

# Entwicklung von bispezifischen Antikörpern mit optimierter Ziel- und Effektorspezifität

## **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. Fabian Vogt**  
aus Ulm

Tübingen  
2017

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

24.05.2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1.Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2.Berichterstatter:

Prof. Dr. Gundram Jung



# Zusammenfassung:

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Therapie und Prognose einiger Krebsformen durch die Anwendung von chimärisierten und humanisierten Antikörpern deutlich verbessert. Allerdings ist der therapeutische Erfolg solcher Substanzen, vor allem bei soliden Tumoren, bis heute begrenzt. Um die Antikörpertherapie von Tumoren zu optimieren, können verschiedene Strategien angewendet werden. Eine Möglichkeit ist die Entwicklung von bispezifischen Antikörperkonstrukten. Diese Konstrukte können simultan an zwei unterschiedliche Antigene binden, wobei das eine auf der Oberfläche von Tumorzellen und das andere auf Immunzellen exprimiert wird. Der Vorteil solcher Antikörper ist, dass über die Bindung an Oberflächenantigene auch Effektorzellen aktiviert werden, die keine Fc Rezeptoren tragen und deshalb von monospezifischen Antikörpern nicht rekrutiert werden können. An erster Stelle sind hier T-Zellen zu nennen, welche die Fähigkeit haben nach Aktivierung *in vivo* stark zu proliferieren und effektiv Tumorzellen bekämpfen zu können. Jedoch kann eine überschießende Reaktion des T-Zellsystems auch zu schweren Nebenwirkungen führen, was durch Auswahl optimierter Konstrukte vermieden werden kann.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Generierung und Charakterisierung von neuen Antikörpern zur Optimierung sowohl der Effektor- als auch der Zielzelle von bispezifischen Antikörperkonstrukten.

Um die Zielzelle zu verbessern, wurden neue Antikörper gegen die tumorassoziierten Antigene PSMA und CDCP1 generiert, wobei die  $\alpha$ -CDCP1 Antikörper nur initial charakterisiert wurden, da die Rolle des Moleküls (CDCP1) bei der Metastasierung in neuen Arbeiten zwar bestätigt wurde, seine Spezifität für Tumorzellen aber limitiert ist. Die gleichzeitig stromale und neovaskuläre Expression von PSMA sollte zu einer gezielten Lyse des Tumorendothels führen und verbessert dadurch den Einstrom von Immunzellen, wodurch die anti-tumorale Wirkung des bispezifischen Konstrukts zusätzlich verstärkt wird. Der mittels konventioneller Hybridomatechnologie neu generierte  $\alpha$ -PSMA Antikörper 10B3 wurde näher charakterisiert und ist dem „benchmark“ Antikörper J591 insofern überlegen als er einen verminderten Antigenshift, stärkere Färbung der tumorassoziierten Gefäße und eine erweiterte Reaktivität mit Plattenepithelkarzinomen aufweist.

Mit der humanisierten Form des 10B3-Antikörpers wurden bispezifische Antikörperkonstrukte zur Rekrutierung von T-Zellen (via CD3) in unterschiedlichen Formaten (IgGsc und Fabsc) generiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass das tetravalente IgGsc-Format dem bivalenten Fabsc-Format, hinsichtlich einer verringerten *off-target* Aktivierung und verlängerter Serumhalbwertszeit, überlegen war. Mit diesem Molekül wurde deshalb ein humanisiertes bispezifisches Antikörperkonstrukt generiert (IgGsc PSMAxCD3), welches für eine GMP-konforme Produktion und eine klinische Phase I Studie vorgesehen ist.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen den  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor generiert und *in vitro* charakterisiert. Ziel war es durch bispezifische Antikörper  $\gamma\delta$ -T-Zellen, eine effiziente T-Zellsubpopulation, zu rekrutieren und so eine überschießende T-Zellaktivierung zu verhindern. Die generierten bispezifischen Konstrukte waren in der Lage  $\gamma\delta$ -T-Zellen effizient gegen Tumorzellen zu rekrutieren.

# Abstract:

Over the last two decades, chimeric and humanized antibodies have already significantly improved the treatment and prognosis of different cancer diseases. However the therapeutic success of solid tumors is still very limited. Different strategies are possible to improve the antibody-based immunotherapy. One possible strategy is the development of bispecific antibodies. Such a construct can bind simultaneously two different antigens on the surface of both tumor and immune cells. Through this approach not only the classical Fc $\gamma$ -receptor-bearing cells of the innate immune system can be utilized as potent effector cells. The advantage of bispecific antibodies is the recruitment of immune cells like T-cells which can proliferate and kill tumor cells *in vivo* very effectively. However the selection of the tumor-associated antigen plays a crucial role to avoid emerging side effects.

This work describes the generation and characterization of new antibodies to optimize the effector side as well as the target side of bispecific antibody constructs. To optimize the target side new antibodies against PSMA and CDCP1 were generated. The  $\alpha$ -CDCP1 antibodies were only basically characterized due to the expression even on different healthy tissues.

The concurrent expression of PSMA on the tumor associated vessels and the tumor cells facilitate the influx of immune cells to the tumor side and increase the effect of the bispecific antibody.

The new generated  $\alpha$ -PSMA antibody (10B3) by hybridoma technology was characterized *in vitro*. This antibody induced less antigen shift from the cell surface compared to the benchmark antibody J591. Furthermore 10B3 showed a stronger staining of tumor associated vessels and a unique reactivity with squamous cell carcinoma cells.

Different bispecific antibody formats (Fabsc and IgGsc) were next generated using the humanized 10B3 sequence combined with  $\alpha$ -CD3 single chain sequences. The comparison of those constructs revealed a comparable T cell activation and tumor cell reduction. Interestingly, the IgGsc antibody showed a reduced off-target T cell activation and prolonged serum half-life. The humanized bispecific antibody (IgGsc PSMA $\times$ CD3) is currently under GMP production and will enter the phase I clinical study in the near future.

Bispecific antibodies recruiting via CD3 the whole T cell population can lead to an induction of a cytokine storm limiting the applied doses to patients. An alternative bispecific antibody against the  $\gamma\delta$ -TCR were generated, characterized and produced in an IgGsc format allowing the targeting of only a small population of T cells to reduce or inhibit upcoming side effects. These bispecific antibodies were able to activate  $\gamma\delta$  T cells and kill tumor cells *in vitro* effectively.

# Eigene Publikationen

## Publikationen

Durben M, Schmiedel D, Hofman M, **Vogt F**, Nübling T, Pyz E, Bühring HJ, Rammensee HG, Salih HR, Große-Hovest L, Jung G.

*Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia.*

Mol Ther. 2015 Apr; 23(4):648-55.

Seidel UJ, **Vogt F**, Grosse-Hovest L, Jung G, Handgretinger R, Lang P.

*$\gamma\delta$  T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay.*

Front Immunol. 2014 Dec 2;5:618.

Lieber J, Ellerkamp V, **Vogt F**, Wenz J, Warmann SW, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S.

*BH3-mimetic drugs prevent tumour onset in an orthotopic mouse model of hepatoblastoma.*

Exp Cell Res. 2014 Mar 10;322(1):217-25.

**Vogt F**, Lieber J, Dewerth A, Hoh A, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S.

*BH3 mimetics reduce adhesion and migration of hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma cells.*

Exp Cell Res. 2013 Jun 10;319(10):1443-50.

Hoh A, Dewerth A, **Vogt F**, Wenz J, Baeuerle PA, Warmann SW, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S.

*The activity of  $\gamma\delta$  T cells against paediatric liver tumour cells and spheroids in cell culture.*

Liver Int. 2013 Jan;33(1):127-36.

## Anmeldungen

Jung G, Salih HR, **Vogt F**, Kauer J.

*Use of blocking-reagents for reducing unspecific t cell-activation*

Patent Publication number: EP 14195645 (2014)

Jung G, Salih HR, **Vogt F**, Zekri L.

*Novel PSMA binding antibody and uses thereof*

Patent Publication number: EP 16151281(2016)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Krebs.....	1
1.2	Tumorüberwachung .....	1
1.3	Tumorsubversion.....	2
1.4	Tumorasoziierte Antigene (TAA).....	4
1.5	Aktive anti-tumorale Immuntherapie .....	4
1.5.1	Aktive Vakzinierung mit TAAs.....	4
1.6	Passive anti-tumorale Immuntherapie.....	5
1.6.1	Adoptiver Zelltransfer .....	5
1.6.2	Antikörpertherapie.....	6
1.7	Antikörper .....	6
1.7.1	Historische Entwicklung .....	6
1.7.2	Struktur von Antikörpern .....	7
1.7.3	Wirkmechanismen von IgG-Antikörpern.....	9
1.7.4	Therapeutische Antikörper.....	10
1.7.5	Bispezifische Antikörper .....	12
1.7.6	Physiologische und Antikörper-abhängige T-Zellaktivierung .....	15
1.8	$\gamma\delta$ -T-Zellen.....	16
1.8.1	Antigenerkennung und Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2).....	16
1.8.2	Anwendung von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immuntherapie .....	18
1.9	Zielantigene für eine Antikörpertherapie.....	19
1.10	Prostatakarzinom und das prostataspezifische Membranantigen .....	20
1.10.1	Prostatakarzinom .....	20
1.10.2	Expression von PSMA .....	21
1.10.3	Struktur von PSMA .....	21
1.10.4	Enzymatische Funktion des PSMA-Proteins .....	22
1.10.5	PSMA als Zielantigen zur Behandlung von Tumoren.....	22
1.10.6	PSMA-spezifische Antikörper basierte Therapie .....	23
1.11	<i>CUB domain-containing protein-1</i> , CDCP1, CD318) .....	23
1.11.1	Struktur und Funktion .....	23
1.11.2	Expression von CDCP1 .....	24
1.12	Zielsetzung der Arbeit .....	26

