

# **BiTE Antikörper-Konstrukte zur Therapie von Influenza A- und Cytomegalovirus- Infektionen**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Jochen Pendzialek

aus Tübingen

Tübingen

2016



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 19.10.2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Patrick A. Baeuerle



## Zusammenfassung

Bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörper-Konstrukte, auch BiTE Antikörper-Konstrukte (BiTE AKs) genannt (von *bispecific T cell engaging antibody constructs*), konnten in klinischen Studien bereits erfolgreich zur Behandlung verschiedener Formen von Krebs eingesetzt werden. Sie besitzen zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Spezifitäten und binden so zum einen spezifisch an ein bestimmtes Protein auf der Oberfläche von Zielzellen, zum anderen an CD3 $\epsilon$ , welches auf der Oberfläche aller T-Zellen vorkommt. Durch die so zustande kommende enge Bindung von T-Zellen an Zielzellen kommt es zur Ausbildung immunologischer Synapsen und zur Lyse der Zielzellen. In dieser Arbeit wurden auf der Grundlage muriner Antikörper-Spezifitäten BiTE AKs generiert, deren Zielprotein-bindende Anteile die Extrazellulär-Domäne des Influenza A-Matrixproteins 2 (M2e) oder das Cytomegalovirus Glykoprotein B (gB) binden. Es konnte gezeigt werden, dass diese BiTE AKs in der Lage sind, die spezifische Lyse von Zellen zu vermitteln, die diese Proteine auf der Oberfläche tragen. Um BiTE AKs zu erhalten, deren M2e- bzw. gB-bindende Anteile eine Aminosäuresequenz aufweisen, die eine hohe Ähnlichkeit zur humanen Keimbahnsequenz, und dadurch ein geringeres immunogenes Potential, besitzt, wurden die sich unterscheidenden Aminosäuren in den *Framework*-Regionen der murinen Sequenz, wenn möglich, gegen die Aminosäuren ausgetauscht, die in der humanen Keimbahnsequenz an diesen Positionen vorkommen. Die resultierenden human-ähnlichen (*human-like*) M2e- und gB-bindenden einzelkettigen variablen Fragmente (scFvs) mit den besten Eigenschaften wurden als komplette BiTE AKs exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. Die so generierten *human-like* M2e BiTE AKs besaßen M2e-bindende Anteile, die bis zu 87,3 % identisch mit der humanen Keimbahnsequenz waren (muriner Binder: 78,2 %). Der Großteil der *human-like* M2e BiTE AKs wies eine höhere Affinität zu M2e, sowie eine höhere zytotoxische Aktivität im Vergleich zum murinen M2e BiTE auf, obwohl die Sequenzen der CDRs (*complementarity determining regions*) nicht verändert wurden. Mit unterschiedlichen Influenza A-Virusstämmen infizierte Zellen wurden in einem *in vitro* Zytotoxizitäts-Assay durch einen *human-like* M2e BiTE mindestens 5-fach besser lysiert, als durch das murine Molekül. Im Maus-Modell konnte außerdem gezeigt werden, dass die Tiere durch eine Behandlung mit *human-like* M2e BiTE vor dem tödlichen Verlauf einer Influenza A-Infektion geschützt waren, während die Behandlung mit dem gleich dosierten murinen M2e BiTE nur zum Teil schützend wirkte. Die generierten *human-like* CMV-gB BiTE AKs besaßen gB-bindende scFv-Anteile, die bis zu 85,9 % identisch mit der humanen Keimbahnsequenz waren (muriner Binder: 66,8 %). Die *human-like* CMV-gB BiTE AKs hatten eine vergleichbar hohe Aktivität in *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays, wie der murine CMV-gB BiTE. Da CMV-gB und Influenza A-M2 sowohl hoch spezifisch für infizierte Zellen, als auch hoch konserviert zwischen verschiedenen Virusstämmen sind, könnten die untersuchten BiTE AKs ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung dieser viralen Erkrankungen sein. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen zudem, dass BiTE AKs nicht nur in der Onkologie erfolgreich eingesetzt werden können, sondern ein Einsatz auch in dem breiten Feld der Infektionserkrankungen erfolgversprechend erscheint.

## Summary

Bispecific T cell engaging (BiTE) antibody constructs (ACs) have already been used to successfully treat different types of cancer in clinical trials. They possess two different binding sites. One binding site is specific for a certain target protein expressed on a diseased cell and the other is specific for CD3 $\epsilon$ , which is expressed on all T cells. The resulting binding of T cells to target cells leads to the formation of immunological synapses and target cell lysis. In this thesis, different BiTE ACs were generated with target protein binding moieties based on the amino acid sequences of the variable fragments of murine antibodies specific for the extracellular domain of the Influenza A matrix-protein 2 (M2e) or the Cytomegalovirus glycoprotein B (gB). It could be shown that these BiTE ACs are able to redirect T cells to bind and lyse cells carrying these proteins on the cell surface. To obtain BiTE ACs with M2e- or gB-binding moieties with a high similarity to the human germline amino acid sequence, resulting in a lower immunogenic potential of the antibody, the differing amino acids in the framework regions of the murine sequence were replaced by the respective human amino acids, if possible. The resulting human-like M2e- or gB-binding single-chain variable fragments (scFvs) with the best properties were converted into complete BiTE ACs which were expressed, purified and characterized. The generated human-like M2e BiTE ACs had M2e-binding moieties which displayed up to 87.3% identity to the human germline sequence (original murine binder: 78.2%). Most of the human-like M2e BiTE ACs showed higher affinities for M2e and higher cytotoxic activities, compared to the murine M2e BiTE, although the amino acid sequences of the complementarity determining regions (CDRs) had not been changed. Cells infected with different strains of Influenza A virus were lysed at least 5 times more potently by a human-like M2e BiTE, compared to the murine molecule. Moreover, a human-like M2e BiTE was able to protect mice infected with a potentially lethal dose of a mouse-adapted Influenza A strain from death, while mice treated with the same dose of the murine M2e BiTE were only partly protected. The human-like CMV-gB BiTE ACs had gB-specific moieties which exhibited up to 85.9% identity to the human germline sequence (murine gB-binding moiety: 66.8%). Compared to the murine CMV-gB BiTE, human-like CMV-gB BiTE ACs proved to be similarly effective in *in vitro* cytotoxicity assays. With Influenza A-M2 and CMV-gB being highly specific for virus-infected cells as well as highly conserved among different viral strains, the examined BiTE ACs could be a promising approach for the treatment of these two viral diseases. Moreover, the results presented in this thesis indicate a therapeutic potential of BiTE ACs beyond oncology, e.g. in the broad field of infectious diseases.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Bispezifische Antikörper – BiTE Antikörper-Konstrukte.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Wirkungsmechanismus von BiTE Antikörper-Konstrukten.....	2
1.1.2	BiTE Antikörper-Konstrukte in klinischen Studien .....	4
<b>1.2</b>	<b>Virale Proteine als Ziel-Antigene für BiTE Antikörper-Konstrukte.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Influenza A und humanes Cytomegalovirus .....</b>	<b>6</b>
1.3.1	<b>Influenza A .....</b>	<b>6</b>
1.3.1.1	<i>Aufbau und Replikation des Influenza A-Virus .....</i>	<i>6</i>
1.3.1.2	<i>Influenza-Epidemien und -Pandemien, Antigen-Drift und -Shift .....</i>	<i>8</i>
1.3.1.3	<i>Prävention und Behandlung von Influenza A-Infektionen.....</i>	<i>9</i>
1.3.1.4	<i>Das Influenza A Matrixprotein 2 als Ziel für BiTE Antikörper-Konstrukte .....</i>	<i>9</i>
1.3.2	<b>Das humane Cytomegalovirus .....</b>	<b>10</b>
1.3.2.1	<i>Aufbau, Replikation und Latenz des humanen Cytomegalovirus .....</i>	<i>11</i>
1.3.2.2	<i>Prävention und Behandlung von HCMV-Infektionen .....</i>	<i>11</i>
1.3.2.3	<i>Das HCMV-Glykoprotein B als Ziel-Antigen.....</i>	<i>14</i>
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>16</b>
2.1	<b>Antikörper, Antigene, Detektions- und Separations-Reagenzien .....</b>	<b>16</b>
2.2	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>16</b>
2.3	<b>Zellkultur- und Bakterien-Medien und Zusätze .....</b>	<b>18</b>
2.4	<b>Chemikalien.....</b>	<b>19</b>
2.5	<b>Reagenzien für molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.5.1	Reagenzien für enzymatische Reaktionen.....	20
2.5.2	DNA- & Protein-Marker .....	21
2.6	<b>Pro- und eukaryotische Organismen, Viren .....</b>	<b>21</b>
2.6.1	Bakterien .....	21
2.6.2	Viren .....	21
2.6.3	Zelllinien .....	21
2.6.4	Versuchstiere .....	22
2.7	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>22</b>
2.8	<b>Geräte .....</b>	<b>22</b>
2.9	<b>Kits.....</b>	<b>23</b>
2.10	<b>Dienstleistungen.....</b>	<b>23</b>
2.11	<b>Software.....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	<b>Zelllinien.....</b>	<b>25</b>
3.1.1	Generierung und Kultivierung Antigen-exprimierender Zellen.....	25
3.1.2	Überprüfung der Antigen-Expression .....	26
3.1.3	Kultivierung von T-Zelllinien.....	27

3.1.4	Kultivierung von MDCK-Zellen.....	27
3.1.5	Generierung BiTE AK produzierender Zellen .....	27
3.1.6	Generierung Antigen-sezernierender Zellen .....	28
3.2	Aufreinigung von Proteinen aus Zellkultur-Überstand .....	28
3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
3.4	Western-Blot .....	30
3.5	Biotinylierung von Antigenen.....	30
3.6	<i>Human-like engineering</i> muriner V-Regionen.....	31
3.6.1	Primer-Design.....	31
3.6.2	Library-Aufbau .....	33
3.6.3	Library-Panning .....	34
3.7	Screening der aus dem Phage Display erhaltenen Binder.....	36
3.8	Messung der Dissoziations-Raten von scFv Molekülen .....	36
3.9	Bestimmung der Thermosensitivität von scFvs und BiTE Antikörper-Konstrukten.....	37
3.10	Affinitäts-Bestimmung mittels „Scatchard-Assay“ .....	37
3.11	Isolierung von PBMCs aus Humanblut .....	38
3.11.1	CD14/CD56-Depletion von PBMCs.....	38
3.11.2	Stimulierung von PBMCs und Isolierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	39
3.12	Zytotoxizitäts-Assays .....	39
3.12.1	FACS-basierter Assay zur Bestimmung der BiTE vermittelten Lyse transfizierter Zellen .....	39
3.12.2	ToxiLight-Assay zur Bestimmung der BiTE vermittelten Lyse Virus-infizierter Zellen	40
3.13	Mausmodell .....	42
3.14	Statistik .....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
4.1	Influenza A M2e BiTE .....	44
4.1.1	Aufreinigung muriner M2e BiTE Antikörper-Konstrukte .....	44
4.1.2	M2- und CD3-exprimierende Zellen werden vom murM2e BiTE gebunden .....	45
4.1.3	Bestimmung der Bindungsstärken der M2e- und CD3-Bindung.....	46
4.1.4	M2 exprimierende Zellen können BiTE vermittelt lysiert werden .....	48
4.1.5	Human-like engineering.....	49
4.1.5.1	Phage Display Library-Aufbau und Panning.....	49
4.1.5.2	Screening und Charakterisierung der halb human-like scFv Moleküle.....	51
4.1.5.3	Generierung und Aufreinigung von human-like M2e BiTE Antikörper-Konstrukten ...	54
4.1.6	Charakterisierung der <i>human-like</i> M2e BiTE Antikörper-Konstrukte.....	57
4.1.6.1	Affinitäts-Bestimmung der M2-Bindung der humM2e-h BiTE AKs.....	57
4.1.6.2	Zytotoxische Aktivität der humM2e-h BiTE Antikörper-Konstrukte .....	58
4.1.6.3	Affinitätsbestimmung der CD3-Bindung des humM2e-h BiTE 5 .....	59
4.1.6.4	Zytotoxische Aktivität des humM2e-h BiTE 5 mit Rhesus-Effektor-Zellen.....	60
4.1.7	Zytotoxische Aktivität von M2e-h BiTE Antikörper-Konstrukten auf Influenza A-infizierten Zellen.....	61
4.1.8	Wirksamkeit von M2e-m BiTE in Influenza A-infizierten Mäusen.....	63



<b>4.2</b>	<b>Cytomegalovirus Glykoprotein B BiTE .....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Herstellung und Isolierung von CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukten .....	65
4.2.2	Murine CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukte binden das Glykoprotein B verschiedener Virus-Stämme sowie CD3.....	66
4.2.3	Affinitäts-Bestimmung des mur CMV-gB BiTE .....	68
4.2.4	CMV-gB exprimierende Zellen können BiTE vermittelt lysiert werden .....	69
4.2.5	Human-like Engineering.....	71
4.2.5.1	<i>Library-Aufbau und Panning .....</i>	71
4.2.5.2	<i>Screening und Charakterisierung der halb human-like scFv-Moleküle.....</i>	72
4.2.5.3	<i>Generierung und Charakterisierung von human-like scFv-Molekülen.....</i>	73
4.2.5.4	<i>Weiteres human-like engineering der VL .....</i>	74
4.2.5.5	<i>Generierung neuer human-like anti-CMV-gB scFv-Moleküle .....</i>	76
4.2.6	Generierung und Charakterisierung von human-like CMV-gB BiTE Antikörper- Konstrukten und Selektion der favorisierten Varianten.....	79
4.2.6.1	<i>Affinitäts-Bestimmungen der human-like CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukte .....</i>	81
4.2.6.2	<i>Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der human-like CMV-gB-h BiTE Antikörper- Konstrukte .....</i>	83
4.2.6.3	<i>TS<sub>50</sub>-Werte und weitere Kriterien zur Bewertung der human-like CMV-gB BiTE Varianten.....</i>	84
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
5.1	BiTE Antikörper-Konstrukte zur Behandlung von Influenza A-Infektionen ....	88
5.1.1	Generierung und Charakterisierung von <i>human-like</i> M2e BiTE Antikörper- Konstrukten .....	88
5.1.2	Infektionen mit unterschiedlichen Influenza A-Stämmen .....	92
5.1.3	Mausmodell .....	93
5.1.4	BiTE vermittelte T-Zell-abhängige Lyse bei Influenza A-Infektionen .....	94
5.1.5	BiTE Therapie bei Influenza A-Infektionen im Menschen.....	96
5.2	BiTE Antikörper-Konstrukte zur Behandlung von CMV-Infektionen.....	98
5.2.1	Bindung von Glykoprotein B verschiedener CMV-Viren.....	98
5.2.2	Generierung und Charakterisierung von human-like CMV-gB-spezifischen scFv- Molekülen und BiTE Antikörper-Konstrukten .....	99
5.2.3	BiTE Therapie von CMV-Infektionen im Menschen.....	101
5.3	Ausblick - Behandlung viraler Infektionen mittels BiTE Antikörper- Konstrukten.....	103
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
	Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit .....	121
	Danksagung .....	122

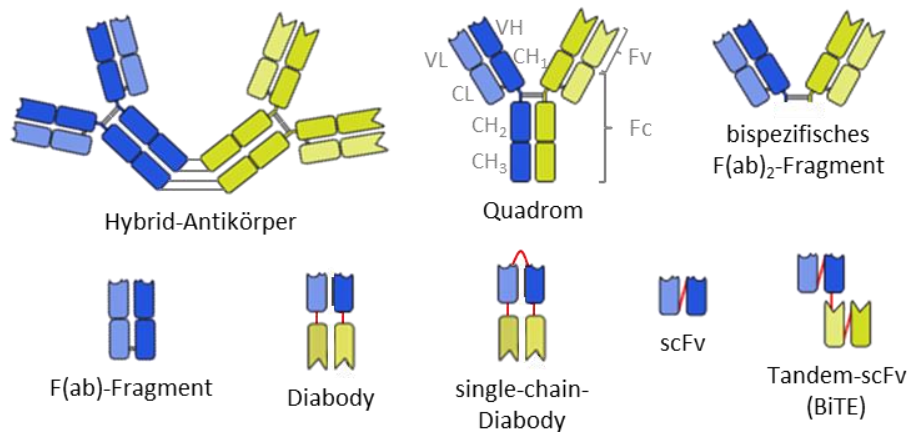


# 1 Einleitung

## 1.1 Bispezifische Antikörper – BiTE Antikörper-Konstrukte

Die ersten Berichte von bispezifischen Antikörper-Konstrukten stammen aus dem Jahr 1985. Die hier beschriebenen Hybrid-Antikörper entstehen durch die chemische Verlinkung zweier monoklonaler Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten über ihre Fc-Anteile [1, 2] (siehe Abbildung 1). Sogenannte Quadrom-Antikörper, eine Weiterentwicklung der Hybrid-Antikörper, entstehen durch Fusion zweier unterschiedlicher Hybridom-Zelllinien [3]. Die so entstehenden „Hybrid-Hybridome“ oder Quadrome produzieren eine Mischung verschiedener IgG-Moleküle, unter anderem auch Antikörper mit zwei unterschiedlichen Spezifitäten. Letztere können über aufwendige Aufreinigungs-Verfahren aus der Antikörper-Mischung isoliert werden. Durch Entfernen des Fc-Anteils können bispezifische F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente gewonnen werden, die ebenfalls eine Lyse von Zielzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) vermitteln können, ohne eine Fc-Rezeptor-vermittelte Lyse zu bewirken [4]. Da für eine Antigen-Bindung lediglich die variablen Domänen der schweren Kette (VH) und der leichten Kette (VL) notwendig sind, wurden außerdem zunehmend Antikörper-Formate entwickelt, die lediglich aus VH- und VL-Fragmenten, sowie Linker-Sequenzen – in der Regel Glycin-Serin-Linker (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub> – bestehen. Im Jahr 1993 wurden von Holliger *et al.* Diabodies beschrieben, die aus zwei Polypeptidketten bestehen, welche jeweils aus einer VH- und einer VL-Domäne bestehen, die über einen Linker verbunden sind, der so kurz ist, dass eine Paarung der VH und VL innerhalb eines Polypeptids nicht stattfinden kann und sich somit nur zwei VH-VL-Polypeptidketten zu einem Diabody zusammenlagern können [5]. Später wurden aus einer einzigen Polypeptidkette bestehende *single-chain*-Diabodies hergestellt, die unter anderem nicht mehr die Probleme der bicistronischen Expression mit sich brachten [6]. Zwischenzeitlich wurde eine Vielzahl weiterer bi- und multi-spezifischer Antikörper-Konstrukte entwickelt. Für einen Überblick über die verschiedenen Formate und ihre Anwendungsmöglichkeiten siehe [7-9].

Im Jahre 1995 veröffentlichten Mack *et al.* ihre Ergebnisse zu einem bispezifischen Antikörper-Konstrukt, das aus einer Polypeptid-Kette besteht, die zwei unterschiedliche scFvs (*single-chain variable fragments*) enthält, welche über einen Glycin-Serin-Linker verbunden sind [10]. Dieses Tandem-scFv-Konstrukt, dessen eine Spezifität gegen humanes CD3ε und dessen andere Spezifität gegen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) gerichtet war, wies in Zytotoxizitäts-Experimenten mit humanen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) und EpCAM-exprimierenden Tumorzellen eine hohe Tumorzell-Toxizität auf. Die durch den bispezifischen Antikörper vermittelte Aktivierung von T-Zellen erwies sich als abhängig vom Vorhandensein von Zielzellen und als unabhängig von einem CD28-Kostimulus. Die Aktivierung konnte mit einer Kostimulation durch einen anti-CD28 Antikörper außerdem nicht weiter erhöht werden [11].



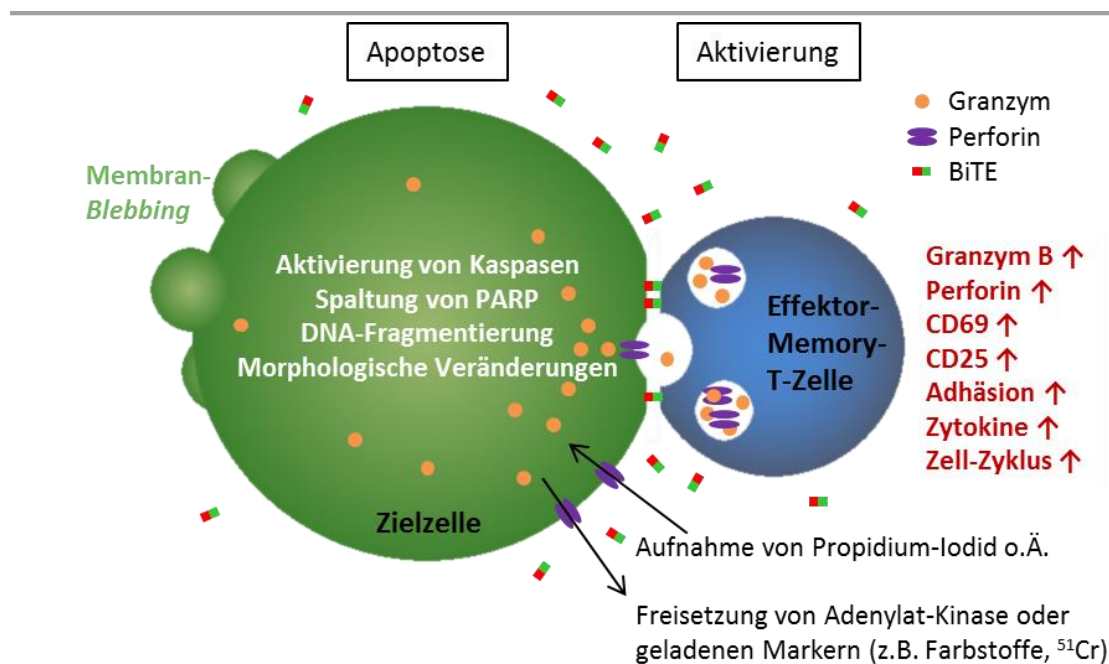
**Abbildung 1: Bispezifische Antikörper-Formate.** Blau - Antikörper (-Fragment), spezifisch für Antigen A; gelb - Antikörper (-Fragment), spezifisch für Antigen B; rot - Glycin-Serin-Linker; VL - variabler Anteil der leichten Kette; CL - konstanter Anteil der leichten Kette; VH - variabler Anteil der schweren Kette; CH<sub>1-3</sub> - konstante Anteile der schweren Kette; Fv - variables Fragment; Fc - konstantes Fragment.

In der Zwischenzeit wurde dieses Antikörper-Format weiter entwickelt. Der CD3-bindende Anteil des als BiTE (*bispecific T cell engager*) bezeichneten Moleküls wurde zunächst durch eine de-immunisierte Variante ausgetauscht [12] und mittlerweile durch einen „human-ähnlichen“ (*human-like*) CD3-Binder ersetzt, der sich in seiner Aminosäure-Sequenz kaum von der humanen Keimbahn-Sequenz unterscheidet und neben humanem CD3 auch das CD3 von Makaken binden kann [13]. Mit den verschiedenen Generationen der CD3-Binder wurden gegen eine Vielzahl von Ziel-Antigenen gerichtete BiTE AKs hergestellt und teilweise bereits in klinischen Studien untersucht (siehe Abschnitt 1.1.2). Die Vorteile von BiTE AKs liegen in der, im Vergleich zu anderen bispezifischen und konventionellen Antikörper-Formaten, deutlich höheren Aktivität [14], in der langjährigen Entwicklung, die immer weiter verbesserte Moleküle hervorbrachte, die heute teilweise schon klinisch erprobt sind, sowie in der Möglichkeit „doppelt kreuzreaktive“ Moleküle herzustellen. Diese sind zum einen spezifisch für humanes und Makaken-CD3, zum anderen für das Ziel-Antigen in seiner humanen Form und seinem Makaken-Äquivalent. Dies erlaubt präklinische Sicherheits-Studien in einem Affen-Modell.

### 1.1.1 Wirkungsmechanismus von BiTE Antikörper-Konstrukten

BiTE AKs binden mit ihrer gegen CD3ε gerichteten Spezifität an Effektor-Zellen (T-Zellen) und verbinden diese über ihre zweite Spezifität mit Zellen, die das Ziel-Antigen (z.B. CD19 oder EpCAM) auf ihrer Oberfläche tragen. Wird eine kritische Masse an BiTE AKs überschritten, die die beiden Zellen verbinden, kommt es zu einer Quervernetzung von CD3 Proteinen, welche mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert sind. Die so entstehende Ansammlung von TCR-Komplexen führt dann zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, ohne dass weitere kostimulatorische Proteine benötigt werden [15]. Auch das Vorhandensein von MHC Klasse I Molekülen auf den Zielzellen ist nicht notwendig [16]. Ohne das Vorhandensein des Ziel-Antigens ist eine T-Zell-Aktivierung selbst bei hohen BiTE Konzentrationen nicht messbar. Durch

die monovalente CD3-Bindung ist für die Quervernetzung der TCR-Komplexe und die damit verbundene T-Zell-Aktivierung das Vorhandensein von Zellen notwendig, die das Ziel-Antigen exprimieren [17]. Prinzipiell können durch BiTE AKs alle T-Zellen für die Lyse von Zielzellen rekrutiert werden. Den größten Anteil an der BiTE vermittelten Lyse haben dabei geprimte T-Zellen des CD8<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Phänotyps, während naive T-Zellen kaum zur BiTE vermittelten Zielzell-Lyse beitragen [18]. Der Wirkungsmechanismus von BiTE AKs ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Nach der BiTE vermittelten Aktivierung einer T-Zelle und der Ausbildung einer immunologischen Synapse kommt es zur Zielzell-Lyse durch Perforin und Granzym B [19]. Perforin-Moleküle bilden Poren in der Zielzell-Membran, durch die Granzym B in die Zelle eindringen und Apoptose induzieren kann [20].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von BiTE Antikörper-Konstrukten.** BiTE AKs induzieren die temporäre Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen Ziel- und T-Zelle. Die T-Zelle setzt in Granula enthaltene Perforine und Granzyme frei. Die Perforine bilden Poren in der Zielzelle, durch die Granzyme eindringen und Apoptose induzieren können. Durch die Aufnahme von z.B. Propidium-Iodid oder die Freisetzung von Adenylat-Kinase bzw. zuvor geladenen Markern durch die gebildeten Poren ist die BiTE vermittelte Lyse von Zielzellen experimentell nachweisbar. Durch die Aktivierung der T-Zelle kommt es zur verstärkten Expression von Aktivitäts-Markern und Zytokinen, sowie verstärkter Adhäsion und Proliferation. (Modifiziert nach Nagorsen, Baeuerle [21])

Nach der Inkubation mit Solitomab (AMG 110/MT110) und T-Zellen konnten in Zielzellen eindeutige Anzeichen von Apoptose, wie Membran-Blebbing (Bläschenbildung), Aktivierung der Prokaspasen 3 und 7, die Fragmentierung nuklearer DNA und die Spaltung des Kaspase-Substrats Poly(ADP Ribose)-Polymerase (PARP), nachgewiesen werden [19]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine einzelne T-Zelle mehrere Zielzellen seriell BiTE vermittelt lysieren kann [22].

### 1.1.2 BiTE Antikörper-Konstrukte in klinischen Studien

Das heute am besten untersuchte BiTE AK ist Blinatumomab (auch AMG 103/MT103), welches spezifisch für CD19 und CD3 ist [23]. CD19 ist in allen Stadien der B-Zell-Reifung vorhanden und wird nur in Plasmazellen herunterreguliert. In neoplastischen Zellen der B-Lymphozyten-Linie bleibt die CD19-Expression in allen Stadien erhalten [24]. Die BiTE vermittelte Lyse von CD19<sup>+</sup> Zellen führt somit zum Abräumen aller potentiell neoplastischer B-(Vorläufer)-Zellen. Die Wirksamkeit dieses Ansatzes wurde bereits in mehreren klinischen Studien bestätigt. Therapeutische Erfolge sind sowohl bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) [25-27] als auch beim Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) [28] belegt. Vor kurzem wurde Blinatumomab (Handelsname: Blincyto) sowohl von der US-amerikanischen FDA (*food and drug administration*), als auch von der Europäische Kommission für die Behandlung von Erwachsenen mit Philadelphia-Chromosom-negativer rezidivierender oder refraktärer B-Vorläufer ALL zugelassen.

Ein weiteres gut untersuchtes BiTE AK ist das für EpCAM und CD3 spezifische Molekül Solitomab (auch AMG 110/MT110) [29-31], welches ebenfalls in klinischen Studien erprobt wird. EpCAM wird in vielen epithelialen Geweben exprimiert, ist aber auf fast allen humanen Karzinom-Zellen überexprimiert [32, 33] und in normalem epitheliale Gewebe nur begrenzt zugänglich [34]. Dies macht EpCAM zu einem attraktiven Ziel-Antigen für die Behandlung einer Vielzahl von Krebs-Erkrankungen. Aufgrund der vorhandenen EpCAM-Expression in gesundem Gewebe gilt es jedoch ein therapeutisches Fenster zu finden, das die BiTE vermittelte Lyse von neoplastischen Zellen erlaubt, ohne gesundes Epithel-Gewebe zu schädigen [35]. Eine klinische Phase I-Studie untersucht die Verträglichkeit dieses Moleküls bei Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren (Studien-Kennung: NCT00635596).

Ein BiTE AK, das spezifisch für das prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) und CD3 ist (BAY2010112/AMG 212) [13], wird in einer klinischen Phase I-Studie an Prostatakrebs-Patienten getestet (Studien-Kennung: NCT01723475).

Ein weiteres klinisch erprobtes BiTE AK besitzt Spezifitäten für das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und CD3 (MEDI-565/AMG 211) [12]. CEA ist unter anderem auf Krebszellen beim kolorektalen Karzinom, sowie bei Brust- und Lungenkrebs vorhanden. MEDI-565 wird in einer klinischen Studie der Phase I auf seine Verträglichkeit an Patienten mit gastrointestinalen Adenokarzinomen untersucht (Studien-Kennung: NCT01284231).

## 1.2 Virale Proteine als Ziel-Antigene für BiTE Antikörper-Konstrukte

BiTE AKs werden aktuell vor allem zur Behandlung von Krebserkrankungen entwickelt [12, 13, 26, 36-38]. Die Ziel-Antigene, die auf Krebszellen vorhanden sind, sind fast ausschließlich körpereigene Zelloberflächen-Proteine, die auf Krebszellen aber oft in einer deutlich höheren Kopienzahl vorliegen, als auf gesunden Zellen. Der Unterschied zwischen normaler Expression

und Überexpression auf Krebszellen bestimmt das therapeutische Fenster für die Behandlung mit BiTE AKs [35]. Es besteht damit prinzipiell die Gefahr, dass bei zu hoher Dosierung auch gesunde Körperzellen BiTE vermittelt durch T-Zellen lysiert werden. Ein optimales Ziel-Antigen für ein BiTE AK sollte also nach Möglichkeit nur auf kranken Zellen vorhanden sein und auf gesunden Körperzellen fehlen. Diese Eigenschaft trifft etwa auf virale Proteine zu. Sie sind ausschließlich in bzw. auf Virus-infizierten Zellen vorhanden und fehlen auf gesunden Zellen.

Virale Antigene, die für eine Therapie mit BiTE AKs in Frage kommen, sind Zelloberflächen-Proteine. Allerdings werden viele virale Proteine nur über einen relativ kurzen Zeitraum exprimiert. Viren, in deren Replikations-Zyklus eine Latenz-Phase vorkommt (z.B. CMV, Herpes simplex Virus (HSV) oder humanes Immundefizienz-Virus (HIV)), exprimieren während dieser Phase meist fast ausschließlich regulatorische Proteine, die nicht auf der Zelloberfläche zu finden sind und zu einem großen Teil dem Zweck dienen, das virale Genom bzw. die Virus-infizierte Zelle vor Abwehrmechanismen zu schützen, etwa durch die Inhibition der MHC-Präsentation viraler Peptide [39] oder durch Inhibition von Immun-Effektor-Zellen, z.B. durch ein virales Interleukin-10-Homolog, das in CMV-infizierten Zellen synthetisiert wird [40]. Die meisten latenten Virus-Infektionen verursachen in dieser Phase jedoch keine Symptome. Erst wenn eine Reaktivierung eintritt und zugleich das Immunsystem geschwächt ist, etwa nach einer Transplantation oder durch eine HIV-Infektion, kommt es zu ernsthaften symptomatischen Erkrankungen, die mit einer erheblichen Morbidität einhergehen und teilweise auch tödlich verlaufen können. In einem solchen Szenario, in dem die Anzahl der Virus-spezifischen T-Zellen zu gering ist, um eine effektive Lyse Virus-infizierter Zellen zu bewirken, könnten Virus-Protein-spezifische BiTE AKs praktisch alle vorhandenen T-Zellen zur Lyse der Antigen-exprimierenden Zellen rekrutieren, so einer weiteren Ausbreitung des Virus entgegenwirken, und damit eine schwerwiegende symptomatische Erkrankung verhindern oder beenden.

Bei anderen, akut verlaufenden Virus-Infektionen, wie etwa einer Influenza-Infektion, besteht das Problem einer Herunterregulierung der viralen Zelloberflächen-Proteine nicht. Hier bestünde der Vorteil einer BiTE Therapie darin, durch die Rekrutierung nicht Virus-spezifischer T-Zellen eine frühere Lyse Virus-infizierter Zellen zu bewirken. So könnte die schnelle Ausbreitung im Gewebe in einem frühen Stadium der Infektion effektiv verhindert werden, ohne dass erst eine Expansion Virus-Protein-spezifischer T-Zell-Klone nötig ist. Vermutlich wäre hier nur eine Gabe von BiTE AKs über einen kurzen Zeitraum nötig, bis die natürliche zelluläre Immunantwort voll ausgebildet ist.

Für alle viralen Antigene, die als Zielproteine für eine Therapie mit BiTE AKs dienen sollen, gilt aber, dass die Aminosäure-Sequenz des Epitops, gegen das das entsprechende BiTE AK gerichtet ist, hoch konserviert zwischen möglichst vielen der kursierenden Virus-Stämme sein sollte, um eine breite Wirksamkeit zu erreichen.

## 1.3 Influenza A und humanes Cytomegalovirus

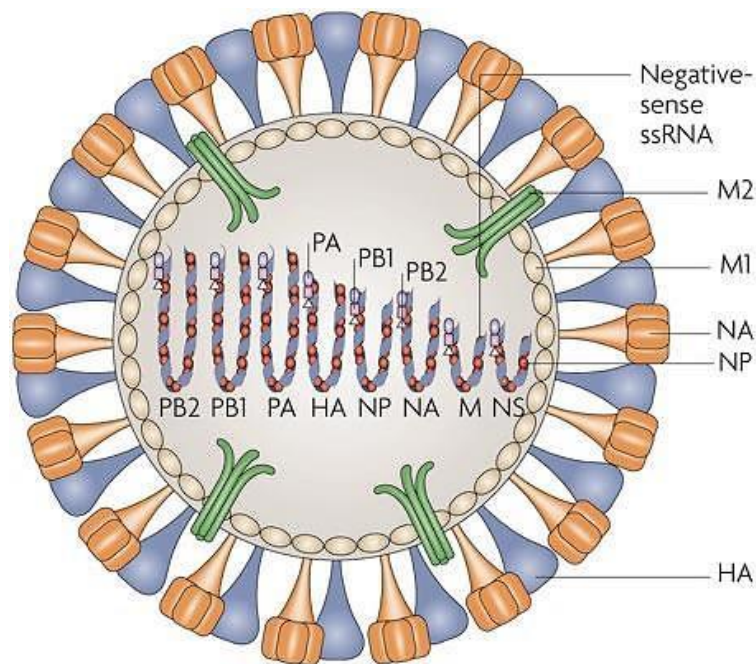
### 1.3.1 Influenza A

Influenza A-Infektionen stellen ein großes weltweites Problem dar. Während der Jahreszeit-abhängigen Epidemien werden pro Jahr üblicherweise weltweit 5-10 % aller Erwachsenen und 20-30 % aller Kinder infiziert, was in 3-5 Millionen Fällen zu einem schweren Krankheitsverlauf und in bis zu 500.000 Fällen zu einem tödlichen Verlauf führt [41]. Darüber hinaus entsteht durch den krankheitsbedingten Ausfall von Arbeitskräften und die medizinischen Kosten ein beträchtlicher volkswirtschaftlicher Schaden, der allein in den USA bei geschätzten 87 Milliarden Dollar liegt [42]. Das vor allem durch Tröpfcheninfektion übertragene Influenza A-Virus infiziert in erster Linie Lungenepithel-Zellen und führt in den meisten Fällen zu einer Tracheobronchitis, seltener auch zu Pneumonien. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 24 Stunden und 5 Tagen, unter anderem auch abhängig von der Virus-Dosis und dem Gesundheitszustand des Patienten. Typische Krankheitssymptome sind abrupt auftretende Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Reizhusten, gefolgt von hohem Fieber, Muskelschmerzen, allgemeinem Krankheitsgefühl und Appetitlosigkeit. Nach etwa sechs Tagen ist das Fieber in der Regel wieder abgeklungen, Symptome wie Reizhusten und allgemeine Schwäche können aber noch ein bis zwei weitere Wochen erhalten bleiben. Ältere, Kinder und Immungeschwächte können stärkere Symptome entwickeln. [43]

#### 1.3.1.1 Aufbau und Replikation des Influenza A-Virus

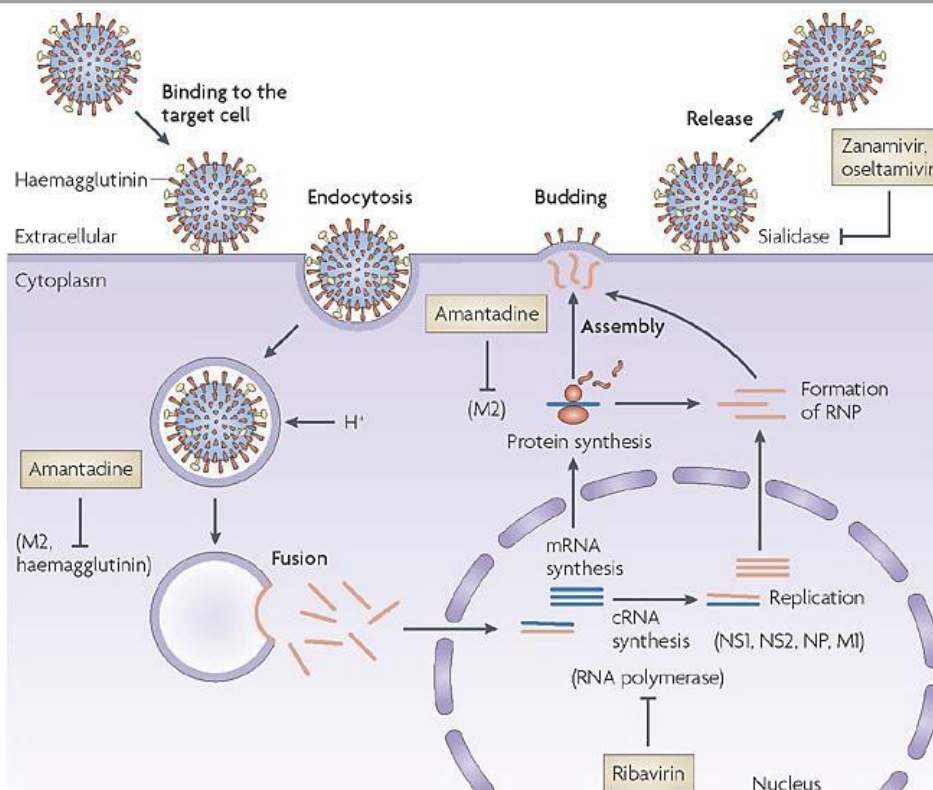
Influenza-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie werden in die Subtypen A, B und C unterteilt. Das Influenza A-Virus besitzt ein segmentiertes Genom, bestehend aus acht einzelsträngigen (*single-stranded*) Minus-Strang-RNA-Segmenten (*negative-sense ssRNA*). Jedes Segment codiert 1-2 Proteine (vgl. Abbildung 3). Die auf den Segmenten 1-3 codierten Proteine PB1 (*polymerase basic protein 1*), PB2 (*polymerase basic protein 2*) und PA (*polymerase acidic protein*) bilden den viralen Polymerase-Komplex (RNA-abhängige RNA-Polymerase). Verpackt im Ribonukleoproteinkomplex (RNP) sind die RNA-Moleküle mit dem Nukleoprotein (NP) und dem Polymerase-Komplex assoziiert. Das Nukleoprotein bildet einen Kern, um den die RNA in Form einer helikalen Struktur gewickelt ist. Die RNPs sind im Virion mit dem M1-Protein assoziiert. Das RNA-Segment 7 codiert zwei Proteine mit einer kurzen überlappenden Region: M1 (*matrix protein 1*), die Hauptkomponente des viralen Capsids, sowie M2 (*matrix protein 2*), ein integrales Membranprotein, welches die Funktion eines Ionenkanals hat. Die Virushülle wird aus der Wirtszellmembran gebildet und enthält die Proteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und M2. Das RNA-Segment 8 codiert zwei Proteine: das *non-structural protein 1* (NS1), das die Immunantwort der Wirtszelle inhibiert [44], und NS2 (auch NEP – *nuclear export protein*), welches den Export von RNPs aus dem Nukleus vermittelt und im Zusammenhang mit dem Matrixprotein 1 steht. [45, 46]





**Abbildung 3:** Influenza A-Virion, schematisch. Abbildung aus [46].

In Abbildung 4 ist der Replikations-Zyklus des Influenza A-Virus dargestellt. Das Virion bindet über HA an N-Acetyl-Neuraminsäure-Reste auf der Zelloberfläche und wird über ein Endosom in die Zelle aufgenommen. Die Ansäuerung des Endosoms in zwei Schritten bewirkt eine Konformationsänderung von HA, was die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran ermöglicht (besprochen in [47]). Außerdem bewirkt die Ansäuerung die Aktivierung der Protonenkanal-Funktion von M2, wodurch auch ein saurer pH-Wert im Inneren des Virions zustande kommt, welcher zur Dissoziation der RNPs von den M1-Proteinen führt und damit ein Freisetzen der viralen RNA ins Zytoplasma der Zelle ermöglicht [47]. Durch Amantadin oder Rimantadin kann die Protonenkanal-Funktion des M2-Proteins blockiert und somit die Infektion der Zelle verhindert werden [48]. Im Nukleus finden die Replikation der viralen RNA und die Synthese viraler mRNA mit Hilfe des viralen Polymerase-Komplexes statt. Die virale RNA-Synthese kann mit Ribavirin inhibiert werden [49]. Der Zusammenbau (*Assembly*) des Virus findet an der Zellmembran statt. Die in der Membran vorhandene Neuraminidase (*Sialidase*) entfernt Neuraminsäure-Reste auf der Wirtszell-Membran und verhindert damit ein „kleben bleiben“ des neu gebuddeten Virions an der bereits infizierten Zelle. Durch Zanamivir oder Oseltamivir wird die Funktion der Neuraminidase inhibiert, wodurch ein Ablösen der neu gebildeten Virionen von der infizierten Zelle verhindert wird [50, 51].



**Abbildung 4:** Replikations-Zyklus des Influenza A-Virus. (*Sialidase* = Neuraminidase (NA)). Abbildung aus [52].

### 1.3.1.2 Influenza-Epidemien und -Pandemien, Antigen-Drift und -Shift

Influenza-Infektionen treten meist im Rahmen von Epidemien, selten auch als Pandemien auf. Die praktisch jährlich in der kalten Jahreszeit der gemäßigten Klimazonen auftretenden Epidemien unterscheiden sich von Pandemien in der Regel durch eine geringere Anzahl erkrankter Personen und eine mildere Verlaufsform [53]. Influenza-Epidemien werden meist durch einen sogenannten Antigen-Drift ausgelöst. Antigen-Drift ist die allmähliche Evolution von Virus-Stämmen aufgrund der Anhäufung von Mutationen [54]. Diese Mutationen im Bereich der antigenen Epitope von HA und vor allem NA führen nach und nach zu Varianten, die von Antikörpern, die während einer früheren Influenza-Infektion gebildet wurden, nicht mehr gebunden werden können [55, 56], und gegen die somit kein effektiver Schutz mehr besteht.

Durch die mögliche Neukombination (*Reassortment*) der acht RNA-Segmente, die das Genom des Influenza A-Virus bilden, können, beispielsweise in Schweinen oder anderen Säugetieren, die etwa gleichzeitig mit humanen Grippe-Viren und Vogelgrippe-Viren infiziert werden, noch stärker humanpathogene Viren entstehen. Bei diesem als Antigen-Shift bezeichneten Ereignis wird meist das HA-codierende Gen-Segment (seltener auch das NA-codierende Segment) eines Stamms durch das eines anderen Stamms ersetzt [57]. Dies kann zu neuen Virus-Stämmen führen, die noch nie oder schon sehr lange nicht mehr in der menschlichen Population kursierten. Dadurch ist gegen einen so entstandenen neuen Virus-Stamm praktisch keine

Immunität in der Bevölkerung vorhanden. Somit könnten solche Stämme in der Lage sein, weltweite Pandemien mit hunderttausenden oder Millionen von Toten auszulösen [58]. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass das hoch pathogene Vogelgrippe-Virus H5N1, welches bisher nur vom Tier auf den Menschen übertragbar ist, schon durch wenige adaptive Mutationen die Fähigkeit erlangen konnte, sich durch Tröpfcheninfektion unter Frettchen zu verbreiten, was zuvor ebenfalls nicht der Fall gewesen war [59]. Damit wäre die Entstehung eines leicht von Mensch zu Mensch übertragbaren, pandemischen Influenza A-Virus auch allein durch Antigen-*Drift*, unabhängig von einem *Reassortment*, denkbar.

### **1.3.1.3 Prävention und Behandlung von Influenza A-Infektionen**

Der gegenwärtig effektivste Schutz vor einer Influenza A-Erkrankung ist die Vakzinierung mit einem Impfstoff, dessen Zusammensetzung, basierend auf Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO), regelmäßig an die aktuell kursierenden Influenza-Viren angepasst wird. Die Impfung wird vor allem für Kinder (6 Monate bis 5 Jahre), Ältere ( $\geq 65$  Jahre), Schwangere, Personen mit chronischen Erkrankungen und Gesundheitspersonal empfohlen [41]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie bescheinigt dem in Europa verwendeten Influenza-Impfstoff der Grippe-Saison 2012/2013 aber nur eine niedrige bis mittlere Effektivität [60]. Ein Grund hierfür ist vermutlich der in Abschnitt 1.3.1.2 beschriebene Antigen-*Drift*, der die richtige Auswahl der für einen Impfstoff verwendeten Virus-Stämme sehr schwer macht [61]. Daher wird rund um die Welt an der Entwicklung von Impfstoffen geforscht, die einen besseren Schutz gegen verschiedene Influenza-Stämme bieten (für einen Überblick siehe [62-64]). Für die Behandlung nicht geimpfter Patienten oder von Personen, deren Impfung keinen ausreichenden Schutz bietet, stehen die in Abschnitt 1.3.1.1 erwähnten antiviralen Medikamente zur Verfügung. Zunehmend sind allerdings Virus-Stämme im Umlauf, die gegen mindestens einen antiviralen Wirkstoff resistent sind [65, 66], und für die somit häufig wirksame Therapie-Optionen fehlen.

### **1.3.1.4 Das Influenza A Matrixprotein 2 als Ziel für BiTE Antikörper-Konstrukte**

Das Matrixprotein (M2) des Influenza A-Virus ist ein Transmembran-Protein mit einer Größe von 97 Aminosäuren, welches nur in geringer Kopienzahl auf Virionen vorhanden ist, aber auf der Oberfläche infizierter Zellen in hoher Kopienzahl zu finden ist [67, 68]. Es bildet Homotetramere, welche die Funktion von Protonenkanälen erfüllen [48, 69]. M2 spielt außer beim *Entry* des Virus in die Zelle auch eine wichtige Rolle beim *Budding* der Virionen von der Wirtszell-Membran [70]. Das M2-Protein besitzt in Influenza-Infizierten Individuen ein geringes immunogenes Potential [71] und besitzt vermutlich unter anderem aus diesem Grund eine zwischen unterschiedlichen Stämmen hoch konservierte Extrazellulär-Domäne (M2e), welche 23 Aminosäuren umfasst [72]. Seit einiger Zeit wird M2e auch als Grundlage für eine universelle Influenza-Vakzine mit einer breiten Wirksamkeit gegen verschiedene Virus-Stämme diskutiert (für einen Überblick siehe [73-75]). Unter anderem konnte etwa in einem Maus-Modell gezeigt werden, dass mit einem M2e-basierten Impfstoff vakzinierter Tiere sowohl gegen eine primäre, als auch eine sekundäre, heterosubtypische Influenza A-Infektion geschützt

waren. Tiere, die mit einem Impfstoff behandelt wurden, der auf ganzen inaktivierten Viren basierte, waren hingegen zwar gegen die erste Infektion geschützt, überlebten aber die zweite, heterosubtypische Infektion nicht [76].

Die beschriebenen Eigenschaften des M2-Proteins, besonders dessen starke Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen, sowie die Ergebnisse der mit M2e-basierten Impfstoffen durchgeführten Experimente, lassen dieses Protein als vielversprechendes Ziel-Antigen für BiTE AKs erscheinen. Die auf infizierten Zellen im Vergleich zu den Virionen deutlich höhere Kopienzahl kann vermutlich auch dafür sorgen, dass BiTE AKs nicht durch zirkulierende Virionen abgefangen werden, sondern in der Mehrzahl an Virus-infizierte Zellen binden und effektiv deren Lyse durch T-Zellen vermitteln können, noch bevor die natürliche Immunantwort voll ausgebildet ist. Somit könnten M2e-spezifische BiTE AKs Patienten, die kein immunologisches Gedächtnis für den Influenza-Stamm besitzen, der für die Infektion verantwortlich ist, vor einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf bewahren.

