

Neue Ansätze für eine Antikörper-basierte Therapie CD20⁺ lymphoider Neoplasien

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Tina Otz

aus Pforzheim

vorgelegte

Dissertation

2008

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2008
Dekan: Prof. Dr. H. Mallot
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt“

Sir Isaak Newton

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Englische Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)	6
1.2 Therapeutische Antikörper: Antikörperstruktur und Effektormechanismen	9
1.3 Antikörpertherapie für die Behandlung von NHL	16
1.4 Rekombinante Antikörper und neue Antikörperformate	21
1.5 Bispezifische Antikörper	27
1.6 Zielsetzung	41
2 Material und Methoden	43
2.1 Material	45
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden zur Konstruktion und Klonierung rekombinanter Antikörper	63
2.3 Zellbiologische Methoden eukaryontischer Zellen	70
2.4 Chromatographische Verfahren	75
2.5 Proteinchemische Methoden	78
2.6 Analytische Methoden	83
2.7 Funktionelle Charakterisierung der produzierten Antikörper	85
2.8 <i>In vivo</i> -Immuntherapieversuche	88
3 Ergebnisse	90
3.1 Optimierung des monoklonalen chimären α CD20-Antikörpers 2H7-IgG1	92
3.2 Panklonale T-Zellstimulation und Lyse CD20-positiver Zielzellen mit dem bispezifischen <i>single-chain</i> Antikörper r2820	100
3.3 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen CD20 x CD95-Konstrukten	116

3.4	Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination aus 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt	134
4	Diskussion	144
4.1	Optimierung des monoklonalen chimären α CD20-Antikörpers 2H7-IgG1	147
4.2	Supra-agonistische CD28-Stimulation mit dem rekombinanten bispezifischen <i>single-chain</i> Antikörper r2820	152
4.3	Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen CD95xCD20-Konstrukten	159
4.4	Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination aus 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt	165
5	Literaturverzeichnis	168
6	Anhang	185
6.1	Abkürzungsverzeichnis	185
6.2	Vektorkarten	188
6.3	Eigene Publikationen	192

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die allgemeine Struktur eines Antikörpers am Beispiel eines IgG-Moleküls	9
1.2	Leichte Kette eines Antikörpermoleküls im Detail	10
1.3	Formate therapeutischer Antikörper	11
1.4	Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	12
1.5	Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	13
1.6	CD20	19
1.7	Komplexes, biantennäres, N-gebundenes Oligosaccharid eines humanen IgG1-Antikörpers	23
1.8	IgG1-Fc-Fc γ RIII-Komplex	24
1.9	Repräsentative Antikörperformate	25
1.10	Das bispezifische Prinzip	28
1.11	Modell zur Bindung super-agonistischer und konventioneller α CD28-Antikörper	32
1.12	Schematische Darstellung des DISC	35
1.13	Typ I und II der CD95-induzierten Apoptose	37
1.14	Bindungsmöglichkeiten bispezifischer F(ab') ₂ -Fragmente mit Spezifität Tumorantigen x CD95	40
2.1	Vektorkarte <i>pPCR-ScriptTM AmpSK(+)</i> Cloning-Vektor	57
2.2	Vektorkarte <i>pSeqTag2/Hygro</i>	57
2.3	Vektorkarte <i>CD20pSec</i>	58
2.4	Vektorkarte <i>Kozak Splice</i>	58
2.5	Vektorkarte <i>2H7-kappa</i>	59
2.6	Vektorkarte <i>2H7-IgG1-Fc-mut</i>	59
2.7	Vektorkarte <i>Mel-myc</i>	59
2.8	Herstellung bispezifischer F(ab') ₂ -Fragmente	79
3.1	Chromatogramm zur Elution des 2H7-IgG1-Antikörpers (produziert in Sp2/0-Ag14) von einer Protein A-Säule	93

3.2	Analytische Charakterisierung der verschiedenen 2H7-Antikörper mittels SDS-PAGE-Analyse	94
3.3	Titration der verschiedenen 2H7-Antikörper auf der CD20-positiven humanen B-Lymphomzelllinie Raji	95
3.4	⁵¹ Cr-Freisetzungstest zur Evaluierung des Einflusses einer DE-Modifikation des Fc-Teils des 2H7-Antikörpers auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität	96
3.5	⁵¹ Cr-Freisetzungstest zur Evaluierung des Einflusses einer verminderten Fucosylierung des 2H7-Antikörpers auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität	97
3.6	Einfluß der Kombination der DE-Modifikation und einer geringen Fucosylierung auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität . . .	98
3.7	Direkte Apoptoseinduktion durch die α CD20-Antikörper Rituxan und 2H7	99
3.8	Übersicht über das Klonierungsschema des r2820	101
3.9	Protein L-Affinitätschromatographie zur Reinigung des bispezifischen <i>single-chain</i> Antikörpers r2820	102
3.10	Schematische Darstellung des r2820	103
3.11	Analytische Charakterisierung des r2820	104
3.12	Titration des gereinigten r2820	105
3.13	[³ H]-Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung	106
3.14	[³ H]-Thymidin-Inkorporationsassay zum Beweis der Abhängigkeit der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung vom Vorhandensein des Zielantigens CD20	107
3.15	[³ H]-Thymidin-Inkorporationsassay zum Beweis der Abhängigkeit der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung vom Vorhandensein CD20 ⁺ -Zielzellen	108
3.16	ELISA zum Nachweis der IL-2-Produktion r2820-behandelter PBMC bzw. B-Zell-depletierter PBMC	109
3.17	[³ H]-Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der supra-agonistischen T-Zellaktivierung des r2820 und des 2H7 x 9.3	111
3.18	[³ H]-Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der supra-agonistischen T-Zellaktivierung der monomeren und multimeren Form des r2820	112

3.19	[³ H]-Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung in PBMC-Präparationen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)	113
3.20	r2820-induzierte Tumorzelllyse	115
3.21	Gelfiltrationschromatogramme von APO-1 und Rituxan nach proteolytischem Pepsin-Verdau	118
3.22	Gelfiltrationsprofil der Hybridisierung des bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmentes Rit x APO-1	119
3.23	Analytische Charakterisierung des bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmentes Rit x APO-1 mittels SDS-PAGE-Analyse und analytischer Gelfiltration	120
3.24	Durchflußzytometrische FACS-Analyse zur Bestimmung des Bindungsverhaltens des bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmentes Rit x APO-1 auf Zielantigen-positiven Zellen	121
3.25	Induktion der Tumorzelllyse durch verschiedene bispezifische CD20 x APO-1-F(ab') ₂ -Fragmente im sensitiven Lymphommodell mit SKW6.4	123
3.26	Erfordernis der Bispezifität	124
3.27	Abhängigkeit vom Vorhandensein beider Zielantigene bei der Rit x APO-1 induzierten Tumorzelllyse	125
3.28	Rit x APO-1-induzierte Tumorzelllyse verschiedener humaner B-Lymphomzelllinien	126
3.29	Vergleich der durch Rit x APO-1 bzw. 2H7 x APO-1 induzierten Tumorzelllyse im „insensitiveren“ Lymphommodell	128
3.30	Getestete Apoptose-Sensitivierer in Kombination mit Rit x APO-1	130
3.31	Immuntherapie mit dem bispezifischen F(ab') ₂ -Fragment Rit x APO-1 in einem SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4	132
3.32	„Indirektes setting“: Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination des 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1	134
3.33	Präparative Gelfiltrationen zur Herstellung des bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmentes 9E10 x APO-1	135
3.34	Durchflußzytometrische FACS-Analyse zur Bestimmung des Bindungsverhaltens des bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmentes 9E10 x APO-1	137
3.35	Übersicht über das Klonierungsschema für den Anbau des c-myc-Epitops an den C-Terminus des 2H7-IgG1	138
3.36	Induktion der Tumorzelllyse durch Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem bs F(ab') ₂ -Fragment 9E10 x APO-1	140
3.37	Abhängigkeit der 9E10 x APO-1 induzierten Tumorzelllyse vom Vorhandensein des c-myc-Epitops am 2H7-IgG1-myc-Antikörper	141

3.38	Vergleich der 2H7 x APO-1 induzierten mit der durch eine Kombination aus 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 induzierten Tumorzelllyse der B-Lymphomzelllinie C1R	143
6.1	Vektorkarte <i>2H7-IgG1</i>	188
6.2	Vektorkarte <i>2H7-IgG1-DE</i>	189
6.3	Vektorkarte <i>2H7-IgG1-Fc-mut-myc</i>	190
6.4	Vektorkarte <i>r2820</i>	191

Tabellenverzeichnis

1.1	Charakteristika der humanen $Fc\gamma R$ -Klassen	14
1.2	Auswahl durch die FDA zugelassener Antikörper und Antikörper- Konjugate für die Krebstherapie	17
1.3	Eigenschaften verschiedener Antikörperformate	30
2.1	Konjugierte Antikörper	60
2.2	Bispezifische Antikörper	60
2.3	Unkonjugierte Antikörper	61
2.4	Zelllinien	62
2.5	Relative Bindungsstärke Antikörper-bindender Proteine	76
2.6	Mischtabelle für SDS-Polyacrylamid-Gele	83
2.7	Versuchsschema für Immuntherapieversuche	89

Zusammenfassung

Die Behandlung lymphoider Neoplasien konnte in den letzten Jahren insbesondere durch Antikörper-basierte Therapeutika deutlich verbessert werden. Dennoch stellen Rezidive weiterhin ein schwerwiegendes Problem dar, weshalb ein großer Bedarf an innovativen Therapieoptionen besteht.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Entwicklung und funktionellen Charakterisierung neuer Antikörper-basierter Immuntherapeutika. Dabei wurden folgende Moleküle untersucht, welche auf unterschiedliche Weise wirken, die aber alle gegen das CD20-Antigen auf Lymphomzellen gerichtet sind:

- **Monospezifische α CD20-Antikörper mit optimiertem Fc-Teil**

Wie die Erfolgsgeschichte des chimären monoklonalen α CD20-Antikörper Rituximab zeigt, stellen derartige Antikörper einen effizienten Ansatz bei der Therapie von B-Zell-Lymphomen dar. Dabei spielt die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) eine wesentliche Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf den Arbeiten von Lazar et al. [Lazar et al., 2006] und mit Hilfe von durch L. Große-Hovest (Abt. Immunologie, Universität Tübingen) entwickelten Expressionsvektoren ein Austausch der Aminosäuren S₂₉₃ \rightarrow D₂₉₃ und I₃₃₂ \rightarrow E₃₃₂ im Fc-Teil des α CD20-Antikörpers 2H7 durchgeführt. Dadurch konnte die Effizienz der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert werden. Dies ist auf eine verbesserte Interaktion mit den aktivierenden Fc γ -Rezeptoren von Effektorzellen zurückzuführen.

Auch durch einen einfachen Wechsel der Expressionszelllinie hin zu der gering-fucosylierenden Zelllinie YB2/0 konnte die ADCC-Effizienz wesentlich gesteigert werden. Durch eine Kombination der Aminosäure-Mutation und einer Expression in YB2/0-Zellen wurde jedoch keine weitere Verbesserung der ADCC-Effizienz erreicht.

- **Bispezifische Antikörper zur supra-agonistischen T-Zellstimulation über CD28**

Bispezifische Antikörper können so konstruiert werden, dass nur dann eine Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf Immunzellen möglich ist, wenn sie mit ihrem zweiten Arm gleichzeitig an das Zielantigen, in der Regel ein tumorassoziiertes Antigen, gebunden haben. Grosse-Hovest et al. gelang es 2003 erstmalig eine Zielzell-restringierte supra-agonistische CD28-Stimulation mit einem rekombinanten bispezifischen *single-chain* Antikörper mit Spezifität CD28 x NG2 (r28M) zu zeigen [Grosse-Hovest et al., 2003]. Im Rahmen

der vorliegenden Arbeit konnte für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r2820 mit Spezifität für CD28 und CD20 nachgewiesen werden, dass er die Fähigkeit zur Vermittlung einer Zielzell-restringierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung und einer Lyse CD20-positiver Zielzellen im vollständig autologen System besitzt. Dies zeigt, dass die Zielzell-restringierte supra-agonistische CD28-Stimulation keine besondere Eigenschaft der im r28M-Molekül enthaltenen Spezifität für NG2 ist, und dass die supra-agonistische Aktivität nicht durch allogene Effekte bedingt ist.

- **Bispezifische Antikörper zur selektiven Apoptoseinduktion über CD95**

Basierend auf der Beobachtung, dass bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 in der Lage sind, *in vitro*, in humanen CD95-sensitiven, Zielantigen-positiven Lymphomzellen (SKW6.4) Apoptose zu induzieren [Jung et al., 2001], wurden verschiedene bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 *in vitro* näher charakterisiert und auf verschiedenen, unterschiedlich sensitiven B-Lymphomzelllinien untersucht. Erstmals konnte in Immuntherapieversuchen in einem SCID-Maus-Xenograft-Modell gezeigt werden, dass solche bispezifischen F(ab')₂-Fragmente auch *in vivo* eine effektive Tumorzelllyse vermitteln können.

Zusätzlich wurde eine neue Variante der Stimulation des Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen Antikörpern evaluiert: Ein rekombinanter monoklonaler Antikörper gegen CD20 wurde am C-Terminus mit einem c-myc-Epitop versehen. Durch eine Kombination mit einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment mit Spezifität α myc x CD95 wurde es möglich, eine CD95-vermittelte Apoptose der Tumorzellen zu induzieren.

Der wesentliche Vorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, ein universell einsetzbares bispezifisches F(ab')₂-Fragment verwenden zu können, so dass nicht für jedes Zielantigen ein neues F(ab')₂-Fragment aus den jeweiligen Ausgangsantikörpern hybridisiert werden muss. Dadurch kann die Problematik der aufwendigen Produktion bispezifischer Antikörper, die die klinische Applikation dieser Substanzen bis heute behindert, in der Zukunft deutlich abgemildert werden.

Die prä-klinischen Studien dieser Arbeit verdeutlichen das hohe Potential Antikörper-basierter Therapeutika die gegen das CD20-Antigen gerichtet sind und zeigen neue Wege auf, wie die therapeutische Aktivität von α CD20-Antikörpern verbessert werden kann.

Englische Zusammenfassung

Treatment of lymphoid malignancies has improved considerably over the last years due to antibody-based therapeutics. Nevertheless relapse remains a major problem and the development of innovative therapeutic options is highly desirable. The central aim of this thesis was the development and functional characterization of antibody-based immunotherapeutics. In this thesis the following molecules were produced and characterized which exert their therapeutic effects in different ways, but which are all directed against the CD20-antigen on lymphoma cells:

- **Monospecific α CD20-antibodies with optimized Fc-part**

The success story of the chimeric monoclonal α CD20-antibody Rituximab demonstrates that monoclonal α CD20-antibodies are an efficient modality for the treatment of B-cell lymphomas. The antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) plays an essential role in mediating this activity. Based on the work of Lazar et al. [Lazar et al., 2006] and using expression vectors developed by L. Große-Hovest (Department of Immunology, University of Tübingen) the amino acids S₂₉₃ \rightarrow D₂₉₃ and I₃₃₂ \rightarrow E₃₃₂ in the Fc-part of the α CD20-antibody 2H7 were exchanged. This led to an increase in the efficacy of antibody-mediated cellular cytotoxicity by several orders of magnitude. In addition by a simple change of the expression cell line to the lower fucosylating YB2/0 cells a considerable increase of ADCC efficacy could be achieved. A combination of the mutation and expression approach did not further increase the ADCC-efficiency.

- **Bispecific antibodies for a supra-agonistic T-cell stimulation via CD28**

Certain bispecific antibodies mediate the activation of surface receptors in a target cell restricted way. In 2003 Grosse-Hovest et al. showed for the first time a target-cell restricted, supra-agonistic CD28-stimulation using a recombinant bispecific *single-chain* antibody with CD28 x NG2 specificity (r28M) [Grosse-Hovest et al., 2003]. In this thesis it could be demonstrated that the bispecific *single-chain* antibody r2820 with specificity for CD28 and CD20 has the ability to mediate a target-cell restricted, supra-agonistic T-cell stimulation and tumor cell lysis in an autologous system. Thus, target-cell restricted supra-agonistic CD28-stimulation is neither a property of the particular antibodies contained in the r28M molecule nor is it due to allogeneic

effects.

- **Bispecific antibodies for selective induction of CD95-mediated apoptosis**

Bispecific F(ab')₂-fragments with CD20 x CD95 specificity are capable of inducing apoptosis in human CD95-sensitive, target-antigen positive lymphoma cells (SKW6.4) *in vitro* [Jung et al., 2001]. Therefore CD20 x CD95 bispecific F(ab')₂-fragments were further analysed *in vitro* using cell lines of different sensitivity towards CD95-mediated cell death. Furthermore, it could be shown for the first time that such bispecific F(ab')₂-fragments mediate a tumor cell lysis in a SCID-mouse-xenograft-model.

Moreover a completely new approach for a stimulation of the CD95 death receptor was evaluated: A c-myc-epitope was attached to the C-terminus of a recombinant monoclonal α CD20-antibody and was used in combination with a bispecific F(ab')₂-fragment with specificity α c-myc x α CD95. This combination of reagents induced a CD95-mediated apoptosis of the tumor cells.

The main advantage of this approach is the ability to use a universal bispecific F(ab')₂-fragment targeting tagged antitumor antibodies of different specificities. This attenuates the production problem for bispecific antibodies which hampered the clinical evaluation of these reagents over the years.

These preclinical studies indicate the high potential of CD20-directed, antibody-based therapeutics and show new approaches for the optimization of the therapeutic activity of α CD20-antibodies.

Kapitel 1

Einleitung

Inhalt

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)	6
1.1.1 Ursachen	7
1.1.2 Therapieformen	7
1.2 Therapeutische Antikörper: Antikörperstruktur und Effektormechanismen	9
1.2.1 Struktur von Antikörpern	9
1.2.2 Murine, chimärisierte, humanisierte und humane Antikörper	10
1.2.3 Effektormechanismen therapeutischer Antikörper	12
1.3 Antikörpertherapie für die Behandlung von NHL	16
1.3.1 Therapeutische Antikörper für NHL	17
1.3.2 CD20 als Zielantigen	19
1.3.3 Voraussetzungen für eine erfolgreiche Antikörpervermittelte Immuntherapie	20
1.4 Rekombinante Antikörper und neue Antikörperformate 21	
1.4.1 Optimierung monoklonaler Antikörper für eine verbesserte Interaktion mit Effektorzellen	21
1.4.2 Neue Antikörperformate	25
1.5 Bispezifische Antikörper	27
1.5.1 Das bispezifische Prinzip	28
1.5.2 Herstellung bispezifischer Antikörper	29
1.5.3 Expressionssysteme für bispezifische Antikörper	30
1.5.4 Bispezifische Antikörper zur Fokussierung zytotoxischer Effektoren	30
1.5.5 Bispezifische Antikörper zur Zielantigen-abhängigen Aktivierung des Todesrezeptors CD95	34
1.6 Zielsetzung	41

Mit etwa 200.000 Todesfällen pro Jahr ist Krebs in Deutschland nach Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache. Jährlich kommen in Deutschland etwa 400.000 Krebsneuerkrankungen hinzu. Dabei sind im Vergleich zu soliden Tumoren wie Brustkrebs, Darmkrebs, Lungenkrebs und Prostatakrebs Neoplasien des hämatopoietischen Systems mit einem Anteil von ca. 5% aller Tumorerkrankungen eher selten.

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Unter der Bezeichnung Non-Hodgkin-Lymphome werden eine Vielzahl bösartiger (maligner) Erkrankungen des lymphatischen Systems zusammengefasst. Wörtlich übersetzt bedeutet der Begriff „maligne Lymphome“ „bösartige Lymphknotenschwulst“. In der medizinischen Fachsprache ist damit eine große Gruppe von Krebserkrankungen gemeint, die von Zellen des lymphatischen Systems ausgehen und als ein Hauptmerkmal Lymphknotenschwellungen (= Lymphome) hervorrufen können.

Das erste maligne Lymphom wurde 1832 von dem englischen Arzt Dr. Thomas Hodgkin beschrieben. Kennzeichen der nach ihm benannten Hodgkin-Lymphome sind die so genannten Sternberg-Riesenzellen, die entstehen, wenn einige der erkrankten Zellen verschmelzen. Alle anderen malignen Lymphome, also die, bei denen die Sternberg-Riesenzellen nicht nachweisbar sind, werden insgesamt als Non-Hodgkin-Lymphome oder kurz NHL bezeichnet.

Mit den immer weiter verfeinerten Untersuchungsmethoden lassen sich Non-Hodgkin-Lymphome mittlerweile sehr genau charakterisieren. Heute schätzt man, dass es etwa 40 unterschiedliche Arten dieser Malignome gibt.

Non-Hodgkin-Lymphome können langsam oder schnell voranschreiten und werden demnach als indolente oder aggressive Non-Hodgkin-Lymphome bezeichnet. Die Non-Hodgkin-Lymphome sind Erkrankungen des höheren Alters - bei Frauen wird die Erkrankung im Schnitt mit 70, bei Männern mit etwa 66 Jahren festgestellt. Die Häufigkeit solcher Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen wobei die Ursachen hierfür nicht bekannt sind. Eventuell ist dieser statistische Anstieg durch eine bessere Erkennung und Erfassung der Lymphome sowie einer gesteigerten durchschnittlichen Lebenserwartung zu erklären (<http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/start.htm&check=0>).

1.1.1 Ursachen

Lymphome entstehen, wenn bestimmte Zellen des lymphatischen Systems, die Lymphozyten, infolge einer Veränderung im Erbgut entarten. Non-Hodgkin-Lymphome gehen zu 90 % von B-Lymphozyten und zu 10 % von T-Lymphozyten aus. Diese maligne „Entartung“ kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt während der B- oder T-Zellentwicklung auftreten. Eine „entartete“ Zelle vermehrt sich unaufhörlich weiter. Je unreifer eine Zelle zum Zeitpunkt der Entartung ist, desto aggressiver ist im Allgemeinen das entstehende Non-Hodgkin Lymphom.

Trotz intensiver Forschung und vieler verschiedener Studien ist die Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome noch nicht vollständig geklärt. Es gilt jedoch als gesichert, dass das Risiko ein NHL zu entwickeln mit einer Schwächung des Immunsystems ansteigt, wie es z.B. bei immunsuppressiver Medikation, nach einer Organtransplantation oder nach HIV-Infektion der Fall ist.

In einer im Jahre 1999 publizierten Case-Control-Studie konnte gezeigt werden, dass auch eine berufliche Exposition mit Chemikalien, insbesondere mit Herbiziden und organischen Lösungsmitteln, als risikosteigernd betrachtet werden muss [Hardell und Eriksson, 1999].

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass bestimmte Viren wie z.B. das Epstein-Barr-Virus oder das humane *T-cell-leukemia/lymphoma-virus 1* (HLTV-1) für die Entwicklung von bestimmten Lymphomentitäten verantwortlich sein könnten [Du et al., 2002; Hardell und Eriksson, 1999]. Als weitere Ursache gelten chromosomale Veränderungen (Mutationen) die mit zunehmendem Alter ansteigen und häufig bei Patienten mit NHL beobachtet werden. Eine für die NHL-Entstehung bedeutsame Mutation ist die Translokation des bcl-2 Gens [Beau, 1990].

1.1.2 Therapieformen

Die Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms richtet sich nach dem histologischen Subtyp und nach dem Stadium der Erkrankung. Die Therapieoptionen reichen vom abwartenden „Watchful Waiting“ bis hin zur aggressiven Hochdosis-Chemotherapie.

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen den niedrigmalignen und den hochmalignen Lymphomen.

Niedrigmaligne Lymphome zeichnen sich durch langsames Wachstum und einer chronischen Verlaufsform aus. Diese Gruppe zu der 70% aller Lymphome zählen, ist morphologisch durch kleine reife Lymphozyten gekennzeichnet. Niedrigmaligne Lymphome sind chronische Krankheiten, die nicht heilbar sind, sich aber durch

Behandlung aufhalten lassen.

Hochmaligne Lymphome machen 30% der Non-Hodgkin-Lymphome aus. Meist sind sie durch große unreife Zellen mit hoher Proliferationsaktivität gekennzeichnet. Diese Art von Non-Hodgkin-Lymphomen weist einen akuten Krankheitsverlauf auf und würde unbehandelt rasch zum Tode führen. Hochmaligne Lymphome sind auch in fortgeschrittenen Stadien, aufgrund eines guten Ansprechens auf Strahlen- und Chemotherapie, heilbar. Hier kommt die CHOP-Therapie als Standardtherapie zum Einsatz, die aus den Zytostatika Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison besteht (<http://www.aerztezeitung.de/docs/2002/04/05/063a0301.asp?cat=>).

Der Nachteil herkömmlicher Chemotherapien ist deren unspezifische Wirkung auf eine Vielzahl gesunder Gewebe. Deshalb liegen die für den Körper tolerierbaren Dosen oft im suboptimalen Bereich ihrer Wirksamkeit, so dass der Ausgang der Therapie häufig nicht zufriedenstellend ist [Allen, 2002]. Ein zusätzliches Problem stellt auch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zytostatika dar. Es besteht somit ein dringender Bedarf an neuen Behandlungsformen. Substanzen die gezielt auf Tumorzellen wirken und möglichst gesunde Gewebe verschonen, würden viele Nebenwirkungen der Zytostatika und der Bestrahlung verringern.

Neben Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie erlangt die Immuntherapie immer stärker an Bedeutung und stellt somit heutzutage eine vierte Säule unter den onkologischen Behandlungsmöglichkeiten dar. Ziel einer Immuntherapie maligner Erkrankungen ist es, das eigene Immunsystem gegen die Tumorzellen zu aktivieren, wobei zwischen aktiven und passiven Therapieverfahren unterschieden wird. Die aktive Immuntherapie beinhaltet die Generierung von zytotoxischen, zellulären oder humoralen Immunreaktionen. Die passive Immuntherapie, und dabei besonders der therapeutische Einsatz von monoklonalen Antikörpern ist mittlerweile klinisch etabliert. Der zunehmende Erfolg der passiven Immuntherapie insbesondere bei Lymphomen belegt, dass das Immunsystem erfolgreich gegen Krebserkrankungen eingesetzt werden kann.

1.2 Therapeutische Antikörper: Antikörperstruktur und Effektormechanismen

Mit der Herstellung monoklonaler Antikörper durch Milstein und Köhler Anfang der 70er Jahre gelang ein entscheidender Schritt in der passiven Immuntherapie, welcher insbesondere auch für die Hämatologie und Onkologie von entscheidender Bedeutung war [Köhler und Milstein, 1975].

1.2.1 Struktur von Antikörpern

Die Aufklärung der molekularen Struktur von Antikörpern erfolgte bereits in den sechziger Jahren durch Edelman [Edelman et al., 1969]. Antikörper der IgG-Subklasse bestehen aus je einem Paar identischer leichter (ca. 25 kDa) und schwerer (55 kDa) Polypeptidketten, die über intermolekulare Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind [Edelman, 1991]. Jede leichte und schwere Kette läßt sich wiederum in einzelne globuläre Domänen unterteilen, die jeweils über eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert werden und aus ungefähr 100 Aminosäuren aufgebaut sind (s. Abb. 1.1).

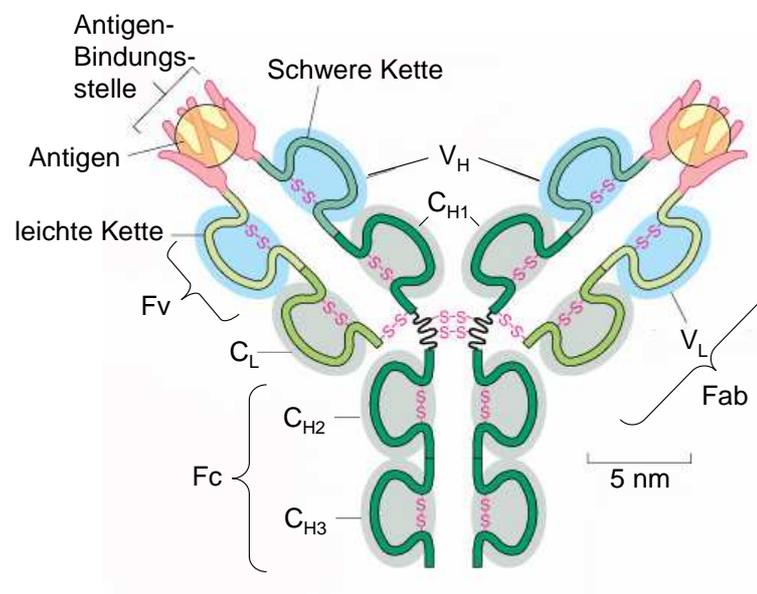


Abb. 1.1: Die allgemeine Struktur eines Antikörpers am Beispiel eines IgG-Moleküls
 Ein Antikörper besteht aus zwei identischen schweren (dunkel grün) und zwei identischen leichten Ketten (hell grün) die sich wiederum in einzelne Domänen gliedern lassen. Modifiziert nach http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody_molecule.html

Jede schwere Kette ist je nach Immunglobulin-Klasse aus 3 bis 4 konstanten (C_H) und einer variablen Domäne (V_H) aufgebaut. Die leichte Kette hingegen setzt sich aus nur einer konstanten Domäne (C_L) und einer variablen Domäne (V_L) zusammen (s. Abb. 1.2).

Schon früh wurde vermutet dass die variablen Domänen beider Ketten die Antigenbindungsstellen repräsentieren [Edelman et al., 1969]. In den variablen Domänen befinden sich 3 hypervariable Regionen (complementary determining regions) welche eine extreme Sequenzvariabilität aufweisen und von relativ konservierten Bereichen (framework regions) flankiert werden [Wu und Kabat, 1970].

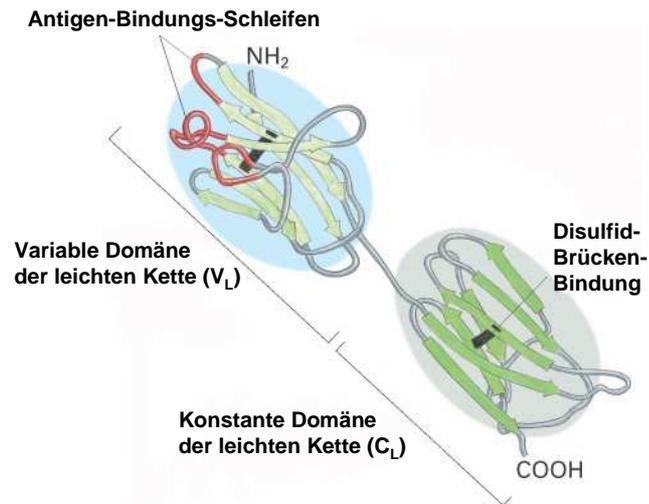


Abb. 1.2: Leichte Kette eines Antikörpermoleküls im Detail

Die Regionen der leichten Kette die am stärksten in die Antigenbindung involviert sind, sind in Rot dargestellt. Modifiziert nach http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody_molecule.html

1.2.2 Murine, chimärisierte, humanisierte und humane Antikörper

Nach der Etablierung der Hybridom-Technologie durch Milstein und Köhler Anfang der 70er Jahre [Köhler und Milstein, 1975] galten monoklonale Antikörper aus der Maus als potentielle Wundermittel für viele therapeutische Anwendungen. Es zeigte sich jedoch sehr schnell, dass diese Maus-Antikörper als Fremdproteine im menschlichen Körper ein hohes immunogenes Potential haben und Patienten denen aus der Maus stammende Antikörper injiziert werden anti-Maus-IgG Antikörper (Human Anti-Mouse Antibodies, HAMA) bilden. Diese unerwünschten Immunreaktionen beeinflussen nicht nur die Wirksamkeit des therapeutischen Antikörpers durch z.B. direkte Neutralisierung des applizierten Antikörpers, sondern können auch ernste Nebenwirkungen wie eine Induktion der Serumkrankheit bis hin zum anaphylaktischen Schock haben.

Weitere Nachteile der Verwendung von Maus-Antikörpern sind die nur geringe Interaktion mit humanen $Fc\gamma$ -Rezeptoren und der Komplement-Komponente C1q, was die Fähigkeit *in vivo* physiologische Effektormechanismen zu rekrutieren, stark herabsetzt. Außerdem zeigen Maus-Antikörper eine stark reduzierte Serum-

Halbwertszeit.

Heutzutage läßt sich dieses Problem teilweise oder ganz durch Chimärisierung bzw. Humanisierung von Antikörpern umgehen [Morrison et al., 1984; Jones et al., 1986] (s. Abb. 1.3). Bei chimärisierten Antikörpern werden die konstanten Regionen eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen die entsprechenden humanen Domänen ausgetauscht. Durch diesen Austausch wird die Affinität zum Zielantigen in der Regel nicht beeinträchtigt [Morrison et al., 1984; Boulianne et al., 1984], die Immunogenität der Antikörper wird dadurch jedoch reduziert.

Bei humanisierten Antikörpern sind nur noch die CDRs murinen Ursprungs, da hier auch zusätzlich noch die *framework*-Regionen der variablen Domänen ausgetauscht werden. Dieser Austausch geht jedoch häufig zu Lasten der Affinität, da er einen bedeutenden Eingriff in die Struktur der V-Domänen darstellt [Jones et al., 1986]. Mittlerweile ist es auch möglich vollständig humane Antikörper zu erzeugen. Die *Phage Display* Technologie bietet heute die Möglichkeit, humane Antikörper-Banken nach Antikörperfragmenten einer bestimmten Spezifität zu durchsuchen, welche dann, kombiniert mit humanen konstanten Regionen, voll humane Antikörper ergeben [Marks et al., 1991; Hoogenboom, 2005].

Eine andere Möglichkeit vollständig humane Antikörper zu gewinnen ist die Verwendung von Mäusen, die für die humanen Immunglobulin-Loci transgen sind (vergleiche [Brekke und Loset, 2003]). Die Immunisierung solcher transgener Mäuse mit dem gewünschten Antigen resultiert in der Bildung humaner Antikörper. Dadurch ist es möglich, auf klassische Art und Weise Hybridome zu etablieren, die spezifische, humane Antikörper produzieren [Lonberg, 2005; Green et al., 1994].

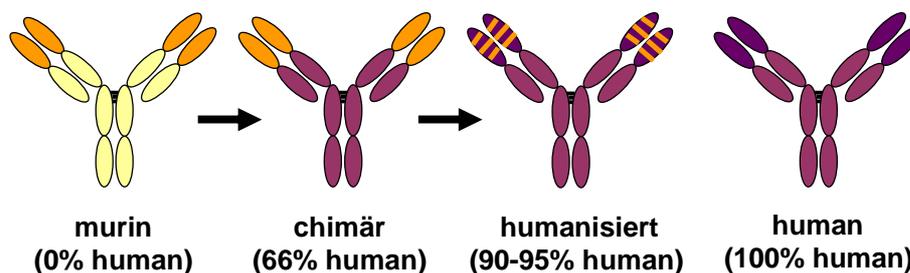


Abb. 1.3: Formate therapeutischer Antikörper

Die Immunogenität muriner Antikörper wurde schrittweise über chimäre und humanisierte Antikörper durch Reduktion der murinen Anteile verringert. Modifiziert nach [Sharkey und Goldenberg, 2006]

1.2.3 Effektormechanismen therapeutischer Antikörper

Antikörper können auf unterschiedliche Art und Weise wirken. Zum einen gibt es direkte Wirkmechanismen, bei denen durch Bindung des Antikörpers an das entsprechende Antigen Signale in der Zelle ausgelöst oder blockiert werden. Andererseits können Antikörper durch ihre konstanten Regionen Effektoren des Immunsystems rekrutieren und indirekte Wirkmechanismen vermitteln, was in der Eliminierung der Antikörper-beschichteten Zelle resultiert.

Direkte Wirkmechanismen

Die direkte Wirkung eines Antikörpers beruht allein auf der Bindung an sein Antigen, ist also unabhängig vom Fc-Teil und vom Isotyp des Antikörpers.

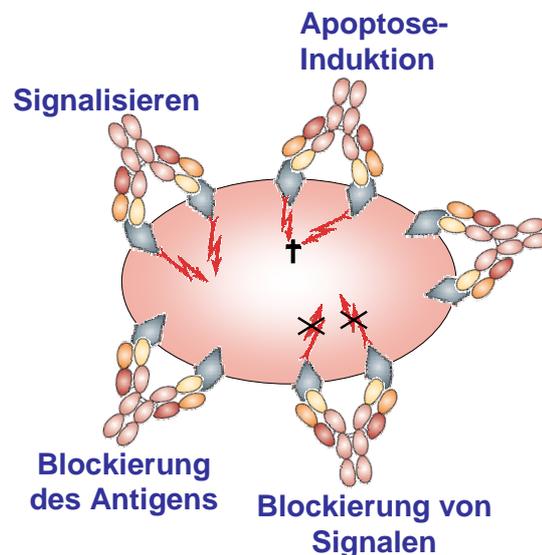


Abb. 1.4: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Abgewandelt nach [Glennie und Johnson, 2000]

So können Interaktionen zwischen Rezeptoren, wie z.B. für Wachstumsfaktoren und ihren Liganden, unterbunden werden, indem der Antikörper entweder den Liganden oder den Rezeptor selbst bindet und damit einen blockierenden Effekt ausübt (s. Abb.1.4). Auf die gleiche Art und Weise können auch Interaktionen zwischen zwei Zellen behindert werden. Dieser blockierende Mechanismus von Antikörpern kommt jedoch weniger bei der Krebstherapie, sondern eher bei Autoimmunerkrankungen und der Immunsuppression zum Einsatz.

Eine weiteres direktes Wirkprinzip von Antikörpern ist das unmittelbare Induzieren von antiproliferativen und proapoptotischen intrazellulären Signalen durch Kreuz-

vernetzung von Oberflächenantigenen. Für den Antikörper Rituximab (MabThera®) der an das CD20-Antigen bindet, konnte gezeigt werden, dass er seine therapeutische Wirkung teilweise durch direkte Apoptoseinduktion entfaltet [Shan et al., 1998; Ghetie et al., 2001; Johnson und Glennie, 2003]. Offensichtlich ist hierbei der Grad der Quervernetzung für die Stärke des apoptotischen Signals ausschlaggebend [Ghetie et al., 2001].

Rituximab ist jedoch nicht der einzige Antikörper der das CD20-Antigen bindet, und für den eine Fähigkeit zur direkten Apoptoseinduktion beschrieben wurde. Auch für den α CD20-Antikörper Anti-B1 (Tositumomab) konnte gezeigt werden, dass er auf verschiedenen B-Lymphom-Zelllinien Apoptose induzieren kann [Cardarelli et al., 2002].

Indirekte Wirkmechanismen

Antikörper können nicht nur auf direkte Weise therapeutisch wirksam werden, sondern auch indirekt mittels ihres Fc-Teils Effektorfunktionen vermitteln (s. Abb. 1.5). Hierbei ist jedoch nicht nur die Spezifität sondern auch der Isotyp des Antikörpers von Bedeutung.

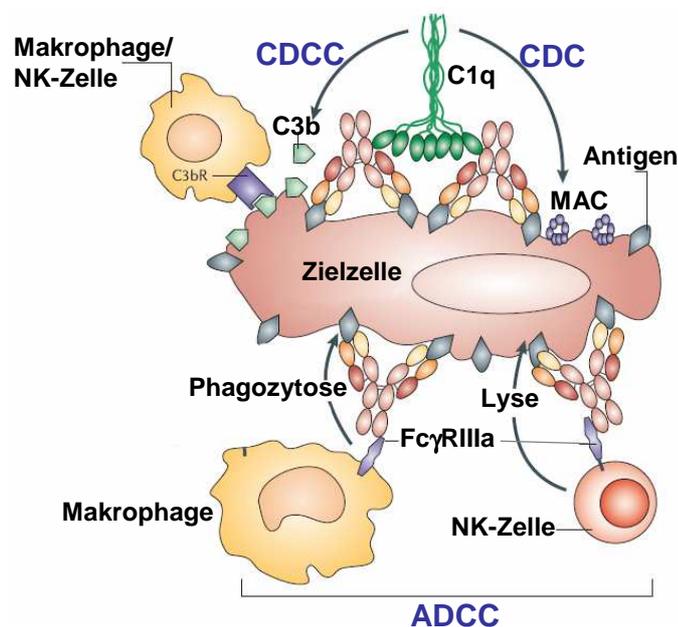


Abb. 1.5: Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Antikörper opsonisieren Tumorzellen durch Bindung an ihr Zielantigen. Die gebundenen Antikörper sind in der Lage Effektorfunktionen zu vermitteln, die letztendlich zu einer Eliminierung der Zielzelle führen. (CDC = Komplement-vermittelte Zytotoxizität; CDCC = Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität; ADCC = Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität)

Modifiziert nach [Imai und Takaoka, 2006]

Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC*)

Die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wird durch die Interaktion des Fc-Teils von Antikörpern, die spezifisch ihr Antigen auf der Zelloberfläche gebunden haben, und Fc-Rezeptoren auf Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen, Granulozyten oder NK-Zellen vermittelt (s. Abb. 1.5, S. 13). Durch diese Interaktion kommt es zur Phagozytose der Zielzelle oder zur Freisetzung zytolytischer Substanzen wie Perforine und Granzyme durch die Effektorzellen. Man geht davon aus, dass die Perforine durch Polymerbildung einen Kanal durch die Oberfläche der Zielzelle bilden, durch den die Granzyme in das Zellinnere gelangen was zu einer Zerstörung der Zielzelle führt [Lanier et al., 1988].

Die Fc γ -Rezeptoren gehören zur Immunglobulin Superfamilie und werden in drei Klassen, Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII unterteilt, die zum Teil weiter untergliedert sind (s. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Charakteristika der humanen Fc γ R-Klassen. Modifiziert nach [van Sorge et al., 2003] und [Stieglmaier, 2007]

Klasse	Fc γ RI CD64 Fc γ RI	Fc γ RII CD32			Fc γ RIII CD16	
		Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIc	Fc γ RIIIa	Fc γ RIIIb
Signal	ITAM	ITAM	ITIM	ITAM	ITAM	- (GPI)
IgG-Affinität	hoch	niedrig	niedrig	medium	niedrig	
Expression	myeloische Zellen Neutrophile ^b	myeloische Zellen Plättchen T-Zellen ^b Endothelzellen R/H ¹³¹	B-Zellen Monozyten Makrophage	NK-Zellen	Makrophage Monozyten ^b NK-Zellen T-Zellen ^b	Neutrophile Eosinophile ^a
Allo- typen			I/T ¹⁸⁷		V/F ¹⁵⁸	NA1/2
Spezifität für IgG Subklasse	3 > 1 > 4 >>> 2	3 > 1 \geq 2 >> 4	3 > 1 > 4 >> 2		1 = 3 >> 2, 4 ^c	1 = 3 >> 2, 4

⁰ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motive*

ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motive*

^aExpression des Rezeptors induzierbar

^bExpression auf einigen Subgruppen dieses Zelltyps

^cV¹⁵⁸ weist eine höhere Affinität für IgG1 und IgG3 auf als F¹⁵⁸

Neben dem hoch-affinen Fc γ RI gibt es eine ganze Reihe niedrig-affiner Fc γ -Rezeptoren, deren Signalweiterleitung durch das *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) charakterisiert ist. Dieses zytoplasmatische Motiv ist für die Vermittlung aktivierender Signale verantwortlich. Im Gegensatz dazu wirkt der Fc γ RIIb, welcher ein zytoplasmatisches ITIM *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* trägt, inhibitorisch. Der durch Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankerte Fc γ RIIIb hingegen besitzt keine Fähigkeit zur Signaltransduktion [Daeron, 1997].

Der für die ADCC bedeutendste Fc-Rezeptor ist der hoch-affine Fc γ RIIIa (CD16), da NK-Zellen besonders effizient Lyse vermitteln können, doch auch der Fc γ RI und Fc γ RIIa tragen dazu bei [Burton und Woof, 1992]. Die Effektorzellen werden durch die Interaktion ihrer Fc γ -Rezeptoren mit dem Antikörper nicht nur an die Zielzelle rekrutiert, sondern durch die dabei stattfindende Kreuzvernetzung der Fc γ -Rezeptoren auch aktiviert. Für letzteres ist die γ -Kette verantwortlich, die mit den Fc γ -Rezeptoren assoziiert ist und die Signalübertragung ins Innere der Zelle vermittelt.

Bei den beiden aktivierenden Fc γ RIIa und Fc γ RIIIa treten jeweils zwei unterschiedliche Allotypen auf, welche sich auf die Effizienz der vermittelten ADCC auswirken. So konnte in prä-klinischen Studien mit Rituximab gezeigt werden, dass Fc γ RIIa mit einem Histidin an der Position 131 aktiver waren als Fc γ RIIa die ein Arginin an dieser Position hatten, was auf Unterschiede in der Affinität der beiden Allotypen zu IgG1 zurückgeführt wurde [Parren et al., 1992]. Vergleichbare Resultate wurden in klinischen Studien für den Fc γ RIIIa beobachtet. Hier sprachen Patienten die an der Aminosäureposition 158 ein Valin trugen besser auf die Behandlung mit Rituximab an als solche, bei denen sich an dieser Position ein Phenylalanin befand [Cartron et al., 2002].

Die Interaktion der Fc-Rezeptoren ist entscheidend von der Sequenz der C_H2-Domäne abhängig [Shields et al., 2001]. Auch scheint die Glykosylierung von Antikörpern einen Effekt auf die Bindungsaffinität des Fc-Teils an den Fc-Rezeptor zu haben [Shinkawa et al., 2003].

Daß die ADCC für die therapeutische Wirkung von Rituximab auch *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt konnte durch Versuche mit FcR-defizienten Mäusen gezeigt werden [Clynes et al., 2000].

Komplement-vermittelte Zytotoxizität (Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC)

Bindet ein Antikörper an ein zelluläres Antigen, werden in den C_H2 -Domänen spezifische Erkennungsstellen für den Komplementfaktor C1q exponiert. Durch Bindung des C1q wird die klassische Komplementkaskade aktiviert. Als Folge der proteolytischen Komplementkaskade wird der sogenannte *membrane-attack complex* (MAC) ausgebildet, der die Lyse der Zielzelle vermittelt (s. Abb. 1.5, S. 13) [Bhakdi und Trandum-Jensen, 1991].

Um die Komplementkaskade zu aktivieren, bedarf es der gleichzeitigen Bindung von C1q an mindestens zwei Fc-Teile, weshalb vor allem IgM-Antikörper potente Induktoren der CDC sind. Doch auch andere Antikörperklassen (z.B. IgG1 und IgG3) können bei ausreichender Antigendichte durch Bindung von C1q die Komplementkaskade aktivieren, was zu einer Zerstörung der Zielzelle führt [Cooper, 1985]. Der therapeutische Effekt von Rituximab wird neben der ADCC auch der CDC zugeschrieben [Johnson und Glennie, 2003; Golay et al., 2001; Gaetano et al., 2003].

Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (Complement-Dependent Cellular Cytotoxicity, CDCC)

Bei der CDC wird durch Bindung des C1q an membrangebundene Antikörpermoleküle die klassische Komplementkaskade aktiviert. Das im Laufe dieser Reaktionen gebildete C3b wirkt opsonisierend und ermöglicht durch eine Interaktion mit dem C3b-Rezeptor (C3bR) auf Makrophagen oder natürlichen Killerzellen eine Phagozytose oder Zytolyse der Zielzelle (s. Abb. 1.5, S. 13) [Imai und Takaoka, 2006].

Während des Ablaufs der Komplementkaskade werden außerdem mehrere kleine, chemotaktisch-wirksame Faktoren (C3a, C4a, C5a) gebildet, die zusätzlich weitere Immunzellen anlocken und eine Entzündungsreaktion auslösen können.

1.3 Antikörpertherapie für die Behandlung von NHL

Die Hälfte aller von der FDA zugelassenen monoklonalen Antikörper wird für die Krebstherapie eingesetzt (s. auch Tabelle 1.2, S. 17). Dabei eignen sich besonders hämatologische Neoplasien für Therapieansätze mit Antikörpern, da diese Tumorzellen leicht zugänglich sind und ein therapeutischer Effekt bereits mit niedrigen Antikörper-Dosen erreicht werden kann [Adams und Weiner, 2005]. Da sich die Wirkmechanismen der Antikörper von denen der klassischen Zytostatika prinzipiell

unterscheiden, ergibt sich die Möglichkeit, Patienten, die auf eine Chemotherapie nicht mehr ansprechen, erfolgreich mit Antikörpern zu behandeln. Für eine Kombination von herkömmlichen Behandlungsmethoden und einer Antikörpertherapie bei Lymphomen konnte gezeigt werden, dass sich additive und sogar synergistische Effekte erzielen lassen [Coiffier et al., 2002].

Tabelle 1.2: Auswahl durch die FDA zugelassener Antikörper und Antikörper-Konjugate für die Krebstherapie. Modifiziert nach [Adams und Weiner, 2005]

Antikörper name	Antikörper-format	Ziel-molekül	Indikation	Zulassung
Rituximab	chimärisierter IgG1	CD20	B-Zell Lymphom	1997
Gemtuzumab Ozogamycin	Calicheamycin humanisierter IgG4	CD33	AML	2000
Alemtuzumab	humanisierter IgG1	CD52	CLL	2001
Ibritumomab- Tiuxetan	⁹⁰ Y-muriner IgG1	CD20	B-Zell Lymphom	2002
Tositumomab	¹³¹ I-muriner IgG2a	CD20	B-Zell Lymphom	2003

1.3.1 Therapeutische Antikörper für NHL

Der erste therapeutische Antikörper in der Tumorthherapie war Rituximab der 1997 erstmalig für die Behandlung des follikulären Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) nach Versagen der Chemotherapie bzw. in Kombination zur Erstbehandlung zugelassen wurde. In ersten Studien mit rezidivierten Lymphompatienten sprachen 48% der Patienten auf die Therapie mit Rituximab an, wobei 6% eine komplette Remission erlangten [McLaughlin et al., 1998]. Wurde der Antikörper als *first line* Therapie verabreicht, wurden Ansprechraten von über 70% erreicht und für fast 40% der Patienten wurde eine komplette Remission beobachtet. Die Behandlung wurde von den meisten Patienten sehr gut toleriert und die Nebenwirkungen beschränkten sich in den meisten Fällen auf Fieber und Schüttelfrost [Hainsworth et al., 2002].

Daß Rituximab einen sensibilisierenden Effekt für Chemotherapeutika auf Lymphomzellen hat wurde schon früh erkannt [Demidem et al., 1997]. In klinischen Studien mit Lymphompatienten konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Rituximab zur Standardtherapie Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP) den therapeutischen Effekt im Vergleich zur alleinigen CHOP-Therapie signifikant verbesserte, ohne dass dabei die Nebenwirkungen verstärkt wurden [Coiffier et al., 2002].

Ein zweiter 2001 zur Behandlung von Chemotherapie-resistenter chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) zugelassener Antikörper ist Alemtuzumab. Dieser Antikörper ist gegen das CD52-Antigen gerichtet, das auf B- und T-Zellen exprimiert ist. Über 30% der gegen Fludarabin refraktären Patienten sprechen auf die Therapie mit Alemtuzumab an, allerdings werden nur bei etwa 2% komplette Remissionen induziert [Keating et al., 2002].

Leider ist auch die Therapie mit monoklonalen Antikörpern nicht frei von Nebenwirkungen. So können, unabhängig vom Wirkmechanismus des Antikörpers, Hypersensitivitätsreaktionen auftreten [Adams und Weiner, 2005]. Als schwere Nebenwirkung wird unter Rituximab die verstärkte Freisetzung inflammatorischer Zytokine, das sogenannte *cytokine release syndrome*, gefürchtet [Winkler et al., 1999].

Die Tatsache dass die biologische Wirksamkeit „nackter“ Antikörper häufig unzureichend ist gab Anlaß zur Entwicklung verschiedener Ansätze zur „Bewaffnung“ von Antikörpermolekülen.

Bei den Immunotoxinen werden hochtoxische Substanzen meist pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs (z.B. Ricin A, Diphtherietoxin, Pseudomonas Exotoxin) oder Zytostatika an Antikörperfragmente gekoppelt. Dadurch wird versucht ein wirksames Zellgift selektiv im Tumor anzureichern [Reiter et al., 1996]. Nachteilig ist dabei jedoch, dass die Zytotoxizität auch unabhängig von einer spezifischen Bindung vorhanden ist.

Bei den Radio-Immunkonjugaten werden Radionuklide an Antikörperfragmente gekoppelt, was einen gezielten Einsatz ionisierender Strahlung gegen den Tumor ermöglicht. Allerdings tritt auch hier die zytotoxische Wirkung unabhängig von einer spezifischen Bindung ein.

Für die Bewaffnung von Antikörpern finden heute vorallem die β -Strahler ^{131}I und ^{90}Y Verwendung. Ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) und Tositumomab (Bexxar[®]), an ^{90}Y bzw. ^{131}I gekoppelte murine $\alpha\text{CD}20$ -Antikörper, wurden kürzlich für die Behandlung rezidivierter NHL von der FDA zugelassen. In klinischen Vergleichsstudien konnten für beide Konjugate signifikant höhere Ansprechraten beobachtet werden als mit den jeweils unkonjugierten Antikörpern [Witzig et al., 2002; Davis et al., 2004].

1.3.2 CD20 als Zielantigen

Bei dem Oberflächenantigen CD20 handelt es sich um das erste humane Differenzierungsantigen, welches mit Hilfe monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche von menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnte [Stashenko et al., 1980]. Dieses Antigen ist ein membranständiges nicht-glykosyliertes Phosphoprotein welches auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, jedoch nicht auf hämatopoetischen Stammzellen oder reifen Plasmazellen exprimiert wird. Auch ist das CD20-Antigen auf den meisten B-Zell Lymphomen exprimiert [Nadler et al., 1981]. CD20 eignet sich somit als Zielstruktur für eine Antikörper-basierte Strategie, mit der allerdings alle - maligne und nichtmaligne - B-Zellen angegriffen werden [Anderson et al., 1984]. Da die hämatopoetischen Stammzellen unbeeinträchtigt bleiben, kann sich der B-Zellpool von alleine wieder regenerieren.

Das CD20-Molekül besteht aus vier transmembranösen Domänen, wobei sowohl das Amino-, als auch das Carboxylende des Proteins intrazellulär liegt und das Molekül nur einen kleinen extrazellulären Teil besitzt (s. Abb. 1.6) [Tedder et al., 1988; Tedder et al., 1989a; Tedder et al., 1989b].

Die genaue Funktion des CD20-Antigens ist noch nicht vollständig geklärt, doch es gibt Untersuchungen die darauf hinweisen, dass es eine bedeutende Rolle bei der Wachstumsregulation, Differenzierung und Proliferation aktivierter B-Lymphozyten spielt [Tedder et al., 1985; Tedder und Engel, 1994].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren einen Zusammenhang zwischen dem CD20-Antigen und der intrazellulären Calciumkonzentration zeigen [Bubien et al., 1993; Genot, 1994]. Durch Bindung eines monoklonalen Antikörper an das CD20-Antigen kommt es zu einem Anstieg

der intrazellulären Calciumkonzentration, wobei das CD20-Rezeptormolekül wahrscheinlich selbst die Funktion eines Ionenkanals übernimmt [Bubien et al., 1993]. Die Ligation des CD20 mit einem monoklonalen Antikörper führt zu einer Aktivierung der Thyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen welche wahrscheinlich zu einer

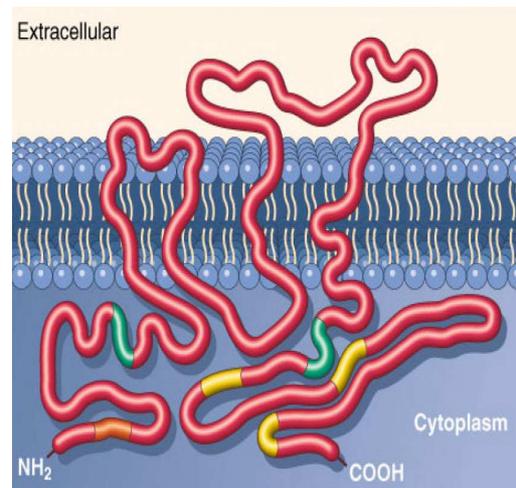


Abb. 1.6: CD20

Das B-Zelldifferenzierungsantigen CD20 setzt sich aus 297 Aminosäuren zusammen und bildet vier transmembranöse Domänen. Sowohl das Amino-, als auch das Carboxylende des Proteins liegen intrazellulär und besitzen Phosphorylierungs-Konsensussequenzen für Serin/Threoninkinasen (orange = Proteinkinase C, grün = Calmodulin/Calcium, gelb = Casein Kinase II). Nach [Riley und Sliwkowski, 2000]

Thyrosinphosphorylierung der Phospholipase $C\gamma$ führen, welche ihrerseits zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt [Deans et al., 1993; Shan et al., 1998].

Für den Übertritt der Zellen aus der G_1 -Phase in die S-Phase des Zellzyklus ist eine niedrige intrazelluläre Calciumkonzentration notwendig und damit wahrscheinlich mitverantwortlich für eine klonale Expansion der Zellen. Durch die, durch Bindung eines monoklonalen Antikörpers gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentration wird so eine weitere Proliferation verhindert. Auch konnte gezeigt werden, dass durch Bindung eines zweiten anti-IgG-Antikörpers an den Fc-Teil eines CD20-Antikörpers (*hypercross-linking*) die intrazelluläre Calciumkonzentration so weit angehoben werden konnte, dass in den Zellen Apoptose ausgelöst wurde [Shan et al., 1998]. Jedoch zeigen nicht alle α CD20-Antikörper nach Bindung an das CD20-Antigen die gleichen Effekte auf den Zellzyklus und damit auf die Proliferation der B-Lymphozyten.

1.3.3 Vorraussetzungen für eine erfolgreiche Antikörpervermittelte Immuntherapie

Wichtige Voraussetzungen für eine effektive Antikörpertherapie sind eine homogene, möglichst hohe Expression des erkannten Antigens, das Fehlen von „*shedding*“ bzw. einer Herunterregulation der Expression. Diese Anforderungen werden vom CD20-Antigen in idealer Weise erfüllt.

Ein grundsätzliches Problem der Antikörpertherapie mit monoklonalen Antikörpern ist die Tatsache, dass es Antigene mit absoluter Spezifität für den malignen Zustand *per se* nicht gibt. Die relative Spezifität wird jedoch als ausreichend für eine *in vivo*-Applikation angesehen, wie der therapeutische Einsatz der verschiedenen α CD20-Antikörper zeigt.

Desweiteren erbrachten pharmakokinetische Studien den Befund, dass *in vivo* nur ein Bruchteil der applizierten monoklonalen Antikörper spezifisch an den Tumor bindet. Dies ist auf eine unspezifische Bindung an Fc-Rezeptor tragende Zellen oder an kreuzreagierendes Gewebe zurückzuführen [Begent et al., 1982; Dillman et al., 1984].

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass es für eine erfolgreiche Antikörpervermittelte Immuntherapie im Wesentlichen drei Vorraussetzungen gibt [Wolf et al., 1994]:

- Der Effektormechanismus muss sehr wirkungsvoll sein
- Die Wirkung muss Zielzell-restringiert sein, d.h. der Antikörper sollte ohne

Bindung an die Zielzelle wirkungslos sein

- Der Antikörper sollte auch in der Lage sein, Zielantigen-negative Zellen (*bystander*-Zellen) in der unmittelbaren Nachbarschaft zu zerstören

Diese Forderungen tragen u.a. dazu bei, dass sich auf dem Gebiet der Antikörper-technologie eine rege Entwicklung zeigt.

1.4 Rekombinante Antikörper und neue Antikörperformate

Durch die Fortschritte der letzten Jahre auf dem Gebiet der rekombinanten Antikörper-technologie haben sich ganz neue Perspektiven für eine Optimierung therapeutischer Antikörper eröffnet. Dazu zählen nicht nur die bereits genannten Immuntoxine und Radioimmunkonjugate, sondern auch die verschiedensten Ansätze zur Verbesserung der Effektorfunktionen monoklonaler Antikörper und die Entwicklung verschiedener rekombinanter Antikörperformate sowie bispezifischer Antikörper, die die Spezifität von Antikörpern mit der Wirksamkeit von immunologischen Effektorzellen kombinieren.

1.4.1 Optimierung monoklonaler Antikörper für eine verbesserte Interaktion mit Effektorzellen

Es gibt mehrere Fakten, die die Rolle der $Fc\gamma R$ -vermittelten Effektorfunktionen in der Antikörpertherapie von Tumorerkrankungen belegen, und einen Zusammenhang zwischen der Affinität des Fc-Teil/ $Fc\gamma R$ und dem zytotoxischen Potential aufweisen.