2	Material und Methoden .....	27
2.1	Material .....	27
2.1.1	Geräte .....	27
2.1.2	Glas- und Plastikwaren .....	28
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	29
2.1.4	Zellkulturmedien und –zusätze .....	30
2.1.5	Enzyme .....	30
2.1.6	Größenmarker für die Gelelektrophorese.....	30
2.1.7	Gebrauchsfertige Kits .....	30
2.1.8	Oligonukleotide .....	31
2.1.9	Software .....	31
2.1.10	Puffer und Medien .....	31
2.1.11	Zellkulturreagenzien.....	33
2.1.12	Chromatographische Verfahren.....	34
2.1.13	Durchflusszytometrie .....	35
2.1.14	Bakterienstämme .....	35
2.1.15	Plasmide .....	35
2.1.16	Antikörper.....	35
2.1.17	Zelllinien .....	38
2.1.18	Primäre humane Zelllinien .....	39
2.1.19	Mäuse .....	39
2.2	Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen .....	39
2.2.1	Passagieren und Ernten von Zellen .....	39
2.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	40
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen.....	40
2.2.4	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	40
2.2.5	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	41
2.2.6	Kultivierung von antikörperproduzierenden Zellen .....	42
2.2.7	Subklonierung von Zelllinien .....	42
2.2.8	Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) .....	42
2.2.9	Kultivierung und Expansion von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen.....	43
2.2.10	Magnetische Zellseparation mittels MACS <sup>®</sup> -Technologie .....	43
2.2.11	Inaktivierung von Tumorzellen.....	44
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	44
2.3.1	Plasmid-Aufreinigung .....	44



2.3.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion .....	44
2.3.3	Analytische und präparative Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese.	45
2.3.4	Aufreinigung von Nukleinsäure-Fragmenten aus einem Agarosegel.....	45
2.3.5	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform-Extraktion.....	45
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	46
2.3.7	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren .....	46
2.3.8	Herstellung von kompetenten Bakterien .....	47
2.3.9	Transformation von kompetenten Bakterien ( <i>E.coli</i> ).....	47
2.3.10	Anlegen von Bakterienkulturen.....	48
2.3.11	Sequenzierung.....	48
2.4	Herstellung von monoklonalen Antikörpern.....	48
2.4.1	Immunisierung von Mäusen.....	48
2.4.2	Generierung von antikörperproduzierenden Hybridomzellen .....	48
2.4.3	Selektion von Hybridomzellen.....	49
2.4.4	Austestung von Hybridomüberständen .....	49
2.4.5	Subklonierung von positiven Hybridomklonen .....	49
2.4.6	Retrobulbäre Blutentnahme und Isolierung von Serum bei Mäusen .....	50
2.5	Chromatographische Verfahren.....	50
2.5.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A.....	50
2.5.2	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an KappaSelect .....	50
2.5.3	Dialyse von monoklonalen Antikörpern.....	50
2.5.4	Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen mittels NanoDrop .....	51
2.6	Analytische Methoden .....	51
2.6.1	Analytische Gelfiltration .....	51
2.6.2	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese .....	51
2.6.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	52
2.6.4	Durchflusszytometrische Analyse der Antikörper-vermittelten Expressionsmodulation .....	52
2.7	Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern.....	52
2.7.1	<sup>51</sup> Chromfreisetzungstest.....	52
2.7.2	<sup>3</sup> [H]-Thymidin-Proliferationstest .....	53
2.7.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Antikörper-vermittelten Lyse.....	54
2.7.4	X-Celligence-Test (Impedanzmessung).....	54

2.7.5	Nachweis von Vy9V $\delta$ 2-Fusionsproteinen mittels ELISA .....	55
2.7.6	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten.....	55
2.7.7	Anfertigung von Kryoschnitten.....	55
2.7.8	Färben von Kryoschnitten .....	55
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -CDCP1-Antikörper.....	57
3.1.1	Generierung einer Sp2/0-CDCP1-Transfektante .....	57
3.1.2	Immunisierung von Mäusen mit Sp2/0-CDCP1-Transfektanten und Messung des CDCP1-spezifischen Antikörperserumtiters.....	58
3.1.3	Generierung von $\alpha$ -CDCP1-Antikörpern mittels der Hybridoma-Technologie.....	58
3.1.4	Bindungsaffinität der CDCP1-spezifischen Igy-Antikörper .....	60
3.1.5	Antigenshift (CDCP1) .....	60
3.2	Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA .....	62
3.2.1	Charakterisierung der generierten $\alpha$ -PSMA Konstrukte .....	63
3.2.2	Funktionelle Charakterisierung der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA-Konstrukte .....	65
3.2.3	Analyse der Fähigkeit des bispezifischen Antikörpers zur Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen .....	67
3.2.4	Proteinbiochemische Charakterisierung der bispezifischen Antikörperkonstrukte .....	72
3.2.5	Bindung der bispezifischen Moleküle an den TCR/CD3-Komplex und PSMA .....	73
3.2.6	Zielzellyse durch die verschiedenen $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukte.....	74
3.2.7	Induktion der unspezifischen ( <i>off-target</i> ) bzw. spezifischen ( <i>on-target</i> ) T-Proliferation bzw. –aktivierung durch die Fabsc-Konstrukte NP-CU und NP-CO.....	76
3.3	Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper .....	78
3.3.1	Immunisierung von Mäusen mit Sp2/0-PSMA-Transfektanten und Messung des PSMA- spezifischen Antikörperserumtiters.....	78
3.3.2	Generierung von $\alpha$ -PSMA-Antikörpern mittels der Hybridoma-Technologie.....	79
3.3.3	Bindungsaffinität des neu generierten-PSMA Igy-Antikörpers 10B3 .....	79
3.3.4	Antigenshift (PSMA) .....	80
3.3.5	Kompetition mit J591 .....	81
3.3.6	Immunhistochemische Charakterisierung.....	81
3.3.7	Funktionelle Charakterisierung des neu generierten bispezifischen Fabsc-Konstrukts N10-CO im Vergleich zu NP-CO.....	83
3.3.8	Bindungsanalyse der humanisierten Antikörperfragmente im Fabsc-Konstrukt.....	84
3.3.9	Generierung bispezifischer PSMAxCD3 IgGsc-Konstrukte .....	86
3.3.10	Proteinbiochemische Charakterisierung der bispezifischen IgGsc-Antikörper .....	88

3.3.11	Bindung an CD3 und PSMA.....	89
3.4	Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor .....	92
3.4.1	Generierung eines V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins zur Hybridomherstellung.....	92
3.4.2	Charakterisierung des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins .....	92
3.4.3	Immunisierung von Mäusen mit einem V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins und Messung des V $\gamma$ 9 $\delta$ 2-TCRs -spezifischen Antikörperserumtiters.....	94
3.4.4	Generierung von monoklonalen $\alpha$ -V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR-Antikörpern mittels der Hybridoma-Technologie .....	95
3.4.5	Bindungsaffinität und -spezifität der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR spezifischen Igy-Antikörper .....	96
3.4.6	Aktivierungspotenzial der generierten Antikörper .....	97
3.4.7	Nähere Charakterisierung der Antikörperbindung (V $\gamma$ 9 vs. V $\delta$ 2) .....	98
3.4.8	Generierung von bispezifischen Antikörpern mit Spezifitäten für die V $\gamma$ 9-Kette des $\gamma\delta$ -TCRs (Effektorantigen) und CD19 oder PSMA (Zielantigen) .....	99
3.4.9	Klonierung, Expression und Aufreinigung der bispezifischen Antikörperformate.....	100
3.4.10	Proteinbiochemische Charakterisierung der bispezifischen Antikörperkonstrukte ...	101
3.4.11	Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Moleküle an den $\gamma\delta$ -TCR, CD19 und PSMA.....	103
3.4.12	<i>Ex vivo</i> Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	105
3.4.13	Tumorzelllyse durch bispezifische Antikörper und prä-aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	106
3.4.14	Depletion von autologen B-Zellen durch bispezifische Antikörper und prä-aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen .....	106
3.4.15	Tumorzelllyse nach Aktivierung ruhender $\gamma\delta$ -T-Zellen durch bispezifische Antikörper .....	107
4	Diskussion.....	112
4.1	Generierung von neuen $\alpha$ -CDCP1 (CD318) monoklonalen Antikörpern zur Therapie von Krebserkrankungen.....	112
4.2	Generierung von optimierten, monospezifischen und bispezifischen Fabsc Antikörpern gegen PSMA.....	114
4.3	Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper .....	116
4.4	Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen den $\gamma\delta$ -TCR und die Charakterisierung der bispezifischen Moleküle .....	118
4.5	Ausblick.....	120
5	Danksagung .....	121
6	Literaturverzeichnis.....	122
7	Appendix.....	131
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	131
7.2	Curriculum vitae .....	133