### 1.3.2 Das humane Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein weltweit endemisches, streng wirtsspezifisches Virus, das vor allem über Speichel, Tränen, Urin, Blut, Muttermilch, sexuell oder kongenital übertragen werden kann [77]. Die Seroprävalenz liegt bei Erwachsenen in den USA im Schnitt bei 50 %. Sie steigt mit zunehmendem Alter und ist umso höher, je niedriger der sozioökonomische Status ist [78]. In Entwicklungsländern liegt die Seroprävalenz, zumeist beruhend auf Daten von schwangeren Frauen, deutlich höher und erreicht mancherorts annähernd 100 % [79-81]. Eine Infektion mit dem HCMV-Virus verläuft in immunkompetenten Personen in der Regel asymptomatisch. Gelegentlich treten allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber, Schweißausbrüche oder eine milde Hepatitis auf, die ohne Behandlung wieder abklingen [82]. Nur in extrem seltenen Fällen kann es auch in immunkompetenten Patienten zu schwerwiegenden Verläufen mit einer hohen Sterblichkeitsrate kommen [83]. Bei kongenitalen CMV-Infektionen besteht eine deutlich erhöhte Gefahr eines schwerwiegenden Verlaufs (für einen Überblick siehe [81]). Kongenitale CMV-Infektionen sind etwa einer der Hauptgründe für einen teilweisen oder kompletten Hörverlust (sensorineuraler Hörverlust) [84]. Eine weitere Patientengruppe, für die CMV als opportunistische Infektion ein großes Problem darstellt, sind immungeschwächte Personen [77]. Dazu zählen unter anderem HIV-infizierte Patienten [85] und Transplantat-Empfänger [86-88]. Aufgrund der weltweiten Verbreitung und der teilweise schwerwiegenden Symptome besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an verbesserten Therapeutika, sowie an einem Impfstoff, der die Infektion mit diesem lebenslang persistierenden Virus verhindern kann.

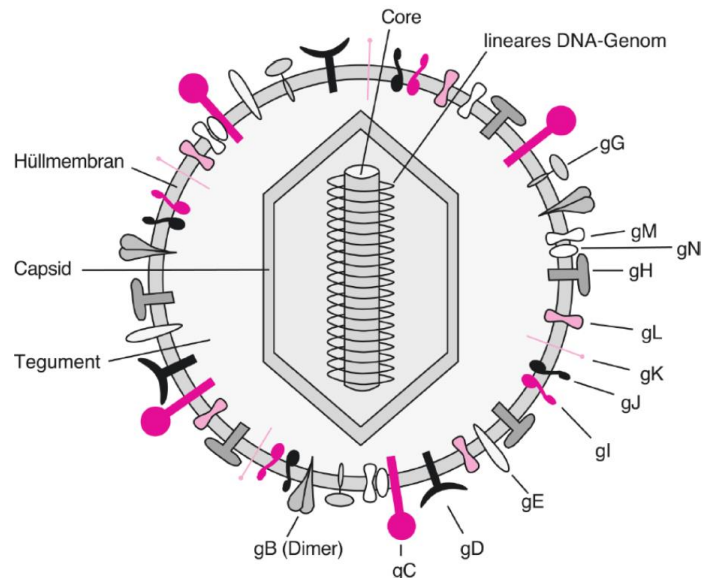
### 1.3.2.1 Aufbau, Replikation und Latenz des humanen Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört in der Familie der *Herpesviridae* zur Subfamilie der *Betaherpesvirinae* und wird auch als humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) bezeichnet. Zur Subfamilie der *Betaherpesvirinae* gehören, neben den humanpathogenen humanen Herpesviren 6A, 6B und 7, unter anderem auch nicht humane Cytomegaloviren, wie das murine Cytomegalovirus (MCMV), das Schimpansen-, Rhesus- und Cynomolgus-Cytomegalovirus (CCMV, RhCMV und CyCMV). Cytomegaloviren besitzen, wie alle Herpesviren, ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom, das in einem ikosaedrischen Kapsid verpackt ist, welches von einer Protein-Schicht (= Tegument) und einer Membran (*envelope*) umgeben wird, welche von der Wirtszelle abstammt und virale Glykoproteine auf der Oberfläche trägt [77]. Das Genom hat eine Größe von ca. 230.000 Basen-Paaren und codiert über 700 Proteine und Polypeptide, die teilweise durch alternatives *Splicing* und optionale Start-Codons entstehen [89]. Eine schematische Darstellung eines CMV-Virions ist in Abbildung 5 zu sehen. Das humane Cytomegalovirus kann eine Vielzahl verschiedener Zellen infizieren, unter anderem Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, verschiedene hämatopoietische Zellen, sowie parenchymale Zellen und Bindegewebszellen in praktisch jedem Gewebe (für einen Überblick siehe [90]). Die Replikation verläuft, wie bei allen Betaherpesviren, langsam und benötigt eine große Zahl verschiedener viraler Genprodukte. In Abbildung 6 ist der Replikationszyklus in Fibroblasten, mit den wichtigsten beteiligten Genprodukten, schematisch dargestellt. Für einen genaueren Überblick über die komplexen Prozesse vom *Entry* bis zur Freisetzung neuer Virionen, welche bis heute nicht komplett aufgeklärt sind, siehe [77, 91-93]. Neben infektiösen Virionen werden auch DNA-freie *dense bodies* (DB) und nicht infektiöse umhüllte Partikel (*noninfectious enveloped particles*, NIEP) freigesetzt [94, 95].

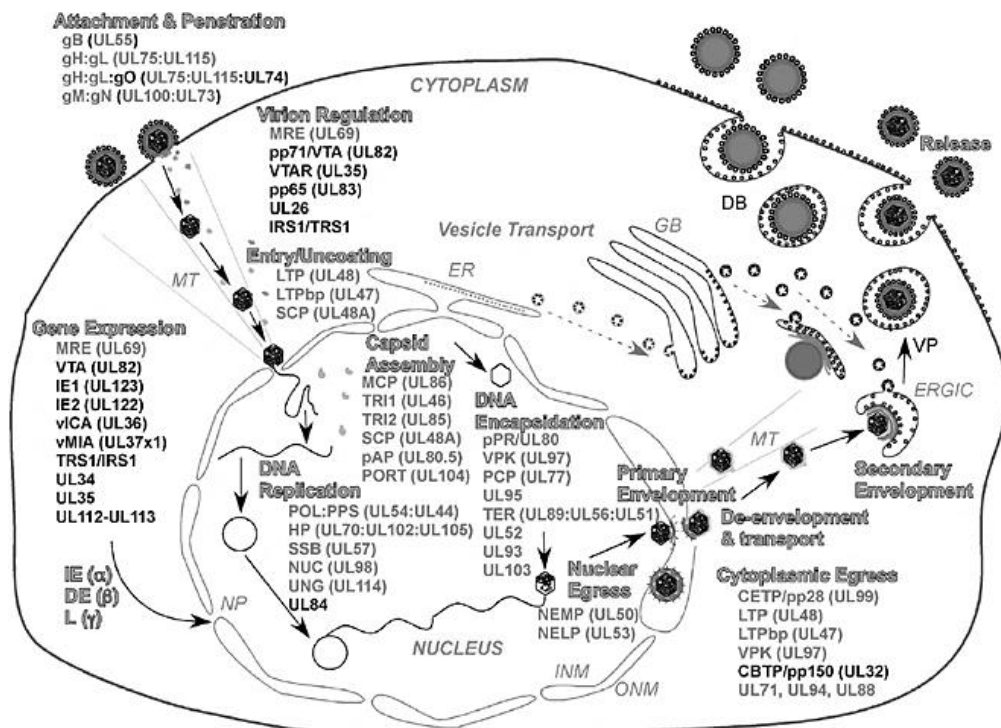
Nach der Infektion persistiert HCMV, wie alle Herpesviren, lebenslang latent im Körper, insbesondere in CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Vorläuferzellen [96, 97]. Während der Latenz werden hauptsächlich immunmodulatorische Genprodukte exprimiert, die verhindern, dass die infizierte Zelle lysiert wird, oder in Apoptose geht (für einen Überblick siehe [98, 99]). Sporadische Reaktivierungen der aktiven Replikation in latent infizierten Zellen werden in immungesunden Personen vor allem durch eine stark ausgeprägte zelluläre Immunantwort kontrolliert und verursachen in der Regel keinerlei Symptome [100].

### 1.3.2.2 Prävention und Behandlung von HCMV-Infektionen

Obwohl eine HCMV-Infektion in gesunden Menschen in der Regel ohne Symptome verläuft, wird eine präventive Schutzimpfung angestrebt. Durch solch eine Impfung könnten sich Neuinfektionen bei den beiden Hauptrisikogruppen, Schwangeren und Immungeschwächten, verhindern lassen.



**Abbildung 5: CMV-Virion, schematisch.** Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom ist mit einem Protein-Core assoziiert im etwa 130 nm großen ikosaedrischen Capsid verpackt. Dieses wird vom Tegument und einer Hüllmembran umgeben, in die vor allem verschiedene Glykoproteine eingelagert sind, z.B. Glykoprotein B (gB), gH und gL. Abbildung aus [101].



**Abbildung 6: Replikation von HCMV.** Dargestellt ist der Replikationszyklus von HCMV in Fibroblasten mit den einzelnen Replikations-Schritten vom Attachment bis zum Release neuer reifer Virionen bzw. Dense Bodies, sowie die wichtigsten an den einzelnen Schritten beteiligten viralen Genprodukte. Abbildung aus [77].

Es gibt allerdings nur wenige in den letzten Jahren publizierte Ergebnisse von frühen klinischen Studien, in denen etwa eine DNA-Vakzine [102] oder ein auf CMV-gB beruhender Impfstoff [103] Ergebnisse mit positiver Tendenz lieferten. In einer Placebo-kontrollierten Phase II-Doppelblind-Studie konnten mit einem Impfstoff, der ebenfalls aus rekombinantem HCMV Glykoprotein B sowie einem Adjuvans bestand, eine HCMV-Infektion mit einer Effektivität von 50 % verhindert werden [104]. Diese relativ geringe Erfolgsquote zeigt, dass noch viel Forschungs- und Entwicklungsarbeit nötig ist, um eine breit wirksame HCMV-Schutzimpfung zu erhalten.

Die Behandlungs-Optionen für immungeschwächte Patienten nach einer CMV-Neuinfektion oder -Reaktivierung beschränken sich derzeit im Wesentlichen auf die Nukleosid-Analoga Ganciclovir, Valganciclovir und Cidofovir, sowie das Pyrophosphat-Analogon Foscarnet [105]. Nach einer hämatopoietischen Stammzell-Transplantation (HSCT) verringert die prophylaktische Gabe von Ganciclovir, Valganciclovir, oder Foscarnet deutlich das Auftreten von Cytomegalien [106-108]. Dennoch kommt es zu spät einsetzende Cytomegalien, welche mittlerweile die wichtigste mit CMV in Verbindung stehende Komplikation nach einer HSCT sind [109, 110]. Ein weiteres Problem bei der Behandlung ist das Auftreten von CMV-Stämmen, die teilweise gegen mehrere antivirale Medikamente resistent sind [111-115].

Zur Verhinderung einer Schädigung des Fötus durch eine während der Schwangerschaft auftretende CMV-Primärinfektion wird eine Behandlung mit CMV-spezifischen Hyperimmunglobulinen diskutiert. Während in einer Studie ein signifikant besserer Gesundheitszustand von während der Schwangerschaft infizierten Kindern im Alter von einem Jahr feststellen konnte [116], kam eine zweite Studie zu dem Schluss, dass eine solche Hyperimmunglobulin-Behandlung keine signifikante Verbesserung des Gesundheitszustandes der Kinder bei der Geburt bewirken konnte [117].

Es gibt mehrere, zum Teil noch experimentelle, immuntherapeutische Ansätze, um CMV-Infektionen mit Hilfe von T-Zellen zu bekämpfen. Eine Möglichkeit ist der adoptive T-Zell-Transfer. Hierfür werden T-Zellen aus dem Blut des Spenders isoliert, CMV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) *ex vivo* selektiert, expandiert und dem Patienten nach erfolgter Transplantation injiziert [118-120]. Dadurch kann die Rekonstitution einer CMV-spezifischen Immunantwort deutlich beschleunigt werden [121, 122].

Ein weiteres immuntherapeutisches Verfahren zur Behandlung verschiedener Erkrankungen sind sogenannte chimäre Antigen-Rezeptoren (CARs), teilweise auch als chimäre Immun-Rezeptoren (cIRs) bezeichnet. Zur Generierung der Effektor-Zellen werden körpereigene T-Zellen isoliert und transfiziert, sodass diese chimäre Rezeptoren exprimieren, die ein bestimmtes Protein oder Peptid spezifisch binden können und ohne weitere co-stimulatorische Signale die Aktivierung der T-Zelle und damit eine Lyse der Zielzelle bewirken können [123]. Dieser Ansatz wird vor allem für onkologische Indikationen untersucht, aber unter anderem auch im Zusammenhang mit CMV-Infektionen [124]. In *in vitro* Experimenten mit gegen gB gerichteten chimären Immunrezeptoren konnte eine Lyse von Zielzellen, allerdings bisher nur

mit transfizierten Zellen, welche das Antigen in hoher Kopien-Zahl exprimieren, nachgewiesen werden [125].

Auch bispezifische Antikörper werden zur Behandlung von CMV-Infektionen untersucht. Lum, Ramesh *et al.* beschreiben als CMVbi bezeichnete bispezifische Antikörper, die durch Kopplung von Cytogam (anti-CMV) an OKT3 (anti-huCD3) entstehen [126]. Aktivierte CTLs wurden zunächst mit diesem Antikörper inkubiert und anschließend in *in vitro* Zytotoxizitäts-Experimenten mit CMV-infizierten Fibroblasten verwendet. Letztere werden durch die Antikörperbeladenen CTLs deutlich stärker lysiert, als durch nicht vorbehandelte aktivierte CTLs. Ein Vorteil von CMVbi könnte darin liegen, dass die CMV-Antigen-bindenden Teile nicht von einem monoklonalen Antikörper abstammen, sondern von Immunglobulinen (Igs) aus einem *Pool* humaner Immunsereen, welche einen hohen Anteil an CMV-spezifischen Igs enthalten. CMVbi kann somit mehrere verschiedene CMV-Antigene binden. Zudem ist Cytogam bereits ein zugelassenes Therapeutikum, für welches klinische Studien existieren, die eine signifikante Reduktion opportunistischer Infektionen etwa nach Herztransplantationen nahelegen [127]. Allerdings konnte in einer Studie mit Lungentransplantat-Empfängern kein protektiver Effekt durch die Gabe von Cytogam erreicht werden [128]. Zwei entscheidende Nachteile des CMVbi Antikörpers sind zum einen die Verwendung zweier kompletter Igs (inklusive deren Fc-Anteile) als Fusionspartner, zum anderen die Verwendung des murinen OKT3-Antikörpers. Die Antikörper können so nur durch die *ex vivo* Beladung von T-Zellen appliziert werden, da das Vorhandensein vieler frei zirkulierender CMVbi-Antikörper - wie nach einer direkten Injektion des Antikörpers zu erwarten - durch Fc-Rezeptor-Bindung auf NK-Zellen, Monozyten und Mastzellen zu einem unkontrollierbaren Zytokinsturm führen könnte [129]. Zudem hat die murine Aminosäuresequenz des OKT3-Antikörper-Anteils ein hohes immunogenes Potential [130], was zu einer gegen das Therapeutikum gerichteten Antikörper-Antwort und dadurch zu einer Verminderung oder Aufhebung der Wirksamkeit führen könnte.

### **1.3.2.3 Das HCMV-Glykoprotein B als Ziel-Antigen**

Das Glykoprotein B, auch *unique long 55* (UL-55), des humanen Cytomegalovirus ist auf der Oberfläche des Virions und auf der Oberfläche infizierter Zellen zu finden [131]. Es ist essentiell für Zell-Entry und Zell-zu-Zell-Verbreitung des Virus [132]. Die Zelloberflächen-Expression ist während der frühen (*early*) und der darauf folgenden *delayed early* Phase der CMV-Replikation zu beobachten [133]. Etwa 40-70 % aller gegen CMV gerichteter neutralisierender Antikörper sind gB-spezifisch [131], ein Großteil davon ist gegen die Domäne AD-1 (*antigenic domain 1*) gerichtet [134]. Zudem können Antikörper gegen gB in allen auf natürlichem Weg infizierten Personen nachgewiesen werden [135]. Neben den viralen Proteinen pp65, IE1 und IE2, ist auch gB in der Lage eine adaptive T-Zell-Antwort zu induzieren [136, 137]. All diese Kriterien machen gB zu einem attraktiven Protein etwa als Bestandteil eines Impfstoffs [138, 139] oder als Zielstruktur für immuntherapeutische Ansätze, wie CARs/cIRs [125], oder auch BiTE AKs. In dieser Arbeit wurde ein gegen die Domäne AD-1 gerichtetes BiTE AK untersucht. Diese Domäne gilt als hoch konserviert [140]. Somit könnte ein solches BiTE AK gegen viele verschiedene HCMV-Stämme wirksam sein.



## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die grundsätzliche Anwendbarkeit einer Behandlung viraler Infektionen mit BiTE AKs am Beispiel des Influenza A-Virus und des Cytomegalovirus untersucht werden. Beide besitzen Zelloberflächen-Proteine mit Epitopen, die hoch konserviert sind (M2e bei Influenza A, Glykoprotein B AD-1 beim Cytomegalovirus), was den Einsatz eines BiTE AKs zur Bekämpfung fast aller bekannter Stämme dieser Viren möglich machen könnte. Dazu sollten zunächst BiTE Antikörper-Konstrukte auf der Grundlage muriner monoklonaler Antikörper generiert und *in vitro* charakterisiert werden. Anschließend sollten die Aminosäure-Sequenzen der murinen Antigen-bindenden scFvs an die humane Keimbahn-Sequenz angeglichen werden, um human-ähnliche („*human-like*“) BiTE AKs zu erhalten, die im Vergleich mit den ursprünglichen murinen BiTE AKs mit geringerer Wahrscheinlichkeit eine Immunantwort im Menschen hervorrufen. Durch die Generierung und Charakterisierung mehrerer, sich in den Aminosäure-Sequenzen des Ziel-Antigen-Binders unterscheidender, *human-like* BiTE AKs sollten Varianten identifiziert werden, die trotz der veränderten Aminosäure-Sequenz nach Möglichkeit keine Verringerung der Spezifität oder der Affinität zu ihrem Antigen aufweisen. Diese Varianten sollten in *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays auf ihre zytotoxische Aktivität getestet und mit dem ursprünglichen murinen BiTE AK verglichen werden. Nach Möglichkeit sollte die zytotoxische Aktivität der BiTE AKs, außer auf transfizierten Antigen-exprimierenden Zellen, auch auf Virus-infizierten Zellen nachgewiesen, sowie deren Wirksamkeit in einem Tiermodell gezeigt werden. So sollten Varianten identifiziert werden, die als Ausgangspunkt für therapeutische BiTE AKs dienen könnten.

## 2 Material

### 2.1 Antikörper, Antigene, Detektions- und Separations-Reagenzien

Anti-CD28 mAb (Klon L293)	Becton Dickinson
Anti-human CD14 MACS <i>Beads</i>	Miltenyi Biotec
Anti-human CD56 MACS <i>Beads</i>	Miltenyi Biotec
Dynabeads M-280 Streptavidin	Life Technologies
IAV M2e-tGCN4 Protein	Zur Verfügung gestellt von Xavier Saelens, VIB Ghent, Belgien
Kaninchen anti-human EpCAM (Klon E144)	Epitomics
Maus anti-His Fab (Klon AD1.1.10), Alexa488-konjugiert	Zur Verfügung gestellt von Patrick Hoffmann, Amgen Research (Munich)
Maus anti-His mAb (Klon AD1.1.10)	AbD Serotec
Maus anti-His mAb, biotinyliert (Penta-His Biotin Conjugate)	Qiagen
Maus anti-humanCD3 (OKT-3)	Orthoclone, Janssen-Cilag
Maus anti-Influenza A Virus M2 Protein (Klon 14C2)	Abcam
Maus anti- $\beta$ -Aktin (Klon C4)	Santa Cruz Biotechnologies
Maus-anti-CMV-gB (Klon 2F12)	Virusys Corporation
Streptavidin-Alkaline Phosphatase Konjugat	Promega
SYTOX Red	Life Technologies
Vybrant DiO Lösung	Life Technologies
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific
Ziege anti-Maus F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Fc $\gamma$ Fragment spezifisch, APC-konjugiert	Jackson Immunoresearch
Ziege anti-Maus F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Fc $\gamma$ Fragment spezifisch, PE-konjugiert	Jackson Immunoresearch
HCMV gB Protein (ECD, Fc Tag; Cat. No. 10202-V02H2)	Sino Biological

### 2.2 Puffer und Lösungen

20x NuPAGE MES SDS Laufpuffer	Life Technologies
20x NuPAGE MES Transfer-Puffer	Life Technologies
4x NuPAGE LDS Proben-Ladepuffer	Life Technologies
6x DNA-Ladepuffer	Fermentas

Antikörper-Puffer	10 mM Zitronensäure-Monohydrat 75 mM L-Lysin-Monohydrochlorid eingestellt auf pH 7,0; sterilfiltriert
Bakterien-Lysepuffer (= 2x BBS-Puffer + Lysozym)	400 mM Borsäure 320 mM NaCl 4 mM EDTA eingestellt auf pH 8,0 + 2,5 mg/ml Lysozym
Erythrozyten-Lyse-Puffer	150 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 100 mM Na <sub>2</sub> EDTA eingestellt auf pH 7,2; sterilfiltriert
FACS-Puffer	PBS 2 % FCS 0,05 % Natrium-Azid
Glycin-HCl	0,1M Glycin-Hydrochlorid 1 mg/ml BSA Eingestellt auf pH 2,2
HBS-EP Puffer	GE Healthcare
IMAC Puffer A	100 mM NaCl 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 % (v/v) Glycerin eingestellt auf pH 7,2; sterilfiltriert
IMAC Puffer B	100 mM NaCl 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500 mM Imidazol 5 % (v/v) Glycerin eingestellt auf pH 7,2; sterilfiltriert
MACS-Puffer	PBS 0,5 % (v/v) FCS 2 mM EDTA GE Healthcare
Natriumacetat-Puffer, pH 5,0 bzw. pH 5,5 PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> , ohne Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom
PBST	PBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Permeabilisierungs-Puffer	PBS 2 % FCS 0,5 % Saponin

TBS	50 mM TRIS 150 mM NaCl eingestellt auf pH 7,4
Trehalose-Stammlösung	24 % (w/v) Trehalose in Antikörper-Puffer (s.o.) oder in PBS eingestellt auf pH 7,2; sterilfiltriert
TRIS-base-Lösung	2 M Tris-base eingestellt auf pH 12,0
Zell-Lysepuffer	PBS 1 % (v/v) Triton X-100 1 complete Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)/40 ml

### 2.3 Zellkultur- und Bakterien-Medien und Zusätze

Carbenicillin	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Biochrom
EDTA (Versen) Lösung, 1 %	Biochrom
Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
Fötale Kälberserum (dialysiert gegen PBS, nukleosidfrei)	Biochrom
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
HEPES Pufferlösung, 1 M	Biochrom
HyClone PF-CHO LS	Thermo Scientific
HyQ PS Medium	HyClone PF-CHO LS 0,2 % (v/v) Phenolrot-Lösung 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin 1x NEA 500 nM β-Mercaptoethanol 10 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat
Interleukin-2 (IL-2; Proleukin)	Chiron Behring
Iscove's Flüssigmedium mit stabilem Glutamin	Biochrom
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
Methotrexat (MTX)	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Biochrom

Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom
Nukleosid-Mix (200x)	2 mg/ml Adenosin
	2 mg/ml Desoxyadenosin
	2 mg/ml Thymidin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom
Phenolrot-Lösung	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Biochrom
RPMI+-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin
	10 % (v/v) FCS
	100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin
	1x NEA
	500 nM β-Mercaptoethanol
	10 mM HEPES
	1 mM Natriumpyruvat
SB-Medium	30 g/L Trypton/Pepton
	20 g/L Hefeextrakt
	10 g/L MOPS
	eingestellt auf pH 7,0; autoklaviert
SOC (Broth) Medium	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol-Lösung	Gibco
Trypsin/EDTA-Puffer	PBS
	0,25 % Trypsin
	0,05 % EDTA
Trypsin-Lösung (2,5 %)	Biochrom

## 2.4 Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid-Hydrochlorid (EDC)	GE Healthcare
1-Step NBT/BCIP	Thermo Scientific
Adipinsäure-Dihydrazid	Sigma-Aldrich
Agarose	Sigma-Aldrich
Ampuwa H <sub>2</sub> O	Fresenius Kabi
Biocoll-Trennlösung	Biochrom
Biotin-Polyethylenglykol-N-Hydroxysuccinimid (Biotin-PEG-NHS)	Nektar Pharmaceuticals
Borsäure	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biowest
CM-Dextran Natrium-Salz	Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
DTT	Life Technologies
EDTA	Carl Roth
Ethanol	Merck
Ethanolamin-HCl	GE Healthcare
Fractogel EMD Chelat (M)	Merck
Glycerin	Merck
Glycin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Carl Roth
Imidazol	Merck
InstantBlue Coomassie-Färbelösung	Expedeon
IPTG	Thermo Scientific
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth
L-Lysin-Monohydrochlorid	Merck
Lysozym aus Hühner-Eiweiß	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Fluka
MOPS	Carl Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Peroxidase-Substrat SuperSignal West Pico	Thermo Scientific
Polyethylenglykol (PEG) 8000	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	Merck
Saponin	Sigma-Aldrich
Tris base	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck
Zitronensäure-Monohydrat	Merck

## 2.5 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Reagenzien für enzymatische Reaktionen

10x PCR-Puffer ThermoPol buffer	New England Biolabs
dNTP Solution Mix (10 mM)	New England Biolabs

Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs

## 2.5.2 DNA- & Protein-Marker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard	Invitrogen

## 2.6 Pro- und eukaryotische Organismen, Viren

### 2.6.1 Bakterien

<i>E. coli</i> TG1 (Best.-Nr.: 200123)	Agilent
<i>E. coli</i> XL-1 blue (Best.-Nr.: 200228)	Agilent

### 2.6.2 Viren

Helferphagen VCSM13	Stratagene
Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Sämtliche Influenza Virusstämme wurden zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Xavier Saelens, VIB Gent, Belgien
Influenza A/California/4/09 (H1N1)	
Influenza A/swine/Ontario/42729A/01 (H3N3)	
Influenza A/Memphis/106/76 (H3N2)	
Influenza A/X47 (H3N2)	
Influenza B/Memphis/10/97	

### 2.6.3 Zelllinien

4119 LnPx	Zur Verfügung gestellt von Prof. Fickenscher, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg [141]
CHO-K1 (DHFR <sup>-</sup> ; ACC110)	DSMZ
CTLL-2	Sigma-Aldrich
HPB-ALL (ACC483)	DSMZ
HSC-F	Japan Health Science Foundation
MDCK	Sigma-Aldrich

### 2.6.4 Versuchstiere

BALB/c Mäuse

Charles River Laboratories

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Biacore Sensor Chips CM5	GE Healthcare
Polyacrylamid-Gele NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris	Life Technologies
Eppendorf <i>Tubes</i> 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Gewebekulturplatten, 96-Well, F-, V-, U-Form	Greiner
PVDF Membran Hybond-P	GE Healthcare
Kryoröhrchen	Nunc
Leucosep-Röhrchen, 50 ml	Greiner
MACS LS-Säulen	Miltenyi Biotec
PCR 8-er Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific
Petrischalen	Greiner
Polypropylen Sammel-Röhrchen	Sarstedt
Qiashredder Proben-Homogenisierung-Säulchen	Qiagen
Schwammkissen für Western-Blot	Life Technologies
Sterilfilter Stericap PLUS, 0,2 µm	Millipore
Zellkulturflaschen mit Filterschraubverschlüssen	Greiner, Nunc
Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 6 bzw. 20 bzw. 500 (10.000 MWCO)	Sartorius
Zentrifugationsröhrchen, 50 ml und 15 ml	Becton Dickinson
Biomax MR Röntgenfilm	Kodak
Elektroporations-Küvetten, 2 mm Spaltbreite	Biorad
96-Well Mikrotiter-Platten ( <i>Half Area Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind</i> )	Corning

## 2.8 Geräte

ÄKTApurifier System	GE Healthcare
Biacore 2000	GE Healthcare
BioPhotometer	Eppendorf
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heraeus Cytoperm 2	Thermo Scientific



Durchflusszytometer FACSCanto II mit HTS-Einheit	Becton Dickinson
Elektroporator Gene Pulser Xcell	Biorad
Kühlzentrifuge Rotanta 460 RS	Hettich
Mini MACS Magnet	Miltenyi Biotec
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
PCR-Thermocycler	MJ Research
Röntgenfilm-Entwickler-Maschine <i>Extra-X</i>	Velopex
Rotationsmischer L28	Labinco
SEC-Säule HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Thermo Scientific
Thermocycler Hybaid PX2	Thermo Scientific
Thermomixer/-block	Eppendorf
Tischzentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Thermo Scientific
Wasserbad	GFL
XCell SureLock Mini-Cell Elektrophorese-System	Life Technologies
Zellzähl-Gerät Moxi Z	Orflo Technologies

## 2.9 Kits

BCA Protein-Assay	Thermo Scientific
CD8 <sup>+</sup> T cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit	Thermo Scientific
ToxiLight Non-destructive Cytotoxicity Bio-Assay Kit	Lonza

## 2.10 Dienstleistungen

DNA-Sequenzierung	Sequiserve
Oligonukleotid-Synthesen	Metabion
Gen-Synthesen	Geneart (Life Technologies)

## 2.11 Software

BIAevaluation Software 3.2

EndNoteX7

FCS Express Research V4

FlowJo V10

Graph Pad Prism 6

HP Scansoftware

Office 2010

Unicorn 5.20

Vector NTI Advance 11

GE Healthcare

Thomson Reuters

De Novo Software

TreeStar

Graph Pad Software

Hewlett-Packard

Microsoft

GE Healthcare

Invitrogen

## 3 Methoden

### 3.1 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in ihren jeweiligen Medien (siehe unten) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2-3 Tage, oder wenn das Medium verbraucht war (Umschlag des pH-Indikators Phenolrot von rot nach gelb), wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt. Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen anschließend in einen Stickstofftank (-170 °C) überführt. Zur Reaktivierung wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in 15 ml warmem Kulturmedium gewaschen und abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Medium resuspendiert und in Kultur genommen.

#### 3.1.1 Generierung und Kultivierung Antigen-exprimierender Zellen

Das Ziel der Zelllinien-Generierung war es, das Ziel-Antigen in seiner natürlichen Form (Influenza A M2 Protein), oder als membrangebundenes rekombinantes Antigen (CMV-gB Proteine) in einer nativen Konformation mit hohen Expressionsraten verfügbar zu machen, um die Bindung, die Bindungs-Affinitäten und die zytotoxischen Aktivitäten von BiTE AKs überprüfen und messen zu können.

Die kodierende Sequenz der extrazellulären Domäne des CMV-gB Proteins wurde im selben Leseramen gefolgt von der Sequenz für einen Ser<sub>1</sub>-Gly<sub>4</sub>-Ser<sub>1</sub>-Linker und der Transmembran- und Intrazellulär-Domäne von huEpCAM (Aminosäuren 226-314; GenBank *accession number* NM\_002354). Alle kodierenden Sequenzen wurden von einem Stopp-Codon gefolgt. Die synthetisierten Gen-Fragmente (für CMV-gB x EpCAM Proteine) wurden so entworfen, dass sie eine EcoRI-Schnittstelle *upstream* der jeweiligen CMV-gB *Leader*-Sequenz und eine Sall-Schnittstelle *downstream* des Stopp-Codons enthielten. In die das Influenza A-Virus (IAV) M2-Protein codierende DNA wurden die gleichen Restriktionsschnittstellen *upstream* der *Leader*-Sequenz und *downstream* des Stopp-Codons über eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern, die diese Schnittstellen enthielten, eingefügt. Der Vektor mit der M2-codierenden Sequenz, der als *Template* in dieser PCR-Reaktion eingesetzt wurde, wurde von der Arbeitsgruppe von Xavier Saelens (VIB Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die EcoRI- und Sall-geschnittenen Gen-Fragmente wurden in einen mit den gleichen Enzymen verdauten pEF-DHFR Vektor kloniert (pEF-DHFR ist beschrieben in Raum, Gruber [142]). Alle oben genannten Prozeduren wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt, beschrieben in Sambrook [143].

Für die eukaryotische Expression jedes Antigens wurden DHFR-defiziente CHO-Zellen (CHO-K1/CHO<sup>DHFR-</sup>) mit einem Vektor mit verifizierter Nukleotidsequenz mittels Elektroporation

transfiziert. Dazu wurden ca.  $1 \times 10^7$  CHO<sup>DHFR</sup>-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit ca. 3 µg Vektor-DNA resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit einer Spannung von 260 V und einer Kapazität von 950 µF. Danach wurden die Zellen sofort in 30 ml warmem Medium mit 10 % dialysiertem FCS und 1x Nukleosid-Mix aufgenommen. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches Medium ohne Nukleoside ersetzt, wodurch nur transfizierte Zellen überleben konnten. Nicht transfizierte Zellen lösten sich vom Flaschenboden ab und wurden beim Wechseln des Mediums entfernt. Nach 1-2 Wochen wurden die so selektierten Zellen (Primärselektion, PS) in Medium ohne FCS aufgenommen und wuchsen in Suspension weiter.

Das verwendete Medium zur Kultivierung aller CHO-Zellen war HyQ PS Medium. Für die Kultivierung untransfizierter CHO<sup>DHFR</sup>-Zellen wurde dem Medium außerdem noch 1x Nukleosid-Mix zugesetzt. Nach erfolgreicher Primärselektion stabiler Transfektanten in Medium ohne Nukleosid-Zugabe, wurde z.T. auf Transfektanten mit mehrfachen Kopien (und damit stärkerer Antigen-Expression) des transfizierten Gens selektioniert, indem Methotrexat (MTX) zu einer Endkonzentration von 20 nM (1. Amplifikationsstufe, 1. Amp.), bei manchen BiTE AK produzierenden Zellen auch 100 nM (2. Amp.) oder 500 nM (3. Amp.), zugegeben wurde.

### 3.1.2 Überprüfung der Antigen-Expression

Die Expression von Influenza A-M2 in CHO-Zellen wurde durch eine Oberflächen-Immunfluoreszenz-Färbung mit einem monoklonalen Maus-anti-IAV-M2 Antikörper als Primär-Ak, die Expression von HCMV(AD169)-gB x EpC, HCMV(Toledo)-gB x EpC, CyCMV-gB x EpC und RhCMV-gB x EpC durch eine Oberflächen-Immunfluoreszenz-Färbung mit einem monoklonalen Maus-anti-CMV-gB Antikörper als Primär-Ak detektiert. Als Sekundär-Antikörper wurde jeweils ein Allophycocyanin (APC)- oder Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper verwendet. Nach jeder Inkubation mit einem Antikörper (jew. 1:200 verdünnt in PBS/2 % FCS; 45 min, 4 °C) wurden die Zellen zweimal mit PBS/2 % FCS gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenz-Intensität der gefärbten Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die Software FCS Express 4.

Für CMV-gB x EpCAM-exprimierende CHO-Zellen wurde die Antigen-Expression neben der Oberflächen-Färbung noch über die Färbung des C-Terminus des EpCAM-Anteils des Fusionsproteins nachgewiesen. Dazu wurde zum einen Immunfluoreszenz-Färbungen mit anschließender Messung am Durchflusszytometer durchgeführt. Hierzu wurden die transfizierten Zellen zunächst in Permeabilisierung-Puffer resuspendiert, anschließend mit einem Kaninchen-anti-EpCAM (C-Terminus) Antikörper (1:50 in Permeabilisierung-Puffer) als Primär-Antikörper und einem APC-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:200 in Permeabilisierung-Puffer) als Sekundär-Antikörper gefärbt. Zwischen den Farbe-Schritten (jew. 45 min, 4 °C) wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierung-Puffer gewaschen. Die Messung und Auswertung erfolgte, wie oben beschrieben.

Für eine genauere Quantifizierung der Menge von CMV-gB x EpCAM in HCMV-gB x EpCAM- und CyCMV-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen, wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in Zell-Lysepuffer lysiert und über eine Qiashredder-Säule homogenisiert. Die Gesamtprotein-Konzentrationen der Lysate wurden mittels BCA-Assay (nach Hersteller-Angaben durchgeführt) bestimmt und jeweils gleiche Gesamtprotein-Mengen für die Detektion über SDS-PAGE und Western-Blot (siehe Abschnitte 3.3 und 3.4) eingesetzt.

### 3.1.3 Kultivierung von T-Zelllinien

Die humane T-Zelllinie HPB-ALL wurde in RPMI+-Medium kultiviert und gesplittet, wenn ein Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot, der im Medium enthalten war, von rot nach gelb festgestellt werden konnte.

Murine CTLL-2-Zellen (*cytotoxic T lymphoblastoid line-2*) wurden in Iscove's Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 500 nM 2-Mercaptoethanol und 20 U/ml IL-2 kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet. Dabei wurde zu einem Teil Zell-Suspension die 5- bis 20-fache Menge frisches Medium gegeben, sodass die Konzentration ca.  $1-2,5 \times 10^5$  Zellen/ml betrug.

Die Cynomolgus-T-Zelllinie HSC-F wurde in RPMI+-Medium mit 50 U/ml IL-2 kultiviert. Die Kultivierung der Rhesus-T-Zelllinie 4119 LnPx erfolgte in RPMI+-Medium mit 75 U/ml IL-2. Auch bei diesen beiden Zelllinien wurde ein Medienwechsel vorgenommen, wenn ein Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot festgestellt werden konnte.

### 3.1.4 Kultivierung von MDCK-Zellen

*Madin Darby canine kidney* (MDCK)-Zellen wurden in DMEM mit 100 U/ml/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES und 10 % FCS kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreichten, wurden sie im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu wurden die fest adhären- den Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst (ca. 10 min bei 37 °C im Brutschrank). Ein Fünftel des Volumens der Zellsuspension wurde mit vier Teilen frischem Medium in eine neue Zellkultur-Flasche über- führt.

### 3.1.5 Generierung BiTE AK produzierender Zellen

Zur Produktion von BiTE AKs wurden Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-defiziente CHO-Zellen mit einem pEFDHFR-Plasmid transfiziert, das neben der codierenden Sequenz für DHFR auch die codierende Sequenz für ein BiTE AK enthielt. Letztere bestand aus den codierenden Se- quenzen für die Leader-Sequenz zur eukaryotischen Expression (MGWSCILFLVATATGVHS), gefolgt von der VH-Sequenz des *Target*-Binders, einem 3x G<sub>4</sub>S-Linker, der VL-Sequenz des *Target*-Binders, einem G<sub>4</sub>S-Linker, der VH-VL-Sequenz des CD3-Binders analog zum *Target*-Binder

und einem 6x His-*Tag*, gefolgt von einem Stopp-Codon. Die Klonierung des Vektors und die Transfektion der Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Für die Produktion möglichst hoher Mengen von BiTE AKs wurde nach erfolgter Primär-Selektion durch Zugabe von MTX zu einer Endkonzentration von 20 nM (1. Amp.), 100 nM (2. Amp.) oder 500 nM (3. Amp) auf Zellklone mit multiplen Kopien der transfizierten DNA selektioniert. Die Zellen wurden weiter expandiert und kultiviert, bis ein Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb stattgefunden hatte. Der Zellkultur-Überstand, der die sezernierten BiTE AKs enthielt, wurde gesammelt, bei -80 °C eingefroren und bis zur Aufreinigung der BiTE AKs bei -20 °C gelagert.

### 3.1.6 Generierung Antigen-sezernierender Zellen

Antigene, die nicht oder nicht in ausreichender Menge von kommerziellen Anbietern oder Kollaborations-Partnern zu erhalten waren, aber für ein Phage Display-*Panning* (s.u.) benötigt wurden, wurden selbst hergestellt, indem die der Literatur entnommene codierende Sequenz für das jeweilige Antigen synthetisiert wurde. Die Gen-Synthese und Verifizierung der Sequenz wurde von GeneArt (Regensburg) durchgeführt. Fusionsproteine von HCMV-gB (Stamm AD169) und CyCMV-gB wurden auf diese Weise produziert. Die AS-Sequenzen der zu exprimierenden Antigene entsprachen vom N-Terminus bis Position 691 (HCMV-gB, Stamm AD169, *Accession number*: P06473.1), bzw. Position 659 (CyCMV-gB, Stamm Ottawa, *Accession number*: ADV35145.1) der publizierten Sequenz, und enthielt die komplette AD1-Domäne. C-terminal davon wurden sie gefolgt von einer murinen Immunglobulin IgG-Fc1-Domäne (*Accession number*: FJ232993.1), einem FLAG- und einem (H<sub>3</sub>G<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-*Tag* für die Aufreinigung über eine mit Zink beladene IMAC-Säule, sowie einem Stopp-Codon. Die Transfektion und Kultivierung von CHO-Zellen zur Produktion des Proteins, sowie das Sammeln des Überstandes mit den sezernierten Antigenen erfolgte wie in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.5 beschrieben.

## 3.2 Aufreinigung von Proteinen aus Zellkultur-Überstand

Durch Abzentrifugieren der in Suspension kultivierten transfizierten CHO-Zellen, die für die Protein-Produktion eingesetzt wurden (vgl. Abschnitt 3.1.5 und 3.1.6), wurde der Überstand gewonnen, der durch Sterilfiltration weiter geklärt wurde.

Der Aufreinigungs-Prozess wurde mit Hilfe eines ÄKTApurifier Systems mit der dazugehörigen Software „Unicorn 5.2“ durchgeführt. Eine IMAC-Säule mit 10 ml ZnCl<sub>2</sub>-beladenem Fractogel EMD Chelat wurde mit IMAC Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen des Zellkultur-Überstandes wurden nicht gebundene Bestandteile durch Waschen mit Puffer A entfernt. Vor der Elution der mit einem His-*Tag* versehenen BiTE AKs oder mit einem (H<sub>3</sub>G<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-*Tag* versehenen Antigene wurde ein Prä-Elutionsschritt durchgeführt, bei dem durch Waschen mit Puffer A,

dem 10 % IMAC Puffer B beigemischt waren (entspricht Puffer A mit 50 mM Imidazol), unspezifisch gebundene Proteine entfernt wurden. BiTE AKs bzw. Antigene wurden mittels IMAC Puffer B (entspricht Puffer A mit 500 mM Imidazol), von der Säule eluiert und mit Hilfe eines Fraktionen-Kollektors in Fraktionen von 3 ml gesammelt. Die Fraktionen, die die eluierten BiTE AKs bzw. Antigene enthielten, wurden gepoolt und mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 20), der zuvor zunächst mit PBST, dann mit Antikörper-Puffer prä-äquilibriert wurde (jew. 10 ml, 10 min Zentrifugation bei 3500 x g), auf 3 ml aufkonzentriert (Zentrifugation bei 4 °C, 3500 x g für ca. 1,5 h, abhängig von der Protein-Konzentration im Eluat). Das konzentrierte Eluat wurde auf eine Superdex S200 SEC-Säule aufgetragen, die mit Antikörper-Puffer prä-äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit Antikörper-Puffer. Bei der Aufreinigung von Antigenen wurde für die Prä-Äquilibrierung und für die Elution statt Antikörperpuffer PBS verwendet. Das gesamte Volumen wurde in Fraktionen von 1-2 ml in Polypropylen Sammel-Röhrchen gesammelt, um verschiedene Formen der BiTE AKs bzw. Antigen-Moleküle (Aggregationen, Multimer, Dimer, Monomer und mögliche Abbauprodukte) voneinander zu trennen. Die Fraktionen, die Monomer enthielten wurden gepoolt und eine Trehalose-Stammlösung wurde zu einer Endkonzentration von 4 % Trehalose hinzugefügt. Die Fraktionen, die andere Formen des Proteins enthielten, wurden ebenfalls gepoolt und für die Analytik (SDS-PAGE und Western-Blot, s.u.) verwendet. Die Protein-Konzentration des Monomer-Pools wurde über die Absorption bei 280 nm in Polykarbonat-Küvetten (UVette) mit 1 cm Schichtdicke und den von der Software VectorNTI berechneten  $A_{280}$ -Korrekturfaktor für das jeweilige Protein bestimmt. Anschließend wurde der Monomer-Pool aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde zur Analyse von Protein-Aufreinigungen und zur Überprüfung der Antigen-Expression in transfizierten Zellen eingesetzt.

Zur Analyse einer Protein-Aufreinigung wurde von jeder während der Aufreinigung anfallenden Fraktion ein Aliquot abgenommen, im Verhältnis 4:1 mit Proben-Ladepuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. In der Regel wurden folgende Fraktionen verwendet: Zellkultur-Überstand, IMAC-Durchlauf, IMAC-Präelutions-Peak (50 mM Imidazol), IMAC Elutions-Peak (500 mM Imidazol), Aggregations-, Multimer-, Dimer-, Monomer-, und evtl. Abbauprodukte-Peak. Der Zellkultur-Überstand und der IMAC-Durchlauf wurden zuvor durch Zentrifugation in Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren 5-fach aufkonzentriert. Je Tasche eines Polyacrylamid-Gels wurden 25 µl Probe geladen. Je Gel wurde in 1-2 Taschen die Gleiche Menge eines BiTE AKs mit bekannter Konzentration und in eine Tasche ein Größenstandard geladen. Die Elektrophorese lief 45-60 min bei 120 V und 120 mA in 1x MES SDS Laufpuffer. Für die Analytik wurden 2 Gele identisch beladen, wovon eines in einer Coomassie-Färbelösung für ca. 1 h gefärbt und anschließend in mehreren Chargen Wasser gewaschen wurde. Das andere Gel wurde für einen Western-Blot verwendet (siehe Abschnitt 3.4).

Zur Analyse der Lysate von mit CMV-gB x EpCAM transfizierten Zellen wurden diese mit gleichen Gesamtprotein-Mengen in die Taschen eines Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurde das Gel für einen Western-Blot verwendet.

### 3.4 Western-Blot

Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran transferiert. Dies erfolgte in einem Nassblot-Elektrophorese-System zwischen in 1x NuPAGE Transferpuffer getränktem Whatman-Filterpapier und Schwämmen (1 h, 45 V). Anschließend wurde die Membran in Blocklösung (PBST/3 % BSA) überführt (1 h, RT), mit Primärantikörper (1:1000 in Blocklösung) eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert und 3x in PBST jew. 5 min gewaschen. Als Primärantikörper für die Detektion von BiTE AKs in der Aufreinigungs-Analytik wurde ein biotinylierter Maus-anti-Histidin-*Tag* Antikörper verwendet. Zur Detektion von CMV-gB x EpCAM wurde ein Kaninchen-anti-EpCAM (C-Terminus) Antikörper verwendet. Die weitere Detektion erfolgte mit Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (BiTE AK-Detektion; 1:5000 in Blocklösung, 1 h, RT) oder einem Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (Thermo Scientific; 1:1000 in Blockpuffer, 1 h, RT). Anschließend wurde die Membran erneut 3x mit PBST gewaschen. Als Substrat für die BiTE AK-Detektion diente eine NBT/BCIP-Lösung. Die Membran wurde in dieser Lösung bei RT so lange geschwenkt, bis deutliche Banden sichtbar wurden (ca. 20 min) und anschließend 3x mit Wasser gewaschen. Für die Detektion von CMV-gB x EpCAM in den Zelllysaten wurde Peroxidase-Substrat (SuperSignal West Pico Kit) für 3 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Chemolumineszenz mittels eines Röntgenfilms und einer Entwickler-Maschine in der Dunkelkammer detektiert.

### 3.5 Biotinylierung von Antigenen

Die Proteine HCMV(AD169)-gB x murFc1 und CyCMV-gB x murFc1 wurden für ein Phage Display-*Solution-Panning* (siehe Abschnitt 3.6.3) in biotinylierter Form benötigt. Hierfür wurden die Proteine, die zuvor wie in Abschnitt 3.2 beschrieben aufgereinigt und in PBS gelöst waren, über einen Vivaspin 6 Zentrifugalkonzentrator bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml aufkonzentriert. Zu einem Milligramm CMV-gB x murFc1 wurde in 20-fachem molarem Überschuss Biotin-PEG-NHS und DMSO zu einer Endkonzentration von 10 % gegeben. Diese Mischung wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß 2 h in einem Rotationsmischer bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Adipinsäure-Dihydrazid (20 mg/ml in PBS) und weitere Inkubation für 15 min abgestoppt. Danach wurde der Reaktionsansatz über eine SEC-Säule mit PBS als Laufpuffer aufgetrennt. Die Fraktionen des Haupt-Protein-Peaks wurden gepoolt und die Konzentration wurde photometrisch über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Verifizierung der erfolgreichen Biotinylierung erfolgte über SDS-PAGE



und anschließenden Western-Blot, welcher mit AP-gekoppeltem Streptavidin inkubiert und nach 3 Waschschritten mit NBT/BCIP-Lösung gefärbt wurde. Die Aufreinigung über SEC und die Analyse über SDS-PAGE und Western-Blot sind in den Abschnitten 3.2 bis 3.4 genauer beschrieben. Das biotinylierte Antigen wurde aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.6 *Human-like engineering* muriner V-Regionen

Um auf Grundlage muriner scFv-Binder äquivalente Binder mit *Framework*-Sequenzen zu generieren, die eine größere Ähnlichkeit zu humanen Keimbahnsequenzen besitzen, und damit die Immunogenizität im Menschen zu minimieren, wurde ein „*human-like engineering*“ Ansatz verwendet. Die *in vitro*-Selektion der besten Sequenzen (s.u.) wurde per Phage Display durchgeführt. Um scFv-Bibliotheken mit einer Vielzahl unterschiedlicher Sequenzen zu generieren, wurden die ähnlichsten VH- und VL-Segmente der humanen Keimbahn (vgl. <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php>) identifiziert und als Vorlage für die *Framework*-Regionen (FRs) verwendet.

#### 3.6.1 Primer-Design

Zur Generierung der *human-like* Sequenzen wurden *Wobble*-Primer so entworfen, dass sie an definierten Positionen künstliche Mutationen mit einer Wahrscheinlichkeit von jew. 75 % (anti-M2e BiTE) oder 90 % (anti-CMV-gB BiTE) enthielten. Bei Vorhandensein dieser Mutationen in einem Codon wurde die Aminosäure der humanen FR-Sequenz kodiert, ansonsten die der murinen Sequenz. Die CDR-kodierenden Sequenzen wurden größtenteils nicht verändert. Eine Ausnahme hiervon stellte die CDR 2 der VH des CMV-gB-Binders dar, bei dem versucht wurde, das Serin einer hier vorhandenen Glykosylierungs-Stelle (Aminosäure-Sequenz: NYS) durch das Einfügen von *Wobble*-Basen (50 %/50 %) durch eine beliebige Aminosäure zu ersetzen und dadurch die Glykosylierungs-Stelle zu entfernen. Auf diese Weise sollten Binder generiert und selektiert werden, die eine deutlich höhere Ähnlichkeit zur humanen Keimbahnsequenz aufweisen, als der murine Ausgangs-Binder.