In einer Studie mit $Fc\gamma R$ -*knockout*-Mäusen konnte bewiesen werden, dass aktivierende $Fc\gamma$ -Rezeptoren für die therapeutische Aktivität von Rituximab und Trastuzumab essentiell sind, wohingegen die inhibierenden $Fc\gamma$ -Rezeptoren eher einen nachteiligen Effekt haben [Clynes et al., 2000]. Andere Studien belegen einen klaren Zusammenhang zwischen der therapeutischen Wirksamkeit von Antikörpern und dem Allotyp von hoch-affinen (V^{158}) und niedrig-affinen (F^{158}) polymorphen Formen des $Fc\gamma RIIIa$ [Cartron et al., 2002; Weng und Levy, 2003; Dall'Ozzo et al., 2004]. Außerdem konnte durch Mutagenese [Duncan et al., 1988; Sarmay et al., 1992; Redpath et al., 1998; Shields et al., 2001] und *Glyco-engineering* [Shields et al., 2002] in zellulären Experimenten eine klare Korrelation der Affinität des Fc-Teils zu bestimmten $Fc\gamma$ -Rezeptoren und der Zytotoxizität bewiesen werden.

Die Optimierung von monoklonalen Antikörpern für eine verbesserte Interaktion mit aktivierenden Rezeptoren von Effektorzellen und eine dadurch gesteigerte Fähigkeit für eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) stellt somit einen vielversprechenden Ansatz für die Verbesserung der therapeutischen Effektivität dar.

Für diese Strategie ist die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Fc γ -Rezeptoren ein wichtiger Aspekt. Die optimalen Effektorfunktionen ließen sich mit einem Fc-Teil erreichen, der eine gesteigerte Affinität für die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren und eine reduzierte Affinität zum inhibitorischen Fc γ RIIb hätte.

Eine Erhöhung der Affinität des Fc-Teils von IgG-Molekülen für eine Bindung an Fc γ -Rezeptoren kann durch zwei unterschiedliche Strategien erreicht werden: Einerseits können durch sogenanntes *Fc-Remodelling* Aminosäuren am Fc-Teil der IgG-Antikörper ausgetauscht werden, so dass die Affinität des mutierten Fc-Teils für eine Bindung an die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren erhöht ist. Zum anderen kann die N-Glykosylierung am Asn²⁹⁷ der C_H2-Domäne dahingehend modifiziert werden, dass sie die Bindung zum Fc γ -Rezeptor positiv beeinflusst.

Fc-Remodelling

In einer Studie von Shields et al. zur Identifizierung der genauen Bindungsstellen des Fc-Teils an den Fc γ R, wurden die Aminosäuren der Fc-Domäne humaner IgG1-Antikörper einzeln durch Alanin ersetzt und die Bindungsaffinität der einzelnen Mutanten an die verschiedenen Fc γ Rs bestimmt [Shields et al., 2001]. Dabei konnten mehrere Gruppen von Mutationen identifiziert werden, welche die Bindung an die verschiedenen Fc γ Rs beeinflussen.

Diese Resultate konnten mithilfe anderer Strategien für weitere Mutanten bestätigt werden [Lazar et al., 2006]. Hier konnte für die Rituximab-Mutante S239D/I332E, bei der die Aminosäure Serin (S) an Position 239 gegen Asparaginsäure (D) und die Aminosäure Isoleucin (I) an Position 332 gegen Glutaminsäure (E) ausgetauscht worden war, *in vitro* eine signifikant erhöhte ADCC-Effizienz beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte diese Mutante in *in vivo* Experimenten mit Affen (*Macaca fascicularis*) eine deutlich gesteigerte B-Zell-Depletion im Vergleich zum Wildtyp-Rituximab. Die Steigerung der ADCC-Effektivität ist auf eine erhöhte Affinität der DE-Mutante für eine Bindung an aktivierende Fc γ -Rezeptoren zurückzuführen.

Glycosylierung von Antikörpern

Die Glycosylierung von Immunglobulinen spielt eine spezifische strukturelle Rolle bei der Erhaltung und Modulierung von physiologisch relevanten Effektorfunktionen und ermöglicht eine Manipulation um die therapeutischen Fähigkeiten von Antikörpern zu optimieren. IgG1-Moleküle besitzen an der Aminosäureposition Asn²⁹⁷ der C_H2-Domäne eine N-gebundene Glycosylierung.

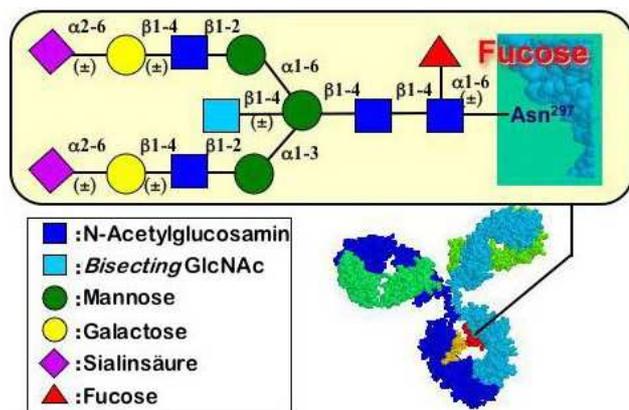


Abb. 1.7: Komplexes, biantennäres, N-gebundenes Oligosaccharid eines humanen IgG1-Antikörpers Modifiziert nach <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/immunity/IS-A06E.html>

hydratarme werden oft von Sialinsäureresten (Neu5Ac) gebildet [Jefferis et al., 1990]. An das N-gebundene, biantennäre *core*-Heptasaccharid kann zusätzlich am proximalen GlcNAc α1-6 gebundene Fucose (Fuc) angefügt werden [Jefferis et al., 1990]. Typische Serum IgG-Antikörper sind dadurch charakterisiert, dass sie zu 95% fucosyliert sind [Raju et al., 2000].

Das Glycosylierungsmuster wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, zu denen u.a. neben dem Expressionssystem auch die Kulturbedingungen zählen [Maiorella et al., 1993; Jenkins und Curling, 1994]. Daher ist bei der Herstellung therapeutischer Antikörper auch die Wahl der Zelllinie für die Struktur des N-gebundenen Oligosaccharids ausschlaggebend.

Für die industrielle Herstellung von Antikörpern werden vorwiegend *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen verwendet. Diese so produzierten Antikörper tragen am Asn²⁹⁷ α1-6 fucosylierte, komplexe biantennäre Oligosaccharide, die zum Teil terminale Galactose-Reste besitzen, und somit humanen N-gebundenen Oligosacchariden weitestgehend ähneln [Shields et al., 2002].

In einer vergleichenden Studie in der der Einfluß der einzelnen Zucker-Reste auf

die ADCC bestimmt wurde zeigte sich, dass unfucosylierte Antikörper wesentlich effizienter bei der Vermittlung der ADCC waren [Shinkawa et al., 2003].

Eine detaillierte Analyse der intermolekularen Wechselwirkungen beider Proteine erlaubt die Kristallstruktur eines 1:1-Komplexes aus IgG1-Fc und Fc γ RIII [Sondermann et al., 2000] (s. Abb. 1.8). Hier zeigt sich, dass interessanterweise die Zucker nicht direkt an der Wechselwirkung beteiligt sind, denn es findet sich nur eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Arg152 des Fc γ RIII und dem Zuckerrest GlcNAc1 der

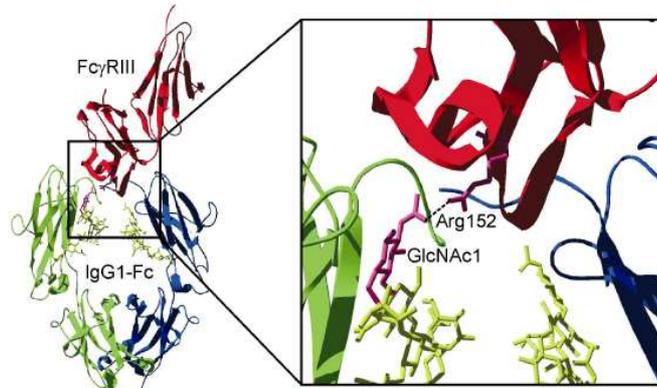


Abb. 1.8: IgG1-Fc-Fc γ RIII-Komplex

Vergrößerte Ansicht der Kontaktstelle des Fc-Teils und des Fc γ RIII zeigt, dass abgesehen von einer schwachen polaren Wechselwirkung zwischen dem Carbonylsauerstoff und der Guanidinogruppe des Arg 152 (gestrichelte Linie) kein direkter Kontakt zwischen der Kohlenhydratkette und dem Fc γ RIII besteht. Nach [Sondermann et al., 2000]

Fc-Kohlenhydrate. Die Kohlenhydratketten müssen folglich einen Einfluß auf die Struktur des IgG1-Fc-Fragmentes haben, die für eine effektive Fc γ R-Bindung von Bedeutung ist.

Obwohl die genauen Mechanismen der ADCC noch nicht vollständig verstanden sind, wird das Wissen über Fc-Fc γ R Interaktionen ausgenutzt, um therapeutische Antikörper zu modifizieren [Jefferis, 2005].

Neben diesen Anstrengungen die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität therapeutischer Antikörper zu verbessern gibt es andere Ansätze die versuchen durch ähnliche Modifikationen der Fc-Domäne auch die Komplement-vermittelte Zytotoxizität zu steigern und die Pharmakokinetik der therapeutischen Antikörper spezifisch zu verbessern.

1.4.2 Neue Antikörperformate

Die technologischen Fortschritte der vergangenen Jahre auf dem Gebiet der rekombinanten Antikörper haben diese zu einer bedeutenden Substanzklasse, den sogenannten Biotherapeutika, werden lassen.

Die Etablierung der *Phage display* Technologie [McCafferty et al., 1990] und der Möglichkeit zur Herstellung von *single chain V-domain fragments* (scFvs) haben auf dem Gebiet der Selektion und Konstruktion von synthetischen Antikörpern und Antikörper-Fragmenten neue Möglichkeiten für therapeutische Ansätze eröffnet.

Durch ihre geringere Größe zeigen rekombinante Antikörperfragmente im Vergleich zu natürlichen Immunglobulinen eine homogenere Bioverteilung und eine bessere Gewebegänglichkeit, was sie zu interessanten Kandidaten für den Einsatz in der Krebsdiagnostik und -therapie macht.

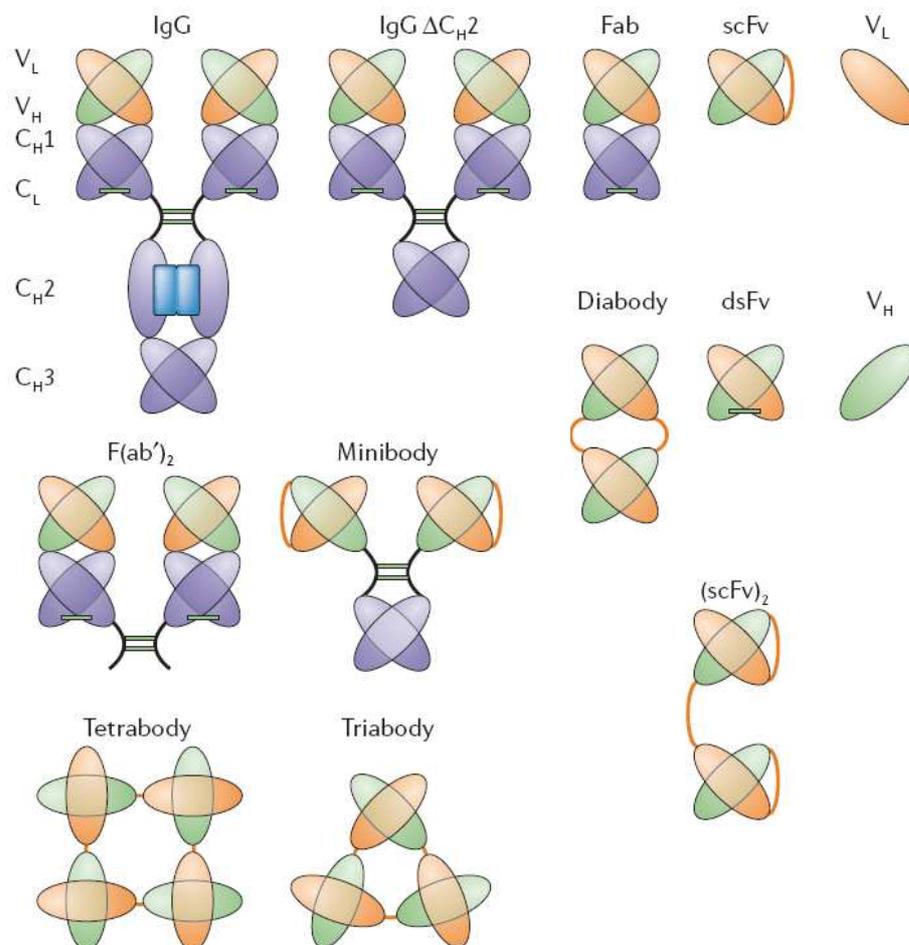


Abb. 1.9: Repräsentative Antikörperformate

Antikörperfragmente können einerseits durch proteolytische Spaltung aus kompletten IgG-Antikörpern, oder rekombinant hergestellt werden. Modifiziert nach [Carter, 2006]

Antikörperfragmente können einerseits durch proteolytische Spaltung aus kompletten IgG-Antikörpern, oder rekombinant hergestellt werden. Durch die zufällige Kombination von V-Genen können große scFv-Bibliotheken erstellt werden, aus denen einzelne Fragmente durch ihre spezifische Bindung an ein gewünschtes Antigen im *Phage display* selektiert werden können [Hoogenboom, 2005]. Dadurch wird es möglich, Antikörper mit prädefinierter Spezifität ohne eine vorhergehende Immunisierung zu generieren.

Im folgenden werden die gängigsten Antikörperformate kurz beschrieben:

- Trunkierte Antikörper und Minibodies

Um einen stabilen bivalenten Antikörper zu erzeugen der jedoch keine Effektorfunktionen vermitteln kann, werden häufig die C_H2 -Domänen eines IgG-Moleküls deletiert, so dass ein trunkierter Antikörper entsteht. Ein Antikörper mit zusätzlich deletierten C_H1 und C_L -Domänen bezeichnet man gewöhnlich als Minibody.

- *single chain V-domain fragments* (scFvs)

Die kleinste antigenbindende Einheit eines Antikörpers ist das Fv-Fragment, das sich im Wesentlichen nur aus den antigenbindenden variablen Domänen (V_H und V_L) zusammensetzt. Die beiden Ketten werden mit einem Peptidlinker (meist ein Glycin-Serin-Linker $(G_4S)_3$) zu sogenannten *single-chain-Fv* (scFv)-Fragmenten verbunden. Das scFv besitzt die selbe Antigen-spezifität und oft auch Affinität wie ein kompletter Antikörper mit identischen V-Domänen [Holliger und Hudson, 2005].

Aufbauend auf den scFv-Fragmenten kann eine Vielfalt multivalenter, hochaffiner Moleküle mit optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften generiert werden. So kann z.B. durch Fusion zweier scFvs gleicher Spezifität, über einen längeren Peptidlinker ein bivalentes $(scFv)_2$ -Fragment entstehen. Fusioniert man zwei scFvs unterschiedlicher Spezifität mittels eines Peptidlinkers, so bekommt man ein bispezifisches scFv.

- Diabodies, Triabodies und Tetrabodies

Diabodies sind Dimere, die aus zwei Ketten der Struktur V_H-V_L bzw. V_L-V_H des gleichen oder zweier verschiedener Antikörper bestehen. Die beiden variablen Polypeptidketten, die die Bindungsdomäne bilden, werden dabei von kurzen Verbindungspeptiden (in der Regel 5-6 Aminosäurereste) zusammengehalten. Die beiden Ketten lagern sich aufgrund der Wechselwirkungen zwischen den variablen Domänen stabil zu einem bivalenten oder bispezifischen

Molekül zusammen. Analog zu den Diabodies sind auch Tria- oder Tetrabodies hergestellt worden.

- Fab' und F(ab')₂-Fragmente

Verdaut man einen IgG-Antikörper mit der Protease Pepsin, entstehen durch Abspaltung des F_c-Teils bivalente F(ab')₂-Fragmente, die keine physiologischen Effektorfunktionen mehr vermitteln können. Durch eine Spaltung der Disulfidbrücken in der *hinge*-Region können F(ab')₂-Fragmente in monovalente Fab'-Fragmente zerlegt werden.

Durch chemische Hybridisierung zwei Fab'-Fragmente unterschiedlicher Spezifität kann ein bispezifisches F(ab')₂-Fragment erzeugt werden (s. auch Abschnitt 2.5.3, S. 79).

Auch wenn sich von den rekombinanten Antikörper-Fragmenten derzeit mehrere vielversprechende Kandidaten in der Entwicklung und in (prä-)klinischen Tests befinden [Holliger und Hudson, 2005], ist bisher noch kein Antikörper-Fragment für die klinische Anwendung in der Krebstherapie zugelassen.

1.5 Bispezifische Antikörper

Generell versteht man unter bispezifischen Antikörpern (bsAK) Konstrukte, die sich durch zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen auszeichnen. Für den Einsatz in der Tumorthherapie werden im allgemeinen Konstrukte verwendet, deren eine Spezifität gegen ein tumorassoziiertes Antigen und deren andere Spezifität gegen Antigene auf einer immunologischen Effektorzelle gerichtet ist. Dadurch ist es möglich, Zellen des Immunsystems gezielt an Tumorzellen heranzuführen, aber nicht *per se* zu aktivieren. Daher muss das Antigen auf der Effektorzelle so gewählt werden, dass es möglichst effektiv eine Aktivierung der Effektorzelle und eine Lyse der Tumorzelle ermöglicht.

Ein weiterer Ansatz mit bispezifischen Antikörpern ist die Aktivierung von Todesrezeptoren zur selektiven Apoptoseinduktion der Tumorzellen, welche durch den Einsatz bispezifischer Antikörper mit Spezifität Todesrezeptor x Tumorantigen ermöglicht wird.

Nicht zuletzt werden mit bispezifischen Antikörpern therapeutische Ansätze zur Fokussierung toxischer Substanzen (Toxine, Zytostatika, Enzyme zur Aktivierung von „Prodrugs“ oder radioaktive Moleküle) an den Tumor verfolgt. Dabei bindet das bispezifische Molekül mit einem Arm an ein tumorassoziiertes Antigen, mit dem zweiten Arm werden die toxischen Substanzen an die Tumorzelle fixiert. Auch ist

eine Kombination von bispezifischen Antikörpern mit Zytokinen möglich. Außerdem konnte in einer *in vitro*-Studie gezeigt werden, dass mittels eines bispezifischen scFv eine selektive Infektion von Zielzellen mit zytolytischen Viren erreicht werden kann [Wurdinger et al., 2005]. Auf Moleküle dieser Art soll in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden.

1.5.1 Das bispezifische Prinzip

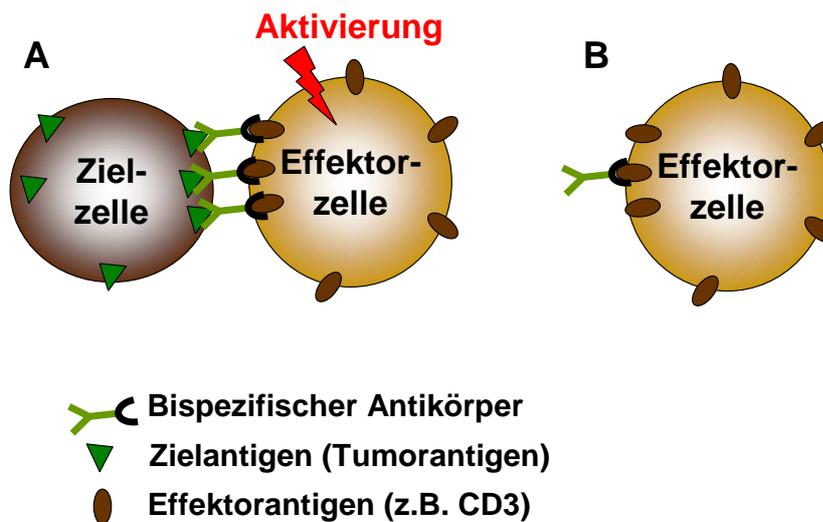


Abb. 1.10: Das bispezifische Prinzip

Bispezifische Antikörper ermöglichen eine Zielzellrestriktion bei der Rekrutierung von Effektormechanismen.

A: Bindet der bispezifische Antikörper gleichzeitig mit beiden Armen an seine beiden Antigene, so ist er in der Lage eine Aktivierung der Effektorzelle zu vermitteln.

B: Bei Abwesenheit der Zielzelle fehlt die bispezifische Bindung des Antikörpers und somit die multivalente Stimulation der Effektorzelle.

Das bispezifische Prinzip beruht auf der Beobachtung, dass für eine Aktivierung der Effektorzelle eine monovalente Bindung einzelner Antikörper an aktivierende Rezeptoren meist nicht ausreicht. Die agonistische Aktivität des Effektorarms benötigt in solchen Fällen eine Immobilisierung durch die Bindung des bispezifischen Antikörpers an das Zielantigen. Auf diese Weise kann ein potenter Effektormechanismus in strenger Abhängigkeit von der Anwesenheit von Zielzellen („Zielzellrestriktion“) ausgelöst werden (s. Abb. 1.10).

1.5.2 Herstellung bispezifischer Antikörper

Zur Herstellung bispezifischer Antikörper existieren verschiedene Methoden. Eine Möglichkeit ist die Quadrom- oder Hybrid-Hybridom-Technologie. Darunter versteht man die Fusion zweier Hybridome, die Antikörper verschiedener Spezifität produzieren. Da die Quadrome jedoch die beiden leichten und schweren Ketten kodominant exprimieren, können bis zu 10 verschiedene Antikörper-Moleküle entstehen, wovon jedoch nur eines das gewünschte bispezifische Hybridmolekül ist [Milstein und Cuello, 1983]. Weitere Probleme dieser Technologie liegen in der nur geringen Syntheserate des gewünschten Hybridmoleküls (12-50%) [Lanzavecchia und Scheidegger, 1987]. Darüber hinaus kann es zu Problemen bei der Fusion und der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität aufgrund des polyploiden, 8-fachen Chromosomensatzes der Quadrome kommen [Songsivilai und Lachmann, 1990].

Eine andere Methode zur Herstellung bispezifischer Antikörper ist die chemische Kopplung zweier Fab'-Fragmente unterschiedlicher Spezifität zu einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment. Die Methode wurde von Brennan [Brennan et al., 1985] und Nitta [Nitta et al., 1989] entwickelt und von Glennie [Glennie et al., 1987] und Jung [Jung et al., 1991] modifiziert. Bei dieser Methode wird selektiv die *hinge*-Region von proteolytisch erstellten F(ab')₂-Fragmenten reduziert und anschließend werden zwei Fab'-Fragmente unterschiedlicher Spezifität chemisch rehybridisiert. Auf diese Art und Weise lassen sich relativ schnell und einfach größere Mengen bispezifischer F(ab')₂-Fragmente herstellen. Ein großer Vorteil bei der Verwendung solcher bispezifischer F(ab')₂-Fragmente ist der fehlende Fc-Teil und damit die Vermeidung Fc-vermittelter Bindungen die zu einer Immobilisierung des Moleküls und damit zu unspezifischen Reaktionen führen könnten. Auch haben die F(ab')₂-Fragmente aufgrund des fehlenden Fc-Teils eine geringere Größe, was eine bessere Tumorpene-
tration gewährleistet [Nitta et al., 1989].

Die Herstellung bispezifischer Antikörper mittels Hybrid-Hybridom-Technologie und chemischer Kopplung ist meist mit geringer Ausbeute bei Herstellung und Aufreinigung und somit hohem Produktionsaufwand verbunden, was bislang die rasche klinische Weiterentwicklung des bispezifischen Therapieansatzes erheblich behinderte.

Ein neuerer Ansatz ist die molekularbiologische Herstellung von bispezifischen *single-chain* Antikörpern [Kurucz et al., 1995; Gruber et al., 1994; Mallender und E. W. Voss, 1994] oder sogenannter Diabodies [Holliger et al., 1993]. Ein Vorteil gegenüber der chemischen Hybridisierung liegt in der genauen Kenntnis der Stöchiometrie der Fragmente.

Trotz aller Vorteile und einer verbesserten Tumorpene-
tration ist die rasche Eli-

minierung des Konstruktes aus dem Organismus, bedingt durch das geringe Molekulargewicht, ein potentieller Nachteil für einen therapeutischen Einsatz solcher bispezifischer scFv-Antikörper (s. Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: Eigenschaften verschiedener Antikörperformate. Modifiziert nach [C. A. Leath et al., 2004] und [Jain und Baxter, 1988]

Antikörperformat	Molekulargewicht (kDa)	Ausscheidungsgeschwindigkeit	Tumorpenetration (h/mm Tumor)	Tumorretention
IgG	150	+	+ (54h)	+++
F(ab') ₂	100	++	++ (16h)	++
scFv	25	+++	+++	+

1.5.3 Expressionssysteme für bispezifische Antikörper

Die schnellste und einfachste Methode zur Herstellung rekombinanter bispezifischer Antikörper ist die bakterielle Expression. Ein erhebliches Problem stellt jedoch die korrekte Faltung des Proteins dar. Deshalb wird heutzutage die Expression rekombinanter Antikörper in eukaryontischen Expressionssystemen bevorzugt [Peipp und Valerius, 2002]. Aufgrund der grundsätzlich geringeren Produktionsrate solcher rekombinanter bispezifischer Antikörper im Vergleich zu physiologischen Antikörpern wurden viele Bemühungen für die Entwicklung alternativer Produktionsmethoden u.a. durch transgene Antikörper-produzierende Pflanzen (Übersicht in [Floss et al., 2007]) und Tiere unternommen.

Ein bispezifisches scFv mit Spezifität CD28 x NG2 (r28M) konnte erfolgreich, mit einer weit höheren Expressionsrate (100 mg/l) als in konventionellen Expressionssystemen, in transgenen geklonten Kühen und Kaninchen produziert werden [Grosse-Hovest et al., 2004]. *In vitro* und *in vivo* war die anti-Tumor Aktivität des Proteins mit dem in der Zellkultur hergestellten bs-scFv vergleichbar.

1.5.4 Bispezifische Antikörper zur Fokussierung zytotoxischer Effektoren

Unter zytotoxischen Triggermolekülen versteht man Moleküle auf der Oberfläche von zytotoxischen Zellen, die nach Aktivierung durch einen Antikörper eine Tumorzelllyse induzieren. Je nach Auswahl des Triggermoleküls lassen sich gezielt unterschiedliche Zellen des Immunsystems als Effektorzellen für eine Antikörpertherapie rekrutieren.

- **Panklonale Stimulation von T-Zellen über CD3**

Für die Aktivierung einer T-Zelle wird normalerweise zusätzlich zur Stimulation des T-Zellrezeptorkomplexes (TZR) ein zweites aktivierendes Signal benötigt [Lafferty und Cunningham, 1975]. Dieses Antigen-unabhängige kostimulatorische Signal kann von löslichen Faktoren wie Interleukin-2 oder aber von Rezeptoren, die Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle erkennen, vermittelt werden (z.B. CD28). Bei Fehlen dieses zweiten Signals kann eine Aktivierung des T-Zellrezeptors zur Anergie führen.

Mit präaktivierten T-Zellen konnte *in vitro* schon sehr bald gezeigt werden, dass es möglich ist, T-Zellen mittels eines bispezifischen Antikörpers mit Spezifität TZR/CD3 x Tumorantigen an die Tumorzellen zu rekrutieren und eine effektive Tumorzelllyse zu induzieren [Liu et al., 1985]. Unstimulierte, „ruhende“ T-Zellen hingegen waren nicht fähig, durch Verwendung bispezifischer Antikörper der Spezifität CD3 x Tumorantigen Tumorzellen zu lysieren.

Basierend auf dem Zwei-Signal-Modell konnte von Jung et al. erstmalig gezeigt werden, dass durch eine Kombination zweier bispezifischer Antikörper, gerichtet gegen ein Zielantigen auf der Tumorzelle und CD3 bzw. CD28 auf T-Lymphozyten, auch ruhende T-Zellen zu einer Lyse von Tumorzellen aktiviert werden können [Jung et al., 1987a]. Da die Induktion der Aktivierung eine Immobilisierung auf der Zielzelle voraussetzt, erfolgt eine Zielzell-restringierte T-Zellaktivierung.

Mittlerweile existieren mehrere bispezifische Antikörper die in der Lage sind T-Zellen auch ohne vorherige Präaktivierung und Kostimulation zu aktivieren und eine Tumorzelllyse herbeizuführen.

- **„Supra-agonistische“, panklonale T-Zellstimulation über CD28**

Das homodimere 44 kDa große Glycoprotein CD28 [Hara et al., 1985; Leslauer et al., 1986] gehört zu den wichtigsten kostimulatorischen Rezeptoren. Über ein MYPPPY-Motif in der extrazellulären Domäne [Freeman et al., 1993] bindet CD28 an Mitglieder der von professionellen APCs exprimierten B7-Familie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD81) [Linsley und Ledbetter, 1993; June et al., 1994; Allison, 1994; Rudd et al., 1994]. Im Gegensatz zur Ligation des TZR ohne Kostimulation, bleibt das Antigen-unabhängige kostimulatorische Signal ein neutrales Ereignis: Die alleinige Bindung von CD28 an seinen Liganden führt unter physiologischen Umständen zu keiner Reaktion; die Zelle wird nicht aktiviert, wird aber auch nicht anerg [June et al., 1994]. Weder α TZR-Antikörper noch „konventionelle“ α CD28-Antikörper sind in der Regel alleine in der Lage T-Zellen vollständig zu stimulieren, wohingegen eine Kom-

bination der beiden Antikörper zu einer vollständigen T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion führt.

Interessanterweise existiert aber eine Subklasse CD28-spezifischer Antikörper, die CD28-Superagonisten, welche in der Lage sind, T-Zellen auch ohne Stimulation des TZR vollständig zu aktivieren [Tacke et al., 1997].

Mittels einer Kartierung der Bindungsmotive von „konventionellen“ α CD28-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstelle dieser Antikörper nahe der B7-Bindungsstelle (MYPPPY-Motif) lag, wohingegen „superagonistische“ CD28-Antikörper an einen lateralen, Membran-proximalen Loop (C^{''}D Loop) des CD28-Moleküls binden [Luhder et al., 2003]. Mittels kristallographischer Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion zu einer linearen Komplexbildung führte (s. Abb. 1.11) [Evans et al., 2005]. Diese spezielle, durch CD28-Superagonisten vermittelte Komplexbildung der CD28-Moleküle führt voraussichtlich zu einer Aggregation kostimulatorischer Komponenten wie der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und dem *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) und folglich zur Generierung eines starken aktivierenden Signals [Beyersdorf et al., 2005].

Daß dieses Modell in der vorgeschlagenen Weise aber nicht uneingeschränkt gültig ist, konnte von Große-Hovest et. al gezeigt werden [Grosse-Hovest et al., 2003]. Unter Verwendung eines konventionellen α CD28-Antikörpers (Klon 9.3 [Hansen et al., 1980]) konnte in Form eines bispezifischen scFv-Fragmentes

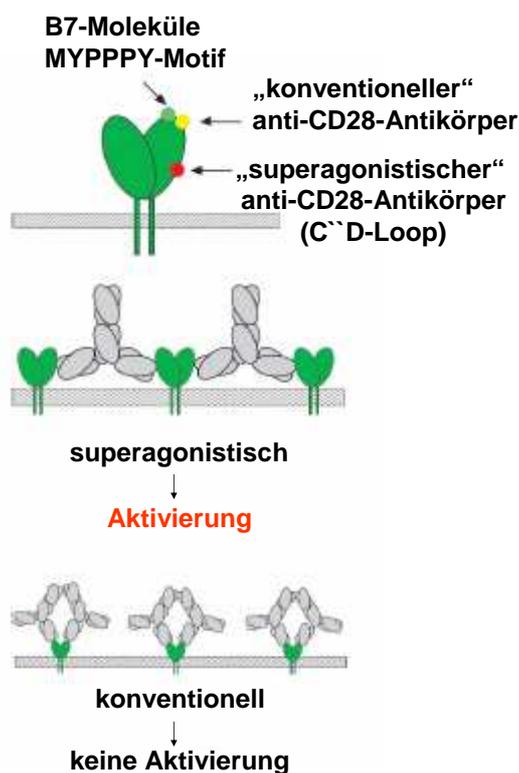


Abb. 1.11: Modell zur Bindung superagonistischer und konventioneller α CD28-Antikörper

Nur die super-agonistischen α CD28-Antikörper (rot) binden an den lateralen C^{''}D-Loop des CD28, nicht aber die konventionellen α CD28-Antikörper (gelb) oder die B7-Moleküle (grün). Die Bindung super-agonistischer α CD28-Antikörper führt zu einer linearen Komplexbildung und der Induktion einer T-Zellaktivierung. Modifiziert nach [Beyersdorf et al., 2005]

eine supra-agonistische T-Zellaktivierung erreicht werden (siehe unten).

Ein therapeutischer Einsatz von CD28-Superagonisten ist jedoch äußerst problematisch wie sich in dramatischer Weise bei einer im März 2006 durchgeführten klinischen Studie mit dem CD28-Agonisten TGN1412 zeigte. Vorausgegangene *in vitro*- und Tierversuche hatten gezeigt, dass der Antikörper überwiegend regulatorische T-Zellen aktivieren konnte, was ihn zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis machte [Beyersdorf et al., 2005]. In dieser ersten klinischen Studie sollte die Fähigkeit des IgG4-Antikörpers TGN1412 zu selektiven Aktivierung regulatorischer T-Zellen erstmalig im Menschen an gesunden Freiwilligen getestet werden. Doch schon kurze Zeit nach Injektion des Medikamentes kollabierten die sechs Testpersonen aufgrund eines Zytokinsturms [Suntharalingam et al., 2006]. Vorraussichtlich hatte die panklonale Aktivierung von T-Zellen im ganzen Körper inflammatorische Zytokine systemisch freigesetzt, die letztendlich zu einem Multiorganversagen führten.

Der dramatische Ausgang dieser klinischen Studie macht die Notwendigkeit einer strengen Zielzellrestriktion deutlich. Diese kann durch die Verwendung bispezifischer Antikörper erreicht werden. In einer Studie konnte für den bispezifischen scFv r28M mit Spezifität (anti-human CD28 x anti-human NG2 (CSPG4)) gezeigt werden, dass dieser in der Lage ist eine „supra-agonistische“ Zielzell-restringierte T-Zellaktivierung zu induzieren und eine Tumorzelllyse NG2-positiver Tumorzellen sowohl *in vitro* [Grosse-Hovest et al., 2003] als auch *in vivo* [Grosse-Hovest et al., 2005] zu vermitteln. Eine klinische Studie mit Patienten mit einem metastasierenden Melanom musste allerdings aufgrund der Londoner Zwischenfälle mit TGN1412 unterbrochen werden (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00204594?term=bispecific&rank=4>).

- **Bispezifische Antikörper gegen Fc γ -Rezeptoren**

Neben Lymphozyten können auch Makrophagen und Granulozyten durch bispezifische Antikörper mit einer Spezifität für Fc-Rezeptoren gezielt gegen Zielzellen gerichtet werden. Aufgrund ihrer selektiven Expression auf zytotoxischen Zellen erscheinen CD64 (Monozyten/Makrophagen und aktivierte neutrophile Granulozyten), CD16 (NK-Zellen) sowie Fc α RI (CD89) (Monozyten/Makrophagen, eosinophile und neutrophile Granulozyten) als zytotoxische Triggermoleküle interessant.

1.5.5 Bispezifische Antikörper zur Zielantigen-abhängigen Aktivierung des Todesrezeptors CD95

Ein Ziel der Krebstherapie ist es, kontrolliert Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen. Dies kann u.a. durch die Verwendung von bispezifischen Antikörpern gegen ein Tumorantigen und CD95 erreicht werden.

Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein Selbstmordprogramm der Zelle, durch das innerhalb weniger Stunden die Zelle vollständig eliminiert wird. Der Begriff Apoptose (apo = ab, weg los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst.

Erst durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose im Jahre 1972 [Kerr et al., 1972] wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt. Fünf Jahre später wurden beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die ersten Gene entdeckt, die für die Apoptose verantwortlich sind.

Die Apoptose ist für den vielzelligen Organismus eine wichtige Möglichkeit, sich selbst zu organisieren und zu erhalten. Beim „geregelten Zelltod“ handelt es sich um einen aktiven Prozess, der durch die Aktivierung verschiedener Eiweißstoffe vermittelt wird. Ein großer Meilenstein in der Tumorforschung war die Entdeckung, dass Chemotherapie u.a. durch die Auslösung von „geregeltem Zelltod“ in den Tumorzellen wirkt.

Zu den Stimuli die den programmierten Zelltod auslösen können zählen z.B. Schäden in der DNA, das Fehlen von Überlebenssignalen, zytotoxische Substanzen und die Interaktion verschiedener Todesrezeptoren mit ihren Liganden. Somit dient die Apoptose nicht nur der Zellzahlkontrolle in verschiedenen Geweben, sondern auch der Eliminierung von funktionsgeschädigten oder funktionsschädigenden Zellen [Ashkenazi und Dixit, 1998]. Nach ausgeprägten DNA-Schäden kann eine gestörte Apoptosefähigkeit sich teilender Zellen zur Entstehung von Tumoren beitragen [Thompson, 1995].

Der Todesrezeptor CD95

Der Todesrezeptor CD95 wurde erstmalig etwa gleichzeitig von den Gruppen um P.H. Krammer und S. Yonehara beschrieben und APO-1 bzw. Fas [Trauth et al.,

1989; Yonehara et al., 1989] und die entsprechenden Antikörper anti-APO-1 und anti-Fas genannt.

Bei dem CD95-Rezeptor handelt es sich um ein Glykoprotein mit nur einer membrandurchspannenden Domäne, das aufgrund seiner hohen Homologie zu anderen Rezeptoren zur Familie der TNF-(*tumor necrosis factor*) und NGF-Rezeptoren (*nerve grow factor*) gehört [Cosman, 1994; Itoh und Nagata, 1993; Nagata und Golstein, 1995].

Alle Mitglieder der Familie besitzen extrazellulär mehrere Cystein-reiche Domänen, die der Ligandenbindung dienen. Intrazellulär befindet sich bei einigen Rezeptoren, vor allem den Apoptose-vermittelnden Mitgliedern, eine sogenannte Todesdomäne (*Death Domain*, DD) [Lavrik et al., 2005], über die im Zytoplasma nach Rezeptoraktivierung hochmolekulare Signalkomplexe gebildet werden (s. Abb. 1.12).

Nach Bindung des entsprechenden Liganden wird eine Oligomerisierung des Rezeptors induziert, wodurch die intrazellulären DDs der Rezeptoren in der Lage sind, andere DD-besitzende Adaptermoleküle zu rekrutieren. Die Initiierung der Apoptose kann somit nur im Falle einer Multimerisierung (Trimerisierung) des CD95-Rezeptors erfolgen. Die von Krammer und Yonehara im Jahre 1989 beschriebenen Antikörper (anti-APO-1 bzw. anti-Fas) besaßen den Isotyp IgG3 bzw. IgM [Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989]. Dieser Isotyp führt zu einer Quervernetzung (*crosslink*) des Todesrezeptors durch Aggregation von Fc-Teilen, während IgM-Antikörper als Pentamere ohnehin die Fähigkeit zur Quervernetzung ihres Antigens besitzen. Vom ursprünglichen α APO-1-Antikörper existiert auch eine IgG2a-Isotyp Variante die *per se* nicht in der Lage ist Apoptose zu induzieren. Durch eine Quervernetzung mit einem α Maus-Antikörper jedoch, kann erfolgreich Apoptose induziert werden [Dhein et al., 1992].

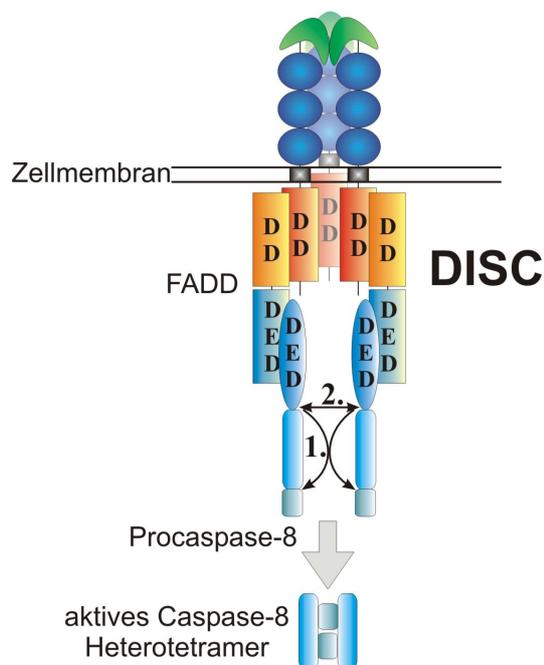


Abb. 1.12: Schematische Darstellung des DISC

Die Bindung des CD95 Liganden oder eines antagonistisch wirkenden Antikörpers führt zur Oligomerisierung des Rezeptors und damit zur Anlagerung von FADD/MORT1 über eine DD-DD Interaktion. FADD rekrutiert im Folgenden Procaspase-8 über die N-terminale DED und bewirkt so die Prozessierung der Caspase in die aktiven Untereinheiten. Nach [Sohn, 2007]

CD95 wird in einer Vielzahl verschiedener Gewebe wie den Zellen des lymphatischen Systems, Hepatozyten, alveolären Zellen, Myokardzellen und verschiedenen Tumorzellen exprimiert und kommt sowohl als Typ-I-Transmembranrezeptor als auch in einer löslichen Form vor [Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Cheng et al., 1994].

Die Expression des CD95-Liganden hingegen ist selektiver als die des CD95-Rezeptors und findet sich insbesondere auf zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen und einigen Tumorzellen.

Das CD95-System ist ein essentieller Bestandteil in der physiologischen Regulation des Immunsystems [Nagata, 1997] und gilt als ein wichtiger Mechanismus bei der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose [Trauth et al., 1989; Friesen et al., 1996; Walczak et al., 2000].

Apoptotische Signalwege

Die Einleitung der Apoptose kann entweder über Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche - auch als extrinsischer Weg bezeichnet - oder über Mitochondrien - als intrinsischer Weg bezeichnet [Krammer, 1999; Schmitz et al., 2000] erfolgen (s. Abb. 1.13, S. 37).

Todesrezeptoren werden durch ihre Liganden, Mitglieder der TNF-Familie aktiviert. Bindet der entsprechende Ligand an die Todesrezeptoren, kommt es zur Bindung von Adaptorproteinen an die Todesdomäne des Todesrezeptors wie zB. FADD (*Fas-associating protein with death domain*), die dann die inaktiven Proformen von Mitgliedern der Caspasen-Familie, Procaspase-8 (FLICE: *FADD-like Interleukin-1-converting enzyme*) und Procaspase-10, über homophile Interaktionen der C-terminalen Todesdomäne (DD) von FADD mit der DD des CD95-Antigens, aus dem Zytoplasma rekrutieren. Caspase-8 und Caspase-10 fungieren hierbei als „Initiator“-Caspasen da diese zum „Tod-induzierenden Signal-Komplex“ („*Death-inducing Signaling Complex*“, DISC) der aus den zytoplasmatischen Domänen des Todesrezeptors, Adaptermolekülen (FADD) und der Initiatorcaspase-8 besteht, rekrutiert werden. [Kischkel et al., 1995; Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2000] (s. Abb. 1.13, S. 37). Im DISC werden Procaspase-8 und -10 gespalten und ergeben die aktiven Initiator-Caspasen. Zellen bei denen die Menge an aktiver Caspase-8 und damit die alleinige Stimulierung des extrinsischen Weges ausreicht um Apoptose direkt einzuleiten, nennt man Typ-I-Zellen [Scaffidi et al., 1998]. In Typ-II-Zellen reicht das extrinsische Signal alleine nicht aus, zur Apoptoseinduktion wird hierbei eine Aktivierung des intrinsischen Weges benötigt.

Der intrinsische Weg wird durch das Bcl-2-Familienmitglied Bid aktiviert.

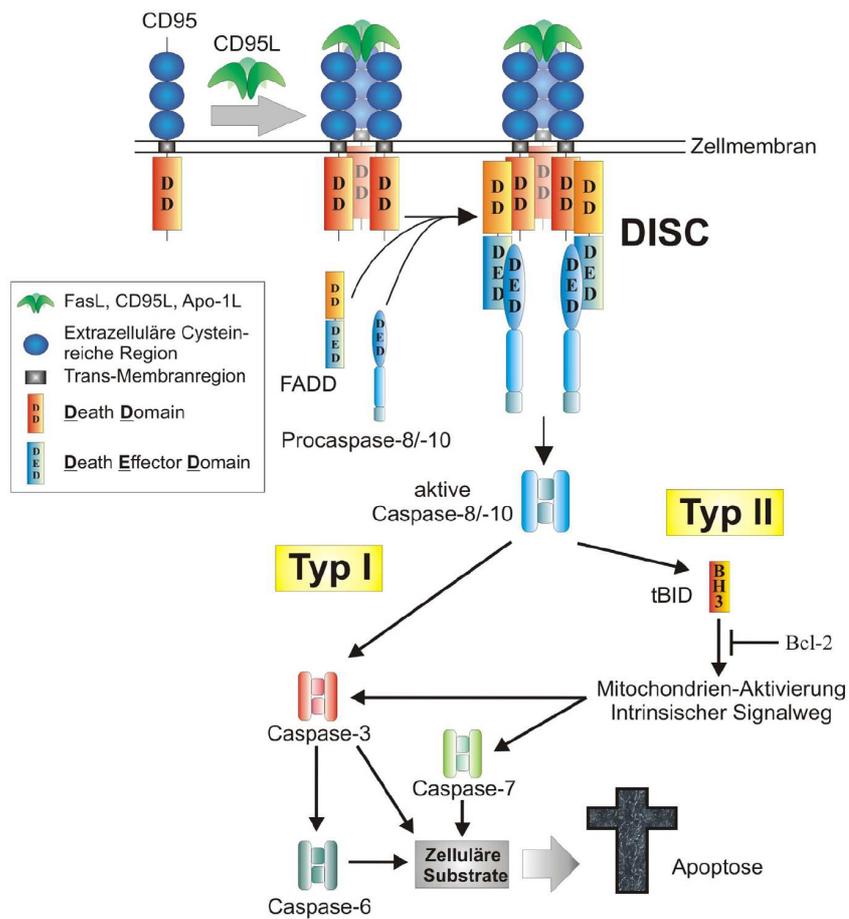


Abb. 1.13: Typ I und II der CD95-induzierten Apoptose

Nach der durch den CD95-Liganden (CD95L) induzierten Oligomerisierung des CD95-Rezeptors wird der DISC über die Rekrutierung von FADD und Procaspase-8/-10 gebildet. In Typ I-Zellen wird dadurch genügend Caspase-8/-10 aktiviert, um über eine direkte Prozessierung von Caspase-3 Apoptose auszulösen. Typ II Zellen dagegen benötigen eine Signalverstärkung über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von BID, welches den intrinsischen Signalweg aktiviert, der wiederum durch Bcl-2 inhibiert werden kann. Nach [Sohn, 2007]

Bid wird durch aktive Caspase-8 gespalten und zu den Mitochondrien transloziert. Der intrinsische Weg wird auf der Ebene der Mitochondrien durch Stimulation der mitochondrialen Membran durch noch genauer zu definierende Mechanismen eingeleitet. Der Apoptoseprozeß bewirkt eine Störung des Elektronentransportes, der oxidativen Phosphorylierung und der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Produktion. Es kommt zu einer Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptogenen Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien [Martinou und Green, 2001; Zamzami und Kroemer, 2001]. Cytochrom C bildet mit Apaf-1, ATP und einer weiteren Initiator-Caspase, Procaspase-9, einen Komplex das sogenannte Apoptosom, in welchem Caspase-9 aktiviert wird.

Die aktivierten Initiator-Caspasen spalten und aktivieren Effektor-Caspasen, vor

allem Caspase-3, -6 und -7. Da sich aktive Effektor-Caspasen gegenseitig spalten, wird eine sich verstärkende Caspasen-Aktivierungs-Kaskade gestartet [Rathmell und Thompson, 1999]. Letztendlich spalten die Effektor-Caspasen zelluläre Substrate, die „Todessubstrate“, was zu charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen führt, wie Änderung der Zellmorphologie, Chromatin-Kondensation, zum Verlust der Plasmamembran-Stabilität durch Verlagerung von Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite der Membran an die Außenseite und schließlich zur DNA-Fragmentierung [Thompson, 1995; Cohen, 1997]. Diese Alterationen der Zellmembran werden von Phagozyten erkannt, welche die Überreste der sterbenden Zelle aufnehmen [Savill und Fadok, 2000].

Regulatorische Proteine bei der Apoptose

Es gibt verschiedene Proteine die den apoptotischen Prozeß sehr genau auf unterschiedlichen Ebenen kontrollieren. So inhibieren beispielsweise die FLIPs (*FLICE-inhibitory proteins*) die Einleitung der Apoptose auf der Ebene der Todesrezeptoren [Krueger et al., 2001]. In humanen Zellen konnten zwei Splice-Varianten identifiziert werden: eine lange ($FLIP_L$) und eine kurze Form ($FLIP_S$). Sie besitzen strukturelle Homologie zu Procaspase-8, haben aber kein katalytisches Zentrum. Diese Struktur erlaubt es ihnen, an den DISC zu binden und dadurch die Prozessierung und Aktivierung der Initiator-Caspasen zu inhibieren.

Eine weitere Klasse von regulatorischen Proteinen sind die IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) [Deveraux und Reed, 1999]. IAPs binden und inhibieren Caspasen. Möglicherweise fungieren sie auch als Ubiquitin-Ligasen und fördern den Abbau der gebundenen Caspasen. Jedoch konnte nicht für alle IAPs gezeigt werden dass sie Apoptose unterdrücken, möglicherweise haben diese IAPs andere Funktionen. Die IAPs wiederum werden durch das Protein SMAC/DIABLO inhibiert [Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000]. Es wird zusammen mit dem Cytochrom c während der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt und fördert die Aktivierung von Caspasen, indem es an IAPs bindet.

Eine wichtige Klasse von regulatorischen Proteinen sind die Mitglieder der Bcl-2 Familie, die die Apoptose auf der mitochondrialen Ebene regulieren [Martinou und Green, 2001; Zamzami und Kroemer, 2001]. Ihrer Funktion nach können die Bcl-Familienmitglieder in anti-apoptotische und pro-apoptotische Proteine eingeteilt werden. Alle anti-apoptotischen Mitglieder besitzen die Bcl-2-Homologie-(BH)-Domänen 1, 2 und 4, während für die Apoptose-Induktion die BH3-Domäne entscheidend zu sein scheint. Die pro-apoptotischen Mitglieder können in die Bax-Superfamilie und die „BH3-only“-Proteine unterteilt werden. Bcl-2 Proteine beein-

flussen die Permeabilität der Membran, jedoch ist der biochemische Mechanismus ihrer Wirkung noch nicht ganz geklärt.

Zielantigen-abhängige Aktivierung des Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen Antikörpern

Monoklonale agonistische α CD95-Antikörper können in CD95-positiven und Fas-sensitiven Zelllinien Apoptose induzieren. Jedoch ist ein klinischer Einsatz solcher monoklonaler Antikörper nicht möglich, da das CD95-Antigen auch auf einer Vielzahl von normalen Zellen, wie z.B. Hepatozyten, exprimiert wird. In einer *in vivo* Studie mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine systemische Applikation agonistischer α CD95-Antikörper innerhalb kürzester Zeit zu einem tödlichen Leberversagen führte [Ogasawara et al., 1993]. Folglich ist auch im Falle der α CD95-Antikörper für den therapeutischen Ansatz eine stringente Zielzellrestriktion notwendig, welche durch den Einsatz bispezifischer Antikörper gewährleistet werden könnte.

In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass bispezifische CD19 x CD95, CD40 x CD95 und CD20 x CD95 F(ab')₂-Fragmente selektiv Apoptose in humanen Zielantigen-positiven B-Lymphom-Zelllinien induzieren konnten [Jung et al., 2001]. Bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität Tumorantigen x CD95 können prinzipiell auf zwei unterschiedliche Weisen binden: uni- oder bizellulär (s. Abb. 1.14, S. 40).

Auch wenn eine unizelluläre Bindung nicht ausgeschlossen werden kann, so wird vermutet, dass im Falle der Tumorantigen x CD95-Konstrukte eine bizelluläre Bindung für die Auslösung einer CD95-vermittelten Apoptose verantwortlich ist. Jung et al. zeigten, dass in CD95-sensitiven, jedoch Zielantigen-negativen Lymphomzellen mit den CD20 x APO-1 und CD40 x APO-1-Konstrukten alleine keine Aktivierung des CD95 möglich war. Waren jedoch zusätzlich Zielantigen-positive Zellen während des Experimentes präsent, so konnte eine Lyse der Zellen in einem sogenannten *bystander* Modus induziert werden [Jung et al., 2001]. Solch eine *bystander*-Lyse kann folglich nur durch eine bizelluläre Bindung der bispezifischen Antikörper zustande kommen (s. Abb. 1.14, S. 40). Auch für ein bispezifisches F(ab')₂-Fragment mit Spezifität für EGFR x CD95 konnte neuerdings gezeigt werden, dass es bevorzugt unizellulär bindet und keine CD95-induzierte Apoptose EGFR-positiver, CD95-sensitiver Tumorzellen vermitteln kann [Herrmann et al., 2007]. Wurde das bispezifische EGFR x CD95-Konstrukt in einem *bystander* Experiment eingesetzt, so war es in der Lage eine äußerst effiziente Apoptose der CD95-sensitiven, Zielantigen-negativen *bystander*-Zellen zu induzieren. Dadurch

konnte gezeigt werden, dass das bispezifische $F(ab')_2$ -Fragment EGFR x CD95 nur bei bizellulärer Bindung effizient eine CD95-vermittelte Apoptose vermitteln kann.

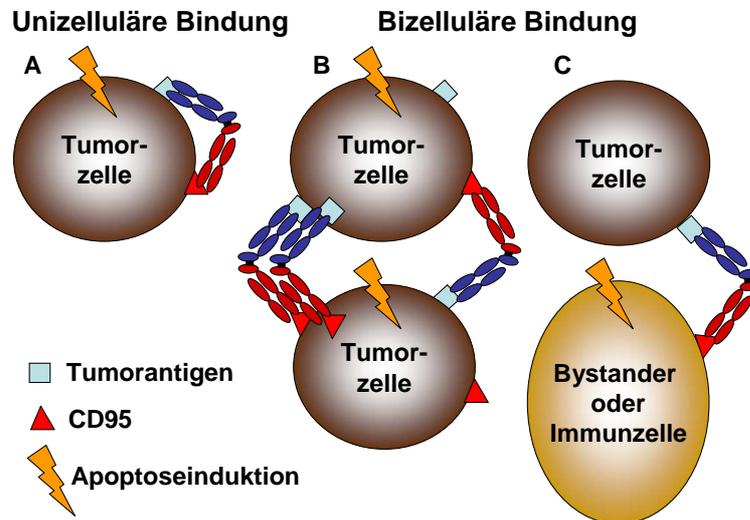


Abb. 1.14: Bindungsmöglichkeiten bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente mit Spezifität Tumorantigen x CD95

Bispezifische $F(ab')_2$ -Fragmente können prinzipiell auf zwei unterschiedliche Weisen binden: uni- oder bizellulär.

A: Unizelluläre Bindung

B: Bizelluläre Bindung

C: Bizelluläre Bindung im *bystander* Modus

Apoptosesensitivierer

Im Gegensatz zu gesunden Zellen kann es in Tumorzellen durch Aktivierung von Protoonkogenen und Verlust von Tumorsuppressorgenen zu einer Fehlregulation des Zellzyklus mit rascher Zellproliferation und Störung des Apoptoseweges kommen. Deshalb sind Tumorzellen in der Regel *per se* nur wenig sensitiv gegenüber CD95-induziertem Zelltod. Ein alleiniger Einsatz bispezifischer Antikörper zur Induktion von Apoptose über den Todesrezeptor CD95 wäre in diesem Falle nur wenig erfolgreich, weshalb der Einsatz eines sensitivierenden Reagenz unumgänglich wäre. Es existieren viele verschiedene Substanzen von denen beschrieben wurde, dass sie in Kombination mit Todesrezeptorliganden oder agonistischen Antikörpern gegen Todesrezeptoren, die Apoptose-Sensitivität *in vitro* und *in vivo* erhöhen können. Dazu zählen neben den klassischen Zytostatika weitere Substanzen wie z.B. Hormone, therapeutische monoklonale Antikörper, Zytokine und sogenannte „small molecules“ wie z.B. Signaltransduktions-Inhibitoren und Proteasominhibitoren.

1.6 Zielsetzung

Durch den Einsatz Antikörper-basierter Therapeutika wurden in den letzten Jahren große Erfolge bei der Therapie lymphoider Neoplasien erzielt. Dennoch stellen Rezidive weiterhin ein großes Problem dar, was die Notwendigkeit einer Optimierung zur Therapie eingesetzter Antikörper und einer Suche nach neuen, besseren Therapeutika verdeutlicht.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Entwicklung und funktionellen Charakterisierung Antikörper-basierter Immuntherapeutika die gegen das CD20-Antigen gerichtet sind. Dabei sollten verschiedene Moleküle untersucht werden, welche auf unterschiedliche Weise wirken, die aber alle gegen das CD20-Antigen auf Lymphomzellen gerichtet sind.

Eine Optimierung der Affinität des Fc-Teils monoklonaler IgG1-Antikörper zum Fc γ -RIIIa und als Folge davon eine gesteigerte Effizienz bei der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der therapeutischen Effektivität von Antikörpern dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die therapeutische Effektivität des chimerisierten α CD20-IgG1-Antikörpers 2H7 mittels *Fc-Remodelling* basierend auf den Arbeiten von Lazar et al. [Lazar et al., 2006], und einer Veränderung der Glycosylierung durch einen einfachen Wechsel der Expressionszelllinie hin zu der gering-fucosylierenden Zelllinie YB2/0 optimiert werden.

Grosse-Hovest et al. gelang es 2003 erstmalig, mit einem rekombinanten bispezifischen *single-chain* Antikörper mit Spezifität CD28 x NG2 (r28M), eine Zielzell-restringierte supra-agonistische T-Zellaktivierung und Lyse Zielantigen-positiver Tumorzellen zu zeigen, wobei ein „primäres“ Signal über den T-Zellrezeptor hierbei nicht notwendig war [Grosse-Hovest et al., 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Fähigkeit eine besondere Eigenschaft der im r28M-Molekül enthaltenen Antikörper ist, oder ob eine supra-agonistische CD28-Stimulation auch im Falle eines Austausches der Spezifität für NG2 gegen eine Spezifität für das B-Zell-assoziierte Antigen CD20 zu beobachten ist.

Basierend auf den Arbeiten von Jung et al., dass bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD95 x CD20 in der Lage sind *in vitro* in humanen CD95-sensitiven, Zielantigen-positiven Lymphomzellen (SKW6.4) Apoptose zu induzieren [Jung et al., 2001], sollten in dieser Arbeit verschiedene CD20 x CD95-Konstrukte *in vitro* verglichen sowie näher charakterisiert und auf verschiedenen B-Lymphomzelllinien

ZIELSETZUNG

untersucht werden.

Desweiteren sollte ein Mausmodell etabliert werden, um die therapeutische Wirksamkeit der CD20 x CD95-Konstrukte erstmals auch *in vivo* in Immuntherapieversuchen untersuchen zu können.

