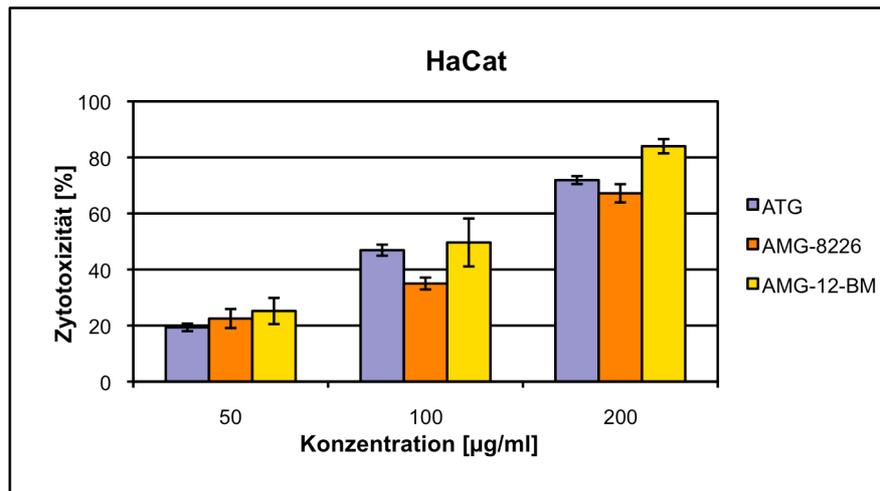


Abb. 9: Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf die Keratinozyten-Zelllinie HaCat. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=2.

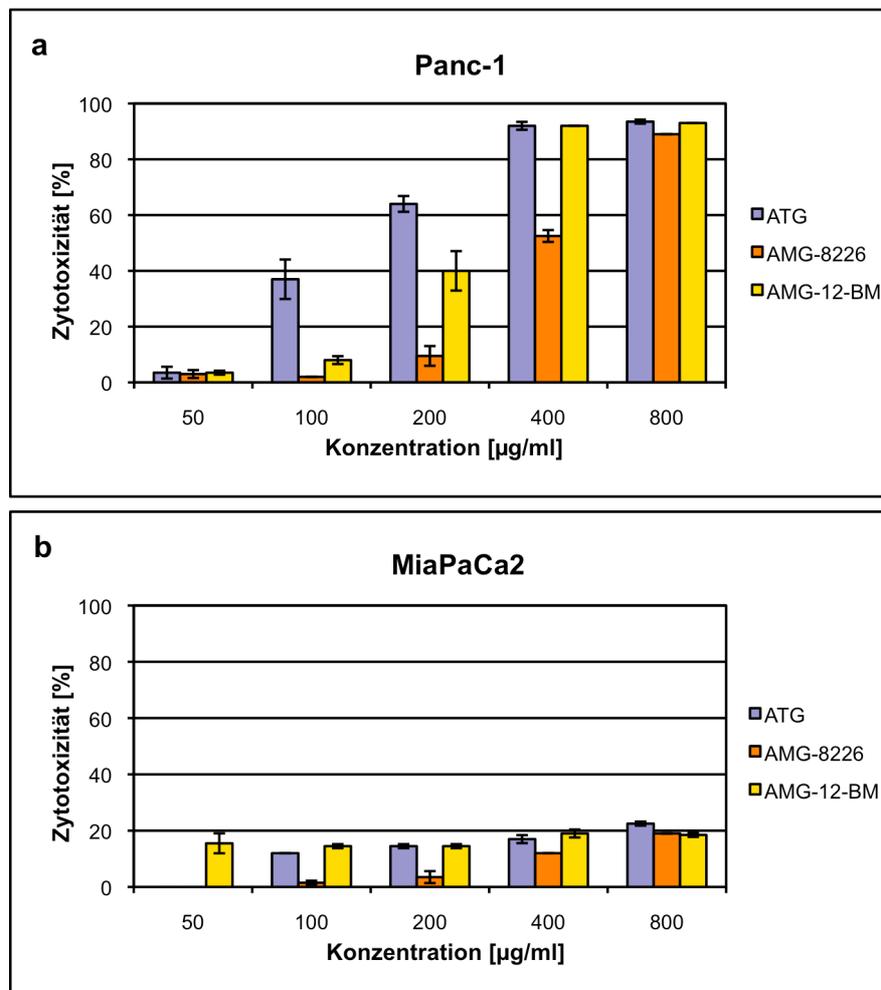


Abb. 10: Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM auf Pankreas-Karzinom-Zelllinien a) Panc-1 und b) MiaPaCa. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=2.

Auf der Keratinozyten-Zelllinie **HaCat** zeigte sich eine dosisabhängige zytotoxische Wirksamkeit aller drei Antikörper (siehe Abb. 9). Doch weder AMG-8226 noch AMG-12-BM erwiesen sich als signifikant stärker als ATG ( $p = 0,24886$  bzw.  $p = 0,07474$ ; siehe Tab. 14).

Auf der Pankreas-Karzinom-Zelllinie **Panc-1** waren ebenfalls alle drei Antikörper dosisabhängig zytotoxisch wirksam (siehe Abb. 10). Doch auch hier war weder AMG-8226 noch AMG-12-BM dem ATG überlegen. Das ATG war sogar signifikant stärker als AMG-8226 ( $p = 0,00691$ ; siehe Tab. 14).

Auf der Pankreas-Karzinom-Zelllinie **MiaPaCa** zeigte sich nur eine geringe dosisabhängige zytotoxische Wirksamkeit (siehe Abb. 10). Die maximale Toxizität betrug selbst unter der höchsten Antikörper-Konzentration (800  $\mu\text{g/ml}$ ) von ATG nur 23% und von AMG-8226 sowie AMG-12-BM nur 19%. Auch hier erwies sich weder AMG-8226 noch AMG-12-BM als signifikant stärker als ATG. Wie schon auf der Pankreas-Karzinom-Zelllinie Panc-1 war das ATG sogar dem AMG-8226 signifikant überlegen ( $p = 0,01172$ ; siehe Tab. 14).

Beide Anti-Myelom-Globuline zeigten sich somit auf den untersuchten nicht-hämatopoetischen, epithelialen Zellen nicht signifikant stärker als ATG und somit nicht unspezifisch zytotoxischer als ATG.

**Tabelle 14: Zytotoxizität auf nicht-hämatopoetischen Zellen - Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummen-Tests.** Gepaarte Stichproben einer Substanz a und einer Substanz b sind signifikant different wenn  $p < 0,05$ .

<b>HaCat</b>	AMG-8226 vs. ATG	$p = 0,24886$	$n = 6$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,07474$	$n = 6$
	AMG-12-BM vs. AMG-8226	$p = 0,04640$	$n = 6$
<b>Panc-1</b>	ATG vs. AMG-8226	$p = 0,00691$	$n = 10$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,05802$	$n = 10$
	AMG-12-BM vs. AMG-8226	$p = 0,00769$	$n = 10$
<b>MiaPaCa2</b>	ATG vs. AMG-8226	$p = 0,01172$	$n = 10$
	AMG-12-BM vs. ATG	$p = 0,31049$	$n = 10$
	AMG-12-BM vs. AMG-8226	$p = 0,01729$	$n = 10$

### 3.2 Teil II - Wirkmechanismen

Die folgenden Untersuchungen bzw. Auswertungen beschäftigen sich mit den verschiedenen Mechanismen die zur Antikörper-vermittelten Zytotoxizität führen. Einige wurden bereits beim Anti-Thymo-Globulin beschrieben. Analog dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Anti-Myelom-Globuline im Vergleich zum Anti-Thymo-Globulin bzgl. ihrer

- Komplement-vermittelten Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity, CDC) und ihrer
- Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)

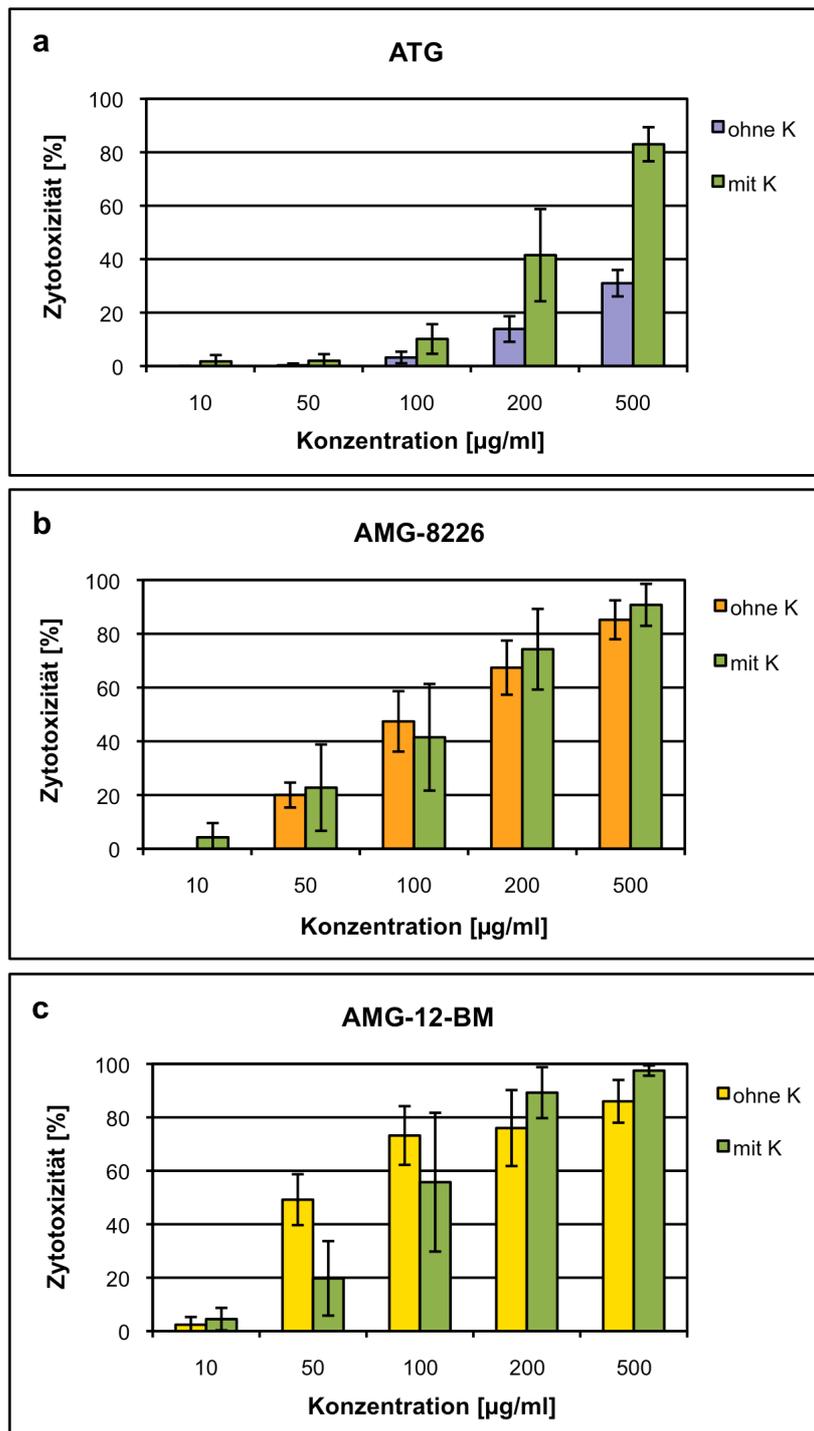
untersucht. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung möglicher Kombinationseffekte der polyklonalen Antikörper mit bereits etablierten Substanzen aus der Myelom-Therapie.

#### 3.2.1 Komplement-vermittelte Zytotoxizität

In den Versuchen zur Wirkung der polyklonalen Antikörper auf Myelom-Zellen wurden je ein Komplement-unabhängiger (24 h Inkubation) und ein Komplement-abhängiger Ansatz (45 min Inkubation, 50% Komplement) durchgeführt. In der folgenden Abbildung (Abb. 11) wird exemplarisch anhand der Zytotoxizität auf die Myelom-Zelllinien KMS-12-BM, die Komplement-abhängige Wirkung im Vergleich zur Komplement-unabhängigen Wirkung der polyklonalen Antikörper veranschaulicht. In Tabelle 15 sind alle Werte in Mittelwerten mit Standardabweichung zusammengetragen worden.

**Tabelle 15: Komplement-unabhängige und -abhängige Zytotoxizität [%] von ATG, AMG-8226 und AMG-12-BM.** Getestet wurde auf die Myelom-Zelllinie KMS-12-BM. Dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. K = Komplement.

Konzentration (µg/ml)	ATG		AMG-8226		AMG-12-BM	
	ohne K n=5	mit K n=4	ohne K n=5	mit K n=4	ohne K n=5	mit K n=4
10	0 +/- 0	2 +/- 2	0 +/- 0	4 +/- 5	2 +/- 3	5 +/- 4
50	0 +/- 1	2 +/- 2	20 +/- 5	23 +/- 16	49 +/- 10	20 +/- 14
100	3 +/- 2	20 +/- 6	47 +/- 11	42 +/- 20	73 +/- 11	56 +/- 26
200	14 +/- 5	42 +/- 17	67 +/- 10	74 +/- 15	76 +/- 14	89 +/- 10
500	31 +/- 5	83 +/- 6	85 +/- 7	91 +/- 8	86 +/- 8	98 +/- 2



**Abb. 11: Komplement-unabhängige und Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von a) ATG b) AMG-8226 und c) AMG-12-BM auf KMS-12-BM-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. K = Komplement.

Die getesteten Antikörper zeigten sich alle, Komplement-unabhängig sowie Komplement-abhängig, auf der Myelom-Zelllinie KMS-12-BM als dosisabhängig zytotoxisch wirksam (siehe Tab. 15 und Abb. 11).

Unter Zugabe von Komplement war bei allen Antikörpern eine Zunahme der Toxizität zu verzeichnen. Bei ATG stieg die Zytotoxizität bei einer Konzentration von 200 µg/ml von 14% (ohne Komplement) auf 42% (mit Komplement) und bei einer Konzentration von 500 µg/ml von 31% (ohne Komplement) auf 83% (mit Komplement). Die Komplement-abhängige Zytotoxizität des ATG war signifikant stärker als die Komplement-unabhängige ( $p = 0,04311$ ; siehe Tab. 16).