Jedes *Wobble*-Primer Set bestand aus fünf bis sechs Oligonukleotiden, die die Sequenz der jeweiligen kompletten V-Region abdeckten und jeweils einen komplementären Überlappungsbereich von 15-20 Nukleotiden aufwiesen. Jeder zweite Primer war ein *Antisense*-Primer.

Folgende VH- und Vκ-Primer wurden für die Generierung von halb *human-like* anti-Influenza A-M2e-Bindern verwendet (jede Klammer repräsentiert eine *Wobble*-Position, an der in 75 % der Primer die erste und in 25 % der Primer die zweite Base enthalten ist):

„148“ anti-Influenza A-M2e VH Primer-Set:

5'-148-A-Xho1: CAGCTGCTCGAGTCTGGGGGAGGCT(T/C)AGTG(C/A)AGCCTGGAGGGTCCCTG  
 3'-148-B: CTGGCGAACCCAAGACATGGCATAAGTACTCA(C/A)AG(T/A)GAATCCAGAGGCTG(C/A)  
 ACAGGA GAGT(C/T)TCAGGGACCCTCCAGGCT  
 5'-148-C: ATGTCTTGGGTTCCGAG(G/A)CTCCAG(G/A)GAAG(G/A)GGCTGGAATGGGTC(T/G)CA  
 TCCATG AGTAGTGGTGGTAGTCTTTATTATCCAGACACT  
 3'-148-D: CCTCAGACTG(T/C)TCATTTGCAGGTACA(A/C)A(G/A)TGTTCTTG(G/A)(A/C)A(T/G)TAT  
 CTCTGG AGATGGTGAATCGGCCCTTACAGTGTCTGGATAATAAAG  
 5'-148-E: TACCTGCAAATGA(A/G)CAGTCTGAGG(G/T)CTGAGGACACGGCC(G/A)TGTATTACT  
 GTG(C/T)A AGAGGAGGCTACGGAACCTTCGACTGGGGC  
 3'-148-F-BstEII: GGAGACGGTGACCAGGGTCCCTTGGCCCCAGTACGAAGTTCCGTAGCCTCCTCT

„148“ anti-Influenza A-M2e Vκ Primer-Set:

5'-148-G-Sac1: TCCGGTGGTGGTGGTTCTGAGCTC(G/T)TG(A/T)TGACCCAAACTCCACTCTCCCTG  
 (T/C)CTGTCA(C/G)TC(C/T)TGGA(C/G)A(A/T)C(C/A)GGCCTCCATCTCTTGACAGA  
 3'-148-H: AGACTGGCCTGGTTTCTGCAGGTACCATTCTAAATAGGTGTCTCCAATACTATGAACAAT  
 GCTCTGA CTAGATCTGCAAGAGATGGAGGC  
 5'-148-I: TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCA(C/A)AGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGAT  
 TTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGA  
 3'-148-J: ACCTTGAAAGCAGTAATAAAA(C/T)TCCCA(C/G)ATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATCTTG  
 AGTGTGA AATCTGTCCCTGATCCACTGCCACTGAACCT  
 3'-148-K-BsiW1-Spe1: TGATCAGCATGCTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCTGTCCGAACGTGTACGG  
 GAAATGTGAACCTTGAAAGCAGTAATA

Für die Generierung von halb *human-like* anti-CMV-gB Bindern wurden folgende VH- und Vκ-Primer verwendet (jede Klammer repräsentiert eine *Wobble*-Position, an der in 90 % der Primer die erste und in 10 % der Primer die zweite Base enthalten ist):

“287” anti-CMV-gB VH Primer-Set:

A-5'287VHXHOI: CAGCTGCTCGAGTCTGGA(G/C)CTGAG(G/C)TG(A/G)(A/T)GAAGCCTGGGGCC  
 TCAGTGAAG(G/A)TTTCCTGCAAAGCTTCTGGC  
 B-3'287VH: CTCAAGACCCTGTCCAGGC(G/C)(C/T)CTGC(C/T)TCACCCAGTTCATCCAAGAGCCA  
 (G/C)TGAATGTGTAGCCAGAAGCTTTGCAGGA  
 C-5'287VH: CCTGGACAGGGTCTTGAGTGGAT(G/T)GGACGGATTTATCCTGGAGATGGAGATACT  
 AACTACNNSGGAAAATTCAAGGGC  
 D-3'287VH: GCTGAGTT(C/G)CA(T/A)GTAGGCTGTGCTG(A/G)(T/A)GGAT(G/T)TGTCT(C/G)(T/C)  
 AGTCA(T/G)TGTG(A/G)CC(C/T)TGCCCTGAATTTCC  
 E-5'287VH: AGCACAGCCTAC(A/T)TG(G/C)AACTCAGCAG(G/C)CTTA(G/C)(G/C)TCTG(A/T)(C/G)  
 GAT(A/T)CTGCGGTCTATT(A/T)CTGTGCAAGAGATGATGGTTAC

F-3'287VHBSTEII: GACGGTGACCG(T/A)GGTTCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCATAGTAATCAAA  
GGCAACGTAGTAACCATCATCTCTTGC  
"287" anti-CMV-gB V<sub>k</sub> Primer-Set:

G-5'287VLSACI: GGTTCCTGAGCTCGTG(A/C)TGACACAG(A/T)CTCCT(C/G)(T/C)TTCCTTA(T/G)CT  
GTA(A/T)CTC(C/T)GGGGCAG(C/A)(C/G)GGCC(T/A)CCATCTCATGCAGGGCCAGC

H-3'287VL: GGGTGGCTGTCCTGGTTTCTGT(A/T)GATACCAGTGCATATAAGTATAACTAGATCTA  
CTGACACTTTGGCTGGCCCTGCATGAGAT

I-5'287VL: AAACCAGGACAGCCACCC(C/A)AACTCCTCATC(T/A)A(T/G)TATGCATCCAACCTAGAA  
TCTGGGGTCCCTG(A/C)CAGGTTCACTGGCAGTGGGTCT

J-3'287VL: GTGCTGACAGTAATAT(A/G)(C/T)T(C/G)CA(A/G)(C/T)ATCCTCC(G/T)CCTCCACA  
(C/G)GA(C/T)(T/G)GAT(C/G)TTGAGGGTGAAGTCTGTCCCAGACCCACTGCCACT

K-3'287VLBSIWISPEI: CAGGTCAGTACGTCGTTTATTTCCAGCTTGGTCCCC(T/C)(G/C)TCCGA  
ACGTGTACGGAATCTCCCAACTGTGCTGACAGTAATA

Für die Generierung von *human-like* CMV-gB-Bindern wurde außer dem *human-like engineering* mit den oben beschriebenen Primern noch ein zweites *human-like engineering* der CDRs 1 und 2 der hum V<sub>k</sub> 3-2-G1 (siehe Abbildung 32 Ergebnis-Teil) durchgeführt. Hierfür wurden folgende Primer verwendet (jede Klammer repräsentiert eine *Wobble*-Position, an der in 75 % der Primer die erste und in 25 % der Primer die zweite Base enthalten ist):

"287" anti-CMV-gB V<sub>k</sub> CDR *human-like engineering* Primer-Set:

A - 5' 287 HULI VL CDR HLE SACI: GGTTCCTGAGCTCGTGATGACACAGACTCCTCTTTCCTTATCTG  
TA(A/T)CTCCGGGGCAGCCGGCCTCCATCTCATGC

B - 3' 287 HULI VL CDR HLE: TTTGGGTGGCTGTCCTGGTTTCTGTAGATACCAGTGCA(A/T)ATAAG  
(T/A)ATAACTAG(A/C)TCTACTGA(G/C)ACTTTGGCTGG(A/C)C(T/C)TGCATGAGATGGA

C - 5' 287 HULI VL CDR HLE: CAGCCACCCAACTCCTCATCAAGTATGCATCCAACC(G/T)AGAATC  
TGGGGTCCCTGATAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC

D - 3' 287 HULI VL CDR HLE: GAACGTGTACGGAATCTCCCAACTGTGCTGACAGTAATATACTCCA  
ACATCCTCCGCCTCCACACGACTGATCTTGAGGGTGAAGTCTGTCCC

E - 3' 287 HULI VL CDR HLE BSIWI SPEI: ACCGGTACTAGTCGTCGTTTATTTCCAGCTTGGTCCC  
CTGTCCGAACGTGTACGG

### 3.6.2 Library-Aufbau

Die Primer eines Primer-Sets wurden äquimolar (1 µl je Primer, jeweils eingestellt auf 100 µM) in einer 25 µl PCR-Reaktion zusammen mit 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl Taq DNA-Polymerase und 2,5 µl dNTP-Mix eingesetzt. Dieser Ansatz wurde 3 min bei 94 °C, 1 min bei 65 °C, 1 min bei 62 °C, 1 min bei 59 °C, 1 min bei 56 °C, 1 min bei 52 °C, 1 min bei 50 °C und 10 min bei 68 °C in einem Thermocycler inkubiert. Das entstandene Produkt, das eine Größe von ca. 250-350 bp hatte, wurde über Agarose-Gelelektrophorese identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Das Fragment wurde anschließend

als Template in einer Standard PCR-Reaktion eingesetzt, in der die flankierenden 5'- und 3'-Primer des Primer-Sets eingesetzt wurden, welche die benötigten Restriktionsschnittstellen enthielten (siehe Primer-Bezeichnungen oben). Das PCR-Produkt mit der richtigen Größe (VH: ca. 350 bp; VL: ca. 330 bp) wurde über Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gel-Extraktion isoliert. 400 ng des *human-like* VH PCR-Produkts wurden mit XhoI und BstEII geschnitten und in den ebenso geschnittenen Phagemid pComb5BHis/N2-Vektor (1200 ng) ligiert, der bereits die korrespondierende murine VL-Sequenz enthielt. 400 ng des *human-like* VL PCR-Produkts wurden mit SacI und SpeI geschnitten und den ebenso geschnittenen Phagemid pComb5BHis/N2-Vektor (1200 ng) ligiert, der bereits die murine VH-Sequenz enthielt. Diese VH-VL-Kombinationen bildeten *Libraries* von halb *human-like* scFvs, aus denen durch Phage Display-*Panning* starke Binder selektiert wurden. Hierzu wurden mit den halb *human-like* scFv *Libraries* zunächst jeweils 300 µl elektrokompente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert, indem sie in einer Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite in einem *Gene-Pulser Xcell* elektroporiert wurden (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Die transformierten Bakterien wurden nach einstündigem Wachstum in SOC-Medium langsam an Carbenicillin (Carb) gewöhnt (zunächst Wachstum in SB-Medium mit 25 µg/ml Carb, dann in SB-Medium mit 50 µg/ml Carb). Die auf diese Weise selektierten Bakterien, die die *Library*-DNA enthielten, wurden mit  $1 \times 10^{12}$  Partikeln des Helfer-Phagen VCSM13 infiziert, was zur Produktion und Sekretion von filamentösen M13 Phagen-Partikeln führte, die einen ein scFv-Fragment kodierendes pComb5BHis/N2-Phagemid enthielten und das korrespondierende scFv-Protein als Fusionsprotein mit dem Phagen-Hüllprotein III auf der Oberfläche trugen. Auf diese Weise konnten in mehreren *Panning*-Runden aus der *Library* die DNA-Sequenzen isoliert werden, die scFvs kodieren, die eine starke Bindung an das Antigen aufweisen.

### 3.6.3 Library-Panning

Die Phage Display-*in vitro*-Selektion wurde in 4 Runden durchgeführt. Dies geschah entweder über mit Antigen gecoatete 96-Well Mikrotiter-Platten (*Platten-Panning*) oder über gelöstes, biotinyliertes Antigen (*Solution-Panning*). Der Ablauf eines Phage Display-*Pannings* ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

Für das *Platten-Panning* wurden 6 µg/ml M2e-tGCN4 in TBS (beschrieben in De Filette, Martens [144]), oder 5 µg/ml HCMV-gB ECD x Fc in TBS auf Mikrotiterplatten immobilisiert (Inkubation über Nacht bei 4 °C). Die Phagen-*Library* mit dem scFv-Repertoire wurde aus dem Bakterien-Kulturüberstand durch Präzipitation mit PEG 8000 (40 mg/ml) und NaCl (30 mg/ml) (Inkubation für 30 min auf Eis) und anschließende Zentrifugation geerntet. Das resultierende Phagen-Pellet wurde in 0,5 ml TBS/1 % BSA resuspendiert und die so eluierten Phagen 1 h auf den Antigen-beschichteten Wells der Mikrotiterplatten unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. ScFv-Phagen, die nicht spezifisch an das Antigen binden konnten, wurden in bis zu 10 Waschschritten mit TBS/0,05 % Tween 20/0,1 % BSA entfernt. Anschließend wurden die gebundenen Phagen mit 50 µl/Well Glycin-HCl (pH 2,2; 10 min Inkubationszeit bei RT) eluiert. Nach der Neutralisierung des Eluats mit 2 M TRIS-Base-Lösung (pH 12) wurde dieses verwendet, um frische *E. coli* XL1-Blue Bakterien ( $OD_{600} > 0,5$ ) zu infizieren. Erfolgreich infizierte und

damit Carb-resistente Bakterien wurden erneut durch Kultivierung in SB-Carb-Medium selektiert und anschließend mit VCSM13 Helferphagen infiziert, um die nächste Runde des Phage Display-Pannings zu starten.

Beim *Solution-Panning*, das für das zweite *human-like engineering* der *human-like* CMV-gB Binder durchgeführt wurde, wurden biotinylierte HCMV-gB x murFc<sub>1</sub>- und CyCMV-gB x murFc<sub>1</sub>-Fusionsproteine (Herstellung siehe Abschnitte 3.1.6 und 3.5) verwendet. Diese wurden nach dem Resuspendieren des Phagen-Pellets zu der Phagen-Lösung gegeben und in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 h auf einem Drehrad inkubiert. In den vier *Panning*-Runden wurden abnehmende Antigen-Konzentrationen verwendet (100 nM, 50 nM, 10 nM, 10 nM). Außerdem wurde in den *Panning*-Runden alternierend HCMV-gB x murFc<sub>1</sub> (Runden 1 und 3) und CyCMV-gB x murFc<sub>1</sub> (Runden 2 und 4) eingesetzt. Die an das biotinylierte Antigen gebundenen scFv-Phagen wurden über Streptavidin-beschichtete Dynabeads mit Hilfe eines Magneten isoliert. Die übrigen Schritte wurden wie für das Platten-*Panning* beschrieben durchgeführt.

Nach vier Selektions-Runden wurde das Pellet der Phagen-infizierten Bakterien verwendet, um daraus mit Hilfe des Plasmid Plus Midi Kits die Phagemid-DNA zu isolieren. Mit dieser DNA wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und SpeI durchgeführt, und damit die VH-VL Kombination aus dem Phagemid herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert und über ein Gel Extraktions-Kit aufgereinigt.

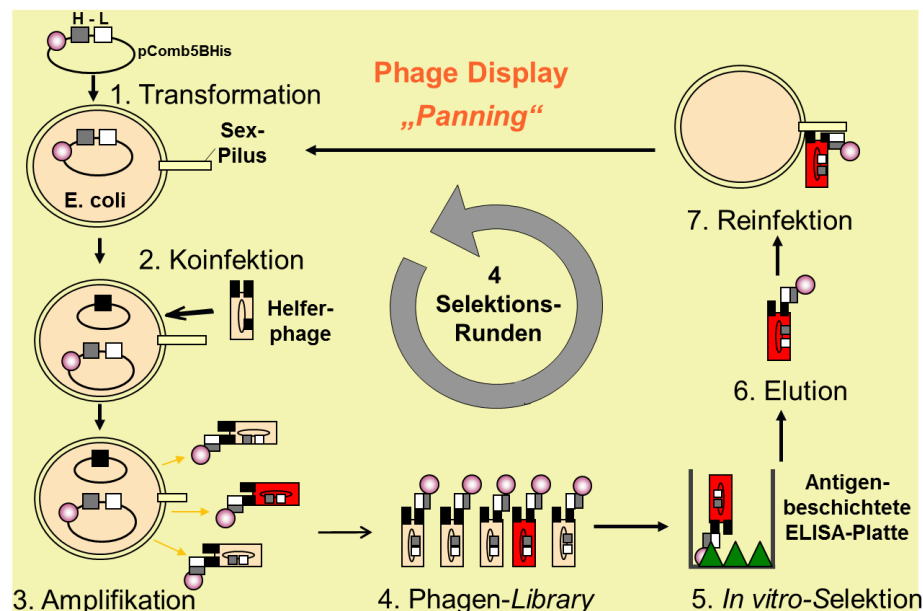


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Phage Display-Panning-Prozedur.

### 3.7 Screening der aus dem Phage Display erhaltenen Binder

Um funktionelle scFv Moleküle zu identifizieren, wurden die aus dem Phage Display erhaltenen VH-VL-Kombinationen (XhoI/SpeI-geschnitten) in einen ebenso geschnittenen Vektor zur prokaryotischen Expression (pComb5BFLAG/HisdelN2) ligiert. Dieser enthält *upstream* der VH-VL-Kombination eine Leader-Sequenz und *downstream* der VH-VL-Sequenz eine Sequenz, die einen FLAG-, sowie einen His-Tag kodiert, gefolgt von einem Stopp-Codon. Die so erhaltenen Expressionsvektoren wurden in *E. coli* TG-1 Bakterien transformiert und auf LB-Carb Agar-Platten ausplattiert. Zum Screening der codierten scFvs wurden einzelne Bakterien-Kolonien gepickt und für 6 h bei 37 °C in LB-Carb Medium/0,1 % Glukose wachsen gelassen. Die periplasmatische Expression der scFvs wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert (Inkubation über Nacht bei 30 °C). Anschließend wurde eine Periplasma-Präparation durchgeführt, indem 120 µl induzierter Bakterienkultur 40 µl Bakterien-Lysepuffer zugegeben wurden (Inkubation 1 h bei RT). Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien-Überreste (15 min, 3500 x g) wurden die Lysate in einem FACS-Assay auf Bindung an CHO-M2-Zellen (PS) (M2e BiTE) oder CHO-HCMV-gB-Zellen (PS) und CHO-CyCMV-gB-Zellen (1. Amp.) getestet (Vorgehen vgl. Abschnitt 3.1.2). Außerdem wurden alle als Antigen-bindend identifizierten Varianten auf die gleiche Weise auf untransfizierten CHO-Zellen getestet, um auszuschließen, dass ein anderes, als das Ziel-Antigen auf der Zelloberfläche gebunden wird.

### 3.8 Messung der Dissoziations-Raten von scFv Molekülen

Um potentiell hoch affine scFv-Moleküle zu identifizieren, wurden die Konzentrations-unabhängigen *off-rates* (Dissoziations-Raten) der Binder mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie an einem Biacore-System bestimmt. Je scFv-exprimierendem Bakterien-Klon wurden 10 ml LB-Medium/50 µg/ml Carbenicillin/0,1 % Glukose angeimpft. Die *E. coli*-Kultur wurde 6 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM die Expression der scFv-Moleküle induziert (Inkubation über Nacht bei 30 °C). Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 x g, 4 °C) und die Bakterien-Pellets in 1 ml PBS aufgenommen. Durch viermaliges wiederholtes Einfrieren in einem Ethanol/Trockeneis-Bad (-70 °C, 5 min) und Auftauen in einem Wasserbad (37 °C, 4 min) wurden die scFv-Moleküle aus den Bakterien freigesetzt. Zell-*Debris* wurde durch Zentrifugieren (10000 xg, 10 min, 4 °C) entfernt. Um alle verbleibenden unlöslichen Bestandteile zu entfernen, wurde der Überstand erneut für 30 min bei 17000 xg zentrifugiert. Für die Messung am Biacore-System wurde der Überstand 1:5 mit PBS / 5 % Dextran/0,5 % Tween 20 verdünnt. Vor der Messung wurden 100 µl dieser Lösung mit 100 µl HBS-EP Biacore Puffer gemischt.

Für die Messung von M2e-Bindern wurde ein Biacore-Chip (Typ CM5) verwendet, dessen Oberfläche zunächst mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid (EDC)

aktiviert und anschließend mit M2e-tGCN4 (Abschnitt 3.6.3) beschichtet wurde. Für die Beschichtung wurde M2e-tGCN4 in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) auf den Chip aufgebracht und so kovalent an die Oberfläche gebunden. Anschließend wurden übrige reaktive Gruppen auf der Chip-Oberfläche mit Ethanolamin-HCl inaktiviert. Die verdünnten Periplasma-Präparationen wurden mit einer Flussrate von 35  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 3 min über die Chip-Oberfläche laufen gelassen, gefolgt von HBS-EP Laufpuffer für 8 min. Die Regeneration des Chips erfolgte mittels 10 mM Glycin/500 nM NaCl (pH 1,5) für 30 Sekunden.

Für die Messung von CMV-gB-Bindern wurde der Chip mit HCMV-gB ECD in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) beschichtet. Für die Messung der verdünnten Periplasma-Präparationen betrug die Flussrate 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 6 min, gefolgt von HBS-EP Laufpuffer für 20 min. Die Regeneration erfolgte mit 10 mM Glycin/500 mM NaCl (pH 2,5) für 45 Sekunden.

Die Daten wurden mit Hilfe der BiaEval Software ausgewertet.

### **3.9 Bestimmung der Thermosensitivität von scFvs und BiTE Antikörper-Konstrukten**

Um BiTE AKs oder scFv-Moleküle hinsichtlich ihrer biophysikalischen Stabilität zu charakterisieren, wurde ein Thermosensitivitäts-Assay durchgeführt. Aufgereinigte BiTE AKs wurden mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS/2 % FCS verwendet, scFv-Periplasma-Präparationen wurden 1:10 mit PBS/2 % FCS verdünnt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnung wurden in PCR-Tubes gegeben, verschlossen und für 5 min in Wasserbädern mit unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 20 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C) inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die so behandelten Verdünnungen wurden als Primär-Antikörper in einer Immunfluoreszenz-Färbung von CHO-M2 (Influenza A M2e-Binder) oder CHO-HCMV-gB (CMV-gB-Binder) eingesetzt (wie beschrieben in Abschnitt 3.1.2). Die Fluoreszenz-Intensitäten der so gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Je Inkubations-Temperatur wurde der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität bestimmt und geplottet. Die Temperatur, die der halb-maximalen Fluoreszenz-Intensität entspricht, wird  $TS_{50}$ -Wert genannt.

### **3.10 Affinitäts-Bestimmung mittels „Scatchard-Assay“**

Zur Bestimmung der Affinitäten von BiTE AKs wurde ein zellbasierter Assay durchgeführt. Hierzu wurden  $1 \times 10^4$  der das jeweilige Antigen exprimierenden Zellen je Well in FACS-Puffer auf eine 96-Well Spitzboden-Platte gegeben. Es wurde eine 1:2- oder 1:3-Verdünnungsreihe eines BiTE AKs in FACS-Puffer hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 50  $\mu\text{l}/\text{Well}$  auf die Zellen gegeben. Als Negativ-Kontrolle dienten Wells mit Zellen, zu denen statt BiTE

Verdünnung 50 µl FACS-Puffer gegeben wurde. Die Platten wurden für 4 Stunden (Bestimmung von Affinitäten zu CD3 und M2e) oder 18-20 Stunden (Bestimmung von Affinitäten zu CMV-gB) bei 4 °C unter schütteln inkubiert. Die Zellen wurden mit 180 µl/Well FACS-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 4 °C mit 30 µl/Well Alexa 488-markierten anti-His-Fab-Fragmenten (30 µg/ml in FACS-Puffer) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 180 µl/Well FACS-Puffer wurden die Zellen mit 100 µl/Well 2 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei 4 °C fixiert, anschließend abzentrifugiert und in 100 µl/Well FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenz-Signale wurde am Durchflusszytometer (FACSCanto II) durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte über den Median des Fluoreszenz-Signals je Well mit Hilfe der Software Prism 6 für Windows und der Fit-Methode „one side binding (hyperbola)“. Die in den Graphen gezeigten Werte sind Median-Werte ± Standardfehler (SEM).

### 3.11 Isolierung von PBMCs aus Humanblut

Mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) aus heparinsiertem Humanblut gesunder Spender isoliert. Vorbereitend wurden 15 ml Biocoll-Separationsmedium in ein Leucosep-Röhrchen pipettiert und bei 1200 rpm für 30 sec unter die Separations-Fritte zentrifugiert. Dann wurden maximal 35 ml Humanblut vorsichtig in das Röhrchen gegeben und bei RT und 2200 rpm für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde das Serum über der sich gebildeten PBMC-Phase abgesaugt. Die PBMCs wurden abgenommen und in einem 50 ml Röhrchen mit kaltem PBS/2 % FCS aufgefüllt, durch vorsichtiges Invertieren vermischt und für 6 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Eventuell noch vorhandene Erythrozyten im PBMC-Pellet wurden mit Hilfe von Erythrozyten-Lysepuffer entfernt, indem das Pellet in 5 ml des Puffers resuspendiert und für maximal 10 min bei 37 °C inkubiert wurde. Danach folgten zwei Waschschriffe mit kaltem PBS/2 % FCS. Die so isolierten Zellen konnten im Anschluss direkt in RPMI+-Medium aufgenommen und in Zytotoxizitäts-Assays eingesetzt, CD14/CD56-depletiert, oder für die Stimulierung und Isolierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet werden (s.u.).

#### 3.11.1 CD14/CD56-Depletion von PBMCs

Vor einem Teil der Zytotoxizitäts-Assays wurden CD14<sup>+</sup> Zellen (Monozyten und Makrophagen), sowie CD56<sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen) aus unstimulierten PBMCs entfernt. Hierzu wurden die isolierten PBMCs in PBS/2 % FCS nach Hersteller-Angaben mit anti-CD14- und anti-CD56-MACS Magnet-Beads inkubiert und über eine MACS LS-Säule und einen Magneten von den CD14- und CD56-negativen Zellen getrennt. Die CD14<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>-Zellen wurden gesammelt, in RPMI+-Medium aufgenommen und als Effektoren in Zytotoxizitäts-Assays verwendet (s.u.).



### 3.11.2 Stimulierung von PBMCs und Isolierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für die Stimulierung von PBMCs wurden große Petrischalen (ø 8,5 cm) mit 1 µg/ml anti-huCD28-Antikörper und 1 µg/ml anti-huCD3-Antikörper, verdünnt in PBS, beschichtet (Inkubation für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank). Das Antikörpergemisch wurde anschließend abgesaugt und die Petrischalen 1x mit PBS gespült. Die zuvor isolierten PBMCs wurden in 50 ml RPMI+-Medium mit IL-2 (20 U/ml) gemischt, in die beschichteten Petrischalen pipettiert und 72 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums und weiterer Inkubation für 24 h wurde mittels Magnet-Beads eine Depletion von nicht CD8-positiven Zellen mit Hilfe des *CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (human)* von Miltenyi nach Hersteller-Angaben durchgeführt.

Die so gewonnenen stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in RPMI+-Medium aufgenommen und bis zur Verwendung im Zytotoxizitäts-Assay auf Eis gestellt. Für die Verwendung in Zytotoxizitäts-Experimenten mit Virus-infizierten Zellen, die am VIB Gent durchgeführt wurden, wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, bei -80 °C eingefroren, auf Trockeneis versandt und anschließend bis zur Verwendung wieder bei -80 °C gelagert.

## 3.12 Zytotoxizitäts-Assays

Assays zur Überprüfung der BiTE vermittelten T-Zell-abhängigen Lyse von Zielzellen wurden für die Untersuchung von huCD3-bindenden BiTE AKs entweder mit frisch isolierten unstimulierten, CD14/CD56-depletierten humanen PBMCs, stimulierten humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder mit den T-Zelllinien HSC-F (Cynomolgus- Makak) oder 4119 LnPx (Rhesus-Makak) durchgeführt. Um murCD3-bindende BiTE AKs zu untersuchen, wurden als Effektoren CTLL-2-Zellen (*cytotoxic T lymphoblastoid line-2*) verwendet. Bei Verwendung von CTLL-2-Zellen wurde dem Assay-Medium in manchen Versuchen 25 U/ml IL-2 zugesetzt. Die Isolierung von humanen PBMCs und ggf. deren Stimulierung und die anschließende Aufreinigung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in den Abschnitten 3.11 und 3.11.2 beschrieben. Die Kultivierung der T-Zelllinien sowie der transfizierten Zielzellen ist in Abschnitt 3.1 beschrieben. Für unstimulierte PBMCs, die in einem Assay mit 3 Tagen Inkubationszeit eingesetzt wurden, wurde eine CD14/CD56-Depletion durchgeführt (siehe Abschnitt 3.11.1). Unstimulierte PBMCs, die in einem 2 Tage-Assay eingesetzt wurden, wurden ohne weitere Depletion verwendet.

### 3.12.1 FACS-basierter Assay zur Bestimmung der BiTE vermittelten Lyse transfizierter Zellen

Die Zielzellen - mit Influenza A-M2, HCMV-gB (Stamm AD169 oder Toledo), RhCMV-gB oder CyCMV-gB transfizierte CHO-Zellen - wurden zweimal mit PBS/2 % FCS gewaschen und mit 5 µl Vybrant DiO Lösung je 1x10<sup>6</sup> Zellen markiert (5 min, 37 °C), anschließend zweimal mit 25 ml RPMI+-Medium gewaschen und in RPMI+-Medium aufgenommen. Der Assay wurde in einer 96-Well Rundboden-Platte in einem Gesamtvolumen von 200 µl RPMI+-Medium/Well

durchgeführt. Je Well wurden  $5 \times 10^3$  Zielzellen (*Targets*) und  $5 \times 10^4$  oder  $10 \times 10^4$  Effektor-Zellen eingesetzt (E:T-Verhältnis = 10:1 oder 20:1). Es wurden 1:3-Verdünnungsreihen mit 20 Verdünnungsstufen von BiTE Monomer hergestellt, sodass die höchste BiTE Konzentration im Well je nach Assay zwischen 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  betrug. Als Negativ-Kontrolle dienten Wells mit Zielzellen und Effektor-Zellen, in denen kein BiTE AK vorhanden war (BiTE unabhängige Lyse) und Wells, in denen ausschließlich Zielzellen vorhanden waren (Spontan-Lyse). Die Assay-Platten wurden bei Verwendung von stimulierten  $\text{CD8}^+$  T-Zellen und einem E:T-Verhältnis von 10:1 für 18 h im Brutschrank inkubiert. Bei Verwendung von unstimulierten PBMCs oder T-Zelllinien als Effektoren betrug die Inkubationszeit zwischen 48 und 72 h.

Nach der Inkubation wurden die Zellen resuspendiert und auf eine neue 96-Well Spitzboden-Platte übertragen. Adhärierende Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Puffer abgelöst (5 min, 37 °C), in PBS/2 % FCS resuspendiert und mit den anderen Zellen aus dem jeweils gleichen Well zusammengeführt. Die Platte wurde abzentrifugiert (4 min, 300 x g), der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet wurde in PBS/2 % FCS mit 1  $\mu\text{g/ml}$  SYTOX Red Lösung aufgenommen und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Der SYTOX Red Farbstoff dringt, ähnlich wie Propidiumiodid, in Zellen mit nicht mehr intakter Plasmamembran ein und bindet an DNA. Dadurch werden tote Zellen angefärbt. Die Platte wurde am Durchflusszytometer (FACSCanto II) gemessen. Die Zytotoxizität wurde über den prozentualen Anteil von DiO/SYTOX Red doppelt positiven Zellen an allen DiO-positiven Zellen bestimmt. Für die Bestimmung der BiTE spezifischen Lyse wurde von diesem Wert der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen an allen DiO-positiven Zellen der BiTE unabhängigen Lyse abgezogen. Alle Messungen wurden in Duplikaten vorgenommen. Die Auswertung und Berechnung des  $\text{EC}_{50}$ -Wertes wurde mit der Software Prism 6 für Windows durchgeführt. Die in den Graphen gezeigten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### **3.12.2 ToxiLight-Assay zur Bestimmung der BiTE vermittelten Lyse Virus-infizierter Zellen**

Die Zytotoxizitäts-Experimente mit Influenza A-infizierten Zellen mussten in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden. Da in diesem Labor kein Durchflusszytometer zur Verfügung stand, wurden diese Experimente mit Hilfe des ToxiLight Assay Kits durchgeführt. Hierbei konnte die Messung mit einem vorhandenen Luminometer erfolgen.

Als Effektoren wurden in diesem Assay humane stimulierte  $\text{CD8}^+$ -Zellen verwendet. Diese waren zuvor, wie in den Abschnitten 3.11 und 3.11.2 beschrieben, isoliert, stimuliert und anschließend, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, eingefroren worden. Die Effektoren wurden einen Tag vor Ansetzen des Assays aufgetaut, und ca. 24 h in RPMI+-Medium mit 20 U/ml IL-2 kultiviert.

MDCK-Zellen wurden in undurchsichtigen 96-Well Flachboden-Platten (enthalten im ToxiLight Assay Kit) mit einer Gesamt-Zellzahl von 5000 Zellen/100 µl Medium/Well ausgesät und konnten über Nacht adhären. Am nächsten Tag wurden die Zellen in einigen Wells trypsinisiert und gezählt, um sicherzustellen, dass keine nennenswerte Vermehrung der Zellen stattgefunden hatte, die zu einer Verschiebung des E:T-Verhältnisses führen würde. Das FCS-haltige Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit 100 µl/Well serumfreiem DMEM (mit 100 U/ml/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES) gewaschen. Das Medium wurde nach 5 min wieder abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 3 mit Influenza-Viren unterschiedlicher Stämme infiziert. Hierzu wurden Verdünnungen von Virus-Lösungen mit einer Konzentration von 150000 PFU/ml hergestellt. Je 96-Well Platte wurden je 100 µl/Well einer Verdünnung in 84 Wells mit MDCK-Zellen gegeben (15000 PFU/Well, Reihen A-G). In die übrigen 12 Wells (Reihe H) wurde serumfreies DMEM (s.o.) gegeben. Die Platten wurden für 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert um die Infektion der Zellen zu ermöglichen. Folgende Influenza A-Stämme wurden für die Infektion der MDCK-Zellen verwendet: A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/California/4/09(H1N1), A/swine/Ontario/42729A/01(H3N3), A/Memphis/106/76(H3N2) (alle zur Verfügung gestellt von der Gruppe von Xavier Saelens, VIB Gent, Belgien).

Es wurden 1:6 Verdünnungsreihen von BiTE Monomer mit 12 Verdünnungsstufen in RPMI+-Medium hergestellt, sodass die höchste Konzentration 4 µg/ml betrug. Die über Nacht kultivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 350 x g) und in frischem RPMI+-Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Nach der Inkubation der MDCK-Zellen mit den Virus-Verdünnungen wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden einmal mit 100 µl/Well serumfreiem DMEM gewaschen. In die Reihen A-F wurden jeweils 50 µl/Well T-Zell-Lösung, 25 µl/Well BiTE Verdünnung und 25 µl/Well RPMI+-Medium gegeben. Somit waren in den Wells mit den höchsten BiTE Konzentrationen 5000 MDCK-Zellen, 50000 T-Zellen und 1 µg/ml BiTE AK vorhanden. Alle Ansätze wurden in Duplikaten durchgeführt. Je Virus-Stamm wurden Ansätze mit folgende BiTE AKs angesetzt: murM2e-h BiTE, humM2e-h BiTE 5, irrelevanter h BiTE (nur T-Zell-Bindung). Folgende weitere Kontrollen wurden mitgeführt: BiTE unabhängige Lyse infizierter und nicht infizierter Zellen (+ 50 µl/Well T-Zell-Lösung, + 50 µl/Well RPMI+-Medium), Spontan-Lyse infizierter und nicht infizierter Zellen (+ 100 µl/Well RPMI+-Medium), Maximal-Lyse infizierter und nicht infizierter Zellen (+ 100 µl/Well RPMI+-Medium, vor Messung Zugabe von ToxiLight 100 % Lyse-Puffer), BiTE abhängige Lyse nicht infizierter Zellen (+ 50 µl/Well T-Zell-Lösung, + 25 µl/Well 1 µg/ml humM2e-h BiTE 5-Verdünnung, + 25 µl/Well RPMI+-Medium).

Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37 °C für 18 h inkubiert und anschließend laut Hersteller-Protokoll des ToxiLight Assay-Kits gemessen.

Zur Auswertung wurden die während einer Messdauer von einer Sekunde im Well detektierten Lumineszenz-Signale verwendet. Von allen Signalen infizierter Zellen wurde der

Durchschnittswert der Spontan-Lyse infizierter Zellen abgezogen. Von den Signalen nicht infizierter Zellen wurde der Durchschnittswert der Spontan-Lyse nicht infizierter Zellen abgezogen. Anschließend wurde der Prozentuale Anteil jedes Wells der Reihen A-F am Durchschnittswert der Maximallyse infizierter Zellen berechnet. Zur Bestimmung der BiTE abhängigen Lyse nicht infizierter Zellen wurde der Prozentuale Anteil der Werte dieser Kontroll-Wells am Durchschnittswert der Maximallyse nicht infizierter Zellen berechnet. Die Auswertung der Daten und die Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte erfolgte mit Hilfe der Software Prism 6. Die in den Graphen gezeigten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.13 Mausmodell

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von M2e BiTE AKs *in vivo* wurden Versuche mit BALB/c-Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen bei einem 12/12 Stunden Hell-/Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Arbeiten wurden am VIB Gent (Belgien) in einem Labor der biologischen Schutzstufe 2 in Zusammenarbeit mit Kenny Roose aus der Arbeitsgruppe von Xavier Saelens durchgeführt und waren durch die lokale Ethikkommission für Versuchstiere der Universität Gent genehmigt.

Die 7-8 Wochen alten weiblichen Tiere wurden zunächst intranasal mit einer sublethalen Dosis (0,2  $LD_{50}$ ) Influenza B/Memphis/10/97 Virus infiziert, um ein Repertoire von Memory-T-Zellen zu induzieren, welche nicht für Influenza A-infizierte Zellen spezifisch sind. (Die experimentellen Arbeiten hierzu wurden von Kenny Roose durchgeführt.) Fünf Wochen später, nachdem sich die Tiere wieder komplett von der Influenza B-Infektion erholt hatten, wurden sie intranasal mit 2  $LD_{50}$  Maus-adaptiertem Influenza A / X47 (H3N2) Virus infiziert. Für die intranasalen Infektionen wurden die Tiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin/Xylazin (50/7,5  $\mu$ g/kg Körpergewicht) in PBS anästhesiert. Die Virus-Infektion erfolgte durch das einflößen von 50  $\mu$ l Virus-Verdünnung in PBS je Tier in die Nüstern der anästhesierten Tiere. Die Behandlung mit BiTE AKs oder dem parentalen Monoklonalen Antikörper (M2e mAb) erfolgte in Form von täglichen intravenösen Gaben in die Schwanzvene von 10  $\mu$ g BiTE oder 15  $\mu$ g M2e mAb (äquimolar) in PBS je Dosis je Maus von Tag 1 bis 6 nach der Infektion. Alle Tiere wurden bis Tag 14 nach der Infektion täglich hinsichtlich Gewichtsverlust und Morbidität überwacht. Bei einem Gewichtsverlust von über 30 % wurden die Tiere als nicht geschützt betrachtet und eingeschläfert. (Die experimentellen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kenny Roose durchgeführt.) In einem ersten Versuch gab es folgende Gruppen: M2e mAb (Positiv-Kontrolle; n = 3), murM2e-h BiTE (Negativ-Kontrolle; n = 3), murM2e-m BiTE (n = 6), humM2e-m BiTE (n = 6). Da bis Tag 8 nach der Infektion der Gewichtsverlust aller Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Positiv-Kontrolle, unerwarteter Weise bereits die Grenze von 30 % überschritten hatte, konnte der Versuch nicht ausgewertet werden. Der Versuch wurde deshalb von Dr. Kenny Roose mit den gleichen Versuchsgruppen wiederholt und um eine weitere Negativ-Kontrollgruppe (humM2e-h BiTE) erweitert. Die Tiere wurden

in Gruppen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt und erhielten die in Tabelle 1 aufgeführte Behandlung.

**Tabelle 1:** Versuchsgruppen des Maus-Experiments.

<b>Gruppe:</b>	<b>Behandlung mit:</b>
1	M2e mAb (Positiv-Kontrolle)
2	murM2e-m BiTE
3	murM2e-h BiTE (Negativ-Kontrolle 1)
4	humM2e-m BiTE
5	humM2e-h BiTE (Negativ-Kontrolle 2)

### 3.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung von Affinitäts-Werten wurde eine 1-way ANOVA mit *Tukey's multiple comparisons test* durchgeführt ( $p \geq 0,05$  (n.s.);  $p \leq 0,05$  (\*);  $p \leq 0,01$  (\*\*);  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)). Die Auswertung wurde mit der Software Graph Pad Prism durchgeführt.

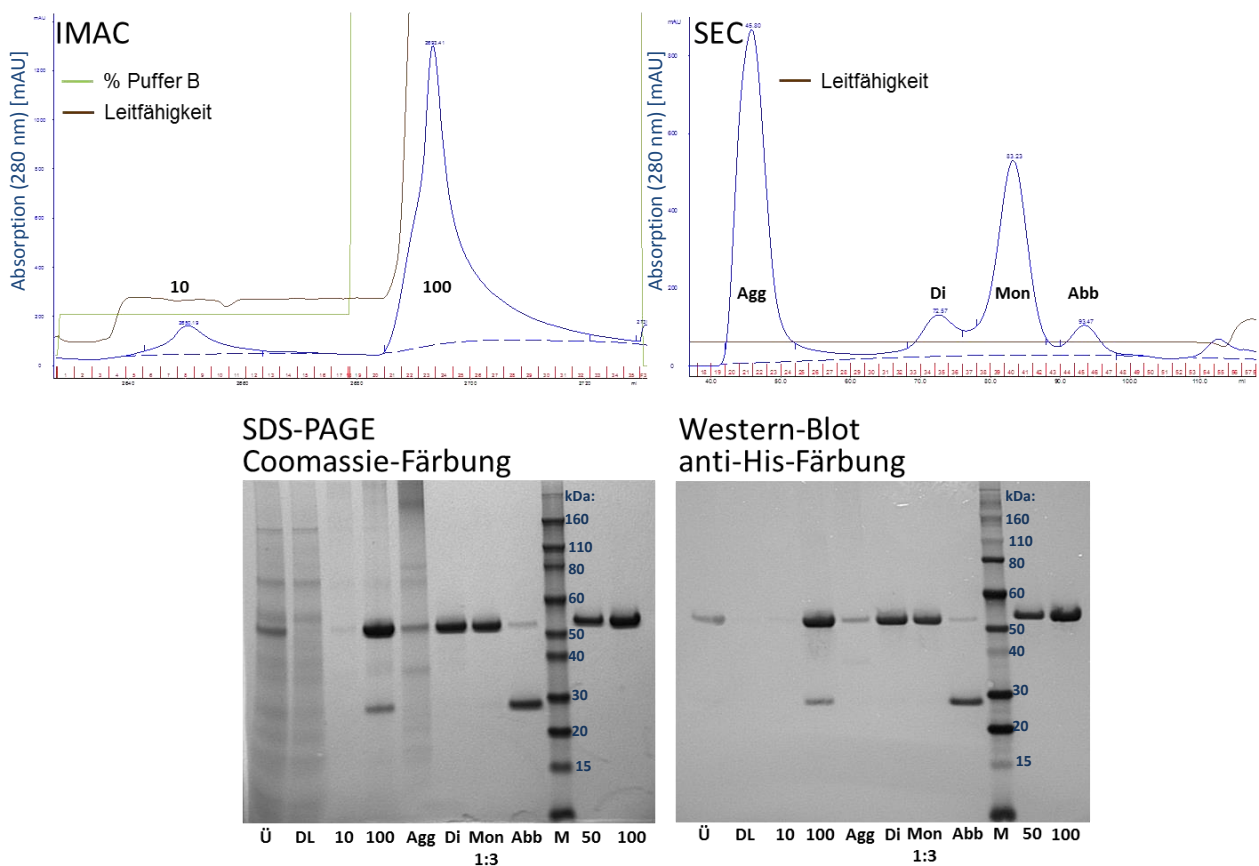
## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war der Machbarkeitsnachweis einer potentiellen Behandlung viraler Infektionen mit anti-viralen BiTE AKs. Die beiden untersuchten BiTE AKs, die gegen das M2-Protein des Influenza A-Virus bzw. das Glykoprotein B des humanen Cytomegalovirus gerichtet sind, stammen von murinen monoklonalen Antikörpern ab. Sie wurden zunächst generiert, charakterisiert und auf Wirksamkeit in einem *in vitro*-Modell getestet. Anschließend wurden ihre Aminosäure-Sequenzen an die ähnlichsten humanen Keimbahnsequenzen angeglichen. Aus den verschiedenen entstandenen Varianten sollte die beste identifiziert und auf Wirksamkeit *in vitro* und, wenn möglich, *in vivo* getestet werden. Diese Charakterisierung und Optimierung wurde für ein Influenza A-M2e- und für ein CMV-gB BiTE AK durchgeführt. Aufgrund der mit dem Influenza A BiTE AK gesammelten Erkenntnisse wurden einige Schritte bei der Charakterisierung und Optimierung des CMV BiTE AKs teilweise verändert oder erweitert, um möglichst gut bindende und gut charakterisierte BiTE AKs zu erhalten.

### 4.1 Influenza A M2e BiTE

#### 4.1.1 Aufreinigung muriner M2e BiTE Antikörper-Konstrukte

Der Zellkultur-Überstand von CHO-Zellen, die mit einem pEFDHFR-Vektor transfiziert waren, der die codierende Sequenz für den murM2e-m BiTE enthielt, wurde gesammelt und über ein zweistufiges Verfahren aufgereinigt. Zunächst wurden die mit einem His-Tag versehenen BiTE AKs an eine mit Zink beladene IMAC-Säule gebunden und anschließend mit einem Imidazolhaltigen Puffer eluiert. Im zweiten Schritt wurden die in diesem Eluat enthaltenen Proteine per Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Chromatogramme der beiden Aufreinigungsschritte, am Beispiel des murinen M2e-h BiTE, sind in Abbildung 8 (oben) zu sehen. Die Monomer-Fraktion (Mon), die gut von der Dimer (Di)- und der Abbau (Abb)-Fraktion abgetrennt werden kann, wurde gesammelt und mit 4 % Trehalose versetzt, um die Monomere zu stabilisieren. Zur Analyse der Aufreinigungsschritte wurden die Fraktionen aller Aufreinigungsschritte per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot mit anti-His-Färbung analysiert (siehe Abbildung 8 unten). Anhand des Coomassie-gefärbten Gels lassen sich die Größen und die Mengenverhältnisse aller enthaltenen Proteine erkennen, durch den Western-Blot werden die mit einem His-Tag versehenen BiTE AKs spezifisch nachgewiesen. Der Monomer-Peak (für die Analytik in einer 1:3-Verdünnung eingesetzt) zeigt sowohl im SDS-Gel, als auch im Western-Blot nur eine erkennbare Bande bei knapp über 50 kDa, was in etwa dem berechneten Molekulargewicht von 53 kDa entspricht. Diese Bande lässt sich außerdem im Western-Blot mit Hilfe eines anti-His Antikörpers anfärben. Somit enthält digesammelte Monomer-Fraktion murM2e-m BiTE in sehr reiner Form und nur sehr geringe Spuren des Abbauprodukts.



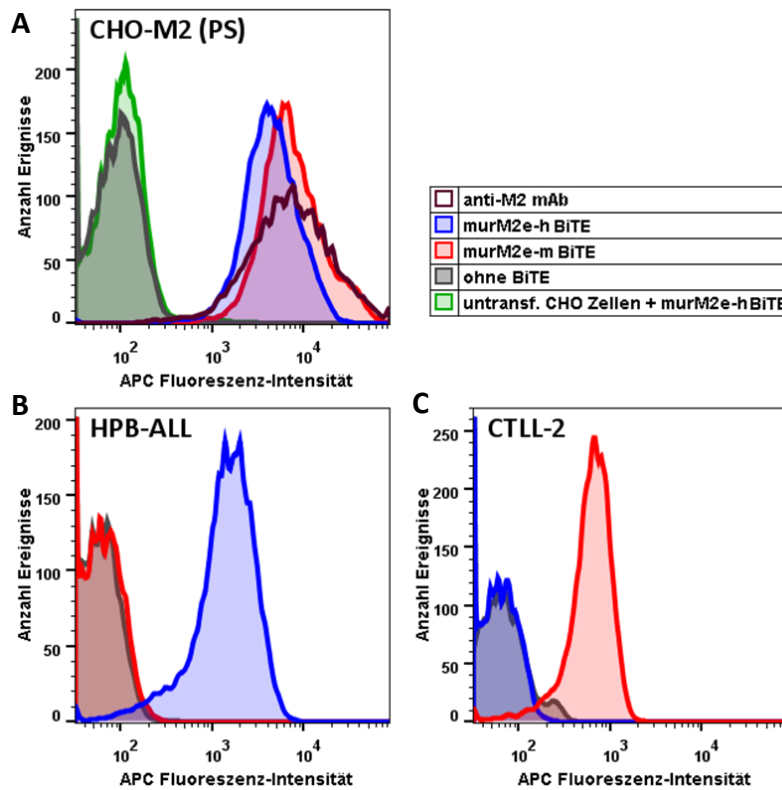
**Abbildung 8:** Aufreinigung des murinen M2e-h BiTE mit dazugehörigem Analyse-Gel (SDS-PAGE) und Western-Blot. Ü - Zellkultur-Überstand; DL - IMAC Durchlauf; 10 bzw. 100 - Eluat mit 10 bzw. 100 % Puffer B; Agg - Aggregation; Di - Dimer; Mon - Monomer (1:3-Verdünnung); Abb - Abbauprodukt; M - Marker; 50 bzw. 100 - BiTE AKs mit einer Konzentration von 50 bzw. 100 µg/ml.