Abschließend sollte ein vollkommen neuer Ansatz zur Stimulation des Todesrezeptors CD95 evaluiert werden: Hierzu wurde der α CD20-IgG1-Antikörper 2H7 am C-Terminus mit dem c-myc-Epitop versehen. Durch eine Kombination mit einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment mit Spezifität α myc x CD95 sollte eine CD95-vermittelte Apoptose der Tumorzellen induziert werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

Inhalt

2.1	Material	45
2.1.1	Geräte	45
2.1.2	Glas- und Plastikwaren	46
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	47
2.1.4	Gebrauchsfertige Kits	51
2.1.5	Oligonukleotide	51
2.1.6	Verwendete Computerprogramme	52
2.1.7	Puffer und Medien	52
2.1.8	Bakterienstämme	56
2.1.9	Plasmide	57
2.1.10	Antikörper	60
2.1.11	Zelllinien	62
2.2	Molekularbiologische Standardmethoden zur Kon- struktion und Klonierung rekombinanter Antikörper . .	63
2.2.1	Polymerase Kettenreaktion mit überhängenden Primern .	63
2.2.2	Agarosegelelektrophorese	64
2.2.3	Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel . . .	64
2.2.4	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion . .	65
2.2.5	Ligation von DNA-Enden	65
2.2.6	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .	66
2.2.7	Anlegen von Bakterien-Kulturen	67
2.2.8	Plasmid Präparation	68
2.2.9	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	68
2.2.10	Sequenzierung	69
2.3	Zellbiologische Methoden eukaryontischer Zellen	70

2.3.1	Passagieren und Ernten von Zellen	70
2.3.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	71
2.3.3	Cryokonservierung von Zellen	71
2.3.4	Inaktivierung von Tumorzellen	72
2.3.5	Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen	72
2.3.6	Kultivierung antikörperproduzierender Zellen	73
2.3.7	Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC)	73
2.3.8	Magnetische Zellseparation (MACS)	74
2.3.9	Gewinnung von humanem Serum aus Vollblut	75
2.4	Chromatographische Verfahren	75
2.4.1	Affinitätschromatographie	75
2.4.2	Gelfiltrationen	77
2.5	Proteinchemische Methoden	78
2.5.1	Dialyse proteinhaltiger Lösungen	78
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen	78
2.5.3	Herstellung bispezifischer F(ab') ₂ -Fragmente	79
2.6	Analytische Methoden	83
2.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie- Färbung	83
2.6.2	Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	84
2.7	Funktionelle Charakterisierung der produzierten Anti- körper	85
2.7.1	Proliferationsassays	85
2.7.2	Vitalitätsassays	85
2.7.3	ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay)	87
2.8	<i>In vivo</i>-Immuntherapieversuche	88
2.8.1	SCID-Maus-Xenograft-Modell	88
2.8.2	Rückgewinnung von Tumorzellen aus dem Knochenmark	89

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank Heraeus function line	Thermo Electron, Waltham, USA
Dispensor Multipette	Eppendorf, Hamburg
DryEase Mini-Gel Drying System	Novex, San Diego, USA
Durchflußzytometer FACS Calibur	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Dual Vertical Mini-Gel Unit	C.B.S. Scientific, Del Mar, USA
Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1	GE Healthcare, München
Einkanalschreiber Rec101	GE Healthcare, München
Elektrophorese-Apparatur Dual Vertical MiniGel Unit	C.B.S. Scientific, Del Mar, USA
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	BioRad, München
ELISA-Plattenlesegerät Spectra Max 340	Molecular Devices, München
FPLC-Pumpe, Pumpen-Typ P500	GE Healthcare, München
FPLC-Kontrolleinheit LCC501	GE Healthcare, München
Fraktionskollektor FRAC-100	GE Healthcare, München
Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion, Ottawa, Kanada
Gelelektrophorese-Apparatur Owl Easy-cast	Owl Separation System, Portsmouth, USA
B2 und B1A	USA
Gelfiltrationschromatographiesäule Superdex TM 200 Prep Grade 16/60 Hi-Load	GE Healthcare, München
Gelfiltrationschromatographiesäule Superdex TM 200 PC3.20	GE Healthcare, München
Heizrührer MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach
MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Midi-MACS System	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Peristaltikpumpe P-1	GE Healthcare, München
pH-Messgerät WTW pH523	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 3000	GE Healthcare, München
Pipetten	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, CH
Schüttler Multitron	Infors, Bottmingen, CH
Sequenziergerät ABI PRISM TM 310	Applied Biosystems, Weiterstadt

MATERIAL UND METHODEN

SMART System	GE Healthcare, München
Sterilbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Chur, CH
Szintillationsmeßgerät MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer, Rodgau
Thermocycler PTC-100	BioRad, Waltham, USA
Trockenschrank Heraeus ET	Thermo Electron, Waltham, USA
UV-Tisch FLX-20M und TFX-20M	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer Vibro-Fix VF2	Ika Labortechnik, Staufen
Waagen (Fein- und Tischwaage)	Sartorius Göttingen
Wasserbad W22	Preiss-Daimler, Medingen
Wippe Rocky RT-1	Fröbel, Lindau
Zell-Harvester ICH-110-96	Inotech, Dottikon, CH
Zell-Inkubator Heraeus B6200	Thermo Electron, Waltham, USA
Zentrifugen:	
Jouan BRA 4i	Thermo Electron, Waltham, USA
Heraeus Biofuge A und Biofuge fresco	Thermo Electron, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0 und 2.0R	Thermo Electron, Waltham, USA
Sorvall RC 5C Plus	Thermo Electron, Waltham, USA

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Auto-Seq G50 Säulchen	GE Healthcare, München
Bechergläser Glas	Schott, Mainz
Bechergläser Plastik	Vitlab, Großostheim
Bottle-top Filter (0,22 μ m Porengröße)	Millipore, Schwalbach
Cellophan-Folie DryEase Mini	Invitrogen, Karlsruhe
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cryobox	Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche Visking 12-14 kDa	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten Plastik 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten Plastik 25 ml	Corning, Kaiserslautern
Einmalspritzen Plastik	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
ELISA-Platte Maxisorb	Nalge Nunc international, Rochester NY, USA
Erlenmeyerkolben Simax 500 ml, 1l	Bohemia Cristal, Selb

Filtermatten Melti Lex A	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Glasflaschen 250 ml, 500 ml, 1l, 2l	Schott, Mainz
Lumaplate 96	Packard BioScience, Dreieich
Midi-MACS-Säulchen LD und LS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Messzylinder Plastik 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1l	Vitlab, Großostheim
Mikrokonzentratoren Amicon Ultra-15	Millipore, Schwalbach
Mini-Säulen PD-10 Sephadex G25	GE Healthcare, München
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten Long size	WU, Mainz
PCR-Softtubes 0,5 ml	Biozym, Oldenburg
Pipettenspitzen 200 μ l, 1000 μ l	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 μ l	Biozym, Oldendorf
PP-Röhrchen 1,3 ml, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PS-Röhrchen Falcon 5 ml, 15 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Präzisions-Küvette Suprasil® halbmikro	Hellma, Basel, CH
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
S-Monovetten® , 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 μ m	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflasche Triple flask	Nunc-Wiesbaden
Zellkulturplatten 96-well flat/round bottom	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatte Falcon 6-well flat bottom	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenbecher 500 ml	Nalgene, Hereford, UK
Zentrifugenröhrchen SS34	Nalgene, Hereford, UK
Zentrikon <i>Amicon Ultra 10 kDa</i> und <i>30 kDa</i>	Millipore, Schwalbach

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg

MATERIAL UND METHODEN

Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
β -Mercaptoethanol 14,3M	Serva, Heidelberg
Biocoll TM Separation Solution	Biochrom, Berlin
BSA (Fraktion V)	New England Biolabs, Frankfurt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Sigma, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure))	Sigma, Steinheim
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Cambrex, Verviers, Belgien
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethanol vergällt (96%)	Merck, Darmstadt
Ethanol zur Analyse (100%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Serva, Heidelberg
FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse	Becton-Dickinson, Heidelberg
FasL [0,5 mg/ml]	Alexis Biochemicals, Grünberg
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Steinheim
HRP-Streptavidin	BD Pharmingen, Heidelberg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
MACS-Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchromat (⁵¹ Cr, 5 mCi/ml)	GE Healthcare, München
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Steinheim
Rekombinantes IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes Protein A, Agarose-immobilisiert	Perbio Science, Bonn
Rekombinantes Protein L, Agarose-immobilisiert	Perbio Science, Bonn
Szintillationscocktail <i>Ultima Gold</i>	Perkin Elmer, Rodgau
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
³ H-Thymidin (1 mCi/ml)	Hartmann Analytic, Braunschweig
TMB Microwell Peroxidase Substrate System (2-C)	KPL, Gaithersburg, USA
TMB Peroxidasesubstrat & Peroxidaselösung	
Triton [®] X-100	Sigma, Steinheim
Trizma Base (Tris-Base)	Sigma, Steinheim
Trizma Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche, Mannheim
X-Gal (5'Br-4'Cl-3'Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma, Steinheim

Zellkulturmedien und -zusätze

FCS (Fötale Kälberserum) (hitzeinaktiviert 1 h, 56°C)	Perbio Science, Bonn
Geneticin-Sulfat (G418)	Invitrogen Karlsruhe
Hybridoma-SFM	Invitrogen, Karlsruhe
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) mit 25 mM HEPES und L-Glutamin	Cambrex, Verviers, Belgien
MEM-NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren)	c.c.pro, Neustadt

MATERIAL UND METHODEN

Natriumpyruvat	c.c.pro, Neustadt
Penicillin/Streptomycin	Cambrex, Verviers, Belgien
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit 25 mM HEPES und L-Glutamin	Cambrex, Verviers, Belgien

Apoptosesensitivierer

Acetylsalicylsäure	Sigma, Steinheim
Bortezomib (Velcade)	Universitätsapotheke, UKT, Tübingen
Cycloheximid (3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl) 2-hydroxyethyl]glutarimid	Sigma, Steinheim
Dexamethasone	Sigma, Steinheim
Doxorubicin	cell pharm, Hannover
ErCP3	Universitätsapotheke, UKT, Tübingen
LY294002	New England Biolabs, Frankfurt
N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	Roche, Mannheim
Resveratrol	Sigma, Steinheim
Staurosporine	Sigma, Steinheim
Topotecan	SmithKline Beecham Pharma, Dresden
Teniposid	Bristol-Myers Squibb, München

Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
VENT-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Pepsin	Merck, Darmstadt

Größenmarker für die Elektrophorese

- 1kb Marker und 100 bp Marker, New England Biolabs, Frankfurt
- SeeBlue® Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Gebrauchsfertige Kits

- ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V1.1, Applied Biosystems, Weiterstadt
- BioTrap Gelelutions-Starterkit, Schleicher & Schuell, Dassel
- PCR-ScriptTM Amp Cloning Kit, Stratagene Heidelberg
- QIAquick[®] Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden
- QIAprep[®] Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit, Qiagen, Hilden
- QIAGEN[®] Plasmid-DNA Maxiprep Kit, Qiagen, Hilden

2.1.5 Oligonukleotide

Extensions-Primer

Hersteller: BIOMERS.net, Ulm

- 20-BspEI: 5'-atccggacaggcttatctacagcagtctgggctgag-3'
- 20-Rev : 5'-gggggaagatgaacacactgggggcagccactgtccgtttcagctccagcttggcccagcaccgaacgtggg-3'
- universal-Rev : 5'-gatcagcttctgctcttcagcagaagggggaagatgaacacactgggggcagccactgt-3'
- universal-Rev2: 5'-gagttcaggtcctcttcagagatcagcttctgctcttcagcagaagggggaag-3'
- universal-Rev3: 5'-tactagttatcagtcacagcagagttcaggtcctcttcagagatcagcttctgctc-3'

Sequenzier-Primer

Hersteller: MWG-Biotech, Ebersberg; Thermo Hybaid, Ulm

- Kons1-Rev: 5'-tgcagggtccaaggcagtgctgggtg-3'
- Kons2-Rev: 5'-ggtctgttatgccaagctctgtctatg-3'
- Kons2-Hin: 5'-ccagactcaaacttacctacctttatc-3'
- Intron-Rev: 5'-gattcccgtttcagagaatcttgg-3'
- mRNA1-Hin: 5'-acatatgtacaatgtcctcaccacag-3'
- M13-Hin: 5'-gta aaa cga agg cca gt-3'
- M13-Rev: 5'-aac agc tat gac cat g-3'

2.1.6 Verwendete Computerprogramme

CellQuestPro	Becton-Dickinson, Heidelberg
HUSAR Online Bioinformatics Lab	DKFZ, Heidelberg
MS Excel XP	Microsoft, Unterschleißheim
MS PowerPoint XP	Microsoft, Unterschleißheim
Sigma Plot V7.0	SPSS, München
SMART Manager	GE Healthcare, München
TeXnicCenter 1 beta 6.31	ToolsCenter.org (Open Source Project)

2.1.7 Puffer und Medien

Molekularbiologie/Klonierung

Ampicillin-Stocklösung [20 mg/ml]	Ampicillin in H ₂ O (bidest.)
dNTP-Stocklösung [10 mM]	dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H ₂ O (bidest.)
DNA-Ladepuffer (6x)	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA in H ₂ O (bidest.), pH 7,6
EtBr-Stocklösung [10 mg/ml]	Ethidiumbromid in H ₂ O (bidest.)
IPTG-Stocklösung [100 mM]	in H ₂ O (bidest.)
LB-Medium (flüssig)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl H ₂ O (bidest.) ad 1l

LB-Medium (Platten)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Bacto-Agar H ₂ O (bidest.) ad 1l 5 ml Ampicillin-Stocklösung
MgCl ₂ -Stocklösung [1 M]	MgCl ₂ in H ₂ O (bidest.)
Natriumacetat-Lösung [3 M]	Natriumacetat in H ₂ O (bidest.), pH5,2
TAE-Puffer (50x)	2M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA in H ₂ O (bidest.), pH 8,5
X-Gal-Stocklösung [10 %]	X-Gal in DMF

Zellkultur

Einfriermedium	80% FCS (hitzeinaktiviert) 20% DMSO
IMDM-Komplettmedium	IMDM 10% FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 50 µM β-Mercaptoethanol
RPMI-Komplettmedium	RPMI1640 10% FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA

MATERIAL UND METHODEN

	50 μ M β -Mercaptoethanol
SFM (Hybridoma serum-free Medium) + Pen/Strep	1x Hybridoma SFM 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
PBS-EDTA	1 mM EDTA in DPBS, pH8
Trypan-Blau	0,1% Trypan-Blau in DPBS

Chromatographische Verfahren

DPBS-A	0,01% Natriumazid in DPBS
DPBS + 200 mM NaCl	200 mM NaCl in DPBS
Glycin-Puffer pH3 und pH2 [0,1 M]	Glycin in H ₂ O (bidest.), pH3 bzw. pH2
0,1 M Na-Phosphat/0,15 M NaCl-Puffer pH 7,4	0,05 M Natriumdihydrogenphosphat- monohydrat 0,05 M Natriumhydrogenphosphat- dihydrat 0,15 M NaCl
Tris-Puffer pH9 [1,3 M]	Tris-Base in H ₂ O (bidest.)

Proteinbiochemie

0,1 M Acetatpuffer pH4	0,05 M Natriumacetat 0,05 M Essigsäure 0,15M Natriumchlorid
0,5 M Glycinpuffer	Glycin in H ₂ O (bidest.)

Durchflusszytometrie (FACS)

FACS-Puffer DPBS	0,01% Natriumazid 1% FCS (hitzeinaktiviert)
PI-Stocklösung	50 µg/ml Propidium-Iodid in DPBS

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

APS-Lösung (10%)	100mg/ml APS in H ₂ O (bidest.)
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol 10% Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue 34,95% H ₂ O (bidest.)
Entfärbelösung	50% Methanol 10% Essigsäure 50% H ₂ O (bidest.)
Geltrocknungslösung	22% Ethanol 1,5% Glycerin in H ₂ O (bidest.)
6x Ladepuffer nicht-reduzierend	7 ml Sammelgelpuffer 3 ml Glycerin 1 g SDS 1,2 mg Bromphenolblau
6x Ladepuffer reduzierend	7 ml Sammelgelpuffer 3 ml Glycerin 1 g SDS 1,2 mg Bromphenolblau 0,93 g Dithiotreitol
10x Laufpuffer	250 mM Tris-Base 1,9 M Glycin

MATERIAL UND METHODEN

	1% SDS in H ₂ O (bidest.)
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl in H ₂ O (bidest.) pH6,8
SDS-Stocklösung	10% SDS in H ₂ O (bidest.)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Base in H ₂ O (bidest.), pH8,6

ELISA

Waschpuffer	0,05% Tween20 in DPBS
Blockierungslösung	0,05% Tween20 1% BSA in DPBS
0,1 M NaHCO ₃ -Lösung	0,1 M NaHCO ₃ in H ₂ O (bidest.), pH9
Stopplösung	1M H ₃ PO ₄

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli DH5 α , MBI Fermentas, St. Leon Rot

Genotyp:

F⁻(ϕ 80d Δ (lacZ)M15)recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r⁻_km⁺_k supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169

2.1.9 Plasmide

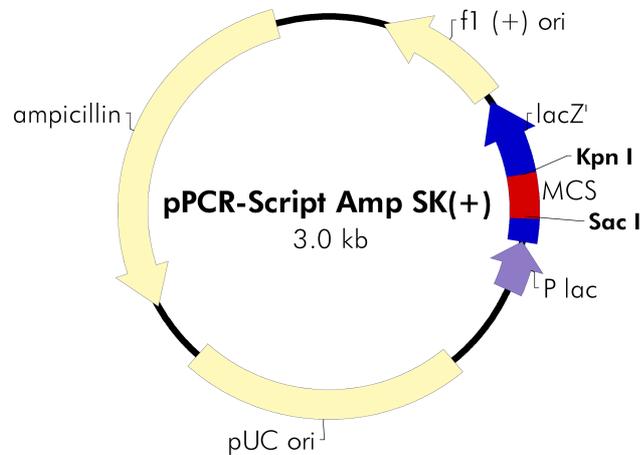


Abb. 2.1: *pPCR-ScriptTM AmpSK(+)* Cloning-Vektor, Stratagene, Heidelberg
Wesentliche Elemente und ihre Position:

f1 (+) Origin (135-441); β -Galactosidase α -Fragment (460-816); Multiple Cloning Site MCS (653-760); *lac*-Promoter (817-938); pUC-Origin (1158-1825); Ampicillin-Resistenz (*bla*) ORF (1978-2833)

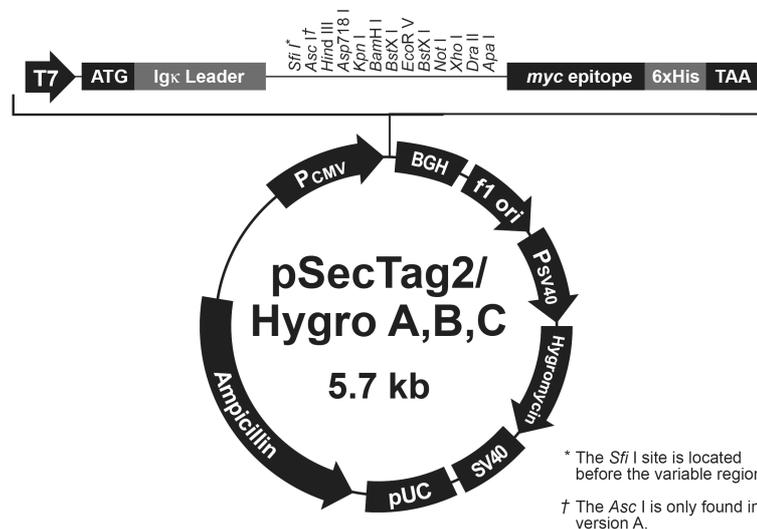


Abb. 2.2: *pSecTag2/Hygro*, Invitrogen, Groningen, NL
Wesentliche Elemente und ihre Position:

CMV-Promoter (209-863); T7-Promoter/priming site (863-882); Maus Ig kappa-Kette V-J2-C Signalpeptid (905-967); Multiple cloning site (970-1081); c-myc-Epitop (1082-1111); Polyhistidine tag (1127-1144); BGH reverse priming site (1167-1184); BGH Polyadenylierungs Sequenz (1166-1380); f1 origin (1443-1856); SV40 Promoter und Origin (1924-2245); Hygromycin B Phosphotransferase ORF (*HygR*)(2263-3288); SV40 polyadenylation site (3418-3547); pUC origin (3931-4604); b-lactamase ORF (*AmpR*) (4749-5609)

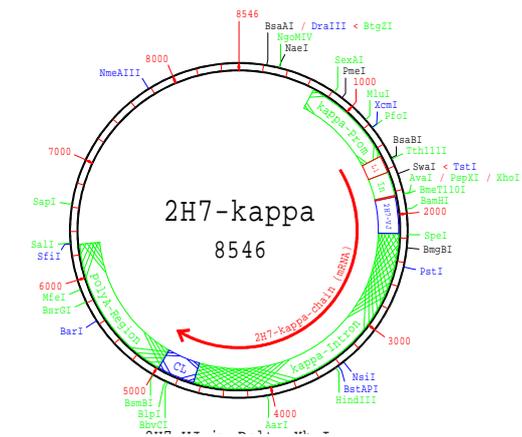


Abb. 2.5: 2H7-kappa

Der 2H7-kappa ist ein eukaryontischer Expressionsvektor für die leichte Kette des chimären α -human CD20-Antikörpers 2H7. Der Vektor enthält den kompletten κ -Promoter, eine von *XhoI*- und *SpeI*-Schnittstellen flankierte V_L -Sequenz, die codierende Sequenz für die C_L -Domäne, sowie ein Polyadenylierungssignal.

(kappa-Prom: κ -Promoter; L1: *Leader* (codiert für das Signal-Peptid); 2H7-VJ: Exon der leichten variablen Domäne (V_L) des 2H7-Antikörpers; kappa-Intron: κ -Intron mit *enhancer* Elementen, CL: κ - C_L -Exon; Poly-A: Polyadenylierungssequenz; In: Intron.)

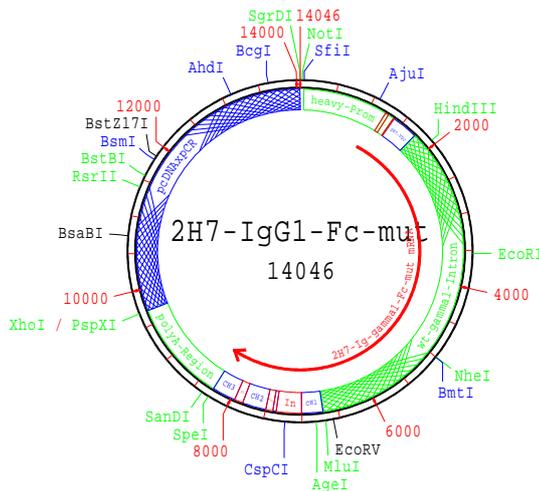


Abb. 2.6: 2H7-IgG1-Fc-mut

Expressionsvektor für die schwere Kette des chimären α human CD20 IgG1-Antikörpers 2H7 mit mutiertem Fc-Teil. Der Vektor enthält *downstream* der *EcoRI*-Schnittstelle Teile des μ -Introns mit der γ -1 switch-Region und die codierenden Sequenzen für die konstanten Domänen der humanen schweren IgG1 Kette. Die Sequenz der C_H2 -Domäne wurde modifiziert, um die spezifische Schnittstelle der Rhinovirus-3C-Protease („PreScission“-Protease) in den Fc-Teil einzubauen.

(heavy-Prom: Promoter der schweren Kette von Antikörpern; L1: *Leader* (codiert für das Signal-Peptid); 2H7-VDJ: Exon der variablen Domäne (V_H) der schweren Kette des 2H7-Antikörpers; wt-gamma1-Intron: Wildtyp-Intron von IgG1-Antikörpern mit *enhancer* Elementen; CH1, CH2, CH3: C_H1 , C_H2 bzw. C_H3 -Exon; Poly-A: Polyadenylierungssequenz; pcDNAxpCR: Vektorgestüt aus den Standardvektoren pcDNA3 und PCR-Script; In: Intron.)

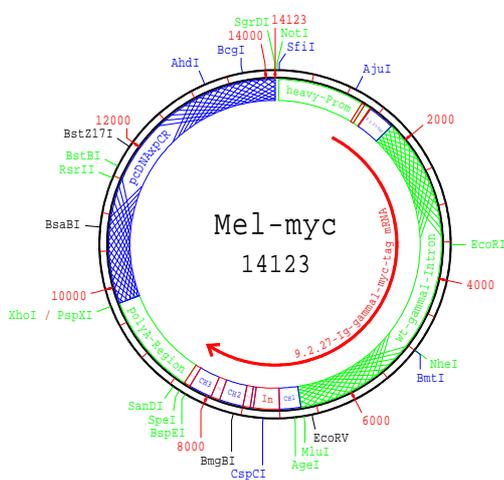


Abb. 2.7: Mel-myc

Expressionsvektor für die schwere Kette des chimären α human NG2 IgG1-Antikörpers 9.2.27 mit mutiertem Fc-Teil und c-myc-Epitop am C-Terminus des Fc-Teils.

(9.2.27-VDJ: Exon der variablen Domäne (V_H) der schweren Kette des 9.2.27-Antikörpers. Die Sequenz für die letzten 14 Aminosäuren des IgA-C-Terminus und das c-myc-Epitop befinden sich direkt *downstream* der C_H3 -Sequenz. Bis auf dieses Exon ist der Vektor identisch mit dem Vektor 2H7-IgG1-Fc-mut-myc (s. Abb. 6.2, S. 190).)

2.1.10 Antikörper

In den Tabellen 2.1 und 2.3 sind die monoklonalen, polyklonalen und Fluorochrom-markierten Antikörper aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über die verwendeten bispezifischen *single-chain* Antikörper und F(ab')₂ Fragmente.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten konjugierten Antikörper

Konjugierte Antikörper				
Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Konjugat	Bezugsquelle
polyklonales anti-Maus-Igγ Serum	murines Igγ H+L-spezifisch	Ziege	R-Phycoerythrin	Dianova Hamburg
polyklonales anti-Maus-Igγ Serum	murines Igγ F(ab') ₂ -spezifisch	Ziege	R-Phycoerythrin	Dianova Hamburg
polyklonales anti-human-Igγ Serum	humanes Igγ H+L-spezifisch	Ziege	R-Phycoerythrin	Dianova Hamburg
αCD3-PE	humCD3	Maus	R-Phycoerythrin	Imunotools, Friesoythe
αCD4-PE	humCD4	Maus	R-Phycoerythrin	Imunotools, Friesoythe
αCD8-PE	humCD8	Maus	R-Phycoerythrin	Imunotools, Friesoythe
αCD20-PE	humCD20	Maus	R-Phycoerythrin	Imunotools, Friesoythe
αIL2-Antikörper	humanes IL-2	Maus	Biotin	BD Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten bispezifischen Antikörper

bispezifische <i>single-chain</i> Antikörper		
Bezeichnung	Spezifität	Bezugsquelle
r28M (9.3 x 9.2.27)	humCD28 x humCSPG	L. Große-Hovest, Tübingen
r2820 (9.3 x 2H7)	humCD28 x humCD20	selbst hergestellt
bsFab ₂		
Bezeichnung	Spezifität	Bezugsquelle
Ritx APO-1	humCD20 x humCD95	G. Jung, Tübingen
2H7 x APO-1	humCD20 x humCD95	G. Jung, Tübingen
MEM97 x APO-1	humCD20 x humCD95	G. Jung, Tübingen
BH-20 x APO-1	humCD20 x humCD95	G. Jung, Tübingen
Tositumomab x APO-1	humCD20 x humCD95	selbst hergestellt
2H7 x 9.3	humCD20 x humCD28	selbst hergestellt

Tabelle 2.3: Unkonjugierte Antikörper

Bezeichnung	Besonderheit	Spezifität	Isotyp	Spezies	Bezugsquelle
9.2.27	Sp2/0-Ag14	humNG2	IgG1	chimär Maus/Mensch	L. Große-Hovest, Tübingen
9.2.27-myc (Mel-myc)	c-myc-Epitop am C-Terminus	humNG2	IgG1	chimär Maus/Mensch	L. Große-Hovest, Tübingen
2H7-IgG1-mut-Fc	Sp2/0-Ag14 Proteaseschnittstelle im Fc-Teil, Sp2/0-Ag14	humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	L. Große-Hovest, Tübingen
Rituxan (Rituximab)		humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	Hoffmann-LaRoche, Basel Schweiz
MEM97		humCD20	IgG2a	Maus	Immunotools, Friesoythe
BH-20		humCD20	IgG2a	Maus	Diaclone, Besançon, Frankreich
Tositumomab		humCD20	IgG2a	Maus	Glaxo Smith Kline, Middlesex, England
2H7-IgG1-myc	c-myc-Epitop am C-Terminus Sp2/0-Ag14 Proteaseschnittstelle im Fc-Teil	humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	selbst hergestellt
2H7-IgG1 Sp2/0	Sp2/0-Ag14	humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	selbst hergestellt
2H7-IgG1 YB2/0	YB2/0	humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	selbst hergestellt
2H7-IgG1-DE Sp2/0	DE-Mutation im Fc-Teil, Sp2/0-Ag14	humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	selbst hergestellt
2H7-IgG1-DE YB2/0	DE-Mutation im Fc-Teil YB2/0	humCD20	IgG1	chimär Maus/Mensch	selbst hergestellt
9.3 polyklonales anti-Maus-Serum	produziert in Sp2/0-Ag14	humCD28	IgG1	chimär Maus/Mensch	L. Große-Hovest, Tübingen
IL2-capture Antikörper	für ELISA	Maus Ig	polyklonal	Ziege	Dianova, Hamburg
Isotypkontrollen		humanes IL-2	IgG	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.11 Zelllinien

In Tabelle 2.4 sind sowohl die Hybridome, die für die Produktion größerer Mengen monoklonaler Antikörper, als auch die humanen, Ratten- und Maus-Zelllinien für *in vitro*-Experimente aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien

Humane Zelllinien				
Bezeichnung	Beschreibung			Bezugsquelle
Jurkat	T-Zell-Lymphom			D. Schendel, München
BJAB	B-Zell-Lymphom			ATCC, Manassas, USA
C1R	B-Zell-Lymphom			ATCC, Manassas, USA
Daudi	B-Zell-Lymphom			ATCC, Manassas, USA
Raji	B-Zell-Lymphom			ATCC, Manassas, USA
SKW6.4	B-Zell-Lymphom			P.H. Krammer, Heidelberg
Ratten- und Maus-Zelllinien				
Bezeichnung	Beschreibung			Bezugsquelle
Sp2/0-Ag14	Maus-Myelom			ATCC, Manassas, USA
YB2/0	Ratten-Myelom			ATCC, Manassas, USA
Hybridome				
Bezeichnung	Antigen	Spezies	Klasse	Beschreibung
APO-1	humCD95	Maus	IgG2a	P.H. Krammer, Heidelberg
9E10	c-myc-Epitop	Maus	IgG1	ATCC, Manassas, USA

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden zur Konstruktion und Klonierung rekombinanter Antikörper

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden zur Konstruktion und Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Antikörper verwendet.

2.2.1 Polymerase Kettenreaktion mit überhängenden Primern

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wurde für Fragmente, die im weiteren Verlauf kloniert werden sollten eine sogenannte *hot-start*-PCR durchgeführt. Bei dieser Art von PCR erfolgt vor Zugabe der DNA-Polymerase ein mehrminütiger Denaturierungsschritt, so dass eine vollständige Denaturierung kontaminierender Proteine und ein vollständiges Aufschmelzen der DNA gewährleistet ist. Die Zugabe der DNA-Polymerase erfolgte bei der Denaturierungstemperatur, wodurch eine unspezifische Hybridisierung der Oligonukleotide und eine vorzeitig einsetzende Polymerisierung bei der Aufwärmzeit ausgeschlossen werden soll. Die folgenden Reaktionsbedingungen wurden so stringent wie möglich gewählt, wobei die Hybridisierungstemperaturen für kurze Oligonukleotide nach der Faustregel $T_H = \sum(A + T) \cdot 2^\circ\text{C} + \sum(G + C) \cdot 4^\circ\text{C}$ berechnet wurde. Für Oligonukleotide die mit mehr als 30 Basen komplementär zur Matrize waren, wurden Hybridisierungstemperaturen von 68°C gewählt. Bei dem Elongationsschritt wurde prinzipiell für 1000 Basen ein einminütiges Intervall eingestellt. Sollten die PCR-Produkte anschließend stumpfendig ligiert werden, so wurde ein zehnminütiger terminaler Elongationsschritt angefügt, um eine vollständige Synthese zu gewährleisten [Li und Guy, 1996].

Standardmäßig wurden alle PCR-Ansätze in einem Endvolumen von $100 \mu\text{l}$ durchgeführt:

Template-DNA (ca. 500 ng)	0,5-1 μl
<i>Forward</i> -Primer (10 pM)	1 μl
<i>Reverse</i> -Primer (10 pM)	1 μl
dNTP-Stocklösung (10 mM)	4 μl
VENT-DNA-Polymerase (10x)	10 μl
H ₂ O (bidest.)	ad 100 μl

2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung können Nukleinsäuren in einem elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt werden. Zur einfachen Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Produkten wurde als Matrix Agarose gewählt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Produkte wurden 0,8-2 % (w/v) Agarosegele in 1xTAE mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidium-Bromid in Flachbettapparaturen verwendet. Das zu trennende DNA-Gemisch wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Fünftel Volumenanteil eines 6-fach DNA-Ladepuffers versetzt.

Zur Größenbestimmung der Produkte wurde die erste Spur des Gels mit einem Größenmarker beladen (1 kb bzw. 100 bp DNA-Leiter) verwendet. Als Laufpuffer für die Elektrophorese diente 1x TAE, wobei die Auftrennung der Proben bei 100 V (konstant) erfolgte.

Die Sichtbarmachung der DNA-Produkte erfolgte unter UV-Licht (Transilluminator, 312 nm). Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht, was eine Sichtbarmachung der getrennten DNA-Banden ermöglicht.

2.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Geeignete, unter UV-Licht sichtbar gemachte DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell so schmal wie möglich aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das Elutionsverfahren der DNA aus der Agarose-Matrix wurde entsprechend der Größe des DNA-Fragmentes ausgewählt.

Die Elution kleiner DNA-Fragmente (bis max. 4 kb) erfolgte nach Herstellerangaben mittels des „QIAquick[®] Gel Extraction Kits“. Das QIAquick[®] System verwendet spezielle Säulchen („spin-columns“), die mit einer Silikat-beschichteten Membran ausgestattet sind. Die Absorption der DNA an diese Membran erfolgt nur bei Anwesenheit eines hoch-konzentrierten, chaotropen Salzes, wobei dieser Bindungsvorgang auch vom pH-Wert abhängig ist. Die am Ende in 40 μl H₂O (bidest.) eluierten Proben wurden bei -20°C gelagert.

Größere DNA-Fragmente wurden, zur Minimierung von Scherkräften, mithilfe des BioTrap-Kits per Elektroelution über Nacht bei 120 V aus den ausgeschnittenen Gelstücken eluiert. Das Prinzip der Elektroelution ist ähnlich dem der Agarosegelelektrophorese. Auch hier wandert die negativ-geladene DNA in einem elektrischen Feld. Bei der Elektroelution wandert die DNA jedoch aus den Agarose-Gelstücken hinaus und bleibt an einer DNA-undurchlässigen Membran

hängen. Durch kurzes Umpolen des elektrischen Feldes wird die an der Membran haftende DNA gelöst und kann aus dem Probenreservoir entnommen werden. Die so eluierte DNA wurde anschließend im Zentrifuge (10 kDa cutoff) gegen H₂O (bidest.) umgepuffert, konzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Um Proteine und weitere hydrophobe Verunreinigungen aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Wässrige Nukleinsäurelösungen wurden dazu mit einem Volumenanteil einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1) versetzt, ausgiebig geschüttelt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Dabei befand sich die DNA in der oberen wässrigen Phase, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Um alle eventuell noch vorhandenen Phenolreste zu entfernen folgte eine zweimalige Extraktion mit je 1 Volumen Chloroform.

Die anschließende Präzipitierung der Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase erfolgte mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol für mindestens 1 h bei -80°C. Nach der Fällung wurden die Nukleinsäuren in einer Tischzentrifuge bei 4°C pellettiert, mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut pellettiert. Das Pellet wurde unter der Sterilbank getrocknet und in H₂O (bidest.) aufgenommen.

2.2.5 Ligation von DNA-Enden

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA-Ligase, wobei das molare Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA in der Regel 3:1 betrug. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei einer Temperatur von 16°C inkubiert.

Blunt-end-Ligation in den Zwischenvektor pPCR-ScriptTM AmpSK(+)-Cloning-Vektor

Die für die PCR verwendete VENT-Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und erzeugt somit keine Nukleotidüberhänge an den 3'-Enden des PCR-Produktes, sondern stumpfe Enden (*blunt end*). Deshalb wurden die PCR-Produkte nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese und Elution aus dem Agarosegel zunächst mithilfe des pPCR-ScriptTM AmpSK(+)-Cloning Kits in den *pPCR-ScriptTM AmpSK(+)-Cloning*-Vektor zwischenkloniert. In den Ligationsansatz wurde hier zusätzlich die Restriktionsendonuklease *SrfI* gegeben, deren palindromische Erkennungssequenz bei intramolekularer Ligation des Plasmids entsteht. Durch die Anwesenheit des Enzyms im Ligationsansatz wird die Plasmid-DNA

wieder geöffnet und die Effizienz der Ligation stumpfer Enden gesteigert. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden ist zu beachten, dass das Insert in zwei verschiedenen Orientierungen in den Vektor eingebaut werden kann. Die Ligationsreaktion wurde in einem 10 μl Ansatz durchgeführt:

pPCR-Script TM AmpSK(+)-Cloning-Vektor	1 μl
10x Rxn-Puffer	1 μl
ATP (10 mM)	0,5 μl
H ₂ O (bidest.)	0,5 μl
DNA-Fragment	5 μl
<i>SrfI</i> (5 U/ μl)	1 μl
T4-DNA-Ligase (4 U/ μl)	1 μl

Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren

Die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Expressionsvektor erfolgte standardmäßig in einem 20 μl Ansatz. Jeder Ligationsansatz enthielt neben der Vektor- und Insert-DNA 2 μl 10x Ligase-Puffer und 1 μl T4-DNA-Ligase (5 U).

2.2.6 Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden chemokompetente *E. coli* vom Stamm DH5 α verwendet. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert und vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Zu 100 μl Bakteriensuspension wurden 20 μl des jeweiligen Ligationsansatzes gegeben, durch sanftes Rühren mit der Pipette gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock für exakt 1 min bei 42°C im Wasserbad führte zur Aufnahme der DNA in die Zellen. Der Ansatz wurde anschließend kurz auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 400 μl LB-Medium für 1 h bei 37°C im Horizontalschüttler bei 225 rpm geschüttelt.

Um zu überprüfen, ob die Bakterienzellen die Vektor-DNA aufgenommen haben, wurden die Bakterien auf einem Kulturmedium ausgestrichen, das Ampicillin enthält. Dazu wurden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen Platten (LB-Amp-Platten bzw. LB-Amp-Platten mit 20 μl 0,2 M IPTG und 20 μl 10 % (w/v) X-Gal-Lösung für die Blau-Weiß-Selektion bei Verwendung des *pPCR-ScriptTMAmpSK(+)-Cloning*-Vektors) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Die verwendeten Vektoren besitzen einen Sequenzbereich, der für eine β -Lactamase

codiert. Folglich konnten nur diejenigen Bakterienzellen wachsen, die das Vektorplasmid aufgenommen hatten, d.h. bei denen die Transformation erfolgreich gewesen war.

Um zu überprüfen, ob das amplifizierte PCR-Produkt in den Vektor eingebaut worden war, wurde bei Verwendung des *pPCR-ScriptTM AmpSK(+)* Cloning-Vektor eine „Blau-Weiß-Selektion“ durchgeführt. Der *pPCR-ScriptTM AmpSK(+)* Cloning-Vektor besitzt eine multiple Klonierungsstelle (MCS), die innerhalb eines *lacZ α* -Gens liegt. Dieses *lacZ α* -Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment des Enzyms β -Galaktosidase, welches am Abbau von Lactose zu Glucose und Galaktose beteiligt ist. Diese kodierende Region ist unterbrochen, da in diesem Bereich der Vektor linearisiert wurde. Enthielten die transformierten Bakterienzellen einen Vektor in den kein Insert inkloniert worden war, so besaßen sie eine funktionsfähige β -Galaktosidase. Um die An- bzw. Abwesenheit der β -Galaktosidase zu überprüfen, wurde ein Lactoseanalogon verwendet. Dabei handelte es sich um X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-*beta*-D-galactopyranose) welches von der β -Galaktosidase zu einem dunkelblauen Indigofarbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo) abgebaut wird. Bakterien, die einen Vektor mit inseriertem DNA-Fragment aufgenommen hatten, konnten keine funktionsfähige β -Galaktosidase bilden und X-Gal nicht umsetzen. Diese Bakterienkolonien erschienen somit farblos (weiß) und wurden auf Integration des Inserts näher analysiert.

2.2.7 Anlegen von Bakterien-Kulturen

Das Picken der einzelnen Bakterienkolonien von der Agarplatte erfolgte mittels einer sterilen Pipettenspitze. Die einzelnen Klone wurden auf eine neue LB-Amp-Platte übertragen (Masterplatte). Danach wurde mit der selben Pipettenspitze ein Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) angeimpft und für die Mini-Plasmid-Präparation für 12-16 h bei 37°C mit 225 rpm auf dem Horizontalschüttler angezogen.

Um größere Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit zu erhalten wurden im Falle der fertigen Expressionsvektoren Maxikulturen angelegt. Dazu wurde wie oben beschrieben zuerst eine 8 h Minikultur angeimpft. 200 μ l dieser Vorkultur wurden zum Animpfen einer Maxikultur (200 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin) verwendet, welche über Nacht bei 37°C mit 225 rpm auf dem Horizontalschüttler inkubiert wurde.

Zur längerfristigen Konservierung transformierter Bakterien wurden Dauerpräparate aus 800 μ l der 8h-Vorkultur und 200 μ l Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

2.2.8 Plasmid Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA lässt sich in drei Hauptschritte gliedern:

1. Wachstum der Bakterien mit Vermehrung des Plasmids
2. Ernten und Lyse der Bakterien
3. Aufreinigung der Plasmid-DNA

Je nach gewünschter Ausbeute an Plasmid erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA entweder mit Hilfe des „QIAprep[®] Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit“ oder mit dem „QIAGEN[®] Plasmid-DNA Maxiprep Kit“. Beide Präparationsverfahren beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen, schneller Neutralisation, bei der die chromosomale DNA ausfällt während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt, Abtrennung der Plasmidlösung durch Zentrifugation, anschließende Trennung der Plasmid-DNA und Reinigung der Plasmide durch Anionenaustauschchromatographie.

Die Minipräparation der Plasmide erfolgte mittels des QIAprep[®] Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit. Das QIAprep[®] Miniprep Verfahren nutzt Säulchen, die mit Silica-Gel-Membranen ausgestattet sind. Einerseits bewirken diese Membranen eine selektive Adsorption von Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen, andererseits kann die Plasmid-DNA unter Niedrigsalzbedingungen wieder von der Säulchenmatrix eluiert werden. Die Elutionseffizienz ist abhängig vom pH-Wert, wobei die maximale Elutionseffizienz bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8,5 erreicht wird. Die Plasmidpräparation wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Um größere Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit zu erhalten wurde das QIAGEN[®] Plasmid-DNA Maxiprep Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.9 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Analytischer Verdau

Um zu testen ob ein Bakterienklon das gewünschte Plasmid enthielt, wurde ein analytischer Verdau mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese Verdau dienten als Test, ob die gewünschten Restriktionsschnittstellen im Plasmid vorhanden und intakt waren.

Die Verdau wurden stets in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l angesetzt.

Plasmid-DNA	1 μ l
10x Reaktionspuffer	1 μ l
Restriktionsendonuklease	10 U
H ₂ O (bidest.)	ad 10 μ l

Der Ansatz wurde bei der für das jeweilige Enzym erforderlichen Temperatur (meist 37°C) für 30 min verdaut. Der Verdauansatz wurde anschließend mittels Gelelektrophorese im Agarosegel getrennt (s. Abschnitt 2.2.2, S. 64) und analysiert. Eine letzte Gewissheit in Bezug auf Insertion, Orientierung, Vollständigkeit und eventuell vorhandener Punktmutationen brachte eine Sequenzierung der positiven Klone (s. Abschnitt 2.2.10, S. 69).

Präparativer Verdau

Um größere Plasmidmengen zu verdauen wurden präparative Ansätze mit einem Endvolumen von 50 μ l verwendet.

Plasmid-DNA	10 μ l
10x Reaktionspuffer	5 μ l
BSA 100x (bei Bedarf)	0,5 μ l
Restriktionsendonuklease	1-10 U
H ₂ O (bidest.)	ad 50 μ l

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und für mindestens 6 h im Thermocycler inkubiert. Die Auftrennung und Extraktion des gewünschten DNA-Fragmentes erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2 (S. 64) und 2.2.3 (S. 64) beschrieben.

2.2.10 Sequenzierung

Um doppelsträngige DNA zu sequenzieren wurde das ABI PRISM BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Kit V1.1 verwendet. Diese Methode basiert auf der nach Sanger et al. [Sanger et al., 1977] beschriebenen Kettenabbruch oder Didesoxynukleotidmethode, verwendet jedoch statt radioaktiv-markierter Fluorochrom-gekoppelte Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch. Dabei entstehen thermozyklisch, durch lineare Amplifikation bei der die eingesetzten Primer verlängert werden, DNA-Einzelstränge, die jeweils mit einem fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotid enden.

Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte bei 96°C für 30 sec. Für die Hybridisierung der Sequenzierprimer wurde in der Regel eine Temperatur gewählt,

die 5°C unter der berechneten Temperatur (T_M) des Primers lag. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte nach der Faustregel: $T_M = \sum(A + T) \cdot 2^\circ\text{C} + \sum(G + C) \cdot 4^\circ\text{C}$. Für die Hybridisierungsreaktion wurde ein Intervall von einer Minute und für die Gegenstrangsynthese bei 60°C ein vierminütiges Intervall gewählt. Eine Standardsequenzierung bestand aus 30 Zyklen.

Der *BigDye Ready Reaction Mix* der zur Sequenzierung verwendet wurde enthielt neben dem Puffer und der *AmpliTaQ*-Polymerase (8 U/ μl) auch den dNTP-Mix und fluorochromgekoppelte Terminatoren im richtigen Verhältnis.

Die Sequenzierungsansätze wurden standardmäßig wie folgt angesetzt:

Plasmid-DNA	meist 1 μl	500 ng
Sequenzierprimer	x μl	10 pmol
<i>BigDye Ready Reaction Mix</i>		2 μl
H ₂ O (bidest.)	ad	10 μl

Nach Ablauf der Sequenzierreaktion wurden die Proben mit 10 μl H₂O (bidest.) verdünnt und mittels Auto-Seq G50 Säulen aufgereinigt. Dieser Reinigungsschritt dient dazu, nicht-inkorporierte, fluoreszenzmarkierte Nukleotide vor der Sequenzierung aus dem Ansatz zu entfernen.

Die Sequenzierung erfolgte mittels Kapillarelektrophorese in einem ABI PRISM 310 Sequenzierer, wo die Fluorochrome durch einen 40 mW Argon-Laser (488 nm und 514 nm) angeregt werden und die Fluoreszenzsignale durch das Detektorsystem gelesen werden. Eine computergestützte Auswertung mittels des Programmes „Sequencer 3.1“ ermöglicht die Darstellung der DNA-Sequenz in Chromatogrammform.

2.3 Zellbiologische Methoden eukaryontischer Zellen

Alle Zelllinien wurden soweit nicht anders angegeben unter Standardbedingungen, bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Begasungsbrutschrank kultiviert.

2.3.1 Passagieren und Ernten von Zellen

Das Medium adhärenter Zellen wurde nach Erreichen der Konfluenz abgenommen und der Zellrasen einmal mit kaltem DPBS gewaschen. Anschließend folgte eine 5-

10 minütige Inkubation mit PBS-EDTA bei Raumtemperatur um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Der Ablösezustand wurde mit einem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 250 x *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden dann entweder direkt weiterverwendet oder in geeigneter Dichte in frische Zellkulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz regelmäßig mit neuem Medium versorgt.

Weniger stark adhärente Zellen (z.B. Sp2/0-Ag14) wurden durch vorsichtiges, seitliches Schlagen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst.

Bei den meisten der verwendeten Zelllinien (z.B. SKW6.4, Jurkat) handelte es sich um Suspensionszellen. Hier wurde je nach Zelldichte ein Teil des Mediums abgenommen und das Volumen mit frischem Zellkulturmedium wieder aufgefüllt.

2.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Konzentration der lebenden Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Trypanblau färbt selektiv tote Zellen an, da deren Membranintegrität gestört ist. Lebende Zellen bleiben hingegen ungefärbt was eine einfache Unterscheidung im Lichtmikroskop ermöglicht.

Die Zellsuspension wurde je nach Zelldichte 1:2 - 1:10 mit einer 0,1% Trypanblau-Lösung versetzt und die Lebendzellzahl mit Hilfe einer Neugebauer-Zählkammer wie folgt bestimmt:

Lebende Zellen/ml Suspension = mittlere Anzahl ungefärbter Zellen pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor der Trypanblau-Lösung x Volumenfaktor der Kammer (10^4)

2.3.3 Cryokonservierung von Zellen

Die Aufbewahrung von Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren erfolgte durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -160°C . Hierzu wurden die Zellen geerntet (s. Abschnitt 2.3.1, S. 70) und in einer Konzentration von ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml in Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 4°C kaltem Einfriermedium im Verhältnis 1:2 wurde die Zellsuspension in Cryoröhrchen überführt und bei -80°C in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox für 24 h eingefroren, bevor die Zellen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt wurden.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad soweit aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in 20 ml kaltes Medium überführt und für 10 min bei 250 x *g*

zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgewärmten Medium (37°C) resuspendiert und in Kulturgefäße ausgesät. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel, um tote Zellen und DMSO-Spuren zu entfernen.

2.3.4 Inaktivierung von Tumorzellen

Die Inaktivierung von Tumorzellen erfolgte durch Bestrahlung in einer $^{137}\text{Cäsium}$ -quelle. Dadurch wurde die DNA zerstört und somit eine weitere Proliferation unterbunden. Die Bestrahlungszeit für Tumorzellen betrug 14 Minuten, was einer Strahlendosis von 120 Gy entspricht.

2.3.5 Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen

Um eukaryontische Zellen stabil zu transfizieren, mussten die entsprechenden Expressionsplasmide vor der Transfektion enzymatisch geöffnet (linearisiert) werden. Nach dem präparativen Verdau (s. Abschnitt 2.2.9, S. 68) wurde die linearisierte DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion von Verunreinigungen befreit (s. Abschnitt 2.2.4, S. 65) und in H_2O (bidest.) aufgenommen.

Für die Transfektion wurden 2×10^7 Zellen (Sp2/0-Ag14 bzw. YB2/0) geerntet (s. Abschnitt 2.3.1, S. 70) und dreimal in serumfreiem IMDM-Medium gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in $250 \mu\text{l}$ serumfreiem IMDM aufgenommen und in eine, auf Eis vorgekühlte, Elektroporationsküvette überführt. Die Zellsuspension wurde nun sorgfältig mit dem geöffneten Expressionsvektor vermischt. Im Falle einer Kotransfektion wie sie bei monoklonalen Antikörpern notwendig war, wurden Expressionsvektoren für die leichte und schwere Kette des jeweiligen Antikörpers gleichzeitig transfiziert. Da der Expressionsvektor der leichten Kette keinen eigenen Selektionsmarker besitzt, wurde dieser im Überschuß zugegeben.

Die Elektroporation erfolgte standardmäßig bei 230 V und $975 \mu\text{F}$. Die Zellen wurden anschließend unmittelbar in 10 ml Komplett-IMDM-Medium aufgenommen, eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:128 hergestellt und die verschiedenen Verdünnungsstufen anschließend in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ pro well auf 96-well Flachbodenplatten ausplattiert.

Zur Selektion der positiv-transfizierten Klone wurde 24 h nach der Transfektion als Selektionsmarker G418 in einer Endkonzentration von 1 mg/ml in jedes well zugegeben. Nach ca. 8 Tagen erfolgte eine erste optische Kontrolle der Platten im Mikroskop auf proliferierende Einzelklone. Um die Produktionsleistung der einzelnen Klone zu untersuchen und vergleichen zu können, wurden die Zellkulturüberstände der in Frage kommenden Einzelklone durchflußzytometrisch mittels FACS-Analyse

auf geeigneten Antigen-positiven Zellen überprüft (s. Abschnitt 2.6.2, S. 84).

2.3.6 Kultivierung antikörperproduzierender Zellen

Nach erfolgter FACS-Analyse wurden die am besten produzierenden der transfizierten Zellklone ausgewählt, unter permanentem Selektionsdruck (mit 1 mg/ml G418) weiter expandiert und in 50 ml Zellkulturflaschen ausgesät. Aus dieser Kultur wurden anschließend 3-Bodenflaschen (*Triple flasks*) angeimpft.

Im Falle der bispezifischen *single-chain* Antikörper wurde IMDM-Komplettmedium zur Kultur der Zellen verwendet, wohingegen intakte IgG-Antikörper langsam an serumfreies Medium (Hybridoma-SFM) adaptiert wurden. Hybridome wurden ebenfalls in Hybridoma-SFM kultiviert.

Da in der exponentiellen Wachstumsphase transfizierter Zellen nur sehr wenig Antikörper produziert und sezerniert wird, erfolgte die Ernte des Zellkulturüberstandes erst nach 10-14 Tagen, nachdem ungefähr 80 % der Zellen bei einer Trypanblaufärbung angefärbt werden konnten. Die 3-Bodenflaschen wurden nach einmaligem Waschen mit DPBS, um Zelldebris zu entfernen, erneut angeimpft. Der Zellkulturüberstand wurde bei 3000 x *g* für 30 min und anschließend für 30 min bei 10000 x *g* zentrifugiert um tote Zellen und grobe Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand mittels eines Bottle-top Filters (Porengröße 0,22 μm) steril filtriert, mit 0,01 % NaN_3 versetzt und bis zu weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.7 Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC)

Um die verschiedenen Antikörperkonstrukte auf ihre Funktionalität zu testen, wurden PBMC benötigt. Die Isolierung der PBMC erfolgte aus heparinisiertem Vollblut gesunder Freiwilliger mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Zentrifugation im Gradienten ermöglicht eine Fraktionierung der Zellen mit unterschiedlicher Größe und Dichte. Es wurde ein Ficoll-Dichtegradient mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml verwendet. Während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichtes den Gradienten passieren und auf dem Boden des Röhrchens sedimentieren, sammeln sich die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten) aufgrund ihrer geringeren Dichte an der Interphase von wo sie für die Weiterverarbeitung gewonnen werden können.

Für die Isolation der PBMC wurde heparinisieretes Blut 1:2 mit PBS verdünnt und je 30 ml davon über 12 ml vorgelegte BiocollTM Separation Solution (Ficoll-Lösung)

geschichtet. Die beiden Flüssigkeiten durften sich dabei nicht vermischen. Die Röhren wurden für 30 min bei 500 x *g* ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer 5 ml Plastikpipette abgenommen und die gewonnenen Zellen anschließend noch zweimal mit DPBS gewaschen, um Ficoll-Reste und Verunreinigungen durch Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen. Anschließend wurden sie in Kulturmedium aufgenommen.

2.3.8 Magnetische Zellseparation (MACS)

Bei der immunomagnetischen Zellsortierung mittels der MACS-Technik werden bestimmte Zellen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe Antikörper behafteter Magnetpartikel separiert [Fillola et al., 1996].

Man unterscheidet zwei Arten von Separationsprinzipien: Die Positiv- und die Negativseparation. In beiden Fällen werden Antikörper verwendet die gegen zellspezifische Oberflächenantigene gerichtet sind. Die Antikörper ihrerseits sind direkt oder indirekt an magnetische Kleinstpartikel, auch als Microbeads bezeichnet, gekoppelt [Miltenyi et al., 1990]. Im Falle der Positivseparation richten sich die verwendeten Antikörper gegen die zu isolierende Zellart. Bei der Negativseparation hingegen werden alle störenden Zellen durch den Einsatz verschiedener Antikörper aus der Zellsuspension entfernt, um eine Zellart zu isolieren.

Nach Antikörperinkubation trägt man die Zellsuspension auf eine Separationssäule auf, welche von einem Dauermagneten umgeben und dadurch magnetisiert wird. Die mit den Microbeads beladenen Zellen bleiben an der Magnetsäule haften. Die unmarkierten Zellen passieren hingegen ungehindert die Säule und werden am Ende aufgefangen. Die an der Säule gebundenen Zellen können durch Entfernen des Magneten problemlos von der Säule eluiert werden, so dass man am Ende zwei verschiedene Fraktionen erhält: Die Positivfraktion mit den Antikörper-markierten Zellen und die Negativfraktion mit den unmarkierten Zellen. Der Reinheitsgrad der jeweiligen Fraktion kann durch eine Wiederholung des Separationsvorganges erhöht werden. Durch eine gezielte Wahl der Säulengröße und -art kann die Kapazität und Durchflußgeschwindigkeit des Systems den jeweiligen Anforderungen angepaßt werden.

In dieser Arbeit wurde die MACS-Technik in Form der Positivseparation eingesetzt, um B- bzw. T-Zellen aus einer PBMC-Präparation zu isolieren. Für die Separation von B-Zellen wurden α CD19-Beads, für die Separation von T-Zellen eine Kombination aus α CD4- und α CD8-Beads gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.9 Gewinnung von humanem Serum aus Vollblut

Für die Gewinnung von humanem Serum wurde Vollblut von gesunden Spendern in S-Monovetten[®] entnommen. Die gerinnungsfördernde Substanz ist in den S-Monovetten[®] auf Kunststoffgranulat aufgebracht, welches aufgrund seiner spezifischen Dichte beim Zentrifugieren eine Trennschicht zwischen Serum und Blutkuchen bildet.

Nach Abnahme des Blutes wurden die gefüllten S-Monovetten[®] für 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen bis das Blut vollständig koagulierte war. Die Trennung des Serums von koaguliertem Blut erfolgte durch einen 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 1000 x *g* und 4°C. Das Serum wurde vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4 Chromatographische Verfahren

2.4.1 Affinitätschromatographie

Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt.

Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A bzw. Protein G

Die Aufreinigung monoklonaler Antikörper erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine mit DPBS (pH 8) äquilibrierten Protein A bzw. Protein G Säule. Protein A, ein Zellwandbestandteil aus *Staphylococcus aureus* und Protein G ein Zelloberflächenprotein aus *Streptokokken* der G-Gruppe binden mit unterschiedlicher Affinität an den Fc-Teil von IgG Antikörpern aus verschiedenen Spezies (vgl. Tab. 2.5, S. 76). Durch drastische Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenstärke können spezifisch gebundene IgG-Moleküle wieder vom Säulenmaterial eluiert werden.

Der zentrifugierte und gefilterte Antikörper-haltige Zellkulturüberstand (s. Abschnitt 2.3.6, S. 73) wurde auf pH 8 eingestellt und anschließend mit einer Flußgeschwindigkeit von 50 ml/h auf die Säule aufgetragen. Vor der Elution des gebundenen Antikörpers wurde die Säule mit DPBS pH 8 gewaschen um alle unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen.

Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte mittels eines 0,1 M Glycin-Puffers, wobei der pH-Wert des Elutionspuffers von der Spezies und vom IgG-Subtyp des zu eluierenden Antikörpers abhängig war. Sowohl der Auftrag als auch die Elution wurde unter Verwendung eines Durchflußspektrophotometers kontinuierlich bei 280 nm

gemessen. Nach jeder Elution wurde die Säule stets mit DPBS pH 8 reäquilibriert. Das aufgefangene Eluat wurde sofort nach der Elution mit 1,3 M Tris-Puffer pH 9 neutralisiert um eine Schädigung des Antikörpers durch niedrige pH-Werte zu vermeiden.

Tabelle 2.5: Relative Bindungsstärke der Antikörper-bindenden Proteine A, G & L

Antikörper-Herkunft	Protein A	Protein G	Protein L
Humanes Ig γ	s	s	s
Maus Ig γ	s	s	s
Kaninchen Ig γ	s	s	sw
Ratten Ig γ	sw	m	s
Ziegen Ig γ	sw	s	nb
Schaf Ig γ	sw	s	nb
Rinder Ig γ	sw	s	nb
Schwein Ig γ	s	sw	s

s: stark; m: mittel; sw: schwach; nb: nicht bindend

Aufreinigung von bs-scFv Fragmenten aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein L

Da bispezifische *single-chain* Antikörperfragmente über keinen Fc-Teil verfügen, können diese nicht über Protein A oder Protein G aufgereinigt werden. Daher wurde zur Aufreinigung der bs-scFv Fragmente Protein L verwendet. Protein L, ein Zellwandbestandteil aus *Peptostreptococcus magnus* bindet Immunglobuline nicht am Fc-Teil, sondern hat die bisher einzigartige Eigenschaft, Antikörper und deren variante Formen über die κ -Kette¹ zu binden [Bjorck, 1988]. Dadurch hat Protein L im Vergleich zu Protein A und Protein G eine größere Bandbreite in der Bindung verschiedener Immunglobulin-Klassen und damit auch die Eigenschaft bestimmte scFv- bzw. bs-scFv- und Fab-Fragmente zu binden. Ein weiterer Vorteil liegt in der höheren Spezies-Spezifität. Protein L bindet humane und murine Antikörper sehr stark, dagegen sind für bovine Immunglobuline keine Bindungsaktivitäten beschrieben.