Bei den AMGs war bereits die Komplement-unabhängige Zytotoxizität relativ hoch, sodass die Komplement-vermittelte Zytotoxizität vergleichsweise geringer ausfiel. Bei einer Antikörper-Konzentration von 200 µg/ml stieg die AMG-8226-Toxizität von 67% auf 74% und die AMG-12-BM-Toxizität von 76% auf 89%.

**Tabelle 16: Komplement-unabhängige vs. Komplement-abhängige Zytotoxizität - Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummen-Tests. K = Komplement.**

<b>KMS-12-BM</b>	ATG	ohne vs. mit K	$p = 0,04311$
	AMG-8226	ohne vs. mit K	$p = 0,22492$
	AMG-12-BM	ohne vs. mit K	$p = 0,68583$

### 3.2.2 Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität

Um zu untersuchen, ob eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) durch ATG und AMG vermittelt wird, wurde ein Chromium-Release-Assay mit NK-Zellen durchgeführt.

Die dafür benötigten NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* verschiedener Spender mittels RosetteSep-Enrichment und Biocoll-Dichte-Zentrifugation gewonnen (siehe Material und Methoden). Mittels einer NK-Zell-Färbung mit einem Anti-CD56-Antikörper und der Durchflusszytometrie wurde die NK-Zell-Dichte bestimmt (80-90% CD56<sup>+</sup>-Zellen). Die Myelom-Zellen (RPMI-8226-Zelllinie) wurden mit radioaktiven Chrom-51 (<sup>51</sup>Cr) inkubiert und anschließend gewaschen.

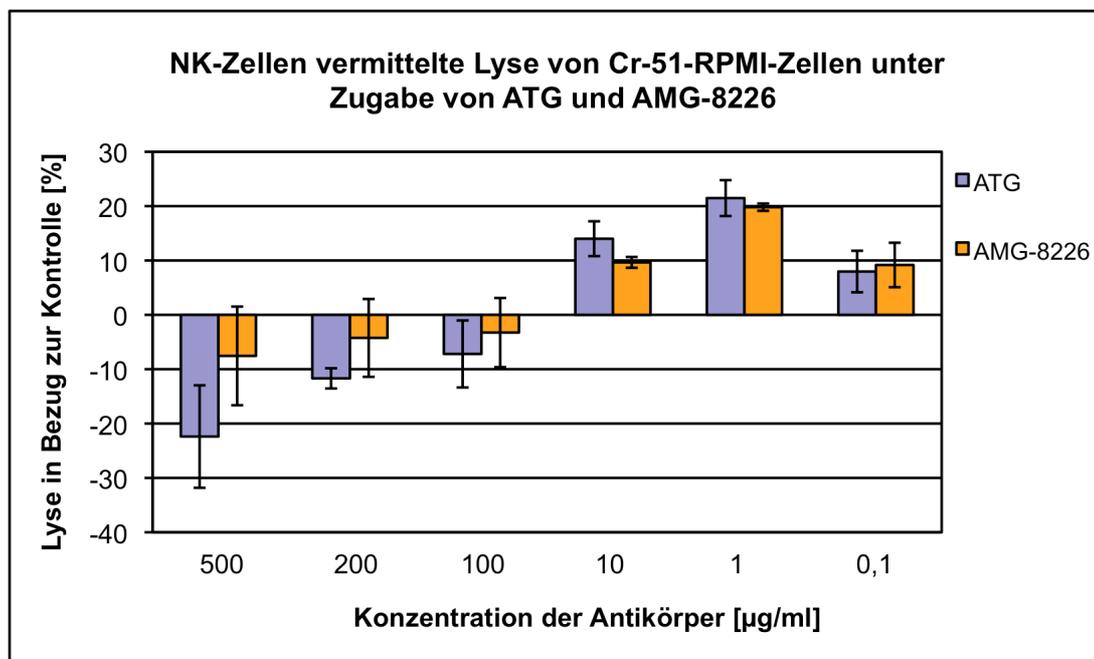
Die Zugabe der Antikörper und der NK-Zellen zu den radioaktiv-markierten Zielzellen erfolgte unmittelbar nacheinander. Das Verhältnis von Effektor-Zelle (NK-Zellen) zu Target-Zelle (<sup>51</sup>Cr-RPMI-Zellen) lag bei 5 zu 1. Der Dosisbereich für die Antikörper lag bei 0,1 µg/ml bis 500 µg/ml.

Nach 4h Inkubation wurde die Radioaktivität im Überstand als Maß für Zellyse durch einen  $\gamma$ -counter bestimmt. Die gemessenen CPM (*counts per minute*) wurden in Bezug auf die minimal Freisetzung (<sup>51</sup>Cr-RPMI-Zellen mit Medium) und auf die Maximal-Freisetzung (<sup>51</sup>Cr-RPMI-

Zellen mit Triton-X-100) als Maß für die relative Lyse der  $^{51}\text{Cr}$ -RPMI-Zellen gesetzt. Für den Ausgangswert wurde ein Kontroll-Ansatz durchgeführt, in dem die Zielzellen nur mit NK-Zellen und Medium ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert wurden. Alle angegebenen Werte sind mit diesem Ausgangswert verrechnet worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst und in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

**Tabelle 17: NK-Zell-vermittelte Lyse [%]** in Mittelwerten +/- Standardabweichung, n = 3. Angegeben ist das Lyseverhalten in Bezug zum Ausgangswert (NK-Zell-vermittelte Lyse ohne Zugabe von Antikörpern).

	500 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml
ATG	-22 +/- 9	-12 +/- 2	-7 +/- 6	14 +/- 3	21 +/- 3	8 +/- 4
AMG-8226	-8 +/- 9	-4 +/- 7	-3 +/- 6	10 +/- 1	20 +/- 1	9 +/- 4



**Abb. 12: Chromium-Release-Assay - NK-Zell-vermittelte Lyse von  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Myelom-Zellen (RPMI-8226) unter Zugabe von ATG und AMG-8226.** Dargestellt ist die relative Zytotoxizität in Mittelwerten und Standardabweichung in Bezug zum Ausgangswert (NK-Zell vermittelte Lyse ohne Zugabe von Antikörpern), n=3.

Als Ausgangswert (Kontrolle) wurde die NK-Zell-vermittelte Lyse ohne Zugabe von Antikörpern bestimmt.

Unter Zugabe von ATG bzw. AMG-8226 in niedriger Dosierung (0,1-1-10 µg/ml) stieg die NK-Zell-vermittelte Lyse signifikant über den Ausgangswert ( $p = 0,00009$  bzw.  $p = 0,00008$ ; siehe Tab. 18). Das Maximum wurde bei 1 µg/ml ATG bzw. AMG-8226, mit einer Lyse-Zunahme von

21% bzw. 20%, erreicht, wobei kein signifikanter Wirkungsunterschied zwischen ATG und AMG-8226 vorlag ( $p = 0,2804$ ; siehe Tab. 18).

Unter Zugabe von ATG bzw. AMG-8226 in hoher Dosierung (100-200-500  $\mu\text{g/ml}$ ) sank die NK-Zell-vermittelte Lyse dosisabhängig unter den Ausgangswert ( $p = 0,00004$  bzw.  $p = 0,00047$ ; siehe Tab. 18). Unter steigender ATG-Konzentration war eine Abnahme der Lyse zu verzeichnen: - 7% bei 100  $\mu\text{g/ml}$ , - 12% bei 200  $\mu\text{g/ml}$  und - 22% bei 500  $\mu\text{g/ml}$ . Unter Zugabe von AMG-8226 fiel die Lyse bei einer Antikörperkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  um 3%, bei 200  $\mu\text{g/ml}$  um 4% und bei 500  $\mu\text{g/ml}$  um 8% (siehe Tab. 17). Die Lyse nahm unter ATG signifikant stärker ab als unter AMG-8226 ( $p = 0,00009$ ; siehe Tab. 18).

**Tabelle 18: NK-Zell-vermittelte Lyse - Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummen-Tests.** Gepaarte Stichproben einer Substanz a und einer Substanz b sind signifikant different wenn  $p < 0,05$ .

<b>hohe Konz. (500-200-100 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	ATG vs. Ktr	$p = 0,00004$	$n=23$
	AMG-8226 vs. Ktr	$p = 0,00047$	$n=23$
	ATG vs. AMG-8226	$p = 0,00009$	$n=23$
<b>niedrige Konz. (10-1-0,1<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	ATG vs. Ktr	$p = 0,00009$	$n=23$
	AMG-8226 vs. Ktr	$p = 0,00008$	$n=23$
	ATG vs. AMG-8226	$p = 0,28040$	$n=23$

### 3.2.3 Kombinationseffekte der polyklonalen Antikörper mit Substanzen aus der Myelom-Therapie

Im Weiteren sollten die Kombinationseffekte der AMGs und des ATG mit bereits etablierten Substanzen aus der Myelom-Therapie untersucht werden: Melphalan und Bortezomib (Velcade®). Die Testung der Zytotoxizität erfolgte exemplarisch auf der Myelom-Zelllinie KMS-12-BM.

Die Konzentrationsreihen wurden so gewählt, dass die höchste Konzentration der einzelnen Substanzen eine Zyotoxizität von ca. 50% induzierte, um mögliche Kombinationseffekte auch in den höheren Konzentrationen beobachten zu können. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: ATG 375-750-1500  $\mu\text{g/ml}$ , AMG-8226 100-200-400  $\mu\text{g/ml}$ , Melphalan 10-20-40  $\mu\text{M}$  und Bortezomib 5-10-20  $\text{ng/ml}$ .

Die Zielzellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit diesen Substanzen einzeln und in Kombination mit AMG bzw. ATG für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der Zytotoxizität mit einer 7-AAD-Färbung am Durchflusszytometer. Berechnet wurde die relative Zytotoxizität in Bezug auf die Negativ-Kontrolle, in der Myelom-Zellen mit Medium und ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst und in den Abbildungen 13 graphisch dargestellt.

**Tabelle 19: Zytotoxizität [%] von ATG und AMG-8226 in Kombination mit den Substanzen Melphalan und Bortezomib auf Myelomzellen (KMS-12-BM).**  
 Angegeben sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung, n=6.

<b>Einzelsubstanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>MW +/- SD</b>
ATG (µg/ml)	375	12 +/- 2
	750	21 +/- 2
	1500	37 +/- 4
AMG (µg/ml)	50	8 +/- 4
	100	16 +/- 7
	200	38 +/- 2
Melphalan (µM)	10	10 +/- 2
	20	27 +/- 8
	40	66 +/- 16
Bortezomib (ng/ml)	5	8 +/- 5
	10	36 +/- 10
	20	50 +/- 4
<b>Kombination</b>	<b>Konzentration</b>	<b>MW +/- SD</b>
ATG + Melphalan	375 / 10	26 +/- 3
	750 / 20	53 +/- 3
	1500 / 40	85 +/- 1
AMG + Melphalan	50 / 10	23 +/- 4
	100 / 20	58 +/- 6
	200 / 40	87 +/- 4
ATG + Bortezomib	375 / 5	28 +/- 6
	750 / 10	58 +/- 6
	1500 / 20	66 +/- 4
AMG + Bortezomib	50 / 5	22 +/- 6
	100 / 10	58 +/- 7
	200 / 20	73 +/- 4

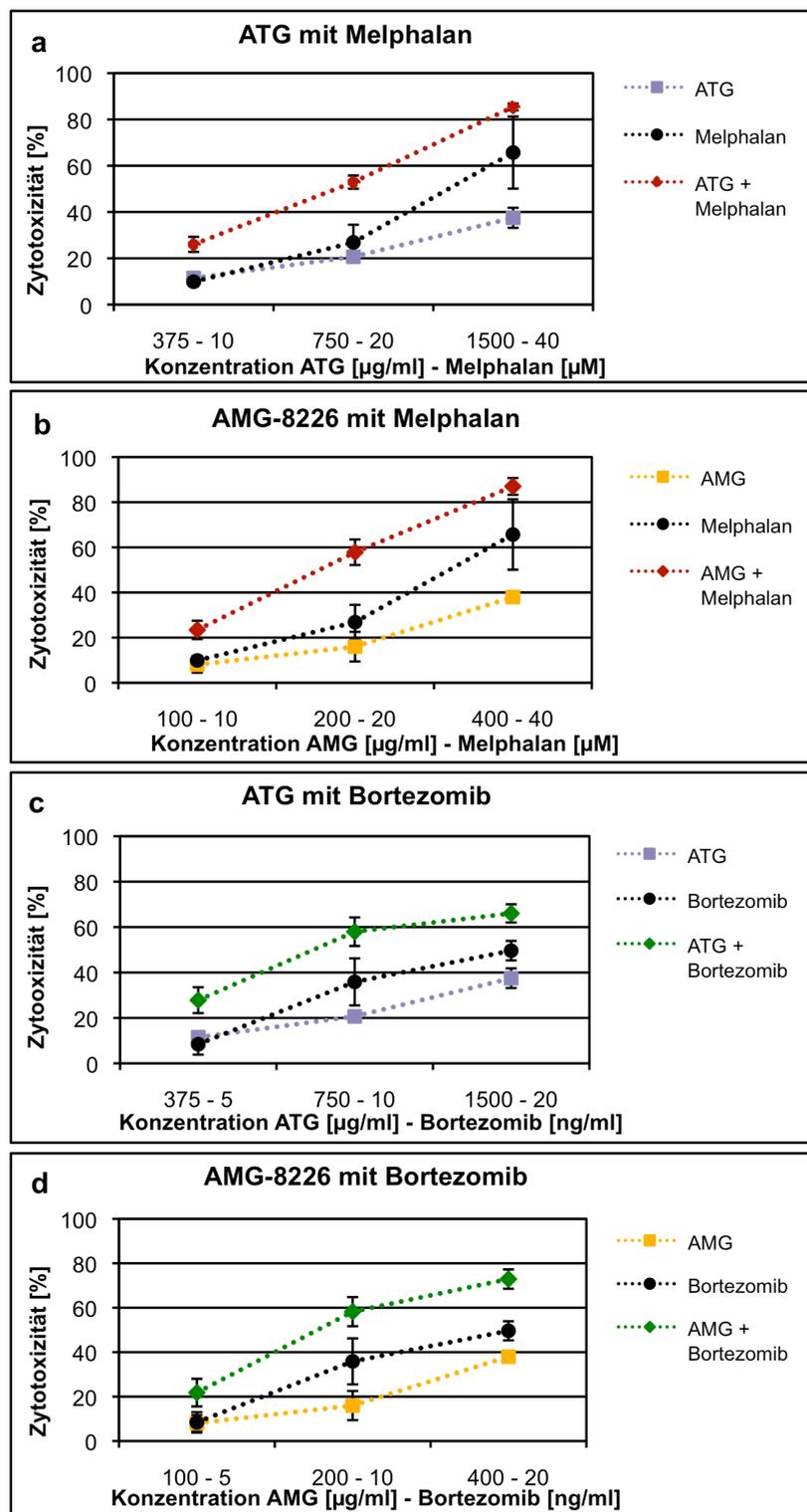


Abb. 13: Relative Zytotoxizität von ATG und AMG-8226 sowie Melphalan und Bortezomib einzeln und in Kombination auf Myelomzellen (KMS-12-BM). a) Zytotoxizität von ATG, Melphalan und ATG mit Melphalan b) Zytotoxizität von AMG-8226, Melphalan und AMG-8226 mit Melphalan c) Zytotoxizität von ATG, Bortezomib und ATG mit Bortezomib d) Zytotoxizität von AMG-8226, Bortezomib und AMG-8226 mit Bortezomib. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=6.