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Igy und verschiedener bispezifischer Antikörperkonstrukte .....	14
Abbildung 1.2: Antigenerkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen .....	18
Abbildung 1.3: Seitenansicht der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des PSMA – Homodimers auf der Zelloberfläche.....	22
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des humanen CDCP1-Proteins .....	24
Abbildung 3.1: CDCP1-Expression der neu generierten transfizierten Sp2/0-Ag14-Zellen .....	57
Abbildung 3.2: Spezifische CDCP1-Serumtiterbestimmung mittels FACS-Analyse .....	58
Abbildung 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von unterschiedlichen potenziellen CDCP1 spezifischen Hybridomüberständen .....	59
Abbildung 3.4: Bindungsaffinität der neu generierten $\alpha$ -CDCP1 Igy-Antikörper .....	60
Abbildung 3.5: Anti-CDCP1-Antikörper induzierter Antigenshift.....	61
Abbildung 3.6: Übersicht über die unterschiedlichen Antikörperformate gegen PSMA.....	63
Abbildung 3.7: Analytische Gelchromatographie und Bindungsanalyse der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA Konstrukte .....	64
Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen $\alpha$ -PSMA Antikörperkonstrukte...	65
Abbildung 3.9: Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA Antikörperkonstrukte .....	66
Abbildung 3.10: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte unter Verwendung eines limitierenden Effektor-Zielzell-Verhältnisses .....	67
Abbildung 3.11: Induktion der spezifischen T-Zellproliferation mittels des bispezifischen Antikörpers Fabsc PSMA $\times$ CD3.....	68
Abbildung 3.12: Induktion der spezifischen T-Zellaktivierung und Zielzellyse.....	69
Abbildung 3.13: Qualitative Analyse der bispezifischen Antikörper vermittelten Zytotoxizität und Rekrutierung von Effektorzellen .....	70
Abbildung 3.14: Unspezifische T-Zellproliferation durch den bispezifischen Antikörper Fabsc PSMA $\times$ CD3.....	71
Abbildung 3.15: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukte...	72
Abbildung 3.16: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen $\alpha$ -PSMA Fabsc Antikörperkonstrukte .....	73
Abbildung 3.17: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Fabsc-Konstrukte an $\alpha\beta$ -TCR/CD3 und PSMA.....	73
Abbildung 3.18: Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA Antikörperkonstrukte .....	74
Abbildung 3.19: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte .....	75
Abbildung 3.20: Induktion der spezifischen und unspezifischen T-Zellproliferation mittels der bispezifischen Antikörper Konstrukte NP-CU und NP-CO.....	76
Abbildung 3.21: Unspezifische T-Zellaktivierung mittels der bispezifischen Antikörper Konstrukte Fabsc NP-CU und Fabsc NP-CO .....	77
Abbildung 3.22: PSMA-Expression der neu generierten transfizierten Sp2/0-Ag14-Zellen.....	78

Abbildung 3.23: Spezifische PSMA-Serumtiterbestimmung mittels FACS-Analyse.....	79
Abbildung 3.24: Bindungsaffinität des neu generierten $\alpha$ -PSMA Igy-Antikörpers .....	80
Abbildung 3.25: $\alpha$ -PSMA-Antikörper induzierter Antigenshift .....	80
Abbildung 3.26: Verdrängungsexperiment zwischen dem Maus 10B3 und dem chimären J591 $\alpha$ - PSMA Antikörperklon .....	81
Abbildung 3.27: Immunhistologisches Färbemuster der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA Antikörper 10B3 und J591.....	82
Abbildung 3.28: Induktion der spezifischen T-Zellproliferation mittels der bispezifischen Antikörper NP-CO und N10-CO .....	83
Abbildung 3.29: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der Fabsc-Konstrukte NP-CO und N10-CO ...	84
Abbildung 3.30: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der humanisierten bispezifischen Fabsc- Konstrukte.....	85
Abbildung 3.31: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der humanisierten bispezifischen Fabsc- Konstrukte Nh10-ChO <sub>1</sub> und Nh10-ChO <sub>2</sub> .....	85
Abbildung 3.32: Induktion der spezifischen T-Zellproliferation mittels der neu generierten humanisierten bispezifischen Antikörper .....	86
Abbildung 3.33: Schematische Übersicht über die unterschiedlichen bispezifischen Antikörperformate .....	87
Abbildung 3.34: Induktion der unspezifischen (A) bzw. spezifischen (B) T-Zellproliferation mittels der bispezifischen IgGsc-Antikörper .....	88
Abbildung 3.35: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen IgGsc-Konstrukte .....	88
Abbildung 3.36: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen IgGsc Antikörperkonstrukte.....	89
Abbildung 3.37: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der bispezifischen $\alpha$ -PSMA Konstrukte .....	90
Abbildung 3.38: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen bispezifischen $\alpha$ - PSMA Konstrukten .....	90
Abbildung 3.39: Analytische Gelfiltration des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins .....	93
Abbildung 3.40: Spezifische Bindung eines $\alpha$ -V $\delta$ 2-Antikörpers an das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein .....	93
Abbildung 3.41: Spezifische V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR-Antikörper Serumtiterbestimmung mittels FACS- Analyse auf humanen PBMCs.....	94
Abbildung 3.42: Durchflusszytometrische Analyse von unterschiedlichen potenziellen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2- TCR spezifischen Hybridomüberständen .....	95
Abbildung 3.43: Bindungsaffinität der neu generierten $\alpha$ - V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR Igy-Antikörper .....	96
Abbildung 3.44: Bindungsspezifität der neu generierten $\alpha$ -V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR Antikörper.....	97
Abbildung 3.45: Aktivierungspotenzial der monospezifischen Antikörper .....	98
Abbildung 3.46: Bindungsnachweis der generierten Antikörper an einen V $\gamma$ 9V $\delta$ 1-TCR exprimierenden $\gamma\delta$ -T-Zellklon.....	99
Abbildung 3.47: Schematische Übersicht über die unterschiedlichen bispezifischen Antikörperformate .....	100
Abbildung 3.48: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen IgGsc-Konstrukte .....	101
Abbildung 3.49: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen Fabsc-Konstrukte.....	102
Abbildung 3.50: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen Fabsc Antikörperkonstrukte...	103
Abbildung 3.51: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen IgGsc Antikörperkonstrukte....	103
Abbildung 3.52: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Fabsc- und IgGsc-Konstrukte an den $\gamma\delta$ -TCR.....	104
Abbildung 3.53: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Fabsc- und IgGsc-Konstrukte an PSMA bzw. CD19.....	105

Abbildung 3.54: Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels IL-2 und Zoledronsäure .....	105
Abbildung 3.55: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedliche Antikörperkonstrukte unter Verwendung von prä-aktivierten und aufgereinigten $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	106
Abbildung 3.56: Lyse autologer CD19 <sup>+</sup> Zellen durch die Zugabe aktivierter, expandierter und aufgereinigter $\gamma\delta$ -T-Zellen .....	107
Abbildung 3.57: Lyse CD19 <sup>+</sup> NALM-16-Zellen durch die Zugabe frisch isolierter allogener PBMCs	108
Abbildung 3.58: Lyse CD19 <sup>+</sup> NALM-16-Zellen durch die Zugabe frisch isolierter allogener PBMCs	109
Abbildung 3.59: Lyse CD19 <sup>+</sup> B-Zellen durch autologe PBMCs <i>ex vivo</i> .....	110
Abbildung 3.60: Lyse CD19 <sup>+</sup> B-Zellen <i>ex vivo</i> durch autologe PBMCs in Kombination mit Zytokinen.....	111

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Konjugierte monoklonale Antikörper .....	36
Tabelle 2.2: Konjugierte polyklonale Antikörper .....	36
Tabelle 2.3: Unkonjugierte Antikörper .....	37
Tabelle 2.4: Unkonjugierte Isotypkontroll-Antikörper .....	38
Tabelle 2.5: Hybridome .....	38
Tabelle 2.6: Humane Zelllinien.....	38
Tabelle 2.7: Tierische Zelllinien.....	39
Tabelle 2.8: Primäre humane Zelllinien.....	39
Tabelle 2.9: Mäusestämme .....	39
Tabelle 3.1: Übersicht über die neu generierten $\alpha$ -CDCP1 Antikörper .....	60
Tabelle 3.2: Übersicht über die neu generierten $\alpha$ - $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper .....	96
Tabelle 3.3: Übersicht über die neu generierten $\alpha$ -V $\gamma$ 9 oder $\alpha$ -V $\delta$ 2 Antikörper.....	99

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs

Mit fast einer halben Million Neuerkrankungen pro Jahr gehört Krebs zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und ist die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Nach Zahlen des Robert-Koch-Instituts (Krebs in Deutschland 2011/12) sind trotz Grundlagen- und Wirkstoffforschung die Zahlen (Todesfälle durch Tumorerkrankungen) in den letzten Jahren gestiegen.

Krebserkrankungen entstehen aus einer entarteten, mutierten Zelle, welche sich unkontrolliert teilen kann, ein Prozess der eine Akkumulation von malignen Zellen zur Folge hat. Die Entstehung der mutierten, sich unkontrolliert teilenden malignen Zellen hat in der Regel sowohl endogene als auch exogene Ursachen. Unter endogenen Ursachen versteht man die individuelle genetische Ausstattung des Einzelnen, die zu Krebs führen kann (zum Beispiel durch fehlende DNA-Reparaturmechanismen). Unter exogenen Ursachen werden zum Beispiel Umwelteinflüsse (z.B. Zigarettenrauch oder Alkoholkonsum), Viruserkrankungen (z.B. humane Papillomviren) oder ionisierende Strahlung gezählt [1]. Den malignen Zellen fehlt die Kontrolle des Zellzyklus oder sie überexprimieren Proteine, welche die Zellproliferation begünstigen. Außerdem fehlt den Tumorzellen oft die Fähigkeit zur Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose). Des Weiteren können Tumorzellen Infiltration, tumorfördernde Entzündungsreaktionen, Angiogenese im Tumorgewebe und eine Genominstabilität induzieren, welche zu einer Ansammlung von weiteren Mutationen führen kann. Die medizinisch folgenreichste Eigenschaft maligner Zellen ist ihre Fähigkeit in andere Gewebe zu migrieren und dort Absiedelungen zu bilden (Metastasierung) [2, 3].