Die Vorgehensweise bei der Aufreinigung von bs-scFv war ansonsten identisch mit der Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern durch Protein A und Protein G Affinitätschromatographie (s. Abschnitt 2.4.1, S. 75).

¹Unterschiedliche Affinitäten sind bei den einzelnen κ -Subklassen zu verzeichnen.

2.4.2 Gelfiltrationen

Für die Gelfiltration im präparativem Maßstab wurde eine FPLC-Anlage verwendet (Pumpen-Typ P500, Kontrolleinheit LCC501, Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1, Fraktionskollektor FRAC-100). Für kleinere Probenmengen wurde das SMART-System benutzt.

Analytische Gelfiltration

Um das Molekulargewicht und das Vorliegen von Proteinkomplexen in Lösung zu überprüfen wurde das SMART-System mit einer SuperdexTM200 PC3.2/30 Gelfiltrationssäule verwendet. Hierbei wurden 50 μ l des zu testenden Proteins auf die Säule aufgetragen und mit einer Flußrate von 40 μ l pro Minute über die Säule gegeben. Als Laufpuffer diente DPBS. Ein UV-Spektrometer maß die optische Dichte des Durchflusses bei 220 nm und 280 nm. Aus dem aufgezeichneten Profil ließ sich mithilfe einer Kalibrierkurve mit Proteinen definierter Größe, das Molekulargewicht des untersuchten Proteins bestimmen.

Präparative Gelfiltration

Die Trennung der multimeren Form des r2820 von der monomeren Form erfolgte mithilfe des SMART-Systems mit einer SuperdexTM200 PC3.2/30 Gelfiltrationssäule in mehreren aufeinanderfolgenden Läufen. Dazu wurden jeweils 50 μ l des r2820 auf die Säule aufgetragen und mit einer Flußrate von 40 μ l pro Minute über die Säule gegeben. Als Laufpuffer diente ein Hochsalz-Puffer (DPBS + 200 mM NaCl). Der hohe Salzgehalt soll dabei ein Auseinanderfallen der Multimere verhindern. Die optische Dichte des Durchflusses wurde UV-spektrometrisch bei 220 nm und 280 nm bestimmt und die einzelnen Fraktionen durch einen Fraktionssammler aufgefangen. Am Ende wurden die gewünschten Monomer- und Multimer-haltigen Fraktionen aller Läufe gepoolt und weiterverwendet.

Proteolyseansätze und modifizierende Schritte zur Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente wurden auf eine SuperdexTM200 Prep Grade 16/60 HiLoad mit einer Flußrate von 50 ml/h aufgetragen und präparativ getrennt. Als Puffer-System wurde ein 0,1 M Na-Phosphat/0,15 M NaCl-Puffer (pH 7,4) verwendet. Das aufzutragende Probenvolumen betrug max. 4 ml.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Dialyse proteinhaltiger Lösungen

Zur Entsalzung und Umpufferung wurden alle Antikörperlösungen nach der Reinigung dialysiert. Für die Dialyse wurden entsprechend den Angaben des Herstellers vorbereitete Dialyseschläuche mit einer Porengröße von ca. 25 Å verwendet was einer Ausschlußgröße von 12-14 kDa entspricht. Die Dialyse erfolgte in der Regel gegen DPBS unter ständigem Rühren bei 4°C über Nacht.

War das Volumen des Eluates zu groß, so wurde es auf ein geeignetes Volumen eingengt (ca. 2-5 ml je nach erwarteter Antikörper-Konzentration). Hierzu wurde ein Zentrikon (30 kDa cutoff) mit einem 0,5 M Glycinpuffer geblockt und anschließend das Eluat auf das gewünschte Volumen eingengt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen

Um die Konzentration von Antikörperlösungen zu bestimmen wurde deren Absorption im UV-Spektrometer bei 280 nm bestimmt. In diesem Bereich ist die Absorption hauptsächlich durch Tyrosin und Tryptophan und zu einem sehr geringen Teil auch durch Phenylalanin und Disulfid-Brücken bedingt. Da die Anteile der verschiedenen Aminosäuren in jedem Protein unterschiedlich sind, unterscheidet sich der Extinktionskoeffizient einer 1 mg/ml Proteinlösung je nach Zusammensetzung von 0 bis 4,0 [Kirschenbaum, 1975]. Für Antikörper liegt der spezifische Extinktionskoeffizient bei 1,4.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels des Lambert-Beerschen-Gesetzes:

$$c = \epsilon \times c \times D$$

A = Absorption bei 280 nm

ϵ = natürlicher molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($\epsilon = 1,4 \text{ cm}^2/\text{mg}$)

c = Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (mg/ml)

l = Weglänge des Lichtes im Material (l = 1cm)

Für die Berechnung der Antikörperkonzentration ergibt sich daraus folgende Formel:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{A}{1,4}$$

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde das Eluat sterilfiltriert (Spitzenvor-

satzfilter 0,22 μm) und bei 4°C gelagert.

2.5.3 Herstellung bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente

Die Herstellung bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente erfolgte nach einer Methode die ursprünglich von [Brennan et al., 1985] entwickelt und später von [Jung et al., 1991] modifiziert wurde. Die Methode umfaßt im wesentlichen vier Schritte (S. Abb. 2.8, S. 79)

1. Enzymatische Hydrolyse monoklonaler Antikörper zu (monospezifischen) $F(ab')_2$ -Molekülen als Ausgangsmaterial mittels Pepsin
2. Reduktion der $F(ab')_2$ -Fragmente mittels Dithiothreitol (DTT, Cleland's Reagenz) und Modifikation durch Dithionitrobenzoesäure (DTNB, Ellman's Reagenz), Einführung einer Schutzgruppe an die Thiolgruppen der *hinge*-Region
3. Reduktion einer Spezies der Fab' -TNB-Fragmente zu Fab' -SH-Fragmenten, Herstellung eines reaktionsfähigen Fab' -Fragmentes für die Heterohybridisierung
4. Hybridisierung der beiden unterschiedlich modifizierten Fab' -Fragmente zu bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmenten

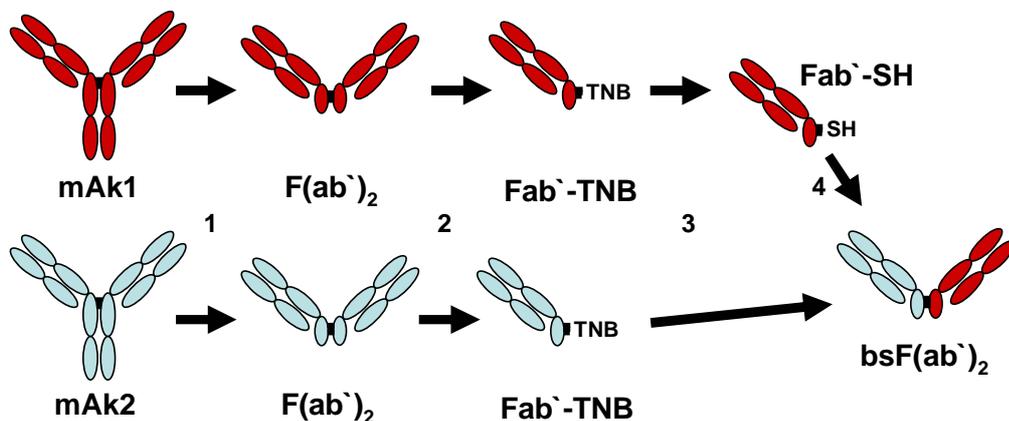


Abb. 2.8: Vereinfachte Übersicht zur Herstellung bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente.

Enzymatischer Abbau monoklonaler Antikörper zu $F(ab')_2$ -Fragmenten mit Pepsin (1)

Inkubiert man monoklonale Antikörper mit der Carboxypeptidase Pepsin so werden die Peptidbindungen zwischen der *hinge*-Region und dem Fc-Teil des Antikörpers

hydrolysiert, so dass $F(ab')_2$ -Fragmente entstehen [Parham, 1983]. Unterschiedliche Antikörperklassen, -subklassen und auch Antikörper der gleichen Klasse werden durch Pepsin unterschiedlich schnell proteolytisch zu $F(ab')_2$ -Fragmenten gespalten. Der Fc-Teil des Antikörpers wird durch das Pepsin in kleine Fragmente gespalten. Da es bei einer zu langen Reaktionszeit auch zu einer Degradierung der $F(ab')_2$ -Fragmente kommt, muss für jeden Antikörper die optimale Inkubationsdauer für die Hydrolyse mittels einer gesonderten Verdaukinetik ermittelt werden.

Dafür wurde aus einem Proteolyse-Ansatz (ca. 1 mg monoklonaler Antikörper) in regelmäßigen Zeitabständen ein Aliquot entnommen und die Reaktion durch Zugabe einer 1 M Tris-Lösung (pH9) gestoppt. Zur Bestimmung des Zeitoptimums wurden die Proben in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Coomassie Färbung analysiert (s. Abschnitt 2.6.1, S. 83).

Da das pH-Optimum von Pepsin bei einem pH-Wert von 2-3 liegt [Schlamowitz und Peterson, 1959], wurde der Pepsinverdau bei einem sauren pH-Wert durchgeführt. Hierbei wurde ein pH-Wert von 4 gewählt, als Kompromiß zwischen dem pH-Optimum des Pepsins und einem für den Antikörper akzeptablen, sauren pH.

Die zu verdauenden Antikörper lagen in der Regel in DPBS gelöst vor, weshalb eine Dialyse über Nacht bei 4°C gegen einen 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH4 nötig war. Nach der Umpufferung wurde die absolute Antikörperkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 2.5.2, S. 78) und eine Pepsinlösung (1 mg/ml) im Verhältnis 1:30 (w/w; 112 U Pepsin pro mg Antikörper) zugegeben. Die Hydrolyse erfolgte je nach ermitteltem Zeitoptimum bei 37°C im Wasserbad. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde der Verdau gestoppt, indem der pH-Wert des Verdauansatzes mit einer 1,3 M Tris-Lösung pH9 auf einen pH-Wert von ungefähr 8,0 angehoben wurde was zu einer Inaktivierung des Pepsins führte.

Um die gewünschten $F(ab')_2$ -Fragmente von unverdauten Antikörpern und kleineren Fragmenten zu trennen, wurde der Reaktionsansatz nach der Hydrolyse auf einer Gelfiltrations-Chromatographiesäule (SuperdexTM 200) aufgetragen und aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,1 M Natriumphosphatpuffer. Das Eluat wurde unter Verwendung eines Durchflußspektrophotometers kontinuierlich bei 280 nm gemessen und mittels eines Fraktions-Kollektors aufgefangen. Die gewünschten Fraktionen wurden vereinigt und mittels eines Zentricons (30 kDa cutoff) konzentriert. Die Filtermembran des Centricons wurde vor dem Gebrauch mit einer 0,1 M Glycinlösung geblockt um eine Bindung der Fab'-TNB-Fragmente an die Membran zu vermeiden.

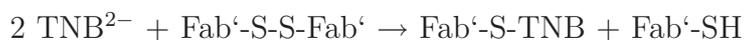
Reduktion von F(ab')₂-Fragmenten zu Fab'-TNB-Fragmenten (2)

In nächsten Schritt werden die F(ab')₂-Fragmente in Fab'-Fragmente gespalten. Um zu verhindern, dass sich aus den entstandenen Fab'-Fragmenten spontan wieder F(ab')₂-Fragmente bilden, wurden die entstandenen Fragmente mit Dithionitbenzoesäure (DTNB) und Dithiothreitol (DTT) modifiziert.

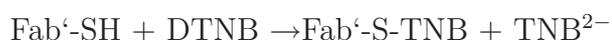
DTT ist ein starkes Reduktionsmittel welches das DTNB quantitativ zu zwei Molekülen des stark gelben 2-Nitro-5-Thiobenzoatanion (TNB²⁻) reduziert.



Die entstehenden 2-Nitro-5-Thiobenzoatanionen (TNB²⁻) besitzen ein Reduktionspotential, das groß genug ist, die interchenaren Disulfid-Brücken der *hinge*-Region eines F(ab')₂-Fragmentes zu spalten [Ellman, 1959]. Der nukleophile Angriff des TNB²⁻ führt in einer Additions-Eliminierungsreaktion zur kovalenten Bindung der Schutzgruppe an die Cysteinyl-Reste der Fab'-Fragmente, so dass Fab'-S-TNB-Fragmente entstehen. Somit wird eine spontane Oxidation der Fab'-Fragmente zu F(ab')₂-Fragmenten verhindert.



Da das freie Thiolanion (Fab'-SH) in der Lage ist die Reaktion zu revertieren, wird nicht reduziertes DTNB im Überschuß zugegeben. Somit kommt es zu einer Abreaktion des freien Thiols an DTNB, was letztlich in der erneuten Einführung einer TNB-Schutzgruppe resultiert.



Für die Reduktion und Modifikation der F(ab')₂-Fragmente wurde ein 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit 40 mM DTNB und 10 mM DTT versetzt. Nach Reduktion des DTNB mit DTT entsteht ein DTNB : TNB²⁻ Verhältnis von 30 mM : 20 mM. Diese DTNB/TNB²⁻-Lösung wurde anschließend im gleichen Volumen zu den F(ab')₂-Fragmenten des Pepsinverdaus gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht auf der Wippe inkubiert.

Grund für die externe Abreaktion des DTT ist, F(ab')₂-Fragmente vor einer direkten Reduktion durch DTT zu schützen und dadurch die Trennung der Disulfidbrücken zwischen der leichten und schweren Kette zu verhindern. Die Vereinigung beider Lösungen zu gleichen Volumina ergab eine Endkonzentration des TNB²⁻ 10 mM

und die des DTNB 15 mM. Bei den eingesetzten Mengen an $F(ab')_2$ -Fragmenten war diese Konzentration immer ausreichend, um die Disulfidbrücken in der *hinge*-Region quantitativ zu spalten und Schutzgruppen einzuführen.

Um die gewünschten Fab'-TNB-Moleküle vom unverdauten Antikörper, den nicht reduzierten $F(ab')_2$ -Fragmenten sowie dem DTNB/TNB²⁻-Gemisch zu trennen, wurde das Reduktionsgemisch auf eine Gelfiltrations-Chromatographiesäule (Superdex 200) aufgetragen und aufgetrennt.

Die Fab'-TNB-Fractionen wurden vereinigt und mittels eines Zentrifugens (30 kDa cutoff) konzentriert.

Reduktion von Fab'-TNB-Fragmenten zu Fab'-SH-Fragmenten (3)

Unmittelbar vor der Heterohybridisierungs-Reaktion musste bei einem der beiden, mit einer Schutzgruppe modifizierten, Fab'-Fragmente die Schutzgruppe durch DTT wieder abgespalten werden. Hierzu wurde zu einer Spezies von Fab'-TNB-Fragmenten DTT in einer Endkonzentration von 0,1 mM gegeben, wodurch die durch TNB geschützten Schwefelgruppen der *hinge*-Region wieder zu reaktiven SH-Gruppen reduziert wurden.

Zur Bestimmung des Endpunktes der Reaktion wurde die Freisetzung von TNB²⁻-Molekülen spektrophotometrisch bei 412 nm verfolgt. Die molare Konzentration des freigesetzten TNB²⁻ konnte mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{412} 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹ berechnet werden. Bei murinen Antikörpern der Klasse IgG2a belief sich das molare Verhältnis von freigesetztem TNB²⁻ und eingesetzter Fab'-Fragmente auf etwa 3:1, da diese Antikörper drei Disulfidbrücken in der *hinge*-Region besitzen [Preval et al., 1970; Svasti und Milstein, 1970].

Um das DTT und das freigesetzte TNB²⁻ zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch über eine mit 0,015 M Natriumacetatpuffer pH4 äquilibrierte Sephadex G25-Säule (PD10-Gelfiltrationssäule) gereinigt und umgepuffert.

Hybridisierung von Fab'-Molekülen verschiedener Spezifität zu bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmenten (4)

Durch die Reaktion freier Thiolgruppen eines Fab'-SH-Moleküls mit TNB-geschützten Thiolgruppen der *hinge*-Region eines Fab'-TNB-Moleküls kommt es unter Ausbildung neuer Disulfidbrücken zur Bildung bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist die Ausbildung von Homodimeren zu vernachlässigen. Auch hier konnte der Reaktionsverlauf bzw. die Entstehung bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente wieder spektrophotometrisch bei 412 nm durch Freisetzung von TNB²⁻-Molekülen verfolgt werden. Der vollständige Ablauf der Reaktion

benötigte auf einer Wippe bei Raumtemperatur in der Regel 2-3 h. Auch hier folgte wieder eine Gelfiltrationschromatographie um die bispezifischen F(ab')₂-Hybride von den nicht-hybridisierten Fab'-Fragmenten zu trennen. Die F(ab')₂-Hybridfraktionen wurden vereinigt, mittels eines Zentrifugens (30 kDa cutoff) konzentriert, gegen DPBS dialysiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration zur Lagerung bei 4°C sterilfiltriert.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Zur Reinheits- und Größenbestimmung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [Laemmli, 1970] eingesetzt. Dabei wurden die Proben bei der Vorbereitung unter dem Einfluß von SDS und hoher Temperatur denaturiert. Durch diese Behandlung bilden sich SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis, die sich nur in ihrer Größe unterscheiden und daher nach dieser Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Sollten zusätzlich noch die Disulfidbrücken des zu testenden Moleküls gespalten werden, so wurde ein reduzierender SDS-Probenpuffer mit DTT verwendet.

Für die Elektrophorese wurden entsprechend der unten aufgeführten Mischtablette (s. Tabelle 2.6) Trenngele und 4,9 % Sammelgele gegossen.

Tabelle 2.6: Mischtablette für SDS-Polyacrylamid-Gele

Substanz	Gelprozent		
	Sammelgel 4,9%	Trenngel 10% 12,5%	
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	1,25 ml	4 ml	5ml
Sammelgelpuffer	1,9 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	3 ml	2,5ml
H ₂ O (bidest.)	4,5 ml	5 ml	4,5 ml
10% SDS	75 µl	150 µl	
TEMED	25 µl	25 µl	
10% APS	45 µl	45 µl	

Die Proben (max. 5 µg Protein/Spur) wurden zunächst mit 1/6 Volumen eines 6x SDS-Probenpuffers versetzt und für 5 min bei 85°C im Thermoblock denaturiert. Die Elektrophorese wurde in analytischen Minigelapparaturen (Dual Vertical Mini-Gel

Unit) bei 100V für ca. 1-2 h durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte anschließend eine Coomassie Brilliant Blue Färbung [Wilson, 1983]. Die fertigen Gele wurden für ca. 10 min in Geltrocknungslösung eingelegt und zwischen zwei Cellophan-Membranen getrocknet.

2.6.2 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Zum Nachweis der Affinität und Bindungseigenschaften verschiedener Antikörper sowie der quantitativen Bestimmung von Zelloberflächenproteinen wurde die Durchflußzytometrie angewendet.

Grundlage der durchflußzytometrischen FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)-Analyse ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluorochrom-markierten Antikörpern durchgeführt wird.

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.3.1 (S. 70) beschrieben geerntet, die Lebendzellzahl bestimmt (s. Abschnitt 2.3.2, S. 71) und pro Ansatz 250.000 lebende Zellen in FACS-Puffer gewaschen (400 x *g*, 5 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 50 μl der entsprechenden Antikörperverdünnung (im Falle der direkten Färbung mit FITC- oder R-PE-markiert) aufgenommen und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit je 750 μl FACS-Puffer waren die Proben im Falle einer direkten Fluoreszenzfärbung meßbereit und wurden in 250 μl FACS-Puffer aufgenommen.

Bei der indirekten Färbung wurde das Zellpellet für weitere 30 min im Dunkeln bei 4°C in 50 μl einer vom Hersteller angegebenen Verdünnung eines FITC- oder R-PE-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Im Falle der bispezifischen *single-chain* Antikörper war ein zusätzlicher Zwischenschritt mit dem α -myc-Epitop-Antikörper 9E10 notwendig. In diesem Falle wurden die Ansätze nach Inkubation mit dem bs-scFv und einem Waschschrift zunächst für 30 min bei 4°C im Dunkeln mit dem 9E10-Antikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-markierten Detektionsantikörper.

In allen FACS-Analysen wurden entsprechende Isotypkontrollen sowie Positiv- und Negativkontrollen eingeschlossen.

Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte mit einem FACSCalibur und die Auswertung über das integrierte Software-Programm CellQuestPro.

2.7 Funktionelle Charakterisierung der produzierten Antikörper

2.7.1 Proliferationsassays

Als Nachweismethode für Zellaktivierung wurde der [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay verwendet. Hier erfolgt die Bestimmung der mitotischen Syntheseleistung mittels des Einbaus von Tritium[³H]-markiertem Thymidin in neugebildetes Chromatin von proliferierenden Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden kann dann je nach Proliferationsstatus, die Radioaktivität der Effektorzellen gemessen werden. PBMC bzw. Mischkulturen aus PBMC und durch Bestrahlung inaktivierten Tumorzellen wurden mit den verschiedenen zu testenden Antikörpern inkubiert und nach 3 Tagen Inkubation für 16 h mit 0,5 μ Ci [³H]-Thymidin/well versetzt. Die eingebaute Radioaktivität wurde gemäß Herstellerangaben in einem Mikroplatten- β -Szintillationsmeßgerät bestimmt. Jeder Meßpunkt wurde in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

2.7.2 Vitalitätsassays

⁵¹Cr-Freisetzungstest

Als Standardtest zur Messung der Zytotoxizität wurde der ⁵¹Cr-Freisetzungstest etabliert. Bei diesem Nachweisverfahren werden Zielzellen mit ⁵¹Cr-Natriumchromat (Na₂⁵¹CrO₄) inkubiert, welches als CrO₄²⁻-Anion über spezifische Ionenkanäle von der Zelle aufgenommen und im Zytoplasma durch Glutathion zu Cr^{III} reduziert wird. Cr^{III} gelangt in den Zellkern und bindet dort an die DNA. Da nur Zellen mit gestörter Membranintegrität das Cr^{III} in den Überstand freisetzen können, kann das im Überstand nachgewiesene Cr^{III} als Maß für die Anzahl lysierter Zellen verwendet werden. Der Prozentsatz lysierter Zielzellen wird wie folgt ermittelt:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Spontanfreisetzung}}}{\text{cpm}_{\text{maximale Freisetzung}} - \text{cpm}_{\text{Spontanfreisetzung}}} * 100$$

Die erforderliche Anzahl an Zielzellen wurde geerntet (s. Abschnitt 2.3.1, S. 70), in Kulturmedium aufgenommen und für 1 h bei 37°C mit Na₂⁵¹CrO₄ (50 μ Ci/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 4x mit Kulturmedium (RPMI1640) gewaschen und anschließend auf eine 96-well-Rundbodenplatte ausplattiert (5-10 x 10³ Zellen/50 μ l).

Um die zytotoxische Aktivität verschiedener Apoptose-induzierender Substanzen zu bestimmen, wurden diese in der entsprechenden Konzentration in einem Volumen von 50 μl /well zu den radioaktiv-markierten Zielzellen zugegeben und ein Endvolumen von 150 μl durch Zugabe von 50 μl /well Kompletmedium eingestellt.

Um die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität zu untersuchen, wurden als Effektoren PBMC in einem definierten Effektor:Zielzellverhältnis (in den meisten Ansätzen 10:1 (1×10^5 PBMC/50 μl)) zugegeben.

Alle Ansätze wurden unter Standardbedingungen, bei 37°C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO_2 -Begasungsbrutschrank für 4-20 h inkubiert. Anschließend wurde aus jedem well 50 μl Überstand entnommen und auf eine Feststoff-Szintillationsplatte (Lumaplate) transferiert. Nach vollständiger Trocknung der Lumaplate bei 54°C im Trockenschrank erfolgte die Auswertung im β -Zähler.

Als Bezugswerte für die Berechnung der spezifischen Lyse in % dienten jeweils die Spontanfreisetzung von markierten Zielzellen in Kulturmedium und die maximale Freisetzung ^{51}Cr -markierter Zielzellen die mit 1 % des Detergenz Triton X-100 behandelt wurden.

Alle ^{51}Cr -Freisetzungstests wurden in einem Endvolumen von 150 μl /well und jeder Meßwert in Triplikaten durchgeführt.

WST-1-Zellviabilitätstest

Als ein weiterer Standardtest zur Messung der Zytotoxizität wurde in dieser Arbeit der WST-1-Test verwendet. Dieser Test beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulphonat) durch die Succinatdehydrogenase in den Mitochondrien stoffwechselaktiver Zellen zum dunkelroten Farbstoff Formazan. Dieser Farbumsatz kann im ELISA-Plattenlesegerät durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. Je vitaler die Zellen sind, desto intensiver ist der Farbumschlag beziehungsweise desto höher ist die gemessene Extinktion.

In dieser Arbeit wurde der WST-Test als ein indirektes Nachweisverfahren des Zelltodes von Tumorzellen nach Behandlung mit verschiedenen Antikörpern oder Apoptose-Sensitivierern und zur somit Ermittlung der zytotoxischen Aktivität eines Reagenz verwendet.

Die Zielzellen wurden in einer 96-well Flachboden-Platte ausplattiert und mit den entsprechenden Antikörpern bzw. anderer zu testender Substanzen inkubiert. Die Inkubationszeit für die Messung der Apoptoseinduktion bispezifischer CD20 x CD95-Konstrukte betrug in der Regel 24 h, für die Bestimmung der Apoptoseinduktion verschiedener intakter CD20-Antikörper soweit nicht anders angegeben 48 bis 72

h. Das WST-1 wurde in einer vom Hersteller angegebenen Verdünnung mit Kulturmedium zu den Tumorzellen gegeben. Der Kulturansatz wurde für weitere 2-8 h unter Zellkulturbedingungen kultiviert und durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm im ELISA-Plattenlesegerät ausgewertet. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt, der Mittelwert bestimmt und der Prozentsatz toter Zellen durch $\left(\frac{1-A_{\text{Probe}}}{A_{\text{max}}}\right) * 100$ ermittelt. Dabei ist A_{max} die Absorption von Zellen die nur mit Medium inkubiert wurden. Von allen Werten (A_{Probe} und A_{max}) erfolgte eine Subtraktion des Leerwertes (Absorption des Profarbstoffes WST-1 in Medium).

2.7.3 ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay)

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen stellt der Sandwich-ELISA dar. Bei einem Sandwich-ELISA wird das zu untersuchende Antigen mithilfe von zwei nicht kreuzreagierenden Antikörpern detektiert: Der erste ist an eine Matrix (Mikrotiterplatte) gekoppelt (*capture*-Antikörper), der zweite Antikörper (Detektionsantikörper) dient als Nachweissystem. Dieser kann stöchiometrisch nur in der Menge binden, in der das Antigen vorhanden ist. Im vorliegenden Falle waren die Detektionsantikörper biotinyliert. Biotin geht mit Streptavidin einen spezifischen Komplex ein. An Streptavidin ist ein Enzym gekoppelt (Peroxidase), welches ein später hinzugefügtes Substrat umsetzt. Diese Umsetzung geht mit einer photometrisch meßbaren Farbänderung des Substrats einher. Die Konzentration des nachzuweisenden Antigens ist somit direkt verantwortlich für eine Änderung der Farbinintensität.

Der Sandwich-ELISA wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der IL-2-Produktion im Überstand r2820-behandelter PBMC eingesetzt. Hierzu wurden 50 μl eines IL-2-capture-Antikörpers in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (in NaHCO_3 -Puffer pH9 verdünnt) in jedes well pipettiert und über Nacht bei 4°C an den Boden einer 96 Loch-Mikrotiterplatte gebunden. Im Überschuß vorhandener und nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt. Nach Absättigung des Plattenbodens mit 200 μl Blockierungslösung (1 h, Raumtemperatur) und zwei weiteren Waschschritten wurde das zu untersuchende Material (hier: Zellkulturüberstand und rekombinantes IL-2 als Standardreihe) in einem Volumen von 100 μl in die Vertiefung gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Nach viermaligem Waschen wurden 100 μl eines biotinylierten α -human IL-2-Antikörpers in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (mit Blockinglösung verdünnt) in jede Vertiefung gegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und sechs Waschschritten wurde HRP-Streptavidin 1 : 5000 in Blockinglösung verdünnt, je 100 μl in jedes well gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inku-

biert. Nach sechsmaligem Waschen erfolgte die Zugabe der KPL-Entwicklungslösung (100 μl /well). Eine Farbbildung erschien stets innerhalb der ersten zehn Minuten. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 50 μl /well H_3PO_4 abgestoppt und durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm im ELISA-Plattenlesegerät ausgewertet. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt.

2.8 *In vivo*-Immuntherapieversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente standen im Einklang mit dem Tierschutzrecht und den Tierschutzbedingungen des Landes Baden-Württemberg. Die Versuche waren zuvor vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt worden (Genehmigungsnummer IM 3/02).

Das Töten der Mäuse erfolgte durch zehnmünütige CO_2 -Begasung im geschlossenen Gefäß.

Für die xenogenen *in vivo* Experimente wurden ausschließlich 4-5 Wochen alte Mäuse des immunodefizienten Stammes C.B-17 SCID (CB17/1cr-*Prkdc*^{SCID}/*Crl*) verwendet [Bosma et al., 1983]. Die Tiere wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierställen.

2.8.1 SCID-Maus-Xenograft-Modell

4-5 Wochen alten SCID-Mäusen wurde an Tag 0 eine lethale Dosis von 1×10^7 SKW6.4 in einem Volumen von 200 μl in PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert.

Im Falle der Vorversuche blieben die Tiere unbehandelt und wurden bei Einsetzen erster deutlicher Lähmungserscheinungen der Hinterläufe und des Schwanzes mittels CO_2 -Begasung getötet. Die Rückgewinnung der Tumorzellen aus dem Knochenmark wurde wie in Abschnitt 2.8.2 (S. 89) beschrieben durchgeführt.

Für die Immuntherapieversuche erfolgte eine Applikation der Immuntherapeutika (20 μg) in einem Endvolumen von 100 μl in PBS an den Tagen 1, 2 und 3 nach Tumorzellinokkulation ins Peritoneum. Tabelle 2.7 (S. 89) zeigt einen Überblick über die verschiedenen Gruppen. Als Kontrollgruppen dienten mit PBS-behandelte und mit 20 μg einer äquimolaren Mischung der Fab'-Fragmente behandelte Tiere. Jede Gruppe bestand dabei aus 6 Tieren.

Tabelle 2.7: Versuchsschema für Immuntherapieversuche mit dem bispezifischen F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1.

Gruppe <i>Tiernummer</i>	Therapeutikum	Tag1	Tag2	Tag2
1 1-6	PBS	100µl PBS	100µl PBS	100µl PBS
1 7-12	Fab'-Mix	10µg Rit-Fab' + 10µg APO-1-Fab'	10µg Rit-Fab' + 10µg APO-1-Fab'	10µg Rit-Fab' + 10µg APO-1-Fab'
1 13-18	Rit x APO-1	20µg Rit x APO-1	20µg Rit x APO-1	20µg Rit x APO-1
1 19-24	Rituxan	20µg Rituxan	20µg Rituxan	20µg Rituxan

2.8.2 Rückgewinnung von Tumorzellen aus dem Knochenmark

Für die Rückgewinnung der Tumorzellen aus dem Knochenmark tumortragender Mäuse wurde das Knochenmark aus dem Oberschenkelknochen und dem Schienbein isoliert. Hierfür wurden die Oberschenkelknochen und das Schienbein freipräpariert. Nach der vollständigen Isolierung wurden die Knochen durch Abschaben mit einem Skalpell von verbleibenden Muskelresten gereinigt. Nun wurden die Gelenkköpfe vorsichtig mit einer sterilen Schere entfernt und das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle mit PBS durchgespült. Die Zellen wurden anschließend in PBS 1x für 5 min bei 250 x *g* gewaschen. Das Zellelett wurde in RPMI-Komplettmedium resuspendiert und die Zellen im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Die so rückgewonnenen „SCID-SKW6.4“ wurden für alle weiteren *in vivo*-Immuntherapieversuche verwendet.

Kapitel 3

Ergebnisse

Inhalt

3.1 Optimierung des monoklonalen chimären αCD20-Antikörpers 2H7-IgG1	92
3.1.1 Herstellung und Reinigung des 2H7-IgG1 und des demutierten IgG1-DE	92
3.1.2 Analytische Evaluierung der verschiedenen 2H7-Antikörper	94
3.1.3 Funktionelle Evaluierung der optimierten 2H7-Antikörper <i>in vitro</i>	95
3.2 Panklonale T-Zellstimulation und Lyse CD20-positiver Zielzellen mit dem bispezifischen <i>single-chain</i> Antikörper r2820	100
3.2.1 Herstellung und Produktion des r2820	100
3.2.2 Analytische Evaluierung des bs-scFv r2820	103
3.2.3 Funktionelle Evaluierung des bs-scFv r2820: Panklonale T-Zellproliferation und Lyse CD20-positiver Zielzellen	105
3.3 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen CD20 x CD95-Konstrukten	116
3.3.1 Herstellung bs F(ab') ₂ -Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 am Beispiel des Rit x APO-1	116
3.3.2 Analytische Evaluierung des F(ab') ₂ -Fragmentes Rit x APO-1	119
3.3.3 Funktionelle Evaluierung der CD20 x CD95-Konstrukte <i>in vitro</i>	122
3.3.4 Funktionelle Evaluierung der CD20 x CD95-Konstrukte <i>in vivo</i> : SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4	131
3.4 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination aus 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt	134

3.4.1	Herstellung des bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmentes 9E10 x APO-1 (α -c-myc x CD95)	135
3.4.2	Analytische Evaluierung des F(ab') ₂ -Fragmentes 9E10 x APO-1	136
3.4.3	Herstellung des Antikörpers 2H7-IgG1-myc	137
3.4.4	Analytische Charakterisierung des 2H7-IgG1-myc	139
3.4.5	Funktionelle Evaluierung der Kombination 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 <i>in vitro</i>	139

3.1 Optimierung des monoklonalen chimären α CD20-Antikörpers 2H7-IgG1

In dieser Arbeit wurde die therapeutische Effektivität des chimärisierten α CD20-Antikörpers 2H7, durch eine Steigerung der Affinität des Fc-Teils zum Fc γ -RIIIa optimiert. Für diese Optimierung wurden zwei unterschiedliche Strategien kombiniert: *Fc-Remodelling* und Veränderung der Glycosylierung.

Für das *Fc-Remodelling* des 2H7-IgG1 wurden analog zu Lazar et al. die Aminosäuren S₂₉₃ \rightarrow D₂₉₃ und I₃₃₂ \rightarrow E₃₃₂ im Fc-Teil des 2H7-IgG1 ausgetauscht und der Einfluß dieses Austausches auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) untersucht.

Um den Einfluß der Fucosylierung auf die ADCC zu untersuchen, wurden der 2H7-Antikörper und die Mutante 2H7-DE gleichzeitig sowohl in YB2/0-Zellen (geringe Fucosylierung) als auch in Sp2/0-Ag14-Zellen (hohe Fucosylierung) exprimiert.

Abschließend wurde die DE-Mutation mit einer geringeren Fucosylierung kombiniert.

Als weiterer direkter Wirkmechanismus von therapeutischen Antikörper wurde die Fähigkeit des α CD20-Antikörper 2H7 zur Vermittlung einer direkten Apoptoseinduktion evaluiert.

3.1.1 Herstellung und Reinigung des 2H7-IgG1 und des DE-mutierten IgG1-DE

Korrektur des mutierten Fc-Teils des 2H7-IgG1-Fc-mut-Antikörpers und Klonierung des 2H7-IgG1-DE

Als Ausgangspunkt für die Klonierung eines Vektors der für die schwere Kette des 2H7-Antikörpers codiert, diente der Vektor *2H7-IgG1-Fc-mut*. Dieses Plasmid codiert für die schwere Kette des chimärisierten α CD20-Antikörpers 2H7 der jedoch eine artifiziell eingeführte Proteaseschnittstelle im Fc-Teil besitzt. Aufgrund dieser Proteaseschnittstelle ist der Fc-Teil dieses IgG1-Antikörpers nicht in der Lage Fc-Teil-vermittelte Effektorfunktionen wie Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) zu vermitteln. Um einen 2H7-IgG1-Antikörper mit einem funktionsfähigen Fc-Teil zu generieren und um die Fähigkeit zur Vermittlung von Effektorfunktionen zu regenerieren, musste die Sequenz die für den „defekten“ Fc-Teil codiert aus dem Plasmid *2H7-IgG1-Fc-mut* entfernt und durch die korrigierte bzw. DE-mutierte Sequenz ersetzt werden. Mittels eines *NheI* und *XhoI*-Doppolverdaus wurde die für den Fc-Teil codieren-

de Sequenz aus dem Vektor *2H7-IgG1-Fc-mut* ausgeschnitten, mittels präparativer Agarosegelelektrophorese präparativ getrennt und der Vektor mittels Elektroelution aus dem Agarosegel eluiert. Abschließend folgte ein Konzentrationsschritt in einem 10 kDa Zentrikon.

Die Korrektur der für den korrigierte Fc-Teil kodierenden Sequenz sowie die S₂₉₃ → D₂₉₃ und I₃₃₂ → E₃₃₂-Mutation wurde von L. Große-Hovest (Universität Tübingen) durchgeführt. Die codierenden Sequenzen für den korrigierten und den DE-mutierten Fc-Teil wurden über die enthaltenen *NheI/XhoI*-Schnittstellen in den geöffneten Vektor ligiert. Nach Verifizierung der Sequenz der VDJ-Region mittels des Sequenzierprimers *mRNA1Hin* und der C_H2-Region mittels der Sequenzierprimer *Kons2Hin* und *Kons2Rev*, wurde jeweils eine Maxiprep angefertigt. Die Plasmid-DNA wurde mit *AhdI* linearisiert und zusammen mit dem linearisierten Plasmid *2H7-kappa* (codiert für die leichte Kette des 2H7-IgG1) in Sp2/0-Ag14 bzw. YB2/0 transfiziert.

Produktion und Reinigung des 2H7-IgG1 und 2H7-IgG1-DE

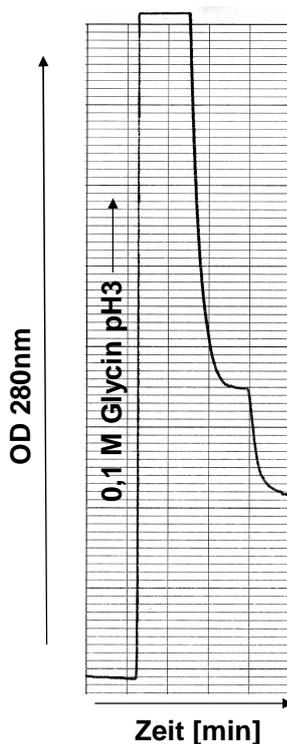


Abb. 3.1: Chromatogramm zur Elution des 2H7-IgG1-Antikörpers (produziert in Sp2/0-Ag14) von einer Protein A-Säule

Die Produktion der beiden Antikörper 2H7-IgG1 und 2H7-IgG1-DE erfolgte parallel sowohl in Sp2/0-Ag14-Zellen als auch in YB2/0-Zellen in serumfreiem Hybridom-

medium. Die produzierten Antikörper wurden durch Protein A-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und mittels eines 0,1 M Glycinpuffers pH3 von der Säule eluiert. Abb. 3.1 (S. 93) zeigt beispielhaft das Elutionsprofil des Antikörpers 2H7-IgG1 aus dem Zellkulturüberstand transfizierter Sp2/0-Ag14-Zellen.

3.1.2 Analytische Evaluierung der verschiedenen 2H7-Antikörper

Reinheitsanalyse

Die Untersuchung der Reinheit der mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigten 2H7-Antikörper erfolgte durch SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden Bedingungen. Wie aus Abbildung 3.2 ersichtlich wird, sind auf dem SDS-Gel die schweren Ketten jeweils durch eine apparente Bande bei etwa 50 kDa repräsentiert, was auch dem Molekulargewicht der schweren Kette von IgG1-Antikörpermolekülen entspricht. Die leichten Ketten sind etwas über der 30 kDa-Bande des Markers zu erkennen was allerdings nicht ganz dem theoretischen Molekulargewicht von 25 kDa entspricht, was aber auf Ungenauigkeiten bei der SDS-PAGE-Analyse zurückgeführt werden kann.

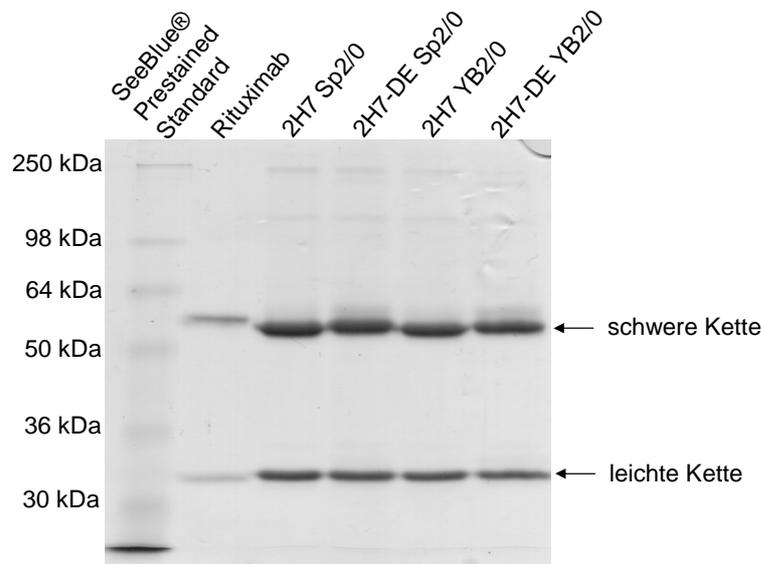


Abb. 3.2: Analytische Charakterisierung der verschiedenen 2H7-Antikörper mittels SDS-PAGE-Analyse

Pro Spur wurden 5 μ g Protein mittels 10% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Größenmarker diente der SeeBlue®Pre-Stained Standard

Bindungsanalyse

Das Bindungsverhalten des 2H7-Antikörpers gegenüber seinem Antigen CD20 sollte theoretisch durch eine DE-Mutation im Fc-Teil des Moleküls oder durch eine Veränderung des Glycosylierungsmusters nicht beeinträchtigt werden. Um dies zu verifizieren wurden die verschiedenen, mittels Protein A aufgereinigten 2H7-Antikörper auf CD20⁺ Raji Zellen titriert.

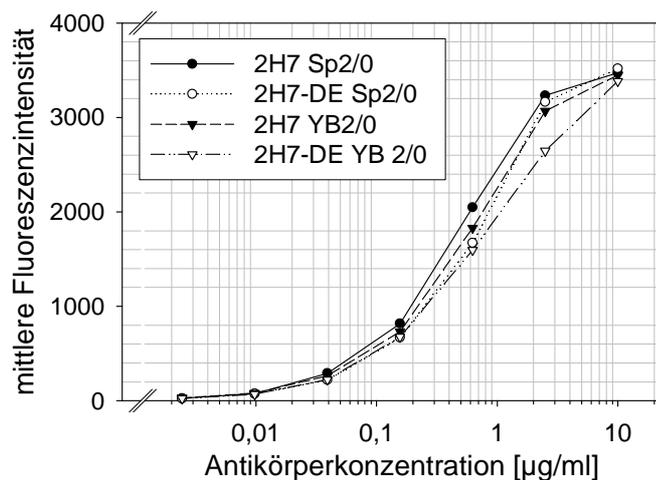


Abb. 3.3: Titration der verschiedenen 2H7-Antikörper auf der CD20-positiven humanen B-Lymphomzelllinie Raji

Die verschiedenen mittels Protein A aufgereinigten 2H7-Antikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen auf Bindung an die Antigen-positive B-Lymphomzelllinie Raji getestet. Die Detektion erfolgte durch ein R-PE-konjugiertes Ziege- α -human-IgG-F(ab')₂-Antikörperfragment

Wie aus Abb. 3.3 ersichtlich wird, führt weder eine DE-Mutation noch eine geringere Fucosylierung durch Expression in YB2/0 zu einer Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens der 2H7-Antikörper. Alle 2H7-Antikörper erreichen ab einer Konzentration von etwa 10 μ g/ml die Sättigung.

3.1.3 Funktionelle Evaluierung der optimierten 2H7-Antikörper *in vitro*

Um den Einfluß einer DE-Modifikation und einer geringeren Fucosylierung am Fc-Teil des α CD20-Antikörpers 2H7 auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) zu testen, wurden standardmäßig 4h ⁵¹Cr-Freisetzungstests durchgeführt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens sechs voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Einfluß der DE-Modifikation des Fc-Teils auf die ADCC

Ob eine DE-Modifikation des Fc-Teils einen Einfluß auf die Vermittlung der ADCC hat, wurde durch einen Vergleich des DE-mutierten 2H7-IgG1-DE mit dem 2H7-IgG1 in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest evaluiert. Der therapeutisch eingesetzte αCD20 -Antikörper Rituxan (Rituximab) wurde als Vergleichsantikörper verwendet. Als Effektorzellen dienten frisch isolierte PBMC wohingegen als CD20^+ -Zielzellen die B-Zell-Lymphomzelllinie Raji verwendet wurde. Das Effektor:Zielzell-Verhältnis betrug 10:1.

Abbildung 3.4 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines solchen ADCC-Experimentes. Aus den Titrationskurven wird ersichtlich, dass die durch 2H7-IgG1 und Rituxan vermittelte zelluläre Zytotoxizität deutlich schlechter ist als die des modifizierten 2H7-IgG1-DE-Antikörpers. Die durch den modifizierten 2H7-Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität erreicht

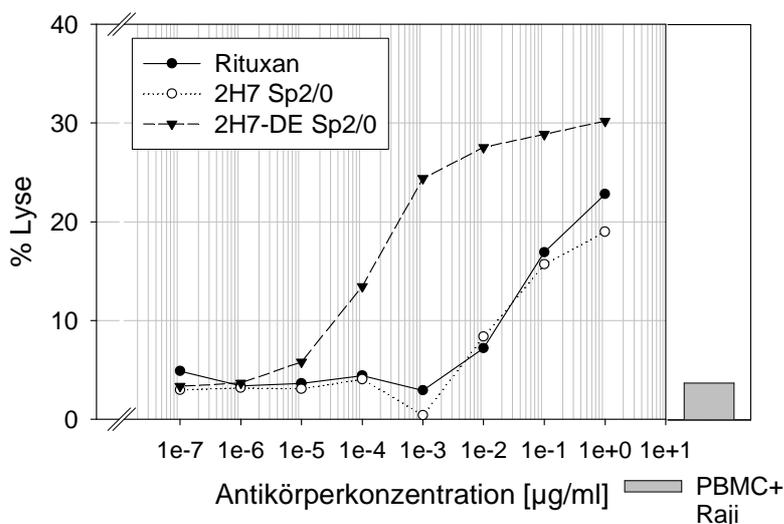


Abb. 3.4: ^{51}Cr -Freisetzungstests zur Evaluierung des Einflusses einer DE-Modifikation des Fc-Teils des 2H7-Antikörpers auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität

Titration des 2H7-IgG1 und des DE-modifizierten 2H7-IgG1-DE auf CD20 -positiven Raji-Zellen in Anwesenheit von PBMC

bei einer Antikörperkonzentration von etwa 1 ng/ml die Sättigung, wohingegen diese bei 2H7-IgG1 und bei Rituxan selbst bei einer Antikörperkonzentration von 1 µg/ml noch nicht erreicht wird.

Durch den Austausch der beiden Aminosäuren in der C_H2 -Region des 2H7-IgG1-Antikörpers kann in diesem Experiment eine um drei Zehnerpotenzen gesteigerte Aktivität der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) im Vergleich zum nicht-modifizierten 2H7 erreicht werden.

Einfluß einer geringeren Fucosylierung des Fc-Teils auf die ADCC

Um den Einfluß der Fucosylierung des 2H7-IgG1 auf die Vermittlung der ADCC zu untersuchen wurden auch hier wieder 4h- ^{51}Cr -Freisetzungstests durchgeführt.

In diesem Experiment sollte die Fähigkeit zur Vermittlung der ADCC des in der Maus-Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14 produzierten 2H7-IgG1 (2H7 Sp2/0) mit dem in der Ratten-Myelomzelllinie YB2/0 produzierten 2H7-IgG1 (2H7 YB2/0) verglichen werden.

Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines Standard-4h-⁵¹Cr-Freisetzungstests mit CD20-positiven Raji-Zellen und PBMC als Effektorzellen (Effektor:Zielzell-Verhältnis 10:1). Aus den Titrationskurven ist deutlich zu erkennen, dass allein durch einen Wechsel der Expressionszelllinie von der Maus-Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14 zur Ratten-

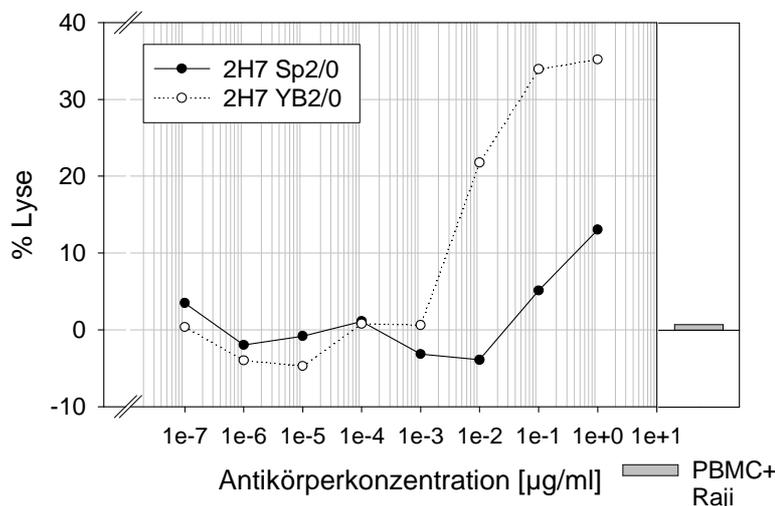


Abb. 3.5: ⁵¹Cr-Freisetzungstests zur Evaluierung des Einflusses einer verminderten Fucosylierung des 2H7-Antikörpers auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität

Titration des hoch-fucosylierten 2H7-IgG1 (Sp2/0) und des gering-fucosylierten 2H7-IgG1 (YB2/0) auf CD20-positiven Raji-Zellen in Anwesenheit von PBMC

Myelomzelllinie YB2/0, welche eine geringe Fucosylierung vermittelt, eine Steigerung der ADCC um etwa 2,5 Zehnerpotenzen erreicht werden kann.

Einfluß der Kombination der DE-Modifikation und geringerer Fucosylierung des Fc-Teils auf die ADCC

Aus den vorhergehenden Abschnitten wird ersichtlich, dass sowohl durch eine DE-Modifikation des Fc-Teils des 2H7-Antikörpers, als auch durch eine Modifikation der Glycosylierung durch einen Wechsel von einem hoch-fucosylierenden (Sp2/0-Ag14) zu einem gering-fucosylierenden (YB2/0) Expressionssystem die Effektivität der ADCC um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert werden kann. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob durch Kombination der DE-Modifikation mit einer geringen Fucosylierungsrate (2H7-DE YB2/0) eine weitere Effizienzsteigerung der ADCC möglich wird.

Abbildung 3.6 (S. 98) zeigt einen Vergleich der verschiedenen 2H7-Antikörper in einem Standard-ADCC-Experiment. Anhand der Titrationskurven ist deutlich zu

erkennen, dass eine DE-Modifikation des 2H7-Antikörpers im selben Maße zu einer Steigerung der ADCC führt wie eine geringere Fucosylierung. Wie aus Abbildung 3.6 ersichtlich wird, ist durch eine Kombination der DE-Modifikation mit einer geringeren Fucosylierung (2H7-DE YB2/0) keine weitere Steigerung der ADCC-Effektivität zu beobachten.

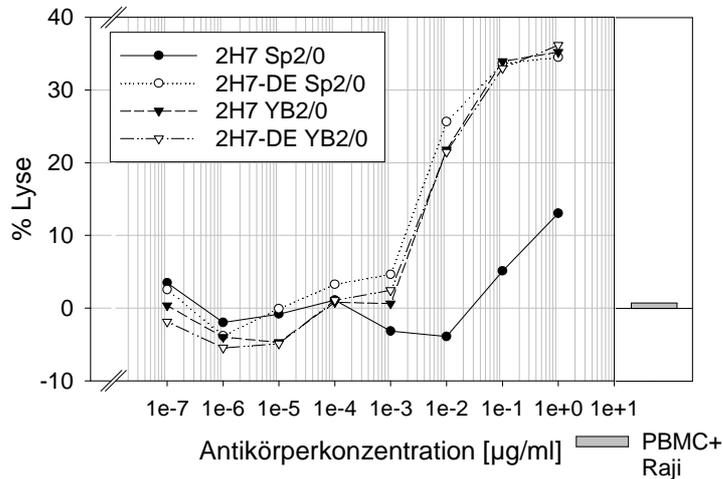


Abb. 3.6: Einfluß der Kombination der DE-Modifikation und einer geringeren Fucosylierung auf die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität.

Die verschiedenen 2H7-Antikörper wurden auf CD20⁺-Raji Zellen in Anwesenheit von PBMC titriert (E:T=10:1) und die Lyserate bestimmt.

Vergleich der direkten Apoptoseinduktion des 2H7-Antikörpers und des Rituxan

Für den α CD20-Antikörper Rituxan (Rituximab) konnte gezeigt werden, dass er seine therapeutische Wirkung teilweise durch direkte Apoptoseinduktion entfaltet [Shan et al., 1998; Ghetie et al., 2001; Johnson und Glennie, 2003]. Ob auch der 2H7-Antikörper in der Lage ist eine direkte Apoptoseinduktion zu vermitteln, wurde mittels eines WST-1-Zellviabilitätstests untersucht.

Abbildung 3.7 (S. 99) zeigt deutlich, dass der α CD20-Antikörper Rituxan eine direkte Apoptoseinduktion der SKW6.4 vermitteln kann, wobei die gemessene Lyserate bei etwa 30% liegt. Im Gegensatz dazu ist der α CD20-Antikörper 2H7 nicht in der Lage eine direkte Apoptoseinduktion der B-Lymphomzelllinie SKW6.4 zu vermitteln.

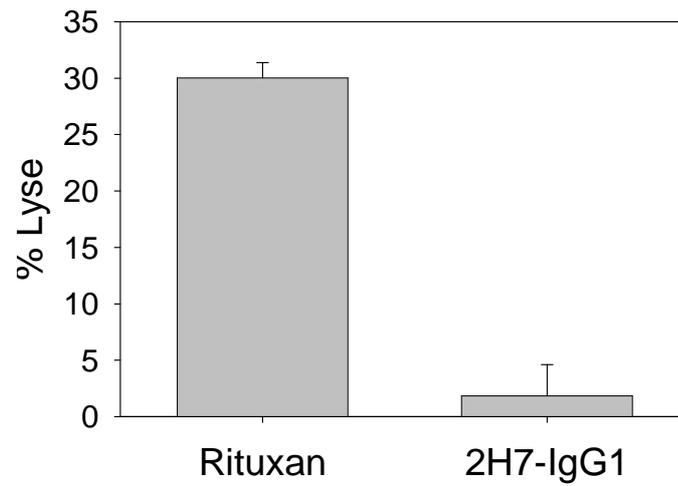


Abb. 3.7: Direkte Apoptoseinduktion durch die α CD20-Antikörper Rituxan und 2H7 5×10^4 CD20⁺-SKW6.4 wurden für 48h mit 5 μ g/ml Rituxan bzw. 2H7-IgG1 (produziert in SP2/0-Ag14) inkubiert und die Lyserate mittels eines WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt. Angegeben sind die gemittelten Lyseraten dreier unabhängiger Experimente und die Standardabweichung.

3.2 Panklonale T-Zellstimulation und Lyse CD20-positiver Zielzellen mit dem bispezifischen *single-chain* Antikörper r2820

Aufbauend auf der Beobachtung, dass der bispezifische *single-chain* Antikörper r28M mit Spezifität anti-humCD28 x anti-humNG2 (CSPG) in der Lage ist, eine Zielzell-restringierte supra-agonistische CD28-Stimulation zu vermitteln [Grosse-Hovest et al., 2003], wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dies eine besondere Eigenschaft der im r28M-Molekül enthaltenen Antikörper ist, oder ob die Fähigkeit zur supra-agonistischen CD28-Stimulation auch im Falle eines Austausches der Spezifität für NG2 gegen eine Spezifität für das B-Zell-assoziierte Antigen CD20 erhalten bleibt.

3.2.1 Herstellung und Produktion des r2820

Klonierung des bispezifischen *single-chain* Antikörpers r2820

Der bispezifische *single-chain* Antikörper r2820 wurde durch den Einbau des 2H7-scFv (anti-human CD20) in den Expressionsvektor *Kozak-Splice* erzeugt, welcher bereits die codierende Sequenz für das 9.3-scFv (anti-human CD28) und den Peptidlinker enthielt.

Ausgangspunkt für die Generierung eines klonierungsfähigen α CD20-scFv (2H7-scFv) war der Vektor *CD20-pSeq*. Zum Anfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung in die Zwischen- und Expressionsvektoren wurden zunächst sogenannte „*overlapping*“-PCRs mit überhängenden Primern durchgeführt. Als Extensionsprimer werden dabei Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 40-60 Nukleotiden und einem 5'-Überhang von ca. 20-30 Nukleotiden gewählt, um noch eine sichere Hybridisierung mit der spezifischen Template-Sequenz zu gewährleisten.

Die im Vektor *CD20-pSeq* enthaltene 2H7-scFv-cDNA wurde dabei mit den Oligonukleotiden *20-BspEI* und *20-Rev* amplifiziert. Durch Folge-PCRs mit den Oligonukleotiden *universal-Rev*, *universal-Rev2* und *universal-Rev3* wurde die 2H7-scFv-cDNA amplifiziert. Gleichzeitig wurde am 5'-Ende die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BspEI* und am 3'-Ende eine ca. 115 bp lange Sequenz angefügt, die für 20 Aminosäuren aus der *elbow*-Region der leichten Antikörperkette, gefolgt vom c-myc-Epitop codiert und am Ende eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *SpeI* enthält. Das entstandenen PCR-Produkt wurde in den pPCR-SkriptTMAmpSK(+)-Cloning-Vektor zwischenkloniert, die

2H7-scFv-cDNA mittels den Sequenzierprimern *M13 Hin* und *M13 Rev* sequenziert und auf ihre Richtigkeit überprüft.

Durch einen seriellen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *BspEI* und *SpeI* wurde das Element aus dem Zwischenvektor ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten Vektor *Kozak-Splice* direkt hinter das μ -Intron ligiert. Nach Verifizierung der Sequenz mithilfe des Sequenzierprimers *Kons1-Rev* wurde eine Maxiprep angefertigt. Die Plasmid-DNA wurde mit *AhdI* linearisiert und in Sp2/0-Ag14-Zellen transfiziert.