Um den Kombinationseffekt beurteilen zu können, wurde der sog. Kombinationsindex (CI) mit Hilfe der Software CalcuSyn berechnet (siehe Material und Methoden).

Die Kombination aus ATG mit Melphalan sowie die Kombination aus AMG-8226 mit Melphalan zeigte eine additive bis synergistische Wirkung. Der Synergismus nahm mit steigender Konzentration zu (siehe Tab. 20 und Tab. 21).

**Tabelle 20: Kombinationsindices (CI) von ATG und Melphalan.**

ATG (µg/ml)	Melphalan (µM)	CI	Effekt
375	10	0,946	additiv
750	20	0,902	additiv
1500	40	0,686	synergistisch

**Tabelle 21: Kombinationsindices (CI) von AMG-8226 und Melphalan.**

AMG-8226 (µg/ml)	Melphalan (µM)	CI	Effekt
50	10	0,978	additiv
100	20	0,835	mäßig synergistisch
200	40	0,699	synergistisch

Die Kombinationen aus ATG mit Bortezomib und AMG-8226 mit Bortezomib zeigten in der mittleren Dosierung einen synergistischen Effekt. Dieser wird jedoch in der niedrigen und hohen Dosierung schwächer bis additiv (siehe Tab. 22 und Tab. 23).

**Tabelle 22: Kombinationsindices (CI) von ATG und Bortezomib.**

ATG (µg/ml)	Bortezomib (ng/ml)	CI	Effekt
375	5	0,854	gering synergistisch
750	10	0,693	synergistisch
1500	20	1,096	additiv

**Tabelle 23: Kombinationsindices (CI) von AMG-8226 und Bortezomib.**

AMG-8226 (µg/ml)	Bortezomib (ng/ml)	CI	Effekt
50	5	1,008	additiv
100	10	0,725	mäßig synergistisch
200	20	0,959	additiv

### 3.3 Teil III - Neue polyklonale Antikörper

Die neu entwickelten Anti-Myelom-Globuline haben sich als wirksam gegen Myelom-Zellen erwiesen. Jedoch konnte auch eine Wirkung gegen epitheliale nicht-hämatopoetischen Zellen und eine relativ starke Wirkung gegen T-Zellen nachgewiesen werden. Daher stellt sich die Frage, wie polyklonale Antikörper hergestellt werden können, die selektiver gegen Myelom-Zellen wirken, um Nebenwirkungen zu vermeiden.

Zu diesem Zweck wurde von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B. Fehse ein neues Konzept zur Generierung von polyklonalen Antikörpern entwickelt und eingesetzt. Dabei werden geeignete Spezies (z. B. Kaninchen) mit genetisch veränderten allogenen bzw. speziesverwandten Zellen (Kaninchen bzw. Mauszellen) immunisiert. Diese genetisch veränderten Zellen exprimieren ektop die gewünschten humanen Zielantigene. Die gewonnenen Antikörper sind somit polyklonal, sollen jedoch nur die gewünschten Zielantigene erkennen und somit selektiver wirken.

Für die vorliegende Arbeit wurden nach diesem Prinzip polyklonale Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera (sog. AMAG-Sera) hergestellt (Entwicklung: PD Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse; Herstellung: Prof. DDr. Drs. h. c. G. Brem). Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte mittels genmodifizierter Mauslymphozyten mit ektoper Expression der „Myelom-Antigene“ CD19, CD38, CD40 und CD138 (S. Kessner, AG Prof. Dr. B. Fehse). Weitere Kaninchen wurden zur Herstellung von „Wildtyp“-Sera mit unmodifizierten Mauslymphozyten immunisiert. Aus allen Tieren wurde vor der Immunisierung sogenannte „Präimmunisierung“-Sera zur Kontrolle gewonnen. Auf diese Weise wurden je vier AMAG-Sera, vier Wildtyp-Sera und insgesamt acht Präimmunisierung-Sera gewonnen.

In der folgenden Versuchsreihe soll nun untersucht werden, inwieweit die Generierung dieser polyklonalen Antikörper erfolgreich war. Dazu wurde zunächst die Zytotoxizität der AMAG-Sera im Vergleich zu den Wildtyp- und den Präimmunisierung-Sera bestimmt.

#### 3.3.1 Die Zytotoxizität der Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera

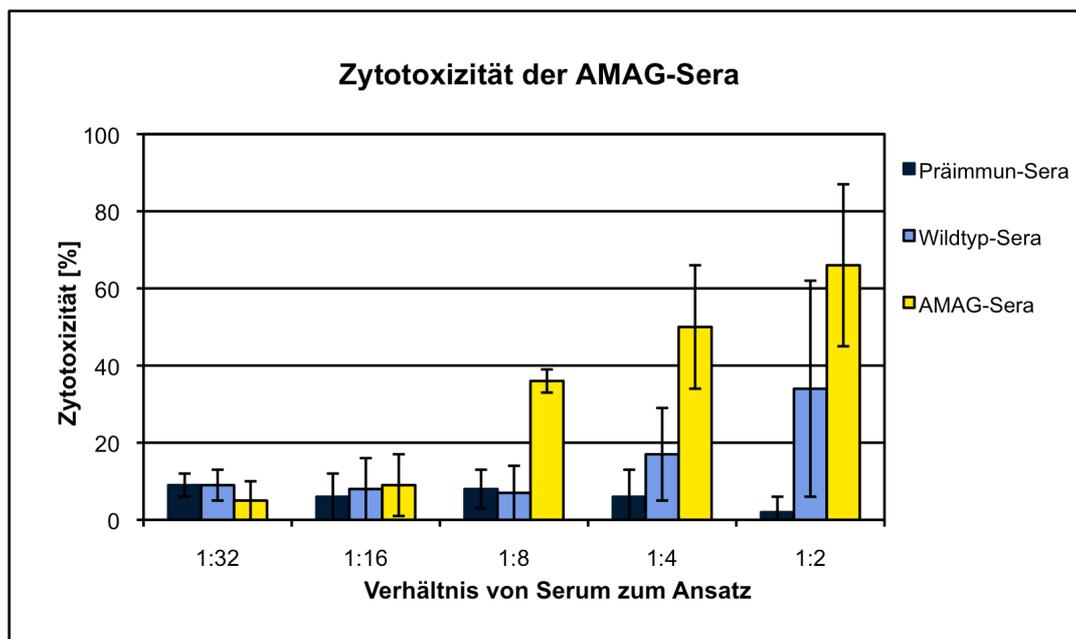
Die Untersuchung der Zytotoxizität der AMAG-Sera im Vergleich zu den Wildtypsera und Präimmunsera erfolgte auf der CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>-Lymphom-Zelllinie Raji, da eine Zelllinie die

alle vier Ziel-Antigene exprimiert, nicht vorlag. Die Typisierung der Raji-Zellen ergab: 99% CD19<sup>+</sup>, 20% CD38<sup>+</sup>, 100% CD40<sup>+</sup>, 0% CD138<sup>+</sup>.

Die Sera wurden zuvor Hitze-inaktiviert, um noch aktives Komplement zu eliminieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zielzellen ( $2 \times 10^5$ /Ansatz) mit den Hitze-inaktivierten Sera und unter Zugabe vom 40% aktiven Serum (Komplement) für 45 min bei 37°C. Die Quantifizierung der Zytotoxizität erfolgte mit einer 7-AAD-Färbung am Durchflusszytometer. Berechnet wurde die relative Zytotoxizität in Bezug auf die Negativ-Kontrolle, in der Raji-Zellen mit Medium und aktivem Serum ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert wurden. Dargestellt ist in Abbildung 14 die relative Zytotoxizität der AMAG-, Wildtyp- und Präimmun- Sera in aufsteigender Konzentration. Angegeben ist das Serum zu Ansatz - Verhältnis (1:32 bis 1:2). Es wurden je vier verschiedene Sera (von je einem Kaninchen) jeweils zweimal getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

**Tabelle 24: Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] von AMAG-Sera, Wildtyp-Sera und Präimmun-Sera auf CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>-Zellen in Mittelwerten +/- Standardabweichung, n = 8.**

<b>Serum : Ansatz</b>	<b>1:32</b>	<b>1:16</b>	<b>1:8</b>	<b>1:4</b>	<b>1:2</b>
AMAG-Sera	5 +/- 5	9 +/- 8	36 +/- 3	50 +/- 16	66 +/- 21
Wildtyp-Sera	9 +/- 4	8 +/- 8	7 +/- 7	17 +/- 12	34 +/- 28
Präimmun-Sera	9 +/- 3	6 +/- 6	8 +/- 5	6 +/- 7	2 +/- 4



**Abb. 14:** Komplement-abhängige Zytotoxizität [%] der AMAG-Sera im Vergleich zu den Wildtyp- und den Präimmun-Sera auf CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=8.

Festzuhalten ist zunächst, dass die Präimmun-Sera keine dosisabhängige zytotoxische Wirkung auf den Zielzellen zeigten. Die Zytotoxizität schwankte Konzentration-unabhängig zwischen 2% und 9% (siehe Tab. 24). Die AMAG-Sera sowie die Wildtyp-Sera hingegen zeigten eine dosisabhängige zytotoxische Wirksamkeit auf den Raji-Zellen.

Dabei erwiesen sich die AMAG-Sera signifikant stärker als die Wildtypsera ( $p = 0,00003$ ). Die Toxizität betrug 36% versus 7% im 1:8 Ansatz, 50% versus 17% im 1:4 Ansatz und 66% versus 34% im 1:2 Ansatz (siehe Tab. 24).

Doch auch die Wildtyp-Sera zeigten im Vergleich zu den Präimmun-Sera eine relativ hohe zytotoxische Wirkung: 17% versus 6% im 1:4 Ansatz und 34% versus 2% im 1:2 Ansatz (siehe Tab. 24).

*Überleitung:* Die AMAG-Sera zeigten sich auf der CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>-Lymphom-Zelllinie Raji zytotoxisch wirksamer als die Wildtyp-Sera. Es folgten Blockierungsversuche der Ziel-Antigene CD19, CD38 und CD40, um zu untersuchen, ob die zytotoxische Wirksamkeit potentiell mit einer stärkeren Bindung an diese Zielantigene einhergeht.

### 3.3.2 Die Blockierung der Oberflächenantigene CD19, CD38 und CD40 durch AMAG-Sera im Vergleich zu Wildtyp-Sera

Die CD19<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD40<sup>+</sup> - Raji-Zellen ( $2 \times 10^5$ /ml) wurden zunächst mit AB-Serum für 20min bei RT inkubiert (Blockade unspezifischer Bindungen) und anschließend mit zuvor Hitze-inaktivierten AMAG- und Wildtyp-Sera 20min bei 4°C inkubiert. Die CD19/CD38/CD40-Antigene wurden anschließend in getrennten Ansätzen mit Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und anschließend in der Durchflusszytometrie die mittlere Fluoreszenzintensität der gebundenen Anti-CD19/38/40-Fluoreszenz-Antikörper bestimmt.

Die Ergebnisse für die einzelnen AMAG-Sera und Wildtyp-Sera (je vier verschiedene Sera, n = 2) sind in Tabelle 25 zusammengefasst und in Abbildung 14 dargestellt. Angegeben wird die relative mittlere Fluoreszenzintensität in Bezug auf die Negativ-Kontrolle, in der die Zellen nur mit Medium ohne Zugabe von Sera inkubiert wurden.

**Tabelle 25: Blockierung der Oberflächen-Antigene CD19/38/40 durch ATG und AMG-8226.** Angegeben ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität [%] in Bezug zur Negativ-Kontrolle in Mittelwerten +/- Standardabweichung, n = 8.