Zusätzlich zum huCD3-bindenden murM2e-h **BiTE** wurde auch der murCD3-bindender murM2e-m **BiTE** produziert und aufgereinigt. Dieser wies ein sehr ähnliches Aufreinigungsprofil auf und enthielt, wie der murM2e-h BiTE, in der Monomer-Fraktion nur sehr geringe Spuren des etwa im gleichen Umfang vorhandenen Abbauprodukts.

#### 4.1.2 M2- und CD3-exprimierende Zellen werden vom murM2e BiTE gebunden

Um murM2e BiTE AKs *in vitro* testen zu können, wurden zunächst CHO-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der die Sequenz des kompletten Influenza A M2 Proteins kodiert. Zur Überprüfung der M2-Expression an der Zelloberfläche wurden die Zellen mit einem murinen M2-bindenden monoklonalen Antikörper und einem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper gefärbt und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Im Histogramm ist zu erkennen, dass alle CHO-Zellen M2-positiv sind (siehe Abbildung 9 A). Auch murM2e-h BiTE

und -m BiTE binden an die M2-exprimierenden CHO-Zellen, untransfizierte Zellen werden nicht gebunden (siehe Abbildung 9 A). Außerdem binden murM2e-h BiTE AKs spezifisch an die humane T-Zelllinie HPB-ALL (siehe Abbildung 9 B) und murM2e-m BiTE AKs spezifisch an die murine T-Zelllinie CTLL-2 (siehe Abbildung 9 C).



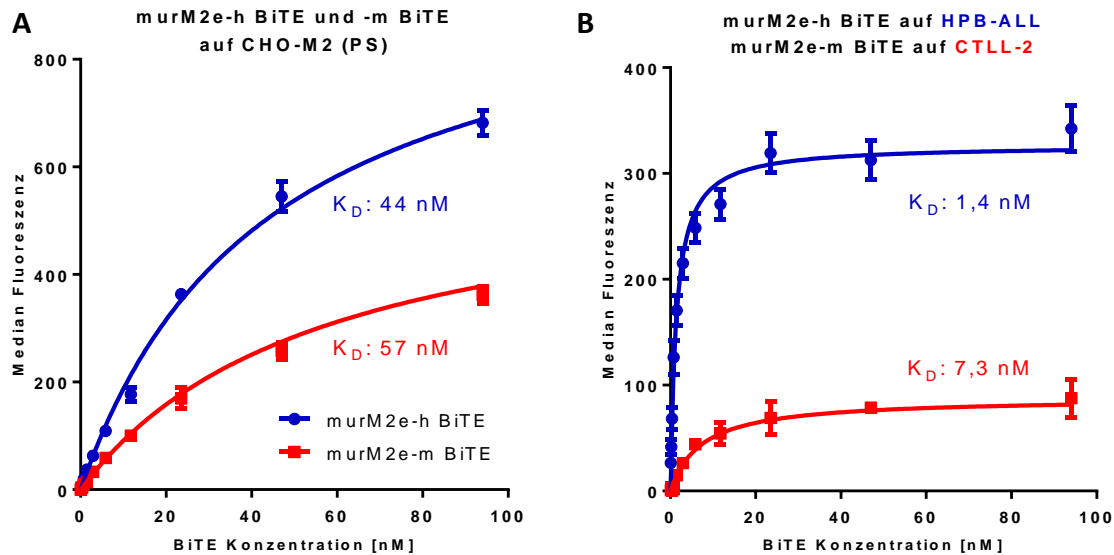
**Abbildung 9:** Bindung eines M2-spezifischen monoklonalen Antikörpers und von murM2e-h BiTE und murM2e-m BiTE an transfizierte, M2-exprimierende CHO-Zellen. Untransfizierte CHO-Zellen werden nicht gebunden (A). murM2e-h BiTE zeigt außerdem eine Bindung an die humane T-Zelllinie HPB-ALL (B), murM2e-m BiTE an die murine T-Zelllinie CTLL-2 (C).

### 4.1.3 Bestimmung der Bindungsstärken der M2e- und CD3-Bindung

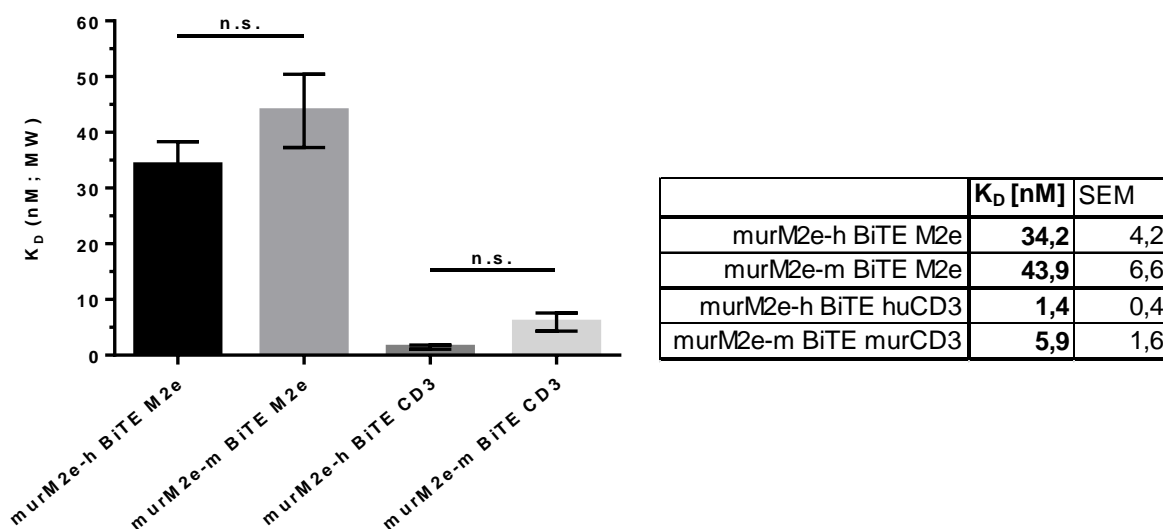
Zur genaueren Charakterisierung der beiden murM2e BiTE AKs (h BiTE und m BiTE) wurden jeweils die Affinitäten beider Spezifitäten mit Hilfe des Zell-basierten Scatchard-Assays bestimmt. Hierfür wurden CHO-M2-Zellen (PS) mit BiTE AKs in unterschiedlichen Konzentrationen für vier Stunden inkubiert, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation einstellen konnte. Anschließend wurden gebundene BiTE AKs über monovalent bindende Fluoreszenz-markierte anti-His Fab-Fragmente detektiert, was Aviditäts-Effekte, wie sie etwa bei Verwendung eines anti-His IgG Detektions-Antikörpers auftreten würden, ausschließt. Die Dissoziations-Konstanten ( $K_D$ -Werte) wurden mit Hilfe des Programms „Prism 6“ berechnet und betragen für den abgebildeten Assay: 44 nM für die M2-



Bindung des murM2e-h BiTE und 57 nM für die M2-Bindung des murM2e-m BiTE (siehe Abbildung 10 A), 1,4 nM für die huCD3-Bindung des murM2e-h BiTE und 7,3 nM für die murCD3-Bindung des murM2e-m BiTE (siehe Abbildung 10 B).



**Abbildung 10:** Exemplarischer Scatchard-Assay zur Affinitäts-Bestimmung der murM2e BiTE AKs auf M2-exprimierenden CHO-Zellen (A) und CD3-exprimierenden Zellen (humanes CD3: HPB-ALL; murines CD3: CTLL-2) (B).  $K_D$  = Dissoziations-Konstante. Datenpunkte im Graphen: Mittelwert aus 3 Einzelmessungen  $\pm$  SEM.



**Abbildung 11:** Affinitäten ( $K_D$ -Werte) von murM2e-h BiTE und murM2e-m BiTE zu M2e und huCD3 (h BiTE) bzw. murCD3 (m BiTE). Die im Diagramm dargestellten Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 5$  für murM2e-h BiTE auf M2e;  $n = 3$  für die übrigen Messungen) sind zusätzlich in der rechts stehenden Tabelle aufgelistet.

In Abbildung 11 sind die Mittelwerte aller Affinitäts-Messungen der murinen M2e BiTE AKs auf M2-exprimierenden CHO-Zellen (M2e), HPB-ALL- und CTLL-2-Zellen (CD3) zu sehen. Die  $K_D$ -Werte für die M2e-Bindung liegen im mittleren zweistellig nanomolaren Bereich (murM2e-h BiTE: 34,2 nM, murM2e-m BiTE: 43,9 nM).

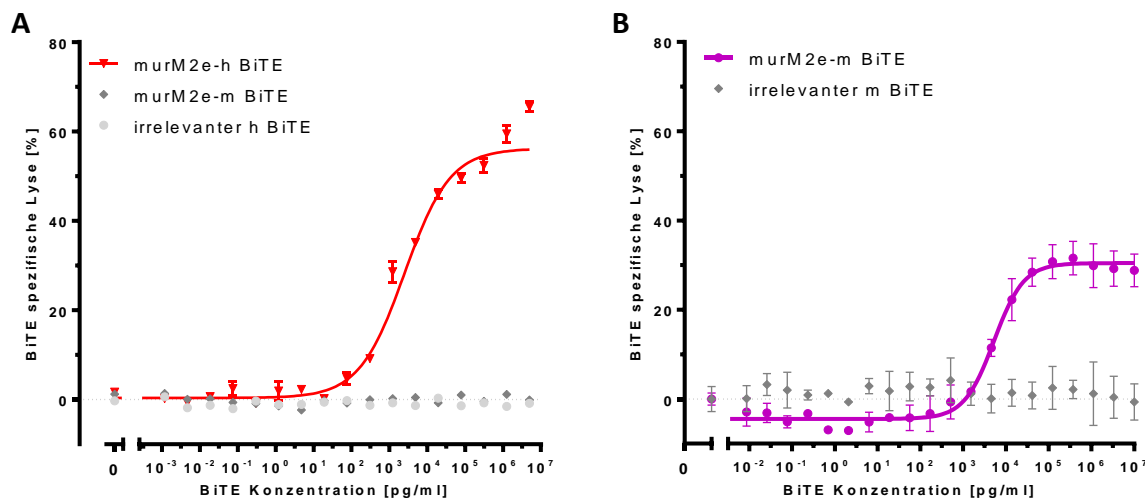
Die Unterschiede der Affinitäten des murM2e-h BiTE und des murM2e-m BiTE zu M2e sind nicht signifikant ( $p = 0,3788$ ). Die Bindung an humanes bzw. murines CD3 liegt im einstellig nanomolaren Bereich (murM2e-h BiTE an huCD3: 1,4 nM, murM2e-m BiTE an murCD3: 5,9 nM). Auch hier unterscheiden sich die  $K_D$ -Werte für murM2e-h BiTE und murM2e-m BiTE nicht signifikant ( $p = 0,8953$ ). Der murine M2e-h BiTE weist aber sowohl für die Bindung an M2e, als auch für die Bindung an CD3 etwas niedrigere  $K_D$ -Werte und damit höhere Affinitäten auf.

#### 4.1.4 M2 exprimierende Zellen können BiTE vermittelt lysiert werden

Um die zytotoxische Aktivität des murM2e-h BiTE nachzuweisen, wurden Zytotoxizitäts-Assays mit PBMCs aus humanem Blut als Effektoren und CHO-M2-Zellen (PS) als Zielzellen (*Targets*) durchgeführt. Effektoren und *Targets* wurden im Effektor zu *Target* (E:T)-Verhältnis von 10:1 gemischt und mit verschiedenen Konzentrationen von murM2e-h BiTE für 48 Stunden inkubiert. Wie in dem in Abbildung 12 A dargestellten exemplarischen Zytotoxizitäts-Assay zu erkennen ist, werden CHO-M2-Zellen ab einer murM2e-h BiTE Konzentration von etwa 100 pg/ml lysiert. Kontroll BiTE AKs, die entweder nur M2 (murM2e-m BiTE) oder nur CD3 (irrelevanter h BiTE) binden können, bewirken auch in hohen Konzentrationen keine Lyse der *Target*-Zellen. Die halb-maximale Lyse ( $EC_{50}$ -Wert) im abgebildeten Assay liegt bei 2513 pg/ml. Dieser Wert kann jedoch bei der Verwendung von PBMCs von verschiedenen Blutspendern deutlich variieren.

Zur Überprüfung der Funktionalität des murCD3-bindenden murM2e-m BiTE AKs wurde der gleiche Assay mit der murinen T-Zelllinie CTLL-2 als Effektoren durchgeführt. Hier ist nach 38-stündiger Inkubation ebenfalls eine deutliche BiTE spezifische Lyse der CHO-M2- Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 12 B). Der  $EC_{50}$ -Wert liegt hier bei 5232 pg/ml.

Sowohl der murM2e-h BiTE als auch der murM2e-m BiTE sind somit voll funktionell. Beide binden sowohl M2-exprimierende Zellen, als auch CD3-exprimierende T-Zellen und vermitteln in einem *in vitro* Zytotoxizitäts-Assay die Lyse von M2-exprimierenden Zellen durch T-Zellen.



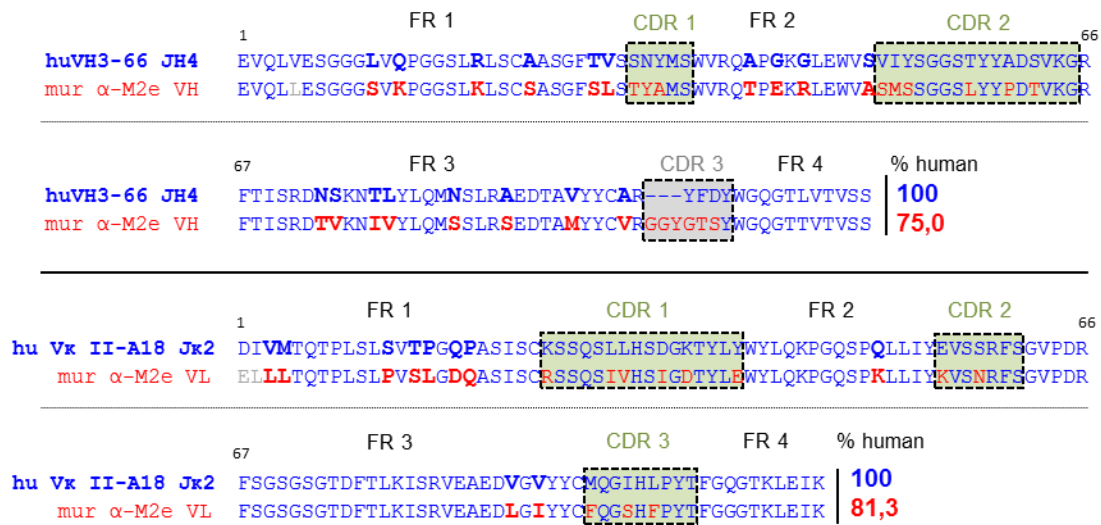
**Abbildung 12:** BiTE abhängige Lyse von M2-exprimierenden CHO-Zellen durch unstimulierte humane PBMCs und murine T-Zellen. **A:** Effektoren: aus humanem Blut isolierte, CD14/CD56-depletierte PBMCs, E:T-Verhältnis: 10:1; Inkubation: 48 h. murM2e-h BiTE bewirkt eine *Target*-Zell-Lyse von bis zu 60 % mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 2513 pg/ml, während die Kontroll BiTE AKs, die entweder nur an *Target*-, oder nur an Effektor-Zellen binden können, keine *Target*-Zell-Lyse bewirken. **B:** CTLL-2 Zellen (E:T Verhältnis = 10:1) lysieren bei 38-stündiger Inkubation mit murM2e-m BiTE und 25 U/ml IL-2 CHO-M2-Zellen (PS) mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 5232 pg/ml.

#### 4.1.5 Human-like engineering

Für den Einsatz eines Antikörpers als Therapeutikum im Menschen sollte dieser möglichst nicht immunogen sein. Die Aminosäure-Sequenzen der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten (VH und VL) eines murinen Binders unterscheiden sich jedoch in der Regel deutlich von den ähnlichsten VH- und VL-Sequenzen der humanen Keimbahn, was die Erkennung als Fremd-Protein im menschlichen Organismus begünstigt. Deshalb wurde versucht, die Aminosäure-Sequenzen der VH und der VL des murM2e-Binders den Sequenzen der humanen Keimbahn so stark wie möglich anzugleichen, möglichst ohne die Spezifität oder die Affinität zu verringern. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass das resultierende BiTE AK vom menschlichen Organismus nicht als Fremd-Protein erkannt wird, was für wiederholte Behandlungen oder die Gabe über einen längeren Zeitraum wichtig ist.

##### 4.1.5.1 Phage Display Library-Aufbau und Panning

Zunächst wurde ein Sequenz-Alignment der VH- und VL-Regionen des M2-bindenden Anteils des murM2e BiTE mit den entsprechenden in der humanen Keimbahn vorkommenden Aminosäure-Sequenzen durchgeführt (siehe Abbildung 13). Die VH-Region des M2-Binders entspricht am ehesten der humanen Sequenz von VH3-66-JH4. Die Sequenzen sind zu 75,0 % identisch. Die humane Keimbahn-Sequenz, die der murinen VL am nächsten kommt, ist VkII-A18-Jk2 mit einer Identität von 81,3 %.



**Abbildung 13:** Sequenz-Alignment der murinen anti-M2e VH- und VL-Sequenzen und der jeweils ähnlichsten humanen Keimbahn-Sequenzen. Die anti-M2e-VH Sequenz ist zu 75,0 % identisch mit der humanen Keimbahn-Sequenz, die anti-M2-VL Sequenz zu 81,3 %. Die CDR-Regionen sind farbig hinterlegt. Die VH CDR 3 Region ist grau hinterlegt, da sie aufgrund ihrer sehr hohen Variabilität nicht in die Berechnung der humanen Identität mit einbezogen wird. In grau gedruckte Aminosäuren entstehen durch das Einfügen benötigter Restriktions-Schnittstellen und werden später durch die jeweiligen Aminosäuren der humanen Keimbahn ersetzt. Die fett gedruckten Aminosäuren in den Framework (FR)-Regionen sind die Positionen, an denen sich die murinen und die humanen Sequenzen unterscheiden und die im Zuge des *human-like engineering* durch die humanen Aminosäuren ersetzt werden sollten.

Durch ein sogenanntes *human-like engineering* sollten die Framework Regionen (FRs) des murinen M2e-Binders an diese humanen Sequenzen angeglichen werden. Dazu wurden *Wobble*-Primer entworfen, die an den Stellen, die die anzuleichenden Aminosäuren kodieren, jeweils zu 75 % die Basen enthalten, die für die Aminosäure der humanen Sequenz erforderlich sind und zu 25 % die Basen, die für die Aminosäure der murinen Sequenz benötigt werden. Die Primer wurden in einer PCR-Reaktion fusioniert und die entstandenen VH- bzw. VL-kodierenden Sequenzen anschließend weiter amplifiziert. Der so entstandene *human-like* VH-Pool wurde in den Phage Display-Vektor pComb5BHis/N2 kloniert, in den zuvor die murine VL-Sequenz vorkloniert worden war, der *human-like* VL-Pool in einen Vektor mit vorklonierter muriner VH-Sequenz. Aus diesen zwei so entstandenen *Libraries*, die „halb *human-like*“ Binder mit einer Vielzahl unterschiedlicher Sequenzen kodieren, wurden durch *Panning* (= *in vitro* Selektion) auf M2e-tGCN4 Protein [144] Sequenzen identifiziert, die in den Framework-Regionen einen höheren Anteil humaner Aminosäuren besitzen, als die murinen Ausgangs-Sequenzen, ohne dabei ihre Spezifität zu verlieren. Die verwendeten Primer und die Phage Display-*Panning*-Prozedur sind im Methoden-Teil dieser Arbeit genauer beschrieben.

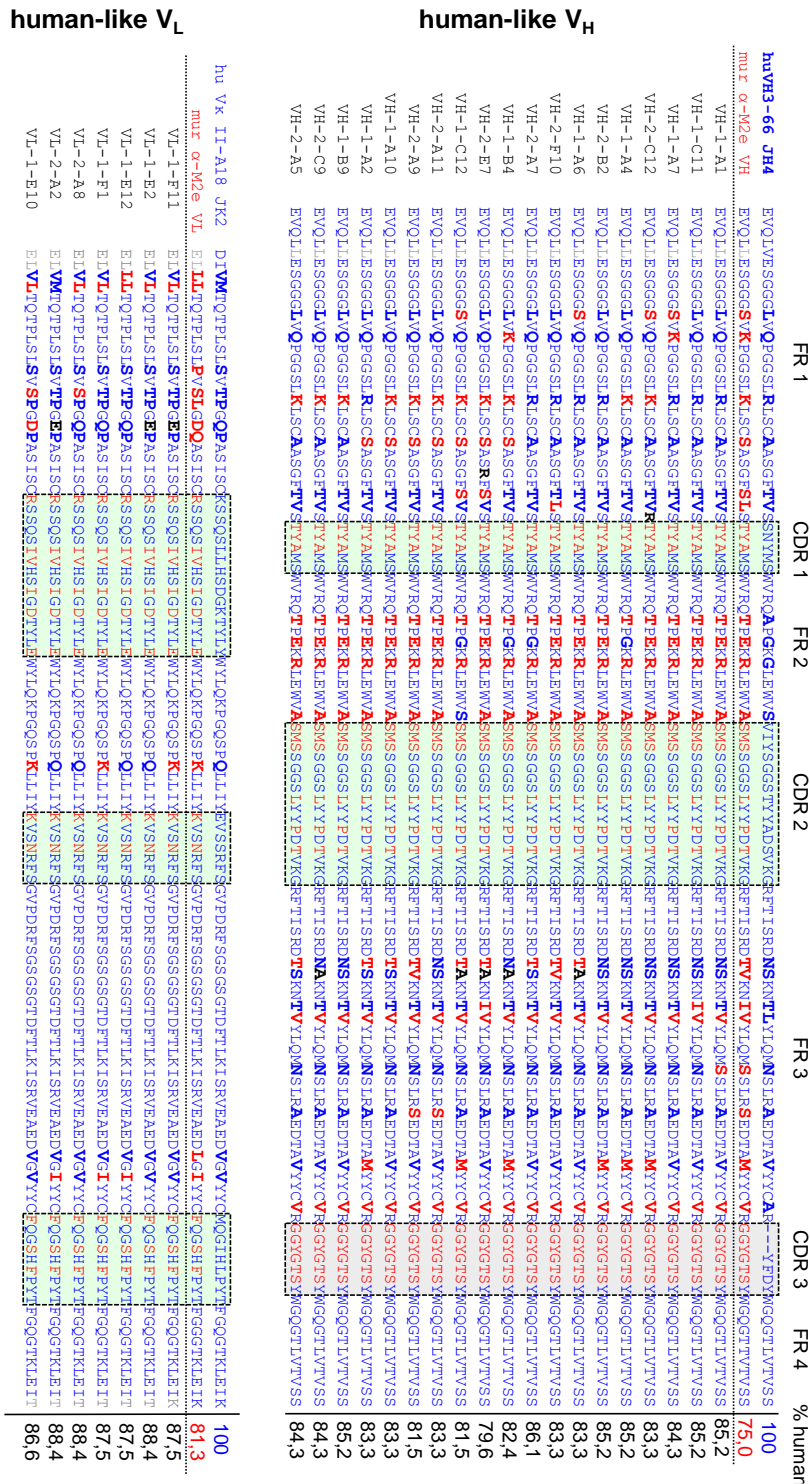
#### 4.1.5.2 Screening und Charakterisierung der halb human-like scFv Moleküle

Die aus dem Phage Display erhaltene Vektor-DNA wurde mittels Plasmid-Präparation isoliert und die halb *human-like* Sequenzen wurden in einen Vektor zur prokaryotischen Expression umkloniert. Mit den so entstandenen *human-like* VH- bzw. *human-like* VL-Expressionsvektor-*Pools* wurden *E. coli* Bakterien transformiert und auf LB-Carb Agar-Platten ausplattiert. Zum Screening der codierten scFvs wurden einzelne Bakterien-Kolonien gepickt. Die periplasmatische Expression der scFvs wurde durch IPTG induziert. Anschließend wurde eine Periplasma-Präparation durchgeführt und die so erhaltenen Lysate in einem FACS-Assay auf Bindung an CHO-M2-Zellen getestet. Von beiden *Libraries* wurden jeweils 126 Klone gescreent. Mit den Klonen, die die stärksten Signale im FACS-Assay lieferten, wurden Plasmid-Präparationen durchgeführt. Je *Library* wurden 20 Klone sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen enthalten 19 verschiedene *human-like* VH-Varianten und 7 verschiedene *human-like* VL-Varianten (siehe Abbildung 14). Die humane Identität ist im Vergleich zur murinen Ausgangs-Variante größtenteils deutlich erhöht und liegt für die *human-like* VH-Sequenzen bei 79,6 bis 86,1 % und für die *human-like* VL-Sequenzen bei 86,6 bis 88,4 %. An einigen Positionen ist in allen oder fast allen Klonen die jeweilige murine Aminosäure (rot), an anderen Positionen die jeweilige humane Aminosäure (blau) vorhanden. Teilweise gibt es auch sogenannte „fremd-Austausche“ (schwarz), Aminosäuren, die weder der murinen, noch der humanen Sequenz entsprechen.

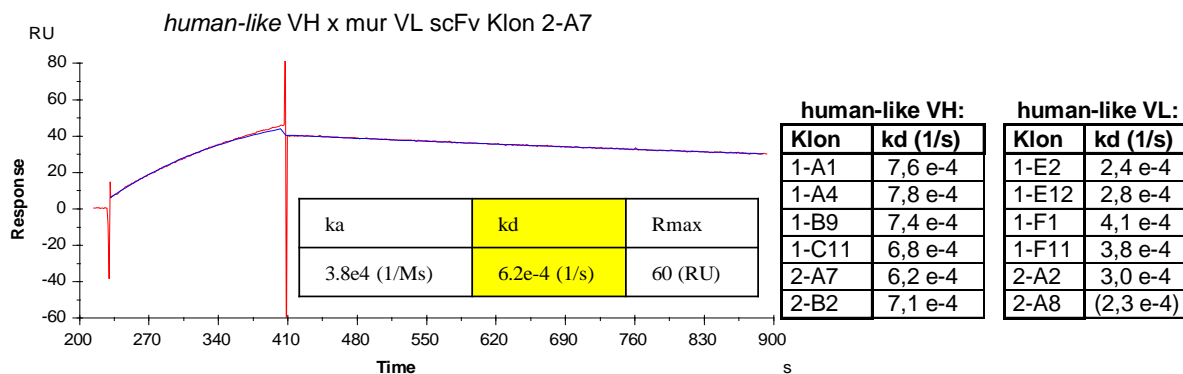
Zur weiteren Charakterisierung wurden diejenigen scFvs mit den sechs *human-like* VHs und mit den sechs *human-like* VLs gewählt, die der humanen Sequenz am nächsten kommen (siehe „% human“ in Abbildung 14). Dies sind die *human-like* VH Klone 1-A1, 1-A4, 1-B9, 1-C11, 2-A7 und 2-B2, sowie die *human-like* VL Klone 1-E2, 1-E12, 1-F1, 1-F11, 2-A2 und 2-A8.

Von diesen 12 Klonen wurden erneut Periplasma-Präparationen im größeren Maßstab hergestellt, um Lysate mit höheren scFv-Konzentrationen zu erhalten. Mit diesen wurden jeweils  $k_{\text{off}}$ -Werte mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Biacore) sowie  $TS_{50}$ -Werte in einem FACS-basierten Assay bestimmt.

Die Dissoziations-Rate ( $k_{\text{off}}$ -Werte;  $k_d$ ) ist, im Gegensatz zum  $K_D$ -Wert, konzentrationsunabhängig und lässt erkennen, wie gut ein scFv nach erfolgter Bindung an ein Antigen an diesem gebunden bleibt. Je kleiner der Wert, desto langsamer ist die Dissoziation. Eine exemplarische Biacore-Messung einer Periplasma-Präparation ist in Abbildung 15 zu sehen. Die  $k_d$ -Werte liegen für die *human-like* VH Klone zwischen  $6,2 \times 10^{-4}$  und  $7,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und für die *human-like* VL Klone bei zwischen  $2,4 \times 10^{-4}$  und  $4,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Mit dem Lysat des *human-like* VL Klons 2-A8 konnten, auch nach Wiederholung der periplasmatischen Expression, nur sehr schwache Signale und damit keine aussagekräftigen Werte erhalten werden.

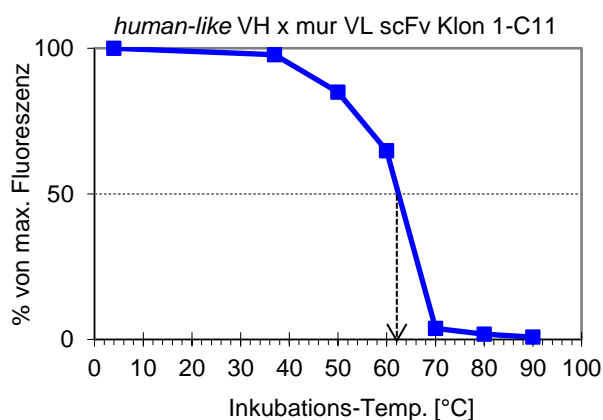


**Abbildung 14:** Alignment aller anti-M2e *human-like* VH und *human-like* VL Sequenzen der 20 sequenzierten halb *human-like* anti-M2e scFv Klone nach der *in vitro*-Selektion. Die fett gedruckten Buchstaben in den Framework (FR)-Regionen stellen die Aminosäuren dar, die durch das *human-like engineering* hin zur Aminosäure der humanen Keimbahn verändert werden sollten. Alle Aminosäuren, die der murinen Sequenz entsprechen sind rot dargestellt, blaue Aminosäuren entsprechen der humanen Keimbahn-Sequenz, und schwarze Aminosäuren stellen einen Fremd-Austausch durch eine Aminosäure dar, die an dieser Position weder in der humanen, noch in der murinen Sequenz vorkommt.



**Abbildung 15:** Messung der Dissoziations-Rate des anti-M2e *human-like* VH x murin VL scFv Klons 2-A7 mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Biacore). Der  $k_d$ -Wert beträgt  $6,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Zwischen dem ersten und dem zweiten Ausschlag der roten Kurve findet der Auftrag der Periplasma-Präparation auf den mit M2e-tGCN4 beschichteten Chip statt, nach dem zweiten Ausschlag der Kurve wird mit Puffer gewaschen; die abfallende Kurve zeigt das Ablösen der scFv-Moleküle vom Antigen. Der  $k_a$  Wert beschreibt die Assoziation und  $R_{\text{max}}$  das von der Software errechnete Maximum, bei dem Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht sind. In der nebenstehenden Tabelle sind die  $k_d$ -Werte aller untersuchter halb *human-like* anti-M2e-scFvs aufgelistet.

Um einen Anhaltspunkt für die Stabilität der halb *human-like* scFvs zu erhalten, wurde ein Assay zur Bestimmung der Temperatur-Sensitivität durchgeführt. Der  $TS_{50}$ -Wert beschreibt die Temperatur, die nötig ist, um innerhalb von 5 min BiTE AKs so stark zu denaturieren, dass sie bei einer anschließenden Fluoreszenz-Färbung von Ziel-Antigen-exprimierenden Zellen in einer FACS-Messung noch ein halb-maximales Fluoreszenz-Signal liefern. Zur Bestimmung der  $TS_{50}$ -Werte wurden Periplasma-Präparationen der halb *human-like* scFvs für 5 min bei Temperaturen zwischen 4 und 90 °C inkubiert und anschließend auf ihre Bindung an M2-exprimierende CHO-Zellen untersucht. Ein repräsentatives Beispiel zur Bestimmung des  $TS_{50}$ -Wertes des *human-like* VH scFv 1-C11 ist in Abbildung 16 zu sehen.



**Abbildung 16:** Bestimmung der Temperatur-Sensitivität des *human-like* VH scFv-Klons 1-C11. Die Temperatur, bei der noch ein halb-maximales Fluoreszenz-Signal erreicht wird ( $TS_{50}$ -Wert) beträgt 62 °C.

In Tabelle 2 sind alle ermittelten Werte der näher charakterisierten halb *human-like* scFv-Moleküle dargestellt. Jeweils drei *human-like* VHs und drei *human-like* VLs mit möglichst hohem  $TS_{50}$ -Wert, möglichst hoher humaner Identität und möglichst kleinem  $k_d$ -Wert wurden ausgewählt, um diese zu neun verschiedenen *human-like* M2e BiTE AKs zu kombinieren und anschließend zu charakterisieren. Von den *human-like* VH Klonen wurden die Varianten 1-C11, 2-A7 und 2-B2 ausgewählt, von den *human-like* VL Klonen die Varianten 1-E2, 1-F11 und 2-A2. Die *human-like* VL-Variante 2-A8 wurde ausgeschlossen, da diese, wie oben beschrieben, nur sehr schwach in *E. coli* exprimiert wurde, und dadurch vor allem bei der Messung der *off-rates* nur sehr unzuverlässige Werte lieferte. Die Variante 1-F11 weist einen etwas höheren  $TS_{50}$ -Wert auf, als die Variante 2-A8 und die anderen noch in Frage kommenden Varianten 1-E12 und 1-F1. Sie wurde sehr gut in *E. coli* exprimiert, lieferte dadurch sichere Messwerte, und wurde aus diesem Grund ausgewählt.

**Tabelle 2:** Übersicht über die ermittelten Eigenschaften aller halb *human-like* anti-M2e scFv Moleküle. Aufgelistet sind jeweils Dissoziations-Rate ( $k_d$ -Wert), humane Identität (% human) und Temperatur-Sensitivität ( $TS_{50}$ -Wert).

**human-like VH:**

Klon	$k_d$ [1/s]	% human	$TS_{50}$ [°C]
1-A1	7,6 e-4	85,2	60
1-A4	7,8 e-4	85,2	58
1-B9	7,4 e-4	85,2	62
1-C11	6,8 e-4	85,2	62
2-A7	6,2 e-4	86,1	62
2-B2	7,1 e-4	85,2	62

**human-like VL:**

Klon	$k_d$ [1/s]	% human	$TS_{50}$ [°C]
1-E2	2,4 e-4	88,4	61
1-E12	2,8 e-4	87,5	61
1-F1	4,1 e-4	87,5	61
1-F11	3,8 e-4	87,5	62
2-A2	3,0 e-4	88,4	63
2-A8	(2,3 e-4)	88,4	61

#### 4.1.5.3 Generierung und Aufreinigung von *human-like* M2e BiTE Antikörper-Konstrukten

Die DNA-Sequenzen der ausgewählten drei anti-M2e *human-like* VH-Varianten wurden jeweils über PCR-Fusion mit jeder der drei anti-M2e *human-like* VL-Varianten zu insgesamt neun verschiedenen *human-like* M2e-h BiTE Varianten kombiniert. Dabei wurden die für die in Abbildung 14 grau gefärbten Aminosäuren kodierenden Basen-Triplets durch Triplets ersetzt, die die jeweilige humane Aminosäure kodieren. Diese *human-like* anti-M2e scFv-Sequenzen wurden in einen Vektor kloniert, in dem bereits die anti-huCD3 scFv-Sequenz vor-kloniert war. Die jeweils entstandenen Sequenzen wurden verifiziert. In Tabelle 3 sind die jeweiligen VH-VL Kombinationen für die neun *human-like* anti-M2e-h BiTE AKs aufgelistet.

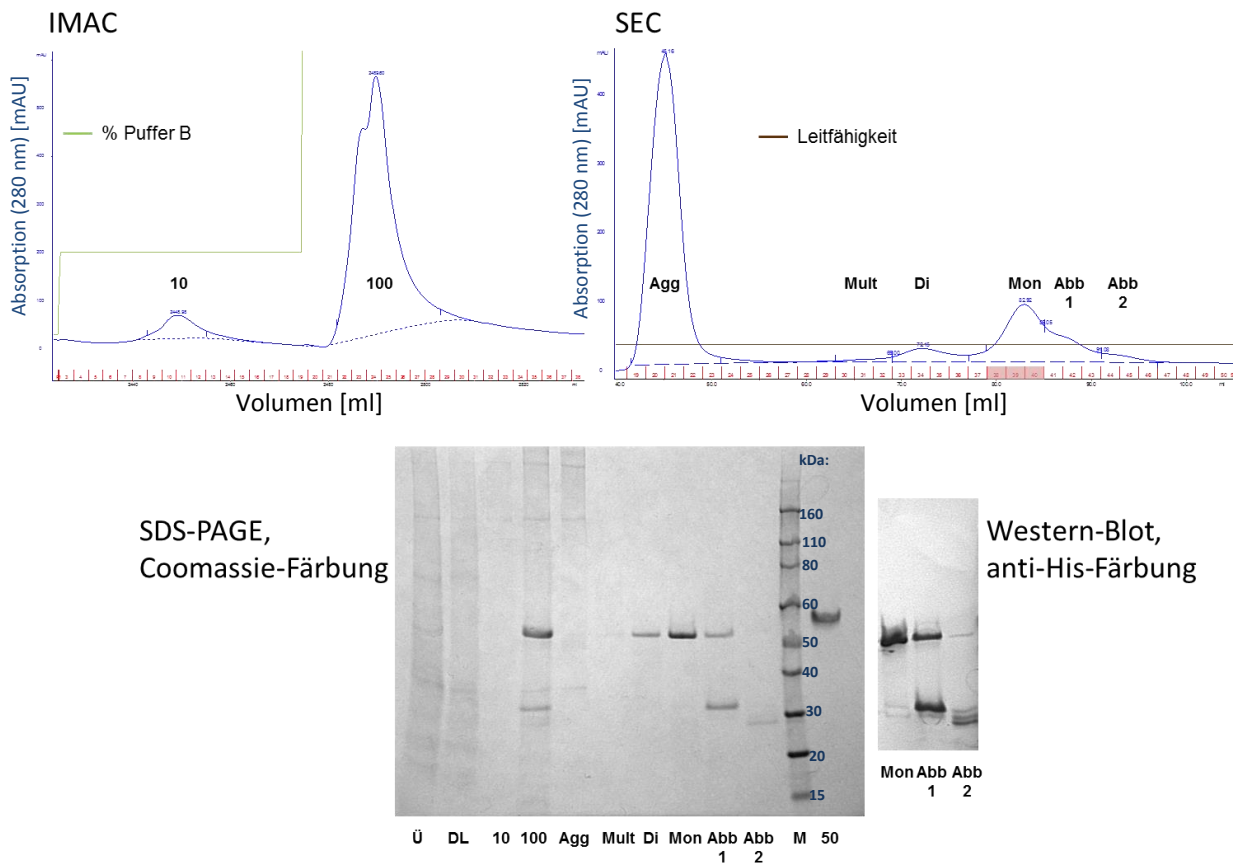


**Tabelle 3:** *Human-like* M2e-h BiTE Varianten.

humM2e-h BiTE Variante	<i>human-like</i> VH	<i>human-like</i> VL
1	2-B2	2-A2
2	2-B2	1-E2
3	2-B2	1-F11
4	2-A7	2-A2
5	2-A7	1-E2
6	2-A7	1-F11
7	1-C11	2-A2
8	1-C11	1-E2
9	1-C11	1-F11

Mit jeder Variante wurde eine Transfektion von CHO<sup>DHFR</sup>-Zellen durchgeführt und stabile Transfektanten wurden in der ersten Amplifikationsstufe (Medium mit 20 nM Methotrexat) kultiviert. Etwa ein Liter Zellkultur-Überstand je humM2e-h BiTE Variante wurde gesammelt und daraus über einen IMAC- und einen anschließenden SEC-Lauf BiTE Monomer aufgereinigt. Die unterschiedlichen Fraktionen aller Aufreinigungsschritte wurden über SDS-PAGE analysiert, um z.B. mögliche Abbauprodukte mit geringerem Molekulargewicht in der Monomer-Fraktion nachweisen zu können. Eine repräsentative Aufreinigung inklusive analytischem SDS-Gel und Western-Blot eines *human-like* M2e-h BiTE ist in Abbildung 17 zu sehen. Die rechts an den Monomer-Peak (Pfeil) anschließenden Peaks enthalten vermutlich Abbau-Produkte des BiTE AKs. Diese Peaks konnten in ähnlichem Umfang bei allen humM2e-h BiTE Varianten beobachtet werden. Durch die Wahl der gepoolten Monomer-Fractionen (rot schattiert) konnten für alle humM2e-h BiTE AKs dennoch Fraktionen gesammelt werden, die neben dem BiTE Monomer nur einen sehr geringen Anteil an Verunreinigungen in Form von Abbauprodukten enthalten. Die Abbauprodukte sind im SDS-Gel und im Western-Blot an der geringeren molekularen Masse zu erkennen und sind hauptsächlich in den Fraktionen des angrenzenden Peaks (Abbau-Produkt 1) der SEC vorhanden.

In Tabelle 4 sind die Protein-Konzentrationen der Monomer-Fractionen aller 9 *human-like* M2e-h BiTE Varianten, sowie die jeweils aus der Aufreinigung erhaltene Gesamtmenge an BiTE Monomer aufgelistet. Die Konzentrationen liegen im Bereich zwischen 9,2 und 48,6 µg/ml und die Gesamt-Ausbeute an Monomer zwischen 55 und 292 µg.



**Abbildung 17:** Repräsentative Aufreinigung eines *human-like* M2e-h BiTE AKs (humM2e-h BiTE 8) mit dazugehörigem Analyse-Gel und Western-Blot. Der rechts an den Monomer-Peak (Mon) grenzende Peak ist vermutlich ein Abbau-Produkt (Abb 1). Die drei rot markierten Monomer-Fractionen wurden gepoolt. 10 bzw. 100 - Eluat mit 10 bzw. 100 % Puffer B; Ü - Zellkultur-Überstand; DL - IMAC-Durchlauf; Agg - Aggregation; Mult - Multimer; Di - Dimer; 50 – Kontroll BiTE AK (50 µg/ml).

**Tabelle 4:** Protein-Konzentrationen und erhaltene Gesamtmengen der Monomer-Fractionen aller *human-like* M2e-h BiTE Varianten.

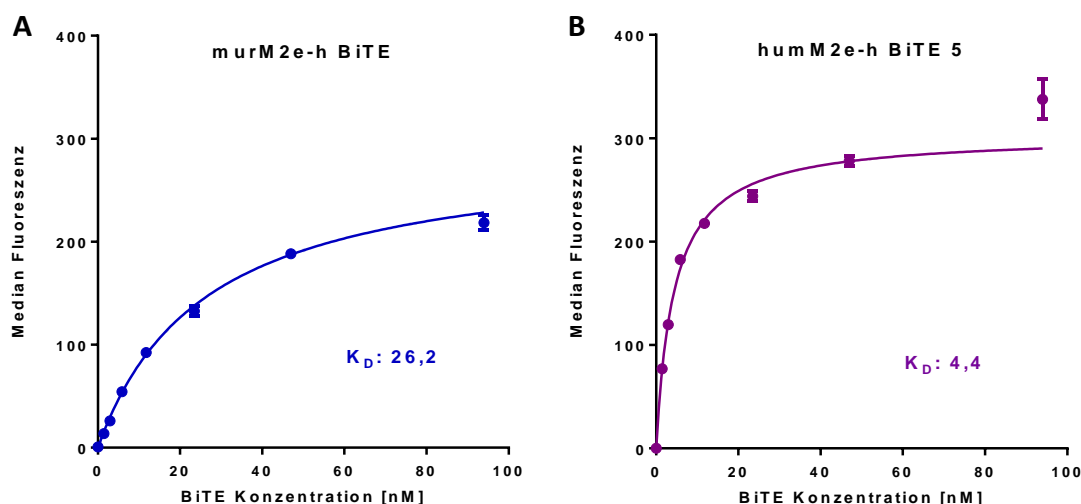
humM2e-h BiTE Variante	Konzentration [µg/ml]	Gesamtmenge [µg]
1	27,4	164
2	15,2	91
3	48,6	292
4	35,3	212
5	30,7	184
6	9,2	55
7	39,8	239
8	47,7	286
9	20,7	124

#### 4.1.6 Charakterisierung der *human-like* M2e BiTE Antikörper-Konstrukte

Zur genaueren Charakterisierung der *human-like* M2e-h BiTE AKs wurde, wie schon für den murinen M2e-h BiTE, jeweils die Affinität zu M2 und die zytotoxische Aktivität jeder *human-like* M2e-h BiTE Variante bestimmt, um die beste Variante zu identifizieren.

##### 4.1.6.1 Affinitäts-Bestimmung der M2-Bindung der *humM2e-h* BiTE AKs

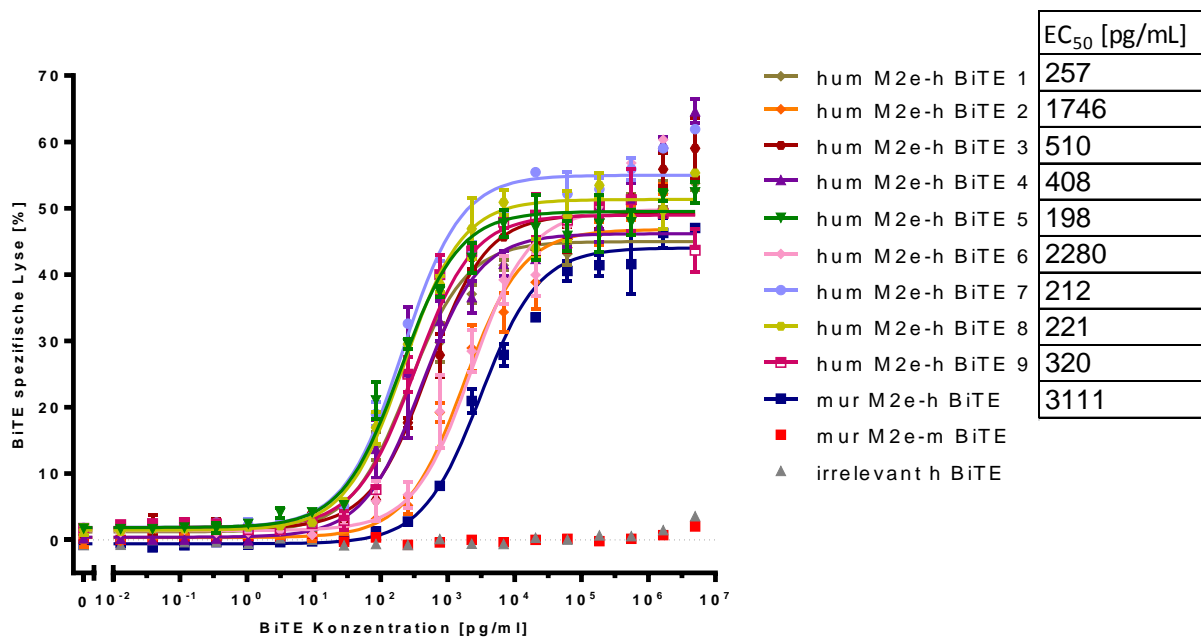
In Abbildung 18 ist ein Scatchard-Assay zur Affinitäts-Bestimmung des *human-like* M2e-h BiTE 5 im direkten Vergleich mit dem murinen M2e-h BiTE zu sehen. Die  $K_D$ -Werte im abgebildeten Assay betragen 4,4 nM für den *human-like* M2e-h BiTE 5 und 26,2 nM für den murinen M2e-h BiTE. Eine Übersicht über die  $K_D$ -Werte aller *human-like* M2e-h BiTE AKs, sowie des murinen M2e-h BiTE sind in Tabelle 5 zu finden. Die dort angegebenen Werte sind, mit Ausnahme des  $K_D$ -Wertes für die *humM2e-h* BiTE Variante 2, für die nur ein auswertbarer Assay durchgeführt werden konnte, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Assays und liegen zwischen 6,2 nM (SD = 1,8) für den *human-like* M2e-h BiTE 5 und 47 nM (Einzel-Wert) für den *human-like* M2e-h BiTE 2. Die *human-like* M2e-h BiTE Varianten 3 ( $K_D$  = 11 nM; SD = 1,4), 4 ( $K_D$  = 18 nM; SD = 1,1), 6 ( $K_D$  = 36 nM; SD = 26,8), 7 ( $K_D$  = 11; SD = 3,2), 8 ( $K_D$  = 9; SD = 5,4) und 9 ( $K_D$  = 13; SD = 4,3) weisen teils deutlich niedrigere  $K_D$ -Werte auf, als der murine M2e-h BiTE ( $K_D$  = 35 nM; SD = 8,9). Somit konnte durch das *human-like engineering* nicht nur die humane Identität des M2e-h BiTE AKs erhöht werden, sondern es wurde außerdem auch eine Verbesserung der Affinität zu M2e erreicht.



**Abbildung 18:** Affinitätsbestimmung des murinen M2e-h BiTE und der *human-like* M2e-h BiTE Variante 5 auf CHO-M2-Zellen (PS). Der murine M2e-h BiTE (A) weist in diesem Assay einen  $K_D$ -Wert von 26,2 nM auf. Der *human-like* M2e-h BiTE 5 (B) erreicht bereits in einem niedrigeren Konzentrationsbereich die Sättigung und hat einen  $K_D$ -Wert von 4,4 nM.

#### 4.1.6.2 Zytotoxische Aktivität der *humM2e-h* BiTE Antikörper-Konstrukte

Zur Überprüfung der zytotoxischen Aktivität der *human-like* M2e-h BiTE AKs wurden mehrere FACS-basierte Zytotoxizitäts-Assays mit unterschiedlichen Inkubations-Zeiten durchgeführt. Ein repräsentativer Assay ist in Abbildung 19 zu sehen. Hier wurden CHO-M2-Zellen im Verhältnis 1:10 mit CD14-/CD56-depletierten, unstimulierten humanen PBMCs bei unterschiedlichen BiTE AK-Konzentrationen für 66 h inkubiert und anschließend über eine Messung am Durchflusszytometer der Prozentsatz toter CHO-M2-Zellen bestimmt. Die berechneten  $EC_{50}$ -Werte aller *human-like* M2e-h BiTE AKs liegen mit Werten zwischen 198 und 2280 pg/ml unterhalb des  $EC_{50}$ -Werts des murinen M2e-h BiTE (3111 pg/ml). Die *human-like* M2e-h BiTE Varianten sind damit potenter, als der murine M2e-h BiTE, was sich bereits in der Affinitätsbestimmung andeutete. Die Variante mit der höchsten Aktivität ist *humM2e-h* BiTE 5 mit einem, im Vergleich zur murinen Variante, etwa 15-fach niedrigeren  $EC_{50}$ -Wert. Mit stimulierten  $CD8^+$  T-Zellen aus dem Blut desselben Spenders wurde ein ansonsten identischer Assay angesetzt und nach 18-stündiger Inkubationszeit ausgewertet (siehe Tabelle 5, stim. Effektoren). Zudem wurde ein 48-stündiger Assay mit unstimulierten PBMCs aus dem Blut eines anderen Spenders durchgeführt (siehe Tabelle 5, unstim. Effektoren, 48 h).