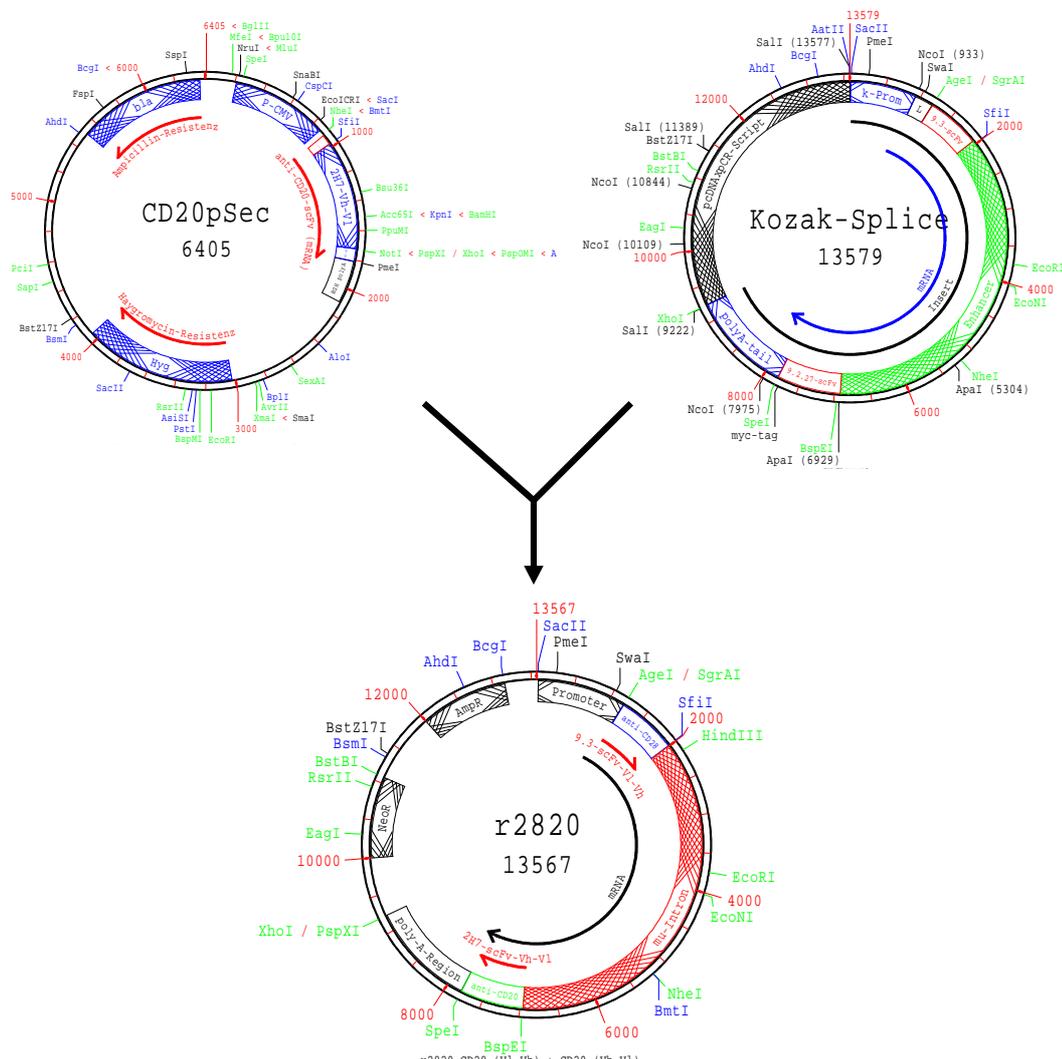


Abb. 3.8: Übersicht über das Klonierungsschema des r2820

Die Sequenz des 2H7-scFv wurde mittels überlappender PCRs amplifiziert und modifiziert und nach einem Zwischenklonierungsschritt über die *BspEI* und *SpeI* Schnittstellen in den entsprechend geöffneten Vektor *Kozak-Splice* einkloniert. Genauere Erklärung im Text.

Produktion und Reinigung des bs-scFv r2820

Die Produktion des bs-scFv r2820 erfolgte mithilfe stabil transfizierter Sp2/0-Ag14-Zellen in IMDM-Komplettmedium unter ständigem Selektionsdruck durch Zugabe des Antibiotikums G418 zum Kulturmedium. Die durchschnittliche Produktionsrate betrug etwa 0,5-1 mg r2820 pro Liter Zellkulturüberstand.

Anschließend wurde das bs-scFv r2820 mittels Protein L-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt.

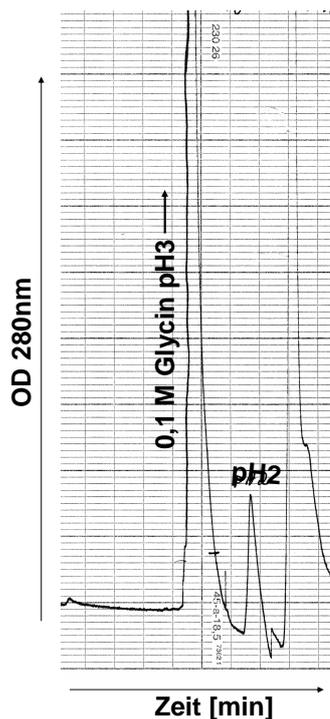


Abb. 3.9: Protein L-Affinitätschromatographie zur Reinigung des bispezifischen *single-chain* Antikörpers r2820

Chromatogramm zur Elution des aus dem Kulturüberstand transfizierter Sp2/0-AG14 gereinigten r2820 von einer Protein L-Säule. Die Elution erfolgte mittels eines 0,1 M Glycinpuffer pH3 und pH2. Angegeben sind die optische Dichte bei 280 nm gegenüber der Zeit.

Schematische Darstellung des bispezifischen *single-chain* Moleküls r2820

Der bispezifische *single-chain* Antikörper r2820 setzt sich aus dem α CD28-scFv (9.3) und dem α CD20-scFv (2H7) in der Anordnung $(V_L-V_H)_{9.3}-(V_H-V_L)_{2H7}$ zusammen. Die V_H - und V_L -Domänen jedes monospezifischen *single-chain*-Fragmentes sind dabei mit einem Glycin-Serin-Linker $(G_4S)_3$ verknüpft. Die beiden monospezifischen scFvs werden wiederum durch eine definierte Sequenz der oberen *elbow*-Region der humanen C_H1 -Domäne zu einem bispezifischen *single-chain* Molekül verbunden.

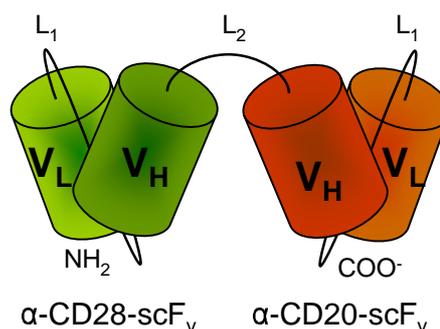


Abb. 3.10: Schematische Darstellung des r2820

Das bispezifische *single chain* Molekül r2820 besteht aus zwei monospezifischen *single chain* Fv-Fragmenten die durch eine definierte Sequenz (L2) der oberen *elbow*-Region der humanen C_H1 -Domäne miteinander verbunden sind. (L1 = Glycin-Serin-Linker (G₄S)₃)

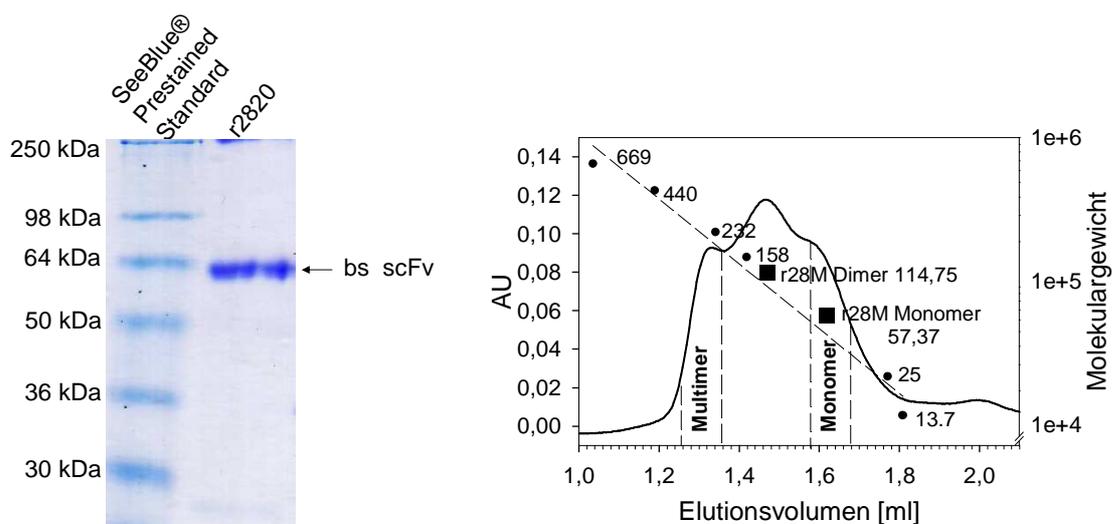
3.2.2 Analytische Evaluierung des bs-scFv r2820

Reinheitsanalyse

Die Untersuchung der Reinheit des mittels Protein L-Affinitätschromatographie aufgereinigten r2820 erfolgte durch analytische Gelfiltration und SDS-PAGE-Analyse.

Trennt man das mittels Protein L-Affinitätschromatographie aufgereinigte r2820 auf einer analytischen Gelfiltrationssäule auf, so zeigt das Gelfiltrationsprofil (s. Abb. 3.11(b), S. 104) mehrere Peaks. Bei dem Peak mit einem Durchflußvolumen von ca. 1,6 ml handelt es sich um die monomere Form des r2820, was auch in etwa dem Molekulargewicht des bs-scFv von 57,14 kDa entspricht. Der höhermolekulare Peak bei ca. 1,3 ml Durchflußvolumen scheint durch eine spontane Multimerisierung des r2820 zustande zu kommen. Dem Molekulargewicht nach zu schließen könnte es sich um Quatomere handeln. Die für eine spätere, getrennte Untersuchung der monomeren und multimeren Form des r2820 gepoolten Fraktionen sind im Elutionsprofil eingezeichnet.

In der SDS-PAGE-Analyse ist nur eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa zu erkennen (s. Abb. 3.11(a), S. 104). Dies spricht dafür, dass es sich bei dem höher-molekularen Peak des Gelfiltrationsprofils tatsächlich um Multimere des r2820-Moleküls handelt, da bei der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE jegliche Zusammenlagerung von Proteinen die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zustande kommt, wie es bei der Multimerisierung der Fall ist, durch die denaturierenden Bedingungen zerstört wird.



(a) SDS-PAGE des bs-scFv r2820 unter reduzierenden Bedingungen

Pro Spur wurden 5 μg des gereinigten r2820 mittels 10% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Größenmarker diente der SeeBlue®Pre-Stained Standard

(b) Analytisches Gelfiltrationsprofil des bs-scFv r2820

50 μl des gereinigten r2820 wurden auf eine analytische Superdex 200 PC3.2/30 Säule bei einer Flußrate von 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgetragen. Die Detektion des Durchlaufes erfolgte bei 280 nm. Als Standardwerte für die Molmassen dienten bekannte Proteine mit genau definiertem Molekulargewicht (schwarze Dreiecke). Zusätzlich sind die gepoolten monomeren und multimeren Fraktionen markiert.

Abb. 3.11: Analytische Charakterisierung des bispezifischen *single-chain* Antikörpers r2820 mittels SDS-PAGE-Analyse und analytischer Gelfiltration

Bindungsanalyse

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens des gereinigten r2820 an seine beiden Antigene erfolgte durchflußzytometrisch mittels FACS-Analyse. Hierzu wurde der gereinigte r2820 auf CD20⁺ SKW6.4 und CD28⁺ Jurkat Zellen titriert.

Bei Betrachten der Titrationskurven (s. Abb. 3.12, S. 105) wird deutlich, dass das im r2820 enthaltene $\alpha\text{CD28-scFv}$ eine deutlich stärkere Affinität zur Bindung an sein Antigen aufweist als das $\alpha\text{CD20-scFv}$. Eine halbmaximale Bindung bei Titration des r2820 auf CD28⁺ Jurkat Zellen wird bei einer Konzentration von etwa 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht, eine Sättigung bei etwa 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (s. Abb. 3.12(a), S. 105). Hingegen liegt bei Titration auf CD20⁺ SKW6.4 die halbmaximale Bindung bei ca. 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, wohingegen die Kurve bei 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ noch nicht vollständig in der Sättigung ist (s. Abb. 3.12(b), S. 105). Dieser Unterschied in der Bindungsaffinität der beiden Spezifitäten des r2820-Moleküls ist insofern nicht verwunderlich, als dass auch bei einem Vergleich der intakten Antikörper $\alpha\text{CD20-IgG1}$ (2H7) und

α CD28-IgG1 (9.3) der 2H7-Antikörper eine geringere Affinität zu seinem Antigen aufweist als der 9.3-Antikörper (Daten nicht gezeigt). Bei dem CD20-Antikörper 2H7 scheint es sich um einen relativ schwach affinen Antikörper zu handeln, was noch ausgeprägter im monovalenten *single-chain* Format zu beobachten ist, da hier zusätzlich die Avidität durch die Monovalenz beeinträchtigt ist.

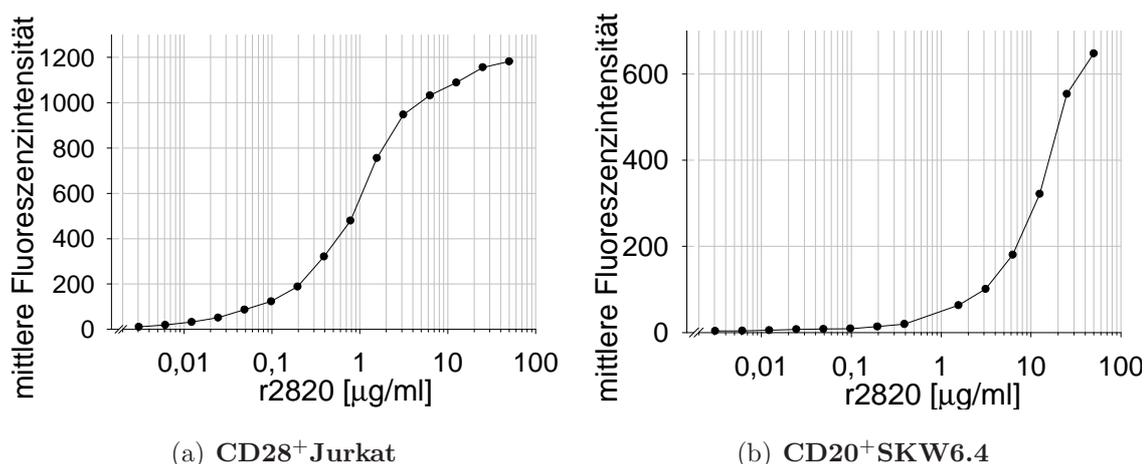


Abb. 3.12: Titration des gereinigten r2820

Das bs-scFv r2820 wurde auf Bindung an seine beiden Antigene getestet. Die B-Zelllymphomlinie SKW6.4 wurde als CD20-positive und die T-Zelllymphomlinie Jurkat als CD28-positive Zelllinie verwendet. Der Bindungsnachweis des r2820 erfolgte durch die Verwendung des anti-c-myc-Antikörpers 9E10 (10 µg/ml) und einer anschließenden Detektion mit einem R-PE-markierten Ziege- α -Maus-F(ab')₂.

3.2.3 Funktionelle Evaluierung des bs-scFv r2820: Panklonale T-Zellproliferation und Lyse CD20-positiver Zielzellen

Nachdem die Reinheit des bispezifischen *single-chain* Antikörpers r2820 überprüft und seine Bindungsaktivität in der Durchflußzytometrie bestätigt werden konnte, sollte nun die Funktionalität des Antikörpers untersucht und die Frage geklärt werden, ob das r2820 in der Lage ist, die erwünschte supra-agonistische T-Zell-Aktivierung und als Folge davon eine Lyse CD20⁺-Zielzellen zu vermitteln. Dazu wurden verschiedene Proliferations- und Zytotoxizitätsexperimente durchgeführt.

Zielzell-restringierte supra-agonistische T-Zell-Aktivierung durch r2820

Als Maß für die T-Zell-Aktivierung wurde die [³H]-Thymidin-Inkorporation und die Freisetzung von Interleukin-2 (IL-2) als Folge einer mit der Aktivierung einhergehenden Proliferation der T-Zellen r2820-behandelter PBMC bestimmt.

Als Positivkontrolle für die Proliferationsfähigkeit der in den PBMC-Präparationen enthaltenen T-Zellen diente in allen Experimenten das Lektin PHA welches eine panklonale T-Zellproliferation induziert.

Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus einer Reihe von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

r2820-induziert eine T-Zellproliferation in PBMC-Präparationen gesunder Spender

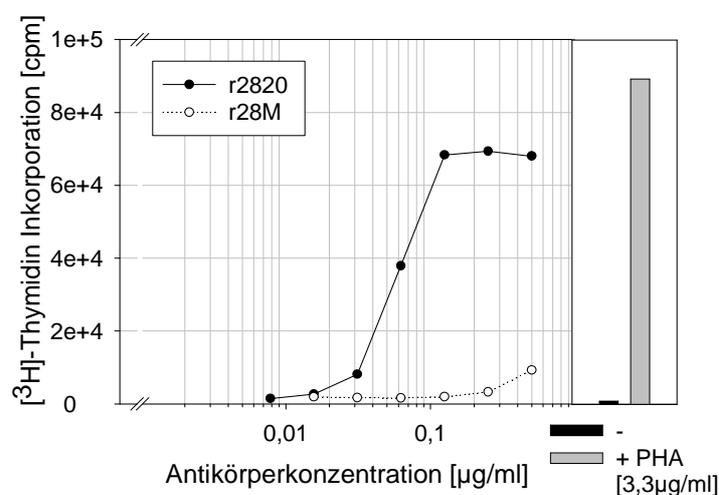


Abb. 3.13: $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung

1×10^5 PBMC wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des r2820 oder des r28M inkubiert und die Proliferationsrate bestimmt. Die Proliferationsfähigkeit der in der PBMC-Präparation enthaltenen T-Zellen wurde durch Inkubation mit $3,3 \mu\text{g/ml}$ des panklonalen T-Zellstimulans PHA gezeigt.

konnte eine T-Zell-Proliferation beginnend mit einer Konzentration von etwa $0,03 \mu\text{g/ml}$ beobachtet werden, wobei die Titrationskurve ab einer r2820-Konzentration von etwa $0,1 \mu\text{g/ml}$ die Sättigung erreichte. Als Negativkontrolle diente in diesen Versuchen der bispezifische *single-chain* Antikörper r28M. Dieses bs-scFv beinhaltet das gleiche 9.3-scFv (anti-CD28) wie es im bs-scFv r2820 enthalten ist. Das r28M bindet jedoch mit seiner zweiten Spezifität an das NG2-Antigen. Da NG2 weder auf PBMC noch auf SKW6.4 exprimiert wird, ist eine Inkubation mit r28M eine geeignete Kontrolle um auszuschließen, dass eine T-Zellaktivierung durch eine alleinige Bindung des $\alpha\text{CD28-scFv}$ oder allein durch das spezifische *single-chain*

Im $^3[\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsassay kann nach 4-tägiger Inkubation mit r2820 eine deutliche supra-agonistische T-Zellproliferation gemessen werden (s. Abb. 3.13). Bei diesen Versuchen dienten die in der PBMC-Präparation enthaltenen autologen CD20^+ -B-Zellen als Zielzellen.

Die T-Zell-Proliferation ist abhängig von der eingesetzten Antikörperkonzentration und zeigt einen deutlichen Titrationsseffekt. Bei den meisten der untersuchten Spender

Format induziert wird. Wie Abbildung 3.13 (S. 106) zeigt, ist das bs-scFv r28M nicht in der Lage unter den gegebenen Bedingungen eine T-Zellaktivierung zu induzieren.

Die r2820-induzierte T-Zellproliferation ist Zielzell-restringiert d.h. es ist keine r2820-induzierte T-Zellaktivierung nach Blockierung des CD20-Antigens oder in Abwesenheit von CD20⁺-Zielzellen zu beobachten

Um die CD20-Abhängigkeit der r2820-induzierten T-Zellproliferation, und damit die Zielzell-Restriktion zu beweisen, wurde das CD20-Antigen vor Zugabe des bs-scFv r2820 mit einem Überschuß (10 µl/mg) des αCD20-Antikörpers Rituxan (Rituximab) blockiert.

In diesem Falle kann keine r2820-induzierte supra-agonistische T-Zellproliferation nachgewiesen werden (s. Abb. 3.14).

Um zu überprüfen, ob eine Zugabe zusätzlicher CD20⁺-Zielzellen in Form von bestrahlten SKW6.4, zu einer Erhöhung der Proliferation führen kann, wurden zusätzlich in jedes well 5x10³ SKW6.4 zugegeben. Wie jedoch aus Abb. 3.14 ersichtlich wird, führt die Anwesenheit dieser „zusätzlichen“ Zielzellen nur zu einer geringfügig gesteigerten Effektivität des r2820. Da jedoch der SKW6.4-Kontrollansatz

(bestrahlte SKW6.4) ebenfalls eine geringe Proliferation zeigt, scheint es sich hier lediglich um einen additiven Effekt der minimalen *per se* Proliferation der bestrahlten SKW6.4 und der r2820-induzierten T-Zellproliferation der PBMC zu handeln.

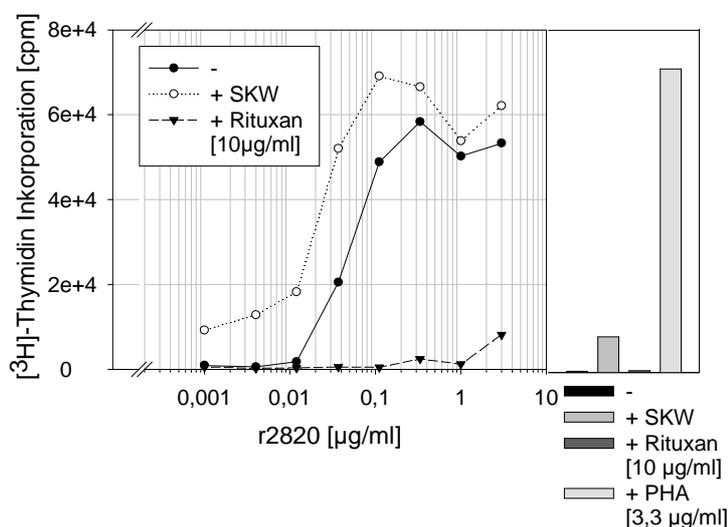


Abb. 3.14: [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay zum Beweis der Abhängigkeit der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung vom Vorhandensein des Zielantigens CD20

1x10⁵ PBMC wurden in An- bzw. Abwesenheit eines Überschusses des blockierenden αCD20-Antikörpers Rituxan inkubiert und die T-Zellproliferation nach 4-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des r2820 gemessen. In einem weiteren Ansatz sollte der Einfluß zusätzlicher CD20⁺-Zielzellen, in Form von bestrahlten SKW6.4, auf die r2820-induzierte T-Zellproliferation bestimmt werden.

Als weiterer Beweis für die Abhängigkeit der r2820-induzierten T-Zellproliferation vom Vorhandensein CD20⁺-Zielzellen wurde ein [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay mit B-Zell-depletierten PBMC durchgeführt. Hierfür wurden die B-Zellen mittels des Prinzips der magnetischen Zellseparation (MACS) (s. Abschnitt 2.3.8, S. 74) mit αCD19-Beads aus der PBMC-Präparation entfernt. Um sicherzustellen dass die Separation erfolgreich war, wurden die Fraktionen durchflußzytometrisch mittels FACS-Analyse mit R-PE-konjugierten αCD20- und αCD3-Antikörpern untersucht (Daten nicht gezeigt). Der Anteil verbliebener B-Zellen in den B-Zell-depletierten PBMC betrug zwischen 0,5 und 1%.

Wie aus Abb. 3.15 ersichtlich wird, ist bei Inkubation B-Zell-depletierter PBMC mit verschiedenen r2820-Konzentrationen keine r2820-induzierte T-Zellproliferation zu beobachten. Werden jedoch bestrahlte SKW6.4 als „künstliche“ CD20⁺-Zielzellen in jedes well zu den B-Zell-depletierten PBMC gegeben, so kann eine deutliche r2820-induzierte T-Zellproliferation beobachtet werden.

Bei höheren r2820-Konzentrationen war häufig ein Abfall der Proliferationsrate zu beobachten. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch eine zu hohe r2820-Konzentration eine gleichzeitige bizelluläre Bindung des r2820 mit beiden Spezifitäten des Antikörpermoleküls erschwert ist.

Als eine weitere Methode zur Bestimmung der r2820-induzierten T-Zellproliferation wurden IL-2-ELISAs durchgeführt. Hierzu wurden PBMC bzw. B-Zell-depletierte PBMC gesunder Spender mit r2820, r28M oder PHA inkubiert. Dabei wurde täglich Kulturüberstand abgenommen und der IL-2-Gehalt der Pro-

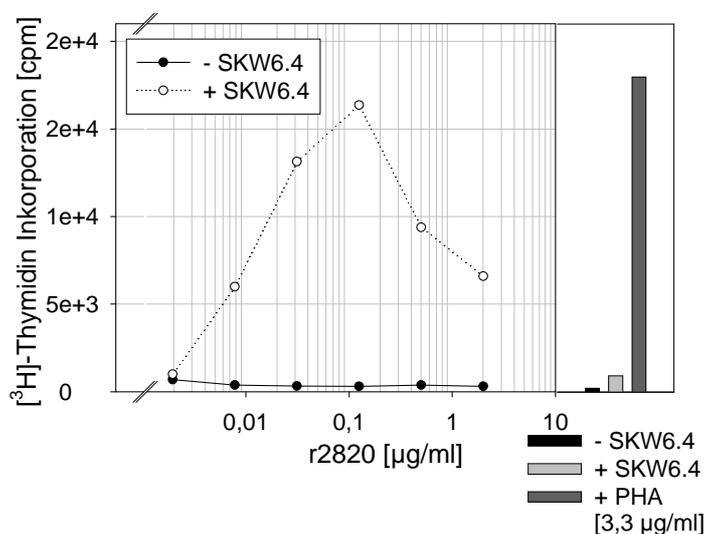
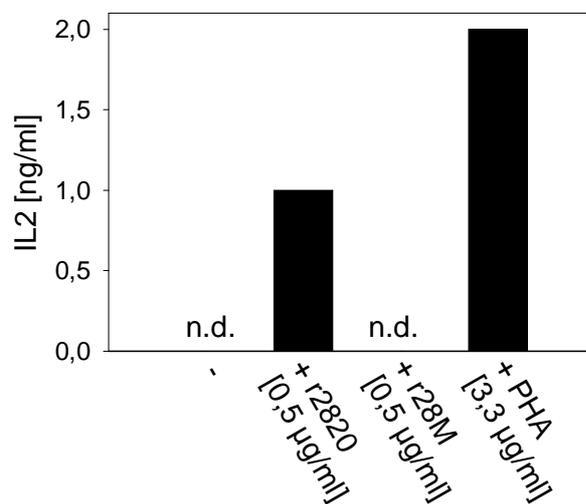


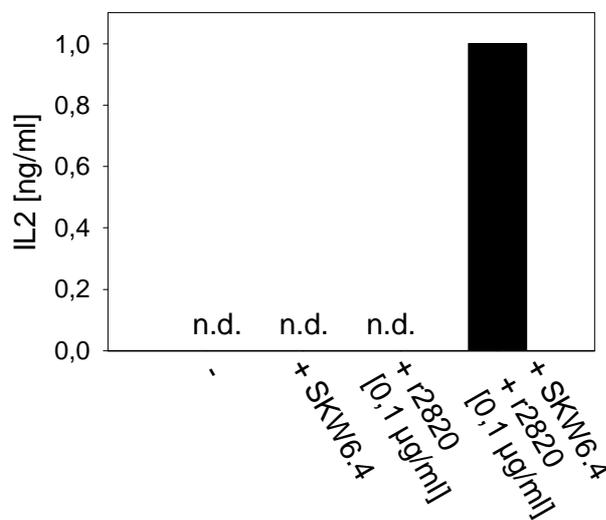
Abb. 3.15: [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay zum Beweis der Abhängigkeit der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung vom Vorhandensein CD20⁺-Zielzellen

1x10⁵ B-Zell-depletierte PBMC wurden in An- bzw. Abwesenheit CD20⁺-Zielzellen (5x10³ SKW6.4/well) für 4 Tage mit verschiedenen r2820-Konzentrationen inkubiert und die Proliferationsrate bestimmt. Als Positivkontrolle für die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen diente ein Ansatz mit 3,3 µg/ml des panklonalen T-Zellstimulus PHA.

ben bestimmt. Der IL-2-Gehalt im Überstand der Zellen erreicht nach 48 stündiger Inkubationszeit seinen Höhepunkt und fällt danach rasch ab (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung des IL-2-Gehaltes nach 48-stündiger Inkubationszeit. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis.



(a) PBMC



(b) B-Zell-depletierte PBMC

Abb. 3.16: ELISA zum Nachweis der IL-2-Produktion r2820-behandelter PBMC bzw. B-Zell-depletierter PBMC

PBMC bzw. B-Zell-depletierte PBMC gesunder Spender (1×10^5 Zellen/well) wurden für 48h in Anwesenheit des bs-scFv r2820 inkubiert und die IL-2-Produktion aktivierter T-Zellen mittels ELISA detektiert. Eine Inkubation mit PHA diente als Positivkontrolle für die Proliferationsfähigkeit der in der PBMC- bzw. B-Zell-depletierten PBMC-Präparation enthaltenen T-Zellen. Durch Verwendung von B-Zell-depletierten PBMC kann die Abhängigkeit der r2820-induzierten IL-2-Freisetzung aktivierter T-Zellen vom Vorhandensein CD20⁺-Zielzellen gezeigt werden. (n.d.= kein IL-2 detektierbar)

Abb. 3.16(a) (S. 109) zeigt den IL-2-Gehalt im Überstand von mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ r2820 behandelten PBMC nach Inkubation unter Standardbedingungen im Zellinkubator. Es zeigt sich deutlich, dass r2820 zu einer starken IL-2-Produktion führt, die im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Im Überstand unbehandelter bzw. r28M-behandelter PBMC läßt sich kein IL-2 detektieren. Das panklonale T-Zellstimulans PHA induzierte eine sehr starke IL-2-Produktion und diente auch in diesen Versuchen als Positivkontrolle.

Bei Inkubation von B-Zell-depletierten PBMC mit r2820 kann im IL-2-ELISA keine IL-2-Freisetzung nachgewiesen werden (s. Abb. 3.16(b), S. 109). Um zu beweisen, dass diese fehlende IL-2-Produktion auf ein Fehlen CD20⁺-Zielzellen zurückzuführen ist, wurden auch hier wieder Zielzellen in Form von bestrahlten SKW6.4 (5×10^3 Zellen/well) zugegeben. Abb. 3.16(b)) zeigt deutlich, dass nach Zugabe von SKW6.4 zu den B-Zell-depletierten PBMC in Anwesenheit von r2820 IL-2 im Zellkulturüberstand detektiert werden kann. Eine Inkubation B-Zell-depletierter PBMC mit SKW6.4 in Abwesenheit von r2820 führt wie erwartet zu keiner IL-2-Produktion.

Diese Versuchsansätze beweisen, dass r2820 nur dann eine T-Zellproliferation induziert, wenn es mit beiden Spezifitäten an seine Zielantigene gebunden hat.

Das spezielle bispezifische *single-chain* Format ist verantwortlich für die supra-agonistische T-Zellaktivierung des r2820

In einer Studie mit einem, mittels chemischer Hybridisierung hergestellten bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes, mit Spezifität CD20 x CD28, konnte für dieses Konstrukt keinerlei supra-agonistische Aktivität beobachtet werden [Brandl et al., 1999]. Dieses bispezifische F(ab')₂-Fragment war nur dann in der Lage eine T-Zellaktivierung hervorzurufen, wenn gleichzeitig auch das CD3-Molekül getriggert wurde.

Dies konnte auch in einem [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay mit einem im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten bispezifischen F(ab')₂-Fragment (2H7 x 9.3) (Daten nicht gezeigt) belegt werden. Betrachtet man Abb. 3.17 (S. 111) so kann man bei Inkubation von PBMC mit verschiedenen Konzentrationen des bsF(ab')₂ 2H7 x 9.3 keine T-Zellproliferation nachweisen, wohingegen eine Inkubation mit dem analogen bs-scFv r2820 zu einer starken T-Zellproliferation führt.

Im Falle des r2820 scheint demnach das spezielle bispezifische *single-chain* Format dafür verantwortlich zu sein, dass dieses Molekül die Fähigkeit zur Induktion einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung besitzt.

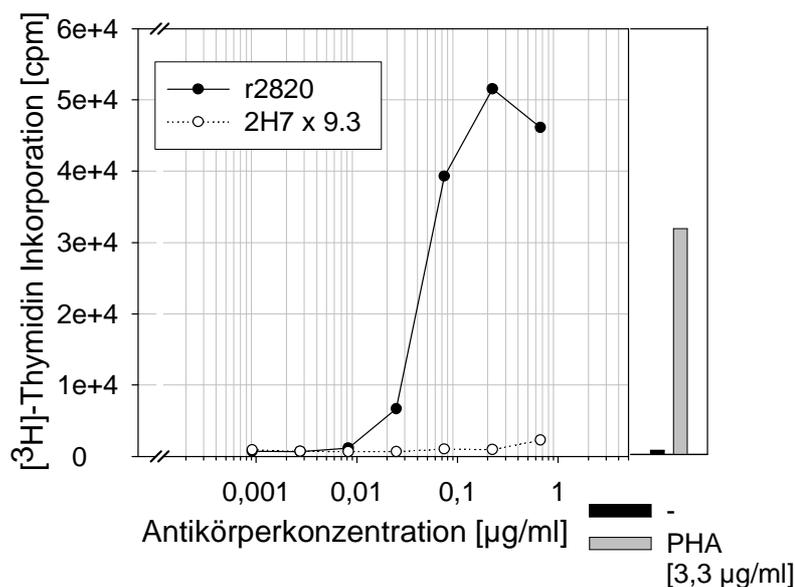


Abb. 3.17: $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der supra-agonistischen T-Zellaktivierung des r2820 und des 2H7 x 9.3

1×10^5 PBMC wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des r2820 oder des analogen bispezifischen $\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragmentes 2H7 x 9.3 für 4-Tage inkubiert und die Proliferationsrate bestimmt. Die Proliferationsfähigkeit der in der PBMC-Präparation enthaltenen T-Zellen wurde durch Inkubation mit $3,3 \mu\text{g/ml}$ des panklonalen T-Zellstimulans PHA gezeigt.

Die multimeren Form des r2820 ist effizienter bei der Vermittlung einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung

Für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r28M konnte eine unerwartete spontane Dimer-Formation beobachtet werden und es wurde gezeigt, dass das Dimer viel effizienter bei der Induzierung einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung war [Grosse-Hovest et al., 2003]. Wie in Abbildung 3.11(b) (S. 104) gezeigt, konnte auch für r2820 eine Multimerisierung beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob auch in diesem Falle die multimeren Form effektiver bei der Vermittlung einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung ist, wurden die Multimere von den Monomeren getrennt. Die Trennung erfolgte durch präparative Gelfiltration mithilfe des SMART-Systems mit einer SuperdexTM200 PC3.2/30 Gelfiltrationssäule in mehreren aufeinanderfolgenden Läufen. Die Fähigkeit der multimeren und der monomeren Form des r2820 zur Vermittlung einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung wurde anschließend in einem $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsassay untersucht.

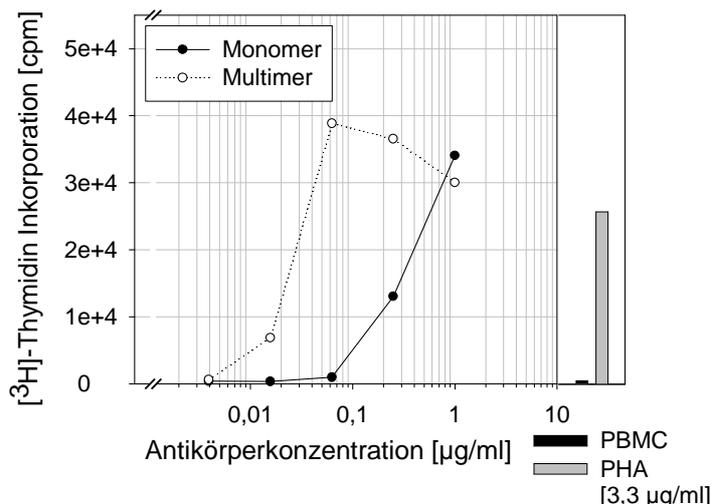


Abb. 3.18: $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der supra-agonistischen T-Zellaktivierung der monomeren und multimeren Form des r2820

1×10^5 PBMC wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der monomeren bzw. multimeren Form des r2820 für 4-Tage inkubiert und die Proliferationsrate bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Inkubation mit $3,3 \mu\text{g/ml}$ PHA.

hohen Konzentrationen erklären könnte.

r2820-induziert eine T-Zellproliferation in PBMC-Präparationen von CLL-Patienten nach Manipulation des T:CLL-B-Zell-Verhältnisses

PBMC die aus heparinisierendem Frischblut von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) isoliert werden, bestehen überwiegend aus entarteten B-Zellen (CLL-B-Zellen). Der Anteil der T-Zellen beträgt dabei in der Regel weniger als 20 %. Zusätzlich sind bei diesen T-Zellen häufig intrinsische Defekte [Kunicka und Platsoucas, 1988] oder eine unnormale Verteilung der T-Zell-Subtypen [Platsoucas et al., 1982; Totterman et al., 1989; Foon et al., 1990] zu beobachten. Daher ist es nicht verwunderlich, dass bei Inkubation solcher CLL-PBMC mit verschiedenen Konzentrationen des r2820 keine supra-agonistische T-Zellproliferation zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob Defekte der T-Zellen oder doch nur das ungünstige Effektor-:Zielzell-Verhältnis dafür verantwortlich sind, wurde das Effektor-:Zielzell-Verhältnis (T-Zell-:CLL-B-Zell-Verhältnis) artifiziell erhöht. Hierzu wurden die in der PBMC-Präparation enthaltenen T-Zellen durch positive Selektion mittels der MACS-Technik und einer Mischung aus magnetischen CD4-

Wie aus Abbildung 3.18 ersichtlich wird, ist die multimerere Form des r2820 weitaus effizienter bei der Induktion einer supra-agonistischen T-Zellproliferation als die monomere Form. Der Unterschied in der Effektivität der beiden Formen beträgt dabei etwa eine Zehnerpotenz.

Allerdings kann nicht 100%ig ausgeschlossen werden, dass die Monomer-Fraktion noch Dimerverunreinigungen enthält bzw. dass es in der monomeren Fraktion wieder zu einer Multimerisierung kommt, was die Aktivität der monomeren Fraktion bei

und CD8-Beads von den CLL-B-Zellen separiert. Die T- und CLL-B-Zell-Fractionen wurden durchflußzytometrisch mittels FACS-Analyse und R-PE-konjugierten α CD3 bzw. α CD20 Antikörpern auf ihre Reinheit getestet (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Zellen in einem definierten T-Zell:CLL-B-Zell-Verhältnis (5×10^4 , 10×10^4 bzw. 15×10^4 T-Zellen/well + 5×10^4 CLL-B-Zellen/well) für 4 Tage in An- bzw. Abwesenheit von r2820 kultiviert.

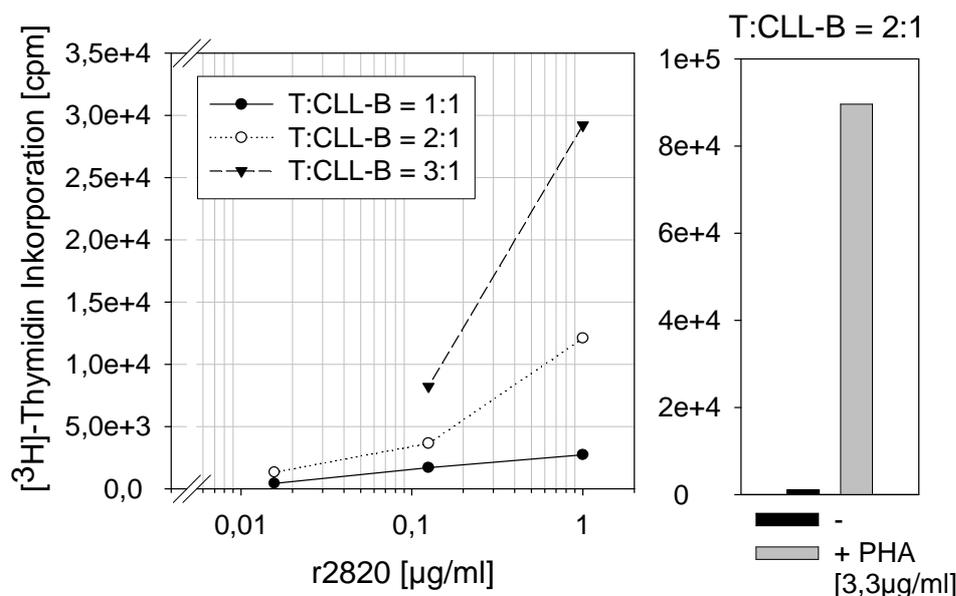


Abb. 3.19: $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsassay zur Bestimmung der r2820-induzierten supra-agonistischen T-Zellaktivierung in PBMC-Präparationen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)

T- und „CLL-B“-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation mit der MACS-Technik aus PBMC-Präparationen von CLL-Patienten separiert und in definierten T-Zell:CLL-B-Zell-Verhältnissen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des r2820 für 4-Tage inkubiert und die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt. Die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen bei einem T-Zell:B-CLL-Verhältnis von 2:1 wurde durch Inkubation mit $3,3 \mu\text{g/ml}$ des panklonalen T-Zellstimulans PHA getestet. (3:1, 2:1 und 1:1 gibt das jeweilige Verhältnis der T-Zellen zu den CLL-B-Zellen an).

Wie aus Abb. 3.19 ersichtlich wird, kann durch eine Manipulation des T-Zell:CLL-B-Zell-Verhältnisses auch mit CLL-PBMC eine r2820-induzierte T-Zellproliferation beobachtet werden. Dabei ist eine nennenswerte T-Zellproliferation erst ab einem T:CLL-B-Verhältnis von 3:1 zu beobachten.

Ein interessanter Aspekt ist in diesem Experiment die Tatsache, dass bei einer Inkubation mit PHA und einem T:CLL-B-Verhältnis von 2:1 eine T-Zellproliferation zu beobachten ist die vergleichbar mit derjenigen von PBMC gesunder Spender ist. Allerdings ist bei Inkubation „gesunder“ PBMC mit r2820 ab einer r2820-Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ eine mit der Positivkontrolle PHA vergleichbare T-Zellproliferation

zu beobachten (s. z.B. Abb. 3.13, S. 106). Im Gegensatz dazu ist die durch r2820-induzierte T-Zellproliferation bei Verwendung von CLL-PBMC selbst bei Konzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deutlich geringer als bei der PHA-Kontrolle. Möglicherweise sind dafür die bereits erwähnten intrinsischen Defekte der T-Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie verantwortlich.

r2820-induzierte Tumorzelllyse

Um die Fähigkeit des bs-scFv r2820 zur Lyse von Tumorzellen zu untersuchen, wurden PBMC in Anwesenheit von r2820 für 4 Tage unter Standardbedingungen in 6-well Platten kultiviert. Als CD20⁺ Zielzellen wurden SKW6.4 in einem definierten PBMC:SKW6.4-Verhältnis (10:1) zu den Ansätzen gegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen sorgfältig geerntet. Da sowohl die SKW6.4 als in einigen Ansätzen nach Stimulation auch die T-Zellen proliferieren, musste vor jeder FACS-Analyse die absolute Zellzahl in jedem einzelnen well bestimmt werden. Der Prozentsatz überlebender CD20⁺-Zellen in jedem well wurde durchflußzytometrisch mittels FACS-Analyse nach Inkubation mit einem R-PE-konjugierten αCD20 -Antikörper ermittelt. Bei der durchflußzytometrischen FACS-Analyse wurden jeweils 10000 Zellen detektiert. Der detektierte Prozentsatz CD20⁺ Zellen des jeweiligen wells wurde auf die Gesamtzellzahl umgerechnet, um die absolute Zellzahl CD20⁺ Zellen pro Ansatz zu erhalten. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$(\text{absolute Zellzahl CD20}^+\text{Zellen})/\text{well} = (\% \text{ CD20}^+\text{Zellen})_{\text{FACS}} * \text{Gesamtzellzahl}/\text{well}$$

Die absolute Zellzahl der verbleibenden CD20⁺ Zellen wurde anschließend nach folgender Formel ermittelt:

$$\%(\text{CD20}^+\text{Zellen})/\text{well} = \frac{(\text{absolute Zellzahl CD20}^+)/\text{well}}{(\text{absolute Zellzahl CD20}^+)_{\text{Mediumkontrolle}}} * 100$$

Bei jedem Lyseversuch wurde eine Mediumkontrolle angesetzt, die nur die Kombination PBMC plus SKW6.4 enthielt. Die absolute Zellzahl CD20⁺-Zielzellen in diesem Ansatz diente als Bezugswert (100%-Wert).

Bei den Lyseversuchen dienten als Negativkontrollen ein mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ r28M und ein mit dem zu r2820 analogen bispezifischen F(ab')₂-Fragment 2H7 x 9.3 behandelte Ansatz. Wie aus Abbildung 3.20 (S. 115) ersichtlich wird, ist r2820 in der Lage eine durchschnittliche Lyserate von ca. 50 % zu vermitteln. Bei Inkubation mit dem analogen bispezifischen F(ab')₂-Fragment 2H7 x 9.3 ist hingegen keine Ly-

se der Tumorzellen zu beobachten. Für r28M kommt es in einigen Experimenten zu einer unerwarteten Proliferation der SKW6.4.

Abbildung 3.20 zeigt die gemittelte Lyserate aus einer Anzahl von 5 Experimenten sowie die Standardabweichung der Mittelwerte.

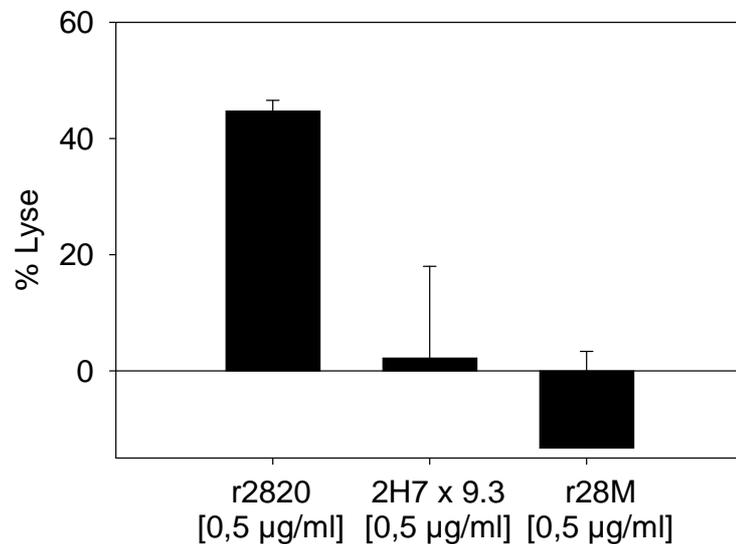


Abb. 3.20: r2820-induzierte Tumorzellyse

3×10^6 PBMC wurden mit 3×10^5 SKW6.4 in Anwesenheit von $0,5 \mu\text{g/ml}$ r2820, r28M oder 2H7 x 9.3 für 4 Tage unter Standardbedingungen in 6-well Platten kultiviert. Anschließend wurde die absolute Zellzahl pro well bestimmt, mittels durchflußzytometrischer FACS-Analyse mit einem R-PE-konjugierten α -CD20-Antikörper die relative Zellzahl verbleibender $\text{CD}20^+$ -SKW6.4 ermittelt und daraus die absolute Zellzahl berechnet.

3.3 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen CD20 x CD95-Konstrukten

Basierend auf der Beobachtung, dass bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 in der Lage sind *in vitro* in humanen CD95-sensitiven, zielantigen-positiven Lymphomzellen (SKW6.4) Apoptose zu induzieren [Jung et al., 2001], wurden in dieser Arbeit verschiedene bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 näher charakterisiert. Zusätzlich wurde die Fähigkeit solcher Konstrukte eine CD95-induzierte Apoptose zu vermitteln nicht nur auf der CD95-sensitiven B-Lymphomzelllinie SKW6.4, sondern auch auf verschiedenen weniger CD95-sensitiven B-Lymphomzelllinien untersucht.

Desweiteren sollte eine sensitivierende Substanzen ausfindig gemacht werden, welche in der Lage ist, durch Kombination mit einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment mit Spezifität CD20 x CD95 einen synergistischen Effekt auf die CD95-induzierte Apoptose zu vermitteln.

Um die durch bispezifische F(ab')₂-Fragmente induzierte Tumorzell-Eliminierung erstmalig auch *in vivo* bewerten zu können, wurde außerdem ein geeignetes präklinisches Tiermodell etabliert und Immuntherapieversuche durchgeführt.

3.3.1 Herstellung bs F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 am Beispiel des Rit x APO-1

Im folgenden Abschnitt wird die Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente mittels chemischer Hybridisierung und die Proteincharakterisierung am Beispiel des Rit x APO-1 erläutert, wohingegen auf die Herstellung der anderen bispezifischen F(ab')₂-Fragmente mit CD20 x APO-1-Spezifität nicht näher eingegangen werden soll.

Produktion der monoklonalen Ausgangsantikörper

Vor der Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente musste zuerst der benötigte APO-1-Antikörper aus Hybridomkulturüberständen durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose aufgereinigt werden. Die Produktionsrate der an serumfreies Hybridommedium adaptierten Hybridome pro Liter Hybridomüberstand betrug durchschnittlich 15-20 mg.

Als Ausgangsantikörper für die zweite für die Hybridisierung verwendete Spezifität

wurden verschiedene kommerziell erhältliche α CD20-Antikörper (Rituxan, B-H20, MEM97), sowie der aus Zellkulturüberstand transfizierter Sp2/0-Ag14-Zellen, mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigte α CD20-Antikörper 2H7 (s. Abschnitt 3.1, S. 93) verwendet.

Die Reinheit dieser Antikörper wurde jeweils mittels SDS-PAGE und analytischer Gelfiltration überprüft und das Bindungsverhalten durchflußzytometrisch mittels FACS-Analyse bestimmt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Funktionalität des APO-1-Antikörpers durch Bestimmung der CD95-vermittelten Lyse Fas-sensitiver SKW6.4 nach Kreuzvernetzung mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper in einem WST-1-Zellviabilitätsassays getestet (Daten nicht gezeigt).

Verdau der monoklonalen Ausgangsantikörper APO-1 und Rituxan mit anschließender Reduktion und Modifikation zu Fab'-TNB-Fragmenten

Für die präparative Proteolyse der monoklonalen Antikörper wurden 5-10 mg gereinigter Antikörper eingesetzt. Im Anschluß an die Hydrolyse folgte eine Spaltung der Disulfidbrücken in der *hinge*-Region der entstandenen $F(ab')_2$ -Fragmente und eine Einführung der TNB^{2-} -Schutzgruppen. Die daraus resultierenden Fab'-TNB-Fragmente wurden mittels präparativer Gelfiltration von unverdauten, intakten Antikörpern, nicht-reduzierten $F(ab')_2$ -Fragmenten und freiem DTNB/ TNB^{2-} bzw. DTT getrennt.

Wie aus Abbildung 3.21 (S. 118) ersichtlich wird, war der Pepsin-Verdau, sowie die Reduktion und Modifikation der beiden Antikörper unter den gegebenen Bedingungen (4h, 37°C, 1:30 Pepsin) erfolgreich. Es sind weder eine nennenswerte Menge an unverdautem Antikörper noch nicht-reduzierte $F(ab')_2$ -Fragmente zu erkennen. Die Fab'-TNB-Fragmente waren bei der präparativen Gelfiltration des APO-1 in den Fraktionen 19-24, bei Rituxan in den Fraktionen 20-26 enthalten. Diese Fraktionen wurden jeweils gepoolt, gegebenenfalls konzentriert und für die Hybridisierung weiter verwendet.

Aus den Gelfiltrationsprofilen lässt sich auch erkennen, dass die Rituxan-Fab'-TNB-Fragmente etwas kleiner als die APO-1-Fab'-TNB-Fragmente zu sein scheinen, da sie länger auf der Gelfiltrationssäule verweilen und erst bei höheren Fraktionsnummern eluiert werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass es sich bei den beiden Antikörpern um Antikörper aus unterschiedlichen Spezies und mit unterschiedlichen Isotypen handelt. Rituxan ist ein chimärisierter IgG1-Antikörper, wohingegen der APO-1 ein Maus-Antikörper mit Isotyp IgG2a ist. Wahrscheinlich sind die Proteaseschnittstellen für das Pepsin nicht ganz identisch, was in unterschiedlich großen

Fab'-Fragmenten resultiert.

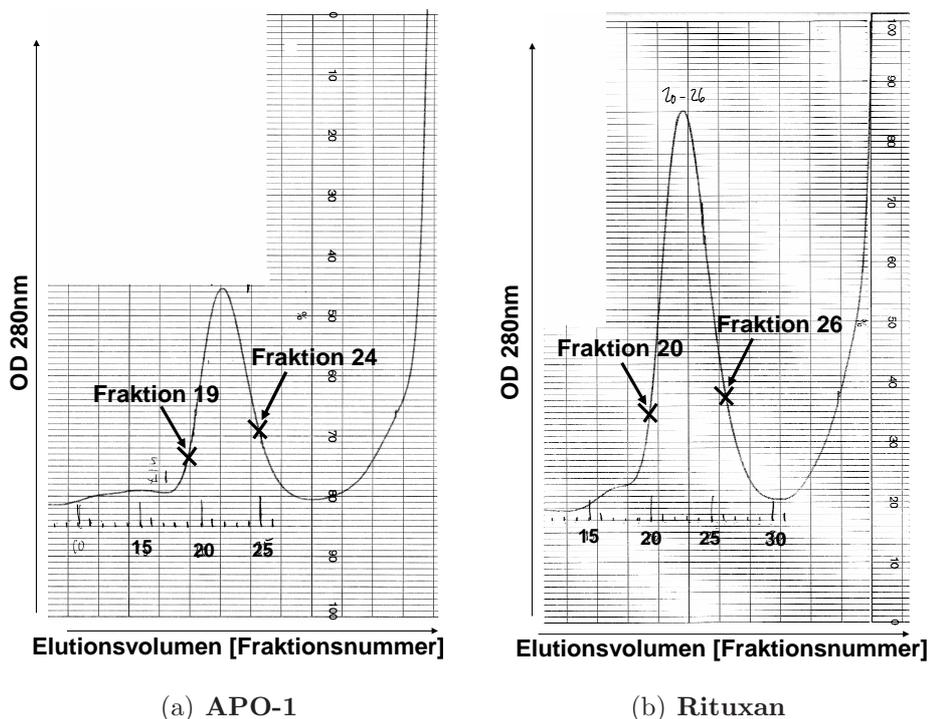


Abb. 3.21: Gelfiltrationschromatogramme von APO-1 und Rituxan nach proteolytischem Pepsin-Verdau

Die monoklonalen Antikörper APO-1 und Rituxan wurden für 4h bei 37% mit Pepsin (1:30) verdaut und anschließend mit DTT und DTNB reduziert und modifiziert. Die präparative Reinigung der entstandenen Fab'-TNB-Fragmente erfolgte mittels präparativer Gelfiltration.

Hybridisierung des APO-1-Fab'-TNB mit dem Rituxan-Fab'-TNB zum F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1

Um zwei Fab'-TNB-Fragmente hybridisieren zu können, muss zunächst ein Hybridisierungspartner reduziert werden. Zur Vermeidung der Entstehung von APO-1-Homodimeren, die zu einer nicht Zielantigen-restringierten Lyse von CD95-sensitiven Zellen führen könnten, wurden die Rituxan-Fab'-TNB-Fragmente reduziert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der Rituxan-Fab'-SH-Fragmente mit einer äquimolaren Menge der APO-1-Fab'-TNB-Fragmente zum bispezifischen F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1. Die Trennung der bispezifischen F(ab')₂-Fragmente von nicht-hybridisierten Fab'-Fragmenten erfolgte wiederum durch eine präparative Gelfiltration.

Das Gelfiltrationsprofil (s. Abb. 3.22, S. 119) zeigt eine erfolgreiche Hybridisierung. Auch wenn noch nicht-hybridisierte Fab'-Fragmente vorhanden sind (Peak bei den Fraktionen 21-26), so ist die Hybridisierungseffizienz doch zufriedenstellend. Die Fraktionen 10-18 enthielten das F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1. Diese Fraktionen

wurden gepoolt, mittels eines 15 kDa Centricons konzentriert, die Konzentration bestimmt und mit einem 0,22 μm Spritzenfilter sterilfiltriert.

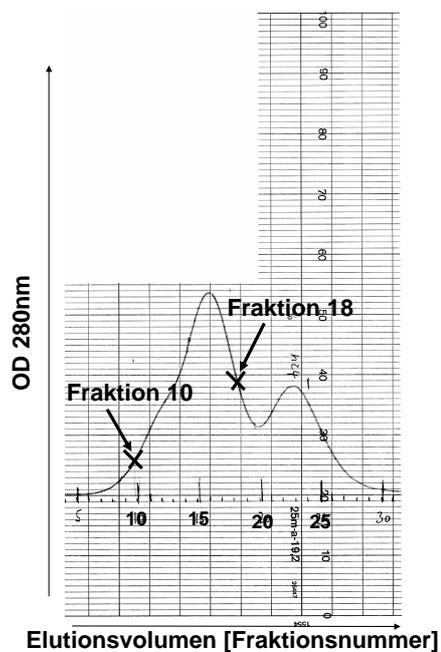


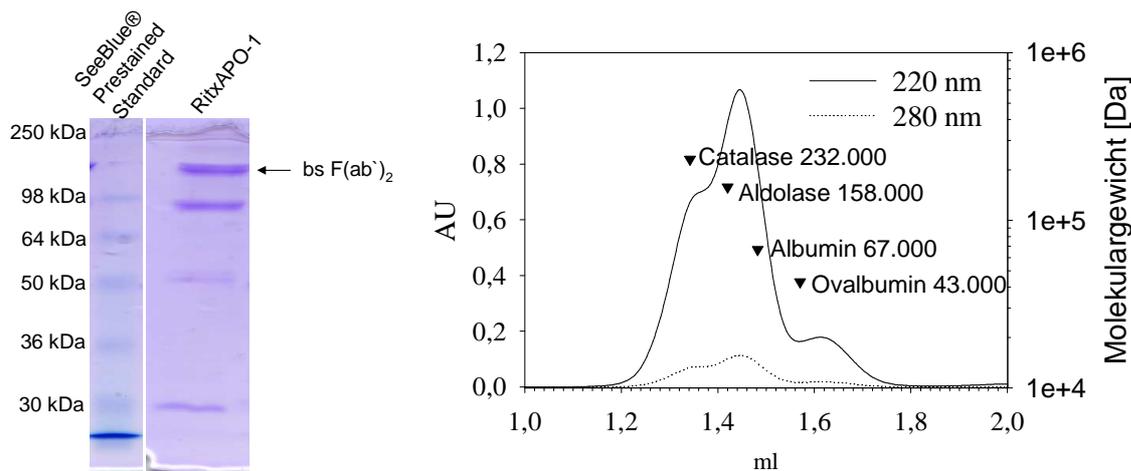
Abb. 3.22: Gelfiltrationsprofil der Hybridisierung des bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmentes Rit x APO-1

Zur Herstellung des bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmentes Rit x APO-1 wurde eine äquimolare Menge an Rituxan-Fab'-SH-Fragmenten mit APO-1-Fab'-TNB-Fragmenten hybridisiert. Die entstandenen bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmente wurden mittels präparativer Gelfiltration von nicht-hybridisierten Fab'-Fragmenten getrennt.

3.3.2 Analytische Evaluierung des $F(ab')_2$ -Fragmentes Rit x APO-1

Reinheitsanalyse des $F(ab')_2$ -Fragmentes RitxAPO-1

Das bispezifische $F(ab')_2$ -Fragment Rit x APO-1 wurde zur Überprüfung der Reinheit mittels SDS-PAGE und analytischer Gelfiltrationschromatographie analysiert (s. Abb. 3.23, S. 120).



(a) SDS-PAGE-Analyse

5 μg Rit x APO-1 wurden mittels 10%-SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente der SeeBlue®Pre-Stained Standard.

(b) Analytisches Gelfiltrationsprofil

50 μl des Rit x APO-1 wurden auf eine analytische Superdex 200 PC3.2/30 Säule bei einer Flußrate von 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgetragen. Die Detektion des Durchlaufes erfolgte bei 280 nm. Als Standardwerte für die Molmassen dienten Proteine mit genau definiertem Molekulargewicht (schwarze Dreiecke).

Abb. 3.23: Analytische Charakterisierung des bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmentes Rit x APO-1 mittels SDS-PAGE-Analyse und analytischer Gelfiltration

Bei der SDS-PAGE-Analyse (s. Abb. 3.23(a)) unter nicht-reduzierenden Bedingungen erscheint das $bsF(ab')_2$ -Fragment Rit x APO-1 als apparente Bande bei einem Molekulargewicht von ungefähr 110 kDa was auch dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht des $F(ab')_2$ -Fragmentes Rit x APO-1 entspricht. Außerdem sind noch weitere Banden bei etwa 98 kDa, 50 kDa und 30 kDa zu erkennen. Die Bande bei 98 kDa könnte auf $bsF(ab')_2$ -Fragmente zurückzuführen sein, die eine leichte Kette verloren haben. Diese leichten Ketten werden durch die Bande repräsentiert die bei etwa 30 kDa liegt. Bei der sehr schwachen Bande um 50 kDa handelt es sich höchstwahrscheinlich um geringe Mengen an Fab' -Fragmenten. Diese Fab' -Verunreinigungen können entweder von einem weniger stringenten Sammeln der $F(ab')_2$ -Fraktionen während der Hybridisierung, oder aber durch einen Zerfall der $bsF(ab')_2$ -Fragmente herrühren.