	Serum:Ansatz	1 zu 2	1 zu 1	2 zu 1
<b>CD 19</b>	<b>Wildtyp</b>	93 +/- 6	94 +/- 5	96 +/- 6
	<b>AMAG</b>	90 +/- 3	87 +/- 5	85 +/- 8
<b>CD 38</b>	<b>Wildtyp</b>	97 +/- 5	101 +/- 3	100 +/- 8
	<b>AMAG</b>	77 +/- 9	62 +/- 12	63 +/- 18
<b>CD 40</b>	<b>Wildtyp</b>	101 +/- 7	101 +/- 8	99 +/- 9
	<b>AMAG</b>	18 +/- 3	9 +/- 2	8 +/- 2

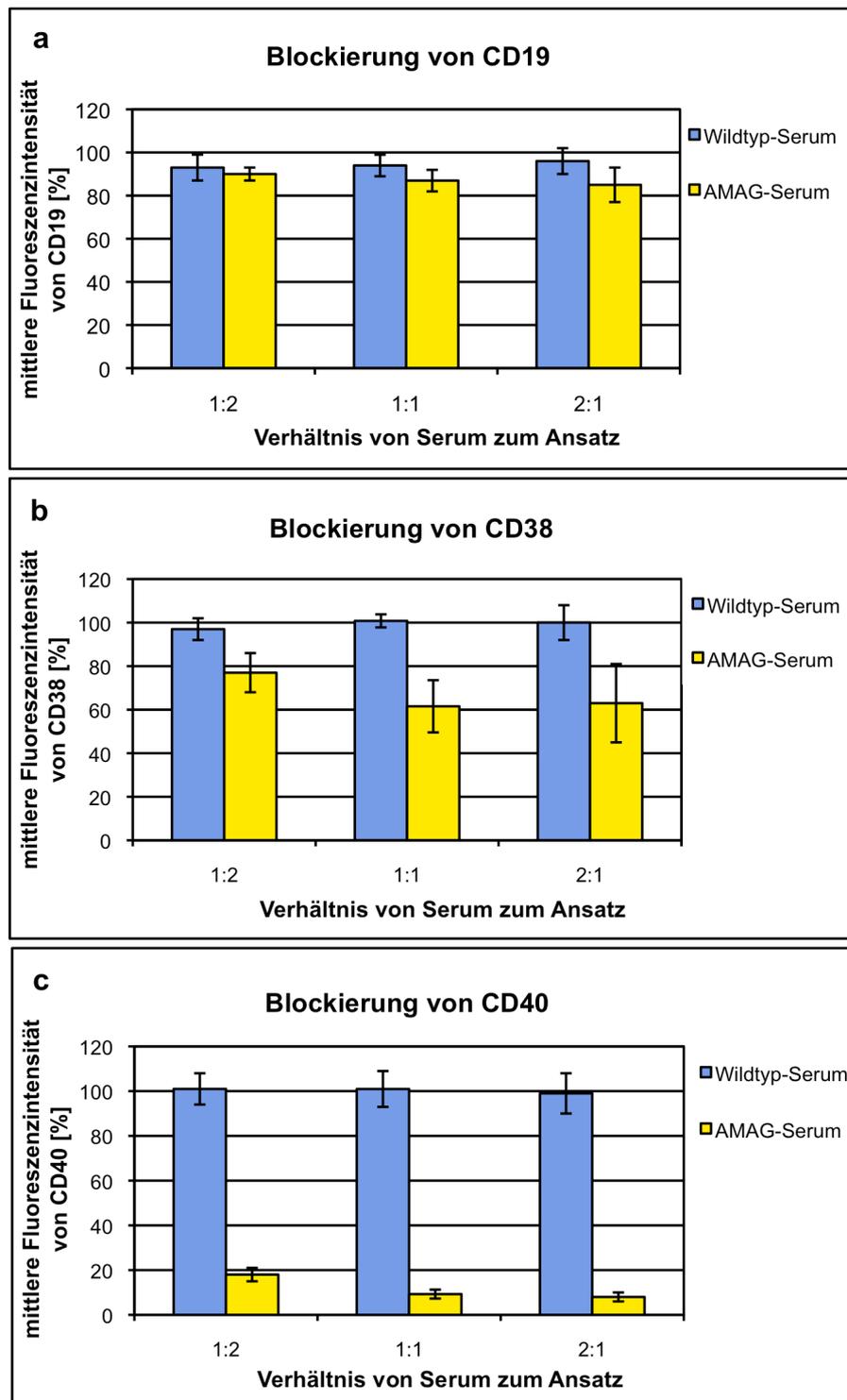


Abb. 15: Blockierung der Oberflächenantigene CD19, CD38 und CD40 durch AMAG-Sera und Wildtyp-Sera. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung, n=8.

Nach Präinkubation mit den Wildtyp-Sera konnte keine Blockierung der Antigene (CD19, CD38, CD40) beobachtet werden. Die Werte schwankten unspezifisch zwischen 93-101% der Ausgangsfluoreszenz des jeweiligen Antigens (siehe Tab. 25).

Nach Präinkubation mit den AMAG-Sera war eine dosisabhängige Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität zu beobachten. Die mittlere CD19-Fluoreszenzintensität fiel zunächst auf 90% und mit steigender Konzentration bis auf 85% des Ausgangswertes. Die mittlere CD38-Fluoreszenzintensität sank zunächst auf 77% und mit steigender Konzentration bis auf 63% des Ausgangswertes. Die mittlere CD40-Fluoreszenzintensität fiel zunächst auf 18% und dann bis auf 8% der Ausgangsfluoreszenz (siehe Tab. 25).

Die oben gezeigte höhere zytotoxische Wirksamkeit der AMAG-Sera geht also mit einer höheren Bindungskapazität der Zielantigene CD19, CD38 und CD40 einher.

## 4 Diskussion

Die Therapie des Multiplen Myelom ist außerordentlich unbefriedigend. Trotz therapeutischer Fortschritte versterben nahezu alle Patienten an den Folgen sich häufender Rezidive, die Ausdruck bereits vorhandener bzw. sich entwickelnder Resistenzen sind. Ziel ist daher die Entwicklung neuer Substanzen und Kombinationsschemata zur Überwindung dieser.

Eine mögliche Lösung ist der Einsatz therapeutischer Antikörper. Aufgrund der Heterogenität der Myelomzellen und des bisher limitierten Erfolgs der monoklonalen Antikörper in der Myelom-Therapie, ist die Entwicklung und Testung polyklonaler Antikörper sinnvoll.

Ein polyklonaler Antikörper, der sich bereits als wirksam gegen Myelom-Zellen erwiesen hat, ist das Anti-Thymozyten-Globulin (Ayuk et al. 2005, Zand et al. 2006a, Timm et al. 2006). Das ATG wird im Rahmen von allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen zur Prophylaxe von einer GvHD eingesetzt. Er zeichnet sich durch eine relativ breite zytotoxische Wirkung auf hämatopoetische Zellen, vor allem aber auf T-Zellen, aus (Preville et al. 2001, Mohty et al. 2007). Eine T-Zell-Depletion hat wiederum einen Anstieg der Infektionsrate zur Folge und limitiert daher den klinischen Einsatz (Williamson et al. 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, spezifischere polyklonale Antikörper gegen Myelomzellen zu entwickeln, die zum einen breit genug wirken, um die Heterogenität der Myelom-Zellen abzudecken und zum anderen jedoch selektiver wirken, um weniger unerwünschte Nebenwirkungen zu verursachen.

### 4.1 Die Anti-Myelom-Globuline

Wir generierten zunächst analog zum ATG-Fresenius sogenannte Anti-Myelom-Globuline. Zur Herstellung wurden je fünf Kaninchen mit den Myelom-Zelllinien RPMI-8226 und KMS-12-BM immunisiert. Die gewonnenen Sera wurden analog zur ATG-Herstellung anschließend gepoolt und immunologisch sowie proteinchemisch aufgereinigt. Somit wurden zwei verschiedene Anti-Myelom-Globuline generiert: das AMG-8226 und das AMG-12-BM.

Da die AMGs analog dem ATG nach dem identischen Immunisierungs- bzw. Boosterungs-Protokoll und Aufreinigungs-Protokoll wie das ATG-Fresenius hergestellt wurden, waren die Antikörper in ihrer Wirkung direkt miteinander vergleichbar. Als Kontroll-Antikörper wurde polyklonales Kaninchen-IgG (rIgG) eingesetzt, um eine mögliche unspezifische Toxizität durch Kaninchen-Antikörper zu erfassen (Bonney-Berard et al. 1994, Genestier et al. 1998).

Die Konzentration der Antikörper wurde analog zu den therapeutisch relevanten ATG-

Konzentrationen gewählt: Die empfohlene ATG-Gesamtdosis zur GvHD-Prophylaxe bei nicht-verwandten allogenen SZT beträgt > 60 mg/kg KG (Schleuning et al. 2003). Dies zeigte auch eine Phase III Studie (Finke et al. 2009). Eiermann et al. (1999) untersuchten die Serum-Konzentration bei Patienten bei einer Gesamtdosis von 90 mg/kg KG ATG und erhielten Spitzenwerte von über 900 µg/ml an Tag 0. Die Serum-Konzentration nahm bis auf 170 µg/ml an Tag 22 ab. In vergleichbaren *in vitro* Arbeiten wurde das ATG stets in dem Konzentrationsbereich von 1 µg/ml - 1000 µg/ml eingesetzt (Genestier et al. 1998, Ayuk et al. 2005, Zand et al. 2006a). Problematisch ist jedoch, dass bisher wenige Daten zu dem hier verwendeten ATG-Fresenius existieren. Die meisten publizierten Daten beziehen sich auf das bisher besser untersuchte Thymoglobulin.

Die Zelltoxizität wurde in der vorliegenden Arbeit mittels der Durchflusszytometrie quantifiziert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese am Durchflusszytometer zu bestimmen. Im Rahmen der Apoptose kommt es unter anderem zu morphologischen Veränderungen, beispielweise zu einer Zellschrumpfung, die sich mit Abnahme im FSC und mit Zunahme im SSC messen lässt (Carbonari et al. 1995). Des Weiteren kommt es zu Umlagerungen von Phosphatidylserin nach außen. Dies lässt sich mit einer Annexin-Färbung nachweisen (Vermees et al. 1995, Van Engeland et al. 1996). Eine erhöhte Membranpermeabilität ist mittels 7-AAD (Schmid et al. 1992, 1994) oder Propidium Iodide (PI) (Ormerod et al. 1993, Zamaï et al. 2001) nachweisbar. Diese Färbungen dringen bei erhöhter Durchlässigkeit in die Zelle und interkalieren dort mit der DNA. Oft wird eine Kombinationsfärbung aus Annexin und PI bzw. 7-AAD verwendet (siehe Tab. 26).

**Tabelle 26: Toxizitätsfärbungen, modifiziert nach Bedner et al. 1999, Schmid et al. 1994 und Lecoeur et al. 1997**

Annexin	PI/7-AAD	Vitalität
-	-	lebend
+	- / low	frühapoptotisch
+	+ / high	spätapoptotisch/nekrotisch

In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Doppelfärbung wie z. B. Annexin/PI verzichtet, da bereits gezeigt werden konnte, dass mit dem Zytotoxizitätsnachweis mit 7-AAD-Färbung die gleiche Sensitivität erreicht wird (Lecoeur et al. 1996, 1997).

Da aber alle Färbungen, einschließlich der 7-AAD-Färbung nicht zuverlässig zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden können (Philpott et al. 1996, Waring et al. 1999; Bedner et al. 1999, Lecoeur et al. 2002, 2008), wird in der vorliegenden Arbeit der allgemeine Begriff der Zytotoxizität verwendet. Um genauere Aussagen machen zu können, wären weitere Untersuchungen sinnvoll, beispielsweise der Nachweis von Caspase-abhängiger Apoptose mittels

Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk, wie bereits für ATG beschrieben (Zand et al. 2005, Ayuk et al. 2005, 2008a).

Für die zytotoxische Testung der Antikörper auf Myelomzellen wurden die Myelom-Zelllinien KMS-12-BM, RPMI-8226 und OPM-2 mit den zu testenden Antikörpern unter Zugabe von Komplement für 45 min und ohne Zugabe von Komplement für 20-24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Zytotoxizität am Durchflusszytometer. Es konnte in beiden Ansätzen, sowohl Komplement-abhängig als auch Komplement-unabhängig, gezeigt werden dass

- das ATG und die AMGs, im Gegensatz zum unspezifischen Kontroll-Antikörper rIgG, auf diesen Myelomzelllinien dosisabhängig zytotoxisch wirksam sind, und dass
- die Anti-Myelom-Globuline auf Myelomzellen signifikant zytotoxischer sind als ATG.

So wurde zum Beispiel bei einer Antikörper-Konzentration von 200 µg/ml auf der Myelom-Zelllinie KMS-12-BM mit AMG-12-BM bzw. AMG-8226 eine Komplement-unabhängige Toxizität von 76% bzw. 67% erreicht. Die Komplement-unabhängige Toxizität von ATG in der gleichen Konzentration betrug 14% und von rIgG max. 1%. Auf der Zelllinie RPMI-8226-BM wurde mit AMG-8226 bzw. AMG-12-BM eine Komplement-unabhängige Toxizität von 84% bzw. 66%, im Vergleich zum ATG mit 8% und rIgG mit 6%, erreicht.

Auffällig, jedoch nachvollziehbar war, dass

- diejenigen Antikörper sich als am stärksten bzgl. ihrer Zytotoxizität auf den Zelllinien erwiesen haben, mit Hilfe dieser sie generiert worden waren:  
Das AMG-12-BM erwies sich als zytotoxisch wirksamster Antikörper auf KMS-12-BM-Zellen. Das AMG-8226 erwies sich als zytotoxisch wirksamster Antikörper auf RPMI-8226-Zellen.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich humane Myelomzelllinien eignen um potente polyklonale Antikörper gegen Myelomzellen zu generieren.

Mu et al. (2011) wendeten kürzlich einen ähnlichen Ansatz im Mausmodell an. Sie immunisierten Kaninchen mit der murinen Plasmazytom-Zelllinie MPC-11. Die gewonnenen Anti-murine-Plasmazytomzell-Globuline induzierten *in vitro* auf MPC-11-Zellen eine Apoptoserate von ca. 48% im Vergleich zur rIgG-Kontrolle von 8% sowie *in vivo* eine Hemmung des Plasmazytomwachstums in der Maus (Mu et al. 2011). Ein zytotoxischer Effekt auf andere hämatopoetische Zellen, wie zum Beispiel B- und T-Zellen, konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine genaue Darstellung dieser Ergebnisse, die genauen Zahlenwerte der Toxizitätsbestimmung sowie Angaben zum genauen Versuchsaufbau, wie z. B. der Inkubationszeit, fehlen jedoch.

Wir untersuchten ebenfalls die Toxizität der von uns generierten AMGs auf primäre T-Zellen und stellten fest, dass

- eine relativ starke Toxizität der AMGs auf primäre T-Zellen vorliegt.

Bei einer Antikörper-Konzentration von 200 µg/ml betrug die Komplement-unabhängige Zytotoxizität auf primären T-Zellen von AMG-8226 87% im Vergleich zu ATG mit 85%. Im Komplement-abhängigen Ansatz war das AMG-8226 auf primären T-Zellen sogar zytotoxisch wirksamer als ATG. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml lag die Toxizität des AMG-8226 bei 84% im Vergleich zu ATG mit 41%. Diese unerwünschte Wirkung basiert auf der Tatsache, dass die AMGs eine Vielzahl von Antikörper gegen verschiedene Antigene enthalten, die nicht nur auf Myelom-Zellen sondern auch auf T-Zellen oder anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. So wurde bereits auch in ATG-Präparaten nicht nur Antikörpern gegen T-Zell-Antigene wie z. B. CD3, sondern auch gegen B-Zell-Antigene wie z. B. CD19, CD20, CD38, CD40, gegen Plasma-Zell-Antigene wie z. B. CD138 sowie gegen Myelom-Zell-Antigene wie z. B. CD38, CD126, CD138 identifiziert (Raefsky et al. 1986, Bonnefoy-Berard et al. 1994, Rebellato et al. 1994, Bourdage et al. 1995, Mohty et al. 2007).