Die Heilungschancen bei Krebs sind sehr unterschiedlich und hängen stark vom Ort des Ursprungs der Erkrankung ab. Die Säulen der Tumorthherapie stellen die chirurgische Resektion des Tumors, sowie Strahlen- oder Chemotherapie dar. Diese Therapien stoßen jedoch bei inoperablen oder Strahlen- bzw. Chemotherapie resistenten Tumoren an ihre Grenzen und sind im Wesentlichen wenig selektiv gegenüber malignen Zellen. Sie beschädigen auch normales (benignes) Gewebe, wodurch starke Nebenwirkungen auftreten können und die therapeutische Aktivität eingeschränkt wird.

Eine sich immer mehr etablierende neue Säule der Tumorthherapie stellt die Immuntherapie dar, bei der Immunzellen genutzt werden, um den Tumor spezifisch zu eliminieren. Dadurch erhofft man sich, dass Tumore nicht nur zielgerichtet, sondern auch mit weniger Nebenwirkungen behandelt werden können.

## 1.2 Tumorüberwachung

Die Anfänge der Immuntherapie reichen bereits 150 Jahre zurück. Der Bonner Chirurg Wilhelm Busch beobachtete im Jahr 1866, dass sich ein Halstumor einer Patientin durch eine hervorgerufene bakterielle Infektion (Wundrose; Erysipel) zurückbildete [4].

Zwei Jahrzehnte später übernahm W. B. Coley diesen Ansatz und injizierte hitzebehandelte, abgetötete Bakterien in inoperable Tumore. Dadurch wurde eine lokale Entzündung ausgelöst, was bei einem Teil der so behandelten Patienten zu einer Tumorrogression führte. Dieser



### 1.3 Tumorsubversion

Versuch stellte die erste beschriebene Immuntherapie dar, bei der angenommen wird, dass es durch die Entzündung zu einer Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor kam [5].

Etwa zur gleichen Zeit stellte Paul Ehrlich die Hypothese auf, dass das Immunsystem vor der Entstehung von Tumoren schützen kann. Ehrlich war davon überzeugt, dass häufig maligne Zellen entstehen, diese aber durch eine „Schutzvorrichtung des Organismus“ erkannt und eliminiert werden können [6].

Erst einige Jahrzehnte später konnte in Tumortransplantationsexperimenten gezeigt werden, dass Mäuse mit syngenen Tumoren erfolgreich immunisiert werden konnten, was zur Abstoßung transplanteder Tumore führte [7-9]. Daraus ließ sich schließen, dass das Immunsystem maligne von benignen Zellen unterscheiden kann. Damit bestätigte sich im Prinzip auch das Vorkommen von tumorassoziierten Antigenen (TAA), wie es Paul Ehrlich bereits postuliert.

Diese neuen Erkenntnisse waren Anstoß für Sir Frank Macfarlane Burnet und Lewis Thomas wieder über die Kontrolle des Immunsystems über maligne Zellen zu spekulieren. 1970 beschrieb Burnet die Hypothese der Immunüberwachung (engl.: *Immunsurveillance*). Sie beinhaltet, dass maligne Zellen durch ständig patrouillierende Lymphozyten durch die Expression von TAAs erkannt und eliminiert werden können [10].

Später wurde diese Hypothese jedoch immer wieder in Frage gestellt, zum Beispiel als nachgewiesen wurde, dass Thymus-defiziente Mäuse im Vergleich zu syngenen, immunkompetenten Mäusen (Wildtyp) in gleicher Frequenz spontane Tumore entwickelten [11-13]. Jedoch war damals noch nicht bekannt das Thymus-defiziente Mäuse noch einige funktionelle T- und NK-Zellen besitzen und somit nicht komplett immundefizient sind [14].

Mit der Entdeckung der NK-Zellen in der Maus, wie auch im Menschen, konnte die Hypothese von patrouillierenden Lymphozyten mit Antitumoraktivität bestätigt werden, da solche Zellen die Fähigkeit haben Tumore *in vitro* zu eliminieren. Außerdem führt ein Fehlen von NK-Zellen im Mausmodell zu einer gesteigerten Tumorgenese [15].

Weitere Unterstützung erhielt die Hypothese der „immune surveillance“ durch die Untersuchung von einer Reihe von immundefizienten knock out Mäusen, RAG<sup>-/-</sup> (keine T- und B-Zellen), bei welchen eine erhöhte Tumorinduktion festgestellt werden konnte [16].

Weitere Studien in Mäusen konnten zeigen, dass neben NK- und T-Zellen auch NKT- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wesentliche Rolle bei der Immunsurveillance spielen [17-19].

Zusammenfassend sprechen zahlreiche Ergebnisse dafür, dass die Entstehung von Tumoren durch das Immunsystem überwacht wird. Eine Voraussetzung zur Tumorinduktion muss daher sein, dass die malignen Zellen der Immunüberwachung entgehen (engl.: *immunescape*).

### 1.3 Tumorsubversion

Die Tumorentstehung ist ein evolutionärer Prozess. Denn durch die hohe genetische Instabilität und die Akkumulation von zahlreichen genetischen Veränderungen [20, 21], werden die malignen Zellen selektioniert, welche unter anderem eine Resistenz gegenüber der Eliminierung des Immunsystem haben oder das System gezielt unterdrücken und so zu einem vermehrten Tumorwachstum oder zur Metastasierung beitragen.

Ein möglicher Mechanismus des „*immunescape*“ ist die verminderte Expression von MHC-Molekülen, dies kann durch einen fehlerhaft regulierten IFN- $\gamma$ -Signalweg ausgelöst werden [22], was zur Folge hat, dass weniger Peptid-MHC-Komplexe den zirkulierenden zytotoxischen T-Zellen (engl.: *cytotoxic T-Lymphocyte*, CTL) präsentiert werden können [23, 24]. Auch

## 1.4 Tumorassoziierte Antigene (TAA)

Mutationen in Proteinen (TAP1, LMP2 oder LMP7), die an der Prozessierung der Peptide beteiligt sind, können bei malignen Zellen auftreten, wodurch die Peptide nicht mehr auf die MHC-Moleküle geladen werden können [25].

Tumorzellen können auch durch die Produktion von löslichen Faktoren oder durch Zell-Zell-Kontakt das Immunsystem direkt beeinflussen. Sie können Tumorzellen, T-Zellinhibitoren wie Galectin-1 [26] oder Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) [27], oder auch immunsupprimierende Zytokine wie TGF- $\beta$  oder IL-10 sezernieren [28]. Ebenfalls wurde beschrieben, dass maligne Zellen lösliche MIC-Moleküle, die natürlichen Liganden des NKG2D-Rezeptors, welcher auf Immuneffektorzellen exprimiert wird, ausschütten, wodurch die zytotoxische Wirkung dieser Zellen abgeschwächt wird [29].

Auch kann die Expression von membranständigen Proteinen auf den Tumorzellen zu einer Unterdrückung des Immunsystems führen. So kann zum Beispiel der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen Immunzelle und Tumorzelle durch die Expression von FasL beziehungsweise PD1-L auf der Tumorzelle zu einer Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) oder zur Inhibition der zytotoxischen Wirkung von T-Zellen führen [30, 31].

Des Weiteren können Komponenten des Immunsystems selbst immunsupprimierend wirken. Dabei handelt es sich um sogenannte unreife dendritische Zellen (engl.: *immature dendritic cells, iDC*), myeloische Suppressorzellen (engl.: *myeloid derived suppressor cells, MDSC*) sowie regulatorische T-Zellen (engl.: *regulatory t cells, Tregs*) [32, 33]. Einige Mausexperimente zeigten, dass die Tregs einen inhibitorischen Einfluss auf die Eliminierung von transplantierten Tumoren haben. So konnte durch die Reduktion der T-regulatorischen Zellen, durch einen monoklonalen anti-CD25 Antikörper, das Tumorwachstum in Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe unterbunden werden [34, 35]. Tregs scheinen dabei häufig der Grund für die Inhibition der natürlichen oder der therapeutisch-vermittelten Therapie zu sein, was auch in Studien im Menschen bestätigt werden konnte. Dafür wurde die Anzahl von eingewanderten Tregs in den Tumor untersucht, was mit einer schlechteren Prognose für die Patienten korrelierte [36, 37]. Diesen Prozess der Treg-Rekrutierung beziehungsweise -Expansion können Tumorzellen aktiv zum Beispiel durch die Sekretion von miR-214 manipulieren, wodurch Tregs expandiert werden und eine anti-tumorale Immunreaktion unterdrückt wird [38]. Des Weiteren wird postuliert, dass einige Krebsarten zum Beispiel Glioblastome, durch die Sekretion von G-CSF zu einer Akkumulation von MDSCs führen, welche immunsupprimierend wirken [39].

Zusammengefasst ist die Hypothese von Burnet, welche die Überwachung des Organismus vor dem unkontrollierten Wachstum von malignen Zellen durch das Immunsystem beschreibt, durch zahlreiche Beispiele belegt und heute unter dem Begriff Immunoediting bekannt ist. Dieser Begriff beschreibt allgemein das Gleichgewicht zwischen der fortschreitenden Entwicklung von weniger immunogenen beziehungsweise immunsupprimierenden Tumorzellen und der Eliminierung von malignen Zellen durch das Immunsystem [40, 41].

Daher sollte eine erfolgversprechende Immuntherapie in dieses Gleichgewicht eingreifen und die Effektorimmunzellen aktivieren, um gegen die malignen Zellen vorzugehen oder die Tumorzellen daran zu hindern das Immunsystem zu ihrem Zweck umzumodellieren beziehungsweise zu unterdrücken.