Um diese Vermutung zu belegen, wurde zusätzlich eine SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In diesem Falle konnten nur leichte bzw. trunkierte schwere Ketten detektiert werden. Daraus läßt sich schließen, dass das $F(ab')_2$ -Fragment nur aus einem Vielfachen dieser leichten und schweren Ketten aufgebaut sein kann und frei von den Fc-Teilen der intakten Antikörper ist.

Über die Gründe warum einige der $F(ab')_2$ -Fragmente auch unter nicht-

reduzierenden Bedingungen eine leichte Kette verlieren kann hier nur spekuliert werden. Ein möglicher Grund sind die denaturierenden Bedingungen bei der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE.

Wie aus dem Gelfiltrationsprofil zu erkennen ist (s. Abb. 3.23(b), S. 120), wird das Rit x APO-1 bsF(ab')₂ bei einem Elutionsvolumen von etwa 1,5 ml eluiert, was seinem erwarteten Molekulargewicht von ca. 110 kDa entspricht. Auf dem Elutionsprofil ist ein zweiter kleiner Peak bei einem Elutionsvolumen von etwa 1,6 ml zu erkennen. Dieser Peak könnte F(ab')-Fragmente repräsentieren, die in der SDS-PAGE-Analyse als Bande bei etwa 50 kDa zu erkennen sind.

Bindungsanalyse des F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1

Um das Bindungsverhalten der beiden im bsF(ab')₂ Rit x APO-1 enthaltenen Spezifitäten zu untersuchen, wurde eine durchflußzytometrische FACS-Analyse auf CD95⁺,CD20⁻-Jurkat Zellen (s. Abb. 3.24(a)) und CD20⁺, CD95⁻ PBMC von CLL-Patienten (CLL-PBMC) (s. Abb. 3.24(b)) durchgeführt.

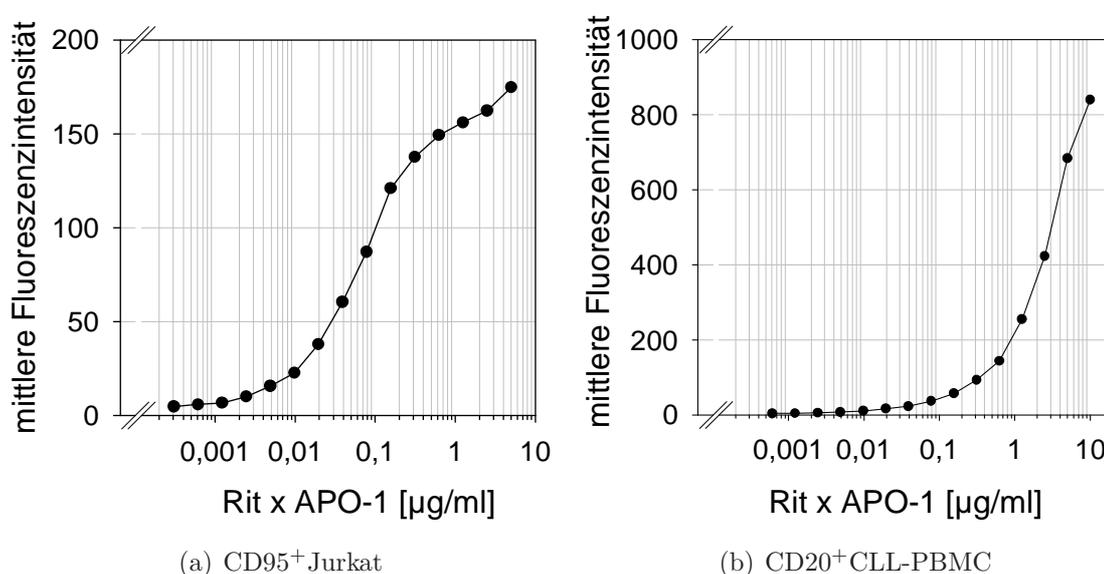


Abb. 3.24: Durchflußzytometrische FACS-Analyse zur Bestimmung des Bindungsverhaltens des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1 auf Zielantigen-positiven Zellen

Das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 wurde auf CD95⁺Jurkat und CD20⁺CLL-PBMC titriert. Der Bindungsnachweis erfolgte mittels eines R-PE-konjugierten Ziege- α -Maus F(ab')₂-Antikörpers.

Aus Abb. 3.24 wird ersichtlich, dass die Bindungsaffinität des APO-1-Teils des bs F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1 eine viel höhere Bindungsaffinität zu seinem Ziel-

antigen aufweist als der Rituxan-Teil. Die Sättigungsschwelle liegt bei Titration des Rit x APO-1 auf CD95⁺-Jurkat bei einer Konzentration von etwa 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, wohingegen bei der Titration auf CD20⁺-CLL-PBMC selbst bei Antikörperkonzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keine Sättigung erreicht werden kann. Die höhere Affinität des APO-1-Antikörpers zur Bindung an sein Zielantigen im Vergleich zu Rituxan, konnte auch bei Titration der intakten Ausgangsantikörper (APO1 und Rituxan) auf Zielantigen-positiven Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Funktionelle Evaluierung der CD20 x CD95-Konstrukte *in vitro*

Im folgenden Abschnitt sollten die CD20 x CD95-Konstrukte *in vitro* evaluiert werden. Hierbei wurde zwischen zwei verschiedenen Modellen unterschieden: Das „sensitive Lymphommodell mit SKW6.4“ und das „insensitivere Lymphommodell“ mit Raji, Daudi, C1R, BJAB und JY.

Direkte anti-Tumor Aktivität der CD20 x CD95-Konstrukte im „sensitiven Lymphommodell“ mit SKW6.4

CD20 x CD95-Konstrukte sind in der Lage *in vitro* eine sehr effiziente Tumorzellyse von SKW6.4 zu vermitteln

Zur Untersuchung der Fähigkeit des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1 *in vitro* eine CD95-induzierte Lyse CD20-positiver, CD95-sensitiver Tumorzellen (SKW6.4) zu vermitteln, wurde ein WST-1-Zellviabilitätstest durchgeführt.

Desweiteren sollte die Fähigkeit des Rit x APO-1 zur Lyse CD95-sensitiver, CD20-positiver Tumorzellen mit drei weiteren bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten mit Spezifität CD20 x CD95 verglichen werden. Als Ausgangsantikörper für diese Konstrukte diene ebenfalls der αCD95 -Antikörper APO-1, wohingegen als Ausgangsantikörper für die CD20-Spezifität verschiedene αCD20 -Antikörper (2H7, MEM97 und B-H20) verwendet wurden.

Aus Abb. 3.25 (S. 123) wird deutlich, dass das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 *in vitro* ab einer Konzentration von etwa 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine nahezu vollständige Lyse der Tumorzellen vermitteln kann. Vergleicht man die Effektivität des Rit x APO-1 mit der des MEM97 x APO-1 und der des 2H7 x APO-1, so zeigt sich, dass die Titrationskurven sehr ähnlich sind. Die Titrationskurve des B-H20 x APO-1 jedoch erreicht schon bei einer Konzentration von etwa 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ die Sättigungsschwelle. Es scheint dass dieses Konstrukt etwas effizienter in der Vermittlung der CD95-induzierten Tumorzellyse ist. Möglicherweise ist dieser geringe Unterschied aber

auch einfach nur auf Ungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung zurückzuführen.

Die Sensitivität von Tumorzelllinien kann, abhängig von geringfügigen Schwankungen bei den Kulturbedingungen und dem momentanen Zustand der Zellen, gewissen Schwankungen unterliegen. Als interne Kontrolle für die CD95-Sensitivität der Zielzellen diente daher in jedem Versuch ein Ansatz mit dem quervernetzten APO-1. Da die Verfügbarkeit der α CD20-Antikörper in ausreichenden Mengen limitierend war, wurde das Rit x APO-1 für die weiteren Versuche verwendet.

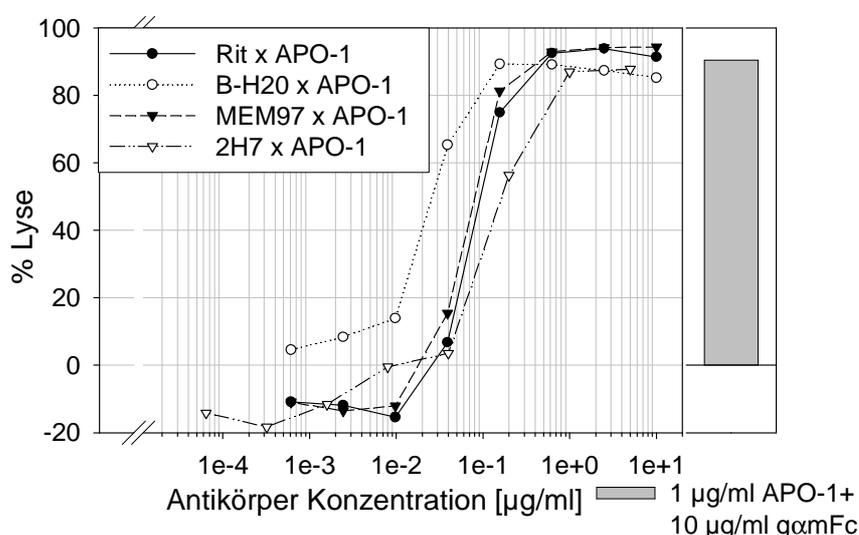


Abb. 3.25: Induktion der Tumorzellyse durch verschiedene bispezifische CD20 x APO-1-F(ab')₂-Fragmente im sensitiven Lymphommodell mit SKW6.4

5x10⁴ SKW6.4 wurden für 24h in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der CD20 x CD95-Konstrukte Rit x APO-1, MEM97 x APO-1, B-H20 x APO-1 und 2H7 x APO-1 inkubiert. Die Bestimmung der Anzahl viableler Zellen erfolgte durch Zugabe des Farbstoffes WST-1 und Messung des Farbumsatzes im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die durch Rit x APO-1 induzierte Tumorzellyse erfordert Bispezifität

Die durch den Todesrezeptor CD95-induzierte Kaskade die letztendlich zur Apoptose der Zelle führt, benötigt als initiales Ereignis eine Multimerisierung des CD95-Rezeptors. Um zu beweisen, dass Rit x APO-1 im bispezifischen Format, nicht aber die Fab'-Fragmente oder ein äquimolarer Mix der beiden in der Lage ist eine CD95-induzierte Tumorzellyse zu vermitteln, wurde ein WST-1-Zellviabilitätstest mit CD95-sensitiven SKW6.4 durchgeführt.

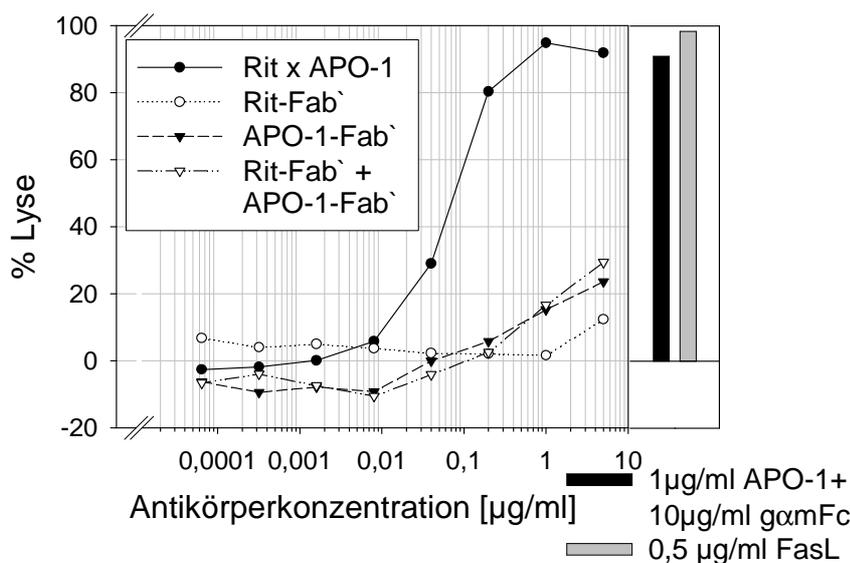


Abb. 3.26: Erfordernis der Bispezifität

5×10^4 SKW6.4 wurden für 24h in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Rit x APO-1, der im bispezifischen Konstrukt enthaltenen Fab'-Fragmente (Rit-Fab' bzw. APO-1-Fab') oder einer äquimolaren Mischung der Fab'-Fragmente (Fab'-Mix) inkubiert. Als Kontrolle für die CD95-Sensitivität der SKW6.4 dienten der kreuzvernetzte APO-1 sowie der Fas-Ligand (FasL). Die Bestimmung der Anzahl viable Zellen erfolgte durch einen WST-1-Zellviabilitätstest.

Wie aus Abb. 3.26 ersichtlich wird, führt eine Inkubation der SKW6.4 mit dem bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragment Rit x APO-1 zu einer konzentrationsabhängigen Tumorzelllyse, die bei einer Konzentration ab $0,5 \mu\text{g/ml}$ annähernd bei 100% liegt. Betrachtet man die Titrationskurve des Rit-Fab', so zeigt sich, dass es selbst bei hohen Konzentrationen nicht in der Lage ist eine Tumorzelllyse zu vermitteln. Bei Titration des APO-1-Fab' hingegen läßt sich bei höheren Konzentrationen eine schwache Tumorzelllyse (ca. 25-30%) beobachten. Dasselbe gilt für einen Mix der beiden Fab'-Fragmente. Dieser Effekt läßt sich dadurch erklären, dass höchstwahrscheinlich in der APO-1-Fab'-Präparation APO-1- $F(ab')_2$ -Fragment-Verunreinigungen enthalten sind. Solche Homodimer-Verunreinigungen sind unerwünscht, lassen sich jedoch selbst durch ein sehr stringentes Poolen der einzelnen Fraktionen nach der präparativen Gelfiltration nicht immer vermeiden.

Die durch Rit x APO-1 induzierte Tumorzelllyse ist abhängig vom Vorhandensein beider Zielantigene

Um sicherzustellen, dass das bispezifische $F(ab')_2$ -Fragment Rit x APO-1 nur dann in der Lage ist eine CD95-induzierte Tumorzelllyse zu vermitteln wenn beide im Molekül enthaltenen Spezifitäten an ihr Zielantigen binden, wurden CD95-sensitive, CD20-negative Zellen der T-Lymphomzelllinie Jurkat mit $1 \mu\text{g/ml}$ Rit x APO-1

inkubiert. Die Lyserate wurde nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit mittels eines WST-1-Zellviabilitätsassays bestimmt.

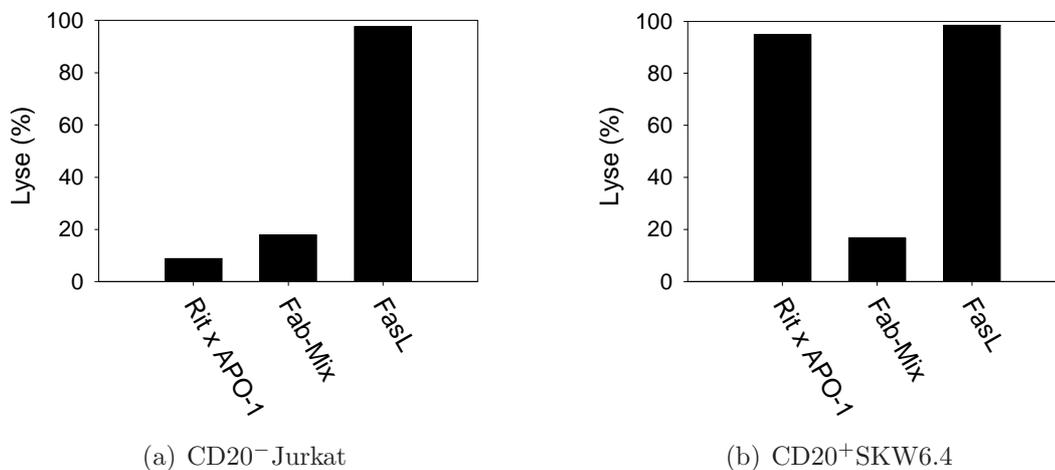


Abb. 3.27: Abhängigkeit vom Vorhandensein beider Zielantigene bei der Rit x APO-1 induzierten Tumorzelllyse

CD20⁻, CD95-sensitive Jurkat bzw. CD20⁺, CD95-sensitive SKW6.4 wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1 oder einer äquimolaren Mischung der Fab'-Fragmente inkubiert. Als Kontrolle für die CD95-Sensitivität diente der Fas-Ligand (FasL). Die Ermittlung der Tumorzelllyse erfolgte mithilfe eines WST-1-Zellviabilitätstests.

Wie aus Abb. 3.27(a) ersichtlich wird, ist Rit x APO-1 nicht in der Lage eine CD95-induzierte Tumorzelllyse CD20⁻-Jurkat-Zellen zu vermitteln, wohingegen die CD20⁺-B-Lymphomzellen SKW6.4 durch die selbe Rit x APO-1-Konzentration fast vollständig lysiert werden (s. Abb. 3.27(b)).

Um auszuschließen, dass eine unterschiedliche Sensitivität der Zellen für CD95-induzierte Apoptose der Grund für diese Resultate ist, diente ein Ansatz mit 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des natürlichen CD95-Liganden FasL (Fas-Ligand). Abb. 3.27 zeigt, dass die CD95-Sensitivität beider Zelllinien identisch ist. Für die Fähigkeit des Rit x APO-1 eine CD95-induzierte Apoptose zu vermitteln ist das Vorhandensein beider Zielantigene daher essentiell.

Abb. 3.27 zeigt außerdem durch den Gebrauch einer äquimolaren Mischung der Fab'-Fragmente (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rit-Fab' + 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APO-1-Fab') als Kontrollansatz, noch einmal die Erfordernis der Bispezifität.

Direkte anti-Tumor Aktivität der CD20 x CD95-Konstrukte im „insensitiveren Lymphommodell“ mit Raji, Daudi, C1R, BJAB und JY

Die hohe CD95-Sensitivität der SKW6.4 stellt eine besonders günstige Situation dar, die der klinischen Situation jedoch nicht sehr nahe kommt. Daher sollte die Fähigkeit des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1 zur Vermittlung CD95-induzierter Tumorzelllyse mithilfe CD95-insensitiverer B-Lymphomzellen überprüft werden.

Rit x APO-1 induziert eine Tumorzelllyse auch in CD95-insensitiveren B-Lymphomzelllinien

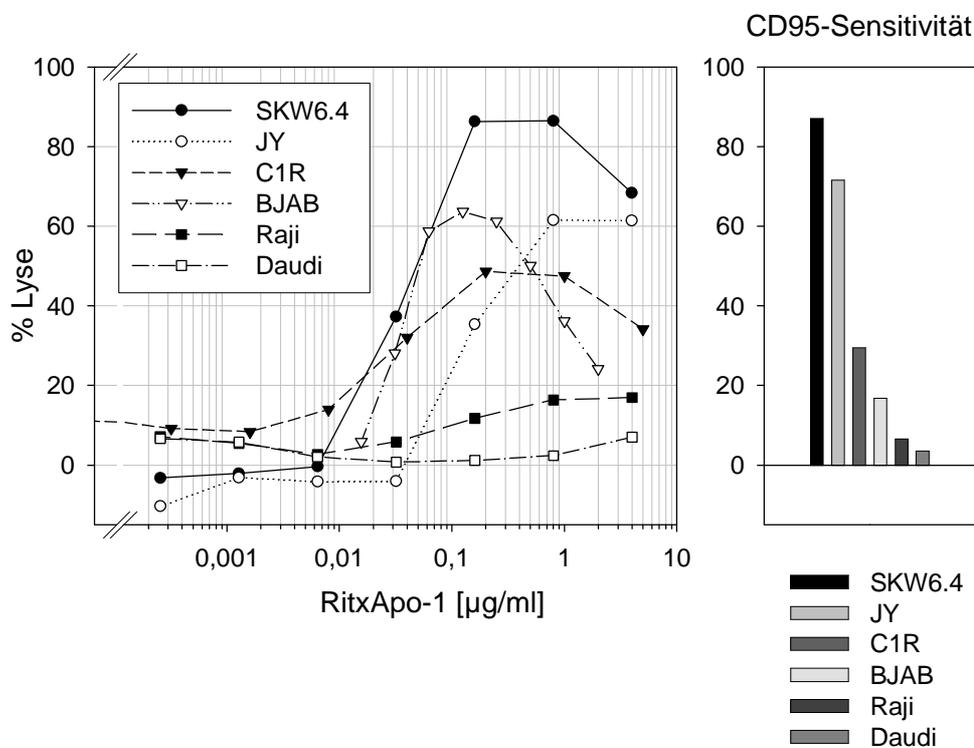


Abb. 3.28: Rit x APO-1-induzierte Tumorzelllyse verschiedener humaner B-Lymphomzelllinien

Das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 wurde auf verschiedenen CD20⁺Tumorzelllinien titriert und die Tumorzelllyse nach 24-stündiger Inkubation mittels eines WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt die CD95-Sensitivität der einzelnen Zelllinien.

Abb. 3.28 zeigt eine Titration des Rit x APO-1 auf verschiedenen B-Lymphomzelllinien. Als Kontrolle für die CD95-Sensitivität diente je ein Ansatz mit dem quervernetzten APO-1 (1 µg/ml des APO-1-IgG2a wurde dabei mit 10 µg/ml eines Ziege-α-Maus-F(ab')₂-Antikörper kreuzvernetzt). Das in Abb. 3.28

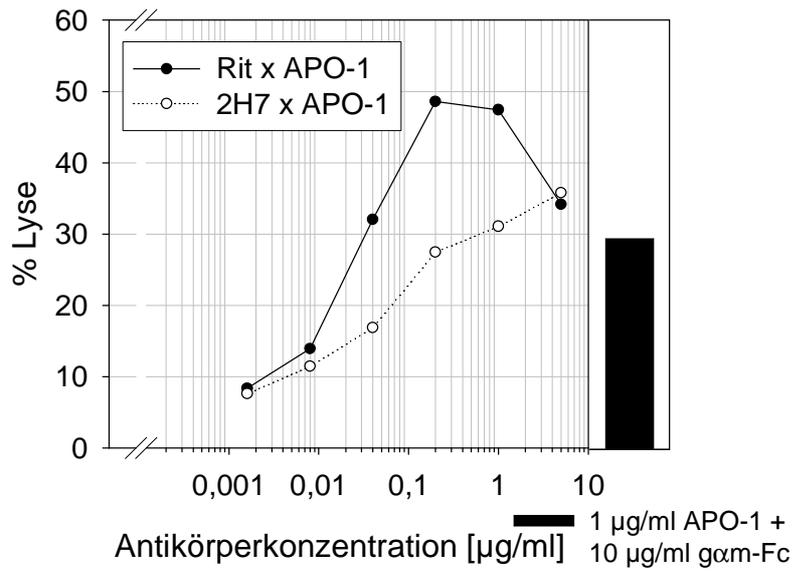
auf der rechten Seite dargestellte Balkendiagramm zeigt die CD95-Sensitivität der verschiedenen Zelllinien. Um einen direkten Vergleich zum „sensitiven Modell“ zu haben, ist die durch Rit x APO-1 induzierte Zellyse CD95-sensitiver SKW6.4 in Abb. 3.28 mit eingeschlossen. Betrachtet man die CD95-Sensitivität so bekommt man folgende Abstufung SKW6.4 > JY > C1R > BJAB > Raji > Daudi.

Die durch Rit x APO-1 induzierte Tumorzellyse variiert sehr stark zwischen den einzelnen Zelllinien. So ist das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 nicht in der Lage, eine CD95-induzierte Tumorzellyse der B-Lymphomlinie Daudi zu vermitteln. Dies ist sehr schön mit der Tatsache in Einklang zu bringen, dass Daudi-Zellen von allen getesteten Zelllinien die am wenigsten sensitiven für eine CD95-induzierte Apoptose sind. In der CD95-Resistenz unterscheiden sich die Daudi-Zellen nur sehr wenig von den ebenfalls CD95-resistenten Raji-Zellen. Auch diese zeigen nur eine sehr geringe Tumorzellyserate nach Inkubation mit Rit x APO-1. Rit x APO-1 kann in BJAB- und JY-Zellen eine maximale Zellyse von etwa 65 % induzieren. Interessanterweise ist das Maximum der Zellyse bei BJAB-Zellen bereits bei Antikörperkonzentrationen von 0,15 µg/ml erreicht, wohingegen bei JY-Zellen eine fast 10-fach höhere Antikörperkonzentration zum Erreichen der maximalen Lyse erforderlich ist. Die maximale Lyse bei C1R-Zellen liegt bei etwa 50 % und wird bei einer Rit x APO-1-Konzentration von etwa 0,2 µg/ml erreicht.

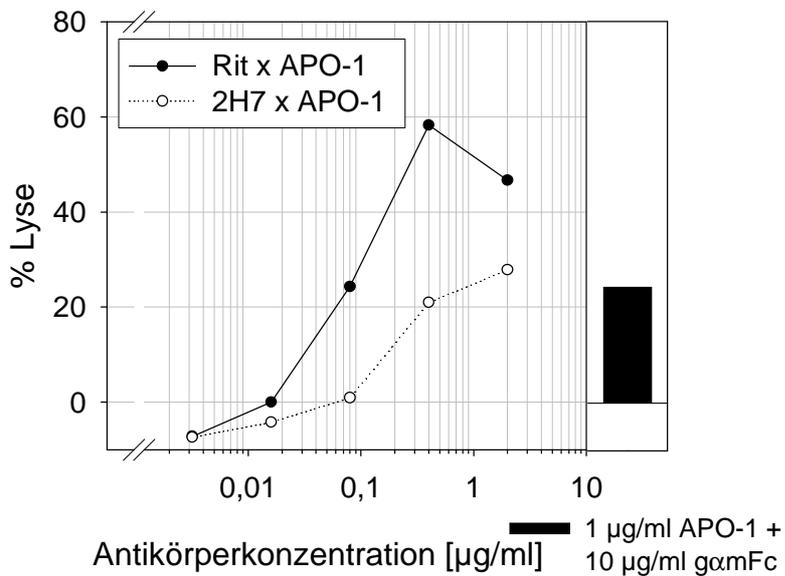
Rit x APO-1 und 2H7 x APO-1 induzieren eine unterschiedlich starke Tumorzellyse in CD95-insensitiveren B-Lymphomzelllinien

Im sensitiven Lymphommodell mit SKW6.4 konnten für die verschiedenen CD20 x CD95-Konstrukte nur äußerst geringe Unterschiede bei der Vermittlung einer CD95-induzierten Tumorzellyse beobachtet werden. Inkubiert man jedoch Zellen der B-Lymphomzelllinien C1R und BJAB in einem Standard-WST-1-Zellviabilitätstest für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Rit x APO-1 bzw. 2H7 x APO-1, so lassen sich deutliche Unterschiede bei der durch die beiden verschiedenen bispezifischen F(ab')₂-Fragmente vermittelten Tumorzellyse beobachten (s. Abb. 3.29, S. 128).

Bei beiden Zelllinien ist das Rit x APO-1 bei geringeren Konzentrationen deutlich effizienter und auch die maximal erreichbare Lyserate ist größer als bei Inkubation mit 2H7 x APO-1. Das Rit x APO-1 erreicht bei C1R-Zellen bei 0,2 µg/ml die Sättigung (ca. 50 % Tumorzellyse). Bei den BJAB-Zellen wird eine Sättigung bei ca. 0,3 µg/ml erreicht und die maximale Lyserate beträgt 60 %. Für das 2H7 x APO-1 kann auf C1R-Zellen selbst bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml keine Sättigung erreicht werden und auch auf den BJAB-Zellen ist bei einer 2H7 x APO-1-Konzentration von 2 µg/ml noch keine Sättigung zu beobachten.



(a) C1R



(b) BJAB

Abb. 3.29: Vergleich der durch Rit x APO-1 bzw. 2H7 x APO-1 induzierten Tumorzelllyse im „insensitiveren“ Lymphommodell

C1R bzw. BJAB-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der bispezifischen F(ab')₂-Fragmente Rit x APO-1 bzw. 2H7 x APO-1 für 24h inkubiert und die Tumorzelllyse mittels eines WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt.

Evaluierung der Kombination eines Apoptose-Sensitivierers mit dem F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1

Wie aus Abb. 3.28 (S. 126) ersichtlich wird, unterscheiden sich B-Lymphomzelllinien stark in ihrer CD95-Sensitivität. Eine hohe CD95-Sensitivität wie sie bei SKW6.4 zu beobachten ist, ist in einer klinischen Situation eher unwahrscheinlich. Umso mehr macht dies den Einsatz eines Apoptose-sensitivierenden Reagenz erforderlich. In dieser Arbeit sollte ein solcher Apoptose-Sensitivierer ausfindig gemacht werden, mit dem Ziel, die Tumorzellen für eine CD95-induzierte Tumorzelllyse durch das F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 zu sensitivieren und einen synergistischen Effekt auf die Apoptoseinduktion zu erreichen.

Vor Einsatz eines sensitivierenden Agens musste zuerst dessen Toxizitätsschwelle ermittelt werden. Dafür wurde der Sensitivierer in verschiedenen Konzentrationen mit den Tumorzellen inkubiert und die Toxizität mit Hilfe eines WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt. Für die Kombinationsversuche mit dem Rit x APO-1 wurde diejenige Konzentration des sensitivierenden Agens gewählt, bei der die Toxizität des Sensitivierers nicht höher als 10 % lag (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluß der Kombination der verschiedenen Sensitivierer mit dem F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 auf die Apoptoseinduktion der verschiedenen Tumorzellen zu untersuchen, wurde das Rit x APO-1-Konstrukt auf den Tumorzellen in An- bzw. Abwesenheit des Sensitivierers titriert und die Lyserate mithilfe eines WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt. Um eine Aussage über den Effekt des Sensitivierers machen zu können, wurden die Titrationskurven mit und ohne sensitivierendes Agens verglichen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.30 (S. 130) zeigt die getesteten Kombinationen verschiedener sensitivierender Agenzien in Kombination mit Rit x APO-1. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen des jeweiligen Sensitivierers auf den verschiedenen B-Lymphomzelllinien Raji, BJAB, JY und C1R und die entsprechende Literatur.

Obwohl in der Literatur viel über Apoptose-sensitivierende Agenzien beschrieben ist, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit für keines der getesteten Reagenzien ein nennenswerter Sensitivierungseffekt nachweisen.

Abb. 3.30: Getestete Apoptose-Sensitivierer in Kombination mit RitxAPO-1

Sensitivierer <i>Wirkstoffklasse</i>	Zelllinie				Literatur
	Raji	BJAB	JY	C1R	
Acetylsalicylsäure <i>Prostaglandinsynthese- hemmer</i>	10 mM 1 mM 0,25 mM	10 mM 1 mM 0,25 mM	0,125 mM 0,25 mM -	- - -	[Kutuk und Basaga, 2004]
Bortezomib <i>Proteasominhibitor</i>	0,005 µg/ml 1 ng/ml -	2,5 ng/ml 1 ng/ml 0,1 ng/ml	- - -	- - -	[Kabore et al., 2006]
Cycloheximid <i>Alkylantien</i>	5 µg/ml 1 µg/ml 8 ng/ml	10 ng/ml 8,3 ng/ml -	1,25 ng/ml 2,5 ng/ml -	8 ng/ml - -	[Fulda et al., 2000]
Dexamethasone <i>Steroidhormon</i>	- -	100 µg/ml 250 µg/ml	- -	100 µg/ml -	[Rose et al., 2002]
Doxorubicin <i>Interkalantien</i>	0,5 µg/ml 1 µg/ml	- -	- -	- -	Teil der CHOP-Therapie
ErCP3 <i>Alkylphosphocholin</i>	-	10 µM	-	-	[Zaharieva et al., 2007]
LY294002 <i>PI3-Kinase-Inhibitor</i>	10 µM 20 µM	2 µM -	1 µM -	- -	[Suzuki et al., 2007]
Resveratrol <i>Polyphenol</i>	20 µM 10 µM	20 µM 10 µM	1,25 µ 2,5 µM	- -	[Jazirehi und Bonavida, 2004] [Clement et al., 1998]
Rituxan <i>Antikörper</i>	20 µg/ml	-	-	-	[Vega et al., 2005]
Staurosporine <i>Proteinkinaseinhibitor</i>	0,2 µM	0,1 µM	0,03 µM	0,01 µM	[Wilson et al., 2000]
Teniposid <i>TopoisomeraseII-Inhibitor</i>	-	5 ng/ml	-	-	
TLCK <i>Serin-Protease- Inhibitor</i>	0,25 mM 0,05 mM 0,1 mM 0,01 mM	0,1 mM 50 µM - -	- - - -	- - - -	[Lee und Shacter, 2001]
Topotecan <i>TopoisomeraseI-Inhibitor</i>	-	5 ng/ml	-	-	[Floros et al., 2006]

3.3.4 Funktionelle Evaluierung der CD20 x CD95-Konstrukte *in vivo*: SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4

Nach erfolgter *in vitro* Charakterisierung der bispezifischen F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x APO-1 sollte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig ein solches Konstrukt *in vivo* untersucht werden.

Evaluierung eines SCID-Maus-Xenograft-Modells mit SKW6.4

Bevor jedoch die Fähigkeit des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes Rit x APO-1 zur CD95-induzierten Tumorzelllyse *in vivo* evaluiert werden konnte, musste zuerst ein geeignetes SCID-Maus-Xenograft-Modell etabliert werden. Als Zielzellen sollte die B-Lymphomzelllinie SKW6.4 verwendet werden, wobei eine intravenöse Applikationsform der Tumorzellen durch die Schwanzvene gewählt wurde. Da in der Literatur keine Angaben über ein Maus-Modell mit SKW6.4 ausfindig gemacht werden konnten, waren einige Vorversuche nötig, um die Etablierung der Tumorzellen zu untersuchen. Dazu wurden 5-6 Wochen alten männlichen SCID-Mäusen 1x10⁷ Tumorzellen in einem Volumen von 200 µl intravenös durch die Schwanzvene injiziert. Circa 3 Wochen nach Tumorzellinokulation zeigten die Tiere erste deutliche Lähmungserscheinungen der Hinterläufe und des Schwanzes. Die Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt mittels CO₂-Begasung getötet.

Unmittelbar nach dem Tod wurde bei einigen Tieren das Knochenmark isoliert und in RPMI-Kulturmedium kultiviert. Nach etwa 3-4 Tagen konnte eine deutliche Zellproliferation beobachtet werden und mittels durchflußzytometrischer FACS-Analyse mit einem anti-human CD20-Antikörper und einem anti-human CD95-Antikörper konnten diese stark proliferierenden Zellen als SKW6.4-Zellen identifiziert werden. Gleichzeitig wurde die CD20- und CD95-Expression quantitativ bestimmt und mit SKW6.4-Zellen aus der Zellkultur verglichen. Hierbei konnten keine Veränderungen der Zelloberflächenexpression von CD95 und CD20 durch die *in vivo* Passage in der SCID-Maus festgestellt werden. Um weiter auszuschließen, dass diese SCID-SKW6.4-Zellen ihre Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose durch die *in vivo* Passage verloren haben, wurde ein WST-1-Zellviabilitätstest mit Rit x APO-1 durchgeführt. Als Vergleichszellen dienten hierbei wieder SKW6.4 aus der Zellkultur. Die CD95-Sensitivität der SCID-SKW6.4 war identisch mit derjenigen der SKW6.4 aus der Zellkultur (Daten nicht gezeigt). Die SCID-SKW6.4 wurden weiter expandiert und für spätere Tierversuche in flüssigem Stickstoff konserviert.

Immuntherapie mit dem bsF(ab')₂ Rit x APO-1

Um die effektive *in vitro* durch Rit x APO-1 induzierte Tumorzelllyse auch *in vivo* bewerten zu können, wurden Immuntherapie-Versuche mit SCID-Mäusen durchgeführt (s. auch Tabelle 2.7, S. 89).

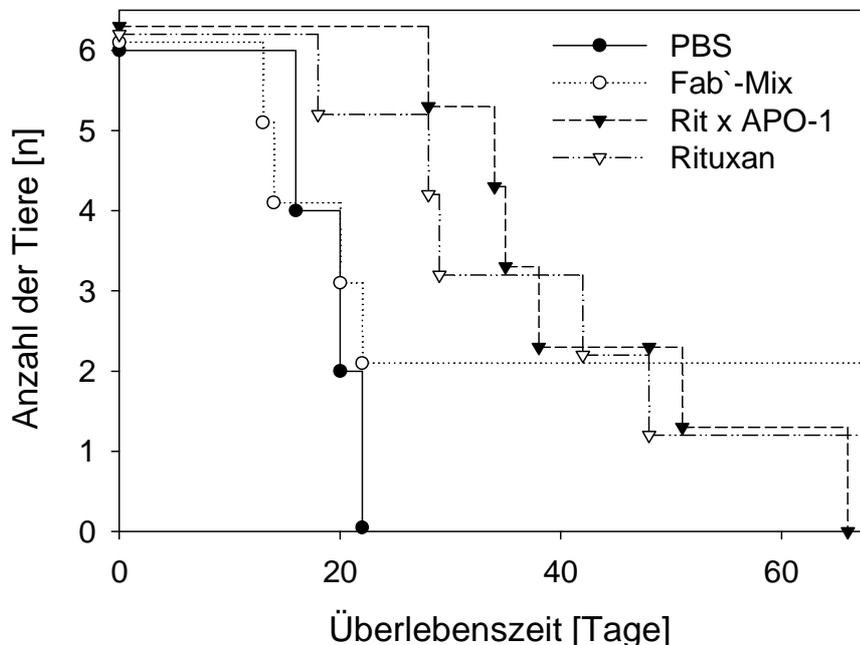


Abb. 3.31: Immuntherapie mit dem bispezifischen F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 in einem SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4

4-5 Wochen alten SCID-Mäusen wurde am Tag 0 eine lethale Dosis von 1×10^7 SCID-SKW6.4 in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ in PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert. Eine Applikation der Immuntherapeutika ($20 \mu\text{g}$) erfolgte in einem Endvolumen von $100 \mu\text{l}$ in PBS an den Tagen 1, 2 und 3 nach Tumorzellinokulation ins Peritoneum. Bei Einsetzen erster deutlicher Lähmungserscheinungen der Hinterläufe und des Schwanzes wurden die Tiere mittels CO₂-Begasung getötet.

Abbildung 3.31 zeigt die Überlebenskurven der verschiedenen Gruppen. Dabei zeigt sich, dass Tiere die mit dem bispezifischen bsF(ab')₂-Hybrid Rit x APO-1 behandelt wurden ein deutlich verlängertes Überleben zeigen. Als Vergleich für die Effektivität einer Immuntherapie mit Rit x APO-1 diente eine mit dem klinisch eingesetzten $\alpha\text{CD}20$ -Antikörper Rituxan behandelte Gruppe. Auch diese Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutliche verlängerte Überlebenszeit die jedoch mit der für das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 beobachteten vergleichbar ist.

Die Tiere der PBS-Kontroll-Gruppe mussten innerhalb von 22 Tagen aufgrund auftretender Lähmungserscheinungen getötet werden. Als weitere Negativkontrolle diente ein äquimolarer Mix der beiden im Rit x APO-1-Konstrukt enthaltenen Fab'-Fragmente. Durch Verwendung einer äquimolaren Mischung der Fab'-Fragmente

sollte die Notwendigkeit der Quervernetzung des CD95-Todesrezeptors zur Induktion einer Tumorzelllyse gezeigt werden. Obwohl die Fab'-Fragmente nicht in der Lage sein sollten solch eine Multimerisierung des CD95 zu vermitteln, überlebten zwei der mit dem Fab-Mix behandelten Tiere. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine APO-1 Homodimer-Verunreinigung der APO-1-Fab'-Fragmente sein.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* in der Lage ist, eine effiziente, Zielzell-restringierte Tumorzelllyse CD95-sensitiver, CD20⁺ Tumorzellen zu induzieren.

3.4 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination aus 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein vollkommen neuer Ansatz zur Stimulation des Todesrezeptors CD95 evaluiert: Hierzu wurde ein rekombinanter monoklonaler α CD20-Antikörper am C-Terminus mit dem c-myc-Epitop versehen. Durch eine Kombination mit einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment mit Spezifität α myc x CD95 wurde eine CD95-vermittelte Apoptose CD95-positiver und sensibler B-Lymphomzellen induziert.

Abbildung 3.32 zeigt schematisch die Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination des 2H7-IgG1-myc + α myc (9E10) x APO-1.

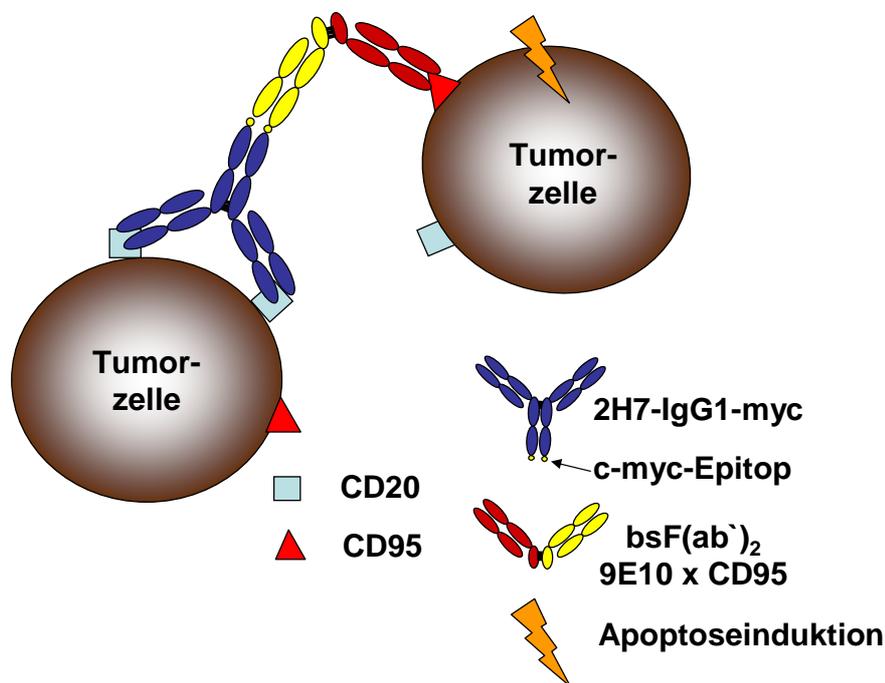
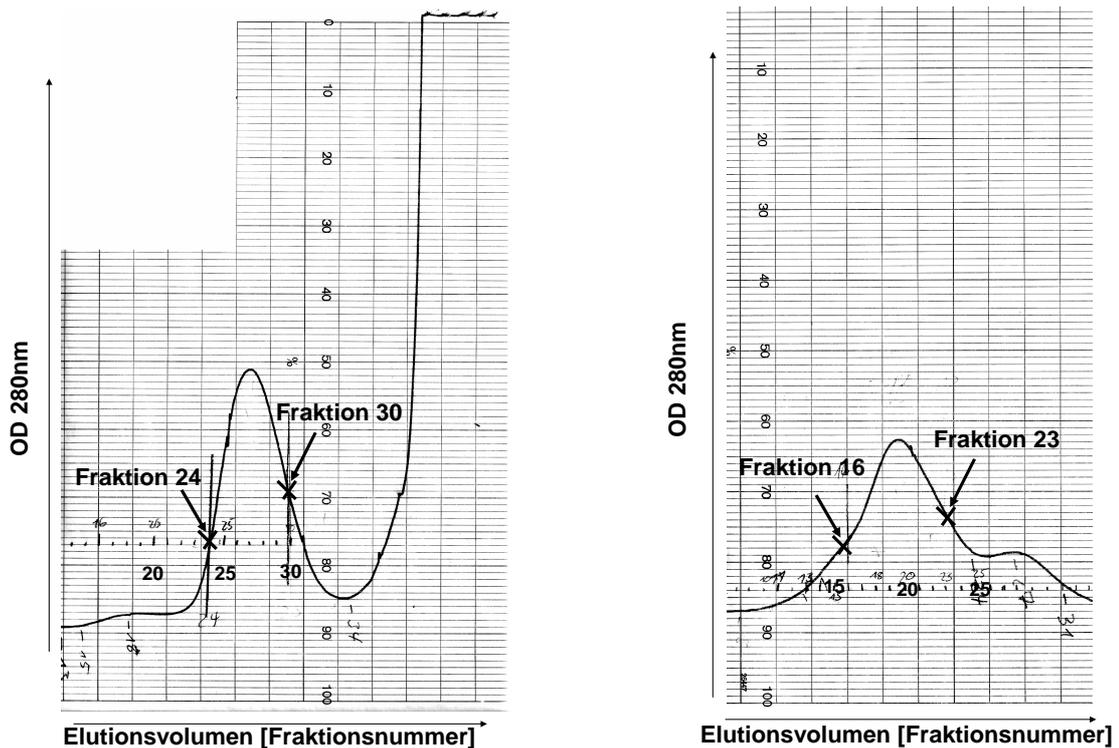


Abb. 3.32: Schematische Darstellung der Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination des 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1

Der rekombinante monoklonale α CD20-Antikörper 2H7-IgG1 wurde am C-Terminus mit einem c-myc-Epitop versehen. Durch eine Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem bispezifischen F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 kann eine CD95-vermittelte Apoptose in der Tumorzelle induziert werden.

3.4.1 Herstellung des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1 (α-c-myc x CD95)

Die Herstellung der Fab'-TNB-Fragmente aus den monoklonalen Antikörpern APO-1 und 9E10 erfolgte analog zur Herstellung des Rit x APO-1 (s. Abschnitt 3.3.1, S. 117).



(a) Gelfiltrationschromatogramm des 9E10-Antikörpers nach proteolytischem Pepsin-Verdau

(b) Gelfiltrationsprofil der Hybridisierung des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1

Abb. 3.33: Präparative Gelfiltrationen zur Herstellung des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1

Abbildung 3.33(a) zeigt das Gelfiltrationschromatogramm des 9E10-Antikörpers nach proteolytischem Pepsin-Verdau. Die 9E10-Fab'-TNB-Fragmente waren in den Fraktionen 24-30 enthalten. Diese Fraktionen wurden gepoolt und für die Hybridisierung weiterverwendet.

Auf das Chromatogramm der präparativen Gelfiltration nach Proteolyse des APO-1-Antikörpers wird an dieser Stelle verzichtet, da bereits ein repräsentatives Ergebnis in Abbildung 3.21(a) (S. 118) gezeigt wurde.

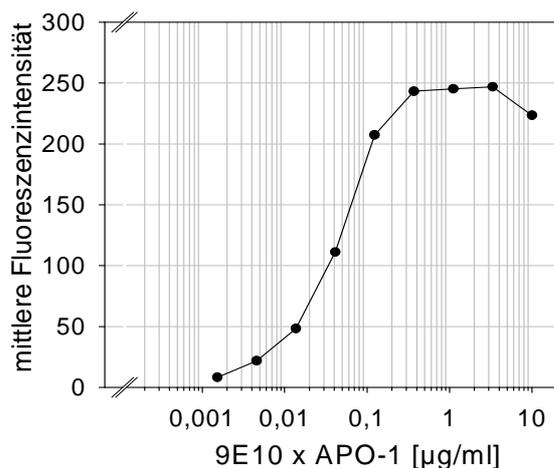
Zur Vermeidung der Entstehung von APO-1-Homodimeren wurde auch bei dieser Hybridisierung nicht das APO-1-Fab'-TNB, sondern das 9E10-Fab'-TNB-Fragment reduziert. Die 9E10-Fab'-SH-Fragmente wurden mit einer äquimolaren Menge der APO-1-Fab'-TNB-Fragmente zu einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 hybridisiert.

Abbildung 3.33(b) (S. 135) zeigt das Gelfiltrationsprofil der Hybridisierung wobei die Hybridisierungseffizienz auf etwa 80% zu schätzen ist. Die Fraktionen 16-23 enthielten das F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1.

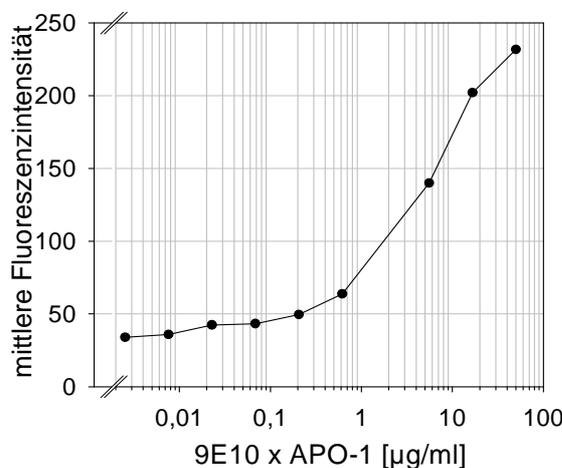
3.4.2 Analytische Evaluierung des F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1

Um das Bindungsverhalten der beiden im bsF(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 enthaltenen Spezifitäten zu untersuchen, wurden durchflußzytometrische FACS-Analysen durchgeführt. Die CD95-Spezifität des bsF(ab')₂-Fragmentes wurde durch Titration auf CD95⁺ SKW6.4 (s. Abb. 3.34(a), S. 137) getestet. Die Überprüfung der Bindungsspezifität des 9E10-Teils des Moleküls gestaltete sich etwas schwieriger. Die für die durchflußzytometrische FACS-Analyse verwendeten CD20⁺ CD95⁻ PBMC von CLL-Patienten mussten zunächst für 1h mit 5 µg/ml des 2H7-IgG1-myc inkubiert werden. Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des 9E10 x APO-1. Als Detektionsantikörper wurde ein R-PE-markierter F(ab')₂-Antikörper aus der Ziege verwendet.

Aus Abb. 3.34 (S. 137) wird ersichtlich, dass die Bindungsaffinität des APO-1-Teils des bs F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1 eine viel höhere Bindungsaffinität zu seinem Zielantigen aufweist als der 9E10-Teil. Die Sättigungsschwelle liegt bei Titration des 9E10 x APO-1 auf CD95⁺-SKW6.4 bei einer Konzentration von etwa 0,5 µg/ml (s. Abb. 3.34(a), S. 137), wohingegen bei Titration auf mit 2H7-IgG1-myc vorinkubierten CLL-PBMC selbst bei Antikörperkonzentrationen von 50 µg/ml keine Sättigung zu beobachten ist (s. Abb. 3.34(b), S. 137). Die höhere Affinität des APO-1-Antikörpers zur Bindung an sein Zielantigen im Vergleich zum 9E10-Antikörper konnte auch bei Titration der intakten Ausgangsantikörper (APO1-IgG2a und 9E10-IgG1) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Beim 9E10-IgG1 scheint es sich folglich um einen schwach affinen Antikörper zu handeln.



(a) SKW6.4



(b) CLL-PBMC

Abb. 3.34: Durchflußzytometrische FACS-Analyse zur Bestimmung des Bindungsverhaltens des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1

Das bispezifische F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 wurde auf CD95⁺ Jurkat und auf mit 5 µg/ml CD20-myc vorinkubierten CD20⁺CLL-PBMC titriert.

Die Reinheit des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1 wurde mittels SDS-PAGE-Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 Herstellung des Antikörpers 2H7-IgG1-myc

Anbau des c-myc-Epitops an den C-Terminus der schweren Kette des chimären anti-human-CD20-IgG1-Antikörpers 2H7

Ziel dieser Klonierungen war es, die schwere Kette des chimären αCD20-IgG1-Antikörpers 2H7 am C-Terminus um eine kurze Sequenz vom IgA-C-Terminus und das c-myc-Epitop zu verlängern. Als Ausgangsmaterial dienten die Vektoren *2H7-IgG1-Fc-mut* und *Mel-myc*. Ersterer codiert für den 2H7-IgG1 mit einer Protease-

ERGEBNISSE

schnittstelle im Fc-Teil, letzterer für die schwere Kette eines chimären anti-NG2-IgG1-Antikörpers mit C-terminalem c-myc-Epitop.

Der Umbau des Plasmids erfolgte durch Ausschneiden eines 5 kb großen, die ganze Sequenz der variablen Region umfassenden Fragmentes des *2H7-IgG1-Fc-mut* durch einen seriellen Verdau mit den Enzymen *NheI* und *NotI*. Dieses Fragment wurde anschließend in den entsprechend geöffneten Vektor *Mel-myc* ligiert. Der fertige, aus dieser Ligation resultierende Vektor *2H7-IgG1-myc* wurde durch Sequenzierung mit dem Sequenzierprimer *IntronRev* verifiziert. Vor der Transfektion erfolgte die Linearisierung des Vektors *CD20-myc* mit *AhdI*. Der geöffnete Vektor wurde zusammen mit dem geöffneten Vektor *humCD20light*, der für die leichte Kette des chimären anti-human-CD20-IgG1-Antikörpers 2H7 codiert, mittels Kotransfektion in Sp2/0-Ag14 transfiziert.

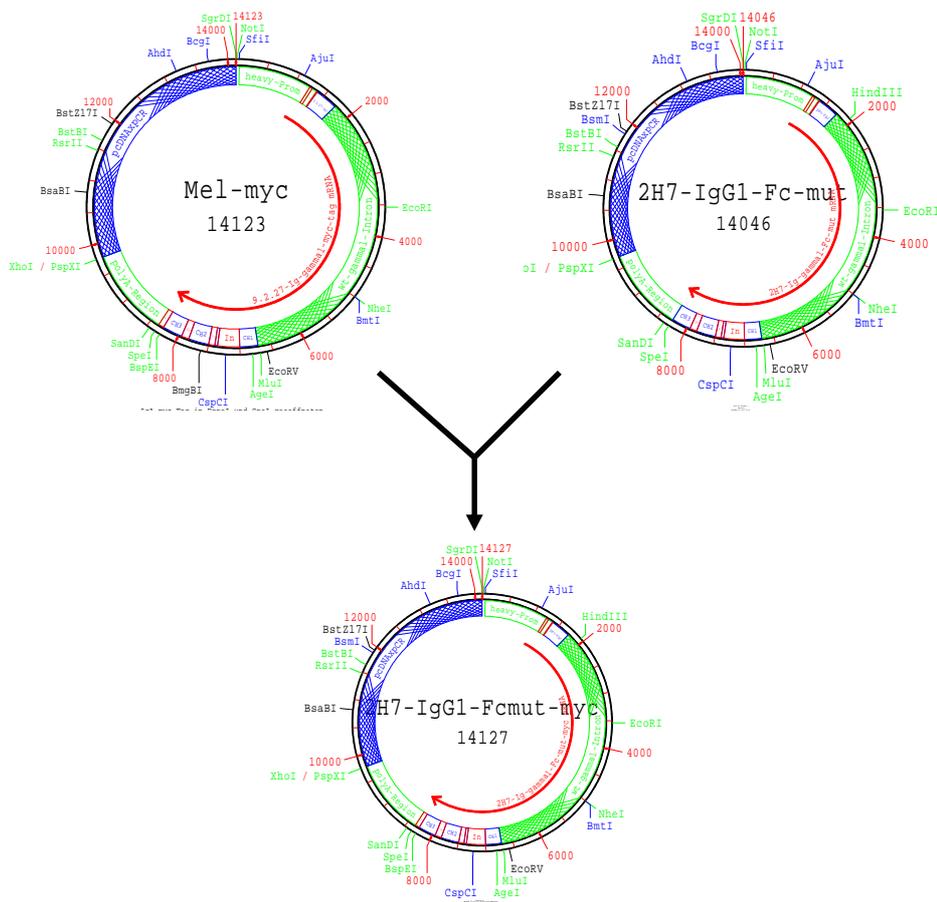


Abb. 3.35: Übersicht über das Klonierungsschema für den Anbau des c-myc-Epitops an den C-Terminus des 2H7-IgG1

Die Sequenz der variablen Region des 2H7 wurde durch einen seriellen Verdau mit den Enzymen *NheI* und *NotI* aus dem Plasmid *2H7-IgG1-Fc-mut* ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten Vektor *Mel-myc* inkloniert.

Produktion und Reinigung des 2H7-IgG1-myc

Die Produktion des 2H7-IgG1-myc-Antikörpers erfolgte, analog wie in Abschnitt 3.1 (S. 93) für die verschiedenen 2H7-Antikörper beschrieben, durch Kultivierung transfizierter Sp2/0-Ag14-Zellen und Reinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie.

3.4.4 Analytische Charakterisierung des 2H7-IgG1-myc

Die analytische Charakterisierung des 2H7-IgG1-myc erfolgte analog zu in Abschnitt 3.1.2 (S. 94) für die verschiedenen 2H7-Antikörper beschrieben. Die Reinheit des Antikörpers wurde mittels SDS-PAGE-Analyse und analytischer Gelfiltration bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Das Bindungsverhalten des 2H7-IgG1-myc-Antikörpers sollte theoretisch durch die Anfügung des c-myc-Epitops an den C-Terminus der schweren Kette nicht beeinträchtigt werden. Dies konnte mittels durchflußzytometrischer FACS-Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.5 Funktionelle Evaluierung der Kombination 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 *in vitro*

Um zu testen, ob eine Kombination des 2H7-IgG1-myc mit 9E10 x APO-1 *in vitro* eine CD95-induzierte Tumorzellyse vermitteln kann, wurden WST-1-Zellviabilitätstests durchgeführt.

Eine Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 führt *in vitro* zu einer CD95-induzierten Tumorzellyse von C1R-Zellen

Für den WST-1-Zellviabilitätstest wurden C1R-Zellen geerntet und in An- bzw. Abwesenheit von 10 µg/ml 2H7-IgG1-myc für 1 h bei 37°C unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PRMI-Medium bevor die Zellzahl bestimmt und je 5x10⁴-Zellen pro well in 96-well Flachbodenplatten ausplattiert wurden. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des 9E10 x APO-1 und 24-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels Zugabe von WST-1 und Messung des Farbumsatzes im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm. Abb. 3.36 (S. 140) zeigt die durch eine Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem bs F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 induzierte Tumorzellyse von C1R-Zellen. Ein Einsetzen

ERGEBNISSE

der Lyse kann ab einer Konzentration von etwa $0,02 \mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Die maximale Lyserate liegt bei etwa 40 %. Eine Lyse der Tumorzellen ist jedoch nur mit denjenigen C1R-Zellen zu beobachten, die zuvor mit dem CD20-IgG1-myc inkubiert worden waren. Bei denjenigen Zellen die nicht mit dem CD20-IgG1-myc benetzt worden waren ist keine durch 9E10 x APO-1-vermittelte Lyse der Tumorzellen zu beobachten. Damit ist bewiesen, dass die durch 9E10 x APO-1-vermittelte Lyse spezifisch und abhängig vom Vorhandensein des CD20-IgG1-myc ist.

Als Kontrolle für die CD95-Sensitivität der C1R-Zellen diene wieder ein Kontrollansatz mit dem kreuzvernetzten APO-1-IgG2a (s. Balkendiagramm Abb. 3.36). Anhand eines Kontrollansatzes mit 2H7-IgG1-myc behandelten Zellen ist gezeigt, dass eine alleinige Inkubation der Zellen mit dem 2H7-IgG1-myc die Viabilität der Zellen nicht beeinflusst.

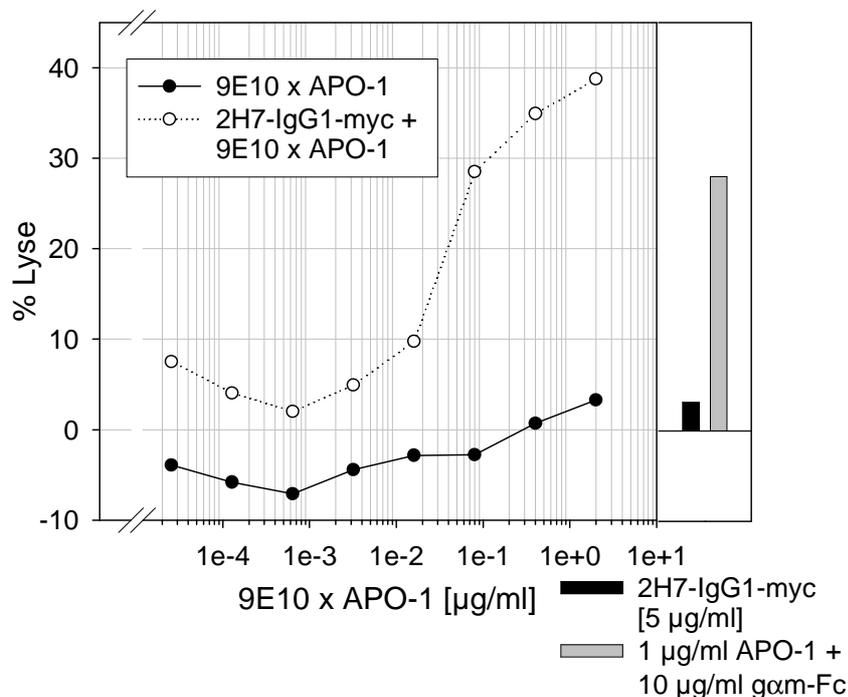


Abb. 3.36: Induktion der Tumorzellyse durch Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem bs F(ab')_2 -Fragment 9E10 x APO-1

5×10^4 mit bzw. ohne 2H7-IgG1-myc vorinkubierte C1R wurden für 24h in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen 9E10 x APO-1 kultiviert. Die Bestimmung der Anzahl viabler Zellen erfolgte durch Zugabe des Farbstoffes WST-1.