Um zu zeigen, dass die höhere Zytotoxizität der AMGs mit einer höheren Bindungskapazität spezifischer Antigene einhergeht, wurde beispielhaft ein Blockierungsversuch des CD38-Antigens durchgeführt. Das CD38-Antigen ist ein Glycoprotein, das in der Signaltransduktion und Zelladhäsion von verschiedenen Immunzellen eine Rolle spielt. CD38 wird von B-Zellen, v. a. von Plasmazellen, aber auch von T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten exprimiert (Funaro et al. 1990). Für den Blockierungsversuch wurden die CD38<sup>+</sup>-Zielzellen (KMS-12-BM) zunächst mit AB-Serum und dann mit ATG bzw. AMG-8826 inkubiert und anschließend mit monoklonalen Fluoreszenz-Anti-CD38-Antikörpern die Menge noch freier Epitope in der Durchflußzytometrie ermittelt. Umso mehr das CD38-Antigen zuvor von ATG bzw. AMG gebunden wurde, desto weniger stark war die mittlere Fluoreszenzintensität der anschließenden Färbung. Eine ähnliche Methode wurde bereits von Zand et al. angewandt um das ATG bzgl. seiner beinhaltenden Antikörper zu charakterisieren (Zand et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass

- eine relativ starke Bindung des CD38-Antigens durch beide Antikörper, jedoch eine viel stärkere durch AMG als durch ATG erreicht wird. So sank die mittlere Fluoreszenzintensität unter 100 µg/ml ATG auf 21% der Ausgangsfluoreszenz und unter 100 µg/ml AMG-8226 auf 9%.

Die nachgewiesene höhere Toxizität der AMGs auf Myelomzellen geht somit mit einer höheren Bindungskapazität des CD38-Antigens einher.

Problematisch ist jedoch, dass die zur Bestimmung der freien Epitope verwendeten Fluoreszenzantikörper monoklonal sind. Monoklonale Antikörper binden nur an ein Epitop eines Antigens. Polyklonale Antikörper wie ATG und AMG hingegen, können nicht nur an verschiedene Antigene, sondern auch an verschiedene Epitope eines Antigens binden. Mit der vorliegenden Methode wurde somit nur das Bindungsverhalten der Antikörper an einem bestimmten Epitop des Antigens untersucht. Das Bindungsverhalten der polyklonalen Antikörper an anderen Epitopen des gleichen Antigens wurde hier nicht weiter untersucht.

Um auszuschließen, dass die stärkere Wirkung der AMGs unspezifisch ist, und möglicherweise nur durch eine besser gelungene Immunisierung der Känninchen bedingt wurde, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay auf nicht-hämatopoetische Zellen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass

- die Anti-Myelom-Globuline auf nicht-hämatopoetische Zellen nicht zytotoxisch wirksamer sind als ATG.
- Auf beiden Pankreas-Karzinom-Zelllinien (Panc-1, Mia-PaCa) erwies sich das ATG sogar zytotoxisch wirksamer als das AMG-8226.

Wären die AMGs lediglich unspezifisch stärker zytotoxisch wirksam, so hätte sich auch hier eine höhere Toxizität zeigen müssen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, dass sich humane Myelom-Zelllinien eignen, um potente Anti-Myelom-Globuline zu generieren. Die von uns generierten AMGs zeigten eine höhere spezifische Toxizität auf den getesteten Myelomzelllinien. Diese Wirkung ging auch mit einer höheren Bindungskapazität spezifischer Antigene einher.

## 4.2 Komplement-unabhängige Toxizität, Komplement-vermittelte Zellyse (CDC) und Antikörper-vermittelte zelluläre Zelltoxizität (ADCC)

In der Antikörper-Therapie spielen verschiedene Wirkungsmechanismen der Antikörper eine Rolle. Die eingesetzten Antikörper können zum einen durch die Bindung an Antigene (z. B. Rezeptoren) antiproliferativ wirken oder Apoptose induzieren. Zum anderen können die gebundenen Antikörper über ihr Fc-Fragment eine Komplement-vermittelte Zellyse (CDC) oder eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zelltoxizität (ADCC) vermitteln. In der monoklonalen Antikörper-Therapie konnte bereits gezeigt werden, dass die Fc-vermittelte Mechanismen in vivo eine wesentliche Rolle spielen (Clynes et al. 2000).

Für die Wirkung von ATG wurde bereits neben der Apoptose (Bonney-Berard et al. 1994, Zand et al. 2005) eine relevante Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) beschrieben (Ayuk et al. 2005 u. 2009, Zand et al. 2006a). In der vorliegenden Arbeit konnte erneut gezeigt werden, dass die Wirkung von ATG sowohl Komplement-unabhängig als auch Komplement-abhängig erfolgt. In der Konzentration von 500 µg/ml wurde auf KMS-12-BM-Zellen eine Toxizität von 83% (mit Komplement) statt 31% (ohne Komplement) und auf RPMI-8226-Zellen eine Toxizität von 95% statt 40% erreicht. In der Arbeit von Ayuk et al. 2005 wurden ähnliche Werte bei einer ATG-Konzentration von 500 µg/ml festgestellt (siehe Tab. 27).

**Tabelle 27: Zytotoxizität von ATG 500µg/ml auf die Myelom-Zelllinien KMS-12-BM und RPMI-8226 ohne und mit Zugabe von Komplement**

	KMS-12-BM		RPMI-8226	
	ohne K	mit K	ohne K	mit K
Ayuk et al. 2005	65%	100%	25%	95%

Die Abweichungen in den Ergebnissen, die hier trotz des analogen Versuchsaufbaus (Zelldichte, Inkubationszeit, Komplement-Art und -Konzentration, Messmethode etc.) festzustellen sind, können z. B. auf einer unterschiedlichen Ausgangsvitalität der Zellen oder der Wahl eines anderen Analysefensters in durchflusszytometrischen Auswertung beruhen. Das Ausmaß der Toxizität von ATG ohne und unter Zugabe von Komplement ist jedoch in beiden Arbeiten vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren gezeigt, dass die Wirkung der neu entwickelten AMGs ebenfalls sowohl Komplement-unabhängig als auch Komplement-abhängig erfolgt. Da bereits die Komplement-unabhängig Zytotoxizität relativ hoch war, viel der Komplement-vermittelte Effekt vergleichsweise gering aus: Bei einer Antikörper-Konzentration von 200 µg/ml

stieg unter Zugabe von Komplement die AMG-8226-Toxizität von 67% auf 74% und die AMG-12-BM-Toxizität von 76% auf 89%.

Die Inkubationszeiten wurden analog zu vergleichbaren Arbeiten gewählt. Im Komplement-unabhängigen Ansatz wurde für 20-24 h bei 37°C inkubiert (Bonney-Bérard et al. 1994, Zand et al. 2005, Ayuk et al. 2009a). Im Komplement-abhängigen Ansatz wurde als Komplementquelle aktives humanes Serum verwendet und die Inkubationszeit auf 45min-1h bei 37°C begrenzt. Als Komplementquelle kann neben dem hier verwendeten aktiven humanen Serum (Ayuk et al. 2005, 2008a, 2009a) auch industriell produziertes Komplement verwendet werden (Zand et al. 2006a). In Abhängigkeit der Komplement-Art und -Konzentration variiert die Inkubationszeit in der Literatur zwischen 45 Minuten und 20 Stunden (Ayuk et al. 2005, 2008a, 2009a; Zand et al. 2006a).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Antikörper-vermittelte zelluläre Zelltoxizität (ADCC) der polyklonalen AK zu untersuchen. Die ADCC wird durch Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) über die Fc-Fragmente der Antikörper vermittelt. Es kommt zur Lyse der von Antikörper gebundenen Zielzellen.

Fischer et al. (2006) haben bereits belegen können, dass für die ADCC auf Lymphom-Zellen insbesondere die NK-Zellen eine Rolle spielen. Daher wurde ein Chromium-Release-Assay mit NK-Zellen als Effektor-Zellen durchgeführt. Als Ausgangswert wurde die NK-Zell-vermittelte Lyse ohne Zugabe von Antikörpern gemessen.

Im niedrigen Konzentrationsbereich (0,1-10 µg/ml) lag die NK-Zell-vermittelte Lyse über dem Ausgangswert. Unter 1 µg/ml ATG und AMG-8226 wurde eine maximale Zunahme der Lyse von 21% bzw. 20% beobachtet. Dieser Effekt entspricht einer ADCC und den Daten von Genestier et al. (1998). Dort wurde der maximale ADCC-Effekt ebenfalls bei einer Konzentration von 1 µg/ml ATG (hergestellt von Merieux) beobachtet. Zu diskutieren bliebe die Frage, in wieweit 1 µg/ml eine effektive therapeutische Serum-Konzentration darstellt. Die bisher empfohlen therapeutischen Serum-Konzentrationen für ATG sind mind. 100fach höher (Schleunig et al. 2003, Finke et al. 2009, Eiermann et al. 1999, Zand et al. 2006a, Ayuk et al. 2005).

Interessanter Weise war im hohen Konzentrationsbereich (100-500 µg/ml) eine Abnahme der Lyse zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml ATG fiel diese um 22% und unter 500 µg/ml AMG-8226 um 8%. Dieser Wirkungsverlust lässt sich möglicherweise durch eine Hemmung der Interaktion zwischen NK-Zellen und Myelomzellen erklären, der unter ATG stärker ist als unter AMG.

Preville et al. (2001) konnten im Primatenmodell einen zytotoxischen Effekt von Thymoglobulin auf NK-Zellen nachweisen. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte u. a. die Wirkung von ATG auf NK-Zellen und fand heraus, dass schon in niedrigen Konzentrationen eine relevante Toxizität

erreicht wird. Unter 1 µg/ml ATG wurde bereits eine Toxizität von ca. 30% beobachtet (Penack et al. 2007). Aufgrund unseres Versuchsaufbaus, mit einer kurzen Inkubationszeit von 4h, und unter Abwesenheit von Komplement sind jedoch zytotoxische Effekte der Antikörper nicht zu erwarten.

Prinzipiell ist es denkbar, dass die nicht-humanen Fc-Fragmente der Kaninchen-Antikörper von humanen Komplement und humanen Effektorzellen nicht gebunden werden können, und damit die Wirkung der Antikörper *in vivo* vermindert wird. Dieses Problem wurde bereits bei monoklonalen Antikörpern beschrieben (Ober et al. 2001). Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass sowohl die CDC als auch die ADCC, mit humanem Komplement bzw. mit humanen NK-Zellen ausgelöst werden können.

### 4.3 Kombinationseffekte mit Chemotherapeutika

Die Resistenzentwicklung in der Myelom-Therapie stellt ein großes Problem dar. In der Wirkung des Thymoglobulins konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Antikörper Medikamentenresistenzen überwinden kann (Timm et al. 2006). Daher scheint eine Kombinationstherapie aus bereits etablierten Chemotherapien (z. B. Melphalan und Bortezomib) und neuen polyklonalen Antikörpern sinnvoll.

Um herauszufinden, welche Kombinationseffekte zu erwarten wären, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Koinkubation des ATG bzw. des AMG mit Melphalan und Bortezomib auf einer Myelomzelllinie (KMS-12-BM) *in vitro* getestet. Für jede Substanz wurde die maximale Konzentration so gewählt, dass ca. eine Toxizität von 50% zu verzeichnen war. Es ergaben sich somit folgende Konzentrationsreihen: ATG 375-750-1500 µg/ml, AMG 50-100-200 µg/ml, Melphalan 10-20-40 µM und Bortezomib 5-10-20 ng/ml.

Wir konnten zeigen, dass die Kombination beider Antikörper, des ATGs und des AMG-8826, mit Melphalan und mit Bortezomib jeweils einen additiven bis synergistischen Effekt zeigte. Daher ist eine gemeinsame klinische Verwendung denkbar. Wichtig wären jedoch noch Untersuchungen zur Wirkung der Kombination gegen Melphalan- und Bortezomib-resistente Zelllinien sowie weitere Untersuchungen zur Wirkung gegen andere hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen, um Aussagen zur Toxizität bzw. Nebenwirkungen treffen zu können.

Die klinisch relevante Konzentration der Antikörper wurde bereits diskutiert. Bleibt noch offen in wie weit die hier verwendeten Melphalan- bzw. Bortezomib-Konzentrationen klinisch relevanten Plasmakonzentrationen *in vivo* entsprechen.

**Melphalan (Alkeran®)** ist bifunktionales Alkylanz, das durch die Alkylierung von Guanin zu DNA-Strangverknüpfung und somit zur Störung der Replikation und Transkription und damit der Zellproliferation führt. Die übliche Dosierung im Rahmen der konventionellen intravenösen Therapie liegt zwischen 8 und 30 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Im Rahmen der Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation werden Dosierungen zwischen 100 und 200 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verwendet.

Kühne et al. (2008) untersuchten die Pharmokinetik des Melphalans. Dabei wurden unter anderem Spiegelmessungen durchgeführt, die gezeigt haben, dass im konventionellen Therapieansatz bei einer Dosierung von 10 - 16 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche im Median ein Spiegelmaximum von 0,7 mg/l erreicht wird. In HD-Therapie-Dosierung von 140 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche wird im Median ein Spiegelmaximum von 5,2 mg/l erreicht. Verrechnet man diese Serum-Konzentrationen mit dem Molekulargewicht des Melphalans (305.2 g/mol), ergeben sich folgende Molaritäten: 2,29 µM in der konventionellen Dosierung und 17,04 µM in der Hochdosistherapie.