### 1.4 Tumorassoziierte Antigene (TAA)

Die Identifizierung und molekulare Charakterisierung von sogenannten Tumorantigenen durch monoklonale Antikörper oder spezifische T-Zellen war die Voraussetzung für die moderne Immuntherapie von Tumorerkrankungen. So wurde 1991 durch Pierre van der Bruggen erstmals ein tumorspezifisches T-Zellepitop MAGEA1 (engl.: *Melanoma antigen family A,1*) identifiziert, welches auf HLA-A1 präsentiert und von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden konnte [42, 43]. Des Weiteren stellt zum Beispiel EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) ein tumorassoziiertes Antigen dar, welches durch die erhöhte Expression auf Tumoren zur Antikörpertherapie genutzt wird [44]. Diese Tumorantigene können mittlerweile in verschiedene Kategorien eingeteilt werden, der tumorassoziierten-, der cancer/testis- und der tumorspezifischen-Antigene. Im Gegensatz zu den tumorspezifischen Antigenen, welche nur von malignen Zellen aufgrund von tumorspezifischen Mutationen exprimiert werden, können tumorassoziierte Antigene oder cancer/testis Antigene auch auf benignen Körperzellen vorkommen, wobei oft eine starke Überexpression der Antigene auf Krebszellen zu beobachten ist.

Im Folgenden wird nun auf einige vielversprechende Immuntherapieformen gegen Krebs eingegangen, die auf TAAs beruhen.

### 1.5 Aktive anti-tumorale Immuntherapie

#### 1.5.1 Aktive Vakzinierung mit TAAs

Dabei wird mit einem tumorassoziierten Antigen bzw. Peptid immunisiert, um T-Zellen zu generieren, welche den Tumor erkennen und eliminieren. Heutzutage werden zur aktiven Tumorstimmung rekombinant hergestellte Proteine oder tumorassoziierte Peptide für HLA Klasse I oder II synthetisiert und zusammen mit einem Adjuvanz, zum Beispiel GM-CSF (engl.: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), welches zur Aktivierung und zu einer optimalen Präsentation der Peptide führt, in die Haut oder intra-dermal injiziert [45]. Dort werden die Peptide von dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und über die HLA-Moleküle präsentiert, um Peptid-spezifische T-Zellen zu aktivieren. Es ist anzumerken, dass der verwendete Peptid-Cocktail an den HLA-Haplotyp des Krebspatienten angepasst werden muss. Andere Möglichkeiten zur Induktion des adaptiven Immunsystems stellen die DNA- und die RNA-Vakzinierung dar. DNA beziehungsweise RNA werden den Krebspatienten appliziert und von Zellen des Patienten aufgenommen, dort exprimiert und über die HLA-Moleküle den T-Zellen, welche dadurch aktiviert werden können, präsentiert. Die RNA-Vakzinierung braucht durch die Aktivierung des Toll-like receptors-7 (TLR7) keine zusätzlichen Adjuvanzen und benötigt im Gegensatz zur DNA-Immunsierung keinen eventuell problematischen viralen Vektor.

Alle genannten Ansätze werden zurzeit in klinischen Studien auf Effektivität getestet.

Eine andere Form des Zelltransfers, die der Vakzinierung mit Tumorantigenen oder Peptiden ähnlich ist, ist die Vakzinierung mit autologen DCs. Diese werden *ex vivo* mit Tumorantigenen oder Peptiden inkubiert und präsentieren tumorspezifische Antigene über MHC-Moleküle den T-Zellen, welche dadurch wiederum aktiviert werden.

## 1.6 Passive anti-tumorale Immuntherapie

Das erste von der FDA (2010) zugelassene Immuntherapeutikum für Prostatakarzinom (Sipuleucel-T, Provenge®) stellt einen solchen autologen DC-Vakzinierungsansatz dar, wobei die Lebensverlängerung durch das Medikament allerdings nur wenige Monate beträgt [46].

## 1.6 Passive anti-tumorale Immuntherapie

### 1.6.1 Adoptiver Zelltransfer

Als Form der passiven Immuntherapie können körpereigene T-Zellen genutzt werden, welche mit dem entsprechenden Antigen *ex vivo* aktiviert und expandiert werden. Diese tumorspezifischen T-Zellen können dann isoliert und in den Patienten reinfundiert werden, um eine Tumorlyse zu induzieren. Eine besonders erfolgsversprechende Methode des T-Zelltransfers sind CAR-T-Zellen. Dafür werden autologe T-Zellen des Patienten mittels viralen Vektoren *ex vivo* mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, welches für ein membranständigen Rezeptor kodiert, der aus tumorantigenspezifischen Domänen eines Antikörpers und T-zellstimulierenden Signaldomänen besteht. Die T-Zellen exprimieren dadurch einen artifiziellen tumorspezifischen T-Zellrezeptor (CAR, engl.: *chimeric antigen receptor*) und werden dem Patienten reinjiziert. Die CAR-T-Zellen sind somit in der Lage Tumorzellen MHC-unabhängig zu detektieren und zu lysieren. Diese Art von T-Zelltransfer wird zurzeit ebenfalls in klinischen Studien getestet, dabei konnten in individuellen Heilversuchen anti-CD19 CAR-T-Zellen zu großen Erfolgen bei Leukämiepatienten führen. Jedoch ist dabei zu beachten, dass es auch schon zu erheblichen Nebenwirkungen durch die Sekretion von großen Mengen an Zytokinen kam [47, 48].

Neben den klassischen  $\alpha\beta$ -T-Zellen, können zur T-Zelltherapie auch die  $\gamma\delta$ -T-Zellen verwendet werden, welche sich *ex vivo* durch eine geringe Dosis Il-2 und Bisphosphonaten spezifisch expandieren und aktivieren lassen. Diese Methode der T-Zelltherapie wird in Abschnitt 1.7.2 näher beschrieben.

Bei der KMT (Knochenmarktransplantation) werden dem Patienten Stammzellen von Verwandten oder selektierten Fremdspendern transplantiert, nachdem das eigene Knochenmark (KM) durch eine Chemo- bzw. Strahlentherapie zerstört wurde (Konditionierung). Die KMT ist damit eine Möglichkeit ein erkranktes KM durch ein gesundes zu ersetzen. Im Laufe der Zeit wurde bemerkt, dass es dabei vorkommen kann, dass sich nach der Transplantation eine *graft versus leukemia*-Reaktion (GvL) etabliert, wobei sich die transplantierten Leukozyten gegen die Tumorzellen des Empfängers richten und so die malignen Zellen eliminieren [49]. Dieses Phänomen führte zu einem Paradigmenwechsel im Hinblick auf das Verständnis der Wirkungsweise der KMT. Jedoch kann sich nach Transplantation auch eine *graft-versus-host*-Reaktion etablieren, wobei die transplantierten Leukozyten die Organe des Empfängers angreifen [50].

## 1.7 Antikörper

### 1.6.2 Antikörpertherapie

Während sich die oben skizzierten Ansätze, bis auf die Knochenmarktransplantation, noch in der Erprobungsphase befinden ist die Immuntherapie mit Antikörpern in Teilbereichen der Onkologie fest etabliert.

Rituximab (Rituxan®), ein anti-CD20 Antikörper, konnte als erstes zugelassenes Reagenz die Überlebensrate bei malignen Lymphomen signifikant verbessern [51].

Da sich diese Arbeit mit der Generierung, Charakterisierung und Verbesserung von therapeutischen (bispezifischen) Antikörpern auseinandersetzt, werden im Weiteren die Entwicklung dieser Strategie sowie der aktuelle wissenschaftliche Stand näher beschrieben.

## 1.7 Antikörper

### 1.7.1 Historische Entwicklung

Während der 1890er Jahre beobachteten Shibasaburo Kitasato und Emil von Behring, dass das Serum von Kaninchen, welche mit abgetöteten *Corynebacterium diphtheria*, dem Erreger der Diphtherie, immunisiert wurden, infizierte Mäuse von einer Diphtherie Erkrankung heilt bzw. gesunde Mäuse vor einer selbigen schützt. Die beiden Forscher konnten auch zeigen, dass das Serum von immunisierten Kaninchen zu einer Neutralisation des bakteriell produzierten Toxins führte. Zum ersten Mal wurde dadurch erkannt, dass das Serum der immunisierten Kaninchen einen Stoff enthielt, welcher vom Organismus produziert werden konnte, nachdem er Kontakt mit dem jeweiligen pathogenen Erreger hatte. Zusammen mit Erich Wernicke entwickelte Behring das erste Konzept einer Serumtherapie gegen Diphtherie. Die ersten klinischen Studien wurden im Jahr 1891 an der Charité in Berlin durchgeführt [52]. Dies war die Grundlage zur Herstellung eines durch die Firma Hoechst entwickelten und vertriebenen immunologischen anti- Diphtheria Serums. Im Jahr 1901 wurde Behring, wegen der Entdeckung der Serumtherapie, mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt. Jedoch führte die Serumtherapie auch zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, welche „serum sickness“ genannt wird. Emil von Behring, wie auch Paul Ehrlich, entwickelten deshalb in der Folgezeit verbesserte Methoden zur Aufreinigung und zur Standardisierung der therapeutischen Wirkung von unterschiedlichen Seren.

Im Jahre 1891 entdeckten Tizzoni und Cattani einen Stoff, welcher die Fähigkeit besaß das Tetanus-Toxin zu neutralisieren. Sie prägten daraufhin den Begriff „Antitoxin“, was die unbekannte Substanz im Serum, welche vor Infektionen schützt, näher beschreiben sollte.