**Abbildung 19:** Zytotoxizitäts-Assay aller *human-like* M2e-h BiTE Varianten und des murinen M2e-h BiTE. Aus humanem Blut isolierte, CD14/CD56-depletierte PBMCs wurden im Verhältnis 10:1 mit CHO-M2-Zellen (PS) und unterschiedlichen Konzentrationen von *human-like* oder murinem M2e-h BiTE oder Kontroll- BiTE AKs gemischt und 66 h bei 37 °C inkubiert. Alle *human-like* M2e-h BiTE AKs bewirken eine effektivere Target-Zell-Lyse mit einem bis zu 15-fach geringeren  $EC_{50}$ -Wert, als der murine M2e-h BiTE. Die Kontroll- BiTE AKs, die entweder nur an Target-, oder nur an Effektor-Zellen binden können, bewirken keine spezifische Target-Zell-Lyse.

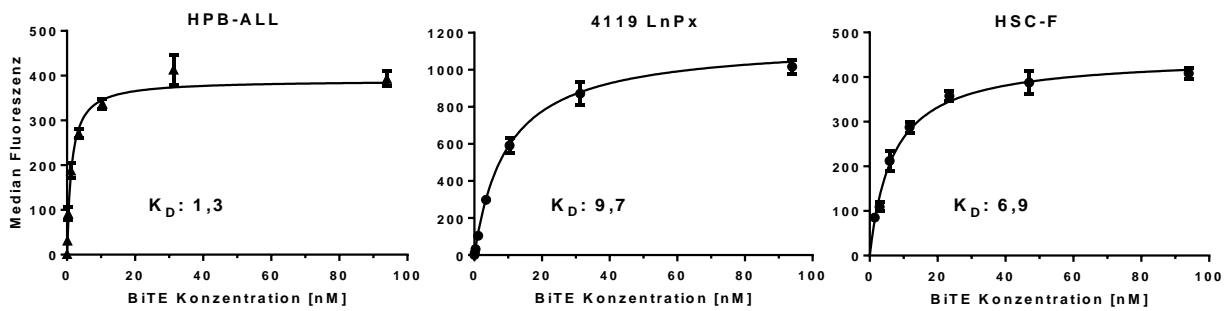
Zur Auswahl des besten *human-like* M2e-h BiTE AKs wurden die drei in Tabelle 5 aufgelisteten Kriterien – zytotoxische Aktivität, Affinität zu M2 und humane Identität – berücksichtigt. Bei Betrachtung der  $EC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte haben besonders die beiden humM2e-h BiTE Varianten 5 und 8 konstant gute Werte. Aufgrund der etwas höheren Affinität und humanen Identität der Variante 5 wurde dieses *human-like* BiTE AK ausgewählt und für alle nachfolgenden Experimente verwendet.

**Tabelle 5:** Charakteristika aller *human-like* M2e-h BiTE AKs im Vergleich mit dem murinen M2e-h BiTE. Aufgelistet sind die zytotoxischen Aktivitäten aus drei Assays, wobei die Effektoren aus dem Blut eines Spenders für 2 Assays einmal stimuliert und einmal unstimuliert eingesetzt wurden. Außerdem sind die Mittelwerte der Affinitäten aus jeweils mindestens 2 unabhängigen Assays sowie die humane Identität der jeweiligen Variante zu sehen. Die Farb-Kodierung versteht sich als *Ranking* je Spalte, wobei eine grüne Färbung eine bessere Eigenschaft und eine rote Färbung eine weniger gute Eigenschaft signalisiert. Der mit \* markierte Assay ist in Abbildung 19 abgebildet.

	Zytotoxische Aktivität; $EC_{50}$ [pg/mL]			Affinität M2-Bindung	Humane Identität
	stim. Effektoren, 18h	unstim. Effektoren, 66h*	unstim. Effektoren, 48h	$K_D$ [nM]	[%]
murM2e-h BiTE	101	3111	1605	35,1	78,2
humM2e-h BiTE 1	34	257	456	39,4	86,8
humM2e-h BiTE 2	171	1746	595	47,0	86,8
humM2e-h BiTE 3	61	510	649	10,6	86,4
humM2e-h BiTE 4	22	408	276	18,1	87,3
humM2e-h BiTE 5	21	198	297	6,2	87,3
humM2e-h BiTE 6	234	2280	547	36,2	86,8
humM2e-h BiTE 7	42	212	330	10,8	86,8
humM2e-h BiTE 8	22	221	219	8,6	86,8
humM2e-h BiTE 9	28	320	197	12,7	86,4
gleicher Blutspender					

#### 4.1.6.3 Affinitätsbestimmung der CD3-Bindung des humM2e-h BiTE 5

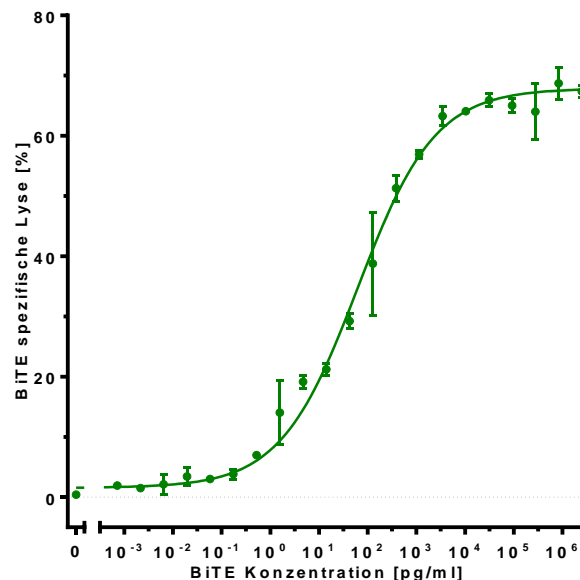
Zur Bestimmung der Affinitäten des CD3-bindenden Anteils der humM2e-h BiTE Variante 5 wurden Scatchard-Assays mit den T-Zelllinien HPB-ALL (human), 4119 LnPx (Rhesus-Makak) und HSC-F (Cynomolgus-Makak) durchgeführt. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, entspricht die Affinität des humM2e-h BiTE 5 zu humanem CD3 mit einem  $K_D$ -Wert von 1,3 nM der für den murinen M2e-h BiTE bestimmten  $K_D$ -Wert (vgl. Abbildung 11). Rhesus-CD3 wird etwa um den Faktor 7,5 schwächer gebunden ( $K_D = 9,7$  nM), Cynomolgus-CD3 wird ca. 5,3-fach schwächer gebunden ( $K_D = 6,9$  nM).



**Abbildung 20:** Affinitäts-Bestimmung der CD3-Bindung des humM2e-h BiTE 5 auf humanem (HPB-ALL), Rhesus- (4119 LnPx) und Cynomolgus- (HSC-F) CD3. Einheit der angegebenen  $K_D$ -Werte: [nM].

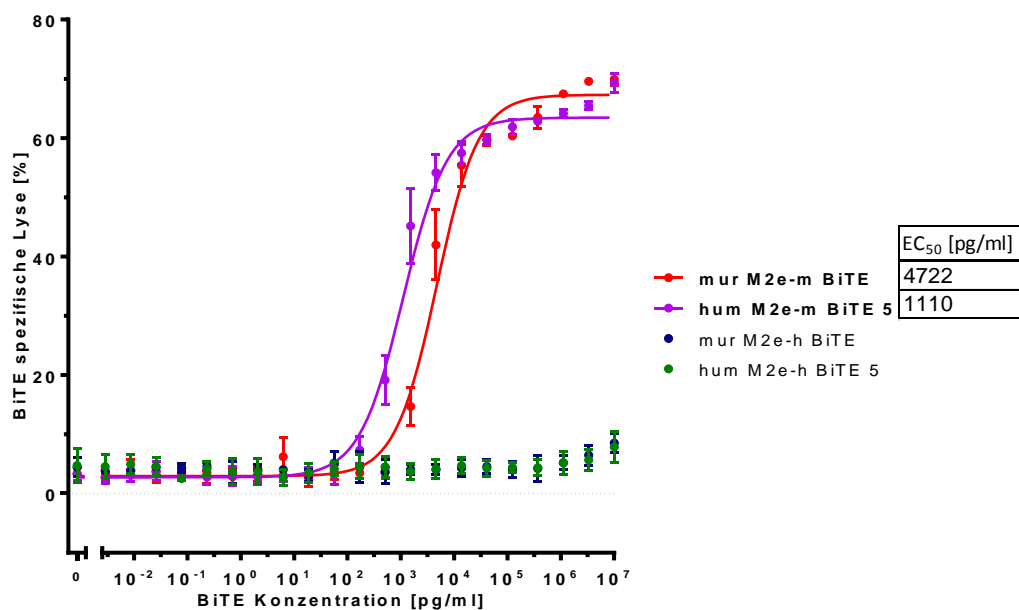
#### 4.1.6.4 Zytotoxische Aktivität des humM2e-h BiTE 5 mit Rhesus-Effektor-Zellen

Um die zytotoxische Aktivität des humM2e-h BiTE 5 mit nicht-humanen T-Zellen als Effektoren nachzuweisen, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay mit der Rhesus-T-Zell-Linie 4119 LnPx als Effektor-Zellen durchgeführt. Nach 72-stündiger Inkubation in einem E:T-Verhältnis von 10:1 bei unterschiedlichen BiTE Konzentrationen werden bis zu 68 % der *Target*-Zellen (CHO-M2 (PS)) BiTE spezifisch lysiert. Der  $EC_{50}$ -Wert liegt bei 62  $\mu\text{g/ml}$  (siehe Abbildung 21). Somit wäre der humM2e-h BiTE 5 auch für eine Wirksamkeits-Studie im Affen geeignet.



**Abbildung 21:** Zytotoxische Aktivität des *human-like* M2e-h BiTE 5 auf CHO-M2-Zellen (PS) mit 4119 LnPx als Effektoren. 4119 LnPx Rhesus-Makaken-T-Zellen wurden in einem E:T-Verhältnis von 10:1 mit CHO-M2-Zellen (PS) und unterschiedlichen Konzentrationen des humM2e-h BiTE 5 für 72 h inkubiert. Die BiTE spezifische Lyse erreicht ein Maximum von 68 %. Der  $EC_{50}$ -Wert liegt bei 62  $\mu\text{g/ml}$ .

Um sowohl den murinen, als auch den *human-like* M2e BiTE auch in einem Influenza A-Maus-Modell testen zu können, wurde außerdem ein murCD3-bindendes BiTE AK der Variante 5 des *human-like* M2e BiTE kloniert, exprimiert, aufgereinigt und in einem Zytotoxizitäts-Assay mit CTLL-2-Zellen als Effektoren getestet (siehe Abbildung 22). Auch die *human-like* Variante des M2e-m BiTE AKs weist eine im Vergleich zur murinen Variante erhöhte Zytotoxizität auf. Dies zeigt sich im abgebildeten Zytotoxizitäts-Assay am mit 1110 pg/ml etwa 4-fach geringeren EC<sub>50</sub>-Wert des *human-like* M2e-m BiTE, im Vergleich zu einem EC<sub>50</sub>-Wert von 4722 pg/ml beim mur M2e-m BiTE.



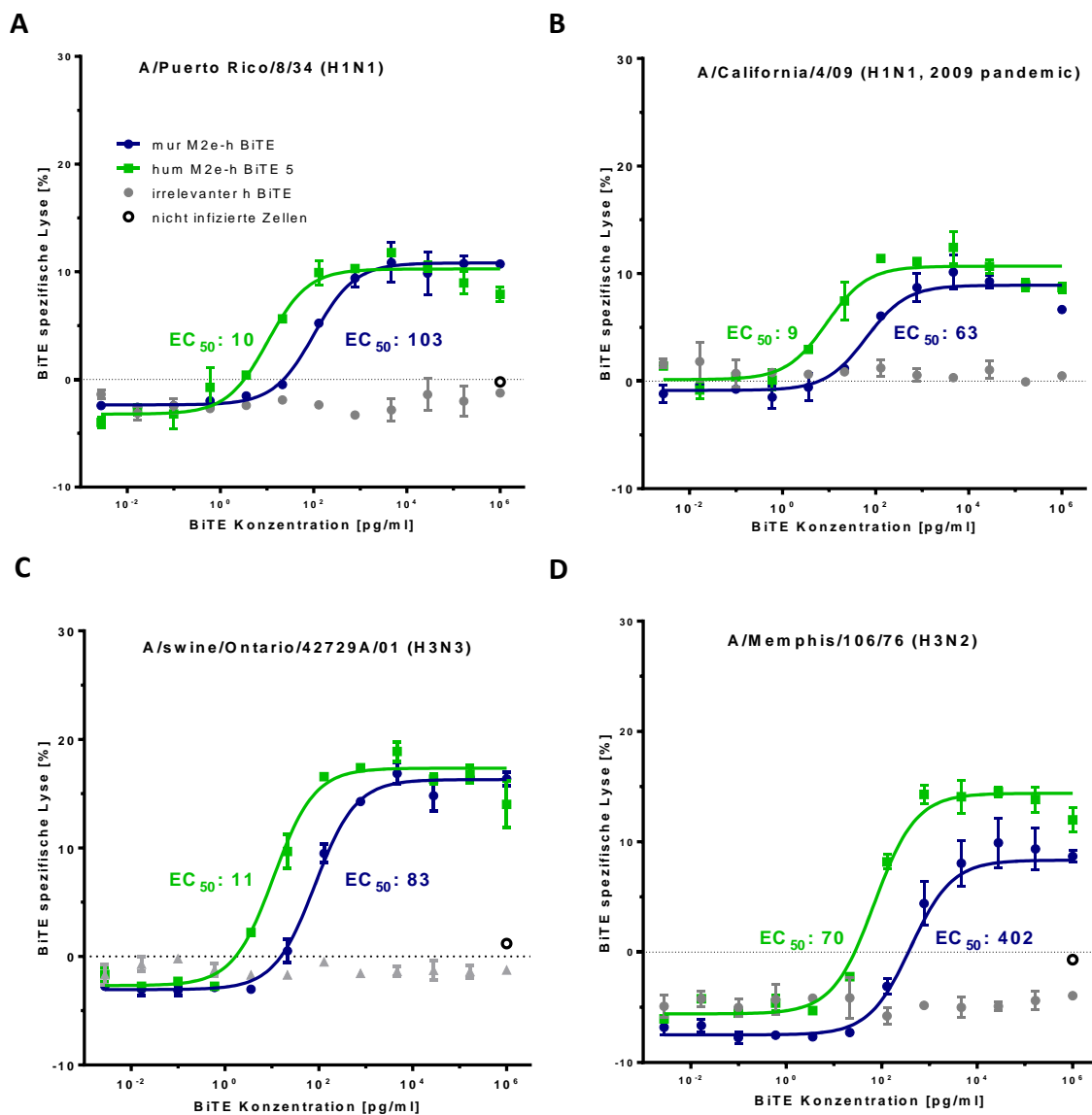
**Abbildung 22:** Zytotoxische Aktivität des *human-like* M2e-m BiTE 5 im Vergleich zum murinen M2e-m BiTE. CHO-M2-Zellen (PS) wurden mit der 10-fachen Menge CTLL-2-Zellen gemischt (E:T-Verhältnis = 10:1) und mit unterschiedlichen BiTE Konzentrationen für 66 h inkubiert.

#### 4.1.7 Zytotoxische Aktivität von M2e-h BiTE Antikörper-Konstrukten auf Influenza A-infizierten Zellen

Um zu überprüfen ob sich die mit transfizierten M2-exprimierenden Zellen erzielten Ergebnisse auch auf Influenza A-infizierte Zellen übertragen lassen, wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt, in denen untersucht werden sollte, ob mit verschiedenen Influenza A Stämmen infizierte Zellen ebenfalls BiTE spezifisch lysiert werden können.

Als gut etabliertes Modell [144-146] wurden zu diesem Zweck MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-Zellen verwendet. Diese wurden mit einer MOI (= *multiplicity of infection*) von 3 infiziert und anschließend mit stimulierten humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem E:T Verhältnis von 10:1 und unterschiedlichen Konzentrationen des murinen, des *human-like* M2e-h BiTE 5 oder

eines irrelevanten h BiTE AKs 18 h inkubiert und anschließend mit Hilfe des *Toxilight* Assay Kits und eines Luminometers ausgewertet.



**Abbildung 23:** Zytotoxische Aktivität des murinen und des *human-like* M2e-h BiTE 5 auf Influenza A-infizierten MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden mit einer MOI von 3 mit verschiedenen Stämmen des Influenza A-Virus infiziert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen des mur M2e-h BiTE, des humM2e-h BiTE 5, oder eines irrelevanten h BiTE AKs und stimulierten humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (E:T-Ratio = 10:1) für 18 h inkubiert. Um zu zeigen, dass eine BiTE vermittelte Lyse nur nach einer Influenza A-Infektion stattfindet, wurden nicht infizierte MDCK-Zellen mit einer M2e-h BiTE Konzentration von 1 µg/ml und humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (E:T-Verhältnis = 10:1) inkubiert (schwarze Kreise). EC<sub>50</sub>-Werte in pg/ml.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, ist nach einer Infektion mit jedem der vier verwendeten Influenza A-Stämme eine klare BiTE spezifische Lyse zu erkennen. Unabhängig vom Virus-



Stamm zeigt die *human-like* M2e-h BiTE Variante 5 eine höhere zytotoxische Aktivität, als die murine Variante dieses BiTE AKs. Für den humM2e-h BiTE liegen die EC<sub>50</sub>-Werte bei Zellen, die mit den Stämmen A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/4/09 (H1N1) oder A/swine/Ontario/42729A/01 (H3N3) infiziert wurden bei 9-11 pg/ml. Für den murM2e-h BiTE liegen sie bei 63-103 pg/ml und damit etwa 7- bis 10-fach höher (Abbildung 23 A-C).

Zellen, die mit dem Stamm A/Memphis/106/76 (H3N2) infiziert wurden, werden sowohl mit dem humM2e-h BiTE (EC<sub>50</sub> = 70 pg/ml), als auch mit dem murM2e-h BiTE (EC<sub>50</sub> = 402 pg/ml) erst bei höheren BiTE Konzentrationen lysiert (Abbildung 23 D). Die M2e-Sequenzen der verwendeten Influenza A-Stämme sind in Tabelle 6 aufgelistet. Diese zeigen beim Stamm A/Memphis/106/76 einen Aminosäure-Austausch (Leucin statt Prolin) an Position 10, welcher in keiner M2e-Sequenz der übrigen verwendeten Stämme vorkommt.

**Tabelle 6:** M2e-Aminosäuresequenzen der für den Zytotoxizitäts-Assay verwendeten Influenza A-Stämme und der M2e-Konsensus-Sequenz [73]. Der unterstrichene Bereich markiert den vom verwendeten M2e-Binder erkannten Bereich (X. Saelens *et al.*, mündliche Kommunikation), rote Buchstaben markieren von der Konsensus-Sequenz abweichende Aminosäuren.

Konsensus-Sequenz	<u>MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD</u>
A/Puerto Rico/8/34(H1N1)	<u>MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD</u>
A/California/4/09(H1N1)	<u>MSLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD</u>
A/swine/Ontario/42729A/01(H3N3)	<u>MSLLTEVETPTRNGWECRCSDSSD</u>
A/Memphis/106/76(H3N2)	<u>MSLLTEVETLIRSEWGCRCNDSSD</u>

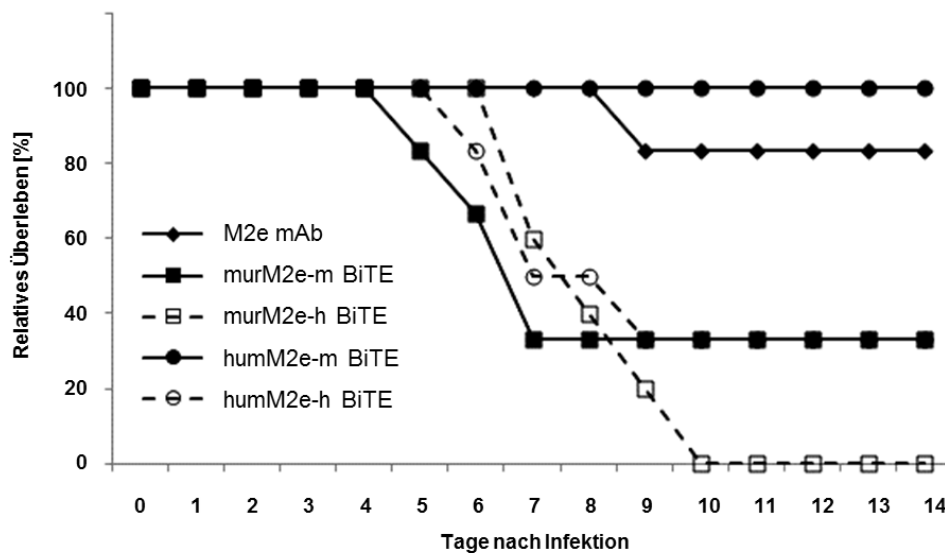
#### 4.1.8 Wirksamkeit von M2e-m BiTE in Influenza A-infizierten Mäusen

Nachdem gezeigt wurde, dass mit Hilfe von M2e BiTE AKs sowohl transfizierte M2-exprimierende CHO-Zellen, als auch Influenza A-infizierte MDCK-Zellen *in vitro* abgetötet werden können, sollte nun untersucht werden, ob diese Moleküle auch in einem *in vivo* Modell einen positiven Einfluss auf den Verlauf einer Influenza A-Infektion nehmen können.

Da BiTE AKs Zielzellen am effektivsten durch die Rekrutierung von Effektor Memory T-Zellen abtöten können [18], diese aber in jungen, unter keimarmen SPF (= spezifiziert pathogenfreien) Bedingungen gehaltenen Labortieren nur in recht geringem Umfang vorkommen, wurden die 7-8 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäuse zunächst intranasal mit einer sublethalen Dosis (0,2 LD<sub>50</sub>) Influenza B Virus (B/Memphis/10/97) infiziert. Fünf Wochen später, nachdem sich die Tiere wieder komplett von der Influenza B-Infektion erholt hatten, wurden sie intranasal mit 2 LD<sub>50</sub> Maus-adaptiertem Influenza A / X47 (H3N2) Virus infiziert. Die Behandlung mit BiTE AKs oder dem parentalen monoklonalen Antikörper (M2e mAb) erfolgte in

Form von täglichen intravenösen Gaben von 10 µg M2e-m BiTE oder 15 µg M2e mAb (äquimolar) in PBS je Dosis je Maus von Tag 1 bis 6 nach der Infektion. Die Tiere wurden in 5 Versuchsgruppen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt und erhielten entweder M2e mAb (Positiv-Kontrolle), murM2e-m BiTE, murM2e-h BiTE (Negativ-Kontrolle 1), humM2e-m BiTE (5), oder humM2e-h BiTE (5) (Negativ-Kontrolle 2).

Die Ergebnisse des *in vivo* Experiments sind in Abbildung 24 zu sehen. 100 % der mit dem humM2e-m BiTE behandelten Tiere überlebten die Infektion mit 2 LD<sub>50</sub> Influenza A / X47 (H3N2) Virus. Von den Mäusen, die mit murM2e-m BiTE behandelt wurden, überlebten lediglich 30 % der Mäuse. Während keines der Tiere, die mit murM2e-h BiTE behandelt wurden, überlebte, erholen sich 30 % der Tiere, die eine humM2e-h BiTE Behandlung erhielten, von der Infektion. Von den Tieren, die mit dem parentalen monoklonalen Antikörper (M2e mAb) behandelt wurden, überlebten 80 %.



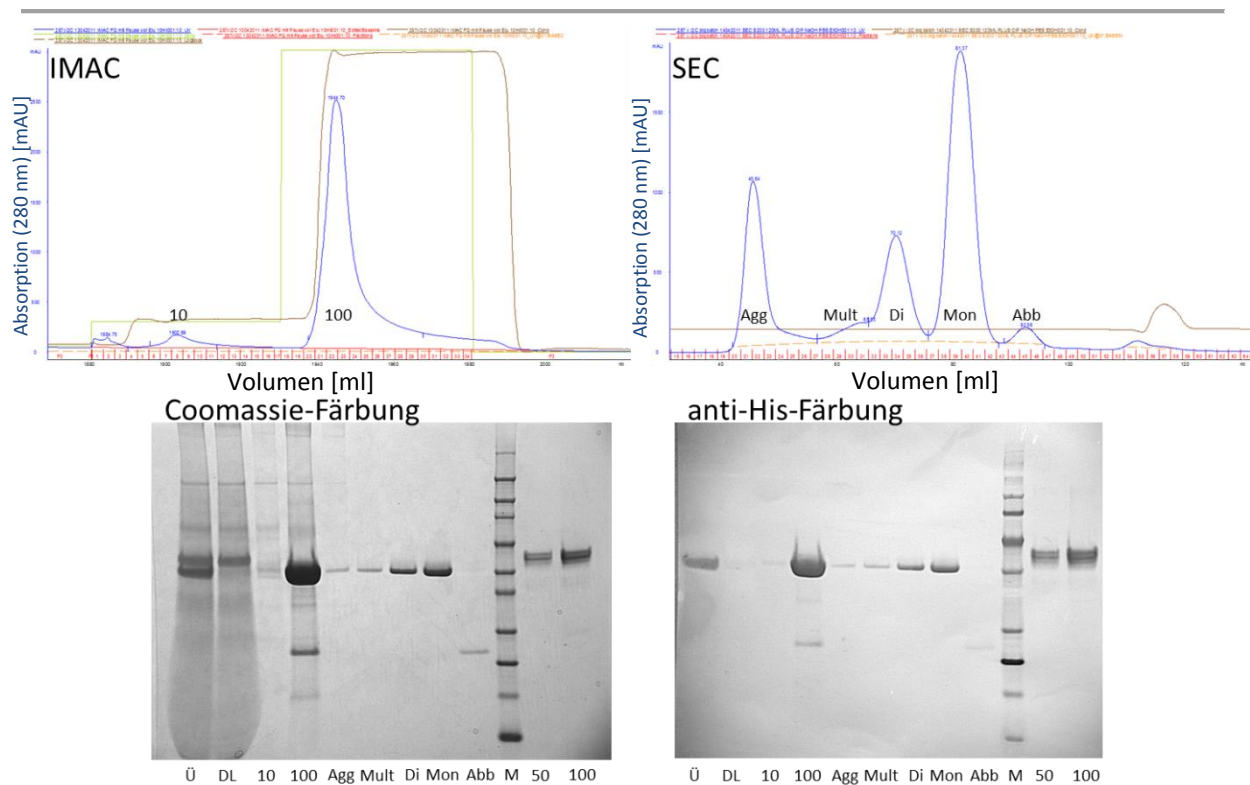
**Abbildung 24:** *In vivo* Evaluierung der Wirksamkeit des human-like und des murinen M2e-m BiTE. An Tag 0 wurden die Mäuse mit 2 LD<sub>50</sub> Influenza A / X47 (H3N2) Virus infiziert und erhielten von Tag 1 bis 6 die angezeigte Behandlung (10 µg BiTE bzw. 15 µg M2e mAb je Tag je Tier). In der mit humM2e-m BiTE behandelten Gruppe überleben alle Tiere. Von den mit murM2e-m BiTE behandelten Tieren überleben 30 %. Keines der mit murM2e-h BiTE behandelten Tiere erreicht den Endpunkt des Experiments.

*In vivo* lassen sich die Ergebnisse aus den *in vitro*-Zytotoxizitäts-Assays somit bestätigen. Der murM2e-m BiTE zeigt in Influenza A-infizierten Mäusen einen leichten protektiven Effekt. Der human-like M2e-m BiTE, der eine höhere *Target*-Affinität und eine höhere zytotoxische Aktivität *in vitro* aufweist, schützt Influenza-infizierte Mäuse besser, als der murM2e-m BiTE.

## 4.2 Cytomegalovirus Glykoprotein B BiTE

### 4.2.1 Herstellung und Isolierung von CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukten

Die Produktion, Aufreinigung und Analytik der mur CMV-gB BiTE AKs wurde, wie bereits für M2e BiTE AKs beschrieben, mit Hilfe von transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Die Chromatogramme einer Aufreinigung, am Beispiel des murinen CMV-gB-h BiTE, sind in Abbildung 25 (oben) zu sehen.



**Abbildung 25:** Aufreinigung des mur CMV-gB-h BiTE AKs. Zunächst erfolgte eine Aufreinigung über IMAC, mit der die BiTE AKs über ihren His-Tag aus dem Zellkultur-Überstand isoliert wurden. Danach wurden die im 100 % IMAC-Peak enthaltenen Proteine über Größenausschluss-chromatographie (SEC) aufgetrennt. Die aus diesen Aufreinigungsschritten erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) und anti-His-Tag Western-Blot analysiert. Ü – Zellkultur-Überstand, DL – Durchlauf aus IMAC, 10 bzw. 100 – 10 % bzw. 100 % Puffer B, Agg – Aggregation\*, Mult – Multimer\*, Di – Dimer\*, Mon – Monomer\*, Abb – evtl. Abbau-Produkt\*, M – Marker, 50 / 100 – BiTE AK mit bekannter Konzentration 50 bzw. 100 µg/ml. \*Analytik mit 1:10-Verdünnung der Fraktionen.

Die Monomer-Fraktion (Mon), die gut von der Dimer (Di)- und der Abbau (Abb)-Fraktion abgetrennt werden kann, wurde gesammelt und mit 4 % Trehalose versetzt. Die Fraktionen aller Aufreinigungsschritte wurden per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot mit anti-His-Färbung analysiert (siehe Abbildung 25 unten; Spuren Agg bis Abb

wurden in 1:10-Verdünnungen aufgetragen). Der Monomer-Peak zeigt sowohl im SDS-Gel, als auch im Western-Blot nur eine erkennbare Bande bei ca. 50 kDa, was etwa dem berechneten Molekulargewicht von 54 kDa entspricht. Durch die anti-His-Färbung im Western-Blot kann diese Bande als BiTE AK identifiziert werden. Somit enthält die gesammelte Monomer-Fraktion nur CMV-gB-h BiTE in sehr reiner Form. Die Konzentration der nur CMV-gB-h BiTE Monomer-Fraktion beträgt 1,12 mg/ml.

Ein muriner CD3 bindender mur CMV-gB-m BiTE wurde nach dem gleichen Verfahren aufgereinigt und analysiert und weist ein sehr ähnliches Aufreinigungs-Profil auf.

#### **4.2.2 Murine CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukte binden das Glykoprotein B verschiedener Virus-Stämme sowie CD3**

Zur *in vitro*-Evaluierung der mur CMV-gB BiTE AKs wurden transfizierte, CMV-Glykoprotein-B-exprimierende CHO-Zellen verwendet. Da das Cytomegalovirus streng wirtsspezifisch ist, und damit keine *in vivo*-Versuche mit HCMV möglich sind, sollte untersucht werden, ob der mur CMV-gB BiTE neben HCMV-gB auch das vom Rhesus-Cytomegalovirus (RhCMV) und Cynomolgus-Cytomegalovirus (CyCMV) codierte Glykoprotein B bindet. Diese beiden CMV-Infektionen ähneln in Symptomen und Verlauf stark einer HCMV-Infektion beim Menschen und könnten von Nutzen sein, um die Sicherheit oder auch die Effizienz einer CMV-gB BiTE Behandlung präklinisch zu evaluieren.

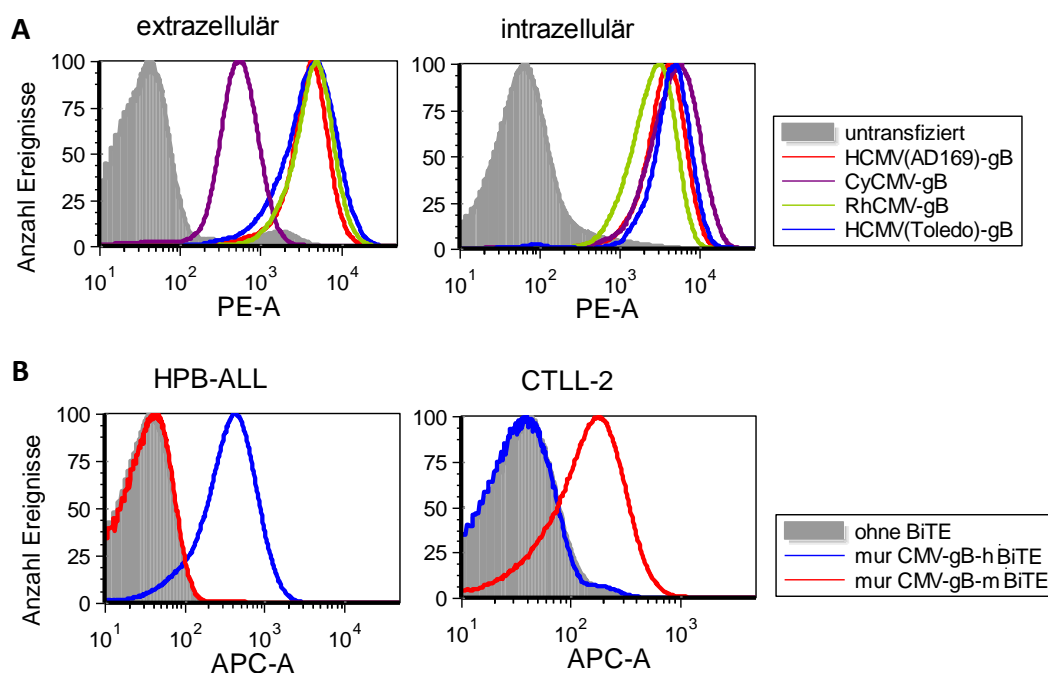
Zur Expression von CMV-gB wurden CHO-Zellen mit einem pEFDHFR-Vektor transfiziert, der die Sequenz für ein CMV-gB Fusionsprotein enthält. Die codierten Fusionsproteine bestehen aus den extrazellulären Domänen des CMV Glykoproteins B (Stämme HCMV AD169, HCMV Toledo, CyCMV, und RhCMV 68.1), die über einen SG<sub>4</sub>S-Linker mit der Transmembran- und intrazellulären Domäne von EpCAM (Aminosäuren 226-314; GenBank *accession number* NM\_002354) verknüpft sind.

Um die Expression der Fusionsproteine zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit anschließender Messung am Durchflusszytometer von transfizierten und permeabilisierten Zellen mit einem anti-EpCAM (C-Terminus) Antikörper durchgeführt. Der EpCAM C-Terminus ist bei allen vier CMV-gB x EpCAM Proteinen identisch und kann zur Überprüfung der Antigen-Expression, unabhängig von der Bindung des CMV-gB BiTE an CMV-gB, benutzt werden. Alle transfizierten Zellen weisen, im Unterschied zu untransfizierten permeabilisierten Zellen, deutliche Fluoreszenz-Signale auf (siehe Abbildung 26 A „intrazellulär“). Die Signale der beiden HCMV-gB Stämme sind ähnlich stark, das Signal der mit CyCMV-gB x EpCAM transfizierten Zellen ist im Vergleich etwas stärker, das der RhCMV-gB x EpCAM-Zellen etwas schwächer.

Zudem wurde eine Oberflächen-Färbung der gleichen Zellen, ohne vorherige Permeabilisierung, durchgeführt. Als Primär-Antikörper wurde der mur CMV-gB-h BiTE verwendet. Auch

hier sind im Durchflusszytometer bei allen transfizierten Zellen deutliche Signale zu erkennen, während untransfizierte Zellen kein Signal zeigen (siehe Abbildung 26 A „extrazellulär“). Obwohl bei der Färbung aller Zellen die gleichen Konzentrationen an BiTE und monoklonalem Antikörper eingesetzt wurden, ist das Signal der CyCMV-gB x EpCAM-Zellen deutlich schwächer, als das der anderen Transfektanten. CyCMV-gB x EpCAM-Zellen weisen allerdings bei der intrazellulären Färbung ein etwas stärkeres Signal auf, als die anderen Transfektanten. Die Zelloberflächen-Färbungen der verschiedenen CMV-gB exprimierenden CHO-Zellen wurde ebenfalls mit dem mur CMV-gB-m BiTE durchgeführt, welcher statt humanem CD3 murines CD3 bindet, und lieferte praktisch identische Ergebnisse (ohne Abbildung).

Um die Bindung der mur CMV-gB BiTE AKs an CD3 zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit BiTE als Primär-Antikörper auf den T-Zelllinien HPB-ALL (huCD3-positiv) und CTLL-2 (murCD3-positiv) durchgeführt und am Durchflusszytometer ausgewertet. mur CMV-gB-h BiTE bindet spezifisch an HPB-ALL-Zellen, mur CMV-gB-m BiTE an CTLL-2-Zellen (siehe Abbildung 26 B).



**Abbildung 26:** Durchflusszytometrische Messung intrazellulärer und extrazellulärer Immunfluoreszenz-Färbungen der verschiedenen CMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen und der T-Zell-Linien HPB-ALL und CTLL-2. **A:** Untransfizierte, mit HCMV(AD169)-, HCMV(Toledo)-, CyCMV- oder RhCMV-gB x EpCAM transfizierte CHO-Zellen wurden mit dem murinen CMV-gB-h BiTE als Primär-Antikörper gefärbt (extrazellulär), oder permeabilisiert und mit einem anti-EpCAM (C-Terminus) Primär-Antikörper gefärbt (intrazellulär). **B:** HPB-ALL-Zellen und CTLL-2-Zellen wurden jeweils mit mur CMV-gB-h BiTE und mur CMV-gB-m BiTE als Primär-Antikörper gefärbt. PE-A – PE-Fluoreszenz-Intensität; APC-A – APC-Fluoreszenz-Intensität.

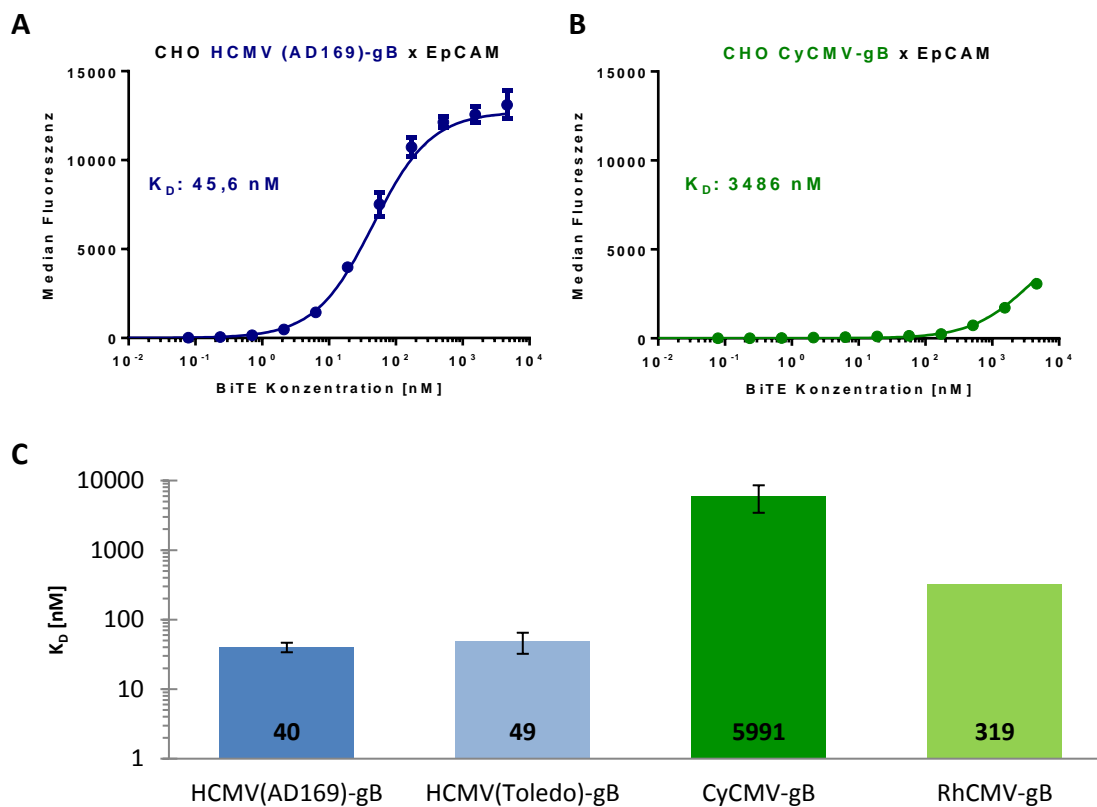
Da CyCMV-gB scheinbar vom mur CMV-gB BiTE schwächer gebunden wird, als HCMV- und RhCMV-gB, wurden die Sequenzen der AD-1 Domäne des Glykoproteins B der vier untersuchten Virus-Stämme verglichen. Die AD-1 Domäne wird von dem mur CMV-gB BiTE AK zugrunde liegenden parentalen Antikörper „27-287“ gebunden [147]. Sie unterscheidet sich zwischen den gB-Proteinen der beiden HCMV-Stämme (AD169 und Toledo) an 2 Positionen (siehe Abbildung 27) und ist damit zu 97,5 % identisch. Dieses Motiv, das auch die vermutliche Bindestelle des mur CMV-gB BiTE ist, ist beim Rhesus-CMV(68.1)-gB zu 78,5 % und beim Cynomolgus-CMV-gB zu 72,2 % identisch mit der HCMV(AD169)-gB-Sequenz.

		% identisch mit AD169
HCMV (AD169) –gB	SVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVFNFANSSYVQYQQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKI FIAGNSAYEYVDYLFKRM	100
HCMV (Toledo) –gB	SVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVFNFVNSSYVQYQQLGEDNEILLGNHRTEECQF PSLKI FIAGNSAYEYVDYLFKRM	97,5
RhCMV –gB	SVKVLRDMRTKEC-gVCYSRPVVLTYFKNSSHVQYQQLGEYNEILLGRHRTEACEYPSLKI YIAGNSSYEYVDYLYKRM	78,5
CyCMV –gB	TVQVMRDMHVRDGSGLCYSRPVVLFRFYNSSHVQYQQLGEHNEILLGRHRTEACEYPSLKI FIAGNTSYEYVGYIFKRQ	72,2

**Abbildung 27:** Alignment der 79 Aminosäuren umfassenden Sequenzen des Motivs der AD-1 Region von CMV-gB, das für die Bindung des parentalen murinen mAbs „27-287“ an HCMV-gB essentiell ist [147]. Von der HCMV(AD169)-gB-Sequenz abweichende Aminosäuren sind farblich markiert.

#### 4.2.3 Affinitäts-Bestimmung des mur CMV-gB BiTE

Um die Bindung des murinen CMV-gB BiTE an HCMV-, RhCMV-, und CyCMV-gB genauer zu charakterisieren, wurden Scatchard-Assays mit den entsprechenden transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen über Nacht mit verschiedenen BiTE Konzentrationen von bis zu 250 µg/ml (= 4625 nM) inkubiert und gebundene BiTE AKs über Alexa488-gekoppelte anti-His Fab-Fragmente detektiert. Zur Bestimmung der CMV-gB-Affinitäten des murinen CMV-gB BiTE wurde sowohl der mur CMV-gB-h BiTE, als auch der mur CMV-gB-m BiTE verwendet, da ein Einfluss des CD3-bindenden Anteils auf die Bindung an CMV-gB nicht festgestellt werden konnte. Wie in Abbildung 28 A zu erkennen ist, stellt sich für die Bindung an HCMV(AD169)-gB auch nach einer Inkubation über Nacht erst bei relativ hohen BiTE Konzentrationen ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation ein, zu erkennen an der in hohen Konzentrationen flacher werdenden Kurve. Auf CyCMV-gB-exprimierenden Zellen stellt sich bei gleichen BiTE Konzentrationen und selber Inkubations-Zeit kein Gleichgewicht ein (siehe Abbildung 28 B). Die Mittelwerte der Dissoziationskonstanten des mur CMV-gB BiTE liegen bei 40 nM (SD = 6,3) für die Bindung an HCMV(AD169)-gB und bei 5991 nM (SD = 2553) für die Bindung an CyCMV-gB (siehe Abbildung 28 C). CyCMV-gB wird damit etwa 150-fach schwächer gebunden, als HCMV(AD169)-gB. Das HCMV-gB des Stamms Toledo wird mit einem  $K_D$ -Wert von 49 nM (SD = 16,3) ähnlich stark gebunden, wie das Glykoprotein B des HCMV-Stamms AD169. Die Bindung an RhCMV-gB ist mit einem  $K_D$ -Wert von 319 nM etwa 6,5- bis 8-fach schwächer, als die Bindung an HCMV-gB.

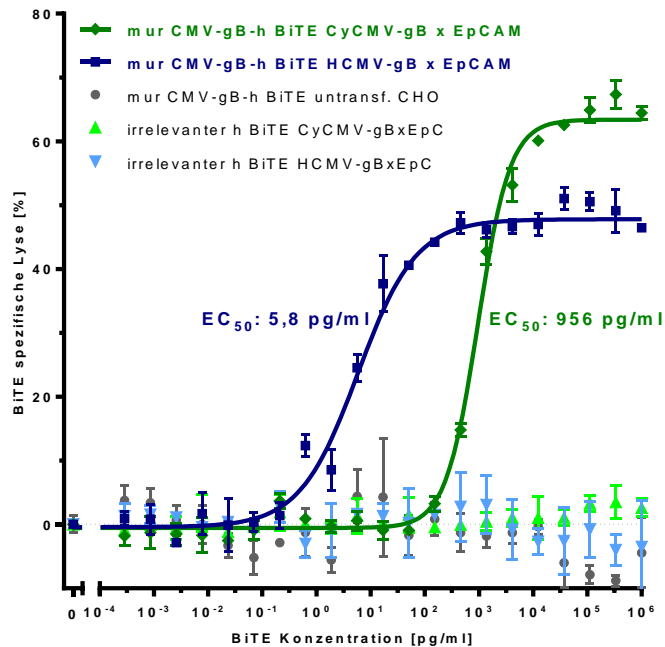


**Abbildung 28:** Affinitäts-Bestimmung des mur CMV-gB BiTE auf CHO-Zellen, welche das Glykoprotein B des HCMV-Stamms AD169 bzw. Toledo oder von CyCMV oder RhCMV auf der Zelloberfläche tragen. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit unterschiedlichen BiTE Konzentrationen inkubiert; anschließend wurden gebundene BiTE AKs über anti-His-Fab x Alexa488-Fragmente detektiert. **A, B:** repräsentative Kurven von Scatchard-Assays auf HCMV(AD169)- bzw. CyCMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen. Der  $K_D$ -Wert wird in dieser Darstellung durch den Wendepunkt der Kurve bestimmt. Auf CyCMV-gB-Zellen wird auch bei hohen Konzentrationen keine Sättigung erreicht, der berechnete  $K_D$ -Wert ist somit nur eine grobe Annäherung. **C:** Mittelwerte der mur CMV-gB BiTE Affinitäten ( $\pm$  SD) auf HCMV(AD169)- und CyCMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen aus 3 unabhängigen Assays ( $n = 3$ ), und  $K_D$ -Werte der Bindungen an HCMV(Toledo)-gB ( $n = 2$ ) und RhCMV-gB ( $n = 1$ ).

#### 4.2.4 CMV-gB exprimierende Zellen können BiTE vermittelt lysiert werden

Um zu überprüfen, ob die CMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen, die von mur CMV-gB-h BiTE gebunden werden können, mit diesem auch spezifisch lysiert werden können, wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. Hierfür wurden die transfizierten CHO-Zellen (*Targets*) in einem E:T-Verhältnis von 10:1 mit stimulierten humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Effektoren) und unterschiedlichen BiTE AK-Konzentrationen 21 h inkubiert. Sowohl HCMV(AD169)-gB- als auch CyCMV-gB-positive CHO-Zellen werden mit mur CMV-gB-h BiTE spezifisch lysiert (siehe Abbildung 29). Die  $EC_{50}$ -Werte unterscheiden sich aber deutlich und

liegen für die HCMV-gB-positiven Zellen bei 5,8 pg/ml und für CyCMV-gB-positive Zellen bei 956 pg/ml.

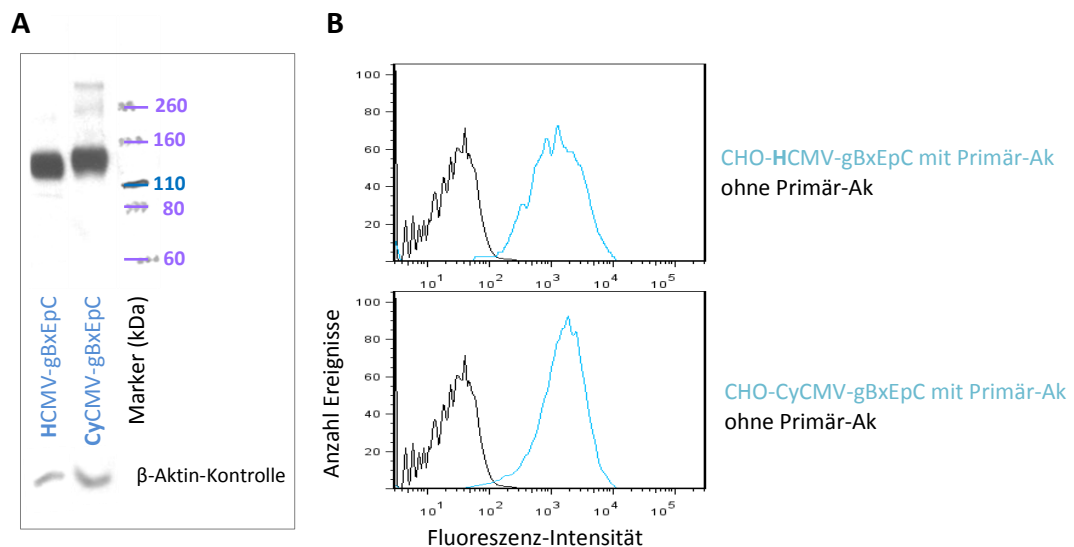


**Abbildung 29:** Zytotoxische Aktivität des mur CMV-gB-h BiTE auf HCMV(AD169)-gB x EpCAM und CyCMV-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen. Sowohl HCMV-gB- als auch CyCMV-gB-positive Zellen werden mit Hilfe des mur CMV-gB-h BiTE durch die eingesetzten humanen stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch lysiert. Der EC<sub>50</sub>-Wert liegt für HCMV-gB-positive Zellen nach 21 h bei 5,8 pg/ml, für CyCMV-gB-positive Zellen bei 956 pg/ml. Bei Inkubation mit einem irrelevanten h BiTE werden die Zellen nicht lysiert. Auch untransfizierte CHO-Zellen, die mit mur CMV-gB-h BiTE und CD8<sup>+</sup> T-Zellen inkubiert werden, werden nicht lysiert.