Die durch die Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 induzierte Tumorzelllyse ist abhängig vom Vorhandensein des c-myc-Epitops am 2H7-IgG1-myc-Antikörper

Als nächster Schritt sollte bewiesen werden, dass die spezifische Bindung des 9E10 x APO-1 an das c-myc-Epitop des 2H7-IgG1-myc für die Vermittlung der 9E10 x APO-1 induzierten Tumorzelllyse verantwortlich ist. Hierfür wurden C1R-Zellen geerntet und in zwei gleiche Ansätze aufgeteilt: Ein Ansatz wurde mit dem 2H7-IgG1-myc vorinkubiert, der zweite mit demselben 2H7-IgG1-Antikörper der jedoch kein c-myc-Epitop am C-Terminus der schweren Kette besitzt (2H7-IgG1). Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 96-well Flachbodenplatten ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1 inkubiert.

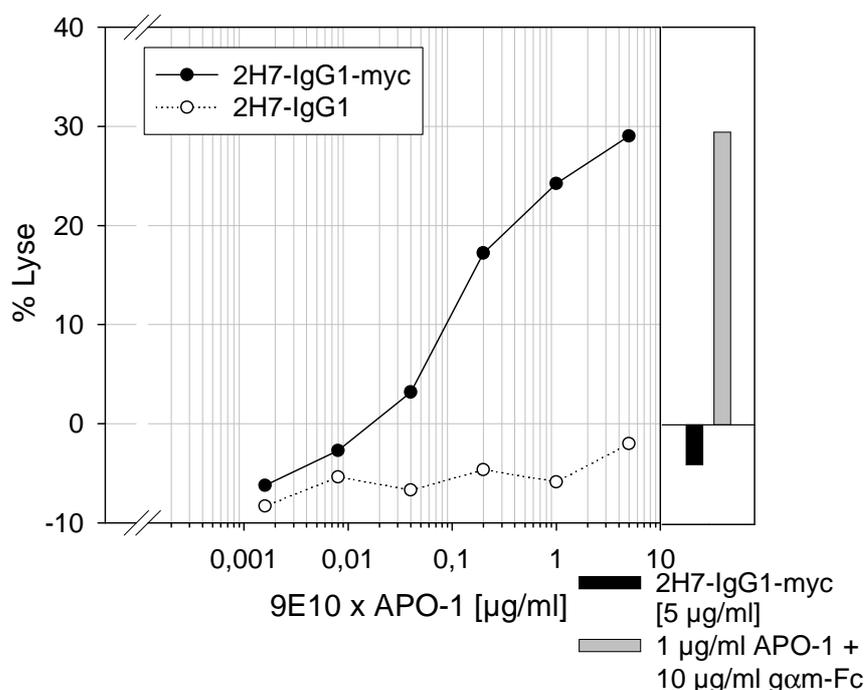


Abb. 3.37: Abhängigkeit der 9E10 x APO-1 induzierten Tumorzelllyse vom Vorhandensein des c-myc-Epitops am 2H7-IgG1-myc-Antikörper

5x10⁴ mit 2H7-IgG1-myc bzw. 2H7-IgG1 vorinkubierte C1R wurden für 24h in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen 9E10 x APO-1 kultiviert. Die Bestimmung der Anzahl viable Zellen erfolgte mittels eines WST-1-Zellviabilitätstests.

Anhand der Abb. 3.37 wird ersichtlich, dass das bispezifische F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 nur dann eine Tumorzelllyse vermitteln kann, wenn es mit beiden Spezifitäten an seine Antigene gebunden hat. Ist kein c-myc-Epitop am 2H7-IgG1-Antikörper vorhanden, so läßt sich auch keine 9E10 x APO-1-induzierte Tumorzell-

lyse beobachten, was anhand der Kombination 2H7-IgG1 + 9E10 x APO-1 belegt werden kann. Bei Vorhandensein des c-myc-Epitops am 2H7-IgG1 (2H7-IgG1-myc) läßt sich, wie bereits in Abb. 3.36 (S. 140) gezeigt, wieder eine 9E10 x APO-1-induzierte Lyse der C1R-Zellen beobachten. Auch hier diente der kreuzvernetzte APO-1-Antikörper wieder als Kontrolle für die CD95-Sensitivität der C1R-Zellen.

Die durch die Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 induzierte Tumorzellyse ist vergleichbar mit der durch 2H7 x APO-1 induzierten Tumorzellyse

Abschließend sollte die Frage geklärt werden, wie effizient eine Kombination des 2H7-IgG1-myc mit dem F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 bei der Vermittlung der CD95-induzierten Apoptose im Vergleich zu einer durch das F(ab')₂-Fragment 2H7 x APO-1-vermittelten Tumorzellyse ist. Hierfür wurde ein WST-1-Zellviabilitätstest mit der B-Lymphomzelllinie C1R durchgeführt.

Die Durchführung des WST-1-Zellviabilitätstests erforderte auch hier wieder zwei unterschiedliche Ansätze. In einem Ansatz wurden 5x10⁴ C1R-Zellen/well mit unterschiedlichen Konzentrationen des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 2H7 x APO-1 inkubiert. Für den Kombinations-Ansatz mussten die C1R-Zellen zunächst mit 5 µg/ml 2H7-IgG1-myc für 1 h vorinkubiert werden. Nach einem Waschschrift wurden ebenfalls 5x10⁴ Zellen/well ausplattiert und für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes 9E10 x APO-1 inkubiert. Die Bestimmung der Tumorzellyse erfolgte durch Zugabe von WST-1 und Messung des Farbumsatzes im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Vergleicht man die in Abbildung 3.38 (S. 143) für 2H7 x APO-1 und 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 dargestellten Titrationskurven, so scheint es auf den ersten Blick als wäre die Kombination ein wenig effektiver bei der Vermittlung der Tumorzellyse. Betrachtet man jedoch den Kontrollansatz bei welchem die C1R-Zellen nur mit dem 2H7-IgG1-myc behandelt wurden, so läßt sich eine Lyse von etwa 5 % beobachten. Berücksichtigt man diesen Hintergrund bei Vergleich der Titrationskurven, so sind die Kurven identisch. Abschließend kann somit festgehalten werden, dass die Effizienz des 2H7 x APO-1 bei der Vermittlung einer CD95-induzierten Tumorzellyse vergleichbar mit der durch eine Kombination aus 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 induzierten Tumorzellyse ist.

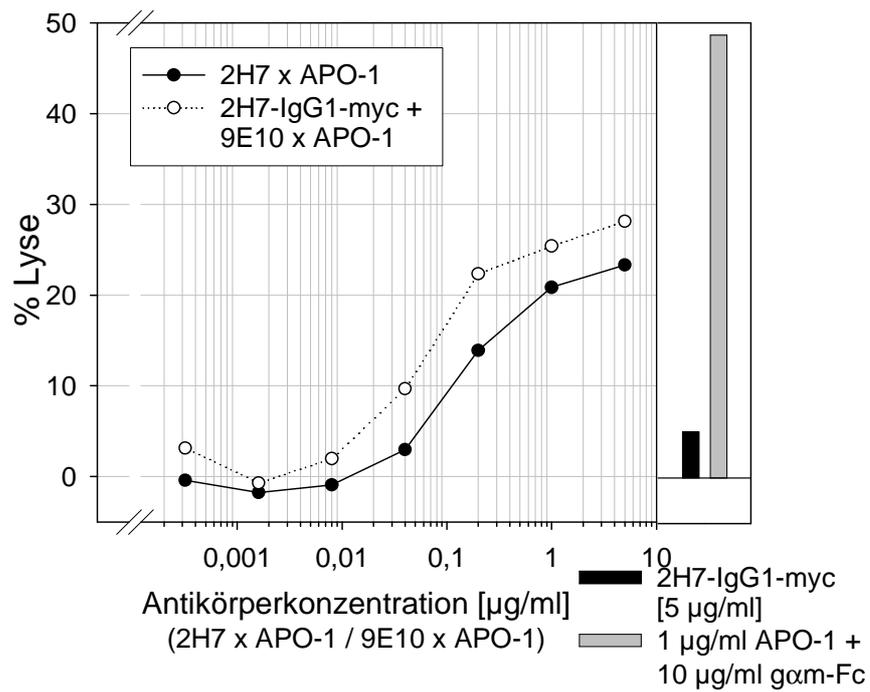


Abb. 3.38: Vergleich der 2H7 x APO-1 induzierten mit der durch eine Kombination aus 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 induzierten Tumorzellyse der B-Lymphomzelllinie C1R

5×10^4 C1R wurden mit 2H7 x APO-1 für 24h inkubiert und die Tumorzellyse mittels eines WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt. Als Vergleich dienten mit $5 \mu\text{g/ml}$ 2H7-IgG1-myc vorinkubierte C1R die für 24h mit verschiedenen Konzentrationen 9E10 x APO-1 inkubiert worden waren.

Kapitel 4

Diskussion

Inhalt

4.1 Optimierung des monoklonalen chimären αCD20-Antikörpers 2H7-IgG1	147
4.1.1 Auswirkungen einer Optimierung der Fc γ R-vermittelten Effektorfunktionen auf die ADCC	147
4.1.2 Generierung unfucosylierter Antikörper	149
4.1.3 DE-Mutation versus Modifikation der Glycosylierung	149
4.1.4 Der α CD20-Antikörper 2H7	150
4.1.5 Fazit und Ausblick	150
4.2 Supra-agonistische CD28-Stimulation mit dem rekombinanten bispezifischen <i>single-chain</i> Antikörper r2820	152
4.2.1 Supra-agonistische, Zielzell-restringierte T-Zellaktivierung durch r2820	152
4.2.2 Multimerisierung des r2820	154
4.2.3 r2820-induzierte T-Zellproliferation in PBMC-Präparationen von CLL-Patienten	154
4.2.4 r2820-induzierte Tumorzelllyse	156
4.2.5 Produktion bispezifischer <i>single-chain</i> Antikörper	156
4.2.6 Fazit und Ausblick	157
4.3 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen CD95xCD20-Konstrukten	159
4.3.1 „Sensitives“ <i>in vitro</i> Modell mit SKW6.4	159
4.3.2 „Insensitiveres“ <i>in vitro</i> Modell	160
4.3.3 <i>In vivo</i> Immuntherapieversuche mit Rit x APO-1 im SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4	162
4.3.4 Fazit und Ausblick	163

4.4	Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination aus 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt	165
4.4.1	Stimulation des Todesrezeptors CD95 durch die Kombination des 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1	165
4.4.2	„Direkte“ versus „indirekte“ Stimulation des Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen F(ab') ₂ -Fragmenten	166
4.4.3	Fazit und Ausblick	167

„Wir haben bereits einen flüchtigen Eindruck von dem Land erheischt, von dem wir glauben, ja sogar erwarten, dass es reiche Schätze für die Biologie und Therapie hervorbringt“

Paul Ehrlich, 1900

Seit den Arbeiten von Behring und Kitasato vor über hundert Jahren ist bekannt, dass spezifisch bindende Moleküle aus Blutseren gewonnen werden können. Ende des 19. Jahrhunderts stellte sich Paul Ehrlich Antikörper als „magische Kugeln“ vor, die toxische Mittel an den Tumor befördern. Dieser Gedanke schien mit der Herstellung der ersten monoklonalen Antikörper durch Köhler und Milstein im Jahr 1975 [Köhler und Milstein, 1975] unmittelbar vor der praktischen Umsetzung zu stehen. Nachdem sich aber die anfänglichen klinischen Versuche mit diesen Antikörpern als eher enttäuschend herausstellten, mussten noch über 20 Jahre vergehen, bis erstmals ein monoklonaler Antikörper für die Krebsbehandlung zur Verfügung stand.

Der erste in der Tumorthherapie eingesetzte chimäre Antikörper war der α CD20-Antikörper Rituximab der 1997 erstmalig für die Behandlung des follikulären Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL), nach Versagen der Chemotherapie oder in Kombination zur Erstbehandlung, zugelassen wurde. Die hohe Wirksamkeit dieses nativen Antikörpers ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass Rituximab nach Bindung an die Zielzelle nicht nur direkt Apoptose vermittelt [Shan et al., 1998], sondern auch eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität und eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität induzieren kann.

Die Erfolgsgeschichte des Rituximab bei der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome ist bisher unerreicht. Aufgrund vielversprechender Therapieerfolge wurde das Präparat sowohl in den USA und später auch in Deutschland zur Behandlung rezidivierender follikulärer Lymphome zugelassen.

Dennoch weist der therapeutische Einsatz von Rituximab einige Einschränkungen auf. So wurden bei der Therapie von Patienten mit peripherer Ausschwemmung des Lymphoms oder mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) schwere Nebenwirkungen im Sinne eines *cytokine release syndrome* beobachtet [Jensen et al., 1998]. Zusätzlich entwickelt, trotz der Erfolge einer initialen Rituximab-Behandlung, die Mehrheit der behandelten CD20⁺-B-NHL Patienten eine anschließende Resistenz [Davis et al., 2000].

Die genannten Probleme einer Rituximab-Behandlung verdeutlichen die Notwendigkeit der Optimierung therapeutischer Antikörper.

Dank der Fortschritte der letzten Jahre auf dem Gebiet der rekombinanten Antikörpertechnologie haben sich ganz neue Perspektiven für eine Optimierung therapeutischer Antikörper eröffnet. Dazu zählen nicht nur die verschiedensten Ansätze zur Verbesserung der Effektorfunktionen monoklonaler Antikörper, sondern auch die Entwicklung verschiedenster rekombinanter Antikörperformate einschließlich bispezifischer Antikörper, die die Spezifität von Antikörpern mit der Wirksamkeit von immunologischen Effektorzellen kombinieren.

4.1 Optimierung des monoklonalen chimären α CD20-Antikörpers 2H7-IgG1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fc-Teil des chimärisierten α CD20-Antikörpers 2H7 dahingehend modifiziert, dass er durch eine verbesserte Interaktion mit aktivierenden Rezeptoren von Effektorzellen und als Folge davon eine gesteigerte Effektivität bei der Vermittlung einer Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) zeigte. Eine derartige Optimierung von monoklonalen Antikörpern stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der therapeutischen Effektivität dar.

4.1.1 Auswirkungen einer Optimierung der Fc γ R-vermittelten Effektorfunktionen auf die ADCC

Um eine verbesserte Interaktion des Fc-Teils des α CD20-Antikörpers 2H7 mit aktivierenden Fc-Rezeptoren zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Strategien angewendet und kombiniert: Das *Fc-Remodelling* und eine Modifikation der Glycosylierung.

Als Ausgangspunkt für das *Fc-Remodelling* dienten die bereits erwähnten Arbeiten von Lazar et al. [Lazar et al., 2006]. Für den α CD20-Antikörper 2H7 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch einen Austausch der Aminosäure S₂₉₃ \rightarrow D₂₉₃ und I₃₃₂ \rightarrow E₃₃₂ im Fc-Teil die Fähigkeit eine Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) zu vermitteln um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert werden konnte (s. Abb. 3.4, S. 96). Von Lazar wurde beschrieben, dass diese Steigerung der ADCC-Effektivität auf eine erhöhte Affinität der DE-Mutante für eine Bindung an aktivierende Fc γ -Rezeptoren zurückzuführen ist.

Desweiteren wurde die Glycosylierung des 2H7-IgG1-Antikörpers modifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ratten-Myelom-Zelllinie YB2/0 als Expressionssystem gewählt. Für diese Zelllinie ist bekannt, dass sie eine geringere Fucosylierung am Asn²⁹⁷ der C_H2-Domäne von Antikörpern vermittelt, was die Bindung zum Fc-Rezeptor positiv beeinflusst [Ferrara et al., 2006]. Um den Einfluß der Fucosylierung auf die ADCC zu untersuchen, wurden der 2H7-Antikörper und die Mutante 2H7-IgG1-DE gleichzeitig sowohl in YB2/0-Zellen (geringe Fucosylierung) als auch in Sp2/0-Ag14-Zellen (hohe Fucosylierung) exprimiert. Durch diesen einfachen Wechsel der Expressionszelllinie konnte vergleichbar mit dem *Fc-Remodelling* eine um mehrere Zehnerpotenzen gesteigerte ADCC-Effizienz beobachtet werden (s. Abb. 3.5, S. 97).

Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Arbeiten von Lifely et al. der für den therapeutisch eingesetzten Antikörper Alemtuzumab zeigen konnte, dass der in YB2/0 Ratten Myelomzellen produzierte Antikörper *in vitro* in der Lage war, bei signifikant geringeren Konzentrationen eine effizientere ADCC als seine in CHO Zellen exprimierte Variante zu vermitteln [Lifely et al., 1995].

Auch Shinkawa et al. konnten in einer vergleichenden Studie in der der Einfluß der einzelnen Zucker-Reste auf die ADCC bestimmt wurde, zeigen, dass unfucosylierte Antikörper wesentlich effizienter bei der Vermittlung der ADCC waren [Shinkawa et al., 2003].

Mittlerweile wurde durch Studien belegt, dass die Interaktion zwischen der Fc-Domäne und der Zuckerstruktur an Position N¹⁶² des Fc γ RIIIa besser ausgebildet ist, wenn der Antikörper unfucosylierte Oligosaccharide trägt [Ferrara et al., 2006]. Interessanterweise scheint der Einfluß der beiden Allotypen des Fc γ RIIIa dabei aufgehoben zu werden [Niwa et al., 2004].

Es gibt mehrere Studien die belegen, dass Fc γ R-vermittelte Effektorfunktionen in der Antikörper-basierten Krebstherapie eine Rolle spielen, und dass es einen Zusammenhang zwischen der Affinität Fc-Teil/Fc γ R und dem zytotoxischen Potential gibt. Interessanterweise konnte jedoch auch eine deutliche Diskrepanz zwischen der *in vitro* und *in vivo* Effektivität therapeutischer Antikörper gezeigt werden. Diese Diskrepanz wurde einer Konkurrenz der therapeutischen IgG1 und der endogenen Serum-IgG für eine Bindung an den Fc γ RIIIa auf NK-Zellen zugeschrieben. Es scheint, dass im Serum enthaltene endogene Immunglobuline die durch therapeutische Antikörper induzierte ADCC inhibieren [Vugmeyster und Howell, 2004; Preithner et al., 2006].

Ein Antikörper mit einer optimierten Fc γ R-Affinität wie die in dieser Arbeit hergestellten optimierten 2H7-Antikörper, sollte durch eine verbesserte Interaktion mit

aktivierenden Rezeptoren von Effektorzellen theoretisch auch den endogen im Serum enthaltenen IgGs bei der Competition um eine Fc-Rezeptorbindung überlegen sein und somit eine gesteigerte therapeutische Effektivität besitzen.

4.1.2 Generierung unfucosylierter Antikörper

Die Expression des 2H7-Antikörpers in YB2/0-Zellen stellt sicherlich nicht den optimalen Weg für eine Generierung unfucosylierter Antikörper dar. Auch wenn die Fucosylierung bei Expression in YB2/0-Zellen deutlich geringer ist als es z.B. bei Sp2/0-Ag14-Zellen der Fall ist, so kann die Fucosylierungsrate bei YB2/0 durchaus, abhängig von den Kulturbedingungen natürlichen Schwankungen unterliegen, so dass eine verlässliche Aussage über den Fucosegehalt nicht mit absoluter Sicherheit getroffen werden kann. Eine Möglichkeit fucosylierte Antikörper von unfucosylierten abzutrennen, würde eine Affinitätschromatographie mit *Lens culinaris*-Agglutinin darstellen.

Eine durchaus elegantere Möglichkeit unfucosylierte Antikörper zu generieren wäre die Verwendung einer GnTIII-überexprimierenden Zelllinie. Die β 1-4 N-Acetylglucosaminyl-Transferase III (GnTIII) katalysiert das Anfügen eines *bisecting* GlcNAc. Eine Überexpression des GnTIII führt dazu, dass das prozessierte Oligosaccharid nicht mehr als Substrat für die α 1-6 Fucosyl-Transferase (α 1-6 FucT) fungiert, und die Zuckerstruktur somit unfucosyliert bleibt [Schachter, 2000]. Für derart glycosylierungs-modifizierte Antikörper konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an unfucosylierten, *bisecting* Oligosacchariden direkt mit dem Grad der Steigerung der vermittelten Lysen in ADCC-Experimenten korrelierte [Umana et al., 1999; Davies et al., 2001; Schuster et al., 2005].

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung einer *Fut8-knockout* Zelllinie. Es ist bekannt, dass Zelllinien mit einer geringen α 1-6 FucT Aktivität unfucosylierte Antikörper erzeugen. Basierend auf dieser Beobachtung war die Erzeugung von *CHO-knockout* Zelllinien für das *Fut8*-Gen [Yamane-Ohnuki et al., 2004]. Für in diesem System produzierte α CD20-Antikörper konnte im Vergleich zu fucosylierten Antikörpern ebenfalls eine mehr als 100-fach gesteigerte ADCC gezeigt werden.

4.1.3 DE-Mutation versus Modifikation der Glycosylierung

Durch eine Kombination der DE-Mutation des 2H7-IgG1 mit einer Expression in YB2/0-Zellen ließ sich im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Steigerung der Effektivität der ADCC beobachten. Da sowohl eine DE-Mutation als auch eine geringere Fucosylierung des 2H7-IgG1-Antikörpers im gleichen Ausmaß zu einer Steigerung

der ADCC-Effizienz führten, eignen sich prinzipiell beide Strategien zur Optimierung der Interaktion mit aktivierenden Rezeptoren von Effektorzellen.

Da für einen therapeutischen Einsatz von Antikörpern in der Regel große Antikörpermengen benötigt werden, gewinnt besonders durch die Ökonomie der Produktion therapeutisch relevanter Antikörper, das *gene-pharming* mit *live stock*-Tieren in der rekombinanten Antikörpertechnologie immer mehr an Bedeutung. Beim *gene-pharming* kann jedoch kein Einfluß auf die Glycosylierung genommen werden, weshalb unter diesem Aspekt eine Aminosäuremodifikation wie die DE-Mutation die bevorzugte Variante zur Optimierung von IgG1-Antikörpern darstellen würde.

4.1.4 Der α CD20-Antikörper 2H7

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten α CD20-Antikörper 2H7 handelt es sich um einen chimären anti-human CD20-IgG1-Antikörper. Wie die meisten α CD20-Antikörper hat der 2H7-Antikörper nur eine schwache Affinität für eine Bindung an sein Zielantigen. Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, dass der 2H7-Antikörper nicht in der Lage ist eine direkte Apoptoseinduktion zu vermitteln, wie es für Rituximab (Rituxan) beschrieben wurde [Shan et al., 1998; Ghetie et al., 2001; Johnson und Glennie, 2003], und auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (s. Abb. 3.7, S. 99). Insofern stellt der 2H7-Antikörper für einen therapeutischen Ansatz möglicherweise nicht die beste Wahl unter den α CD20-Antikörpern dar. Da jedoch der 2H7-Antikörper der einzige im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehende rekombinante α CD20-Antikörper war, wurde dieser für die Optimierung verwendet. Bei den ADCC-Versuchen hat dieser *per se* nicht Apoptose induzierende 2H7-Antikörper allerdings den Vorteil, dass die beobachteten Effekte eindeutig auf die ADCC zurückzuführen sind.

4.1.5 Fazit und Ausblick

Dass eine Optimierung der Fc/Fc γ R Interaktion durch *Fc-Remodelling* und Veränderung der Glycosylierung durch Wechsel des Expressionssystems von einem hoch-fucosylierenden hin zu einem gering-fucosylierenden, eine Effizienzsteigerung der ADCC von mehreren Zehnerpotenzen nach sich zieht, konnte in dieser Arbeit anhand einer DE-Mutation im Fc-Teil des α CD20-Antikörpers 2H7 und einem Wechsel der Expressionszelllinie eindrucklich gezeigt werden. Bei den durchgeführten *in vitro* Experimenten konnte keine zusätzliche Steigerung der ADCC-Effizienz durch eine Kombination von DE-Mutation und geringerer Fucosylierung beobachtet wer-

den.

Interessant wäre der Vergleich des 2H7-Antikörpers mit dem optimierten 2H7-Antikörper *in vivo* im syngenem Mausmodell. Hierzu müsste jedoch im Vorfeld überprüft werden, ob die Fc γ -Rezeptoren von Mauszellen überhaupt in der Lage sind zwischen einem „normalen“ Fc-Teil und einem DE-mutierten Fc-Teil zu unterscheiden. Alternativ wäre die Verwendung von, mit humanen PBMC rekonstituierten Mäusen.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 (S. 149) diskutiert stellt die Produktion von Antikörpern in YB2/0-Zellen nicht die optimale Lösung zur Generierung unfucosylierter Antikörper dar. Hier würde sich die Verwendung einer Fut8-*knockout*-Zelllinie anbieten, um sicher zu sein, vollständig unfucosylierte Antikörper zu generieren.

Der 2H7-Antikörper ist aufgrund der mangelnden Fähigkeit durch Bindung an das CD20-Antigen direkt Apoptose zu induzieren für einen therapeutischen Ansatz sicherlich nicht die beste Wahl. Für den klinischen Einsatz würde man einen α CD20-Antikörper bevorzugen, der zusätzlich in der Lage ist, eine direkte Apoptoseinduktion zu vermitteln wie sie z.B. für Rituximab [Shan et al., 1998; Ghetie et al., 2001; Johnson und Glennie, 2003] und den α CD20-Antikörper Anti-B1 (Tositumomab) beschrieben wurde [Cardarelli et al., 2002]. Die Optimierung des Fc-Teils eines solchen *per se* Apoptose-induzierenden Antikörpers wäre äußerst vielversprechend und würde einen noch effizienteren Ansatz zur Verbesserung der therapeutischen Effektivität darstellen.

Ein weiterer Effektormechanismus therapeutischer Antikörper ist die Komplement-vermittelte Zytotoxizität. Die Bindungsstelle des C1q am Fc-Teil von Antikörpern ist zwar unterschiedlich, jedoch überlappend mit derjenigen für die Fc γ -Rezeptoren [Thommesen et al., 2000; Idusogie et al., 2000]. Laut Lazar et al. sollte eine DE-Mutation des Fc-Teils keine Auswirkungen auf die Komplement-vermittelte Lyse haben [Lazar et al., 2006]. Erste eigene CDC-Versuche weisen jedoch darauf hin, dass sowohl eine DE-Mutation als auch eine geringere Fucosylierung des IgG1-Antikörpers 2H7 die Vermittlung der Komplement-vermittelten Lyse negativ zu beeinträchtigen scheinen (Daten nicht gezeigt).

4.2 Supra-agonistische CD28-Stimulation mit dem rekombinanten bispezifischen *single-chain* Antikörper r2820

Ein kostimulatorisches Signal sollte per Definition alleine nicht ausreichend für die Induktion einer panklonalen T-Zellaktivierung sein. Dennoch konnte für eine Subklasse CD28-spezifischer Antikörper, die CD28-Superagonisten, gezeigt werden, dass sie in der Lage sind T-Zellen auch ohne Stimulation des TZR vollständig zu aktivieren [Tacke et al., 1997].

Die Gefahr einer Verwendung solcher super-agonistischer und monospezifischer α CD28-Antikörper wurde auf dramatische Art und Weise bei einem Arzneimittel-Test in London im März 2006 deutlich. Dabei wurde sechs gesunden Testpersonen ein monoklonaler super-agonistischer α CD28-Antikörper (TGN1412) verabreicht, woraufhin die Probanden innerhalb kürzester Zeit ein durch einen unerwarteten Zytokinsturm ausgelöstes Multiorganversagen entwickelten [Suntharalingam et al., 2006]. Dieses dramatische Ereignis zeigt deutlich, wie groß das Risiko des Einsatzes solcher monoklonaler, super-agonistischer Antikörper sein kann und verdeutlicht die Notwendigkeit einer Zielzell-Restriktion wie sie durch den Einsatz bispezifischer Antikörper erreicht werden kann. Durch ihre duale Spezifität erlauben bispezifische Antikörper nur dann eine Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf Immunzellen, wenn sie mit dem anderen Arm an ihr Zielantigen, in der Regel ein tumorassoziiertes Antigen, gebunden haben.

Große-Hovest et al. gelang es 2003 erstmalig eine Zielzell-restringierte supra-agonistische T-Zellaktivierung und Lyse Zielantigen-positiver Tumorzellen mit einem rekombinanten bispezifischen *single-chain* Antikörper mit Spezifität CD28 x NG2 (r28M) zu zeigen [Grosse-Hovest et al., 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Fähigkeit zur „supra-agonistischen“ CD28-Stimulation eine Besonderheit der im r28M-Molekül enthaltenen Spezifität für NG2 ist. Dafür wurde die NG2-Spezifität gegen eine Spezifität für CD20 ausgetauscht.

4.2.1 Supra-agonistische, Zielzell-restringierte T-Zellaktivierung durch r2820

Der bispezifische *single-chain* Antikörper r2820 mit Spezifität CD20 x CD28 zeigt wie das r28M die Fähigkeit, eine supra-agonistische Zielzell-restringierte T-Zellaktivierung zu vermitteln. Damit wurde es erstmalig möglich, einen derartigen

supra-agonistischen bispezifischen *single-chain* Antikörper im autologen System zu untersuchen.

Für die Untersuchung des r2820 wurden PBMC-Präparationen verwendet, wobei die in der PBMC-Präparation enthaltenen autologen B-Zellen als CD20⁺-Zielzellen dienten. Durch die Verwendung eines vollständig autologen Systems können, im Gegensatz zur Verwendung eines allogenen Systems wie es z.B. beim r28M erforderlich ist, jegliche durch allogene Reaktionen entstandenen Effekte ausgeschlossen werden. Die Anzahl der in der PBMC-Präparation enthaltenen autologen CD20⁺-B-Zellen schien für eine Induzierung der maximal erreichbaren T-Zellproliferation ausreichend zu sein, so dass eine Zugabe weiterer CD20⁺-Zielzellen (in Form von SKW6.4-Zellen) keinen Effekt auf die r2820-induzierte T-Zellaktivierung hatte (s. Abb. 3.14, S. 107). Auch die maximal erreichbare Proliferationsrate konnte durch eine Zugabe zusätzlicher Zielzellen nicht gesteigert werden, wobei hierbei wahrscheinlich die CD28-Moleküle auf den T-Zellen, die ab einer gewissen r2820-Konzentration abgesättigt sind, den limitierenden Faktor darstellen.

Um die Zielzell-Restriktion des bispezifischen r2820 zu beweisen und um auszuschließen, dass eine alleinige Bindung des Moleküls an CD28 eine T-Zellaktivierung vermitteln kann, wurde in den Versuchen das r28M als Kontrolle verwendet (s. Abb. 3.13, S. 106). Da weder PBMC noch SKW6.4 NG2 exprimieren, war es durch r28M nicht möglich eine supra-agonistische T-Zellaktivierung zu erzielen, da es nur mit der CD28-Spezifität nicht aber mit der α NG2-Seite des Moleküls binden konnte. Dies ist ein Beweis dafür, dass die bispezifischen *single-chain* Antikörper nur dann in der Lage sind eine T-Zellaktivierung auszulösen, wenn sie mit beiden Spezifitäten an ihr Zielantigen gebunden haben.

Die Erfordernis der Anwesenheit des Zielantigens und somit der Bispezifität für die Vermittlung einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung wurde zusätzlich durch Blockierungsexperimente mit einem Überschuss des α CD20-Antikörpers Rituxan (s. Abb. 3.14, S. 107) sowie durch Depletion der Zielzellen gezeigt. Wurden jedoch zu den B-Zell-depletierten PBMC bestrahlte SKW6.4 als „künstliche“ Zielzellen gegeben, so ließ sich die Fähigkeit des r2820 eine supra-agonistische T-Zellaktivierung zu vermitteln regenerieren (s. Abb. 3.15, S. 108). Dadurch ist auch belegt, dass es sich bei den proliferierenden Zellen nicht um die B-Zellen handelt, die durch das r2820 aktiviert werden.

Eine interessante Beobachtung bei den [³H]-Thymidin-Inkorporationsversuchen war die Tatsache, dass bei höheren r2820-Konzentrationen häufig ein Abfall der Proliferationsrate zu beobachten ist (s. Abb. 3.14, S. 107 und Abb. 3.15, S. 108). Dies ist dadurch zu erklären, dass durch die hohe r2820-Konzentration eine gleichzeiti-

ge bizelluläre Bindung des r2820 mit beiden Spezifitäten des Antikörpermoleküls erschwert ist, was zusätzlich ein eindeutiger Beleg für die Erfordernis einer bispezifischen Bindung ist.

4.2.2 Multimerisierung des r2820

In analytischen Gelfiltrationsanalysen konnte für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r2820 eine Multimerisierung nachgewiesen werden (s. Abb. 3.11(b), S. 104). Nach präparativer Trennung der multimeren von der monomeren Form konnte gezeigt werden, dass die multimere Form des r2820 wesentlich effizienter bei der Vermittlung einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung ist (s. Abb. 3.18, S. 112).

Große-Hovest et al. beschrieben für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r28M ebenfalls eine unerwartete spontane Dimer-Formation [Grosse-Hovest et al., 2003]. Auch hier zeigte sich das Dimer als weitaus effizienter bei der Induktion einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung. Es wird angenommen, dass durch die Dimerbildung eine bivalente Bindung des bs-scFv ermöglicht wird, was eine supra-agonistische Aktivität des Moleküls zur Folge hat. Interessanterweise besitzt der in den bispezifischen *single-chain* Antikörpern r2820 und r28M enthaltene α CD28-Antikörper 9.3 nur eine marginale super-agonistische Aktivität [Siefken et al., 1998]. Es scheint folglich das spezielle bispezifische *single-chain* Format zu sein, dass für die Konversion eines „sub-agonistischen“ in einen „supra-agonistischen“ Antikörper verantwortlich ist.

Für diese Vermutung spricht auch die Tatsache, dass für ein mittels chemischer Hybridisierung hergestelltes bispezifisches F(ab')₂-Fragment (2H7 x 9.3), mit exakt den selben Bindungsspezifitäten wie sie im r2820 enthalten sind, keinerlei supra-agonistische Aktivität beobachtet werden konnte (s. Abb. 3.17, S. 111). Dieses Konstrukt war nur dann in der Lage eine T-Zellaktivierung hervorzurufen, wenn gleichzeitig auch das CD3-Molekül getriggert wurde.

4.2.3 r2820-induzierte T-Zellproliferation in PBMC-Präparationen von CLL-Patienten

Da der bispezifische *single-chain* Antikörper r2820 in PBMC-Präparationen gesunder Spender in der Lage ist eine supra-agonistische T-Zellaktivierung zu induzieren, wurde untersucht, ob r2820 auch in einer klinischen Situation, in PBMC-Präparationen von Patienten mit B-Zell chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL), eine supra-agonistische T-Zellaktivierung induzieren kann.

Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation von CLL-PBMC mit ver-

schiedenen Konzentrationen des r2820 keine r2820-induzierte T-Zellaktivierung zu beobachten war (s. Abb. 3.19, S. 113). Dies ist dadurch zu erklären, dass PBMC-Präparationen von CLL-Patienten zum Großteil aus malignen CLL-B-Zellen bestehen und der T-Zell-Anteil sehr gering ist (weniger als 20 %). Ob die für die B-CLL beschriebenen intrinsischen T-Zelldefekte [Kunicka und Platsoucas, 1988] bzw. eine unnormale Verteilung der T-Zell-Subtypen [Platsoucas et al., 1982; Totterman et al., 1989; Foon et al., 1990], oder einfach ein ungünstiges T-Zell:CLL-B-Zell-Verhältnis für das Unvermögen des r2820 in CLL-PBMC-Präparationen eine supra-agonistische T-Zellaktivierung zu vermitteln verantwortlich sind, wurde durch eine Manipulation des T-Zell:B-CLL-Verhältnisses untersucht. Dabei konnte anhand von PBMC-Präparationen verschiedener an CLL erkrankter Spender gezeigt werden, dass das Unvermögen des r2820 eine T-Zellaktivierung zu vermitteln auf das ungünstige Effektor:Zielzellverhältnis zurückzuführen ist und sich nach einer Manipulation des T:CLL-B-Zell-Verhältnisses bei den meisten Spendern eine r2820-induzierte T-Zellproliferation nachweisen ließ (s. auch Abb. 3.19, S. 113). Da jedoch auch vereinzelt Fälle auftraten, bei denen selbst durch eine Erhöhung des T-Zell:CLL-B-Zell-Verhältnisses keine T-Zellaktivierung durch r2820 zu induzieren war, muss angenommen werden, dass die T-Zellen dieser Spender aufgrund von intrinsischen Defekten derart beschädigt waren, dass keine T-Zellaktivierung mehr möglich war.

Ein überaus interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass bei einer Inkubation mit PHA und einem T:CLL-B-Verhältnis von 2:1 eine T-Zellproliferation zu beobachten ist, die vergleichbar mit derjenigen von PBMC gesunder Spender ist, wohingegen die durch r2820-vermittelte T-Zellaktivierung in CLL-PBMC-Präparationen im selben T:CLL-B-Zell-Verhältnis (2:1) deutlich geringer ist (s. Abb. 3.19, S. 113). Im Gegensatz dazu ist bei Inkubation „gesunder“ PBMC mit r2820 die T-Zellproliferation ab einer r2820-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit der der Positivkontrolle PHA vergleichbar (s. z.B. Abb. 3.13, S. 106). Möglicherweise haben die T-Zellen von CLL-Patienten eine geringere CD28-Expression oder aber Defekte in der Vermittlung CD28-induzierter Signale. Es gibt bisher nur sehr wenige Studien über die CD28-Expression auf T-Lymphozyten von B-CLL-Patienten. Rossi et al. konnten jedoch eine signifikant reduzierte CD28-Expression auf T-Zellen von 33 B-CLL-Patienten beobachten [Rossi et al., 1996] was auch durch eine von Van den Hove et al. durchgeführte Studie mit 12 B-CLL-Patienten belegt werden konnte [den Hove et al., 1998]. Auch in einer neueren Studie konnten Abnormalitäten der Kinetik und des Expressionslevels von CD28 auf T-Zellen von CLL-Patienten gezeigt werden, was einen Zustand der Hyporeaktivität oder Anergie der T-Zellen nach sich zieht und

einer der Mechanismen der Immundefizienz dieser Erkrankung darstellen könnte [Frydecka et al., 2004].

4.2.4 r2820-induzierte Tumorzellyse

Für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r2820 konnte anhand von Lyseversuchen die Fähigkeit zur Vermittlung einer Tumorzellyse CD20⁺-Zellen gezeigt werden (s. 3.20, S. 115). Die für r2820 beobachtete Lyserate lag hierbei je nach Spender zwischen 40 und 70 %.

Auch für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r28M wurde beschrieben, dass er eine Lyse Zielantigen-positiver Tumorzellen vermitteln kann [Grosse-Hovest et al., 2003]. Es scheint, dass es sich bei den lytisch-aktiven Zellen hauptsächlich um NK-Zellen handelt, die durch von r28M-aktivierten T-Zellen produzierten Zytokine aktiviert wurden. Dies gleicht der lytischen Aktivität welche durch eine panklonale T-Zellaktivierung durch einen α CD3-Antikörper vermittelt wird [Jung et al., 1987b]. Die Induktion einer unspezifischen Zytotoxizität unterstreicht die Notwendigkeit die lytische Aktivität solcher supra-agonistischer bispezifischer Antikörper auf die Tumorzellen zu beschränken. Im Gegensatz zu CD28-Superagonisten ist im Falle der bispezifischen *single-chain* Antikörper solch eine Tumorzell-Restriktion gegeben, da sowohl r28M als auch r2820 nur dann eine supra-agonistische T-Zellaktivierung induzieren können, wenn sie an die Tumorzelle gebunden haben.

4.2.5 Produktion bispezifischer *single-chain* Antikörper

Aufgrund früherer von Große-Hovest (Abt. Immunologie, Universität Tübingen) durchgeführter Arbeiten bestand die Möglichkeit ein konstitutives, d.h. ohne Selektionsdruck funktionierendes Expressionssystem zu verwenden: eine durch regulatorische Elemente von Immunglobulinen gesteuerte Expression in der Maus-Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14. Dadurch war es möglich, ausreichende Proteinnengen unter Laborbedingungen recht einfach im eukaryonten Expressionssystem zu produzieren.

Trotz allem ist die Produktionsrate solcher, für die Zelle „artifizierlicher“ Proteine um mehrere Größenordnungen kleiner als für im gleichen System produzierte monoklonale Antikörper. Solche Produktionsprobleme stellen eine große Hürde auf dem Gebiet der rekombinanten Antikörpertechnologie dar. Für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r28M konnte dieses Produktionsproblem durch eine Überexpression im transgenen Tier gelöst werden [Grosse-Hovest et al., 2004; Grosse-Hovest et al., 2005]. Dafür wurden rearrangierte V_H - und V_L -Gene in einem bispezifischen *single-*

chain Format in fertilisierte Kaninchen-Oozyten [Besenfelder und Brem, 1993; Zakhartchenko et al., 2001] oder fötale Fibroblasten eingebracht um transgene Kaninchen bzw. geklonte transgene Kühe zu generieren [Grosse-Hovest et al., 2004]. Das r28M-Molekül konnte recht einfach und mit guter Ausbeute aus dem Serum geklonter Kühe isoliert werden. Dabei betrug die Konzentration des r28M im Serum transgener Kühe mehr als das fünfzigfache dessen, was im Zellkulturüberstand transfizierter Myelomzellen enthalten war. Die Fähigkeit des aus dem Serum der transgenen Kühe gereinigten r28M zur Induktion einer supra-agonistischen T-Zellaktivierung und Tumorzelllyse Zielantigen-positiver Zellen konnte bestätigt werden und zeigte keinen Unterschied zu in der Zellkultur produziertem r28M [Grosse-Hovest et al., 2004; Grosse-Hovest et al., 2005].

Da sich das r2820 vom r28M lediglich in der Spezifität zum Zielantigen unterscheidet, sollte es prinzipiell möglich sein, die für r28M erfolgreich angewandte Methode des *gene pharming* auf r2820 zu übertragen.

4.2.6 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit des r28M eine Zielzell-restringierte supra-agonistische CD28-Stimulation zu induzieren auch im Falle eines Austausches der Spezifität des NG2 gegen eine Spezifität für das humane B-Zell-assoziierte Antigen CD20 erhalten bleibt. Damit wurde gezeigt, dass es theoretisch möglich sein sollte, diese Fähigkeit auch mit anderen Spezifitäten gegen jedes beliebige Tumorantigen zu reproduzieren.

Das r2820-Molekül ermöglichte erstmalig die Untersuchung eines solchen bispezifischen *single-chain* Antikörpers im vollständig autologen System.

Ein interessanter weiterer Ansatz wäre die Untersuchung der r2820-Wirksamkeit *in vivo* in einem Mausmodell. Da der r2820 jedoch gegen humanes CD28 gerichtet ist, müsste man hier auf mit humanen PBMC rekonstituierte Mäuse zurück greifen.

Ein potentieller Nachteil für einen therapeutischen Einsatz von Antikörpern in einem nicht-physiologischen rekombinanten Format ist die rasche Eliminierung aus dem Organismus, bedingt durch das geringe Molekulargewicht (s. auch Tabelle 1.3, S. 30). Die wenigen bisher über die Ausscheidungsgeschwindigkeit bispezifischer *single-chain* Moleküle verfügbaren Daten zeigen eine relativ schnelle Eliminierung der Moleküle mit Halbwertszeiten von 30-120 min [Jonge et al., 1998; Kipriyanov et al., 1999; Dreier et al., 2003]. Für das r28M konnte jedoch eine höhere Serum-Halbwertszeit von etwa 6-8 Stunden aufgezeigt werden [Grosse-Hovest et al., 2005]. Möglicherweise ist auch hier die Tendenz des r28M zu einer Dimerformation für die beobachtete relativ lange Serumhalbwertszeit verantwortlich. Da das r2820 ebenfalls

zur Multimerbildung neigt ist anzunehmen, dass auch hier eine verlängerte Serumhalbwertszeit besteht.

Die Bildung von Dimeren bzw. Multimeren erfolgt im Falle des r2820 spontan und ungerichtet. Da die multimere Form jedoch die aktive Form des r2820 ist, könnte man das Format dahingehend optimieren, dass eine stabile definierte Dimerisierung des Moleküls gewährleistet und eine spontane ungerichtete Multimerisierung nicht mehr möglich ist. Dadurch hätte man ein definierteres Agens, das nur aus Dimeren bestünde.

Die Bindung im *single-chain* Format erfolgt univalent. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass die Affinität des im r2820 enthaltenen 2H7-scFv geringer ist als bei einer bivalenten Bindung des monoklonalen ohnehin schon schwach affinen 2H7-IgG1-Antikörpers (s. auch Abb. 3.12(b), S. 105). Ein möglicher Ansatzpunkt zur Steigerung der Effektivität des r2820 könnte die Verwendung eines höher-affinen α CD20-Antikörpers darstellen, was zu einer besseren Fokussierung der T-Zellen auf die CD20⁺-Zielzellen führen und die Effektivität des bispezifischen *single-chain*-Moleküls mit Spezifität CD20 x CD28 weiter steigern könnte.

Die unerwarteten Ereignisse bei der Erprobung des super-agonistischen CD28-Antikörpers TGN1412 haben die Notwendigkeit einer Zielzell-Restriktion wie sie in dieser Arbeit für r2820 gezeigt wurde auf dramatische Art und Weise deutlich gemacht.

Im Falle des r2820 ist die Zielzell-Restriktion zwar gewährleistet, allerdings handelt es sich bei dem CD20-Antigen um ein „systemisches“ Antigen, so dass bei einem klinischen Einsatz des r2820 durchaus die Gefahr des *cytokine release syndrome* bestünde.

Nicht nur die Zielzell-Restriktion sondern auch die Tatsache, dass die Produktion des r28M in größeren Mengen in transgenen Tieren gezeigt wurde, macht diese bispezifischen *single-chain* Antikörper mit Spezifität CD28 x Tumorantigen zu äußerst interessanten Kandidaten für die Zukunft der Tumorthherapie.

4.3 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen CD95xCD20-Konstrukten

Wie im Falle der CD28-Superagonisten ist auch für den therapeutischen Einsatz agonistischer α CD95-Antikörper eine stringente Zielzellrestriktion absolut notwendig. Diese Zielzellrestriktion kann auch hier durch den Einsatz bispezifischer Antikörper gewährleistet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von Jung et al. beschriebenen Fähigkeiten bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente mit Spezifität CD20 x CD95 zur Apoptoseinduktion CD95-sensitiver, Zielantigen-positiver Lymphomzellen (SKW6.4) [Jung et al., 2001] anhand verschiedener CD20 x CD95-Konstrukte *in vitro* näher charakterisiert und deren Fähigkeit eine CD95-induzierte Apoptose zu vermitteln auf verschiedenen B-Lymphomzelllinien evaluiert. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die therapeutische Wirksamkeit eines solchen bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmentes mit Spezifität CD20 x CD95 auch in *in vivo* Immuntherapieversuchen mit einem SCID-Maus-Xenograft-Modell gezeigt. Für diese Versuche wurde das bispezifische $F(ab')_2$ -Fragment Rit x APO-1 gewählt. Einer der Gründe für die Wahl dieses Konstruktes war die Verfügbarkeit des Rituxans in ausreichenden Mengen als einer der beiden für die Hybridisierung benötigten Ausgangsantikörper.

4.3.1 „Sensitives“ *in vitro* Modell mit SKW6.4

Im „sensitiven Lymphommodell“ mit SKW6.4 zeigten alle getesteten CD20 x APO-1-Konstrukte ab einer ungefähren Konzentration der bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmente von etwa 0,5 μ g/ml eine nahezu 100%ige Lyse der Tumorzellen (s. Abb. 3.25). Bis auf das B-H20 x APO-1-Konstrukt, das bei geringeren Konzentrationen etwas effizienter zu sein scheint, gab es interessanterweise keine Unterschiede der verschiedenen CD20 x CD95-Konstrukte bei der Vermittlung einer CD95-induzierten Tumorzelllyse.

An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass es sich bei den SKW6.4 um eine äußerst CD95-sensitive Zelllinie handelt. Es konnte gezeigt werden, dass bei dieser Zelllinie selbst der APO-1-Antikörper (ohne eine Quervernetzung mit einem Sekundärantikörper) ab einer Konzentration von 0,01 μ g/ml zu einer etwa 50%igen Lyse der SKW6.4 führte (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser hohen CD95-Sensitivität ist es nicht möglich, Unterschiede bei der CD95-induzierten Tumorzelllyse der unterschiedlichen bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmente (CD20 x

APO-1) zu detektieren.

Die Erfordernis der Bispezifität der CD20 x CD95-Konstrukte konnte durch Inkubation von SKW6.4 mit verschiedenen Konzentrationen der Rituxan-Fab'-Fragmente und der APO-1-Fab'-Fragmente sowie einer äquimolaren Mischung aus beiden eindeutig belegt werden. Hierbei war nur das bispezifische F(ab')₂-Fragment in der Lage eine effiziente Lyse der Tumorzellen zu induzieren (s. Abb. 3.26, S. 124). Allerdings war auch bei alleiniger Titration des APO-1-Fab'-Fragmentes bei hohen Konzentrationen eine Tumorzellyse von etwa 25 % zu beobachten. Möglicherweise ist in der APO-1-Fab'-Präparation eine geringe Menge an APO-1-F(ab')₂-Fragmenten enthalten. Selbst geringste Mengen solcher bivalenter Moleküle führen offensichtlich auf der hoch CD95-sensitiven Zelllinie zu einer meßbaren Tumorzellyse.

Die Zielzell-Restriktion der CD20 x APO-1-Fragmente konnte anhand der Inkubation des Rit x APO-1 mit der CD20⁻-T-Zelllymphomlinie Jurkat gezeigt werden. Hierbei war trotz gleicher CD95-Sensitivität im Gegensatz zu den SKW6.4, keine Tumorzellyse der CD95-sensitiven Zielantigen-negativen Jurkat-Zellen zu beobachten (s. Abb. 3.27, S. 125). Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass bispezifische F(ab')₂-Fragmente nur dann in der Lage sind eine CD95-induzierte Apoptose zu vermitteln, wenn sie gleichzeitig mit beiden Spezifitäten an ihre Zielantigene gebunden haben.

4.3.2 „Insensitiveres“ *in vitro* Modell

Der Nachweis, dass die durch Rit x APO-1-induzierte Tumorzellyse keine Besonderheit der CD95-sensitiven B-Lymphomzelllinie SKW6.4 ist, sondern dass bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität CD20 x APO-1 auch in weniger CD95-sensitiven B-Lymphomzellen eine CD95-induzierte Apoptose vermitteln können, konnte anhand einer Inkubation solcher Konstrukte mit verschiedenen B-Lymphomzelllinien erbracht werden.

Bis auf die Zelllinien Daudi und Raji zeigten alle B-Lymphomzellen eine Rit x APO-1-induzierte Tumorzellyse. Die Unfähigkeit der CD20 x CD95-Konstrukte bei Raji- und Daudi-Zellen eine Tumorzellyse zu vermitteln korreliert mit der Tatsache, dass in diesen beiden Zelllinien auch keine durch eine Quervernetzung des APO-1-induzierte Tumorzellyse zu beobachten ist. Da die CD95-Expression bei Raji- und SKW6.4-Zellen vergleichbar ist (Daten nicht gezeigt), kann eine unterschiedlich starke CD95-Expressionsrate als Ursache ausgeschlossen werden. Möglicherweise sind intrinsische Defekte im Apoptoseweg dafür verantwortlich, dass in diesen Zelllinien

durch CD95-Stimulation keine Apoptose induziert werden kann.

Bei den B-Lymphomzelllinien JY, C1R und BJAB hingegen konnte eine Tumorzelllyse beobachtet werden, allerdings war die Lyserate deutlich geringer als bei der im sensitiven Lymphommodell verwendeten Zelllinie SKW6.4 (s. Abb. 3.28, S. 126).

Interessanterweise konnten, im Gegensatz zum sensitiven Lymphommodell mit SKW6.4, bei den CD95-insensitiveren CD20⁺-Lymphomzelllinien durchaus Unterschiede bei den verschiedenen CD20 x APO-1-Konstrukte in der Effektivität der Induktion einer CD95-vermittelten Tumorzelllyse beobachtet werden. Bei Verwendung der Zelllinien C1R und BJAB war deutlich zu erkennen, dass das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 sowohl bei geringeren Konzentrationen, als auch bei der maximal induzierten Lyserate effizienter als das 2H7 x APO-1-Konstrukt war (s. Abb. 3.29(a) und 3.29(b), S. 128). Diese Beobachtung kann nicht durch Unterschiede in der Affinität der verschiedenen α CD20-Ausgangantikörper für eine Bindung an CD20 erklärt werden (Daten nicht gezeigt).

Das bispezifische F(ab')₂-Fragment Rit x APO-1 induziert bei den B-Lymphomzelllinien BJAB und C1R eine deutlich höhere Tumorzelllyse als die jeweilige Positivkontrolle (quervernetzter APO-1) (s. auch Abb. 3.29(a) und 3.29(b), S. 128). Die durch den kreuzvernetzten APO-1 induzierte Lyserate sollte eigentlich die maximal-erreichbare CD95-induzierte Apoptoserate darstellen. Insofern ist es zunächst verwunderlich, dass das Rit x APO-1 eine höhere Lyserate erreichen kann.

Für einige α CD20-Antikörper (unter anderem Rituxan) konnte jedoch gezeigt werden, dass sie in der Lage sind durch Bindung an CD20 ein direkte Apoptoseinduktion zu vermitteln. Dagegen konnte für den 2H7-Antikörper keine direkte Apoptoseinduktion beobachtet werden (s. Abb. 3.7, S. 99). Möglicherweise wird die für das Konstrukt Rit x APO-1 gezeigte Tumorzelllyse von BJAB und C1R-Zellen nicht allein durch den Todesrezeptor CD95 induziert, sondern setzt sich aus der Kombination einer CD20-vermittelten und einer CD95-induzierten Apoptose zusammen. Dies wird auch dadurch belegt, dass die maximale durch 2H7 x APO-1 erreichte Lyserate derjenigen des quervernetzten APO-1 entspricht.

Im Gegensatz zu gesunden Zellen kann es in Tumorzellen durch Aktivierung von Protoonkogenen und Verlust von Tumorsuppressorgenen zu einer Fehlregulation des Zellzyklus mit rascher Zellproliferation und Störung des Apoptoseweges kommen. Deshalb sind Tumorzellen in der Regel *per se* nur wenig sensitiv gegenüber CD95-induziertem Zelltod. Hierfür gibt es vielfältige Gründe wie die reduzierte Expression oder eine Mutation in den Todesrezeptoren selbst, oder in Molekülen die an der

intrazellulären Signalkaskade beteiligt sind.

Um näher an die klinische Situation von B-Zell-Lymphomen zu kommen wurde in dieser Arbeit versucht, ein sensitivierendes Agens für eine Kombination mit dem Rit x APO-1 im „insensitiveren“ Lymphommodell ausfindig zu machen. Dabei wurden Sensitivierer aus den verschiedensten Zytostatikagruppen, Steroidhormone, der monoklonale α CD20-Antikörper Rituxan sowie verschiedene andere Substanzen, für die in der Literatur ein Apoptose-sensitiverender Effekt bei Lymphomzellen beschrieben ist, getestet (s. Tabelle 3.30, S. 130). Dennoch konnte keine Substanz ausfindig gemacht werden die einen synergistischen Effekt auf die durch Rit x APO-1-induzierte Tumorzellyse hatte. Um auszuschließen, dass die Insensitivität gegen sensitivierende Substanzen auf eine Besonderheit der verwendeten Zelllinie zurückzuführen ist, wurde mit vier verschiedenen B-Lymphomzelllinien gearbeitet. Es scheint, dass die Sensitivität für eine CD95-vermittelte Apoptose der hier verwendeten B-Lymphomzelllinien nicht wesentlich durch sensitivierende Substanzen zu beeinflussen ist.

4.3.3 *In vivo* Immuntherapieversuche mit Rit x APO-1 im SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4

Bei den für das *in vivo* Maus-Modell verwendeten B-Lymphomzellen SKW6.4 handelt es sich um eine humane Zelllinie, weshalb mit immundefizienten Mäusen gearbeitet werden musste. Da ein SCID-Maus-Xenograft-Modell mit SKW6.4 in der Literatur bisher nicht beschrieben ist, wurde die Inokulation der Tumorzellen zunächst in Vorversuchen etabliert. Dabei wurde eine intravenöse Applikationsform der B-Lymphomzellen gewählt. Circa 3 Wochen nach Tumorzellinokulation zeigten die Tiere erste deutliche Lähmungserscheinungen der Hinterläufe und des Schwanzes. Diese Lähmungserscheinungen waren analog zu den bei SCID-Maus-Xenograft-Modellen mit den B-Lymphomzelllinien Raji oder Daudi beobachteten Symptomen [Hernandez-Ilizaliturri et al., 2003; Ghetie et al., 1990].

Von erkrankten Tieren konnten die Tumorzellen (SKW6.4) aus dem Knochenmark isoliert und kultiviert werden. Diese „SCID-SKW6.4“-Zellen wurden für die Inokulation bei allen *in vivo* Immuntherapieversuchen verwendet.

Anhand von Immuntherapieversuchen mit einem SCID-Maus-Xenograft-Modell konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig für ein bispezifisches F(ab')₂-Fragment mit Spezifität CD20 x APO-1 auch *in vivo* ein therapeutischer Effekt gezeigt werden. Dabei ist der Therapieeffekt des Rit x APO-1 vergleichbar mit dem des bereits klinisch eingesetzten monoklonalen α CD20-Antikörpers Rituxan.

Die Tatsache dass bei diesem Tierversuch gleiche Mengen des Rituxan und des Rit x APO-1 eingesetzt wurden stellt einen deutlichen Nachteil für das bispezifische $F(ab')_2$ -Fragment dar, da es im Vergleich zum intakten Antikörper Rituxan, aufgrund seiner deutlich geringeren Halbwertszeit im Blut, viel kürzer seine therapeutische Wirksamkeit im Tier vermitteln kann. Trotz dieser Nachteile ist der therapeutische Effekt des Rit x APO-1 mit dem für Rituxan beobachteten Effekt vergleichbar. Das Rit x APO-1 scheint somit auch *in vivo* äußerst effizient bei der Vermittlung einer Tumorzelllyse zu sein.

In den *in vivo* Immuntherapieversuchen dienten eine mit PBS behandelte Gruppe und eine mit einem äquimolaren Fab'-Mix behandelte Gruppe als Kontrollen. Dabei mussten alle PBS-Kontrolltiere sowie vier der sechs Fab'-Mix-Kontrolltiere bereits nach spätestens 22 Tagen aufgrund starker Lähmungserscheinungen getötet werden. Die Verwendung einer äquimolaren Mischung der im Rit x APO-1- $F(ab')_2$ enthaltenen Fab'-Fragmente diente dazu, die Erfordernis der Bispezifität zu beweisen. Dennoch überlebten zwei der mit dem Fab'-Mix behandelten Tiere. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der bei *in vitro* Versuchen gemachten Beobachtung, dass es bei hohen Konzentrationen des APO-1-Fab'-Fragmentes zu einer 25-30%igen Lyse der SKW6.4 kommt. Möglicherweise sind die in der APO-1-Fab'-Präparation enthaltenen Homodimer-Verunreinigungen auch *in vivo* für das beobachtete Überleben zweier der sechs Tiere verantwortlich.

Diese Tatsache verdeutlicht ein Problem der Verwendung solcher chemisch hybridisierter $F(ab')_2$ -Fragmente mit Spezifität Tumorantigen x CD95. Eine APO-1 Homodimerverunreinigung läßt sich bei der Herstellung der bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmente nicht ganz vermeiden. Im Falle solcher Homodimer-Verunreinigungen kommt es jedoch zu einer Zielantigen-unabhängigen Aktivierung der CD95-induzierten Apoptose, was bei einem therapeutischen Einsatz schwere Nebenwirkungen nach sich ziehen würde. Möglicherweise könnte dieses Problem durch Verwendung rekombinant hergestellter bispezifischer *single-chain* Antikörper mit Spezifität Tumorantigen x CD95 umgangen werden.