Paul Ehrlich veröffentlichte im Jahr 1900 sein Postulat von der Seitenkettentheorie, wobei er zum ersten Mal von der Bildung von freien Antikörpern, welche das Toxin neutralisieren können, ausging. Ehrlich nahm an, dass die Antikörper nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Toxine (Antigene) binden. Paul Ehrlich erhielt für diese Theorie 1908 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Die von Paul Ehrlich beschriebene Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip konnte einige Jahre später bestätigt werden, als nachgewiesen werden konnte, dass Antikörper sowohl an Glykoproteine wie auch an Kohlenhydrate binden können. Des Weiteren konnten Michael Heidelberger und Oswald Avery in den 1920er Jahren nachweisen, dass Antikörper Proteine sind [53].

## 1.7 Antikörper

Durch die Erfindung und Weiterentwicklung der Gelelektrophorese, mit welcher man zum Beispiel eine Proteinmischung durch die unterschiedliche elektrische Ladung der Proteine, nach ihrer Größe auftrennen kann, konnten weitere Erkenntnisse über Antikörper erlangt werden. Benutzt man Serum zur Durchführung einer Elektrophorese entstehen vier Fraktionen unterschiedlicher Mobilität: Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline. Im Jahr 1938 machten sich Tiselius und Kabat diese Methode zu nutzen, um nachzuweisen, dass Antikörper  $\gamma$ -Globuline sind.

Die Entwicklung der Ultrazentrifugation von Svedberg führte zu der Erkenntnis, dass Antikörper ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa haben, jedoch beschrieben Tiselius und Kabat in der oben genannten Veröffentlichung, dass sie Antikörper gegen Polysaccharide von Pneumokokken im Serum von Pferden in der  $\beta$ -Fraktion mit einem Molekulargewicht von fast 1000 kDa nachweisen konnten.

Die verschiedenen Größen der Antikörper wurden bis zur Entdeckung der IgM-Antikörper auf die unterschiedlichen verwendeten Spezies zurückgeführt und als Makroimmunglobuline (Ig $\mu$ ) bezeichnet. Wenig später beschrieb Jan Waldenström zwei Patienten mit einem unkontrollierten Wachstum von B-Zellen, unter anderem mit einem abnormal vorkommenden fast 1000 kDa großen Protein im Serum. Diese Erkrankung wurde als monoklonale Gammopathie beschrieben (heute als Waldenström's macroglobulinemia bekannt), und geht einher mit der krankhaften Vermehrung eines einzelnen Immunglobulins und der damit zusammenhängenden Veränderung der Serumproteine [54].

1948 beschrieb Astrid Fagraeus das Plasmazellen bei der Produktion von Antikörpern beteiligt sind.

In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden von unterschiedlichen Gruppen weitere, im folgenden aufgezählte Isotypen entdeckt und beschrieben: IgA [55], IgD [56] und IgE [57, 58].

### 1.7.2 Struktur von Antikörpern

In den 1950er und 1960er Jahren deckten Rodney Porter in Großbritannien und Gerald Edelman in den USA unabhängig voneinander die chemische Struktur von Antikörpern auf. Porter konzentrierte sich dabei auf einen spezifischen IgG Antikörper aus der Gammaglobulin-Fraktion von immunisierten Kaninchen und benutzte das Enzym Papain, welches in der Anwesenheit von dem reduzierenden Reagenz Cystein verwendet wurde, um mehr über die Antikörperstruktur zu erfahren. Durch den Verdau mit dem Enzym beobachtete Porter den Verdau des Antikörpers in drei etwa 50 kDa große Fragmente unterschiedlicher Ladung. Er konnte zeigen, dass zwei der Fragmente identisch waren, sowie Antigene banden und nannte sie daher „fragments of antigen-binding“ oder Fab-Fragmente. Das dritte Fragment kristallisierte während einer gekühlten Lagerung, wodurch Porter es „fragment crystallizable“ oder Fc-Fragment nannte [59, 60].

Edelman dagegen benutzte zur Charakterisierung der Struktur von Antikörpern denaturierende und reduzierende Reagenzien, mit welchen er Kaninchen-IgG behandelte. Dabei konnte er beobachten, dass es zur Dissoziation des Proteins in zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe kam. Edelman bezeichnete die größere Untereinheit (50 kDa) als schwere Kette (engl.: *heavy chain*) und die kleinere Untereinheit (25 kDa) als leichte Kette (engl.: *light chain*). Daraus schloss er, dass IgG Antikörper aus zwei leichten und zwei schweren Ketten bestehen, welche über Disulfidbrücken und kovalente Bindungen verknüpft sind.

Ähnliche Studien führten zu einer Bestätigung der Ergebnisse von Edelman und Porter. So benutzte Nisonoff das Enzym Pepsin, um Antikörper zu verdauen. Er stellte fest, dass der Pepsinverdau zu einem 100 kDa großen Fragment und zu vielen kleinen Fragmenten führte.

## 1.7 Antikörper

Dieses große Fragment war ebenfalls in der Lage Antigene zu binden und wurde von Nisonoff, da es wohl aus zwei Fab-Fragmenten bestand, F(ab')<sub>2</sub>-Fragment genannt. Damit konnte Nisonoff zeigen, dass die Fab-Fragmente verbunden sein mussten [61].

Zu dieser Zeit wurde eine Y-förmige Struktur des Antikörpermoleküls vermutet, welche einige Jahre später durch die Nutzung der Elektronenmikroskopie und der Röntgenbeugungsanalyse bestätigt werden konnte. Der klassische IgG Antikörper besteht demnach aus vier Polypeptidketten, wovon jeweils zwei identisch sind. Die beiden schweren Ketten werden über zwei Disulfidbrücken zusammengehalten. Gleichzeitig ist jeweils eine leichte Kette über eine Disulfidbrücke an eine schwere Kette gebunden.

Die leichte wie auch die schwere Kette lassen sich in unterschiedliche Domänen unterteilen, die sogenannten Immunglobulin-Domänen. Diese Ig-Domänen bestehen aus 2 $\beta$ -Faltblättern (Immunglobulin-Faltung), welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind und jeweils aus ca. 110 Aminosäuren bestehen.

Bei der Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass die Aminosäuresequenz jeder Kette zwischen unterschiedlichen Antikörpern und auch zwischen Antikörpern verschiedener Spezies große Bereiche enthielt die identisch waren. Diese Konstante wurde die konstante Domäne (engl.: *constant region*) genannt. Es wurde auch ein Bereich am N-terminalen Ende der leichten und der schweren Kette identifiziert, welcher bei allen Antikörpern eine ähnliche Größe hatte, jedoch in der Aminosäuresequenz komplett unterschiedlich war. Dieser Teil wurde die variable Domäne (engl.: *variable region*) genannt. Weitere Sequenzierungsstudien zeigten, dass fast alle Spezies zwei unterschiedliche leichte Ketten bilden können, die  $\kappa$ - oder die  $\lambda$ -Kette [62, 63].

Die leichte Kette lässt sich also in zwei Domänen V<sub>L</sub> (*variable light*) und C<sub>L</sub> (*constant light*) unterteilen. Im Gegensatz dazu besteht die schwere Kette eines IgG Antikörpers aus vier Domänen. Der V<sub>H</sub> (*variable heavy*) und den drei konstanten Domänen C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub> (*constant heavy*). Die C<sub>H1</sub> und die C<sub>H2</sub> sind dabei über eine flexible hinge-Region verbunden.

Wu und Kabat beschrieben 1970, dass jede variable Kette drei hypervariable Regionen (HV1-3, engl.: *complementarity determining region*, CDR1-3) besitzt, welche für die Antigenbindung unerlässlich sind und von weniger variablen Domänen den sogenannten *framework-regions* (FR1-4) umgeben sind [64]. Die CDRs 1-3 der leichten wie der schweren variablen Domäne bilden zusammen die Antigenbindungsstelle (Paratop). Die hypervariablen Domänen sind Grundlage der Antikörperspezifität.

Diese hohe Diversität kommt durch das zufällige Zusammenlagern von unterschiedlichen Gensegmenten zustande, welche für die variablen Domänen der Antikörper kodieren (somatische Rekombination) [65]. Die Gensegmente, die die variable Region der leichten Kette kodieren, werden mit V und J bezeichnet (engl.: *variabel* und *joining*). Das V-Segment bestimmt dabei die CDR1- und CDR2-Region der Antigenbindungsstelle. Die CDR3-Region wird durch das V- und das J-Segment festgelegt. Die V-Region der schweren Kette wird durch drei Gensegmente kodiert. Zusätzlich zu V und J gibt es hier noch das D-Segment (engl.: *diversity*), das zwischen dem V- und dem J-Segment liegt. Es bestimmt zusammen mit dem V- und J-Segment die CDR3-Region (V<sub>H</sub>: V, D, J; V<sub>L</sub>: V, J).

Die Anzahl der V- und J-Gene beträgt für die leichte  $\kappa$ -Kette V 34-38, J 5 und für die leichte  $\lambda$ -Kette V 29-33, J 4-5. Für die schwere Kette beläuft sich die Anzahl der Segmente auf V 38-46, D 23 und J 6. Dies ermöglicht eine möglichst große Zahl verschiedener Antikörpermoleküle. Dieser Rekombinationsmechanismus erlaubt die „Konstruktion“ von zahlreichen variablen Regionen mit Hilfe einer begrenzten Zahl von rekombinierbaren Genen. Bei der Verknüpfung in der B-Zelle kommt es dann zu einer zufälligen Rekombination der unterschiedlichen V-, D- und J-Segment, was die hohe Anzahl der kodierbaren Antikörperspezifitäten ermöglicht.