Die Ergebnisse von Kühne et al. (2008) und die errechnete Molarität, bei einem Molekulargewicht des Melphalans von 305.2 g/mol:

Dosis		Cmax	errechnete Molarität
10 - 16 mg/m <sup>2</sup>	n = 30	0,7 mg/l (0,3-1,1mg/l)	2,29 µM (0,98 - 3,60 µM)
140mg/m <sup>2</sup>	n = 13	5,2 mg/l (3,2-10,7mg/l)	17,04 µM (10,48 - 35 µM)

In der vorliegenden Arbeit wurde Melphalan in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 10, 20 und 40 µM. Dies entspricht etwa den *in vivo* - Spiegelmessungen bei einer HD-Melphalan-Therapie.

Chen et al. (2005) setzten ebenfalls eine relativ hohe Konzentration (50-100 µM) ein, um auf Melphalan-sensiblen und Melphalan-resistenten Myelomzelllinien einen zytotoxischen Effekt auf den Myelomzelllinien RPMI und U266 zeigen zu können. Dabei lag die errechnete IC50 auf den Melphalan-sensiblen Zellen ähnlich zu unseren Konzentrationen, zwischen 12,5 und 25 µM.

Die zweite Substanz, **Bortezomib (Velcade®)** ist ein 26S-Proteasomeninhibitor. Das 26S-Proteasom ist ein großer Proteinkomplex, der Ubiquitin-gebundene Proteine abbaut. Der Abbau dieser Proteine spielt eine wichtige Rolle für den Erhalt der Homöostase innerhalb einer Zelle. Wird diese Homöostase gestört, kommt es zum Zelltod. Die empfohlene Bortezomib-Dosis liegt bei 1,3 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. In einer Studie mit 11 Patienten wurde nach intravenöser Bolusgabe mit 1,3 mg/m<sup>2</sup> Bortezomib eine mittlere maximale Plasmakonzentration von 112 ng/ml gemessen (EMA-Fachinformation 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde Bortezomib in

Konzentrationen 5, 10 und 20 ng/ml verwendet. Dieser Konzentrationsbereich liegt weit unter dem in der Studie gemessenen Plasmaspitzenpiegel, entspricht jedoch den verwendeten Konzentrationen in vergleichbaren Arbeiten. Hideshima et al. (2001) untersuchten den in vitro Effekt von Bortezomib auf das Wachstum von Myelomzelllinien U266, IM-9 und Hs-Sultan mittels MTT-Assay. Mit 100 nM Bortezomib konnte nach 48 Stunden eine komplette Inhibition des Zellwachstums nachgewiesen werden. Die IC<sub>50</sub> - Werte für U266, IM-9 und Hs Sultan Zellen lagen bei max. 20 nM Bortezomib. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 384,24 g/mol einer Konzentration von 7,7 ng/ml und liegt damit in dem Bereich der von uns verwendeten Konzentrationen.

#### 4.4 Die Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera

Wir konnten bereits zeigen, dass die Immunisierung von Kaninchen mit humanen Myelom-Zelllinien eine Möglichkeit darstellt, um potente Anti-Myelom-Globuline zu generieren, die wirksam gegen humane Myelom-Zellen sind. Ein Problem besteht jedoch in ihrer geringen Spezifität. Die von uns generierten AMGs zeigten neben der guten Wirksamkeit auf Myelom-Zellen auch eine relativ starke zytotoxische Wirkung auf nicht-hämatopoetische epitheliale Zellen und T-Zellen: Beide Anti-Myeloma-Globuline erwiesen sich auf nicht-hämatopoetischen Zellen zwar als weniger toxisch als ATG, dennoch zeigten beide AMGs eine dosisabhängig zytotoxische Wirksamkeit. Bei hohen Konzentration wurden Toxizitäten bis zu 93% erreicht (AMG-12-BM 800 µg/ml auf Panc1-Zellen). Auch auf primären T-Zellen zeigte sich eine relativ starke dosisabhängige Wirksamkeit. Im Komplement-abhängigen Ansatz erwies sich das AMG-8226 sogar als signifikant stärker als ATG. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml lag die Toxizität des AMG-8226 bei 84%, im Vergleich zum ATG mit 41%.

Ziel muss daher sein, polyklonale Antikörper zu entwickeln, die zum einen breit genug wirken um die Heterogenität der Myelom-Zellen abzudecken, zum anderen aber spezifisch genug sind, um deutlich weniger unerwünschten Wirkung zu verursachen.

Daher wurde von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B. Fehse ein neues System zur Generierung von polyklonalen Antikörpern entwickelt: Geeignete Spezies, wie z. B. Kaninchen werden mit *genetisch veränderten* allogenen bzw. speziesverwandten Zellen immunisiert. Auf diese Weise wurden polyklonale Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera sog. AMAG-Sera hergestellt (Entwicklung: PD Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse; Herstellung: Prof. DDr. Drs. h. c. G. Brem). Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte dabei mittels genmodifizierter Mauslymphozyten mit ektopter Expression der humanen Antigene CD19, CD38, CD40 und CD138, die häufig durch Myelomzellen hochexprimiert werden (Herstellung: S.

Kessner, AG Prof. Dr. B. Fehse). Eine Kontrollgruppe wurde mit unveränderten Mauslymphozyten immunisiert, um die sog. Wildtyp-Sera zu generieren. Aus allen Kaninchen wurden zuvor sog. Präimmun-Sera gewonnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Sera auf CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>-Zielzellen getestet. Die AMAG-Sera erwiesen sich dabei als signifikant stärker als die Wildtypsera. Die Toxizität betrug in der höchsten Konzentration 66% versus 34%. Ein Blockierungsversuch der Ziel-Antigene zeigte, dass diese Wirkungsstärke mit einer höheren Bindungskapazität dieser Zielantigene einhergeht.

Jedoch zeigten auch die Wildtyp-Sera eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung im Vergleich zu den Präimmun-Sera (34% versus 2%). Dies ist auf eine murine-humane Kreuzreaktivität zurückzuführen. Daher sollten für zukünftige Versuche die zu modifizierende Zellen zur Immunisierung allogenen sein (hier: Kaninchen-Lymphozyten).

## 4.5 Ausblick

### 4.5.1 In-vitro-Versuche

Bevor neue Substanzen in Patientenstudien zugelassen werden, muss ihre Wirkung *in vitro* auf Zelllinien und/oder primärer Zellen und *in vivo* in Tiermodellen nachgewiesen werden. Humane Zelllinien haben sich bereits für verschiedene *in vitro* Studien als vorteilhaft erwiesen, da es sich um immortalisierte und kontinuierlich wachsende Zellen handelt (Zhang et al. 1994, Drexler et al. 2000).

Es sind über hundert Myelomzelllinien bekannt und viele davon über verschiedene Zelllinienbanken erhältlich. Die Nutzung gleicher Zelllinien weltweit hat den Vorteil, dass Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen nachvollziehbar und vergleichbar bleiben. Ein Problem besteht jedoch darin, dass die meisten Myelomzelllinien aus Patienten mit einem fortgeschritten terminalen bzw. leukämischen Stadium und aus nur einem Kompartiment (Blut, Knochenmark, Aszites oder Pleuraerguss) generiert wurden (Zhang et al. 1994, Drexler et al. 2000). Dies birgt die Gefahr, dass eine Zelllinie nur eine Subpopulation des Multiplen Myeloms *in vivo* darstellt und auf Grund des terminalen Stadiums therapierefraktär ist. Daher ist es zunächst sinnvoll, weitere *in vitro* Versuche auf eine Vielzahl unterschiedlicher Myelom-Zelllinien durchzuführen, jedoch auch eine Testung auf primäre Myelom-Zellen aus Patientenproben, um die Wirksamkeit neuer Anti-Myelom-Globuline zu bestätigen. Um die Wirksamkeit der AMGs *in vivo* zu untersuchen, wäre es des Weiteren notwendig Tierversuche anzuschließen. Für die Testung neuer Substanzen *in vivo* haben sich das 5TMM-Maus-Modell und das SCID-Maus-Modell als geeignet herausgestellt (Radl et al. 1988, Asosingh et al. 2000).

#### 4.5.2 Klinischer Einsatz polyklonaler Antikörper in der Myelomtherapie

Schon heute profitieren viele Patienten von einer zielgerichteten Krebstherapie, der sogenannten „targeted therapy“. Sie ist mittlerweile, neben den konventionellen Therapiemethoden (Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie), ein fester Bestandteil onkologischer Therapiekonzepte.

Ein wesentliches Problem der Myelomzelle selbst als Therapie-Target liegt in der großen Heterogenität der Oberflächen-Antigene. Myelomzellen exprimieren normalerweise die Plasmazellantigene CD38 und CD138 und zeichnen sich durch den Verlust von B-Zell-Antigenen, wie z. B. CD19 aus (Fruehauf et al. 2001, Bataille et al. 2006, Tuffaha 2008). Jedoch gibt es Untersuchungen, die gezeigt haben, dass Myelomzellen sehr heterogen bzgl. ihres Wachstumsverhaltens und ihres Phänotyps sind (Huff und Matsui 2008). Einige Arbeitsgruppen postulieren hier die Existenz von sog. „Myelom-Stammzellen“ oder sog. „clonogenic B-cells“. Diese Zellen zeichnen sich durch eine Koexpression von B-zell-Antigenen, wie z. B. CD19 aus (Jensen et al. 1992, Billadeau et al. 1993, Bakkus et al. 1994, Berenson et al. 1995, Bergsagel et al. 1995, Chen und Epstein 1996, Szczepek et al. 1998, Matsui et al. 2004, Matsui et al. 2008, Ghosh und Matsui 2009) und haben sich z.T. als therapieresistent herausgestellt (Matsui et al. 2008).

Polyklonale Antikörper könnten das Problem der Heterogenität überwinden. Unter Einbeziehung der B-Zell-antigene wie beispielsweise CD19, könnten polyklonale Antikörper sich neben den Myelomzellen auch gegen die postulierten „Myelom-Stammzellen“ bzw. „clonogenic B-cells“ als wirksam erweisen, ihre Resistenzen überwinden und somit Rezidive vermeiden. Je breiter jedoch die Wirkung einer Substanz ist, desto mehr muss mit Nebenwirkungen gerechnet werden.

Wir konnten bereits zeigen, dass die Immunisierung von Kaninchen mit humanen Myelom-Zelllinien eine Möglichkeit darstellt, um potente Anti-Myelom-Globuline zu generieren. Ein Problem besteht jedoch in ihrer geringen Spezifität. Ziel muss daher sein, polyklonale Antikörper zu entwickeln, die zum einen breit genug wirken um die Heterogenität der Myelom-Zellen abzudecken, zum anderen aber spezifisch genug sind, um deutlich weniger unerwünschte Wirkung zu verursachen. Wir konnten einen möglichen Ansatz zur Generierung spezifischerer polyklonaler Antikörper aufzeigen: Die Immunisierung mit genetisch veränderten allogenen Zellen, die die gewünschten humanen Zielantigene exprimieren. Weitere Untersuchungen müssen Ihre Effektivität noch überprüfen.

In Abhängigkeit vom Nebenwirkungsprofil künftiger polyklonaler Antikörper sind prinzipiell zwei Anwendungsgebiete denkbar: Bei starken Nebenwirkungen, vor allem bei starker Immunsuppression, ist ein Einsatz polyklonaler Antikörper nur im Rahmen einer autologen bzw. allogenen Stammzelltransplantation denkbar. Sind die Nebenwirkungen gut beherrschbar, wird ein additiver Einsatz zu bereits etablierten Chemotherapien möglich sein.

## 5 Zusammenfassung

Die Therapie des Multiplen Myeloms ist außerordentlich unbefriedigend. Ein wesentliches Problem stellt dabei die Entwicklung von Rezidiven und Therapieresistenzen dar. Daher ist die Entwicklung neuer Therapiekonzepte, die zum einen die Rezidivrate senken und zum anderen Therapieresistenzen überwinden dringend notwendig. Eine mögliche Lösung ist der Einsatz therapeutischer Antikörper. Aufgrund der Heterogenität der Myelomzellen und des bisher limitierten Erfolgs der monoklonalen Antikörper in der Myelom-Therapie, ist die Entwicklung und Testung polyklonaler Antikörper sinnvoll. In der vorliegenden Arbeit wurden polyklonale Antikörper entwickelt und auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

Analog zu ATG-Fresenius (ATG) wurden zunächst sog. polyklonale Anti-Myelom-Globuline (AMGs) generiert. Diese neuentwickelten AMGs zeigten im Vergleich zum ATG eine höhere zytotoxische Wirksamkeit gegen Myelomzellen. Wir konnten zeigen, dass diese Wirkung mit einer höheren Bindungskapazität des CD38-Antigens einhergeht. Eine unspezifisch höhere Toxizität konnte durch die Testung auf nicht-hämatopoetische Zellen ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Wirkung der AMGs sowohl Komplement-unabhängig als auch Komplement-abhängig erfolgt und eine Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Lyse möglich ist. In Kombination mit etablierten Substanzen aus der Myelom-Therapie (Melphalan und Bortezomib) zeigte sich additiv bis synergistische Effekte, sodass ein klinischer Einsatz in Kombination mit diesen sinnvoll sein könnte.

Problematisch war jedoch, dass die AMGs neben der guten Wirksamkeit auf Myelom-Zellen auch eine relativ starke zytotoxische Wirkung auf nicht-hämatopoetische, epitheliale Zellen und primären T-Zellen zeigten, sodass eine Weiterentwicklung nötig war. Wir konnten einen neuen Weg zur Herstellung von spezifischeren polyklonalen Antikörpern aufzeigen: Geeignete Spezies, wie z. B. Kaninchen, werden mit genetisch veränderten allogenen bzw. speziesverwandten Zellen immunisiert. Auf diese Weise wurden für diese Arbeit polyklonale Anti-Myelom-Antigen-Globulin-Sera sog. AMAG-Sera hergestellt (Entwicklung: PD Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse). Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte dabei mittels genmodifizierter Mauslymphozyten mit ektopter Expression der humanen Antigene CD19, CD38, CD40 und CD138, die häufig durch Myelomzellen hochexprimiert werden. Die Testung der AMAG-Sera zeigte eine gute Wirksamkeit auf CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>-Zielzellen. Wir konnten zeigen, dass diese Wirkung mit einer hohen Bindungskapazität der Zielantigene einhergeht. Es zeigte sich jedoch auch eine murin-humane Kreuzreaktivität, sodass zukünftig allogene Zellen zur Immunisierung verwendet werden sollten, um ungewollte Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Schon heute profitieren viele Patienten von einer zielgerichteten Krebstherapie. Ziel ist es, die Entwicklung von polyklonalen Antikörpern in der Myelomtherapie voranzutreiben, um das Problem der Heterogenität der Myelomzellen und ihrer Resistenzentwicklung zu überwinden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AMAG	Anti-Myelom-Antigen-Globulin
AMG	Anti-Myelom-Globulin
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Anti-Thymo-Globulin
bzw.	beziehungsweise
°C	Celsius
ca.	circa
Ca	Karzinom
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytolysis
CI	Combination Index
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<sup>51</sup> Cr	Chrom <sup>51</sup>
CT	Chemotherapeutikum
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
d.h.	das heißt
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine serum

---

FSC	Forward Light Scatter
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
GvM	Graft-versus-Myeloma
h	Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IMF	International Myeloma Foundation
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System
K	Komplement
Ktr.	Kontrolle
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mel	Melphalan
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MM	Multiple Myelom
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
neg.	Negativ
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidium Iodide
pos.	Positiv
RIC	Reduced Intensity Conditioning
rIgG	rabbit Immunglobulin G
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SSC	Side Scatter
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle

TNF	tumor necrosis factor
TRM	Transplant-related mortality
u. a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z. B.	zum Beispiel

## 7 Literaturverzeichnis

Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr, Wilson HE (1969) Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 208: 1680-5.