4.3.4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bispezifische $F(ab')_2$ -Fragmente sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Zielantigen-positiven CD95-sensitiven Tumorzellen effizient Apoptose induzieren können. Die Tatsache jedoch, dass in der klinischen Situation B-Lymphomzellen *per se* nur wenig sensitiv gegenüber CD95-induzierter Apoptose sind, könnte einen therapeutischen Einsatz solcher bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente mit Spezifität gegen CD95 und ein Tumorantigen

erschweren.

Ein interessanter Aspekt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass sich die durch das Rit x APO-1-Konstrukt vermittelte Apoptoseinduktion aus einer Kombination von CD20-vermittelter und CD95-vermittelter Apoptose zusammensetzt. Es ist nicht auszuschließen, dass in der klinischen Situation mit CD95-insensitiveren B-Lymphomzellen der Beitrag einer CD20-vermittelten Apoptoseinduktion eine sehr wichtige Rolle spielen könnte. Möglicherweise können bispezifische Antikörper wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden zu einer Kreuzvernetzung der CD20-Moleküle führen, was in einer effizienten CD20-vermittelten Apoptose resultiert.

Bei $F(ab')_2$ -Fragmenten mit Spezifität Tumorantigen x CD95 besteht immer die Gefahr, dass es zu einer Homodimerbildung kommt, was bei einem therapeutischen Einsatz schwere Nebenwirkungen nach sich ziehen würde. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, dieses Problem durch die Konstruktion eines bispezifischen *single-chain* Antikörpers mit Spezifität CD20 x APO-1 zu beheben. Ein Vorteil gegenüber der chemischen Hybridisierung liegt dabei in der genauen Kenntnis der Stöchiometrie der Fragmente. Unglücklicherweise war nicht nur die Produktion dieses Konstruktes ein großes Problem, sondern auch die Effektivität, was auf eine äußerst schwache Bindung der im Konstrukt enthaltenen scFv zurückzuführen war. In funktionellen Assays lies sich für diesen Antikörper nur eine marginale Tumorzelllyse beobachten und das chemisch hybridisierte Konstrukt war deutlich überlegen (Daten nicht gezeigt). Dennoch sollte weiter versucht werden einen funktionellen bispezifischen *single-chain* Antikörper mit Spezifität CD20 x APO-1 herzustellen. Hierbei wäre eine Inversion der im Konstrukt enthaltenen V_H und V_L -Domänen denkbar, oder aber die Verwendung anderer α CD20- bzw. α CD95-scFv.

Auch die Tatsache, dass bispezifische *single-chain* Antikörper bereits erfolgreich im transgenen Tier produziert werden [Grosse-Hovest et al., 2004; Grosse-Hovest et al., 2005] macht bispezifische *single-chain* Antikörper mit Spezifität Tumorantigen x APO-1 zu äußerst interessanten Reagenzien. Ein solches Konstrukt könnte nicht nur die Produktion vereinfachen und billiger machen, sondern auch wesentlich zur Sicherheit eines therapeutischen Einsatzes bispezifischer Tumorantigen x CD95-Konstrukte beitragen.

4.4 Stimulation des humanen Todesrezeptors CD95 mit einer Kombination aus 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt

Trotz aller Vorteile die ein Einsatz chemisch hybridisierter bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragmente mit sich bringt, ist die Produktion meist mit geringer Ausbeute bei Herstellung und Aufreinigung und somit hohem Produktionsaufwand verbunden, was bislang die rasche klinische Weiterentwicklung des bispezifischen Therapieansatzes ganz erheblich behinderte. Außerdem muss für jedes Zielantigen ein neues $F(ab')_2$ -Fragment aus den jeweiligen Ausgangsantikörpern hybridisiert werden. Diese Produktionsproblematik führte zu einem, in dieser Arbeit erstmalig untersuchten Ansatz: Ein rekombinanter monoklonaler Antikörper gegen ein Tumorantigen (hier CD20) wurde am C-Terminus mit dem c-myc-Epitop versehen und durch ein bispezifisches $F(ab')_2$ -Fragment mit Spezifität α_{myc} x CD95-Konstrukt eine CD95-vermittelte Apoptose in der Tumorzelle induziert (s. Abb. 3.32, S. 134).

Dieser Ansatz hat mehrere Vorteile: Rekombinante monoklonale Antikörper lassen sich ohne größere Probleme in großen Mengen produzieren und aufreinigen. Außerdem ermöglicht das rekombinante Format einen relativ einfachen Austausch der Tumorantigen-Spezifität. Der wesentliche Vorteil dieses Ansatzes ist, dass ein universell einsetzbares bispezifisches $F(ab')_2$ -Fragment α_{myc} x CD95-Konstrukt verwendet werden kann. Die Notwendigkeit für jedes Zielantigen durch chemische Kopplung ein neues bispezifisches $F(ab')_2$ -Fragment mit geringer Ausbeute und hohem Produktionsaufwand zu synthetisieren könnte dadurch umgangen werden.

4.4.1 Stimulation des Todesrezeptors CD95 durch die Kombination des 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass es möglich ist, den humanen Todesrezeptor CD95 mit einer Kombination des 2H7-IgG1-myc und einem bispezifischen α_{myc} x CD95-Konstrukt (9E10 x APO-1) zu stimulieren und eine CD95-induzierte Apoptose von CD95-positiven und sensitiven B-Lymphomzellen zu vermitteln (s. Abb. 3.36, S. 140 und Abb. 3.37, S. 141).

Auch im Falle dieser „indirekten“ Stimulation des Todesrezeptors CD95 ist eine Zielzellrestriktion gewährleistet. Eine alleinige Inkubation mit 9E10 x APO-1 zeigte auf

den C1R-Zellen keine unspezifische Lyse. Anhand eines Versuchsansatzes bei dem die Tumorzellen mit einem 2H7-IgG1 ohne c-myc-Epitop inkubiert wurden konnte eindeutig belegt werden, dass das c-myc-Epitop essentiell für eine Induktion der Tumorzelllyse ist (s. Abb. 3.37, S. 141). Das bispezifische F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 kann folglich nur dann eine CD95-induzierte Apoptose vermitteln, wenn es mit beiden Spezifitäten gleichzeitig an seine Zielantigene gebunden hat. Dies ist wieder mit der Tatsache zu erklären, dass der Todesrezeptor CD95 multimerisiert werden muss, um eine Rezeptor-vermittelte Apoptose der Zelle vermitteln zu können.

In allen Versuchen wurden die C1R-Zellen zunächst für 1 h mit dem 2H7-IgG1-myc inkubiert und anschließend 1x mit RPMI-Komplettmedium gewaschen (s. Abschnitt 3.4.5, S. 139). Ziel dieses Waschschrittes war es, ungebundenen 2H7-IgG1-myc aus dem Versuchsansatz zu entfernen, da ungebundener 2H7-IgG1-myc das bispezifische F(ab')₂-Fragment 9E10 x APO-1 bereits im Medium abfangen würde. Ein solcher Waschschritt entspräche auch der *in vivo* Situation. Würde man solch eine Kombination *in vivo* verabreichen, so würde man ebenfalls zuerst den 2H7-IgG1-myc applizieren und einige Zeit warten um eine spezifische Bindung des 2H7-IgG1-myc an sein Zielantigen CD20 zu ermöglichen. Außerdem müsste sichergestellt sein, dass ungebundene c-myc-markierte Primärantikörper weitestgehend aus der Blutzirkulation entfernt wären.

4.4.2 „Direkte“ versus „indirekte“ Stimulation des Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten

Das „direkte“ Pendant zur „indirekten“ Stimulation des CD95-Todesrezeptors mit einer Kombination des 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 ist das bispezifische F(ab')₂-Fragment 2H7 x APO-1. Ein Vergleich der CD95-induzierten Tumorzelllyse 2H7 x APO-1-behandelter versus 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 behandelter Zellen zeigte interessanterweise, dass sowohl das bispezifische F(ab')₂-Fragment 2H7 x APO-1 als auch eine Kombination aus 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 *in vitro* eine vergleichbare Effizienz bei der Vermittlung einer CD95-induzierten Apoptose zeigten. Dies ist erstaunlich, da es sich beim α CD20-Antikörper 2H7-IgG1-myc als auch beim anti-c-myc-Antikörper 9E10 der im bispezifischen F(ab')₂-Konstrukt enthalten ist um sehr schwach affine Antikörper handelt und man eigentlich erwartet hätte, dass die Kombination 2H7-IgG1-myc + 9E10 x APO-1 weniger effizient bei der CD95-induzierten Tumorzelllyse ist als das 2H7 x APO-1.

Möglicherweise spielen bei den beiden Ansätzen verschiedene sterische Effekte eine Rolle. Aufgrund der Kombination eines monoklonalen Antikörpers mit einem

bispezifischen F(ab')₂-Fragment versus alleiniger Verwendung eines bispezifischen F(ab')₂-Fragmentes läßt sich eine unterschiedliche Sterik bei der Bindung erwarten. Rein hypothetisch könnte die spezielle Sterik bei einer Kombination des 2H7-myc + 9E10 x APO-1 zu einer verbesserten Multimerisierung des CD95-Rezeptors beitragen und dadurch die Nachteile der Verwendung einer Kombination zweier schwach affiner Antikörper aufheben.

4.4.3 Fazit und Ausblick

Anhand dieser ersten Versuche mit einer Kombination des 2H7-IgG1-myc und dem bispezifischen 9E10 x APO-1-Konstrukt konnte deutlich gezeigt werden, dass solch eine Kombination aus einem tumorspezifischen IgG1-myc Antikörper und einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment α -c-myc x α CD95 eine durchaus interessante Alternative zur Verwendung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente mit Spezifität Tumorantigen x CD95 darstellen könnte.

Ein interessanter Ansatzpunkt für eine Verbesserung der Effektivität der Kombination 2H7-myc + 9E10 x APO-1 wäre die Verwendung eines hochaffinen α -c-myc-Antikörpers sowie eines affineren α CD20-Antikörpers. Alternativ jedoch wäre die Verwendung eines α CD20-Antikörpers der in der Lage ist, eine Apoptoseinduktion *per se* zu vermitteln. Hierbei wäre es möglich die Effekte einer CD95-induzierten mit einer CD20-induzierten Tumorzelllyse zu kombinieren.

Die Kombination eines tumorspezifischen IgG1-myc Antikörpers mit einem bispezifischen F(ab')₂-Fragment α -c-myc x α CD95 beinhaltet viel therapeutisches Potential. Durch diesen Ansatz wird es theoretisch möglich, die Effektorfunktionen eines monoklonalen Antikörpers (ADCC, CDC und evtl. Apoptoseinduktion) mit der durch ein bispezifisches F(ab')₂-Fragment vermittelten Zielzell-restringierten Stimulation des Todesrezeptor CD95 zu kombinieren.

Ob eine solche Kombination von Effektorfunktionen überhaupt möglich ist, oder ob die Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers ADCC und CDC zu vermitteln durch die Bindung eines F(ab')₂-Fragmentes α -c-myc x α CD95 eher behindert werden würde, bleibt abzuwarten.

Mit dieser Arbeit wurde ein erster erfolgsversprechender Schritt in eine neue Richtung auf dem Gebiet der Zielzell-abhängigen Aktivierung des Todesrezeptors CD95 mit bispezifischen Antikörpern gemacht.

Kapitel 5

Literaturverzeichnis

- Adams, G. P. and Weiner, L. M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.*, 23(9):1147–1157.
- Allen, T. M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2(10):750–763.
- Allison, J. P. (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 6(3):414–419.
- Anderson, K. C., Bates, M. P., Slaughenhaupt, B. L., Pinkus, G. S., Schlossman, S. F., and Nadler, L. M. (1984). Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*, 63(6):1424–1433.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381):1305–1308.
- Beau, M. M. L. (1990). Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas. *Semin. Oncol.*, 17(1):20–29.
- Begent, R. H., Keep, P. A., Green, A. J., Searle, F., Bagshawe, K. D., Jewkes, R. F., Jones, B. E., Barratt, G. M., and Ryman, B. E. (1982). Liposomally entrapped second antibody improves tumour imaging with radiolabelled (first) antitumour antibody. *Lancet*, 2(8301):739–742.
- Besenfelder, U. and Brem, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, 99(1):53–56.
- Beyersdorf, N., Hanke, T., Kerkau, T., and Hunig, T. (2005). Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 64 Suppl 4:iv91–iv95.
- Bhakdi, S. and Trandum-Jensen, J. (1991). Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today*, 12(9):318–320.
- Bjorck, L. (1988). Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J. Immunol.*, 140(4):1194–1197.

- Bosma, G. C., Custer, R. P., and Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301(5900):527–530.
- Boulianne, G. L., Hozumi, N., and Shulman, M. J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, 312(5995):643–646.
- Brandl, M., Grosse-Hovest, L., Holler, E., Kolb, H. J., and Jung, G. (1999). Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma. *Exp. Hematol.*, 27(8):1264–1270.
- Brekke, O. H. and Loset, G. A. (2003). New technologies in therapeutic antibody development. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 3(5):544–550.
- Brennan, M., Davison, P. F., and Paulus, H. (1985). Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*, 229(4708):81–83.
- Bubien, J. K., Zhou, L. J., Bell, P. D., Frizzell, R. A., and Tedder, T. F. (1993). Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 121(5):1121–1132.
- Burton, D. R. and Woof, J. M. (1992). Human antibody effector function. *Adv. Immunol.*, 51:1–84.
- C. A. Leath, I., Douglas, J. T., Curiel, D. T., and Alvarez, R. D. (2004). Single-chain antibodies: A therapeutic modality for cancer gene therapy (review). *Int. J. Oncol.*, 24(4):765–771.
- Cardarelli, P. M., Quinn, M., Buckman, D., Fang, Y., Colcher, D., King, D. J., Bebbington, C., and Yarranton, G. (2002). Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')₂ is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.*, 51(1):15–24.
- Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.*, 6(5):343–357.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99(3):754–758.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*, 263(5154):1759–1762.
- Clement, M. V., Hirpara, J. L., Chawdhury, S. H., and Pervaiz, S. (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, 92(3):996–1002.

- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6(4):443–446.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 326 (Pt 1):1–16.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Den, N. E. V., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., and Gisselbrecht, C. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 346(4):235–242.
- Cooper, N. R. (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.*, 37:151–216.
- Cosman, D. (1994). A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells*, 12(5):440–455.
- Daeron, M. (1997). Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203–234.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Wautier, H., and Thibault, G. (2004). Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.*, 64(13):4664–4669.
- Davies, J., Jiang, L., Pan, L. Z., LaBarre, M. J., Anderson, D., and Reff, M. (2001). Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol. Bioeng.*, 74(4):288–294.
- Davis, T. A., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., McLaughlin, P., Czuczman, M. S., Link, B. K., Maloney, D. G., Weaver, R. L., Rosenberg, J., and Levy, R. (2000). Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J. Clin. Oncol.*, 18(17):3135–3143.
- Davis, T. A., Kaminski, M. S., Leonard, J. P., Hsu, F. J., Wilkinson, M., Zelenetz, A., Wahl, R. L., Kroll, S., Coleman, M., Goris, M., Levy, R., and Knox, S. J. (2004). The radioisotope contributes significantly to the activity of radioimmunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 10(23):7792–7798.
- Deans, J. P., Schieven, G. L., Shu, G. L., Valentine, M. A., Gilliland, L. A., Aruffo, A., Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1993). Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2. *J. Immunol.*, 151(9):4494–4504.
- Demidem, A., Lam, T., Alas, S., Hariharan, K., Hanna, N., and Bonavida, B. (1997). Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 12(3):177–186.

- den Hove, L. E. V., Vandenberghe, P., Gool, S. W. V., Ceuppens, J. L., Demuyneck, H., Verhoef, G. E., and Boogaerts, M. A. (1998). Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: evidence for systemic activation of the T cell compartment. *Leuk. Res.*, 22(2):175–184.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13(3):239–252.
- Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P., and Krammer, P. H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.*, 149(10):3166–3173.
- Dillman, R. O., Beauregard, J. C., Sobol, R. E., Royston, I., Bartholomew, R. M., Hagan, P. S., and Halpern, S. E. (1984). Lack of radioimmunodetection and complications associated with monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibody cross-reactivity with an antigen on circulating cells. *Cancer Res.*, 44(5):2213–2218.
- Dreier, T., Baeuerle, P. A., Fichtner, I., Grun, M., Schlereth, B., Lorenczewski, G., Kufer, P., Lutterbuse, R., Riethmuller, G., Gjorstrup, P., and Bargou, R. C. (2003). T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3- bispecific single-chain antibody construct. *J. Immunol.*, 170(8):4397–4402.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1):33–42.
- Du, M. Q., Diss, T. C., Liu, H., Ye, H., Hamoudi, R. A., Cabecadas, J., Dong, H. Y., Harris, N. L., Chan, J. K., Rees, J. W., Dogan, A., and Isaacson, P. G. (2002). *Blood*, 100(9):3415–3418.
- Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., and Winter, G. (1988). Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature*, 332(6164):563–564.
- Edelman, G. M. (1991). Antibody structure and molecular immunology. *Scand. J. Immunol.*, 34(1):1–22.
- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., and Waxdal, M. J. (1969). The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 63(1):78–85.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82(1):70–77.
- Evans, E. J., Esnouf, R. M., Manso-Sancho, R., Gilbert, R. J., James, J. R., Yu, C., Fennelly, J. A., Vowles, C., Hanke, T., Walse, B., Hunig, T., Sorensen, P.,

- Stuart, D. I., and Davis, S. J. (2005). Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat. Immunol.*, 6(3):271–279.
- Ferrara, C., Stuart, F., Sonderrmann, P., Brunker, P., and Umana, P. (2006). The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.*, 281(8):5032–5036.
- Fillola, G., Muller, C., Bousquet, R., Fontanilles, A. M., Laharrague, P., and Corberand, J. X. (1996). Isolation of bone marrow plasma cells by negative selection with immunomagnetic beads. *J. Immunol. Methods*, 190(1):127–131.
- Floros, K. V., Talieri, M., and Scorilas, A. (2006). Topotecan and methotrexate alter expression of the apoptosis-related genes BCL2, FAS and BCL2L12 in leukemic HL-60 cells. *Biol. Chem.*, 387(12):1629–1633.
- Floss, D. M., Falkenburg, D., and Conrad, U. (2007). Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res.*, 16(3):315–332.
- Foon, K. A., Rai, K. R., and Gale, R. P. (1990). Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. *Ann. Intern. Med.*, 113(7):525–539.
- Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Gribben, J. G., Ng, J. W., Kim, J., Goldberg, J. M., Hathcock, K., Laszlo, G., and . (1993). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Exp. Med.*, 178(6):2185–2192.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., and Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.*, 2(5):574–577.
- Frydecka, I., Kosmaczewska, A., Bocko, D., Ciszak, L., Wolowiec, D., Kuliczkowski, K., and Kochanowska, I. (2004). Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Cancer*, 90(10):2042–2048.
- Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K. M. (2000). Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res.*, 60(14):3947–3956.
- Gaetano, N. D., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol.*, 171(3):1581–1587.
- Genot, E. (1994). Interferon alpha and intracytoplasmic free calcium in hairy cell leukemia cells. *Leuk. Lymphoma*, 12(5-6):373–381.

- Ghetie, M. A., Bright, H., and Vitetta, E. S. (2001). Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood*, 97(5):1392–1398.
- Ghetie, M. A., Richardson, J., Tucker, T., Jones, D., Uhr, J. W., and Vitetta, E. S. (1990). Disseminated or localized growth of a human B-cell tumor (Daudi) in SCID mice. *Int. J. Cancer*, 45(3):481–485.
- Glennie, M. J. and Johnson, P. W. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol. Today*, 21(8):403–410.
- Glennie, M. J., McBride, H. M., Worth, A. T., and Stevenson, G. T. (1987). Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J. Immunol.*, 139(7):2367–2375.
- Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., and Introna, M. (2001). CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*, 98(12):3383–3389.
- Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., and . (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.*, 7(1):13–21.
- Grosse-Hovest, L., Hartlapp, I., Marwan, W., Brem, G., Rammensee, H. G., and Jung, G. (2003). A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *Eur. J. Immunol.*, 33(5):1334–1340.
- Grosse-Hovest, L., Muller, S., Minoia, R., Wolf, E., Zakhartchenko, V., Wenigerkind, H., Lassnig, C., Besenfelder, U., Muller, M., Lytton, S. D., Jung, G., and Brem, G. (2004). Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(18):6858–6863.
- Grosse-Hovest, L., Wick, W., Minoia, R., Weller, M., Rammensee, H. G., Brem, G., and Jung, G. (2005). Supraagonistic, bispecific single-chain antibody purified from the serum of cloned, transgenic cows induces T-cell-mediated killing of glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer*, 117(6):1060–1064.
- Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R., and Kranz, D. M. (1994). Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.*, 152(11):5368–5374.
- Hainsworth, J. D., Litchy, S., H. A. Burris, I., D. C. Scullin, J., Corso, S. W., Yardley, D. A., Morrissey, L., and Greco, F. A. (2002). Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 20(20):4261–4267.

- Hansen, J. A., Martin, P. J., C., R., and Nowinski (1980). Monoclonal antibodies identifying a novel T cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. *Immunogenetics*, 10:247–260.
- Hara, T., Fu, S. M., and Hansen, J. A. (1985). Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.*, 161(6):1513–1524.
- Hardell, L. and Eriksson, M. (1999). A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer*, 85(6):1353–1360.
- Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Jupudy, V., Ostberg, J., Oflazoglu, E., Huberman, A., Repasky, E., and Czuczman, M. S. (2003). Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin. Cancer Res.*, 9(16 Pt 1):5866–5873.
- Herrmann, T., Grosse-Hovest, L., Otz, T., Krammer, P., Rammensee, H., and Jung, G. (2007). Construction of optimized bispecific antibodies for selective activation of the death receptor CD95. *Cancer Research*, in press.
- Holliger, P. and Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.*, 23(9):1126–1136.
- Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. (1993). Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(14):6444–6448.
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.*, 23(9):1105–1116.
- Idusogie, E. E., Presta, L. G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P. Y., Ultsch, M., Meng, Y. G., and Mulkerrin, M. G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.*, 164(8):4178–4184.
- Imai, K. and Takaoka, A. (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6(9):714–727.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268(15):10932–10937.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66(2):233–243.
- Jain, R. K. and Baxter, L. T. (1988). Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res.*, 48(24 Pt 1):7022–7032.

- Jazirehi, A. R. and Bonavida, B. (2004). Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.*, 3(1):71–84.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Prog.*, 21(1):11–16.
- Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y., and Takahashi, N. (1990). A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins. *Biochem. J.*, 268(3):529–537.
- Jenkins, N. and Curling, E. M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.*, 16(5):354–364.
- Jensen, M., Winkler, U., Manzke, O., Diehl, V., and Engert, A. (1998). Rapid tumor lysis in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphocytosis treated with an anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab). *Ann. Hematol.*, 77(1-2):89–91.
- Johnson, P. and Glennie, M. (2003). The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin. Oncol.*, 30(1 Suppl 2):3–8.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069):522–525.
- Jonge, J. D., Heirman, C., de Veerman, M., Meirvenne, S. V., Moser, M., Leo, O., and Thielemans, K. (1998). In vivo retargeting of T cell effector function by recombinant bispecific single chain Fv (anti-CD3 x anti-idiotypic) induces long-term survival in the murine BCL1 lymphoma model. *J. Immunol.*, 161(3):1454–1461.
- June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M., and Thompson, C. B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today*, 15(7):321–331.
- Jung, G., Freimann, U., Marschall, Z. V., Reisfeld, R. A., and Wilmanns, W. (1991). Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments. *Eur. J. Immunol.*, 21(10):2431–2435.
- Jung, G., Grosse-Hovest, L., Krammer, P. H., and Rammensee, H. G. (2001). Target cell-restricted triggering of the CD95 (APO-1/Fas) death receptor with bispecific antibody fragments. *Cancer Res.*, 61(5):1846–1848.
- Jung, G., Ledbetter, J. A., and Muller-Eberhard, H. J. (1987a). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84(13):4611–4615.
- Jung, G., Martin, D. E., and Muller-Eberhard, H. J. (1987b). Induction of cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells by monoclonal antibody OKT3. *J. Immunol.*, 139(2):639–644.

- Kabore, A. F., Sun, J., Hu, X., McCrea, K., Johnston, J. B., and Gibson, S. B. (2006). The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis*, 11(7):1175–1193.
- Keating, M. J., Flinn, I., Jain, V., Binet, J. L., Hillmen, P., Byrd, J., Albitar, M., Brettman, L., Santabarbara, P., Wacker, B., and Rai, K. R. (2002). Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*, 99(10):3554–3561.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4):239–257.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497.
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Schuhmacher, J., Cochlovius, B., der Lieth, C. W., Matys, E. R., and Little, M. (1999). Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J. Mol. Biol.*, 293(1):41–56.
- Kirschenbaum, D. M. (1975). Molar absorptivity and A 1 per cent 1 cm values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. XI. *Anal. Biochem.*, 68(2):465–484.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, 14(22):5579–5588.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.*, 276(49):46639–46646.
- Krammer, P. H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.*, 71:163–210.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 21(24):8247–8254.
- Kunicka, J. E. and Platsoucas, C. D. (1988). Defective helper function of purified T4 cells and excessive suppressor activity of purified T8 cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. T4 suppressor effector cells are present in certain patients. *Blood*, 71(6):1551–1560.
- Kurucz, I., Titus, J. A., Jost, C. R., Jacobus, C. M., and Segal, D. M. (1995). Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria. *J. Immunol.*, 154(9):4576–4582.

- Kutuk, O. and Basaga, H. (2004). Aspirin inhibits TNFalpha- and IL-1-induced NF-kappaB activation and sensitizes HeLa cells to apoptosis. *Cytokine*, 25(5):229–237.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lafferty, K. J. and Cunningham, A. J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 53(1):27–42.
- Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J., and Phillips, J. H. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.*, 141(10):3478–3485.
- Lanzavecchia, A. and Scheidegger, D. (1987). The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 17(1):105–111.
- Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P. H. (2005). Death receptor signaling. *J. Cell Sci.*, 118(Pt 2):265–267.
- Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., and Dahiyat, B. I. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(11):4005–4010.
- Lee, Y. and Shacter, E. (2001). Fas aggregation does not correlate with Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.*, 167(1):82–89.
- Lesslauer, W., Koning, F., Ottenhoff, T., Giphart, M., Goulmy, E., and van Rood, J. J. (1986). T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 16(10):1289–1296.
- Li, Q. B. and Guy, C. L. (1996). Prolonged final extension time increases cloning efficiency of PCR products. *Biotechniques*, 21(2):192, 196.
- Lifely, M. R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M. J., and Phillips, J. (1995). Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology*, 5(8):813–822.
- Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.*, 11:191–212.
- Liu, M. A., Kranz, D. M., Kurnick, J. T., Boyle, L. A., Levy, R., and Eisen, H. N. (1985). Heteroantibody duplexes target cells for lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82(24):8648–8652.
- Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.*, 23(9):1117–1125.

- Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K. M., Guntermann, C., Muller, I., Winkler, E., Kerkau, T., Ikemizu, S., Davis, S. J., Hanke, T., and Hunig, T. (2003). Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med.*, 197(8):955–966.
- Maiorella, B. L., Winkelhake, J., Young, J., Moyer, B., Bauer, R., Hora, M., Andya, J., Thomson, J., Patel, T., and Parekh, R. (1993). Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity. *Biotechnology (N. Y.)*, 11(3):387–392.
- Mallender, W. D. and E. W. Voss, J. (1994). Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody. *J. Biol. Chem.*, 269(1):199–206.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, 222(3):581–597.
- Martinou, J. C. and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(1):63–67.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301):552–554.
- McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., and Dallaire, B. K. (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.*, 16(8):2825–2833.
- Milstein, C. and Cuello, A. C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*, 305(5934):537–540.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2):231–238.
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81(21):6851–6855.
- Nadler, L. M., Ritz, J., Hardy, R., Pesando, J. M., Schlossman, S. F., and Stashenko, P. (1981). A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J. Clin. Invest.*, 67(1):134–140.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3):355–365.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267(5203):1449–1456.

- Nitta, T., Yagita, H., Azuma, T., Sato, K., and Okumura, K. (1989). Bispecific F(ab')₂ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytolysis of human T cells. *Eur. J. Immunol.*, 19(8):1437–1441.
- Niwa, R., Hatanaka, S., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Yokoi, H., Nakamura, K., and Shitara, K. (2004). Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clin. Cancer Res.*, 10(18 Pt 1):6248–6255.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., and . (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 267(15):10709–10715.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364(6440):806–809.
- Parham, P. (1983). On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J. Immunol.*, 131(6):2895–2902.
- Parren, P. W., Warmerdam, P. A., Boeijs, L. C., Arts, J., Westerdaal, N. A., Vlug, A., Capel, P. J., Aarden, L. A., and van de Winkel, J. G. (1992). On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J. Clin. Invest.*, 90(4):1537–1546.
- Peipp, M. and Valerius, T. (2002). Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 30(4):507–511.
- Platsoucas, C. D., Galinski, M., Kempin, S., Reich, L., Clarkson, B., and Good, R. A. (1982). Abnormal T lymphocyte subpopulations in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia: an analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 129(5):2305–2312.
- Preithner, S., Elm, S., Lippold, S., Locher, M., Wolf, A., da Silva, A. J., Baeuerle, P. A., and Prang, N. S. (2006). High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G. *Mol. Immunol.*, 43(8):1183–1193.
- Preval, C. D., Pink, J. R., and Milstein, C. (1970). Variability of interchain binding of immunoglobulins. Interchain bridges of mouse IgG2a and IgG2b. *Nature*, 228(5275):930–932.
- Raju, T. S., Briggs, J. B., Borge, S. M., and Jones, A. J. (2000). Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation

- and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, 10(5):477–486.
- Rathmell, J. C. and Thompson, C. B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 17:781–828.
- Redpath, S., Michaelsen, T. E., Sandlie, I., and Clark, M. R. (1998). The influence of the hinge region length in binding of human IgG to human Fcγ receptors. *Hum. Immunol.*, 59(11):720–727.
- Reiter, Y., Wright, A. F., Tonge, D. W., and Pastan, I. (1996). Recombinant single-chain and disulfide-stabilized Fv-immunotoxins that cause complete regression of a human colon cancer xenograft in nude mice. *Int. J. Cancer*, 67(1):113–123.
- Riley, J. K. and Sliwkowski, M. X. (2000). CD20: a gene in search of a function. *Semin. Oncol.*, 27(6 Suppl 12):17–24.
- Rose, A. L., Smith, B. E., and Maloney, D. G. (2002). Glucocorticoids and rituximab in vitro: synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. *Blood*, 100(5):1765–1773.
- Rossi, E., Matutes, E., Morilla, R., Owusu-Ankomah, K., Heffernan, A. M., and Catovsky, D. (1996). Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 10(3):494–497.
- Rudd, C. E., Janssen, O., Cai, Y. C., da Silva, A. J., Raab, M., and Prasad, K. V. (1994). Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today*, 15(5):225–234.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(12):5463–5467.
- Sarmay, G., Lund, J., Rozsnyay, Z., Gergely, J., and Jefferis, R. (1992). Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc gamma receptor. *Mol. Immunol.*, 29(5):633–639.
- Savill, J. and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805):784–788.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 17(6):1675–1687.
- Schachter, H. (2000). The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj. J.*, 17(7-9):465–483.
- Schlamowitz, M. and Peterson, L. U. (1959). Studies on the optimum pH for the action of pepsin on native and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 234:3137–3145.

- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32(11-12):1123–1136.
- Schuster, M., Umana, P., Ferrara, C., Brunker, P., Gerdes, C., Waxenecker, G., Wiederkum, S., Schwager, C., Loibner, H., Himmler, G., and Mudde, G. C. (2005). Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res.*, 65(17):7934–7941.
- Shan, D., Ledbetter, J. A., and Press, O. W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*, 91(5):1644–1652.
- Sharkey, R. M. and Goldenberg, D. M. (2006). Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J. Clin.*, 56(4):226–243.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O’Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277(30):26733–26740.
- Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ₁, Fc γ₂, Fc γ₃, and FcR_n and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ₃. *J. Biol. Chem.*, 276(9):6591–6604.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 278(5):3466–3473.
- Siefken, R., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Kurrle, R., and Schwinzer, R. (1998). A CD28-associated signaling pathway leading to cytokine gene transcription and T cell proliferation without TCR engagement. *J. Immunol.*, 161(4):1645–1651.
- Sohn, D. (2007). *Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion: Modulation der Aktivierung von Initiator-Caspasen*. Thesis/dissertation.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000). The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ₃ complex. *Nature*, 406(6793):267–273.
- Songsivilai, S. and Lachmann, P. J. (1990). Bispecific antibody: a tool for diagnosis and treatment of disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 79(3):315–321.
- Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12(6):599–609.

- Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R., and Schlossman, S. F. (1980). Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.*, 125(4):1678–1685.
- Stieglmaier, J. (2007). *Entwicklung und Charakterisierung unterschiedlicher Antikörper-basierter Therapeutika zur Behandlung CD19-positiver Leukämien*. PhD thesis.
- Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., and Panoskaltis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.*, 355(10):1018–1028.
- Suzuki, E., Umezawa, K., and Bonavida, B. (2007). Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 26(42):6184–6193.
- Svasti, J. and Milstein, C. (1970). Interchain bridges of mouse IgG1. *Nature*, 228(5275):932–934.
- Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T., and Hunig, T. (1997). CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol.*, 27(1):239–247.
- Tedder, T. F., Boyd, A. W., Freedman, A. S., Nadler, L. M., and Schlossman, S. F. (1985). The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. *J. Immunol.*, 135(2):973–979.
- Tedder, T. F., Disteche, C. M., Louie, E., Adler, D. A., Croce, C. M., Schlossman, S. F., and Saito, H. (1989a). The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site. *J. Immunol.*, 142(7):2555–2559.
- Tedder, T. F. and Engel, P. (1994). CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today*, 15(9):450–454.
- Tedder, T. F., Klejman, G., Disteche, C. M., Adler, D. A., Schlossman, S. F., and Saito, H. (1988). Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19. *J. Immunol.*, 141(12):4388–4394.
- Tedder, T. F., Klejman, G., Schlossman, S. F., and Saito, H. (1989b). Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J. Immunol.*, 142(7):2560–2568.
- Thommesen, J. E., Michaelsen, T. E., Loset, G. A., Sandlie, I., and Brekke, O. H. (2000). Lysine 322 in the human IgG3 C(H)2 domain is crucial for antibody dependent complement activation. *Mol. Immunol.*, 37(16):995–1004.

- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203):1456–1462.
- Totterman, T. H., Carlsson, M., Simonsson, B., Bengtsson, M., and Nilsson, K. (1989). T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. *Blood*, 74(2):786–792.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245(4915):301–305.
- Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., and Bailey, J. E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.*, 17(2):176–180.
- van Sorge, N. M., van der Pol, W. L., and van de Winkel, J. G. (2003). FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*, 61(3):189–202.
- Vega, M. I., Huerta-Yepez, S., Jazirehi, A. R., Garban, H., and Bonavida, B. (2005). Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene*, 24(55):8114–8127.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIA-BLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1):43–53.
- Vugmeyster, Y. and Howell, K. (2004). Rituximab-mediated depletion of cynomolgus monkey B cells in vitro in different matrices: possible inhibitory effect of IgG. *Int. Immunopharmacol.*, 4(8):1117–1124.
- Walczak, H., Bouchon, A., Stahl, H., and Krammer, P. H. (2000). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res.*, 60(11):3051–3057.
- Weng, W. K. and Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 21(21):3940–3947.
- Wilson, C. M. (1983). Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol.*, 91:236–247.
- Wilson, W. H., Sorbara, L., Figg, W. D., Mont, E. K., Sausville, E., Warren, K. E., Balis, F. M., Bauer, K., Raffeld, M., Senderowicz, A. M., and Monks, A. (2000). Modulation of clinical drug resistance in a B cell lymphoma patient by the protein kinase inhibitor 7-hydroxystaurosporine: presentation of a novel therapeutic paradigm. *Clin. Cancer Res.*, 6(2):415–421.

- Winkler, U., Jensen, M., Manzke, O., Schulz, H., Diehl, V., and Engert, A. (1999). Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood*, 94(7):2217–2224.
- Witzig, T. E., Gordon, L. I., Cabanillas, F., Czuczman, M. S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B. L., Bartlett, N. L., Wiseman, G. A., Padre, N., Grillo-Lopez, A. J., Multani, P., and White, C. A. (2002). Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin’s lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 20(10):2453–2463.
- Wolf, H., Muller, Y., Salmen, S., Wilmanns, W., and Jung, G. (1994). Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 24(6):1410–1417.
- Wu, T. T. and Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.*, 132(2):211–250.
- Wurdinger, T., Verheije, M. H., Raaben, M., Bosch, B. J., de Haan, C. A., van Beusechem, V. W., Rottier, P. J., and Gerritsen, W. R. (2005). Targeting non-human coronaviruses to human cancer cells using a bispecific single-chain antibody. *Gene Ther.*, 12(18):1394–1404.
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., Wakitani, M., Niwa, R., Sakurada, M., Uchida, K., Shitara, K., and Satoh, M. (2004). Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 87(5):614–622.
- Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 169(5):1747–1756.
- Zaharieva, M. M., Konstantinov, S. M., Pilicheva, B., Karaivanova, M., and Berger, M. R. (2007). Erufosine: a membrane targeting antineoplastic agent with signal transduction modulating effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1095:182–192.
- Zakhartchenko, V., Mueller, S., Alberio, R., Schernthaner, W., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., Wanke, R., Lassnig, C., Mueller, M., Wolf, E., and Brem, G. (2001). Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.*, 60(3):362–369.
- Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(1):67–71.

Kapitel 6

Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
mAk	monoklonaler Antikörper
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxi- zität
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
bs	bispezifisch
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
C_H	konstante Region der schweren Kette
C_L	konstante Region der leichten Kette
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
CDR	complementary-determining region
CDC	complement-dependent cytotoxicity Komplement-vermittelte Zytoxizität
CHO	chinese hamster ovary
Ci	Curie
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cpm	counts per minute
Cr	Chrom
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
d	Dezi
Da	Dalton
DD	death domain

DED	Todesdomäne death effector domain
	Todeseffektordomäne
DTNB	Dithiobisnitrobenzoesäure
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat
DISC	death-inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
dsFv	Disulfid-stabilisiertes scFv
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
E:T	Effektor-zu-Zielzell (target)
Fab	fragment antigen-binding
F(ab') ₂	Produkt eines Antikörpers nach Proteolyse mit Pepsin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
Fc	fragment crystallizable
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
Fuc	Fucose
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FucT	Fucosyl-Transferase
g	Gramm / relative Erdbeschleunigung
G	Glycin / Guanosin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GnTIII	β 1-4 N-Acetylglucosaminyl-Transferase III
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
°C	Grad Celcius
h	Stunde
HAMA	human anti-Maus Antikörper (human anti-mouse antibody)
HRP	horseradish peroxidase Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activation motive

ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibition motive
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
κ	κ -Kette von Ig
l	Liter
m	Milli / Meter
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MAC	membrane-attack complex
Man	mannose
min	Minute
n	Nano / Anzahl der durchgeführten Expe- rimente
NG2	neural glial antigen Antigen auf Melanomzellen
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen
PCR	polymerase chain reaction Polymerase Kettenreaktion
R-PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
r28M	rekombinanter bispezifischer <i>single-chain</i> Antikörper mit Spezifität CD28 x NG2
r2820	rekombinanter bispezifischer <i>single-chain</i> Antikörper mit Spezifität CD28 x CD20
S	Serin
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
scFv	single-chain fragment variable
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TNB ²⁻	Dianion der Thionitrobenzoesäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	unit
V/D/J	variable diversity joining region
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume
x	mal

6.2 Vektorkarten

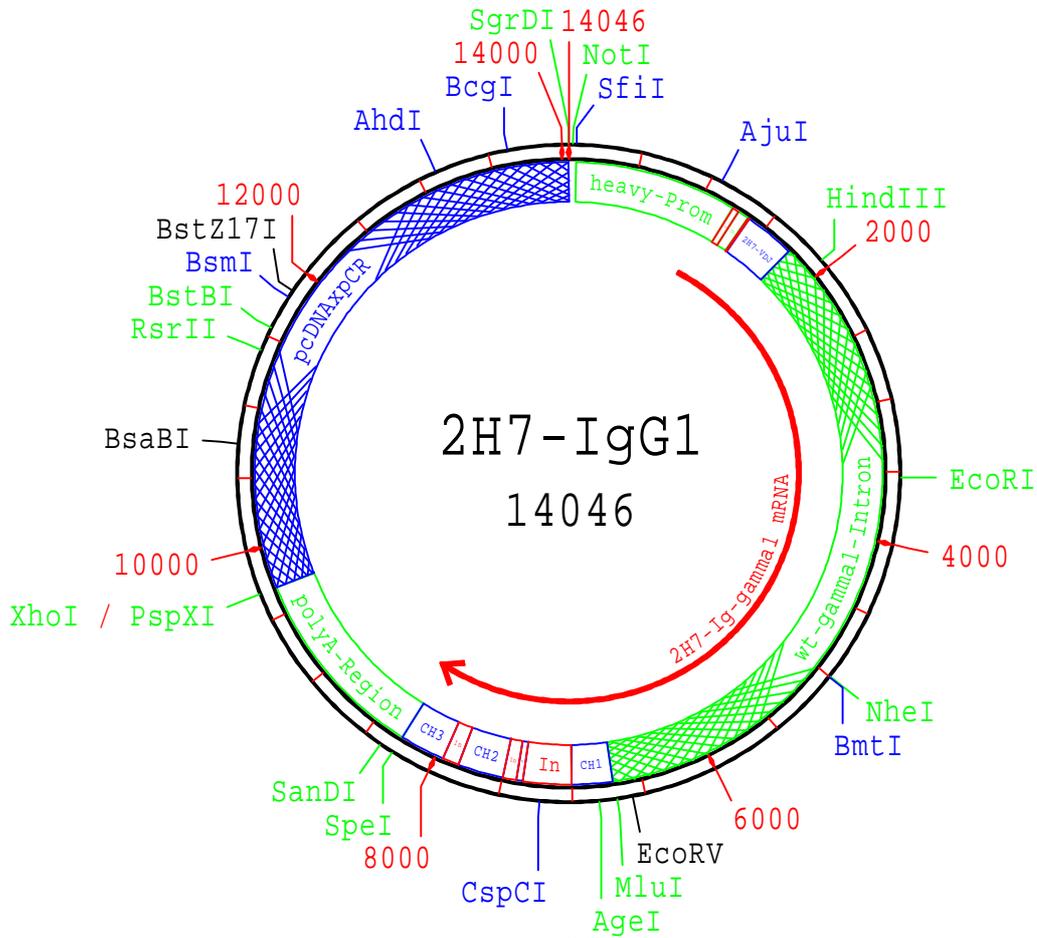


Abb. 6.1: *2H7-IgG1*

Expressionsvektor für die schwere Kette des chimären α -human CD20 IgG1-Antikörpers 2H7. Der Vektor ist identisch mit dem Vektor *2H7-IgG1-Fc-mut* (s. Abb. 2.6 S. 59), besitzt aber keine Schnittstelle für die Rhinovirus-3C-Protease im Fc-Teil.

heavy-Prom: Promoter der schweren Kette von Antikörpern; L1: *Leader* (codiert für das Signal-Peptid); 2H7-VDJ: Exon der variablen Domäne (V_H) der schweren Kette des 2H7-Antikörpers; wt-gamma1-Intron: Wildtyp-Intron von IgG1-Antikörpern mit *enhancer* Elementen; CH1, CH2, CH3: C_{H1} , C_{H2} bzw. C_{H3} -Exon; Poly-A: Polyadenylierungssequenz; pcDNAxpCR: Vektorgerüst aus den Standardvektoren pcDNA3 und PCR-Script; In: Intron.

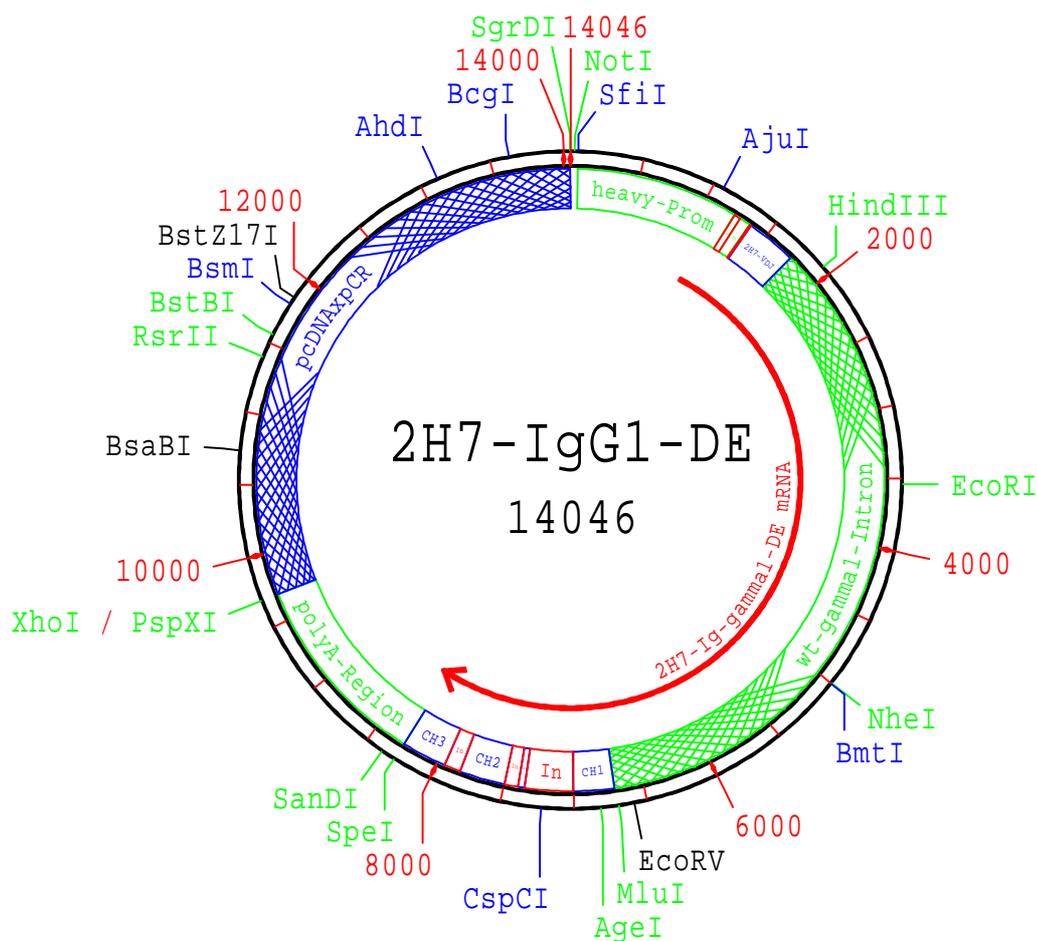


Abb. 6.2: 2H7-IgG1-DE

Expressionsvektor für die schwere Kette des DE-mutierten chimären α -human CD20 IgG1-Antikörpers 2H7.

Der Vektor ist bis auf einen Austausch der Sequenzen die für die Aminosäuren an Position 239 und an Position 332 des Fc-Teils codieren, identisch mit 2H7-IgG1 (s. Abb. 6.1, S. 188)

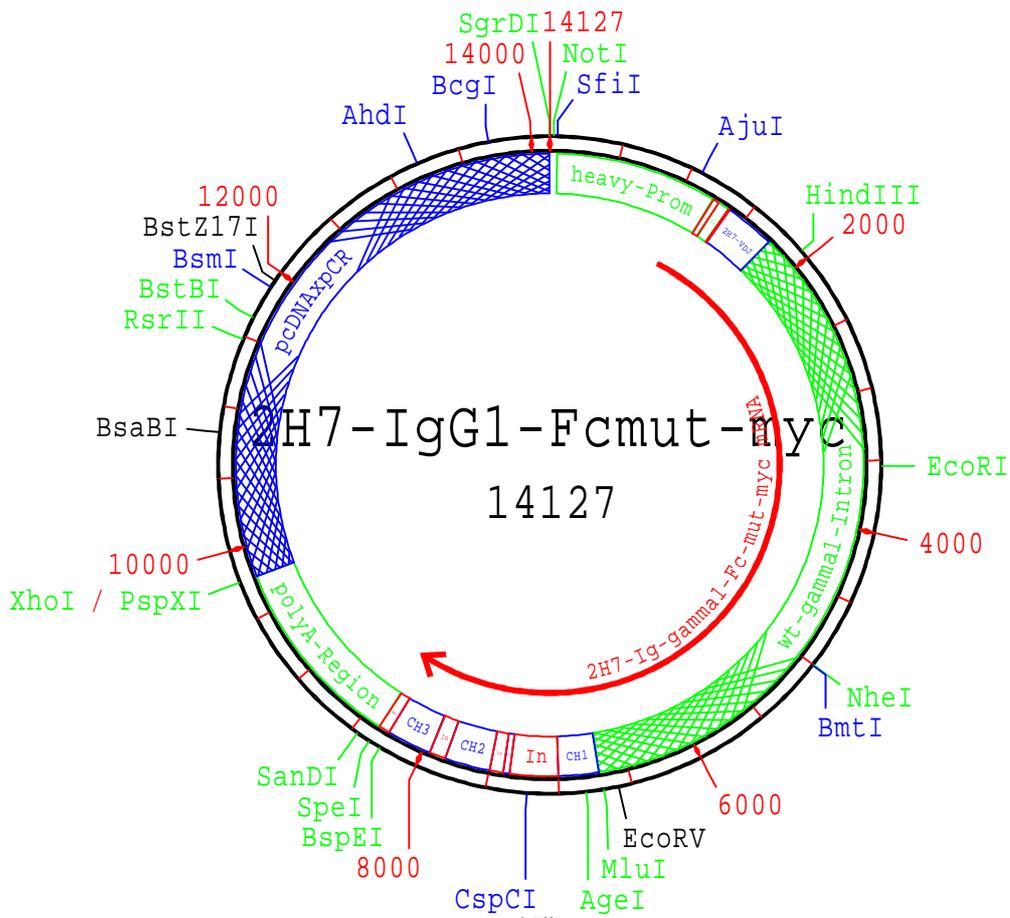


Abb. 6.3: 2H7-IgG1-Fc-mut-myc
 Expressionsvektor für die schwere Kette des chimären α -human CD20 IgG1-Antikörpers 2H7 mit Schnittstelle für die Rhinovirus-3C-Protease im Fc-Teil und c-myc-Epitop am C-Terminus. Die Sequenz für die letzten 14 Aminosäuren des IgA-C-Terminus und das c-myc-Epitop befinden sich direkt *downstream* der C_{H3} -Sequenz. Ansonsten ist der Vektor identisch mit 2H7-IgG1-Fc-mut (s. Abb. 2.6, S. 59)

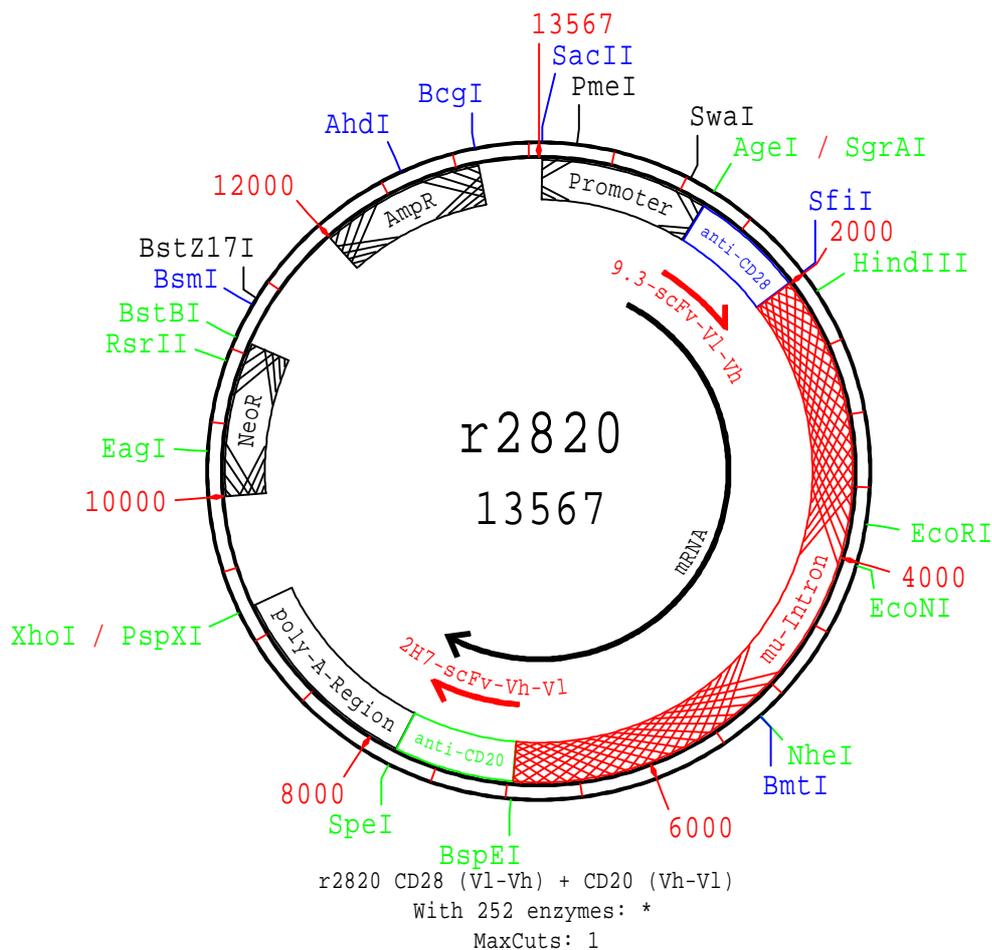


Abb. 6.4: r2820

Expressionsvektor für den bispezifischen *single-chain* Antikörper r2820 (CD28 x CD20). κ -Prom: κ -Promoter; L1: *Leader*-Sequenz (codiert für das Signal-Peptid); 9.3-scFv: cDNA des α CD28 scFv 9.3 in der Konformation V_L -(G₄S)₃-Linker- V_H ; μ -Intron: μ -Intron mit *enhancer*-Elementen; anti-CD20: cDNA des α CD20 scFv 2H7 in der Konformation V_H -(G₄S)₃-Linker- V_L . *Upstream* des scFv befindet sich eine kurze Sequenz die für die ersten 17 Aminosäuren der C_H1 -Domäne (ASTKGPSVFPLAPSSSG) codiert. *Downstream* des scFv folgt eine weitere kurze Sequenz die für die ersten 16 Aminosäuren der C_L -Domäne (RTVAAPSVFIFPPSAE) und das c-myc-Epitop (EQKLISEEDL) codiert; Poly-A-Region: Polyadenylierungssequenz; Neo: Resistenzgen für Neomycin (G418); AmpR: *bla*-Ampicillin-Resistenzgen (β -Laktamase).

6.3 Eigene Publikationen

6.3.1 Publikationen

- **Otz T**, Große-Hovest L, Rammensee HG, Jung G.
A bispecific single-chain antibody mediates target cell restricted, supra-agonistic CD28 stimulation and killing of lymphoma cells
Zur Publikation eingereicht
- Herrmann T, Große-Hovest L, **Otz T**, Krammer PH, Rammensee HG, Jung G.
Construction of optimized bispecific antibodies for selective activation of the death receptor CD95
Cancer Res. 2008 Feb 15;68(4):1221-7
- **Otz T**, Hruba A, Goeser S, Rossmannith WG, Kleine B.
The glycoprotein hormone alpha-chain is more abundantly expressed in early placenta compared to term placenta using differential display technics
Exp Clin Endocrinol Diabetes 2004; 112

6.3.2 Posterpräsentationen

- *Selective stimulation of the CD95 (APO-1/Fas) death receptor with bispecific CD20xCD95 antibodies induces potent anti-tumor activity against CD20 positive lymphoma cells in vitro and in vivo (Posterpreis)*
Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 16. Oktober 2007, Tübingen
- *Target cell restricted stimulation of the CD95 (APO-1/FAS) death receptor with various bispecific antibodies*
Cancer Immunotherapy (CIMT) Annual Meeting, 12. - 14. April 2007, Würzburg
- *Bispecific single-chain antibodies induce target-cell restricted, „supra-agonistic“ CD28 stimulation and T-cell mediated killing of lymphoma cells* 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 6. - 9. September 2006, Paris, Frankreich
- *Bispecific single-chain antibodies induce target-cell restricted, „supra-agonistic“ CD28 stimulation and T-cell mediated killing of lymphoma cells*
Cancer Immunotherapy (CIMT) Annual Meeting, 12. /13. Mai 2005, Mainz
- *Expressionsunterschiede zwischen früher und später humaner Plazenta: Einblick in funktionelle und regulatorische Mechanismen (Posterpreis)*
48th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology, 3. - 6. März 2004, Dresden

Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie in der Abteilung Immunologie durchführen zu können. Danke auch für die konstruktiven Diskussionen und Ideen die ich als sehr wertvoll empfunden habe.

Ein besonders herzliches Dankeschön gebührt Prof. Dr. Gundram Jung für die Bereitstellung des Themas sowie die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Danke für die zahlreichen Diskussionen und Ideen die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dankend zu erwähnen ist an dieser Stelle auch Dr. Helmut Salih für die Bereitstellung des Blutes von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, wobei ein besonderer Dank hier auch den Blutspendern gilt.

Ein ganz riesiges Dankeschön geht an Dr. Ludger Große-Hovest, der mich mit viel Enthusiasmus und Gedult in die Tiefen der Molekularbiologie eingeführt hat und stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Jetzt weiß ich endlich wie ein Kühlschrank funktioniert und daß „Schaum totes Protein ist“ ...auch wenn ich immer noch nicht so ganz davon überzeugt bin.

Ganz herzlich will ich an dieser Stelle meiner „Maus-Mama“ Beate Pömmerl für die Einführung in die Welt der Mäuse und die vielen gemeinsamen Stunden im SPF danken.

Ein ebenfalls ganz herzliches Dankeschön gilt Annika, Inja, Mareike, Tanja, Vicky, Lothar und Elke sowie allen meinen Mitstreitern aus dem 3.Stock des „Vergnügungsgebäudes“, die ich aus Platzgründen hier nicht alle namentlich erwähnen kann. Ihr habt meine Zeit in Tübingen zu dem gemacht was sie immer bleiben wird: „unvergeßlich schön“!

An dieser Stelle sei noch besonders meinen beiden Notfallhelfer Andi und Baschtljahn gedankt. Danke Andi für die zahlreichen Notfalleinsätze wenn LaTeX mal wieder meine Eigenleben führen zu müssen und danke Sebastian fürs Handauflegen, wenn das FACS-Gerät mal wieder nicht dasselbe wollte wie ich.

Dankend zu erwähnen sind hier auch ganz besonders die zahlreichen freiwilligen Blutspender, die mit Unmengen Blut zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, wobei ein herzliches Dankeschön auch an die Blutsauger, insbesondere an Stefan, geht.

Außerhalb des Labors geht mein Dank an meine Freunde und meine Familie und dabei besonders an meine Tante Gerda und meinen Onkel Karl. Danke daß ihr immer für mich da gewesen seid und immer an mich geglaubt habt.

Dank gebührt auch einem der großartigsten Menschen dieser Welt. Danke Jochen für die Geduld die Du für mich aufgebracht hast und die Unterstützung die ich von Dir bekommen habe...auch wenn Du es nicht immer leicht mit mir hattest.

Der herzlichste und größte Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinen beiden Schwestern. Danke daß ihr mich auf meinem Weg stets unterstützt und bestärkt habt, und ich immer auf euch zählen konnte. Ihr habt mir Wurzeln und Flügel gegeben...! Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum	20.5.1979
Geburtsort	Pforzheim
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1985-1989	Nordstadtschule, Pforzheim
1989-1998	Hebel-Gymnasium, Pforzheim

STUDIUM

1998 - 2004	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
2003-2004	Diplomarbeit am Institut für Zell- und Neurobiologie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH), AG Molekulare Neuroendokrinologie unter Leitung von Prof. Dr. W.G. Rossmanith Thema: <i>Differential Display: Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in der humanen Plazenta zwischen dem ersten und dritten Trimester der Gestation</i>
2004-2008	Promotionsarbeit am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. H.G. Rammensee in der AG Experimentelle Antikörper-Therapie betreut durch Prof. Dr. G. Jung Thema: <i>Neue Ansätze für eine Antikörper-basierte Therapie CD20⁺ lymphoider Neoplasien</i>