## 1.7 Antikörper

Bei der Rekombination werden an den Verknüpfungstellen eine zufällige Anzahl von Nukleotiden eingefügt oder entfernt, was einen weiteren Mechanismus zur Erhöhung der Antikörpervielfalt darstellt (Antikörperrepertoire mindestens  $10^{11}$ ). Des Weiteren kommt es in aktivierten B-Zellen, welche Kontakt mit dem entsprechenden Antigen hatten, zur somatischen Hypermutation. Bei der somatischen Hypermutation werden in das gesamte Exon der variablen Domäne Punktmutationen eingefügt, welche die Affinität und das Spezifitätsrepertoire von Antikörpern noch weiter erhöhen können [66].

Wie bereits beschrieben, lässt sich die leichte Kette in zwei Subklassen ( $\kappa$  oder  $\lambda$ ) einteilen. Die schwere Kette dagegen kann in fünf unterschiedliche Isotypen:  $Ig\mu$ ,  $Ig\delta$ ,  $Ig\gamma$ ,  $Ig\epsilon$  oder  $Ig\alpha$  unterteilt werden. Alle fünf Immunglobulingruppen können als Transmembranantigenrezeptoren oder sezernierte Antikörper auftreten. Diese unterscheiden sich durch die Lokalisierung der Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten, die Zahl der angehängten Oligosaccharid-Gruppen, das Molekulargewicht ( $Ig\mu$  950 kDa,  $Ig\delta$  175 kDa,  $Ig\gamma$  150 kDa,  $Ig\epsilon$  190 kDa oder  $Ig\alpha$  160 kDa) und der konstanten Domänen sowie die Länge der hinge-Region und das Vorkommen im menschlichen Körper. Zum Beispiel kommt der  $Ig\gamma$ -Antikörper am häufigsten im Serum von Menschen vor (75-85 % des Gesamt-Immunglobulins), kann das Blutgefäß verlassen und in benachbartes Gewebe penetrieren und besitzt im Vergleich zu den anderen Antikörpergruppen die längste Halbwertszeit im Serum. Diese Eigenschaften machen den  $Ig\gamma$ -Antikörper als therapeutisches Reagenz interessant und somit zum bevorzugten Antikörpertyp. Außerdem besitzen die  $Ig\gamma$ -Antikörper unter anderem anti-tumorale Wirkmechanismen, die hauptsächlich über die Rekrutierung von Immunzellen durch den Fc-Teil des Antikörpers erfolgen, welche im Folgenden weiter erläutert werden.

### 1.7.3 Wirkmechanismen von IgG-Antikörpern

Die natürliche Funktion von Antikörpern ist den Organismus vor Pathogenen (Viren, Bakterien) zu schützen, indem sie die Pathogene, durch Bindung an ein pathogenassoziertes Antigen, für Immunzellen markieren (Fc-Teil abhängig) oder das Pathogen (Fc-Teil unabhängig) neutralisieren.

Zu den Fc-Teil unabhängigen Wirkmechanismen zählt, dass Antikörper allein durch die Bindung wirken können, indem sie zum Beispiel ein bakterielles Toxin oder ein für das Pathogen wichtiges Membranprotein (zum Beispiel zum Binden an eine Wirtszelle) neutralisieren.

Fc-Teil abhängige Wirkmechanismen beinhalten die Zielzellyse durch die Induktion des klassischen Wegs der Komplementkaskade sowie die Aktivierung von Immunzellen durch die Multimerisierung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf der Oberfläche von immunologischen Effektorzellen.

Der klassische Weg der Komplementkaskade, auch Komplement-vermittelte Zytotoxizität (engl.: *complement-dependent cytotoxicity, CDC*) genannt, wird induziert, indem mindestens zwei  $Ig\gamma$  Antikörper, die an ein Oberflächenprotein einer Zelle gebunden haben, mittels des Fc-Teils ( $C_H2$ ) an  $C1q$  binden, wodurch die Komplementkaskade in Gang gesetzt wird. Schlussendlich bildet sich der Membranangriffskomplex (engl.: *complement membrane attack complex, MAC*), welcher Poren in die Membran der Zielzelle induziert, sodass die Zelle lysiert wird. Während der Aktivierung der Komplementkaskade entstehen auch Spaltprodukte (wie zum Beispiel  $C3b$  und  $C4b$ ), welche die Zielzellen opsonieren und dadurch von Makrophagen und Neutrophilen mittels Phagozytoserezeptoren erkannt und phagozytiert werden. Dieser Mechanismus wird als Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (engl.: *complement-dependent cellular cytotoxicity, CDCC*) bezeichnet [67].



## 1.7 Antikörper

Ein weiterer Fc-Teil abhängiger Wirkmechanismus, um nicht neutralisierbare Pathogene aus dem Organismus zu entfernen, ist die Aktivierung von Immunzellen durch die Multimerisierung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf der Oberfläche von immunologischen Effektorzellen. Einer Vielzahl von Effektorzellen können mittels Igy-Antikörper durch sogenannte Fc $\gamma$ -Rezeptoren, welche für das Fc-Fragment spezifisch sind, aktiviert werden. Fc $\gamma$ -Rezeptoren werden bis auf  $\alpha\beta$ -T-Zellen von fast allen hämopoetischen Zellen exprimiert. Die Fc $\gamma$ -Rezeptoren bilden eine Familie von Oberflächenmolekülen, welche an den Fc-Teil (C<sub>H</sub>2, teilweise überlappend mit der C1q Bindungsstelle) von Antikörpern binden und aus vier Molekülen bestehen: drei aktivierenden Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32) Fc $\gamma$ RIII (CD16) und einem hemmenden Rezeptor Fc $\gamma$ RII, welcher in zwei unterschiedlichen Splice-Varianten (Fc $\gamma$ RII-B1, Fc $\gamma$ RII-B2) vorkommt.

Die aktivierenden, wie auch die inhibierenden Rezeptoren, sind auf den meisten hämopoetischen Zellen koexprimiert, um ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inhibition zu gewährleisten. Nur B- und NK-Zellen bilden eine Ausnahme. B-Zellen exprimieren nur den hemmenden Fc $\gamma$ RII-B1-Rezeptor und NK-Zellen nur den aktivierenden Fc $\gamma$ RIII-Rezeptor. Da NK-Zellen nur den aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptor exprimieren, gelten sie mittlerweile als die wichtigsten Zellen bei der Antikörper-vermittelten Lyse (engl.: *antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) [68].

Die Antikörper-vermittelte Lyse wird ausgelöst, indem der Fc $\gamma$ RIII-Rezeptor an einen immobilisierten Antikörper auf der Zielzelle bindet. Die darauffolgende Multimerisierung der Rezeptoren führt zur Aktivierung der NK-Zellen und zur Lyse der antikörpergebundenen Zielzellen durch die Ausschüttung von Perforin und Granzym [69-71].

Nicht nur NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der ADCC. Mittlerweile wird angenommen, dass auch andere Fc $\gamma$ -exprimierende Rezeptoren involviert sind. So wird der Fc $\gamma$ RIII-Rezeptor auch von  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert. Die Fähigkeit dieser T-Zellsubpopulation ADCC *in vitro* zu vermitteln wurde bereits belegt [72].

Auch Makrophagen, Monozyten und Granulozyten (insbesondere Neutrophile) können Zielzellen, an die ein Antikörper gebunden hat, erkennen und phagozytieren. Dies wird als Antikörper-vermittelte zelluläre Phagozytose (engl.: *Antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP*) bezeichnet [73, 74].

Dieser Prozess kann unter anderem auch die adaptive Immunantwort stimulieren, indem nach der Phagozytose Peptide der Zielzellen über die HLA-Klasse I Moleküle den T-Zellen präsentiert werden (engl.: *cross-presentation*), die dadurch aktiviert werden können. Als antigenpräsentierende Zellen sind in diesem Zusammenhang Makrophagen, Monozyten, dendritische- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben worden [75, 76].

Die oben beschriebenen Antikörper-vermittelten Mechanismen, sind die wesentliche Grundlage für die Wirkung der bisher in der Krebstherapie etablierten Antikörper wie Rituxan ( $\alpha$ -CD20 Antikörper) oder auch Herceptin ( $\alpha$ -HER2/neu Antikörper), welche zu großen Erfolgen bei einigen Krebsarten führten.

### 1.7.4 Therapeutische Antikörper

Das Konzept von Köhler und Milstein (1975) Plasmazellen und Myelomzellen zu fusionieren und so immortalisierte Zelllinien zu erhalten, die kontinuierlich monoklonale Antikörper sezernieren, ist der Grundstein der heutigen Antikörpertherapie [77].

Im Jahre 1986 wurde der erste monoklonale Antikörper therapeutisch eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen murinen Igy-Antikörper gegen CD3, einem Membranprotein auf der

## 1.7 Antikörper

Zelloberfläche von T-Zellen. Muromonab-CD3 (Handelsname Orthoclone OKT3®) wurde zur immunsuppressiven Behandlung bei einer akut auftretenden Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen verwendet.

Weitere Maus-Antikörper, wie zum Beispiel Edrecolomab (anti-EpCAM), wurden ebenfalls therapeutisch getestet. Jedoch blieb der klinische Erfolg meist aus, was einerseits an der schwächeren Bindung der humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an den murinen Fc-Teil hängt, andererseits werden die Maus-Antikörper vom menschlichen Körper als „fremd“ erkannt und durch die Bildung von Human- $\alpha$ -Maus-Antikörpern (HAMA) eliminiert [78].