Um zu überprüfen, ob eine schwächere Expression von CyCMV-gB x EpCAM im Vergleich zu HCMV-gB x EpCAM auf den transfizierten CHO-Zellen für den Unterschied in den EC<sub>50</sub>-Werten verantwortlich ist, wurden Zell-Lysate der HCMV(AD169)- und CyCMV-gB x EpCAM exprimierenden Zellen im Western-Blot mittels eines anti-EpCAM (C-Terminus) Antikörpers auf das Vorhandensein von CMV-gB x EpCAM untersucht (siehe Abbildung 30 A). Die Lysate beider Zelllinien weisen spezifische, vergleichbar starke Banden auf, deren Molekulargewicht vermutlich mit der stark glykosylierten Form des gB x EpCAM Fusionsproteins übereinstimmt (theoretische Größe ohne Glykosylierungen: ca. 85 kDa). Unter Einbeziehung der  $\beta$ -Aktin-Kontrolle kann davon ausgegangen werden, dass das CyCMV-gB x EpCAM-Konstrukt etwas schwächer exprimiert wird, als das HCMV-gB-Fusionsprotein. Außerdem wurden HCMV(AD169)- und CyCMV-gB x EpCAM-exprimierende CHO-Zellen fixiert, permeabilisiert und der intrazelluläre Anteil des EpCAM-Fusionsproteins mit dem gleichen anti-EpCAM (C-Terminus) Antikörper in einem weiteren FACS-Assay detektiert. Das Fluoreszenz-Signal der CyCMV-gB x EpCAM-exprimierenden Zellen ist auch hier etwas stärker (siehe Abbildung 30 B,



vgl. auch Abbildung 26 A). Unter der Annahme, dass bei beiden Zelllinien das detektierte Antigen auch in gleichem Umfang auf der Oberfläche exprimieren, wie es intrazellulär nachweisbar ist, unterscheidet sich die Antigen-Anzahl auf der Zell-Oberfläche nur wenig.



**Abbildung 30:** Anti-EpCAM (C-Terminus) Färbungen von HCMV-/CyCMV-gB x EpCAM Zell-Lysaten im Western-Blot und in permeabilisierten Zellen in einem FACS-Assay. **A:** Zell-Lysate von HCMV- oder CyCMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Fusionsproteine mittels eines anti-EpCAM (C-Terminus) Antikörpers detektiert. **B:** HCMV-gB x EpCAM- und CyCMV-gB x EpCAM-Zellen wurden in einem FACS-Assay zunächst fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit dem anti-EpCAM-C-Terminus Antikörper und einem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper gefärbt.

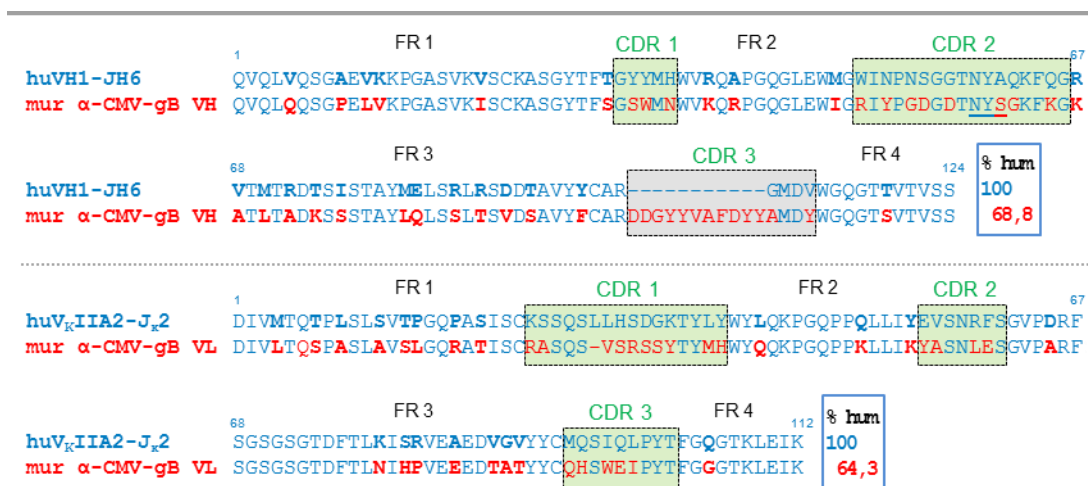
## 4.2.5 Human-like Engineering

Um die Aminosäure-Sequenz des CMV-gB-Binders der humanen Keimbahn-Sequenz anzugleichen und damit die Wahrscheinlichkeit der Immunogenität im Menschen zu verringern, sollte, wie schon für den Influenza A M2e-spezifischen Binder, eine Anpassung durch ein *human-like engineering* durchgeführt werden.

### 4.2.5.1 Library-Aufbau und Panning

Zunächst wurde ein Alignment der Aminosäure-Sequenzen der VH und VL des murine CMV-gB BiTE mit den humanen  $V_H$ -,  $V_K$ - und  $V_L$ -Keimbahn-Sequenzen durchgeführt. Wie in Abbildung 31 zu sehen, ist die murine anti-CMV-gB VH-Sequenz der humanen Sequenz von VH1-JH6 mit 68,8 % identischen Aminosäuren am ähnlichsten. Die murine anti-CMV-gB VL ist mit der humanen  $V_{KIIA2-JK2}$ -Sequenz zu 64,3 % identisch.

Um die Aminosäure-Sequenzen der FR-Regionen der murinen VH und VL an die humanen Sequenzen anzugleichen, wurden *Wobble*-Primer entworfen, die an den Stellen, die die anzugleichenden Aminosäuren kodieren, jeweils zu 90 % die Basen enthalten, die für die Aminosäure der humanen Sequenz erforderlich sind und zu 10 % die Basen, die für die Aminosäure der murinen Sequenz benötigt werden. Im Bereich der CDR2 der murinen VH ist außerdem eine N-Glykosylierungsstelle (NYS) vorhanden. Diese sollte mit dem entsprechenden *Wobble*-Primer durch einen Austausch des Serins gegen eine zufällige Aminosäure entfernt werden, während alle übrigen Bereiche in den CDR-Regionen unverändert blieben. Nach der PCR-Fusion der *Wobble*-Primer und weiterer Amplifikation der VH- bzw. VL-kodierenden DNA-Sequenzen wurde der so entstandene *human-like* VH *Pool* in den Phagemid pComb5BHis/N2, der bereits die vorklonierte murine VL enthielt, kloniert. Der *human-like* VL *Pool* wurde entsprechend in den Phagemid mit der vorklonierten murinen VH kloniert. Aus den zwei so entstandenen „halb *human-like*“ *Libraries* wurden dann über Phage Display-*Panning* auf einem HCMV-gB Fusionsprotein Sequenzen isoliert, die funktionelle CMV-gB-Binder codieren.



**Abbildung 31:** Alignment der Aminosäure-Sequenzen der anti-CMV-gB VH und VL mit der jeweils am nächsten verwandten humanen Keimbahn-Sequenz. Die anti-CMV-gB VH-Sequenz ist zu 68,8 % identisch mit der ähnlichsten humanen Keimbahn-Sequenz, die anti-CMV-gB VL-Sequenz zu 64,3 %. Die CDR-Regionen sind grün hinterlegt. Die VH CDR 3 Region ist grau hinterlegt, da sie aufgrund ihrer sehr hohen Variabilität nicht in die Berechnung der humanen Identität mit einbezogen wird. Die fett gedruckten Aminosäuren in den Framework (FR)-Regionen sind die Positionen, an denen sich die murinen und die humanen Sequenzen unterscheiden und die im Zuge des *human-like engineering* durch die humanen Aminosäuren ersetzt werden sollten.

#### 4.2.5.2 Screening und Charakterisierung der halb *human-like* scFv-Moleküle

Nach dem Umklonieren der aus dem Phage Display-Prozess erhaltenen halb *human-like* VH-VL-Sequenzen in einen Expressionsvektor und der Transformation in Bakterien wurden einzelne Bakterien-Kolonien gepickt und die periplasmatische scFv-Expression durch IPTG induziert. Nach der Lyse der Bakterien wurden die Lysate in einem FACS-Assay auf Bindung

an HCMV-gB x EpCAM exprimierende CHO-Zellen getestet. Positive Klone wurden zudem auf Bindung an untransfizierte CHO-Zellen getestet. Je *Library* wurden 184 Klone getestet. Von den *human-like* VH-Klonen wurden die 13 Klone, welche die stärksten Signale im FACS-Assay auf CHO-HCMV(AD169)-gB x EpCAM-Zellen und keine Bindung an untransfizierte CHO-Zellen aufwiesen, sequenziert. Von den *human-like* VL-Klonen, die starke Signale im FACS-Assay aufwiesen, wurden die 30 stärksten sequenziert. Die mit den *human-like* VL-Klonen erreichten Signale im FACS-Assay waren fast alle deutlich stärker, als die mit den *human-like* VH-Klonen erreichten. Außerdem wies von den Lysaten aller untersuchten Klone der beiden *Libraries* bei den *human-like* VL-Klonen ein größerer Anteil eine Bindung an CMV-gB auf (47 %), als bei den *human-like* VH-Klonen (18 %). Keiner der CMV-gB-bindenden Klone zeigte eine Bindung auf untransfizierten CHO-Zellen.

Die erhaltenen *human-like* VH- und *human-like* VL-Sequenzen sind in Abbildung 32 zu sehen. Für die VH des CMV-gB-Binders konnte die humane Identität von 68,8 % beim murinen Binder auf 84,4 - 87,2 % bei den *human-like* VH-Sequenzen gesteigert werden. Für die VL wurde eine Steigerung von 64,3 % auf 77,5 - 78,4 % humane Identität erreicht. Mit Ausnahme von zwei Klonen enthält die CDR 2 der VH keine N- Glykosylierungsstelle mehr. In der FR 2 der VL sind zwei Lysine vorhanden, die in keiner der 4 Sequenzen durch die jeweilige humane Aminosäure ersetzt wurden. An den variablen Positionen ist aber bei einem Großteil, teilweise sogar bei allen Klonen, die jeweilige humane Aminosäure zu finden, zum Teil aber auch eine fremde Aminosäure, die durch ein „wobble-Basen-Triplet“ alternativ entstehen kann.

#### 4.2.5.3 Generierung und Charakterisierung von *human-like* scFv-Molekülen

Im Unterschied zum *human-like engineering* der anti-Influenza A-M2e-Sequenzen sollten für die CMV-gB-Binder bereits auf der Ebene der scFv-Moleküle die humVH-humVL-Kombinationen gefunden werden, die die besten Bindungseigenschaften besitzen, um möglichst stabile und affine BiTE AKs zu erhalten. Hierzu wurden die *human-like* VH-Sequenzen aller in Abbildung 32 aufgeführter Klone ohne N-Glykosylierungsstelle (n=9) aus dem Expressionsvektor herausgeschnitten und zu gleichen Mengen gepoolt. Diese *Pool* von *human-like* VH-Sequenzen wurde in die mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektoren ligiert, die die *human-like* VL-Sequenzen mit den höchsten humanen Identitäten enthielten, bzw. die laut FACS-Assay stärkste Bindung im halb *human-like* Format aufwiesen. Nach einer Transformation in *E. coli* (TG-1) und periplasmatischer Expression wurden die Lysate mit den *human-like* scFvs auf Bindung an HCMV(AD169)-, und CyCMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen getestet. Die neun Klone je *human-like* VL, die im FACS-Assay die stärksten Signale lieferten, wurden sequenziert. Insgesamt wurden so 16 verschiedene humVH-humVL- Klone identifiziert (siehe Tabelle 7). In diesen Klonen, die die stärksten FACS-Signale liefern, sind sieben der neun verschiedenen eingesetzten *human-like* VH-Sequenzen und alle vier eingesetzten *human-like* VL-Sequenzen vertreten. Die höchste erreichte humane Identität der *human-like*

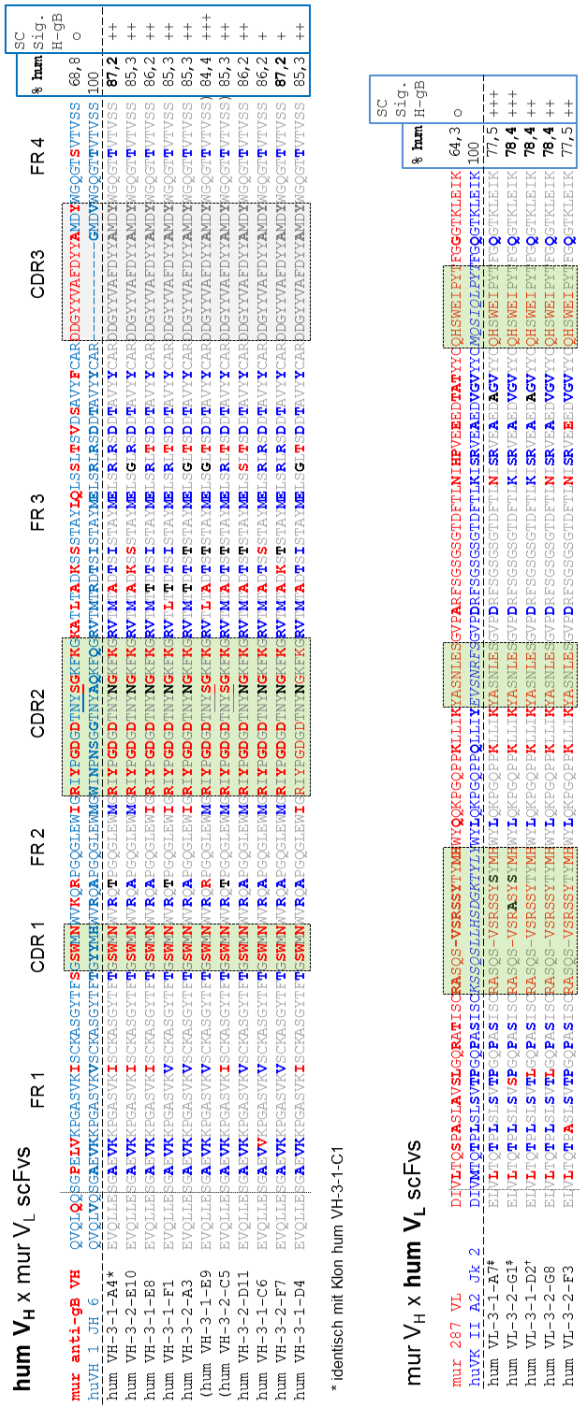
scFvs liegt bei 82,7 %. Dies ist zugleich die höchst mögliche erreichbare humane Identität bei Kombination der verwendeten *human-like* VH- und *human-like* VL-Sequenzen.

**Tabelle 7:** *Human-like* anti-CMV-gB scFv-Moleküle: hum VH x hum VL Kombinationen. Aufgelistet sind die 16 Sequenz-Varianten, die aus der Sequenzierung der 36 *human-like* scFv-Klone, mit denen die stärksten Fluoreszenz-Signale in einem FACS-Assay auf HCMV-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen gemessen wurden, erhalten wurden, sowie die dazugehörigen Fluoreszenz-Signale auf HCMV(AD169)- und CyCMV-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen. Alle Varianten liefern auf CyCMV-gB-Zellen deutlich schwächere Signale, als auf HCMV-gB-Zellen. Die höchste erreichte humane Identität liegt bei 82,7 % (Variante 16).

Variante Nr.	humVH x humVL-Kombination	humane Identität (%)	Fluoreszenz-Signal auf HCMV-gB	Fluoreszenz-Signal auf CyCMV-gB
1	VH-3-1-D4 x VL-3-1-D2	81,8	6118	865
2	VH-3-1-D4 x VL-3-2-G8	81,8	6211	675
3	VH-3-1-E8 x VL-3-1-A7	81,8	7099	870
4	VH-3-1-F1 x VL-3-1-A7	81,4	6223	677
5	VH-3-1-F1 x VL-3-2-G1	81,8	6195	873
6	VH-3-2-A3 x VL-3-1-A7	81,4	6538	849
7	VH-3-2-A3 x VL-3-1-D2	81,8	5380	819
8	VH-3-2-A3 x VL-3-2-G1	81,8	7823	958
9	VH-3-2-D11 x VL-3-1-D2	82,3	4913	806
10	VH-3-2-D11 x VL-3-2-G8	82,3	5523	670
11	VH-3-2-E10 x VL-3-1-A7	81,4	8589	861
12	VH-3-2-E10 x VL-3-1-D2	81,8	5772	755
13	VH-3-2-E10 x VL-3-2-G1	81,8	7497	632
14	VH-3-2-E10 x VL-3-2-G8	81,8	6210	615
15	VH-3-2-F7 x VL-3-1-A7	82,3	8011	678
16	VH-3-2-F7 x VL-3-2-G1	82,7	7943	684

#### 4.2.5.4 Weiteres *human-like* engineering der VL

Die maximal erreichte humane Identität der *human-like* scFv-Moleküle liegt bei 82,7 %. Es wurde jedoch ein Wert von mindestens 85 % angestrebt. Daher sollte durch ein weiteres *human-like* engineering die Aminosäure-Sequenz der anti-CMV-gB VL der humanen Keimbahn-Sequenz noch weiter angenähert werden. Dies sollte durch Austausch einzelner Aminosäuren in der CDR 1 und CDR 2 der *human-like* VL geschehen. Als Grundlage für das *human-like* engineering der VL-CDR Regionen diene die *human-like* VL-3-2-G1. Für das Phage Display wurde sie in Kombination mit der *human-like* VH-3-2-F7 eingesetzt. Diese Kombination weist die höchste humane Identität auf, und gehört zu den *human-like* scFvs mit den stärksten Signalen im FACS-Assay auf HCMV(AD169)-gB x EpCAM exprimierenden CHO-Zellen (vgl. Tabelle 7, Variante 16). Um einzelne veränderte Aminosäuren in die Sequenzen einzufügen wurden Primer entworfen, die *wobble*-Positionen enthielten, die in der CDR 1 und CDR 2 der VL an insgesamt sieben Positionen jeweils zu 75 % für die humane Aminosäure und zu 25 % für die ursprüngliche Aminosäure der VL-3-2-G1 codieren.



\* identisch mit Klon hum VH-3-1-C1  
 \* identisch mit Klon hum VL-3-1-B11, -1-C7, -1-F10, -1-H7, -2-A6, -2-A8, -2-E11, -1-D8, -1-D1, -1-D3, -1-D8, -1-E7, -1-G4, -1-H8, -2-A5, -2-B10, -2-E10, -2-G5  
 \* identisch mit Klon hum VL-3-1-B7, -1-C6, -1-D6, -2-A9, -2-B9, -2-D1  
 † identisch mit Klon hum VL-3-2-D9

**Abbildung 32:** Alignment aller anti-CMV-gB human-like VH- und human-like VL-Sequenzen der insgesamt 43 sequenzierten halb human-like anti-CMV-gB scFv-Klone nach der *in vitro*-Selektion. Die fettgedruckten farbigen Buchstaben in den Framework (FR)-Regionen stellen die Aminosäuren dar, die durch das human-like engineering hin zur Aminosäure der humanen Keimbahn verändert werden sollten. Alle Aminosäuren, die der murinen Sequenz entsprechen sind rot dargestellt, blaue Aminosäuren entsprechen der humanen Keimbahn-Sequenz, schwarze Aminosäuren stellen einen Fremd-Austausch dar. Die Regionen vor der vertikalen gestrichelten Linie werden für die Berechnung der humanen Identität (% hum) nicht berücksichtigt, da sie bei der Konvertierung ins BiTE Format durch die humane Sequenz ersetzt werden. SC Sig. H-gB: Stärke des Fluoreszenz-Signals des jeweiligen scFv-Klons auf CHO-HCMV(AD169)-gB x EpCAM-Zellen.

Außerdem wurde das Leucin an Position 4 der VL durch das der Keimbahn-Sequenz entsprechende Methionin ersetzt und das Serin an Position 14 wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % durch ein Threonin ersetzt. Ebenso wurde das Alanin an Position 32 der *human-like* VL mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % durch die ursprüngliche murine Aminosäure (Serin) ersetzt. Der durch Primer-Fusion erhaltene VL-Pool wurde in einen Phagemid kloniert, in dem die VH-3-2-F7 bereits vorkloniert war.

Im Phage Display wurde ein alternierendes *Panning* durchgeführt, bei dem in den 4 Selektions-Runden abwechselnd auf die Bindung an HCMV(AD169)-gB und CyCMV-gB selektioniert wurde. Dadurch sollten scFv-Varianten identifiziert werden, deren Bindung an HCMV-gB und CyCMV-gB sich weniger stark unterscheidet, als bei den *human-like* anti-CMV-gB-scFvs 1-16 (vgl. Tabelle 7).

Ein großer Teil der aus dem VL-CDR *human-like engineering* resultierenden Klone (184 im Screening untersucht) lieferte im FACS-Assay starke Signal, die teilweise stärker waren, als die mit dem parentalen scFv erzielten Signale. Die 19 Klone mit den stärksten Signalen wurden sequenziert. Die resultierenden VL-Sequenzen sind in Abbildung 33 zu sehen. Die erhaltenen 15 unterschiedlichen VL-Varianten weisen zwischen 82,9 % und 85,6 % Identität zur humanen Keimbahn auf (% hum). Die Aminosäuren, die im Rahmen des CDR *human-like engineering* geändert werden sollten, sind in der parentalen H3-2-F7 x L3-2-G1 Sequenz unterstrichen. Acht Positionen wurden zum Großteil hin zur humanen Sequenz verändert, sechs davon in den CDRs 1 und 2. Das Alanin, das durch das erste *human-like engineering* als Fremd-Austausch in die CDR 1 eingefügt wurde, wurde bei vielen Klonen wieder hin zur murinen Aminosäure (Serin) verändert. Die Bindung an HCMV-gB, abgeleitet aus den FACS-Signalen (Bind.), ist bei den neuen Klonen mindestens gleich stark, wie beim parentalen *human-like* scFv (VH-3-2-F7 x VL-3-2-G1; „+“). Teilweise ist das Signal etwas stärker; dies wird durch die Bewertung „+(+)“ angezeigt.

#### 4.2.5.5 Generierung neuer *human-like anti-CMV-gB scFv-Moleküle*

Um eine möglichst hohe Sequenz-Diversität zu erhalten und daraus die besten *human-like* anti-CMV-gB-Binder zu identifizieren, wurden erneut *human-like* scFvs generiert. Das Vorgehen war gleich, wie in Abschnitt 4.2.5.3 beschrieben. Diesmal wurden aber alle 11 *human-like* VH-Sequenzen aus dem ersten *human-like engineering* (vgl. Abbildung 32) mit allen *human-like* VL-Sequenzen aus dem zweiten *human-like engineering* (vgl. Abbildung 33) kombiniert. Nach periplasmatischer Expression in *E. coli* und anschließender Periplasma-Präparation wurden die Lysate der Einzel-Klone auf ihre Bindung an CHO-HCMV(AD169)-gB x EpCAM-Zellen untersucht. Die 44 Klone, die die stärksten FACS-Signale zeigten, wurden sequenziert. Von den sequenzierten Klonen wurden diejenigen, deren humane Identität bei mindestens 85 % lag (VH + VL), für die genauere Charakterisierung ausgewählt. Die VH-VL-Kombinationen dieser Varianten sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die angegebenen *human-like* VH-Sequenzen sind in Abbildung 32 zu finden, die *human-like* VL-Sequenzen in Abbildung 33.

	% hum.	Bind.
huVK II A2 Jk 2	100	
mur 287 VL	64,3	o
H3-2-F7 x I3-2-G1	78,4	+
287-1-13-4-1-E1	82,9	+
287-1-13-4-1-A3	83,8	+
287-1-13-4-1-E7	83,8	+
287-1-13-4-1-H1	83,8	+(+)
287-1-13-4-1-A11	84,7	+
287-1-13-4-1-G1	84,7	+
287-1-13-4-1-A1	84,7	+
287-1-13-4-1-F1	85,6	+
287-1-13-4-2-B1	82,9	+(+)
287-1-13-4-2-A12	84,7	+(+)
287-1-13-4-2-A6	83,8	+(+)
287-1-13-4-2-H2	83,8	+
287-1-13-4-2-B10	84,7	+(+)
287-1-13-4-2-D8	83,8	+(+)
287-1-13-4-2-E12	85,6	+(+)

Abbildung 33: Alignment der aus dem CDR *human-like engineering* erhaltenen anti-CMV-gB scFv VL-Sequenzen. Farbgebung wie in Abbildung 32.

Von den scFv-Varianten 1-18 wurden jeweils die  $k_{\text{off}}$ -Werte mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Biacore) sowie  $TS_{50}$ -Werte in einem FACS-basierten Assay bestimmt und jeweils ein *Ranking* erstellt (vgl. auch Ergebnis-Teil Influenza A M2e BiTE). Als weiteres Kriterium wurde jeweils der Faktor (FACS-Signal auf HCMV(AD169)-gB x EpCAM / FACS-Signal auf HCMV(Toledo)-gB x EpCAM) bestimmt. Je kleiner dieser Faktor ist, desto ähnlicher ist die Bindung der scFvs auf den gB-Molekülen der beiden Stämme. Das vierte Kriterium zur Bewertung der scFv-Moleküle war die humane Identität der jeweiligen VH-VL-Kombination. Die Werte und die dazugehörigen *Rankings* sind in Tabelle 9 zu finden.

**Tabelle 8:** *Human-like* anti-CMV-gB scFv Moleküle mit humaner Identität  $\geq 85\%$ . Die Sequenzen der *human-like* VHs sind in Abbildung 32 zu finden, die der *human-like* VLs in Abbildung 33.

Variante	hum VH	hum VL
1	3-2-F7	4-1-A1
2	3-2-F7	4-1-A3
3	3-1-A4	4-1-A3
4	3-2-E10	4-1-A11
5	3-2-F7	4-1-A11
6	3-2-F7	4-1-E1
7	3-1-C6	4-1-E1
8	3-2-F7	4-1-E7
9	3-2-A3	4-1-F1
10	3-2-A3	4-1-G1
11	3-2-F7	4-1-H1
12	3-2-F7	4-2-A6
13	3-2-F7	4-2-A12
14	3-2-F7	4-2-B1
15	3-2-F7	4-2-B10
16	3-2-F7	4-2-D8
17	3-2-F7	4-2-E12
18	3-2-F7	4-2-H2

Die erreichten humanen Identitäten der Binder liegen zwischen 85,0 und 86,4 %. Die  $k_{\text{off}}$ -Werte der *human-like* scFv-Varianten reichen von  $1 \times 10^{-5}$  bis  $4,8 \times 10^{-4}$  /s und die FACS-Signale sind auf CHO-HCMV(AD169)-gB x EpCAM-Zellen zwischen 2,1- und 3,4-fach höher, als auf CHO-HCMV(Toledo)-gB x EpCAM-Zellen. Die  $TS_{50}$ -Werte liegen im Bereich von 44-54 °C. Da diese erfahrungsgemäß bei scFvs meist höher liegen, wurde dieser Wert als Ausschluss-Kriterium verwendet. Die Auswahl der acht *human-like* CMV-gB-Binder, die ins BiTE Format überführt werden sollten, erfolgte anhand der Gesamt-Platzierung. Es wurden jedoch nur scFv-Moleküle mit  $TS_{50}$ -Werten über 50 °C berücksichtigt. Da die FACS-Signale aller 18 *human-like* scFv-Varianten auf CyCMV-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen, ähnlich wie in Abschnitt 4.2.5.3 beschrieben, weiterhin sehr deutlich unterhalb der Signale auf HCMV-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen lagen, wurden die CyCMV-gB-Bindungseigenschaften für die Auswahl nicht berücksichtigt.



Für das BiTE Format ausgewählt wurden somit die Varianten 2, 3, 6, 7, 9, 12, 15 und 16.

**Tabelle 9:** Übersicht über die Charakteristika der *human-like* anti-CMV-gB scFv-Moleküle. Der jeweils beste Wert einer Kategorie ist fett gedruckt,  $TS_{50}$ -Werte unter 50 °C, die zum Ausschluss der Variante führen, sind rot eingefärbt. Der Angegebene Rang bezieht sich jeweils auf die Werte links davon. Der Gesamt-Rang entsteht durch ein Ranking der Summen aller Ränge der Varianten, wobei jedes Kriterium gleich gewichtet wurde.

Variante Nr.	humane Identität [%]	Rang	$k_d$ [1/s]	Rang	$TS_{50}$ [°C]	Rang	FACS Signal (Faktor AD169/Toledo)	Rang	Rang (gesamt)
1	85,9	2	<b>1,00E-05</b>	1	45	16	2,6	6	5
2	85,5	8	<b>1,00E-05</b>	1	52	5	2,2	3	1
3	85,5	8	2,00E-04	11	53	3	<b>2,1</b>	2	3
4	85,0	13	4,80E-04	12	48	12	2,4	4	13
5	85,9	2	1,10E-04	9	44	17	3,1	15	16
6	85,0	13	6,10E-05	6	52	5	2,7	9	10
7	85,0	13	<b>1,10E-05</b>	1	52	5	3,2	18	12
8	85,5	8	1,30E-04	10	52	5	3,4	19	15
9	85,5	8	8,70E-05	8	<b>54</b>	1	3,0	13	7
10	85,0	13	1,10E-04	9	50	10	2,9	12	17
11	85,0	13	2,80E-05	2	46	15	3,0	11	13
12	85,9	2	1,10E-04	9	53	3	2,5	5	2
13	85,9	2	4,90E-05	3	47	13	2,6	6	3
14	85,0	13	8,70E-05	8	44	17	2,6	6	17
15	85,9	2	1,10E-04	9	52	5	3,1	15	9
16	85,5	8	1,10E-04	9	<b>54</b>	1	3,1	15	10
17	<b>86,4</b>	1	6,20E-05	7	47	13	2,7	9	7
18	85,9	2	5,90E-05	5	49	11	2,7	9	6
mur	67,3		n/a		43		2,0		

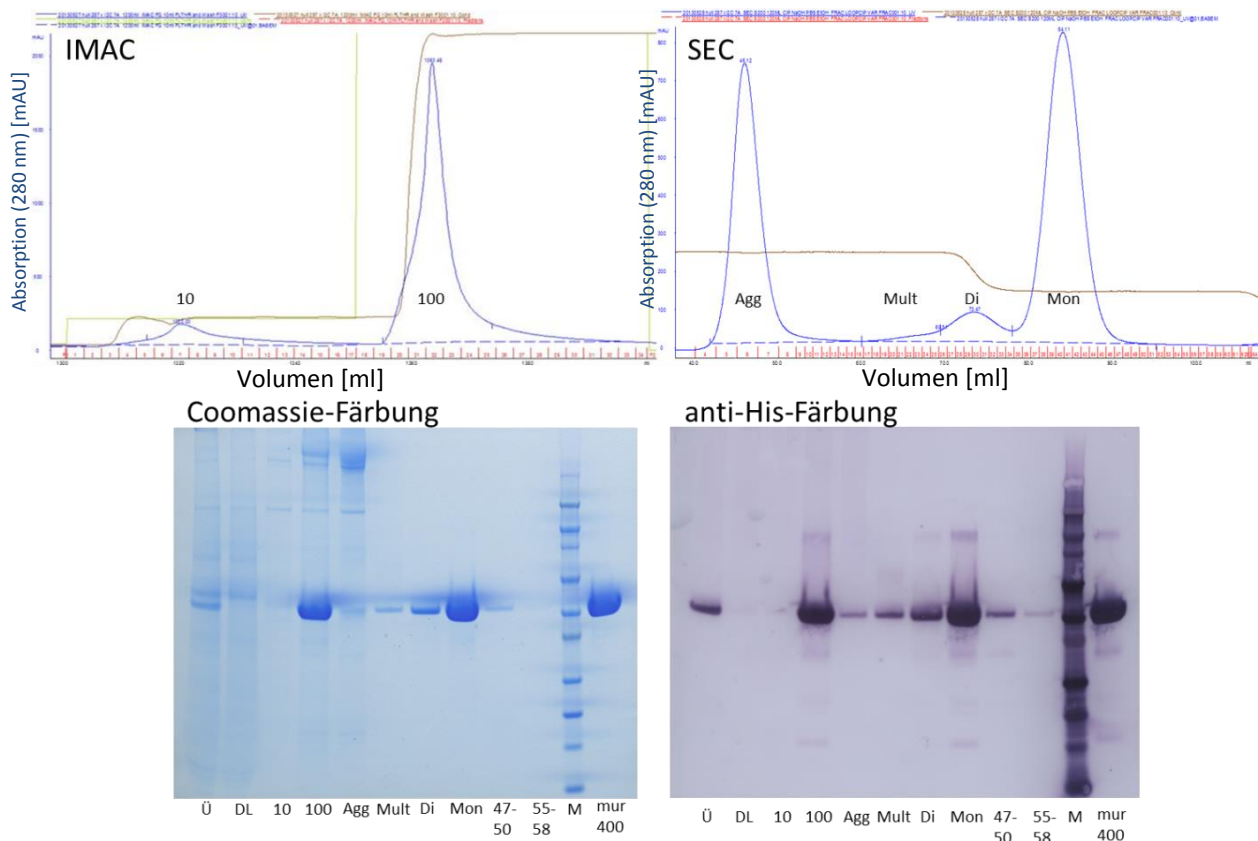
#### 4.2.6 Generierung und Charakterisierung von human-like CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukten und Selektion der favorisierten Varianten

Die VH-Sequenzen der *human-like* CMV-gB-Binder wurden jeweils über PCR-Fusion mit den dazugehörigen VL-Sequenzen kombiniert. Dabei wurden die für die in Abbildung 32 und Abbildung 33 vor den gestrichelten Linien liegenden Aminosäuren kodierenden Basen-Triplets durch Triplets ersetzt, die die jeweilige humane Aminosäure kodieren. Diese *human-like* anti-CMV-gB-Sequenzen wurden in einen Vektor kloniert, in dem bereits die anti-huCD3 scFv-Sequenz vorkloniert war und die jeweils entstandenen Sequenzen wurden verifiziert.

Mit jeder Variante wurde eine Transfektion von CHO<sup>DHFR</sup>-Zellen durchgeführt. Stabile Transfektanten wurden in der ersten Amplifikationsstufe (Medium mit 20 nM Methotrexat) kultiviert. Ein bis 1,5 Liter Zellkultur-Überstand je BiTE Variante wurde gesammelt und daraus über IMAC und anschließende SEC das BiTE Monomer aufgereinigt. Die IMAC- und SEC-Kurven, sowie das Analyse-Gel (Coomassie-Färbung) und der dazugehörige Western-Blot (anti-His-Färbung) einer exemplarischen Aufreinigung eines *human-like* CMV-gB BiTE AKs sind in Abbildung 34 zu sehen. In der SEC ist ein deutlicher Aggregations-Peak (Agg) zu sehen, der aber, wie in den Coomassie- und anti-His-Färbungen zu erkennen, nur wenig BiTE enthält. Dieser Peak wird gefolgt von einem schwachen Peak (Mult), der vermutlich BiTE Multimer enthält, und von einem Dimer-Peak (Di), der deutlich vom Monomer-Peak (Mon) abgesetzt ist. In der anti-His-Färbung sind in der Monomer-Fraktion mehrere Banden zu erkennen, die ein höheres oder niedrigeres Molekular-Gewicht als die Haupt-Bande aufweisen. Diese Produkte sind jedoch in so geringen Mengen vorhanden, dass sie im Coomassie-gefärbten Gel praktisch nicht zu erkennen sind. Das Banden-Muster des *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs in der anti-His-Färbung gleicht dem des murinen CMV-gB-h BiTE (mur 400). Die Aufreinigungen der anderen *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs weisen vergleichbare Ergebnisse auf. Lediglich die Protein-Konzentrationen und die Monomer-Gesamtausbeuten unterscheiden sich teilweise deutlich (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Protein-Konzentrationen und erhaltene Gesamtmengen der Monomer-Fractionen aller *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs.

BiTE Variante	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Gesamtmenge [mg]
hum CMV-gB-h BiTE 2	136	1,15
hum CMV-gB-h BiTE 3	177	1,47
hum CMV-gB-h BiTE 6	45	0,27
hum CMV-gB-h BiTE 7	410	3,96
hum CMV-gB-h BiTE 9	271	2,29
hum CMV-gB-h BiTE 12	341	3,27
hum CMV-gB-h BiTE 15	584	5,61
hum CMV-gB-h BiTE 16	69	0,50

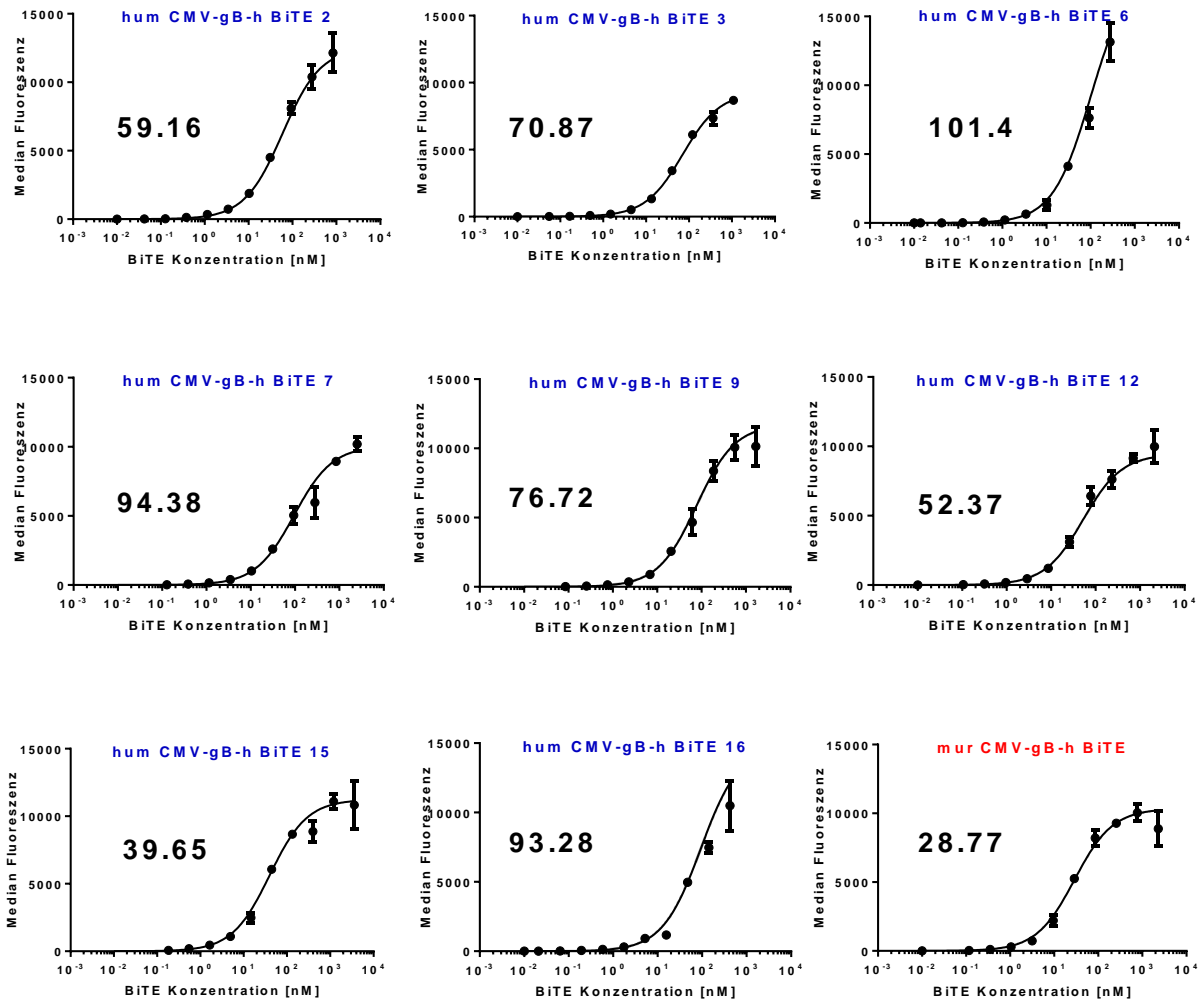


**Abbildung 34:** Aufreinigung eines repräsentativen *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs (hum CMV-gB-h BiTE 7). Ü – Zellkultur-Überstand, DL – Durchlauf aus IMAC, 10 – 10 % Puffer B, 100 – 100 % Puffer B, Agg – Aggregation, Mult – Multimer, Di – Dimer, Mon – Monomer, 47-50 / 55-58 – Fraktionen nach Monomer-Peak (potentiell mit Abbau), M – Marker, mur 400 – murCMV-gB-h BiTE (400 µg/ml).

#### 4.2.6.1 Affinitäts-Bestimmungen der *human-like* CMV-gB BiTE Antikörper-Konstrukte

Um die Affinitäten der *Target*-Bindung der *human-like* CMV-gB BiTE AKs auf HCMV(AD169)-gB, HCMV(Toledo)-gB und CyCMV-gB sowie die CD3-Bindung auf T-Zellen zu testen, wurden Scatchard-Assays, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, durchgeführt. Ein exemplarischer Assay, in dem neben den *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten auch der murine CMV-gB-h BiTE gemessen wurde, ist in Abbildung 35 zu sehen. Die gemessenen Affinitäten sind mit  $K_D$ -Werten von 39,65 nM bis 101,4 nM bei allen *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs geringer, als die des murinen CMV-gB-h BiTE ( $K_D = 28,77$  nM). Die HCMV-gB-Affinitäten des abgebildeten Assays, sowie die Werte aus vier weiteren Assays mit Zellen, die die AD169- oder Toledo-Variante des HCMV-gB exprimieren, sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die  $K_D$ -Werte für einzelne *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten variieren deutlich zwischen den einzelnen Assays. Innerhalb eines Assays zählen aber, neben dem murinen CMV-gB-h BiTE AK, welches jeweils den niedrigsten

$K_D$ -Wert erreicht, die *human-like* Varianten 12 und 15 jeweils zu den Varianten mit den niedrigsten  $K_D$ -Werten. Diese erreichen in allen Assays weniger als den 2-fachen Wert des murinen BiTE AKs. Auch die *human-like* Variante 2 zählt in drei von fünf Assays zu den drei *human-like* BiTE AKs mit den höchsten Affinitäten.



**Abbildung 35:** Affinitäts-Bestimmung der *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs auf HCMV(AD169)-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen (repräsentativer Assay). Angegeben ist die jeweils zur Kurve gehörige Dissoziations-Konstante ( $K_D$  [nM]). Der murine CMV-gB-h BiTE besitzt mit einem  $K_D$ -Wert von 28,77 nM die höchste Affinität. Die schwächste Affinität weist die *human-like* CMV-gB-h BiTE Variante 6 mit einem  $K_D$ -Wert von 101,4 nM auf.

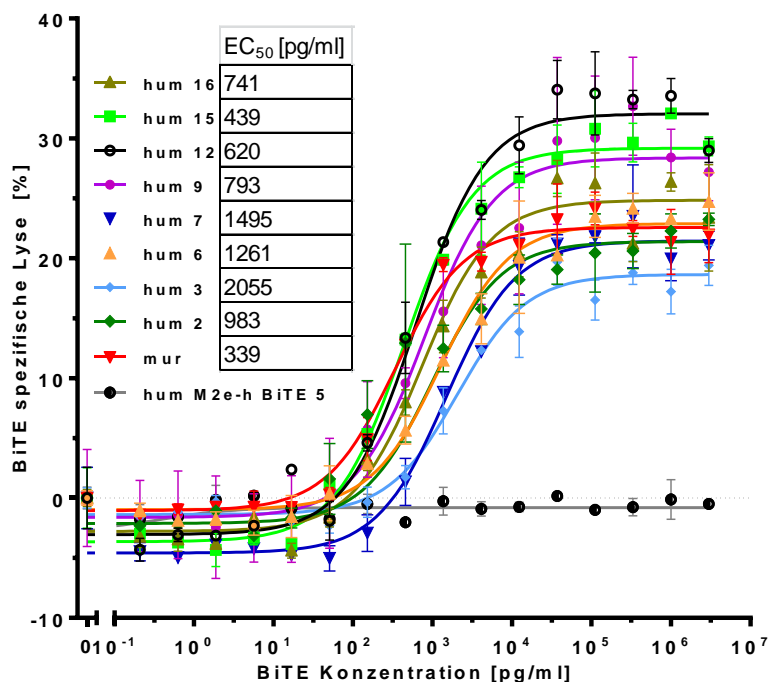
**Tabelle 11:**  $K_D$ -Werte aus Scatchard-Assays aller CMV-gB-h BiTE Varianten auf den HCMV-gB-Varianten der Stämme AD169 und Toledo. Die Farbskala reicht von grün (= niedriger  $K_D$ -Wert = hohe Affinität) bis rot (= hoher  $K_D$ -Wert = niedrige Affinität). Die Farbskalierung wurde jeweils separat innerhalb eines Assays durchgeführt.

K <sub>D</sub> -Werte [nM] aus Scatchard-Assays	human-like CMV-gB-h BiTE								mur CMV-gB-h BiTE
	2	3	6	7	9	12	15	16	
CHO-HCMV-gB(AD169) Assay 1	59	71	101	94	77	52	40	93	29
CHO-HCMV-gB(AD169) Assay 2	22	45	34	42	47	26	18	35	14
CHO-HCMV-gB(Toledo) Assay 1	77	151	107	126	394	87			60
CHO-HCMV-gB(Toledo) Assay 2	86	172	80	92	94	40	58	88	37
CHO-HCMV-gB(Toledo) Assay 3	93	146	139	86	94	36	40	180	

#### 4.2.6.2 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der human-like CMV-gB-h BiTE Antikörper-Konstrukte

Um die zytotoxische Aktivität der *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs zu überprüfen, wurden mehrere Assays, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurden keine mit IL-2 stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt, sondern frisch isolierte humane PBMCs. Die Inkubations-Dauer betrug 48 Stunden. Ein exemplarischer Assay ist in Abbildung 36 zu sehen. Mit allen *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs werden die HCMV(Toledo)-gB x EpCAM exprimierenden *Target*-Zellen spezifisch lysiert. Der murine CMV-gB-h BiTE (mur) erreicht mit 339 pg/ml den niedrigsten EC<sub>50</sub>-Wert. Von den *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs ist der EC<sub>50</sub>-Wert für die Variante 15 (hum 15) mit 439 pg/ml am kleinsten. Die schwächste BiTE spezifische Lyse weist die *human-like* CMV-gB-h BiTE Variante 3 mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 2055 pg/ml auf. Bei Inkubation mit dem *human-like* Influenza A M2e-h BiTE findet keine BiTE spezifische Lyse statt.

In Tabelle 12 sind die EC<sub>50</sub>-Werte aller *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs für die Lyse von HCMV(Toledo)- und HCMV(AD169)-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen aufgelistet. Die Werte liegen für die Lyse von HCMV(AD169)-gB x EpCAM-exprimierenden Zellen deutlich unterhalb der Werte für die Lyse von HCMV(Toledo)-gB x EpCAM-positiven *Targets*. Dies kommt eventuell zum einen durch die etwas geringeren Affinitäten der BiTE AKs zu HCMV(Toledo)-gB (siehe Tabelle 11) zustande. Zum anderen stammen die verwendeten humanen PBMCs von unterschiedlichen Spendern, was auch zu deutlichen Unterschieden in den Messwerten führen kann. Die Bewertung der zytotoxischen Aktivitäten (siehe Farbskala in Tabelle 12; grün = stark bis rot = schwach) wurde deshalb auch hier je Assay vorgenommen.



**Abbildung 36:** Zytotoxische Aktivitäten aller *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten und des murinen CMV-gB-h BiTE auf CHO-HCMV(Toledo)-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen. Die *Target*-Zellen wurden bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 mit unstimulierten humanen PBMCs (ohne vorherige Depletion nicht CD8-positiver Zellen) und unterschiedlichen BiTE Konzentrationen 48 h inkubiert.

**Tabelle 12:** EC<sub>50</sub>-Werte aller CMV-gB-h BiTE AKs für die Lyse von HCMV(Toledo)- und HCMV(AD169)-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen. Die in den Assays verwendeten PBMCs (1-4) stammen von 4 verschiedenen Spendern. Die Farbskala reicht von grün (= niedriger EC<sub>50</sub>-Wert = hohe zytotoxische Aktivität) bis rot (= hoher EC<sub>50</sub>-Wert = niedrige zytotoxische Aktivität). Die Farbskalierung wurde jeweils separat innerhalb eines Assays durchgeführt.

Zytotoxizität; EC <sub>50</sub> [pg/ml]	hum 2	hum 3	hum 6	hum 7	hum 9	hum 12	hum 15	hum 16	mur
CHO-HCMV(Toledo)-gB unstim. PBMC 1	843	1704	1097	1406	1743	979	1446	1558	698
CHO-HCMV(Toledo)-gB unstim. PBMC 2	983	1950	1257	1472	733	642	427	807	356
CHO-HCMV(AD169)-gB unstim. PBMC 3	15	29	38	41			45	60	17
CHO-HCMV(AD169)-gB unstim. PBMC 4	15	25	8,4	35	11	8,9	10	27	14

#### 4.2.6.3 TS<sub>50</sub>-Werte und weitere Kriterien zur Bewertung der *human-like* CMV-gB BiTE Varianten

Zur Bestimmung der Temperatur-Sensitivitäten (TS<sub>50</sub>-Werte) der *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten wurde ein FACS-Assay durchgeführt, in dem die *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten bei verschiedenen Temperaturen zwischen 4 und 90 °C für 5 min inkubiert und anschließend als Primär-Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung von HCMV(Toledo)-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen eingesetzt wurden. Die Temperatur, bei der noch eine

halb-maximale Bindung (Median des Fluoreszenz-Signals im Durchflusszytometer) erreicht wird, wird als  $TS_{50}$ -Wert bezeichnet. Die  $TS_{50}$ -Werte aller *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten sind in Tabelle 13 aufgeführt. Sie liegen mit Werten zwischen 59 und 61 °C knapp oberhalb des  $TS_{50}$ -Wertes des murinen CMV-gB-h BiTE (58 °C).