Alexanian R, Barlogie B, Tucker S (1990) VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *Am J Hematol* 33: 86-9.

Arora M, McGlave PB, Burns LJ, Miller JS, Barke JN, Defor TE, Weisdorf DJ (2005) Results of autologous and allogeneic hematopoietic cell transplant therapy for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 35: 1133-40.

Aschan J, Lönnqvist B, Ringdén O, Kumlien G, Gahrton G (1996) Graft-versus-myeloma effect. *Lancet* 348: 346.

Asosingh K, Radl J, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K (2000) The 5TMM series: a useful in vivo mouse model of human multiple myeloma. *Hematol J* 1: 351-6.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R (1996) A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N Engl J Med* 335: 91-7.

Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, Monconduit M, Hulin C, Caillot D, Bouabdallah R, Voillat L, Sotto JJ, Grosbois B, Bataille R; InterGroupe Francophone du Myélome (2003) Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 349: 2495-502.

Ayuk F, Shimoni A, Nagler A, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Sayer HG, Zabelina T, Zander AR, Kröger N (2004) Efficacy and toxicity of low-dose escalating donor lymphocyte infusion given after reduced intensity conditioning allograft for multiple myeloma. *Leukemia* 18: 659-62.

Ayuk FA, Fang L, Fehse B, Zander AR, Kröger N (2005) Antithymocyte globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells. *Exp Hematol* 33: 1531-6.

Ayuk FA, Atassi N, Schuch G, Mina S, Fang L, Bokemeyer C, Fehse B, Zander AR, Kröger N (2008a) Complement-dependent and complement-independent cytotoxicity of polyclonal antithymocyte globulins in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 32: 1200-6.

Ayuk F, Perez-Simon JA, Shimoni A, Sureda A, Zabelina T, Schwerdtfeger R, Martino R, Sayer HG, Alegre A, Lahuerta JJ, Atanackovic D, Wolschke C, Nagler A, Zander AR, San Miguel JF, Kröger N (2008b) Clinical impact of human Jurkat T-cell-line-derived antithymocyte globulin in multiple myeloma patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 93: 1343-50.

Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, Panse J, Wolschke C, Eiermann T, Binder T, Fehse B, Erttmann R, Kabisch H, Bacher U, Kröger N, Zander AR (2008c) Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors. *Exp Hematol* 36: 1047-54.

- Ayuk F, Maywald N, Hannemann S, Larsen U, Zander A, Kröger N (2009a) Comparison of the cytotoxicity of 4 preparations of anti-T-cell globulins in various hematological malignancies. *Anticancer Res* 29: 1355-60.
- Ayuk F, Zander A, Kröger N (2009b) Antitumor effects of polyclonal antithymocyte globulins: focus on B-cell malignancies and multiple myeloma. *Ann Hematol* 88: 401-4.
- Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Barbanti M, Sacchi N, Van Lint MT, Bosi A (2001) Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 98: 2942-7.
- Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K (1994) Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol* 87: 68-74.
- Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, Zagars G, Spitzer G, Jagannath S, Horwitz L (1987) High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood* 70: 869-72.
- Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, McCoy J, Moore DF Jr, Dakhil SR, Lanier KS, Chapman RA, Cromer JN, Salmon SE, Durie B, Crowley JC (2006) Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol* 24: 929-36.
- Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE (1956) Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 2: 626-7.
- Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C (2006) The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 91: 1234-40.
- Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z (1999) Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35: 181-95.
- Bensinger WI, Buckner CD, Anasetti C, Clift R, Storb R, Barnett T, Chauncey T, Shulman H, Appelbaum FR (1996) Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome. *Blood* 88: 2787-93.
- Berenson JR, Vescio RA, Hong CH, Cao J, Kim A, Lee CC, Schiller G, Berenson RJ, Lichtenstein AK (1995) Multiple myeloma clones are derived from a cell late in B lymphoid development. *Curr Top Microbiol Immunol* 194: 25-33.
- Bergsagel DE, Sprague CC, Austin C, Griffith KM (1962) Evaluation of nechemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. IV. L-Phenylalanine mustard (NSC-8806). *Cancer Chemother Rep* 21: 87-99.
- Bergsagel PL, Smith AM, Szczepek A, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM (1995) In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain. *Blood* 85: 436-47.

- Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM (1996) Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13931-6.
- Bergsagel PL, Kuehl WM (2005) Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23: 6333-8.
- Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Van Ness B (1993) The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med* 178: 1023-31.
- Björkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, Hermans J, Alegre A, Apperley J, Bladé J, Carlson K, Cavo M, Ferrant A, Goldstone AH, de Laurenzi A, Majolino I, Marcus R, Prentice HG, Remes K, Samson D, Sureda A, Verdonck LF, Volin L, Gahrton G (1996) Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 88: 4711-8.
- Björkstrand B, Iacobelli S, Hegenbart U, Gruber A, Greinix H, Volin L, Narni F, Musto P, Beksac M, Bosi A, Milone G, Corradini P, Goldschmidt H, de Witte T, Morris C, Niederwieser D, Gahrton G (2011) Tandem autologous/reduced-intensity conditioning allogeneic stem-cell transplantation versus autologous transplantation in myeloma: long-term follow-up *J Clin Onkol.* 29: 3016-22.
- Bladé J, Rosiñol L, Sureda A, Ribera JM, Díaz-Mediavilla J, García-Laraña J, Mateos MV, Palomera L, Fernández-Calvo J, Martí JM, Giraldo P, Carbonell F, Callis M, Trujillo J, Gardella S, Moro MJ, Barez A, Soler A, Font L, Fontanillas M, San Miguel J; Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna (PETHEMA) (2005) High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood* 106: 3755-9.
- Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP (1991) Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 51: 669-73.
- Bonnefoy-Berard N, Flacher M, Revillard JP (1992) Antiproliferative effect of antilymphocyte globulins on B cells and B-cell lines. *Blood* 79: 2164-70.
- Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, Rouault JP, Lizard G, Mutin M, Revillard JP (1994) Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood* 83: 1051-9.
- Bonnefoy-Berard N, Revillard JP (1996) Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant* 15: 435-42.
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312: 643-6.
- Bourdage JS, Hamlin DM (1995) Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 59: 1194-200.

- Bruno B, Rotta M, Patriarca F, Mordini N, Allione B, Carnevale-Schianca F, Giaccone L, Sorasio R, Omedè P, Baldi I, Bringhen S, Massaia M, Aglietta M, Levis A, Gallamini A, Fanin R, Palumbo A, Storb R, Ciccone G, Boccadoro M (2007) A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 356: 1110-20.
- Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, Leblond V, Ifrah N, Jouet JP, Loberiza F, Ringden O, Barrett AJ, Horowitz MM, Socié G; Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire; Dana Farber Cancer Institute; International Bone Marrow Transplant Registry (2005) Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 106: 1495-500.
- Carbonari M, Cibati M, Fiorilli M (1995) Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry* 22: 161-7.
- Casadevall A, Pirofski LA (2003) Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24: 474-8.
- Cavo M, Tosi P, Zamagni E, Cellini C, Tacchetti P, Patriarca F, Di Raimondo F, Volpe E, Ronconi S, Cangini D, Narni F, Carubelli A, Masini L, Catalano L, Fiacchini M, de Vivo A, Gozzetti A, Lazzaro A, Tura S, Baccarani M (2007) Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J Clin Oncol* 25: 2434-41.
- Chen BJ, Epstein J (1996) Circulating clonal lymphocytes in myeloma constitute a minor subpopulation of B cells. *Blood* 87: 1972-6.
- Chen Q, Van der Sluis PC, Boulware D, Hazlehurst LA, Dalton WS (2005). The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 106: 698-705.
- Chou. T. C. and Talalay P. (1983) Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharmacol. Sci.* 4: 450-454.
- Chou. T. C. and Talalay. P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Regul.* 22: 27-55.
- Chou TC (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58: 621-81.
- Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party (2003) High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348: 1875-83
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6: 443-6.
- Crawley C, Iacobelli S, Björkstrand B, Apperley JF, Niederwieser D, Gahrton G (2007) Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood* 109: 3588-94.

Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95: 2630-6.

DGHO Leitlinien (2010), Autoren der aktuellen Version: M. Kortüm, H. Einsele, R. Naumann, D. Peest, P. Liebisch, H. Goldschmidt [Online im Internet.] URL: <http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/multiples-myelom> [Stand: 02.11.2012, 16:33 Uhr].

Di Bernardo A, Macor P, Guarnotta C, Franco G, Florena AM, Tedesco F, Tripodo C (2010) Humoral immunotherapy of multiple myeloma: perspectives and perplexities. *Expert Opin Biol Ther* 10: 863-73.

Dillman RO (2011) Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 26: 1-64.

Drewinko B, Alexanian R, Boyer H, Barlogie B, Rubinow SI (1981) The growth fraction of human myeloma cells. *Blood* 57: 333-8.

Drexler HG, Matsuo AY, MacLeod RA (2000) Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. *Leuk Res* 24: 881-911.

Durie BG, Salmon SE (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36: 842-54.

Durie BG (2011), Multiples Myelom, International Myeloma Foundation, Handbuch 2011/12. [Online im Internet.] URL: <http://myeloma.org/ArticlePage.action?tabId=0&menuId=0&articleId=1659> [Stand: 02.11.2012, 16:44 Uhr]

Einsele H, Schäfer HJ, Hebart H, Bader P, Meisner C, Plasswilm L, Liebisch P, Bamberg M, Faul C, Kanz L (2003) Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning. *Br J Haematol* 121: 411-8.

Eiermann TH, Lambrecht P, Zander AR (1999) Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow recipients. *Bone Marrow Transplant* 23: 779-81.

EMA-Fachinformation (2012) [Online im Internet.] URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000539/WC500048471.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000539/WC500048471.pdf) [Stand: 02.11.2012, 17:14Uhr]

Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, Renaud M, Harousseau JL, Guillerme G, Chateix C, Dib M, Voillat L, Maisonneuve H, Troncy J, Dorvaux V, Monconduit M, Martin C, Casassus P, Jaubert J, Jardel H, Doyen C, Kolb B, Anglaret B, Grosbois B, Yakoub-Agha I, Mathiot C, Avet-Loiseau H; Intergroupe Francophone du Myélome (2007) Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 370: 1209-18.

Fernand JP, Katsahian S, Divine M, Leblond V, Dreyfus F, Macro M, Arnulf B, Royer B, Mariette X, Pertuiset E, Belanger C, Janvier M, Chevret S, Brouet JC, Ravaud P; Group Myelome-Autogreffe (2005) High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe. *J Clin Oncol* 23: 9227-33.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-61.

Finke J, Bertz H, Schmoor C, Veelken H, Behringer D, Wäsch R, Kunzmann R, Heidecker L, Lang H, Meyer-König U, Mertelsmann R (2000) Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors using in vivo anti-T-cell globulin. *Br J Haematol* 111: 303-13.

Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhäuser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socié G; ATG-Fresenius Trial Group (2009) Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol* 10: 855-64.

Fischer L, Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, Uharek L (2006) The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol* 34: 753-9.

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H (2004) Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 64: 1546-58.

Fruehauf S, Topaly J, Wilmes A, Ho AD (2001) Durchflusszytometrische Diagnostik maligner hämatopoetischer Erkrankungen, überreicht durch BD Bioscience, Sonderdruck aus: Zeller - zur Hausen - Onkologie, Ecomed Verlagsgesellschaft 2001

Funaro A, Spagnoli GC, Ausiello CM, Alessio M, Roggero S, Delia D, Zaccolo M, Malavasi F. (1990) Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol.* 145: 2390-6.

Gahrton G, Tura S, Flesch M, Gratwohl A, Gravett P, Lucarelli G, Michallet M, Reiffers J, Ringdén O, van Lint MT, et al (1987) Bone marrow transplantation in multiple myeloma: report from the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation. *Blood* 69:1262-4.

Gahrton G, Tura S, Ljungman P, Bladé J, Brandt L, Cavo M, Façon T, Gratwohl A, Hagenbeek A, Jacobs P, et al (1995) Prognostic factors in allogeneic bone marrow transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 13: 1312-22.

Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, Gorter A (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 25: 158-64.

Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N (1998) Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91: 2360-8.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18: 295-304.

Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB, et al (1988) Bone marrow transplantation for chronic

myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 108: 806-14.

Ghosh N, Matsui W (2009) Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer Lett* 277: 1-7.  
Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, et al (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7: 13-21.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J (2005) International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23: 3412-20.

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91: 3-21.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, et al (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-62.

Huff CA, Matsui W (2008) Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26: 2895-900.

Hulin C, Facon T, Rodon P, Pegourie B, Benboubker L, Doyen C, Dib M, Guillermin G, Salles B, Eschard JP, Lenain P, Casassus P, Azaïs I, Decaux O, Garderet L, Mathiot C, Fontan J, Lafon I, Virion JM, Moreau P (2009) Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. *J Clin Oncol* 27: 3664-70.

Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. (2001) The Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Growth, Induces Apoptosis, and Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells *Cancer Res* 61:3071-3076.

Jensen GS, Mant MJ, Pilarski LM (1992) Sequential maturation stages of monoclonal B lineage cells from blood, spleen, lymph node, and bone marrow from a terminal myeloma patient. *Am J Hematol* 41: 199-208.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522-5.