Weitere wichtige Kriterien für die Auswahl einer Variante sind eine hohe Monomer-Ausbeute je Liter Zellkultur-Überstand, sowie ein hoher Monomer-Anteil in einer Aufreinigung, berechnet über die  $OD_{280}$ -Kurve der SEC ((Fläche des Monomer-Peaks) / (Fläche des Monomer- + Dimer-Peaks) x 100 %). Diese Werte sind ebenfalls in Tabelle 13 angegeben.

Sämtliche Messwerte der in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche sind ebenfalls noch einmal gesammelt in Tabelle 13 aufgelistet. Hier ist jeder Wert mit einer Schulnote von 1 (sehr gut) bis 5 (mangelhaft) bewertet. Die Bewertungs-Kriterien sind unterhalb der großen Tabelle angegeben. Die angegebenen  $EC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte sind Mittelwerte (MW) aus allen mit dem jeweiligen BiTE AK durchgeführten auswertbaren Assays.

Die drei *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten 2, 12 und 15 wurden aufgrund der besten Durchschnitts-Noten für die genauere Charakterisierung ausgewählt. Für diese Varianten wurden die Affinitäten auf RhCMV-gB und CyCMV-gB sowie auf humanem und Cynomolgus-CD3 mittels Scatchard-Assays bestimmt. Außerdem wurden mit unstimulierten PBMCs eines Spenders parallele Zytotoxizitäts-Assays auf HCMV(Toledo)-gB-, CyCMV-gB- und RhCMV-gB-exprimierenden CHO-Zellen mit der murinen und den drei *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten durchgeführt. Zusätzlich wurden die  $TS_{50}$ -Werte genauer ermittelt, indem der gleiche Assay, wie oben beschrieben, durchgeführt wurde, allerdings mit einer feineren Abstufung der Inkubations-Temperaturen zwischen 45 und 70 °C (5 °C Schritte) vor der Immunfluoreszenz-Färbung von HCMV(AD169)-gB x EpCAM-exprimierenden CHO-Zellen. Die Ergebnisse dieser Assays sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Affinitäten der *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs zu RhCMV-gB sind alle etwa 2-fach schwächer, als beim murinen CMV-gB-h BiTE, während die CD3-Affinitäten, gemessen auf HPB-ALL-Zellen (human) und HSC-F-Zellen (Cynomolgus), bei murinen und *human-like* Molekülen praktisch identisch sind. Die Affinitäten zu CyCMV-gB konnten zum Teil nicht berechnet werden, da die Fluoreszenz-Signale auch bei hohen BiTE Konzentrationen nur schwach waren. Die beiden  $K_D$ -Werte für die CyCMV-gB Bindung, die berechnet werden konnten, basieren auf ähnlichen Kurven, wie in Abbildung 28 B dargestellt, und sind daher ebenfalls ungenau. Diese Werte wurden deshalb bei der Bewertung nicht mit einbezogen, lassen aber vermuten, dass die CyCMV-gB-Bindung der CMV-gB-h BiTE AKs mindestens zehnfach schwächer ist, als die Bindung an RhCMV-gB. Beim Vergleich der *human-like* CMV-gB BiTE Varianten 2, 12 und 15 erhält Variante 12, wie schon bei der ersten Bewertung (vgl. Tabelle 13), mit knappem Vorsprung die beste Bewertung.

**Tabelle 13:** Bewertung aller CMV-gB-h BiTE AKs. Aufgelistet sind Mittelwerte aller in einer Kategorie durchgeführten Assays (MW). In Kategorien, in denen keine Mehrfach-Bestimmung durchgeführt wurde, sind Einzelwerte angegeben. Jedem (Mittel-) Wert wird eine Note zwischen 1 (= sehr gut) und 5 (= mangelhaft) zugeordnet. Die Kriterien für die Noten-Vergabe sind in der untenstehenden kleinen Tabelle zu finden. Als Kriterium zur Bewertung der Affinitäten wurden nicht die absoluten Werte verwendet, sondern der Faktor ( $K_D$  (mur CMV-gB-h BiTE) /  $K_D$  (hum CMV-gB-h BiTE)). In der letzten Zeile der Tabelle ist die Durchschnitts-Note jeder Variante (gleiche Gewichtung aller Kriterien) aufgelistet.

	hum 2	hum 3	hum 6	hum 7	hum 9	hum 12	hum 15	hum 16	mur
<b>EC<sub>50</sub> (MW) auf HCMV-gB (AD169) [pg/ml]</b>	15	27	23,2	38	11	8,9	27,5	43,5	15,5
Note	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>EC<sub>50</sub> (MW) auf HCMV-gB (Toledo) [pg/ml]</b>	913	1827	1177	1439	1238	811	937	1183	527
Note	2	3	3	3	3	2	2	3	2
<b>K<sub>D</sub> (MW) auf HCMV-gB (AD169) [nM]</b>	41	58	67	68	62	39	29	64	21
K <sub>D</sub> Faktor hum/mur	1,9	2,7	3,2	3,2	2,9	1,8	1,4	3,0	1,0
Note	1	2	2	2	2	1	1	2	1
<b>K<sub>D</sub> (MW) auf HCMV-gB (Toledo) [nM]</b>	85	157	108	101	194	54	49	134	49
K <sub>D</sub> Faktor hum/mur	1,7	3,2	2,2	2,1	4,0	1,1	1,0	2,7	1,0
Note	1	2	2	2	3	1	1	2	1
<b>TS<sub>50</sub> auf HCMV-gB (Toledo) [°C]</b>	60	61	60	60	59	61	61	61	58
Note	2	2	2	2	3	2	2	2	3
<b>Humane Identität [%]</b>	85,5	85,5	85,0	85,0	85,5	85,5	85,9	85,5	66,8
Note	2	2	2	2	2	2	2	2	5
<b>Produktivität [mg/l]</b>	0,9	1,1	0,2	3,5	1,6	2,0	4,8	0,3	7,5
Note	3	2	5	1	2	2	1	4	1
<b>Monomer [%]</b>	90	90	93	90	92	90	88	96	73
Note	1	1	1	1	1	1	3	1	5
<b>Durchschnitts-Note</b>	1,6	1,9	2,3	1,8	2,1	1,5	1,6	2,1	2,4

Bewertungs-Kriterien:	Note				
	1	2	3	4	5
EC <sub>50</sub> [pg/ml]	<250	250-1000	>1000-5000	>5000-20000	>20000
K <sub>d</sub> Faktor (hum/mur)	≤2	>2-4	>4-8	>8-16	>16
TS <sub>50</sub> [°C]	≥65	60-<65	55-<60	50-<55	<50
humane Identität [%]	≥90	85-<90	80-<85	75-<80	<75
Produktivität (mg/Liter Zellkultur-Überstand)	>3	>1-3	>0,5-1	>0,25-0,5	≤0,25
% Monomer bei Aufreinigung (von Monomer-plus Dimer-Peak)	≥90	-	≥80-<90	-	<80

Es konnten somit *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs generiert werden, die hinsichtlich ihrer Affinitäten und zytotoxischen Aktivitäten *in vitro* nur minimal schlechtere Eigenschaften aufweisen, als der parentale murine CMV-gB-h BiTE. Die Aminosäure-Sequenzen aller *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs zeigen eine, im Vergleich zur murinen Variante, deutlich höhere Identität zur humanen Keimbahnsequenz, eine etwas geringere Thermosensitivität (höherer TS<sub>50</sub>-Wert) und einen höheren Anteil an Monomer in der Aufreinigung über SEC. Mit den *human-like* CMV-gB BiTE Varianten 2, 12 und 15 wurden drei Moleküle identifiziert, die sich als Ausgangspunkte für die Entwicklung eines therapeutischen BiTE AKs anbieten könnten.



**Tabelle 14:** Genauere Charakterisierung der drei besten *human-like* CMV-gB-h BiTE AKs. Aufgelistet sind Affinitäts-Werte ( $K_D$ ) für die *Target*-Bindung (RhCMV-gB und CyCMV-gB) und die CD3-Bindung (human: HPB-ALL, Cynomolgus: HSC-F), Zytotoxizitäts-Werte ( $EC_{50}$ ) für die BiTE spezifische Lyse von RhCMV-, CyCMV- und HCMV(Toledo)-gB exprimierenden CHO-Zellen, sowie Temperatur-Sensitivitäten ( $TS_{50}$ ), gemessen auf HCMV(AD169)-gB exprimierenden CHO-Zellen. Für alle verfügbaren  $K_D$ -Werte ist der Faktor ( $K_D$  (hum) /  $K_D$  (mur)) angegeben. Je Wert ist eine Bewertung in Form einer Note angegeben, basierend auf den Kriterien in Tabelle 13. Ausnahme: Affinitäten auf CyCMV-gB (nicht für alle Moleküle konnten Werte ermittelt werden). In der untersten Zeile ist für jedes BiTE AK eine Durchschnitts-Note für die aufgelisteten Werte angegeben.

	hum 2	hum 12	hum 15	mur
<b>Affinität; <math>K_D</math> [nM]</b>				
CHO-RhCMV-gB	730	623	781	319
Faktor (mur / hum)	2,3	2,0	2,4	1,0
Note	2	1	2	1
CHO-CyCMV-gB	N/D	N/D	8544	5326
Faktor (mur / hum)	-	-	1,6	1
Note	-	-	-	-
HPB-ALL	0,8	0,8	0,9	0,8
Faktor (mur / hum)	1,0	1,0	1,1	1,0
Note	1	1	1	1
HSC-F	4,2	3,9	3,1	4,4
Faktor (mur / hum)	1,0	0,9	0,7	1,0
Note	1	1	1	1
<b>Zytotoxizität; <math>EC_{50}</math> [pg/ml]</b>				
CHO-RhCMV-gB, unstim. PBMC*	49	114	97	47
Note	1	1	1	1
CHO-CyCMV-gB, unstim. PBMC*	503	484	444	278
Note	2	2	2	2
CHO-HCMV(Toledo)-gB, unstim. PBMC*	107	98	83	90
Note	1	1	1	1
<b>Temperatur-Sensitivität; <math>TS_{50}</math> [°C]</b>				
$TS_{50}$ auf HCMV-gB (AD169)	57	58	57	52
Note	3	3	3	4
<b>Durchschnitts-Note</b>	<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>

\* gleicher Spender

## 5 Diskussion

### 5.1 BiTE Antikörper-Konstrukte zur Behandlung von Influenza A-Infektionen

In dieser Arbeit wurden BiTE AKs generiert, die aus einem humanes oder murines CD3 bindenden Anteil (CD3-Binder), sowie einem Influenza A M2-bindenden Anteil (*Target*-Binder) bestehen. Der *Target*-Binder stammt von dem monoklonalen murinen anti-M2-Antikörper „148“ (Gruppe von Xavier Saelens, VIB Ghent, Belgien, unveröffentlicht) ab, welcher spezifisch an den extrazellulären Teil des M2-Proteins (M2e) bindet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die resultierenden M2e x CD3-bispezifischen BiTE AKs sowohl spezifisch an die humane T-Zelllinie HPB-ALL bzw. die Maus-T-Zelllinie CTLL-2, als auch an Influenza A-M2-exprimierende CHO-Zellen binden. Außerdem bewirken M2e-h BiTE AKs (binden humanes CD3) und M2e-m BiTE AKs (binden murines statt humanes CD3) die spezifische Lyse von M2-exprimierenden CHO-Zellen durch T-Zellen in einem *in vitro* Zytotoxizitäts-Assay. M2e-m BiTE AKs können außerdem Mäuse vor dem Tod durch eine Influenza A-Infektion schützen.

#### 5.1.1 Generierung und Charakterisierung von *human-like* M2e BiTE Antikörper-Konstrukten

Murine therapeutische Antikörper lösen häufig Immunantworten im Menschen aus, was zu einer verminderten Wirksamkeit, vor allem bei wiederholter Behandlung oder der Behandlung über einen längeren Zeitraum, führt [148]. Der M2e-bindende Teil des murM2e-h BiTE weist eine rein murine Aminosäuresequenz auf, während die Sequenz des huCD3-bindenden Teils eine sehr hohe Homologie zur humanen Keimbahnsequenz (= humane Identität) besitzt [13]. Bei dem durchgeführten *human-like engineering* des M2e-Binders sollten gezielt die Aminosäuren in den *Framework*-Regionen (FRs) der VH und VL, die von der ähnlichsten humanen Keimbahn-Sequenz abweichen, ersetzt werden. Im Gegensatz zu einer Humanisierung, bei der die murinen CDRs in ein fest definiertes humanes *Framework* eingesetzt werden [149], besteht beim *human-like engineering* für jede einzelne zu verändernde Position die Möglichkeit, die murine oder die humane Aminosäure zu enthalten, wobei methodisch bedingt die humane Aminosäure jeweils mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit vorhanden ist, als die murine. Bei einem einfachen Einsetzen der nicht humanen CDRs in ein humanes *Framework* besteht die Gefahr eines Affinitäts-Verlusts [150, 151]. Beim hier durchgeführten *human-like engineering* besteht hingegen die Möglichkeit, dass murine Aminosäuren vor allem an Positionen vorhanden bleiben, an denen sie einen Einfluss auf die korrekte Konformation der CDRs und damit der Bindungs-Affinität oder -Spezifität haben. Der Einfluss von Aminosäuren der *Framework* Regionen auf die Konformation der hypervariablen *Loops* wurde unter anderem bereits von Foote *et. al* beschrieben [152].

Nach dem in dieser Arbeit durchgeführten *human-like engineering* sind vor allem in FR 2 und FR 3 der VH Aminosäuren vorhanden, die bei allen halb *human-like* Klonen der Sequenz des murinen Binders entsprechen. Diese Aminosäuren sind vermutlich für eine korrekte Struktur der CDRs des M2e-Binders wichtig und führen, wenn sie durch die entsprechende humane Aminosäure ersetzt werden, zu einer Verschlechterung der Spezifität bzw. Affinität des Binders.

Zur Auswahl der VH- und VL-Sequenzen, die zur Generierung von *human-like* BiTE AKs verwendet werden sollten, wurden die halb *human-like* scFv-Moleküle im Hinblick auf verschiedene Kriterien charakterisiert. Ein Kriterium war die Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ), die mit Hilfe eines mit M2 beschichteten Chips per Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Biacore) bestimmt wurde. Mit diesem Wert lässt sich zwar die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), als Maß für die Affinität des Moleküls, nicht direkt bestimmen, da sich die  $K_D$  aber aus der Formel  $K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$  ergibt, wobei  $k_{\text{on}}$  die Assoziationsrate darstellt, ist ein kleiner  $k_{\text{off}}$ -Wert in der Regel mit einem kleinen  $K_D$ -Wert (d.h. mit einer hohen Affinität) verbunden. Die gemessenen  $k_{\text{off}}$ -Werte der halb *human-like* anti-M2e scFvs liegen alle in einem Bereich, der erfahrungsgemäß ein- bis zweistellig nanomolaren  $K_D$ -Werten entspricht. Dies wurde durch die in Scatchard-Assays gemessenen Affinitäts-Werte der mit einer Auswahl dieser scFvs hergestellten *human-like* M2e-h BiTE AKs bestätigt (siehe Tabelle 5). Die Temperatur-Sensitivität ( $TS_{50}$ -Wert) der halb *human-like* scFvs gibt einen weiteren Hinweis auf deren Stabilität, bzw. die Fähigkeit, sich nach einer (teilweisen) Denaturierung wieder zu einem funktionsfähigen Binder zurück zu falten. Die bestimmten  $TS_{50}$ -Werte liegen mit 58-63 °C alle in einem Bereich, der erfahrungsgemäß ein Indikator für stabile Binder ist. In einem sehr ähnlichen experimentellen Ansatz wurden etwa von Orr *et al.* die Stabilitäten unterschiedlicher scFvs, die auf der Oberfläche von Hefe-Zellen exprimiert wurden, bestimmt und lieferten  $TS_{50}$ -Werte (dort:  $T_{1/2}$ -Werte) von 43,9 - 60,3 °C [153].

Das wichtigste Kriterium zur Auswahl der *human-like* VHs und VLs war die humane Identität der Sequenz. Da das Ziel des *human-like engineering* war, VH- und VL-Sequenzen mit möglichst hoher humaner Identität zu erhalten, wurden nur jeweils die sechs *human-like* VH- und *human-like* VL-Varianten mit den höchsten humanen Identitäten für die Bestimmung der  $k_{\text{off}}$ - und  $TS_{50}$ -Werte verwendet. Dies sind bei den *human-like* VHs alle Sequenzen mit humanen Identitäten von  $\geq 85$  %, bei den *human-like* VLs alle Sequenzen mit humanen Identitäten von  $\geq 87,5$  %. Die M2-bindenden scFv-Anteile der aus den drei jeweils besten VHs und VLs konstruierten *human-like* M2e-h BiTE AKs besitzen humane Identitäten zwischen 86,4 und 87,3 %, was einer Erhöhung der humanen Identität um 8,2 bis 9,1 % gegenüber dem murinen Ausgangs-Binder entspricht. Die berechnete humane Identität bezieht sich auf die gesamte Aminosäure-Sequenz von VH und VL (ohne VH CDR 3). Betrachtet man lediglich die Framework-Regionen, liegt deren humane Identität nach dem *human-like engineering* bei 94,0 bis 95,2 %, während sie beim murinen Ausgangs-Binder bei lediglich 83,2 % lag. In einer Publikation stellen Gao *et al.* mit dem „humanness score“ eine alternative Berechnungs-Möglichkeit zur Bestimmung der humanen Identität von VH- und VL-Sequenzen vor [154]. Die mit Hilfe

dieser Methode Berechneten humanen Identitäten der *human-like* M2e-Binder sind in etwa mit den Prozent-Werten, die sich durch die in dieser Arbeit verwendete Art der Berechnung ergeben, vergleichbar. Gao *et al.* vergleichen verschiedene murine, chimäre, humanisierte und humane therapeutische Antikörper hinsichtlich ihrer humanen Identität und ihrer Immunogenizität und zeigen, dass humanisierte und humane Antikörper mit einem „humanness score“ von über 80-85, im Unterschied zu murinen oder chimären Antikörpern, nur in sehr wenigen Fällen in Patienten eine Immunantwort hervorrufen. Dies lässt annehmen, dass die in dieser Arbeit erreichte Annäherung der ursprünglich murinen M2e-Binder-Sequenz an die humane Keimbahn-Sequenz ausreichend ist, um die Wahrscheinlichkeit einer Immunantwort im Menschen deutlich zu verringern.

Bei der Aufreinigung der *human-like* M2e-h BiTE AKs über SEC fällt auf, dass, im Unterschied zur Aufreinigung des murinen M2e-h BiTE, der Monomer-Peak direkt von einem nicht deutlich abgesetzten Peak gefolgt wird. Dieser könnte von einer alternativ gefalteten Form des BiTE AKs stammen, oder ein neues Abbauprodukt darstellen. Möglicherweise wurde durch die im *human-like engineering* veränderten VH- und VL-Sequenzen eine Protease-Schnittstelle in die BiTE Aminosäuresequenz eingefügt, die dazu führt, dass BiTE AKs im CHO-Zellkulturüberstand, oder evtl. bereits innerhalb der Zellen geschnitten werden. Allerdings ist der eigentliche Monomer-Peak bei allen humM2e-h BiTE Varianten dominant, was dafür spricht, dass nur ein eher kleiner Teil der Antikörper eventuell spezifisch von Proteasen geschnitten oder falsch gefaltet wird. Durch die Begrenzung der gepoolten Fraktionen auf den Bereich, der dem Monomer-Peak entsprechen sollte, konnte BiTE Monomer in reiner Form gewonnen werden. Dies wurde durch die Analytik mittels SDS-PAGE und Western-Blot bestätigt. Aufgrund der Monomer-Ausbeute aus CHO-Zellen in der ersten Amplifikations-Stufe, die geringer ausfiel, als beim murinen M2e-h BiTE, ist fraglich ob der humM2e-h BiTE in dieser Form für eine Produktion im größeren Maßstab unter den in dieser Arbeit verwendeten Expressions- und Aufreinigungs-Bedingungen geeignet wäre. Auch wenn bei der Herstellung im großen Maßstab ein anderes Expressionssystem zum Einsatz kommt und die Produktions- sowie Aufreinigungs-Bedingungen speziell an das Molekül angepasst werden, wäre es vorteilhaft, bereits im kleinen Maßstab Produktions-Bedingungen zu finden, unter denen der Antikörper höhere Ausbeuten bzw. einen größeren Monomer-Anteil liefert. Eine Möglichkeit, eine höhere Ausbeute an BiTE AK zu erhalten, oder geringere Mengen von Dimer und/oder Abbauprodukten zu erhalten, könnte die Verwendung anderer eukaryotischer Zellen zur Produktion sein, z.B. HEK-Zellen [155, 156]. Eventuell könnten auch CHO-Zellen unter Verwendung eines alternativen Transfektions-Vektors bzw. -Systems benutzt werden, um größere Mengen des BiTE AKs, evtl. auch in reinerer Form, herzustellen, als mit dem in dieser Arbeit verwendeten pEFDHFR-Vektor-System. Eine Möglichkeit hierfür wäre etwa das Flp-In-Vektor-System [157, 158].

Für die Charakterisierung der *human-like* M2e-h BiTE Varianten wurde für jedes der Moleküle die Affinität zu M2e mittels Scatchard-Assay bestimmt. Da bei diesem Assay die berechneten Werte für ein Molekül zwischen den einzelnen Assays erfahrungsgemäß etwa um den Faktor

zwei schwanken können, wurden mindestens zwei, für den Großteil der Moleküle aber drei Assays durchgeführt und die Mittelwerte der ermittelten  $K_D$ -Werte als ein Kriterium zur Auswahl der besten Variante verwendet. Die  $K_D$ -Werte der humM2e-h BiTE Varianten lagen im Bereich zwischen 6,2 und 47,0 nM und damit für sechs der neun produzierten Varianten deutlich unter dem  $K_D$ -Wert des murM2e-h BiTE ( $K_D = 35$  nM). Die Affinität der besten Variante (humM2e-h BiTE 5) zum Zielprotein ist damit etwa 4-fach schwächer, als der für das CD19-spezifische BiTE AK Blinatumomab (MT103/AMG 103) angegebene Wert ( $K_D = 1,49$  nM) [159]. Allerdings besitzt Blinatumomab einen CD3-Binder, der eine Dissoziationskonstante von lediglich 260 nM aufweist [159], während alle M2e-h BiTE Varianten humanes CD3 mit einer Dissoziationskonstante von etwa 1-2 nM wesentlich stärker binden (siehe Abbildung 11 und Abbildung 20). Ein weiteres derzeit in frühen klinischen Studien untersuchtes BiTE AK, welches den gleichen CD3-Binder besitzt, wie die hier untersuchten h BiTE AKs, bindet sein Ziel-Antigen (PSMA) mit einer Dissoziationskonstante von 47 nM [13] schwächer, als die meisten humM2e-h BiTE Varianten. Ein weiteres bereits klinisch untersuchtes BiTE AK, Solitomab (MT110/AMG 110), bindet sein Ziel-Antigen EpCAM mit einer Affinität von etwa 16 nM [29]. Damit liegt die Bindungsaffinität zum Ziel-Antigen bei dem ausgewählten humM2e-h BiTE 5 mit 6,2 nM in einem für BiTE AKs guten bis sehr guten Bereich.

Als weiteres wichtiges Auswahl-Kriterium wurde die zytotoxische Aktivität für jede der *human-like* M2e-h BiTE Varianten in *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays bestimmt. Die hier ermittelten  $EC_{50}$ -Werte unterliegen jedoch von Assay zu Assay teilweise starken Schwankungen, die vermutlich hauptsächlich vom Blutspender und dessen aktuellem Immunstatus abhängig sind. Aus diesem Grund wurde nicht versucht, drei möglichst identische Assays durchzuführen; stattdessen wurden drei Zytotoxizitäts-Assays mit unterschiedlichen Inkubationszeiten mit PBMCs von zwei unterschiedlichen Blutspendern und mit unterschiedlichem Aktivierungsgrad der T-Zellen (unstimulierte CD14/CD56-depletierte oder stimulierte CD8-positive T-Zellen) durchgeführt. In jedem dieser Assays wurden alle *human-like* M2e-h BiTE AKs, sowie der murine M2e-h BiTE eingesetzt und die  $EC_{50}$ -Werte innerhalb des Assays verglichen. Auf diese Weise sollte eine *human-like* BiTE Variante identifiziert werden, die unter den verschiedenen Assay-Bedingungen immer gute  $EC_{50}$ -Werte aufweist. In vergleichbaren Zytotoxizitäts-Versuchen wurde mit dem oben erwähnten PSMA-spezifischen BiTE AK bei einem 48-stündigen Assay mit unstimulierten humanen PBMCs als Effektoren und PSMA-exprimierenden CHO-Zellen als Zielzellen ein  $EC_{50}$ -Wert von 370 pg/ml erreicht [13]. Dieser Wert liegt etwas höher, als die mit den besten *human-like* M2e-h BiTE AKs erreichten  $EC_{50}$ -Werte im 48-Stunden Assay mit unstimulierten humanen PBMCs, die etwa im Bereich von 200-300 pg/ml lagen (siehe Tabelle 5). Dies passt mit der Affinität zum Ziel-Antigen zusammen, die beim PSMA-spezifischen BiTE mit einem  $K_D$ -Wert von 47 nM [13] schwächer ist, als bei den meisten humM2e-h BiTE AKs. Allerdings sind  $EC_{50}$ -Werte zwischen gegen verschiedene Ziel-Antigene gerichteten BiTE AKs insgesamt schwer zu vergleichen, da neben den T-Zellen des Blutspenders, dem E:T-Verhältnis und der Bindungs-Affinität eines BiTE AKs zum Ziel-Antigen auch die Expression des Ziel-Antigens auf den Zielzellen, sowie die Affinität zu CD3, die abhängig vom verwendeten CD3-Binder ist (vgl. Abschnitt 1.1), die gemessenen  $EC_{50}$ -Werte beeinflussen.

Bei der Charakterisierung der *human-like* M2e-h BiTE AKs fällt auf, dass alle Varianten sowohl bei Affinitätsmessungen als auch in Zytotoxizitäts-Assays vergleichbar gute, zum Teil sogar deutlich bessere Werte liefern, als der murine BiTE, obwohl an den Aminosäuren der CDRs keine Änderungen vorgenommen wurden. Vermutlich bewirken die Veränderungen in den *Framework*-Regionen leichte Struktur-Änderungen des M2e-Binders, die dazu führen, dass das Antigen mit höherer Affinität gebunden wird. Eine derartige Beeinflussung der Struktur und Affinität durch die Aminosäure-Sequenz der *Framework*-Regionen wurde etwa von Foote *et al.* beschrieben [152]. Obwohl beim durchgeführten Phage Display nicht direkt nach hoher Affinität selektiert wurde, fand durch die 4 *Panning*-Runden wahrscheinlich eine Anreicherung von Bindern mit höheren Affinitäten statt. Da nur die Klone sequenziert wurden, mit denen im FACS-Screening besonders hohe Fluoreszenz-Signale gemessen wurden, wurden hier vermutlich erneut besonders affine Binder ausgewählt.

### 5.1.2 Infektionen mit unterschiedlichen Influenza A-Stämmen

Im *in vitro* Zytotoxizitäts-Assay konnten mit verschiedenen Influenza A-Stämmen infizierte MDCK-Zellen BiTE vermittelt lysiert werden. Die verwendeten Stämme besitzen unterschiedliche M2e-Sequenzen mit 1-4 Aminosäure-Austauschen gegenüber der Konsensus-Sequenz, zwischen den Positionen 10 und 21. Die mit Influenza A/Memphis/106/76(H3N2) infizierten MDCK-Zellen wurden erst bei deutlich höheren BiTE Konzentrationen durch T-Zellen lysiert, als mit den anderen Stämmen infizierte Zellen. Die Ursache hierfür könnte z.B. eine schwächere Infektiosität dieses Virus-Stammes oder eine schwächere Expression des M2-Proteins sein. Der wahrscheinlichere Grund ist aber die M2e-Aminosäure-Sequenz dieses Stammes. An Position 10 ist hier ein Leucin enthalten, während bei den anderen im Zytotoxizitäts-Assay untersuchten Stämmen an dieser Position ein Prolin vorhanden ist. Vermutlich ist dieser Aminosäure-Austausch in unmittelbarer Nachbarschaft der vom M2e BiTE erkannten Sequenz für eine schlechtere Bindung des BiTE AKs verantwortlich, ohne jedoch zum Verlust der Bindung zu führen. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen von Roose *et al.*, die eine verminderte Bindung des parentalen Antikörpers an ein M2e-Peptid dieses Virus-Stammes feststellen konnten (Roose *et al.*, mündliche Kommunikation). Sumarningsih stellte bei Untersuchungen der M2e-Sequenzen von aus geimpften Geflügelbeständen isolierten H5N1-Viren, sowie weiterer online verfügbarer M2e-Sequenzen anderer Vogelgrippe-Virusstämme, Aminosäure-Austausche lediglich zwischen den Positionen 10 und 20 fest, nicht aber weiter N-terminal [160]. Zharikova *et al.* beobachteten bei Laborversuchen mit Influenza A-infizierten SCID-Mäusen, die eine passive Immunisierung mit verschiedenen M2e-bindenden Antikörpern erhielten, nach mehreren Wochen fast ausschließlich „*Escape*“-Mutanten mit M2e-Aminosäure-Austauschen an Position 10 (P10H und P10L) [161]. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass Austausch der ersten 9 Aminosäuren nur sehr selten vorkommen, da sie vermutlich einen negativen Einfluss auf die Funktionen des M2- und/oder des M1-Proteins haben, welche beide denselben N-Terminus besitzen. Das untersuchte M2e BiTE AK wäre somit in der Lage, praktisch mit allen Influenza A-Stämmen infizierte Zellen zu lysieren, wenn

auch im Falle eines Aminosäure-Austauschs an Position 10 des M2-Proteins mit verminderter Effizienz.

### 5.1.3 Mausmodell

Die Validierung der Wirksamkeit der M2e BiTE AKs im Mausmodell stellt einen sehr wichtigen Gesichtspunkt dar, da alle zuvor verwendeten *in vitro*-Modellsysteme den tatsächlichen Zustand eines infizierten Gewebes nicht naturgetreu nachbilden können, z.B. im Hinblick auf die M2-Expressions-Rate in den Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse aufgrund der Behandlung mit humM2e-m BiTE eine potentiell letale Influenza A-Infektion überleben, während mit Kontroll BiTE behandelte Tiere sterben. Der im Maus-Versuch eingesetzte humM2e-m BiTE unterscheidet sich nur durch den murCD3-bindenden Anteil von einem potentiellen therapeutischen BiTE AK (humM2e-h BiTE). Der murCD3-Binder des humM2e-m BiTE besitzt eine etwas geringere Affinität zu murinem CD3, als der huCD3-Binder des humM2e-h BiTE zu humanem CD3. Auch im *in vitro*-Zytotoxizitäts-Assay fällt der Unterschied der EC<sub>50</sub>-Werte zwischen humM2e-m BiTE und murM2e-m BiTE weniger deutlich aus, als bei den h BiTE Varianten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der humM2e-h BiTE im Menschen bei gleicher Konzentration zu einer effektiveren BiTE vermittelten Lyse von Influenza A-infizierten Zellen führen würde. Um den potentiellen therapeutischen humM2e-h BiTE auf seine Wirksamkeit *in vivo* zu testen, wäre eine Option, Experimente mit Rhesus- oder Cynomolgus-Makaken durchzuführen, deren T-Zellen vom humM2e-h BiTE ebenfalls gebunden werden, wenn auch mit etwas geringeren Affinitäten, als humane T-Zellen. Dies würde sicherlich die Situation in einem an Influenza erkrankten Menschen am besten wieder spiegeln, wäre aber sowohl sehr teuer, als auch aus ethischen Gesichtspunkten schwierig. Eine andere Option könnten Versuche mit humanisierten Mäusen sein. In Versuchen mit NSG-Mäusen, denen humane hämatopoietische Stammzellen transplantiert wurden, konnte nach einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) eine funktionelle humane T-Zell-Antwort nachgewiesen werden [162, 163]. Dieses Modell könnte, nach einer Vorinfektion zur Induktion von Memory-T-Zellen, dazu dienen, die Wirksamkeit von huCD3-spezifischen M2e-h BiTE AKs zur Behandlung einer Influenza A-Infektion im Tiermodell zu testen. Als ähnliches, evtl. einfacher durchzuführendes, Tiermodell wäre auch die Verwendung von NOD/SCID-Mäusen in Betracht zu ziehen, denen vor oder zeitgleich mit der Influenza-Infektion aus humanem Blut isolierte PBMCs injiziert werden. Ein solches Modell wurde auch schon erfolgreich zur Überprüfung der Wirksamkeit von gegen Tumor-Antigene gerichteten huCD3-spezifischen BiTE AKs verwendet [13, 29, 164].

### 5.1.4 BiTE vermittelte T-Zell-abhängige Lyse bei Influenza A-Infektionen

Wie bei allen viralen Infektionen spielen auch bei einer Influenza A-Infektion T-Zellen, insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen, eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung der Infektion (für einen Überblick siehe [165, 166]). Erickson *et al.* zeigten jedoch, dass bei einer Influenza-Infektion, aber auch bei anderen viralen Infektionen des respiratorischen Trakts, T-Zellen vermehrt das Protein PD-1 (*programmed cell death 1*) exprimieren. Dieses bindet den PD-Liganden 1 (PD-L1), welcher unter anderem von respiratorischen Epithelzellen, induziert durch proinflammatorische Zytokine, vermehrt exprimiert wird. Dadurch werden die T-Zellen in ihrer Aktivität gehemmt. Die Blockade des PD-1/PD-L1 Signalwegs durch monoklonale Antikörper konnte nach Virus-Infektionen des respiratorischen Trakts die Hemmung der Aktivität von T-Zellen verhindern und, im Vergleich zu Tieren, die nicht mit den Antikörpern behandelt wurden, eine Verringerung der Virus-Titer in der Lunge bewirken [167]. Rutigliano *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass Infektionen mit niedrig pathogenen Influenza-Stämmen in Mäusen zu stärkeren T-Zell-Antworten führen, während bei Infektionen mit hoch pathogenen Influenza A-Stämmen durch die verstärkte Expression von PD-1 auf Influenza-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen schwächere T-Zell-Antworten zustande kommen. Durch die Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs konnte auch in bei Infektionen mit hoch pathogenen Stämmen eine stärkere T-Zell-Antwort und eine stärkere Reduktion der Virus-Titer erreicht werden [168]. BiTE AKs können T-Zellen in Anwesenheit von Zellen, die das Ziel-Antigen auf der Oberfläche tragen, potent aktivieren [36]. Diese Aktivierung kann auch zu einer verstärkten Expression von PD-1 auf T-Zellen führen. Anhand des EpCAM-spezifischen BiTE AKs Solitomab (AMG 110/MT110) konnte aber gezeigt werden, dass auch transfizierte Zielzellen mit einer starken PD-L1-Expression nicht vor einer BiTE vermittelten Lyse geschützt waren, wenngleich der EC<sub>50</sub>-Wert für die Lyse dieser Zellen etwas höher lag, als bei PD-L1-negativen Zielzellen [169]. Durch eine ausreichend hohe Dosierung des M2e BiTE AKs könnte vermutlich auch der PD-1/PD-L1-vermittelte immunsupprimierende Effekt im Zusammenhang mit einer Influenza-Infektion überwunden werden. Vor allem können aber durch BiTE AKs zusätzlich auch alle anderen T-Zellen, und damit auch nicht Virus-spezifische T-Zellen, zur Lyse der Zielzellen rekrutiert werden. Insbesondere tragen gedrimte T-Zellen des CD8<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Phänotyps zur BiTE vermittelten Lyse von Zielzellen bei [18]. Es konnte jedoch anhand des BiTE AKs Solitomab (AMG 110/MT110) gezeigt werden, dass selbst regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen), denen üblicherweise immunsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben werden, mit Hilfe von BiTE AKs zur Lyse von Zielzellen rekrutiert werden können [170].

Bei einer Influenza-Infektion treten Symptome im Menschen erst ab etwa einem Tag nach der Infektion auf und erreichen etwa am dritten Tag ihr Maximum. Die gemessenen Virus-Titer erreichen ihr Maximum etwa zwei Tage nach der Infektion [171]. Da mit einer Behandlung von Patienten in der Praxis somit in der Regel erst drei bis vier Tage nach der Infektion begonnen werden könnte, ist eine wichtige noch zu klärende Frage, ob bei einem Behandlungsbeginn mit M2e BiTE in dieser Phase der Infektion auch noch ein positiver Effekt auf den



Krankheitsverlauf zu erwarten ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse durch eine Behandlung mit humM2e-m BiTE ab dem Zeitpunkt der Infektion eine potentiell letale Influenza A-Infektion überleben. Influenza-infizierte Mäuse zeigen in der Regel etwa nach 3-4 Tagen offensichtliche Krankheits-Anzeichen, wie Gewichtsverlust oder ein zerzaustes Fell (siehe z.B. [178, 179]). Durch weitere mit M2e-m BiTE AKs am VIB Ghent durchgeführte Versuche konnte gezeigt werden, dass Mäuse auch bei einem Beginn der BiTE AK-Behandlung drei Tage nach der Infektion einen signifikanten Überlebens-Vorteil gegenüber PBS-behandelten Tieren haben. Allerdings fällt der Gewichtsverlust, als Indikator für die Morbidität, stärker aus, als bei Tieren, die bereits ab dem Tag der Infektion mit BiTE AK behandelt wurden (zur Veröffentlichung eingereichtes Manuskript). Aufgrund dieser Ergebnisse kann aber noch nicht ausgeschlossen werden, dass bei Beginn der Behandlung mehrere Tage nach einer Influenza-Infektion durch eine massive BiTE vermittelte Aktivierung von T-Zellen und die Lyse der zu diesem Zeitpunkt großen Anzahl infizierter Zellen auch eine Verschlimmerung des Infektions-Verlaufs, etwa durch einen möglichen Zytokinsturm (Hyperzytokinämie), auftreten könnte. Das Auftreten eines Zytokinsturms ist vermutlich die wichtigste Ursache für den fatalen Verlauf einer Influenza A-Infektion [172]. Einen möglichen Ansatz zur Verhinderung eines Zytokinsturms könnte etwa die Behandlung mit AAL-R, einem Sphingosin-Analogon, darstellen, welches die Immunreaktion, insbesondere das massive Einwandern von Lymphozyten und die Zytokin-Sekretion, hemmt bzw. verlangsamt. Die Behandlung mit AAL-R führte bei Influenza A-infizierten Mäusen zu einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit von 21 % auf 82 %; bei Kombination von AAL-R mit dem Neuraminidase-Inhibitor Oseltamivir wurde sogar eine Überlebens-Rate von 96 % erreicht [173]. Dieses Ergebnis steht teilweise im Widerspruch mit den oben genannten Ergebnissen von Erickson und Rutigliano, die mit der Verhinderung der Inhibition von T-Zellen durch PD-L1 eine Verringerung der Virus-Titer in der Lunge bewirken konnten [167, 168]. Rutigliano beschreibt jedoch auch, dass die bewirkte Verringerung der Virus-Titer im Maus-Modell zu keiner allgemeinen Verbesserung des Gesundheitszustands der Tiere führte. In Versuchen mit dem BiTE AK Blinatumomab (AMG 103/MT103) untersuchten Brandl *et al.* den Einfluss von Dexamethason, einem Glucocorticoid-Analogon, auf die Zytokin-Freisetzung durch T-Zellen, wenn diese mit Zielzellen und BiTE inkubiert wurden. Dexamethason zeigte eine effektive Reduktion der Produktion von Interleukin (IL)-2, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-6, IL-10 und IL-4, ohne die zytotoxische Aktivität der durch BiTE aktivierten T-Zellen zu hemmen [174]. Damit könnte Dexamethason ebenfalls eine Option sein, um einen Zytokinsturm bei der BiTE Behandlung von Influenza-infizierten Patienten zu verhindern. Eine weitere Möglichkeit hierfür wäre z.B. die Gabe von Apocynin. Apocynin wirkt inhibitorisch vor allem auf die NADPH-Oxidase NOX2 und hemmt damit die Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS), welche pro-inflammatorisch wirken [175]. Nam *et al.* konnten zeigen, dass Apocynin auch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen hemmt. Für TNF- $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass diese inhibitorische Wirkung unabhängig von NOX2 ist [176]. Eventuell könnte eine Kombinations-Therapie aus M2e BiTE und AAL-R, Dexamethason oder Apocynin die Entstehung einer gefährlichen überschießenden Immunreaktion verhindern und zu einer schnelleren Genesung beitragen. Dies würde entweder durch eine

Verhinderung des Einwanderns einer zu großen Anzahl von T-Zellen ins Lungengewebe (AAL-R), oder durch die Verringerung der von T-Zellen sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine (Dexamethason, Apocynin), jeweils kombiniert mit einer höheren Effektivität der Lyse infizierter Zellen durch BiTE AKs, erreicht.

Das in dieser Arbeit gezeigte Maus-Modell könnte, etwa durch Einbeziehung des Körpergewichts als Morbiditäts-Indikator, weiter als Modell dienen, um der Frage nachzugehen, ob die beschriebene mögliche Inhibierung einer überschießenden Immunreaktion, z.B. mit Hilfe von AAL-R, Dexamethason oder Apocynin, mögliche negativen Auswirkungen der M2e BiTE Behandlung weit genug abmildern können, um insgesamt einen ausschließlich positiven Effekt der Behandlung zu erreichen.

### 5.1.5 BiTE Therapie bei Influenza A-Infektionen im Menschen

Falls sich die in dieser Arbeit im Maus-Modell gezeigten Erfolge bei der Behandlung von Influenza A-infizierten Mäusen auf den Menschen übertragen ließen, könnte ein M2e-h BiTE zuverlässig zur Behandlung von Influenza A-Infektionen praktisch aller Stämme eingesetzt werden. Ein kritischer Punkt bei einer BiTE Behandlung von Patienten könnte die geringe Halbwertszeit des Medikaments im Organismus und die damit verbundene Darreichungsform sein. Für das mittlerweile in mehreren klinischen Studien erfolgreich getestete BiTE AK Blinatumomab (AMG 103/MT103) wurde in einer Studie in Schimpansen gezeigt, dass nach einer zweistündigen Infusion mit verschiedenen BiTE Konzentrationen die Serum-Konzentrationen des Moleküls von anfänglich 424-750 pg/ml jeweils bereits nach etwa 8-10 Stunden unter das Detektionslimit von 50 pg/ml gefallen waren; die berechnete Serum-Halbwertszeit lag bei etwa 2 h [177]. Mittlerweile konnte auch anhand von Patientendaten aus mehreren klinischen Studien eine Serum-Halbwertszeit von 1,25 h [27] bis etwa 2 h [178] berechnet werden. Eine konstante Serum-Konzentration von 470 pg/ml, wie sie für eine effektive Behandlung von ALL-Patienten angestrebt wird, wird durch eine kontinuierliche intravenöse (cIV) Infusion von 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{Tag}$  Blinatumomab für 4 Wochen/Zyklus erreicht [178]. Eine derartige Verabreichungsform ist für eine weltweit sehr verbreitete Infektionskrankheit wie Influenza A kaum vorstellbar, auch wenn eine cIV Infusion hier vermutlich nur einige Tage verabreicht werden müsste. Eventuell durchführbar wäre eine solche Behandlung für Patienten, die so schwer erkranken, dass sie stationär in einem Krankenhaus behandelt werden müssen. Diese Patienten werden jedoch vermutlich erst in einem Stadium dort aufgenommen, in dem die Infektion bereits weit fortgeschritten ist. Eine BiTE Monotherapie könnte in diesem Fall die Lyse sehr vieler Zielzellen in kurzer Zeit, und damit möglicherweise einen Zytokinsturm bewirken. Klinger *et. al.* berichten auch von einem Zytokin-Release-Syndrom, das kurz nach Beginn der Behandlung mit Blinatumomab einsetzt und auf die schnelle T-Zell-vermittelte Lyse einer großen Anzahl maligner Zellen zurückgeführt wird [27]. Dies könnte im Falle einer fortgeschrittenen Influenza A-Infektion noch in größerem Umfang und konzentriert auf die Atemwege auftreten. Eine Kombinations-Therapie, bestehend aus BiTE und einer Substanz,

die die negativen Auswirkungen der erhöhten T-Zell-Aktivität, und die damit verbundene Stimulation einer großen Anzahl weiterer Immunzellen inhibiert (z.B. AAL-R, Dexamethason oder Apocynin, vgl. Abschnitt 5.1.4), könnte daher von Nutzen sein.

Für die Behandlung einer großen Anzahl von Patienten wäre jedoch eine Dauer-Infusion nicht praktikabel. Hier wäre eine Behandlung etwa über eine einmalige intravenöse Gabe per Injektion oder die mehrfache subkutane Gabe, etwa über einen Injektions-Pen, wünschenswert. Die Wirksamkeit könnte hier jedoch nur bei einer deutlich längeren Halbwertszeit des Moleküls gewährleistet werden. Es gibt zahlreiche Strategien zur Halbwertszeit-Verlängerung von Antikörpern oder Antikörper-Fragmenten (für einen Überblick siehe [179]). Dazu zählen Methoden, die zur Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens und damit zur verlangsamt Ausscheidung über die Nieren führen, wie etwa die PEGylierung (kovalente Bindung an Polyethylenglykol-Ketten) [180]. Die Fusion mit der Fc-Region eines IgG-Moleküls ist eine weitere Möglichkeit, eine längere Serum-Halbwertszeit zu erreichen [181]. Hierbei müsste jedoch eine Variante verwendet werden, die keine Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren aufweist [182], um eine BiTE vermittelte Interaktion zwischen NK- und T-Zellen zu vermeiden, was evtl. die Lyse von NK-Zellen durch gebundene T-Zellen zur Folge haben könnte. Auch die Fusion mit humanem Serumalbumin (HSA) oder einem HSA-bindenden Peptid sind gut untersuchte Methoden zur Halbwertszeit-Verlängerung [183]. Die Verlängerung der Halbwertszeit beruht sowohl bei einer Fc-Fusion [184], als auch bei einer Fusion mit HSA [185] bzw. mit einem HSA-bindenden Peptid [186] auf einem Recycling der Moleküle durch die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn). Dieser Rezeptor bindet bei sauren pH-Werten sowohl an den Fc-Anteil von Antikörpern, als auch an Albumin, nachdem diese über Pinozytose in endosomalen Vesikeln in die Zelle aufgenommen wurden, und sorgt dafür, dass die gebundenen Moleküle nicht abgebaut, sondern wieder zur Zelloberfläche transportiert werden, wo sie aufgrund des neutralen pH-Werts wieder freigesetzt werden [187].

Von besonderer Bedeutung wäre eine humM2e-h BiTE Variante mit verlängerter Halbwertszeit für den präventiven Einsatz. Besonders gefährdete Personen-Gruppen, wie etwa medizinisches Personal oder immungeschwächte Personen, könnten im Falle einer schweren Grippe-Epidemie prophylaktisch mit M2e BiTE behandelt werden. Diese Behandlung wäre umso einfacher, je länger die Halbwertszeit des Moleküls wäre und je seltener es dadurch verabreicht werden müsste. Im Falle einer Influenza A-Infektion wären dann bereits M2e BiTE AKs im Kreislauf vorhanden und könnten so, ähnlich wie im durchgeführten Experiment mit Influenza-infizierten Mäusen, der Infektion in einem sehr frühen Stadium entgegenwirken.

Alle Veränderungen an der Aminosäure-Sequenz von BiTE AKs, die durch das Hinzufügen zusätzlicher Domänen oder die Konjugation mit PEG o.Ä. entstehen, können jedoch vermutlich zu deutlichen Veränderungen der Molekül-Eigenschaften, wie der Stabilität oder der Affinitäten der Binder (etwa durch sterische Inhibition), oder auch zu Problemen bei der Produktion oder Aufreinigung führen. Trotz der Vorteile, die BiTE AKs mit einer verlängerten Halbwertszeit in der praktischen Anwendung hätten, könnte ein großer Vorteil nicht Halbwertszeit-

verlängerter BiTE AKs die gute Expositions-Kontrolle sein, da nach einem Infusions-Stopp innerhalb kurzer Zeit alle BiTE AKs abgebaut sind [27, 178]. Damit wäre ein schnelles Gegensteuern bei unerwünschten Nebenwirkungen möglich. Diese enge Kontrolle über das Vorhandensein aktiver BiTE AKs ist zum einen bei Ziel-Antigenen vorteilhaft, die evtl. auf Zellen lebenswichtiger Organe vorhanden und zugänglich sind, sodass eine Organschädigung eintreten könnte, zum anderen bei BiTE AKs, die gegen Zielproteine gerichtet sind, die evtl. auf einer sehr großen Anzahl von Zellen im Körper vorhanden sind, sodass ein Zytokinsturm eine mögliche Folge der BiTE Aktivität wäre. Beides ist für das Influenza A-M2-Protein, welches hauptsächlich auf Epithelzellen der Bronchien zu finden ist, bei einer fortgeschrittenen Influenza-Infektion anzunehmen.

## **5.2 BiTE Antikörper-Konstrukte zur Behandlung von CMV-Infektionen**

Cytomegalovirus-Infektionen, können vor allem bei Transplantations-Empfängern, immunsupprimierten Patienten, Schwangeren und ungeborenen Kindern zu ernsthaften Komplikationen führen. Die Behandlung ist momentan im Wesentlichen auf die vier Therapeutika Ganciclovir, Valganciclovir, Cidofovir und Foscarnet beschränkt, die allerdings zum Großteil häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie Leukopenie oder Anämie, führen [188]. Zudem sind für diese Medikamente bereits zahlreiche resistente CMV-Stämme bekannt [113-115]. Die Therapie mit CMV-gB-spezifischen BiTE AKs könnte eventuell eine wirksame Alternative zu den bisher zugelassenen Medikamenten darstellen.