Kapoor P, Greipp PT, Morice WG, Rajkumar SV, Witzig TE, Greipp PR (2008) Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 141: 135-48.

Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76: 2462-5.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7.

Kröger N, Sayer HG, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Nagler A, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Ayuk F, Wittkowsky G, Schmitz N, Zander AR (2002a) Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 100: 3919-24.

- Kröger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Sayer HG, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Tögel F, Wittkowsky G, Kuse R, Zander AR (2002b) Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood* 100: 755-60.
- Kröger N, Badbaran A, Lioznov M, Schwarz S, Zeschke S, Hildebrand Y, Ayuk F, Atanackovic D, Schilling G, Zabelina T, Bacher U, Klyuchnikov E, Shimoni A, Nagler A, Corradini P, Fehse B, Zander A (2009) Post-transplant immunotherapy with donor-lymphocyte infusion and novel agents to upgrade partial into complete and molecular remission in allografted patients with multiple myeloma. *Exp Hematol*. 37: 791-8.
- Kröger N, Einsele H, Derigs G, Wandt H, Krüll A, Zander A (2010) Long-term follow-up of an intensified myeloablative conditioning regimen with in vivo T cell depletion followed by allografting in patients with advanced multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 861-4.
- Kuehl WM, Bergsagel PL (2002) Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2: 175-87.
- Kühne A., Sezer O., Heider U., Meineke I., Muhlke S., Niere W., Overbeck T., Hohloch K., Trümper L., Brockmöller J., Kaiser R. (2008): Population pharmacokinetics of melphalan and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to side effects. *Clinical pharmacology and therapeutics* 83: 749-757.
- Kumar A, Loughran T, Alsina M, Durie BG, Djulbegovic B (2003) Management of multiple myeloma: a systematic review and critical appraisal of published studies. *Lancet Oncol* 4: 293-304.
- Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA (2008) Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111: 2516-20
- Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, Gertz MA, Greipp PR, Hayman SR, Kyle RA, Lacy MQ, Lust JA, Reeder CB, Roy V, Russell SJ, Short KE, Stewart AK, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dalton RJ, Rajkumar SV, Bergsagel PL (2009) Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc* 84: 1095-110.
- Kuruvilla J, Shepherd JD, Sutherland HJ, Nevill TJ, Nitta J, Le A, Forrest DL, Hogge DE, Lavoie JC, Nantel SH, Toze CL, Smith CA, Barnett MJ, Song KW (2007) Long-term outcome of myeloablative allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 925-31.
- Kyle RA, Rajkumar SV (2002) Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Rev Clin Exp Hematol* 6: 225-52.
- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR (2003) Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 78: 21-33.
- Kyle RA, Rajkumar SV (2004) Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351: 1860-73.
- Kyle RA, Rajkumar SV (2008) Multiple myeloma. *Blood* 111: 2962-72.

- Kyle RA, Rajkumar SV (2009) Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 23: 3-9.
- Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro M; International Myeloma Working Group (2010) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 24: 1121-7.
- Landgren O, Kyle RA, Rajkumar SV (2011) From myeloma precursor disease to multiple myeloma: new diagnostic concepts and opportunities for early intervention. *Clin Cancer Res* 17: 1243-52.
- Lecoeur H, Gougeon ML (1996) Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *J Immunol Methods* 198: 87-99.
- Lecoeur H, Ledru E, Prévost MC, Gougeon ML (1997) Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 209: 111-23.
- Lecoeur H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML (2002) Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods* 265: 81-96.
- Lecoeur H, Melki MT, Saïdi H, Gougeon ML (2008) Analysis of apoptotic pathways by multiparametric flow cytometry: application to HIV infection. *Methods Enzymol* 442: 51-82.
- Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 675-99.
- Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, van Oers MH, Fibbe W, Russell I, Donk NW, Verdonck LF (2000) Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. *J Clin Oncol* 18: 3031-7.
- Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, et al (1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368: 856-9.
- Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, Dejbakhsh-Jones S, Grumet FC, Shizuru JA, Laport GG, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Hoppe RT, Bloch DA, Blume KG, Negrin RS, Strober S (2005) Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 353: 1321-31.
- Ludwig H, Beksac M, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Cavo M, Dimopoulos M, Drach J, Einsele H, Facon T, Goldschmidt H, Harousseau JL, Hess U, Ketterer N, Kropff M, Mendeleeva L, Morgan G, Palumbo A, Plesner T, San Miguel J, Shpilberg O, Sondergeld P, Sonneveld P, Zweegman S (2010) Current multiple myeloma treatment strategies with novel agents: a European perspective. *Oncologist* 15: 6-25.

- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G (1991) Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222: 581-97.
- Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE, et al (1990) A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76: 1464-72.
- Mateos MV, Hernández JM, Hernández MT, Gutiérrez NC, Palomera L, Fuertes M, Díaz-Mediavilla J, Lahuerta JJ, de la Rubia J, Terol MJ, Sureda A, Bargay J, Ribas P, de Arriba F, Alegre A, Oriol A, Carrera D, García-Laraña J, García-Sanz R, Bladé J, Prósper F, Mateo G, Esseltine DL, van de Velde H, San Miguel JF (2006) Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood* 108: 2165-72.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ (2004) Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 103: 2332-6.
- Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, McNiece I, Lin L, Ambinder RF, Peacock C, Watkins DN, Huff CA, Jones RJ (2008) Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 68: 190-7.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-4.
- Mohty M (2007) Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 21:1387-94.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6851-5.
- Mu B, Yang JL, Gou LT, Yao YQ, Zhou Y, Cheng ZH, Shi HS, Li ZY, Wen Y, Leng F, Cui FY, Ma TT, Wei YQ (2011) Polyclonal rabbit anti-murine plasmacytoma cell globulins induce myeloma cells apoptosis and inhibit tumour growth in mice. *Apoptosis* 16: 370-81.
- Nagler A, Aker M, Or R, Naparstek E, Varadi G, Brautbar C, Slavin S (2001) Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 29: 362-70.
- Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, Ueda Y, Abe T, Matsuda F, Kashima K, Taniwaki M (1997) The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood* 90: 526-34.
- Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES (2001) Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 13: 1551-9.
- Odom LF, August CS, Githens JH, Humbert JR, Morse H, Peakman D, Sharma B, Rusnak SL, Johnson FB (1978) Remission of relapsed leukaemia during a graft-versus-host reaction. A "graft-versus-leukaemia reaction" in man? *Lancet* 2: 537-40.
- Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM (1993) Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol* 32: 417-24.

Palumbo A, Sezer O, Kyle R, Miguel JS, Orłowski RZ, Moreau P, Niesvizky R, Morgan G, Comenzo R, Sonneveld P, Kumar S, Hajek R, Giral S, Brinchen S, Anderson KC, Richardson PG, Cavo M, Davies F, Bladé J, Einsele H, Dimopoulos MA, Spencer A, Dispenzieri A, Reiman T, Shimizu K, Lee JH, Attal M, Boccadoro M, Mateos M, Chen W, Ludwig H, Joshua D, Chim J, Hungria V, Turesson I, Durie BG, Lonial S; IMWG (2009) International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 23: 1716-30.

Palumbo A, Anderson K (2011) Multiple myeloma. *N Engl J Med* 364: 1046-60.

Penack O, Fischer L, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Rieger K, Ganepola S, Thiel E, Uharek L (2007) The type of ATG matters - natural killer cells are influenced differentially by Thymoglobulin, Lymphoglobulin and ATG-Fresenius. *Transpl Immunol* 18: 85-7.

Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dalglish AG, Gibson FM (1996) The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 87: 2244-51

Prévile X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP (2001) Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model 71: 460-8.

Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC (2009) Multiple myeloma. *Lancet* 374: 324-39.

Radl J, Croese JW, Zurcher C, Van den Enden-Vieveen MH, de Leeuw AM (1988) Animal model of human disease. Multiple myeloma. *Am J Pathol* 132: 593-7.

Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, Speck B, Young NS (1986) Biological and immunological characterization of ATG and ALG. *Blood* 68: 712-9.

Rajkumar SV, Kyle RA (2005) Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 80: 1371-82.

Rajkumar SV (2011) Multiple myeloma: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 86: 57-65.

Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM (1994) A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 57: 685-94.

Richardson PG, Lonial S, Jakubowiak AJ, Harousseau JL, Anderson KC (2011) Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol* 154: 745-754.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-7.

Ringdén O, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Uhlin M (2009) The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br J Haematol* 147: 614-33.

Roodman GD (2002) Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Res* 17: 1921-5.

- Rosiñol L, Pérez-Simón JA, Sureda A, de la Rubia J, de Arriba F, Lahuerta JJ, González JD, Díaz-Mediavilla J, Hernández B, García-Frade J, Carrera D, León A, Hernández M, Abellán PF, Bergua JM, San Miguel J, Bladé J; Programa para el Estudio y la Terapéutica de las Hemopatías Malignas y Grupo Español de Mieloma (PETHEMA/GEM) (2008) A prospective PETHEMA study of tandem autologous transplantation versus autograft followed by reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 112: 3591-3.
- Rothe G (2007) Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tarnock A, Rothe G (Hrsg) *Zelluläre Diagnostik – Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. Karger, Freiburg-Basel, S.27-70.
- Salmon SE, Shadduck RK, Schilling A (1967) Intermittent high-dose prednisone (NSC-10023) therapy for multiple myeloma. *Cancer Chemother Rep* 51: 179-87.
- San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG; VISTA Trial Investigators (2008) Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 359: 906-17.
- Schleuning M, Günther W, Tischer J, Ledderose G, Kolb HJ (2003) Dose-dependent effects of in vivo antithymocyte globulin during conditioning for allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors in patients with chronic phase CML. *Bone Marrow Transplant* 32: 243-50.
- Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13: 204-8.
- Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV (1994) A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 170: 145-57.
- Szczepek AJ, Seeberger K, Wizniak J, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM (1998) A high frequency of circulating B cells share clonotypic Ig heavy-chain VDJ rearrangements with autologous bone marrow plasma cells in multiple myeloma, as measured by single-cell and in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 92: 2844-55.
- Stewart AK, Richardson PG, San-Miguel JF (2009) How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood* 114: 5436-43.
- Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, Kline MP, Greipp PR, Rajkumar SV, Kumar SK (2006) Thymoglobulin targets multiple plasma cell antigens and has in vitro and in vivo activity in multiple myeloma. *Leukemia* 20: 1863-9.
- Treon SP, Pilarski LM, Belch AR, Kelliher A, Preffer FI, Shima Y, Mitsiades CS, Mitsiades NS, Szczepek AJ, Ellman L, Harmon D, Grossbard ML, Anderson KC (2002) CD20-directed serotherapy in patients with multiple myeloma: biologic considerations and therapeutic applications. *J Immunother* 25: 72-81.
- Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, Hilton J, Munshi N, Barlogie B (1996) Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood* 87: 1196-8.

- Tuffaha M S.A. (2008) Phenotypic and Genotypic Diagnosis of Malignancies. An Immunohistochemical and Molecular Approach. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, S.42.
- Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1996) A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131-9.
- Verdonck LF, Lokhorst HM, Dekker AW, Nieuwenhuis HK, Petersen EJ (1996) Graft-versus-myeloma effect in two cases. *Lancet* 347: 800-1.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
- Waring P, Lambert D, Sjaarda A, Hurne A, Beaver J (1999) Increased cell surface exposure of phosphatidylserine on propidium iodide negative thymocytes undergoing death by necrosis. *Cell Death Differ* 6: 624-37.
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R (1979) Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300: 1068-73.
- Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED (1981) Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 304: 1529-33.
- Wilcoxon F (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 1: 80-83.
- Williamson EC, Millar MR, Steward CG, Cornish JM, Foot AB, Oakhill A, Pamphilon DH, Reeves B, Caul EO, Warnock DW, Marks DI (1999) Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 104: 560-8.
- Yoshimi A, Ito M, Kojima S (2005) Leukemic cell death induced by antithymocyte globulin. *Leuk Res* 29: 821-7.
- Zamai L, Canonico B, Luchetti F, Ferri P, Melloni E, Guidotti L, Cappellini A, Cutroneo G, Vitale M, Papa S (2001) Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells. *Cytometry* 44: 57-64.
- Zand MS, Vo T, Huggins J, Felgar R, Liesveld J, Pellegrin T, Bozorgzadeh A, Sanz I, Briggs BJ (2005) Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* 79: 1507-15.
- Zand MS, Vo T, Pellegrin T, Felgar R, Liesveld JL, Ifthikharuddin JJ, Abboud CN, Sanz I, Huggins J (2006a) Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood* 107: 2895-903.
- Zand MS (2006b) B-cell activity of polyclonal antithymocyte globulins. *Transplantation* 82: 1387-95.

Zander AR, Zabelina T, Kröger N, Renges H, Krüger W, Löliger C, Dürken M, Stockschräder M, de Wit M, Wacker-Backhaus G, Bielack S, Jaburg N, Rüssmann B, Erttmann R, Kabisch H (1999) Use of a five-agent GVHD prevention regimen in recipients of unrelated donor marrow. *Bone Marrow Transplant* 23: 889-93.

Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, Boiron JM, Bataille R, Klein B (1994) Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 83: 3654-63.

Zojer N, Kirchbacher K, Vesely M, Hübl W, Ludwig H (2006) Rituximab treatment provides no clinical benefit in patients with pretreated advanced multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 47: 1103-9.

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Francis Ayuk, für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung und die Freiheit in der Ausgestaltung dieser Arbeit.

Ich danke Ulrike Larsen sowie Sandra Hannemann für die gute Einarbeitung und Betreuung im Labor.

Herrn Prof. Dr. Boris Fehse und allen seinen Mitarbeitern danke ich sehr, für die Möglichkeit der Labormitbenutzung, für die überragend gute Arbeitsatmosphäre sowie für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Kerstin Cornils, vor allem für Ihre moralische Unterstützung.

Melanie Lachmann und Regine Thiele danke ich für die zahlreichen konstruktiven Hilfestellungen bei der Messung und Auswertung von FACS-Analysen.

Für die Einführung und Betreuung im Isotopenlabor bedanke ich mich herzlich bei Dagmara Niedzielska.

Meinen Eltern und Ihren Partnern danke ich sehr für ihre liebevolle moralische und finanzielle Unterstützung, die mir mein Studium und diese Doktorarbeit ermöglichte.

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

A. Schieferdecker