### **5.2.1 Bindung von Glykoprotein B verschiedener CMV-Viren**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das untersuchte CMV-gB BiTE AK spezifisch sowohl an humane T-Zellen, als auch an CMV-gB-exprimierende CHO-Zellen binden kann. Außerdem können letztere spezifisch durch T-Zellen BiTE vermittelt lysiert werden. Da Cytomegaloviren streng wirtsspezifisch sind, wurde untersucht, ob der CMV-gB BiTE neben den gB-Proteinen der humanen CMV-Stämme AD169 und Toledo auch an die gB-Proteine von CMV-Stämmen nahe verwandter Spezies binden kann. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Glykoprotein B des Rhesus-Cytomegalovirus (RhCMV, Stamm 68.1) als auch des Cynomolgus-Cytomegalovirus (CyCMV) vom CMV-gB BiTE spezifisch gebunden werden, wenn auch mit deutlich geringeren Affinitäten, als das HCMV Glykoprotein B. Eine solche doppelte Kreuzreaktivität könnte vorteilhaft sein, da die Pathogenese einer RhCMV-Infektion [189] und vermutlich auch einer CyCMV-Infektion der einer HCMV-Infektion beim Menschen sehr ähnlich ist. Während der präklinischen Entwicklung eines CMV-gB BiTE AKs könnte damit nicht nur dessen Sicherheit, sondern auch dessen Wirksamkeit im Affen-Modell untersucht werden.

## 5.2.2 Generierung und Charakterisierung von human-like CMV-gB-spezifischen scFv-Molekülen und BiTE Antikörper-Konstrukten

Der CMV Glykoprotein B-bindende Teil des CMV-gB BiTE (CMV-gB-Binder) stammt vom murinen monoklonalen Antikörper 27-287 [190] ab. Wie für den ebenfalls in dieser Arbeit beschriebenen Influenza A-M2e BiTE, wurde für die VH- und VL-Sequenz des CMV-gB-Binders ein *human-like engineering* durchgeführt, um die Gefahr einer möglichen gegen den BiTE gerichteten Immunantwort im Menschen zu reduzieren. Die humanen Identitäten sowohl der VH als auch der VL des murinen CMV-gB-Binders sind mit 68,8 % und 64,3 % deutlich niedriger, als beim murinen Influenza A-M2e-Binder (75,0 % und 81,3 %). Um die Wahrscheinlichkeit zu steigern, dennoch Binder mit humanen Identitäten von etwa 85 % zu erhalten, wurden für den Aufbau der Phage Display-Libraries, im Unterschied zum *human-like engineering* des IAV-M2e-Binders, Primer verwendet, die an den zu verändernden Positionen zu 90 % für die jeweilige humane Aminosäure codierten, was zu humanen Identitäten von 95,2 - 97,6 % der VH- und von 94,6 - 96,4 % der VL-Framework-Regionen führte. Bei Berechnung der humanen Identitäten unter Einbeziehung der CDRs (mit Ausnahme der CDR 3 der VH) weisen die erhaltenen *human-like* VH-Sequenzen humane Identitäten von 84,4 % bis 87,2 % auf, während die humanen Identitäten der *human-like* VL-Sequenzen lediglich bei 77,5 % bis 78,4 % liegen. Das Miteinbeziehen der CDRs in die Berechnung der humanen Identität erweist sich als wichtig, da auch humanisierte Antikörper, deren Framework-Regionen komplett einer humanen Aminosäure-Sequenz entsprechen, durch ihre CDRs noch ein deutliches immunogenes Potential besitzen können [191]. In einem zweiten Phage Display-Ansatz wurde deshalb versucht, einen Teil der zahlreichen nicht humanen Aminosäuren vor allem in den CDRs 1 und 2 der *human-like* VL 3-2-G1 durch die jeweiligen humanen Aminosäuren zu ersetzen. Mit diesem Ansatz konnten auch *human-like* VL-Sequenzen mit bis zu 85,6 % humaner Identität isoliert werden. Die aus diesen VL-Sequenzen und allen aus dem ersten Phage Display erhaltenen VH-Sequenzen generierten *human-like* scFv-Moleküle erreichten humane Identitäten von 85,0 - 86,4 % und entsprechen somit dem angestrebten Wert von  $\geq 85$  %. Zudem weist, laut FACS-Analyse der Periplasma-Präparationen, keines dieser scFv-Moleküle einen deutlichen Bindungs-Verlust an HCMV-gB auf.

Bei der Charakterisierung der scFv-Moleküle über die Bindung an HCMV-gB-exprimierende CHO-Zellen mittels FACS-Messung fällt auf, dass das murine anti-CMV-gB-scFv Molekül bei allen durchgeführten Messungen ein deutlich schwächeres Fluoreszenz-Signal liefert, als die *human-like* Varianten. Da nach den Ergebnissen der Affinitäts-Messungen der aus dem *human-like engineering* resultierenden CMV-gB BiTE AKs ausgeschlossen werden kann, dass die *human-like* Binder eine höhere Affinität zu CMV-gB besitzen, kann vermutet werden, dass der murine Binder als scFv-Molekül weniger stabil ist, als die *human-like* Varianten, und somit nur teilweise funktionell. Darauf deuten auch die auf HCMV-gB exprimierenden Zellen gemessenen  $TS_{50}$ -Werte der CMV-gB BiTE AKs hin. Diese sind bei den *human-like* CMV-gB BiTE AKs höher, als beim murinen BiTE. Ebenfalls auffällig ist der geringere Dimer-Anteil bei der Aufreinigung der *human-like* CMV-gB BiTE AKs im Vergleich zur murinen Variante. Eventuell tendiert

der weniger stabile murine *Target*-Binder eher zur Dimer-Bildung. Dies könnte durch schwächere intramolekulare Interaktionen zwischen der VH und der VL erklärt werden, was zu Interaktionen mit benachbarten Molekülen führen könnte. Vergleicht man die VH- und VL-Sequenzen des CMV-gB-Binders mit einem *Alignment* von Wang *et al.*, in dem Aminosäuren markiert sind, die für VH-VL-Interaktionen besonders wichtig sind [192], fällt auf, dass die mittels Phage Display selektierten *human-like* CMV-gB-Binder an vielen Aminosäure-Positionen so verändert wurden, dass sie für die VH-VL-Interaktion wichtige Aminosäuren der humanen Keimbahn-Sequenzen besitzen. Dies könnte die höhere Stabilität dieser scFvs und BiTE AKs im Vergleich zur murinen Variante erklären. Vermutlich fand durch die Selektionsrunden im scFv-basierten Phage Display eine Anreicherung von Bindern statt, die im scFv-Format besonders stabil sind, was sich dann auch positiv auf die Stabilität im BiTE Format auswirkt.

Durch das *human-like engineering* wurden somit die humane Identität und die Stabilität des CMV-gB BiTE erhöht. Außerdem konnte eine in der CDR 2 der murinen VH vorhandene potentielle N-Glykosylierungsstelle bei den meisten Sequenzen durch das *human-like engineering* entfernt werden und ist bei keinem der *human-like* CMV-gB-Binder mit humanen Identitäten von  $\geq 85\%$  mehr vorhanden. Dies ist vor allem für eine eventuelle spätere Produktion im großen Maßstab vorteilhaft, da hier eine gleichbleibende Homogenität der aufgereinigten Antikörper wichtig ist [193], was bei Vorhandensein von Glykosylierungsstellen nicht garantiert werden kann. Im Gegensatz zum M2e BiTE wurde für den CMV-gB BiTE durch das *human-like engineering* allerdings keine Verbesserung, sondern eher eine leichte Verschlechterung der Affinität zu HCMV-gB erreicht. Ob die Affinität des *human-like* CMV-gB-h BiTE zu CMV-gB ausreichend hoch ist, um eine effiziente BiTE vermittelte Lyse von Cytomegalovirus-infizierten Zellen zu bewirken, ist derzeit noch nicht geklärt. Dass die für die *human-like* CMV-gB-h BiTE bestimmten Affinitäten aber durchaus ausreichend hoch sein können, zeigt ein PSMA-spezifischer BiTE (BAY2010112), der mit einer Affinität von 47 nM sein Zielprotein ähnlich stark bindet, wie die *human-like* CMV-gB-h BiTE Varianten, und der den gleichen huCD3-bindenden Teil besitzt. Dieses BiTE AK konnte in einem NOD/SCID Maus-Modell die Regression von Tumoren bewirken, die sich nach Injektion von humanen 22Rv1 Prostatakarzinom-Zellen in Matrigel gebildet hatten [13]. Das Molekül wird mittlerweile auch in einer klinischen Phase I-Studie an Prostatakrebs-Patienten getestet (Studien-Kennung: NCT01723475). Sollte sich die Affinität des *human-like* CMV-gB BiTE AKs dennoch als zu gering erweisen, könnte diese eventuell durch eine Affinitäts-Maturierung erhöht werden. Hierzu könnten Phage Display-*Libraries* generiert werden, die etwa an mehreren Stellen der CDRs für zufällige Aminosäuren codieren. Über *Panning*-Runden mit abnehmenden Antigen-Konzentrationen [194], oder einen Bindungs-Kompetitions-Schritt mit dem Ausgangs-scFv nach der initialen Bindung der Phagen an das Antigen [195], könnten so höher affine scFv-Moleküle isoliert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten an die humane Keimbahnsequenz angegliche CMV-gB-spezifische scFv-Moleküle generiert und die daraus resultierenden *human-like* BiTE AKs initial

charakterisiert werden. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnte aber die Aktivität dieser Moleküle auf CMV-infizierten Zellen und *in vivo* nicht mehr untersucht werden. Mögliche weitere Charakterisierungs-Schritte sollen aber im Weiteren kurz erläutert werden.

Um herauszufinden, ob die Affinitäten zum Ziel-Antigen der in dieser Arbeit generierten *human-like* CMV-gB BiTE AKs ausreichend hoch für ein therapeutisches Molekül sind, muss als nächster Schritt der Nachweis erbracht werden, dass Cytomegalovirus-infizierte Zellen in einem *in vitro*-Assay effektiv BiTE vermittelt durch T-Zellen lysiert werden können. Mit CTLs, die einen chimären Immunrezeptor (cIR) exprimieren, dessen CMV-gB-Spezifität ebenfalls auf einem vom mAb 27-287 abstammenden scFv beruht, konnten Full *et al.* eine spezifische Lyse von CMV-gB-exprimierenden 293T HEK-Zellen zeigen [125]. Ob mit diesem Ansatz auch eine Lyse von CMV-infizierten Zellen möglich ist, bleibt jedoch unklar, da die gB-Expression auf der Oberfläche CMV-infizierter humaner Vorhaut-Fibroblasten zwar ab 48 h nach Infektion nachgewiesen werden kann und sich bis mindestens 96 h nach Infektion weiter erhöht, aber evtl. deutlich geringer bleibt, als auf transfizierten Zellen [125].

Indikationen, für die ebenfalls mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) transfizierte autologe T-Zellen als Behandlungsoption diskutiert werden, sind unter anderem Lymphome und Leukämien [196]. So konnten CD19-spezifische CAR-T-Zellen bereits erfolgreich zur Behandlung von chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) [197, 198] sowie von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) [199] eingesetzt werden. Auch mit dem ebenfalls gegen CD19 gerichteten BiTE Blinatumomab (AMG 103/MT103) konnten unter anderem bei der Behandlung von ALL-Patienten große Erfolge erzielt werden [25, 26]. *In vitro*-Versuche mit Blut von CLL-Patienten legen auch eine Wirksamkeit bei der Behandlung von CLL nahe [200]. Ein Vorteil beim Einsatz von CAR-T-Zellen besteht in der lange anhaltenden Wirksamkeit. Noch nach sechs Monaten konnten funktionelle CD19-spezifische CAR-T-Zellen in Patienten nachgewiesen werden [197]. Diese lange Lebensdauer stellt aber potentiell auch eine Gefahr dar, da im Fall von schwerwiegenden Nebenwirkungen ein schnelles Gegensteuern nicht möglich ist. Hier könnte ein wichtiger Vorteil einer BiTE basierten Therapie liegen. Durch die kurze Serum-Halbwertszeit der Moleküle von nur ca. 2 h [178] lässt die Wirksamkeit nach dem Ende der Infusion sehr schnell nach. Ein zusätzlicher Vorteil von BiTE AKs könnte sein, dass sich die Effektivität der BiTE vermittelten Lyse über eine Erhöhung der Konzentration, und dadurch vermehrt auftretende T-Zell-Zielzell-Kontakte, verbessern lassen könnte, was beim Einsatz cIR-/CAR-exprimierender T-Zellen nicht möglich ist.

### 5.2.3 BiTE Therapie von CMV-Infektionen im Menschen

Patienten, die für die Behandlung mit einem CMV-gB BiTE AK in Frage kommen würden, sind vor allem Transplantat-Empfänger, besonders nach einer hämatopoietischen Stammzell-Transplantation (HSCT). Eine HCMV-Infektion ist durch das Fehlen eines funktionierenden Immunsystems über einen relativ langen Zeitraum nach der HSCT eine der wichtigsten Ursachen

für Morbidität und Mortalität [201, 202]. Das Fehlen einer HCMV-spezifischen T-Zell-Subpopulation wird mit einem erhöhten Risiko für eine HCMV-Infektion mit entsprechenden Komplikationen in Verbindung gebracht. Dies wurde insbesondere bei HCMV-seropositiven Patienten gezeigt, die hämatopoietische Stammzellen von einem HCMV-seronegativen Donor erhielten [87, 203, 204]. Aufgrund der wichtigen Rolle einer funktionellen T-Zell-Antwort ist eine Therapie, die CMV-infizierte Zellen mit Hilfe von T-Zellen targetiert, erfolgsversprechend. Dies zeigt sich auch an den erzielten Erfolgen mit adoptivem T-Zell-Transfer [118, 205, 206]. Dieser ist jedoch aufwändig, teuer und teilweise sehr zeitintensiv, da eine Selektion und zum Teil eine Expansion von T-Zellen *in vitro* unter GMP-Bedingungen notwendig ist [207]. Der Einsatz von CMV-gB BiTE wäre deutlich weniger aufwendig und hätte den Vorteil, dass nicht nur eine CMV-spezifische Subpopulation von T-Zellen zur Lyse Virus-infizierter Zellen herangezogen würde, sondern alle vorhandenen T-Zellen rekrutiert werden könnten. Da die BiTE vermittelte Aktivierung der T-Zellen und die nachfolgende Lyse der Antigen-exprimierenden Zellen MHC-unabhängig funktioniert, wäre der Wirkungsmechanismus außerdem nicht von einigen der viralen Immun-Escape-Mechanismen betroffen, wie etwa der Herunterregulierung der MHCI-Präsentation viraler Peptide.

Das CMV-Glykoprotein B wird während der replikativen Phase des Virus exprimiert [133]. Somit ist auch eine Lyse infizierter Zellen wahrscheinlich nur während der replikativen Phase und nicht während der Latenz-Phase möglich. Da in CMV-seropositiven Patienten in der Regel eine große CMV-spezifische T-Zell-Population zu finden ist, ist anzunehmen, dass eine Reaktivierung in latent CMV-infizierten Zellen vermutlich recht häufig ist, oder keine „echte“ Latenz vorhanden ist [120]. Somit wäre es denkbar, dass durch eine BiTE Behandlung, die bereits vor einer Transplantation beginnt und nach der Transplantation fortgeführt wird, die Anzahl CMV-infizierter Zellen, und somit das Risiko für eine schwerwiegende Cytomegalie nach der Transplantation stärker gesenkt werden könnte, als bei einem Behandlungsbeginn nach der Transplantation.

Wie für den in dieser Arbeit beschriebenen Influenza A M2e BiTE in Abschnitt 5.1.5 diskutiert, wäre auch für einen CMV-gB BiTE eine Halbwertszeit-Verlängerung in Betracht zu ziehen. Da eine Cytomegalovirus-Infektion in der Regel nicht auf ein Organ beschränkt ist, in welchem eine sehr starke Virus-Replikation stattfindet, ist hier die Gefahr geringer, dass durch die schnelle Lyse sehr vieler Zellen in kurzer Zeit eine Hyperzytokinämie ausgelöst werden könnte, wie dies etwa bei einer Influenza A-Infektion denkbar ist. Deshalb wäre auch eine sehr enge Kontrolle über die BiTE Konzentration im Körper, wie sie bei einem nicht Halbwertszeit-verlängerten BiTE durch sein schnelles Verschwinden aus dem Kreislauf möglich ist, vermutlich nicht notwendig. Die Behandlung mit einem CMV-gB BiTE AK mit verlängerter Halbwertszeit wäre damit deutlich einfacher, weil keine kontinuierliche Infusion nötig wäre, sondern eine Verabreichung etwa mittels Kurzzeit-Infusionen oder Einzel-Injektionen möglich wäre.



### 5.3 Ausblick - Behandlung viraler Infektionen mittels BiTE Antikörper-Konstrukten

In dieser Arbeit wurde gezeigt dass ein BiTE AK, das bispezifisch für CD3 $\epsilon$  und das Influenza A M2-Protein ist, *in vitro* effektiv die Lyse von M2-exprimierenden und mit einer niedrigen MOI Virus-Infizierten Zellen induzieren kann. Darüber hinaus schützt der BiTE Mäuse vor einem tödlichen Verlauf einer Influenza A-Infektion. Für den ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten CMV-gB BiTE muss der Nachweis einer BiTE vermittelten Lyse von Virus-infizierten Zellen noch erbracht werden. Die durchgeführten Versuche mit transfizierten CMV-gB-exprimierenden Zellen und die gezeigte Lyse von Influenza A-infizierten Zellen durch M2e BiTE lassen jedoch ein positives Ergebnis als wahrscheinlich erscheinen.

Diese ersten Machbarkeitsnachweise machen BiTE AKs zu einer vielversprechenden Behandlungsoption für Virus-Infektionen. Im Gegensatz zu vielen Tumor-assoziierten Proteinen sind virale Proteine auf der Oberfläche Virus-infizierter Zellen hoch spezifische Zielstrukturen, die auf gesunden Körperzellen nicht zu finden sind. Somit kann eine Schädigung von gesundem Gewebe durch Virus-Protein-spezifische BiTE AKs praktisch ausgeschlossen werden – abgesehen von einer eventuellen indirekten Schädigung von Gewebe durch die Aktivierung vieler T-Zellen in kurzer Zeit, wie sie in manchen Fällen auch beim BiTE Blinatumomab beobachtet werden kann [27]. Ein Vorteil von BiTE AKs ist deren Unabhängigkeit von einer Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle [16]. Sie könnten somit also auch gegen Epitope viraler Proteine gerichtet sein, die im Rahmen der natürlichen Immunantwort nicht auf infizierten Zellen präsentiert, und damit normalerweise nicht von T-Zellen erkannt werden. Dadurch würde auch ein von zahlreichen Viren genutzter Immun-Evasions-Mechanismus, die Inhibierung der MHC-I-Antigen-Präsentation (für einen Überblick siehe [208]), umgangen. Als gutes Ziel-Antigen für ein BiTE AK können potentiell alle Proteine von Viren angesehen werden, die im Laufe des viralen Replikationszyklus auf der Oberfläche der infizierten Zelle zu finden sind und die ein Epitop besitzen, dessen Aminosäuresequenz sich zwischen verschiedenen Virus-Stämmen möglichst wenig unterscheidet. Die in dieser Arbeit als Ziel-Antigene für BiTE AKs untersuchten Proteine, Influenza A-M2 und CMV-gB, erfüllen diese Kriterien und könnten durch die positiven *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse erste Ausgangspunkte auch für die Entwicklung weiterer, gegen andere Virus-Infektionen gerichteter BiTE AKs sein.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AKK	Antikörper-Konstrukt
Amp.	Amplifikationsstufe
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BiTE®	<i>Bispecific T Cell Engager</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity determining region</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> (Zelllinie)
CMV	Cytomegalovirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
Cy	Cynomolgus
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMEM	DULBECCOs Modified EAGLE Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E:T	Effektor zu <i>Target</i>
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EpCAM/EpC	Epitheliales Zelladhensionsmolekül ( <i>epithelial cell adhesion molecule</i> )
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (= Durchflusszytometrie)
Fc	Kristallisierbares (konstantes) Fragment eines Antikörpers
FCS	Fötales Kälberserum
FR	<i>Framework Region</i>
Fv	Variables Fragment eines Antikörpers
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HA	Hämagglutinin
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
hu	Human
i.v.	Intravenös
IAV	Influenza A-Virus

Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Medium)
LD <sub>50</sub>	Mittlere letale Dosis
M2	Influenza A Matrixprotein 2
mAb	Monoklonaler Antikörper/ <i>monoclonal antibody</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i> (Zelllinie)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MOI	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
MTX	Methotrexat
mur	Murin
NA	Neuraminidase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N-Terminus	Amino-Terminus
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PFU	<i>Plaque forming unit</i> (Maß für Anzahl infektiöser Viruspartikel)
PS	Primärselektion
Rh	Rhesus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
SB	<i>Super broth</i> (Medium)
scFv	Einzelketten ( <i>single-chain</i> ) variables Fragment
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit(en) ( <i>Unit(s)</i> )
VH	Variabler Teil der schweren Kette eines Immunglobulins
VL	Variabler Teil der leichten Kette eines Immunglobulins

## 7 Literaturverzeichnis

1. Perez, P., et al., *Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody*. Nature, 1985. **316**(6026): p. 354-6.
2. Staerz, U.D., O. Kanagawa, and M.J. Bevan, *Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells*. Nature, 1985. **314**(6012): p. 628-31.
3. Staerz, U.D. and M.J. Bevan, *Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(5): p. 1453-7.
4. Mezzanzanica, D., et al., *Human ovarian carcinoma lysis by cytotoxic T cells targeted by bispecific monoclonal antibodies: analysis of the antibody components*. Int J Cancer, 1988. **41**(4): p. 609-15.
5. Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, *"Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6444-8.
6. Kipriyanov, S.M., et al., *Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics*. J Mol Biol, 1999. **293**(1): p. 41-56.
7. Kontermann, R., *Dual targeting strategies with bispecific antibodies*. MAbs, 2012. **4**(2).
8. Byrne, H., et al., *A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications*. Trends Biotechnol, 2013.
9. Weidle, U.H., et al., *The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer*. Cancer Genomics Proteomics, 2013. **10**(1): p. 1-18.
10. Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7021-5.
11. Mack, M., et al., *Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3965-70.
12. Lutterbuese, R., et al., *Potent control of tumor growth by CEA/CD3-bispecific single-chain antibody constructs that are not competitively inhibited by soluble CEA*. J Immunother, 2009. **32**(4): p. 341-52.
13. Friedrich, M., et al., *Regression of Human Prostate Cancer Xenografts in Mice by AMG 212/BAY2010112, a Novel PSMA/CD3-Bispecific BiTE Antibody Cross-Reactive with Non-Human Primate Antigens*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(12): p. 2664-73.

14. Molhoj, M., et al., *CD19-/CD3-bispecific antibody of the BiTE class is far superior to tandem diabody with respect to redirected tumor cell lysis*. Mol Immunol, 2007. **44**(8): p. 1935-43.
15. Kufer, P., R. Lutterbuse, and P.A. Baeuerle, *A revival of bispecific antibodies*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 238-44.
16. Offner, S., et al., *Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells*. Mol Immunol, 2006. **43**(6): p. 763-71.
17. Brischwein, K., et al., *Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class*. J Immunother, 2007. **30**(8): p. 798-807.
18. Kischel R, H.S., Klinger M, Baeuerle PA, Kufer P, *Effector memory T cells make a major contribution to redirected target cell lysis by T cell-engaging BiTE antibody MT110*, in AACR Annual Meeting 2009. 2009.
19. Haas, C., et al., *Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110*. Immunobiology, 2009. **214**(6): p. 441-53.
20. Lopez, J.A., et al., *Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death*. Trends Immunol, 2012. **33**(8): p. 406-12.
21. Nagorsen, D. and P.A. Baeuerle, *Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab*. Exp Cell Res, 2011. **317**(9): p. 1255-60.
22. Hoffmann, P., et al., *Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct*. Int J Cancer, 2005. **115**(1): p. 98-104.
23. Loffler, A., et al., *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2098-103.
24. Scheuermann, R.H. and E. Racila, *CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy*. Leuk Lymphoma, 1995. **18**(5-6): p. 385-97.
25. Topp, M.S., et al., *Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL*. Blood, 2012. **120**(26): p. 5185-7.
26. Topp, M.S., et al., *Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival*. J Clin Oncol, 2011. **29**(18): p. 2493-8.

27. Klinger, M., et al., *Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab*. *Blood*, 2012. **119**(26): p. 6226-33.
28. Bargou, R., et al., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 974-7.
29. Brischwein, K., et al., *MT110: A novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors*. *Molecular Immunology*, 2006. **43**(8): p. 1129-1143.
30. Herrmann, I., et al., *Highly efficient elimination of colorectal tumor-initiating cells by an EpCAM/CD3-bispecific antibody engaging human T cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13474.
31. Cioffi, M., et al., *EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(2): p. 465-74.
32. Momburg, F., et al., *Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues*. *Cancer Res*, 1987. **47**(11): p. 2883-91.
33. Moldenhauer, G., et al., *Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker*. *Br J Cancer*, 1987. **56**(6): p. 714-21.
34. Balzar, M., et al., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. *J Mol Med (Berl)*, 1999. **77**(10): p. 699-712.
35. Amann, M., et al., *Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3*. *Cancer Res*, 2008. **68**(1): p. 143-51.
36. Aigner, M., et al., *T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct*. *Leukemia*, 2012.
37. Torisu-Itakura, H., et al., *Redirected lysis of human melanoma cells by a MCSP/CD3-bispecific BiTE antibody that engages patient-derived T cells*. *J Immunother*, 2011. **34**(8): p. 597-605.
38. Amann, M., et al., *Antitumor activity of an EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody during long-term treatment of mice in the absence of T-cell anergy and sustained cytokine release*. *J Immunother*, 2009. **32**(5): p. 452-64.
39. Fink, A., et al., *Antigen presentation under the influence of 'immune evasion' proteins and its modulation by interferon-gamma: implications for immunotherapy of cytomegalovirus infection with antiviral CD8 T cells*. *Med Microbiol Immunol*, 2012. **201**(4): p. 513-25.
40. Jenkins, C., et al., *Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection*. *J Virol*, 2008. **82**(7): p. 3736-50.

41. WHO. *Influenza (Seasonal) Fact sheet N°211*. 2014 March 2014 ].
42. Molinari, N.A., et al., *The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs*. *Vaccine*, 2007. **25**(27): p. 5086-96.
43. Wright, P.F., G. Neumann, and Y. Kawaoka, *Orthomyxoviruses*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2007, Lippincott Williams & Wilkins.
44. Hale, B.G., et al., *The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses*. *J Gen Virol*, 2008. **89**(Pt 10): p. 2359-76.
45. Fodor, E. and G.G. Brownlee, *Influenza virus replication*, in *Perspectives in Medical Virology*, C.W. Potter, Editor. 2002, Elsevier. p. 1-29.
46. Nelson, M.I. and E.C. Holmes, *The evolution of epidemic influenza*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(3): p. 196-205.
47. Stegmann, T., *Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion*. *Traffic*, 2000. **1**(8): p. 598-604.
48. Pinto, L.H., L.J. Holsinger, and R.A. Lamb, *Influenza virus M2 protein has ion channel activity*. *Cell*, 1992. **69**(3): p. 517-28.
49. Scholtissek, C., *Inhibition of influenza RNA synthesis by virazole (ribavirin)*. *Arch Virol*, 1976. **50**(4): p. 349-52.
50. Gao, R., et al., *Oseltamivir inhibits both viral entry and release but enhances apoptosis of cells infected with influenza A H1N1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **431**(4): p. 788-95.
51. Colman, P.M., *Zanamivir: an influenza virus neuraminidase inhibitor*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2005. **3**(2): p. 191-9.
52. von Itzstein, M., *The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(12): p. 967-74.
53. Klenk, H.D., *[Evolution and infection biology of new influenza A viruses with pandemic potential]*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2013. **56**(1): p. 15-21.
54. Both, G.W., et al., *Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites*. *J Virol*, 1983. **48**(1): p. 52-60.
55. Koelle, K., et al., *Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans*. *Science*, 2006. **314**(5807): p. 1898-903.
56. Das, S.R., et al., *Defining influenza A virus hemagglutinin antigenic drift by sequential monoclonal antibody selection*. *Cell Host Microbe*, 2013. **13**(3): p. 314-23.

57. Cox, N.J. and K. Subbarao, *Global epidemiology of influenza: past and present*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 407-21.
58. Treanor, J., *Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift*. N Engl J Med, 2004. **350**(3): p. 218-20.
59. Herfst, S., et al., *Airborne Transmission of Influenza A/H5N1 Virus Between Ferrets*. Science, 2012. **336**(6088): p. 1534-1541.
60. Kissling, E., et al., *Influenza vaccine effectiveness estimates in Europe in a season with three influenza type/subtypes circulating: the I-MOVE multicentre case-control study, influenza season 2012/13*. Euro Surveill, 2014. **19**(6).
61. Carrat, F. and A. Flahault, *Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift*. Vaccine, 2007. **25**(39-40): p. 6852-62.
62. Gilbert, S.C., *Advances in the development of universal influenza vaccines*. Influenza Other Respir Viruses, 2013. **7**(5): p. 750-8.
63. Wong, S.S. and R.J. Webby, *Traditional and new influenza vaccines*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(3): p. 476-92.
64. Brown, L.E. and A. Kelso, *Prospects for an influenza vaccine that induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(4): p. 300-8.
65. Govorkova, E.A., et al., *Antiviral resistance among highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated worldwide in 2002-2012 shows need for continued monitoring*. Antiviral Res, 2013. **98**(2): p. 297-304.
66. Thorlund, K., et al., *Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors*. BMC Infect Dis, 2011. **11**: p. 134.
67. Lamb, R.A., S.L. Zebedee, and C.D. Richardson, *Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface*. Cell, 1985. **40**(3): p. 627-33.
68. Zebedee, S.L. and R.A. Lamb, *Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2762-72.
69. Sakaguchi, T., et al., *The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5000-5.
70. Rossman, J.S., et al., *Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission*. Cell, 2010. **142**(6): p. 902-13.
71. Feng, J., et al., *Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2*. Virol J, 2006. **3**: p. 102.



72. Liu, W., et al., *Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design*. *Microbes Infect*, 2005. **7**(2): p. 171-7.
73. Schotsaert, M., et al., *Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments*. *Expert Rev Vaccines*, 2009. **8**(4): p. 499-508.
74. Ebrahimi, S.M. and M. Tebianian, *Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines*. *Virus Genes*, 2011. **42**(1): p. 1-8.
75. Fiers, W., et al., *M2e-based universal influenza A vaccine*. *Vaccine*, 2009. **27**(45): p. 6280-3.
76. Schotsaert, M., et al., *Natural and long-lasting cellular immune responses against influenza in the M2e-immune host*. *Mucosal Immunol*, 2013. **6**(2): p. 276-87.
77. Jr., E.S.M., T. Shenk, and R.F. Pass, *Cytomegaloviruses*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.
78. Bate, S.L., S.C. Dollard, and M.J. Cannon, *Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004*. *Clin Infect Dis*, 2010. **50**(11): p. 1439-47.
79. Hamdan, H.Z., et al., *Seroprevalence of cytomegalovirus and rubella among pregnant women in western Sudan*. *Virology*, 2011. **8**: p. 217.
80. Akinbami, A.A., et al., *Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies amongst normal pregnant women in Nigeria*. *Int J Womens Health*, 2011. **3**: p. 423-8.
81. Manicklal, S., et al., *The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus*. *Clin Microbiol Rev*, 2013. **26**(1): p. 86-102.
82. Wreghitt, T.G., et al., *Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(12): p. 1603-6.
83. Eddleston, M., et al., *Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients*. *Clin Infect Dis*, 1997. **24**(1): p. 52-6.
84. Karltorp, E., et al., *Congenital cytomegalovirus infection - a common cause of hearing loss of unknown aetiology*. *Acta Paediatr*, 2012. **101**(8): p. e357-62.
85. Erice, A., et al., *Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360)*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(4): p. 567-78.
86. Ariza-Heredia, E.J., L. Neshner, and R.F. Chemaly, *Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review*. *Cancer Lett*, 2014. **342**(1): p. 1-8.

87. Avetisyan, G., et al., *Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2006. **38**(10): p. 687-92.
88. Ramanan, P. and R.R. Razonable, *Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review*. Infect Chemother, 2013. **45**(3): p. 260-271.
89. Stern-Ginossar, N., et al., *Decoding human cytomegalovirus*. Science, 2012. **338**(6110): p. 1088-93.
90. Sinzger, C., M. Digel, and G. Jahn, *Cytomegalovirus cell tropism*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 63-83.
91. Gibson, W., *Structure and formation of the cytomegalovirus virion*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 187-204.
92. Sinzger, C., *Entry route of HCMV into endothelial cells*. J Clin Virol, 2008. **41**(3): p. 174-9.
93. Tandon, R. and E.S. Mocarski, *Viral and host control of cytomegalovirus maturation*. Trends Microbiol, 2012. **20**(8): p. 392-401.
94. Irmiere, A. and W. Gibson, *Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus*. Virology, 1983. **130**(1): p. 118-33.
95. Craighead, J.E., R.E. Kanich, and J.D. Almeida, *Nonviral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus-infected cells*. J Virol, 1972. **10**(4): p. 766-75.
96. Mendelson, M., et al., *Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors*. J Gen Virol, 1996. **77** ( Pt 12): p. 3099-102.
97. Sindre, H., et al., *Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1996. **88**(12): p. 4526-33.
98. Goodrum, F., K. Caviness, and P. Zagallo, *Human cytomegalovirus persistence*. Cell Microbiol, 2012. **14**(5): p. 644-55.
99. Sinclair, J. and P. Sissons, *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 1763-79.
100. Reddehase, M.J., *The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(4): p. 390-6.
101. Modrow, S., et al., *Molekulare Virologie*. 2010: Spektrum Akademischer Verlag.
102. Jacobson, M.A., et al., *A CMV DNA vaccine primes for memory immune responses to live-attenuated CMV (Towne strain)*. Vaccine, 2009. **27**(10): p. 1540-8.
103. Schleiss, M.R., et al., *Lack of induction of autoantibody responses following immunization with cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) in healthy CMV-seronegative subjects*. Vaccine, 2004. **23**(5): p. 687-92.

104. Pass, R.F., et al., *Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection*. N Engl J Med, 2009. **360**(12): p. 1191-9.
105. Ahmed, A., *Antiviral treatment of cytomegalovirus infection*. Infect Disord Drug Targets, 2011. **11**(5): p. 475-503.
106. Goodrich, J.M., et al., *Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant*. Ann Intern Med, 1993. **118**(3): p. 173-8.
107. Bacigalupo, A., et al., *Foscarnet in the management of cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplant patients*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(11): p. 1249-64.
108. Chawla, J.S., et al., *Oral valganciclovir versus ganciclovir as delayed pre-emptive therapy for patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplant: a pilot trial (04-0274) and review of the literature*. Transpl Infect Dis, 2012. **14**(3): p. 259-67.
109. Boeckh, M., et al., *Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity*. Blood, 2003. **101**(2): p. 407-14.
110. Junghanss, C., et al., *Impact of unrelated donor status on the incidence and outcome of cytomegalovirus infections after non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2003. **123**(4): p. 662-70.
111. Harada, K., et al., *Genetic analysis of a clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting resistance against both ganciclovir and cidofovir*. Arch Virol, 1997. **142**(2): p. 215-25.
112. Sarasini, A., et al., *Double resistance to ganciclovir and foscarnet of four human cytomegalovirus strains recovered from AIDS patients*. J Med Virol, 1995. **47**(3): p. 237-44.
113. Schreiber, A., et al., *Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains*. Expert Opin Pharmacother, 2009. **10**(2): p. 191-209.
114. Harter, G. and D. Michel, *Antiviral treatment of cytomegalovirus infection: an update*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(5): p. 623-7.
115. Choi, K.Y., et al., *Emergence of antiviral resistance during oral valganciclovir treatment of an infant with congenital cytomegalovirus (CMV) infection*. J Clin Virol, 2013. **57**(4): p. 356-60.
116. Visentin, S., et al., *Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(4): p. 497-503.
117. Revello, M.G., et al., *A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus*. N Engl J Med, 2014. **370**(14): p. 1316-26.

118. Feuchtinger, T., et al., *Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation*. *Blood*, 2010. **116**(20): p. 4360-7.
119. Schmitt, A., et al., *Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. *Transfusion*, 2011. **51**(3): p. 591-9.
120. Peggs, K.S., *Adoptive T cell immunotherapy for cytomegalovirus*. *Expert Opin Biol Ther*, 2009. **9**(6): p. 725-36.
121. Horn, B., et al., *Infusion of cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes from a seronegative donor can facilitate resolution of infection and immune reconstitution*. *Pediatr Infect Dis J*, 2009. **28**(1): p. 65-7.
122. Bao, L., et al., *Adoptive immunotherapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV infections*. *J Immunother*, 2012. **35**(3): p. 293-8.
123. Curran, K.J., H.J. Pegram, and R.J. Brentjens, *Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions*. *J Gene Med*, 2012. **14**(6): p. 405-15.
124. Rappl, G., et al., *The CD3-zeta chimeric antigen receptor overcomes TCR Hyporesponsiveness of human terminal late-stage T cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30713.
125. Full, F., et al., *T cells engineered with a cytomegalovirus-specific chimeric immunoreceptor*. *J Virol*, 2010. **84**(8): p. 4083-8.
126. Lum, L.G., et al., *Targeting Cytomegalovirus-Infected Cells Using T Cells Armed with Anti-CD3 x Anti-CMV Bispecific Antibody*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012.
127. Yamani, M.H., et al., *The impact of CytoGam on cardiac transplant recipients with moderate hypogammaglobulinemia: a randomized single-center study*. *J Heart Lung Transplant*, 2005. **24**(11): p. 1766-9.
128. Kruger, R.M., et al., *Impact of prophylaxis with cytogam alone on the incidence of CMV viremia in CMV-seropositive lung transplant recipients*. *J Heart Lung Transplant*, 2003. **22**(7): p. 754-63.
129. Thakur, A. and L.G. Lum, *Cancer therapy with bispecific antibodies: Clinical experience*. *Curr Opin Mol Ther*, 2010. **12**(3): p. 340-9.
130. Richards, J., et al., *Phase I evaluation of humanized OKT3: toxicity and immunomodulatory effects of hOKT3gamma4*. *Cancer Res*, 1999. **59**(9): p. 2096-101.
131. Britt, W.J., et al., *Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response*. *J Virol*, 1990. **64**(3): p. 1079-85.

132. Isaacson, M.K. and T. Compton, *Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3891-903.
133. Smuda, C., E. Bogner, and K. Radsak, *The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle*. J Gen Virol, 1997. **78 ( Pt 8)**: p. 1981-92.
134. Speckner, A., et al., *Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization*. J Gen Virol, 1999. **80 ( Pt 8)**: p. 2183-91.
135. Schoppel, K., et al., *The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies*. J Infect Dis, 1997. **175**(3): p. 533-44.
136. Scheinberg, P., et al., *The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor*. Blood, 2009. **114**(24): p. 5071-80.
137. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 673-85.
138. Kirchmeier, M., et al., *Enveloped virus-like particle expression of human cytomegalovirus glycoprotein B antigen induces antibodies with potent and broad neutralizing activity*. Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(2): p. 174-80.
139. Lilja, A.E. and P.W. Mason, *The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB*. Vaccine, 2012. **30**(49): p. 6980-90.
140. Roy, D.M., J.E. Grundy, and V.C. Emery, *Sequence variation within neutralizing epitopes of the envelope glycoprotein B of human cytomegalovirus: comparison of isolates from renal transplant recipients and AIDS patients*. J Gen Virol, 1993. **74 ( Pt 11)**: p. 2499-505.
141. Knappe, A., et al., *Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3256-61.
142. Raum, T., et al., *Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: a novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens*. Cancer Immunol Immunother, 2001. **50**(3): p. 141-50.
143. Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
144. De Filette, M., et al., *An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11382-7.
145. Brown, A.N., et al., *In vitro system for modeling influenza A virus resistance under drug pressure*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(8): p. 3442-50.

146. Gaush, C.R. and T.F. Smith, *Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells*. Appl Microbiol, 1968. **16**(4): p. 588-94.
147. Wagner, B., et al., *A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus*. J Virol, 1992. **66**(9): p. 5290-7.
148. Hwang, W.Y. and J. Foote, *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. **36**(1): p. 3-10.
149. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**(6069): p. 522-5.
150. Pavlinkova, G., et al., *Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single-chain Fvs*. Int J Cancer, 2001. **94**(5): p. 717-26.
151. Yoon, S.O., et al., *Construction, affinity maturation, and biological characterization of an anti-tumor-associated glycoprotein-72 humanized antibody*. J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 6985-92.
152. Foote, J. and G. Winter, *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. J Mol Biol, 1992. **224**(2): p. 487-99.
153. Orr, B.A., et al., *Rapid method for measuring ScFv thermal stability by yeast surface display*. Biotechnol Prog, 2003. **19**(2): p. 631-8.
154. Gao, S.H., et al., *Monoclonal antibody humanness score and its applications*. BMC Biotechnol, 2013. **13**: p. 55.
155. Vink, T., et al., *A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies*. Methods, 2014. **65**(1): p. 5-10.
156. Grunberg, J., et al., *High-yield production of recombinant antibody fragments in HEK-293 cells using sodium butyrate*. Biotechniques, 2003. **34**(5): p. 968-72.
157. Wiberg, F.C., et al., *Production of target-specific recombinant human polyclonal antibodies in mammalian cells*. Biotechnol Bioeng, 2006. **94**(2): p. 396-405.
158. Lu, H., et al., *A rapid Flp-In system for expression of secreted H5N1 influenza hemagglutinin vaccine immunogen in mammalian cells*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17297.
159. Dreier, T., et al., *Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody*. Int J Cancer, 2002. **100**(6): p. 690-7.
160. Sumarningsih, *Antigenic characterisation of M2e protein of avian influenza virus.*, in Faculty of Veterinary Science. 2011, The University of Melbourne.

161. Zharikova, D., et al., *Influenza type A virus escape mutants emerge in vivo in the presence of antibodies to the ectodomain of matrix protein 2*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6644-54.
162. Shultz, L.D., et al., *Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(29): p. 13022-7.
163. Strowig, T., et al., *Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1423-34.
164. Schlereth, B., et al., *Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2882-9.
165. Thomas, P.G., et al., *Cell-mediated protection in influenza infection*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 48-54.
166. Valkenburg, S.A., et al., *Immunity to seasonal and pandemic influenza A viruses*. Microbes Infect, 2011. **13**(5): p. 489-501.
167. Erickson, J.J., et al., *Viral acute lower respiratory infections impair CD8+ T cells through PD-1*. J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2967-82.
168. Rutigliano, J.A., et al., *Highly pathologic influenza A virus infection is associated with augmented expression of PD-1 by functionally-compromised virus-specific CD8+ T cells*. J Virol, 2013.
169. Deisting, W., et al., *Impact of Diverse Immune Evasion Mechanisms of Cancer Cells on T Cells Engaged by EpCAM/CD3-Bispecific Antibody Construct AMG 110*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141669.
170. Münz, M., et al., *Lysis of cancer cells by highly purified T regulatory cells engaged via an EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody.*, in *Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*. 2012: Chicago, IL.
171. Carrat, F., et al., *Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(7): p. 775-85.
172. de Jong, M.D., et al., *Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1203-7.
173. Walsh, K.B., et al., *Quelling the storm: utilization of sphingosine-1-phosphate receptor signaling to ameliorate influenza virus-induced cytokine storm*. Immunol Res, 2011. **51**(1): p. 15-25.
174. Brandl, C., et al., *The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(10): p. 1551-63.

175. Stefanska, J. and R. Pawliczak, *Apocynin: molecular aptitudes*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 106507.
176. Nam, S.J., et al., *Apocynin regulates cytokine production of CD8 T cells*. Clin Exp Med, 2013.
177. Schlereth, B., et al., *T-cell activation and B-cell depletion in chimpanzees treated with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(5): p. 503-14.
178. Wu, B., et al., *Pharmacokinetics (PK) of blinatumomab and its clinical implications.*, in *ASCO Annual Meeting 2013*, J Clin Oncol: Chicago, IL.
179. Kontermann, R.E., *Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies*. BioDrugs, 2009. **23**(2): p. 93-109.
180. Veronese, F.M. and G. Pasut, *PEGylation, successful approach to drug delivery*. Drug Discov Today, 2005. **10**(21): p. 1451-8.
181. Wang, H., J.S. Davis, and X. Wu, *Immunoglobulin Fc domain fusion to TRAIL significantly prolongs its plasma half-life and enhances its antitumor activity*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(3): p. 643-50.
182. Vafa, O., et al., *An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations*. Methods, 2014. **65**(1): p. 114-26.
183. Sleep, D., J. Cameron, and L.R. Evans, *Albumin as a versatile platform for drug half-life extension*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(12): p. 5526-34.
184. Suzuki, T., et al., *Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1968-76.
185. Andersen, J.T., et al., *Single-chain variable fragment albumin fusions bind the neonatal Fc receptor (FcRn) in a species-dependent manner: implications for in vivo half-life evaluation of albumin fusion therapeutics*. J Biol Chem, 2013. **288**(33): p. 24277-85.
186. Andersen, J.T., et al., *Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain*. J Biol Chem, 2011. **286**(7): p. 5234-41.
187. Baker, K., et al., *Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 223-36.
188. Biron, K.K., *Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases*. Antiviral Res, 2006. **71**(2-3): p. 154-63.
189. Powers, C. and K. Fruh, *Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 109-15.



190. Utz, U., et al., *Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 1995-2001.
191. Harding, F.A., et al., *The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions*. MAbs, 2010. **2**(3): p. 256-65.
192. Wang, N., et al., *Conserved amino acid networks involved in antibody variable domain interactions*. Proteins, 2009. **76**(1): p. 99-114.
193. Igawa, T., et al., *Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies*. MAbs, 2011. **3**(3): p. 243-52.
194. Schier, R., et al., *Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection*. J Mol Biol, 1996. **255**(1): p. 28-43.
195. Yang, W.P., et al., *CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range*. J Mol Biol, 1995. **254**(3): p. 392-403.
196. Biagi, E., et al., *Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies*. Haematologica, 2007. **92**(3): p. 381-8.
197. Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia*. Sci Transl Med, 2011. **3**(95): p. 95ra73.
198. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 725-33.
199. Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(16): p. 1509-18.
200. Wong, R., et al., *Blinatumomab induces autologous T-cell killing of chronic lymphocytic leukemia cells*. Haematologica, 2013. **98**(12): p. 1930-8.
201. Seggewiss, R. and H. Einsele, *Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update*. Blood, 2010. **115**(19): p. 3861-8.
202. Barron, M.A., et al., *Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(12): p. 1777-83.
203. Boeckh, M., et al., *Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies*. Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(9): p. 543-58.
204. Gratama, J.W., et al., *Immune monitoring with iTAG MHCTetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic*

- stem cell transplant recipients: A prospective multicenter study.* Blood, 2010. **116**(10): p. 1655-1662.
205. Riddell, S.R., et al., *Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones.* Science, 1992. **257**(5067): p. 238-41.
206. Leen, A.M., et al., *Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals.* Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1160-6.
207. Sellar, R.S. and K.S. Peggs, *Therapeutic strategies for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection.* Expert Opin Biol Ther, 2012. **12**(9): p. 1161-72.
208. Hansen, T.H. and M. Bouvier, *MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 503-13.

## Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Pendzialek, J., Roose, K., Smet, A., Schepens, B., Kufer, P., Raum, T., Baeuerle, P. A., Muenz, M., Saelens, X., Fiers, W., *Bispecific T-Cell engaging antibody constructs targeting a universally conserved part of the viral M2 ectodomain cure and prevent influenza A virus infection*. *Antiviral Res*, 2017. **141**: p. 155–164.

Brey, C., Proff, J., Salzer, B., Brozy, J., Münz, M., Pendzialek, J., Full, F., Ensser, A., Lehner, M. and Holter, W., *Characterization of a Cytomegalovirus-specific BiTE*. (Poster) PEGS Europe - 8th Annual Protein & Antibody Engineering Summit, Lisbon, Portugal, 31 October - 4 November, 2016

## Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee herzlich für seine Bereitschaft danken, die Aufgabe als Berichtersteller für diese extern in der Firma *Amgen Research (Munich) GmbH* durchgeführte Arbeit zu übernehmen.

Prof. Dr. Patrick Baeuerle danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine sehr hilfreichen Ideen und Anregungen, sowie für seine Bereitschaft, die Aufgabe als Berichtersteller zu übernehmen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Markus Münz für die sehr gute Betreuung der Doktorarbeit, seinen kompetenten Rat bei der Planung vieler Experimente, seine stets offene Tür, sowie das kritische Lesen des Entwurfs dieser Arbeit und seine hilfreichen Anregungen bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Tobias Raum, der mit seinen Anregungen und seiner Motivation dazu beitrug, nie den Gesamtkontext der Arbeit aus den Augen zu verlieren, und der mir ebenfalls hilfreiche Anregungen für das Verfassen dieser Arbeit gab.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Xavier Saelens und Prof. Dr. Walter Fiers, die es mir ermöglichten, am VIB Ghent (Belgien) Versuche mit Influenza-Viren durchzuführen und mich bei der Planung der Experimente unterstützten. Ein besonderer Dank gilt Dr. Kenny Roose, der einen großen Teil der experimentellen *in vivo*-Arbeiten des ersten Maus-Versuchs, sowie die kompletten Arbeiten für die abgebildete Wiederholung des Maus-Versuchs durchführte.

Danke an Alexander Murr, der mir sehr bei der Einarbeitung im Labor half und stets wertvolle Tipps und Tricks auf Lager hatte.

Vielen Dank an Dr. Ines Herrmann, Wibke Deisting und Dr. Johannes Brozy für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung.

Danke auch an Evelyn Friedrich, Melanie Dietrich, Dr. Doris Rau, Jonas Anlahr und Majk Kvesic für die Unterstützung in Sachen Phage Display, Scatchard-Assays und Biacore-Messungen.

Mein Dank gilt auch allen anderen Kollegen aus der Abteilung BiTE Technology, die für eine sehr gute, kollegiale Atmosphäre sorgten und mit vielen wertvollen Tipps, Tricks und Ratschlägen ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und bei meiner Frau Katrin bedanken, die mit ihrer Liebe und Unterstützung ein nicht wegzudenkender Teil meines Lebens sind und meinen Weg bis hierher erst möglich gemacht haben.