Durch Fortschritte der rekombinanten Antikörpertechnologie in den frühen 1990er Jahren wurde es möglich die Gene der konstanten Domänen der humanen Igy-Antikörper und die variablen Domänen der Maus-Antikörper zu klonieren, diese miteinander zu kombinieren und in eukaryotischen Zellen zu produzieren, sodass chimärisierte Antikörperformate entstanden [79]. Diese chimärisierten Antikörper besitzen einen ausschließlich humanen Fc-Teil, wodurch die Immunogenität reduziert und die Fc $\gamma$ -Rezeptor Interaktion erhöht wird. Ein solcher chimärisierter Antikörper ist Rituximab (MabThera®), welcher an CD20 bindet und das Überleben von Patienten mit malignen Lymphomen signifikant verbessert.

Mit der weiteren Entwicklung der Molekularbiologie konnte der murinen Teil weiter reduziert werden. Dabei werden die CDRs des Mausantikörpers, welche für die Antigenbindung verantwortlich sind, in ein Gerüst der humanen variablen Region, bestehend aus *framework-regions*, transferiert [80]. Diese Antikörper sind zu 85-90 % human und sind im Vergleich zu den chimärisierten Antikörpern weniger immunogen.

Mittlerweile ist es auch möglich *in vitro* vollhumane Antikörper mittels der „*phage-display-technology*“ zu erzeugen. Dafür werden große Gen-Bibliotheken aus humanen variablen Domänen (V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>) erstellt und auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass keine Mäuse immunisiert werden müssen, jedoch findet hierbei auch keine natürliche Affinitätsreifung statt. Um den Vorgang der Affinitätsreifung zu gewährleisten und trotzdem vollhumane Antikörper zu erhalten, können transgene „humanisierte“ Mäuse zur Antikörper Generierung verwendet werden. Bei diesen Mäusen werden alle Gen-Loci für Maus Immunglobuline durch humane Gen-Loci ersetzt, wodurch die Mäuse nach Kontakt mit dem Antigen vollhumane Antikörper ausbilden und Hybridomzelllinien generiert werden können, die humane Antikörper sezernieren [81].

Um die Effektoreigenschaften der beschriebenen Antikörpermoleküle zu verbessern, gibt es mittlerweile die Möglichkeit Fc-optimierte Igy-Antikörper zu generieren, bei welchen die Affinität der Fc-Teile zu den aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren erhöht ist. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist der gezielte Austausch von Aminosäuren im Fc-Teil von Antikörpern. Die Firma Xencor generierte so eine Variante, bei der zwei Aminosäuresubstitutionen (S239D/I332E) ausreichen, um eine erhöhte Affinität zu den Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu erhalten und die ADCC beziehungsweise ADCP, im Vergleich zu einem nicht Fc-optimierten humanen Igy-Antikörper, um das 100-fach zu steigern [82].

Ein alternatives Verfahren die Affinität zu verbessern ist die Glykooptimierung. Ausgangspunkt für diesen Ansatz war die Erkenntnis, dass Fructosereste im Zuckerkomplex am Fc-Teil zu einer reduzierten ADCC führen. Diese Erkenntnis führte dazu, dass Zelllinien mit einer Gendelektion (*FUT8*) entwickelt wurden, um Antikörper ohne die Fructosereste und mit verbesserter ADCC zu produzieren. Ein auf diese Art veränderter monoklonaler Antikörper (Obinutuzumab) zeigte bereits in einer Studie verbesserte Ergebnisse bei der Behandlung von CLL Patienten [83].

Eine weitere Möglichkeit der Effizienzsteigerung besteht darin monoklonale Antikörper über einen Linker mit einem Toxin zu verbinden, um so die Spezifität eines Antikörpers mit der

## 1.7 Antikörper

Aktivität des Toxins zu verbinden. Diese Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (engl.: *Antibody-drug-conjugate, ADC*) werden von der Tumorzelle aufgenommen, wodurch es intrazellulär zur enzymatischen Spaltung des Linkers und zur Freisetzung des wirksamen Toxins kommt. Als Toxin wird zum Beispiel DM-1 ein Derivat des Maytansins verwendet, welches ein Tubulininhibitor darstellt und dadurch den Zellzyklus der Tumorzelle blockiert [84].

Beeindruckende Ergebnisse wurden auch mit sogenannten Immunozytokinen (engl.: *Immunocytokines*) beschrieben. Dabei werden Zytokine wie Il-2, Il-15, IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  an Antikörperkonstrukte fusioniert. Diese Immunozytokine haben über die Zytokine das Potenzial direkt am Tumor Immunzellen zu aktivieren [85-87].

Mit den bisher genannten Ansätzen konnten zwar Fortschritte erreicht werden, allerdings nur bei einzelnen Tumorarten. Limitierend für die Effektivität solcher Antikörperkonstrukte ist dabei die Anzahl und Zugänglichkeit von Effektorzellen (NK-Zellen), welche über den Efforterteil (Fc-Teil) der Antikörper rekrutiert werden. Des Weiteren infiltrieren diese Zellen schlecht in etablierte solide Tumore [88]. Möglicherweise könnten bispezifische Antikörper, die simultan zytotoxische T-Zellen, welche über den Fc-Teil nicht rekrutiert werden können, und Tumorzellen binden, effektiver sein.

### 1.7.5 Bispezifische Antikörper

Eine Weiterentwicklung der monospezifischen Antikörper stellen die bispezifischen Antikörper dar. Bispezifische Antikörper zeichnen sich durch ihre Eigenschaft aus an zwei unterschiedliche Zielantigene zu binden. Dabei kann der bispezifische Antikörper gleichzeitig z.B. an ein tumorassoziiertes und an einen immunstimulatorisches Antigen binden, wodurch Effektorzellen direkt am Tumor aktiviert werden können. Durch die Verwendung bestimmter Antikörperfragmente kann so gut wie jede Zellpopulation als Effektorzelle (NK-Zellen, Makrophagen und Monozyten über die Bindung an CD16 oder neutrophile Granulozyten über die Bindung an Fc $\alpha$ RI oder Fc $\gamma$ RI) rekrutiert werden, insbesondere T-Zellen, die als besonders effizient gelten und wegen fehlender Fc-Rezeptoren von monospezifischen Antikörpern nicht aktiviert werden können. Zur gezielten Zielzell-restringierten T-Zellaktivierung werden T-Zellen über die Bindung an das Oberflächenmolekül CD3 rekrutiert und aktiviert [89, 90]. Am erfolgreichsten erscheinen aber T-Zellen, da sie die Fähigkeit besitzen Tumorzellen effektiv zu lysieren und gleichzeitig stark proliferieren können, wodurch sich das Ziel-Effektorzellverhältnis verbessert.

Die ersten bispezifischen Antikörper wurden bereits in den frühen 1980er Jahren generiert. Dabei handelt es sich um die chemische Heterokonjugation aus einem monoklonalen Antikörper gegen ein tumorassoziiertes Antigen und CD3. Dadurch konnten T-Zellen als Effektorzellen zu Tumorzellen rekrutiert werden, welche normalerweise nicht von Antikörpern als Effektorzellen genutzt werden können. Da diese Art von Antikörpern über einen funktionellen Fc-Teil verfügen, kam es in Anwesenheit von Fc $\gamma$ -exprimierenden Zellen zu einer T-Zellaktivierung und zur Eliminierung der Fc $\gamma$ -exprimierenden Zellen [91]. Um dies zu verhindern, wurden Methoden zur chemischen Heterokonjugation entwickelt, die ohne einen Fc-Teil generiert werden konnten. Dazu wurden zunächst F(ab)<sup>2</sup>-Fragmente hergestellt, welche anschließend zu F(ab)'-Fragmenten reduziert wurden und schließlich mit einem F(ab)'-Fragment einer anderen Spezifität wieder hybridisiert wurden. Mittels dieser bispezifischen Antikörperkonstrukte konnte zum ersten Mal die ziel-gerichtete und MHC-unabhängige Lyse von Zielzellen durch Maus-T-Zellen oder prästimulierten humanen T-Zellen nachgewiesen werden [90, 92].

## 1.7 Antikörper

Eine weitere Strategie zur Herstellung von bispezifischen Antikörpern wurde etwa zur gleichen Zeit wie die chemische Konjugation beschrieben.

Dafür wurden zwei Hybridome miteinander fusioniert. Die dabei entstandenen Hybrid-Hybridome (Quadrome) produzierten zwei unterschiedliche leichte beziehungsweise schwere Ketten. Die Assoziation von schwerer und leichter Kette geschah zufällig, was zu einer Mischung an monospezifischen und bispezifischen Antikörpern führte [93, 94]. Ein durch die Fusion zweier Hybridome entstandener Antikörper ist Catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3, Removab®). Catumaxomab besteht aus murinen sowie Ratten-stämmigen Immunglobulin-Ketten. Durch die Verwendung von Ratte und Maus Quadromen entstehen weniger unerwünschte und inaktive Nebenprodukte. Des Weiteren führt es zu einem maßgeblich vereinfachten Aufreinigungsprozess das nur murine, nicht aber Ratten-stämmige Ketten an Protein A binden können. Catumaxomab erhielt im Jahr 2009 in Europa die Zulassung zur Behandlung von malignem Aszites [95].

Wie auch bei den monospezifischen Antikörpern, machte es der Fortschritt der Molekularbiologie möglich, bispezifische Antikörperkonstrukte rekombinant herzustellen und in eukaryotischen Zellen produzieren zu lassen. Dadurch wurde es möglich die Größe der Antikörperkonstrukte zu variieren. So entstanden die ersten artifiziellen Antikörperformate [96]. Generell wird angenommen, dass mit abnehmender Größe eines Antikörperfragments eine bessere Tumorpenetration und günstigere Pharmakokinetik erreicht wird. Die Serumhalbwertszeit wird durch die fehlende Interaktion mit dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) allerdings stark reduziert und beträgt nur wenige Stunden [97].

Auch bispezifische Antikörperreagenzien, die kleiner waren als Fab-Fragmente, wurden entwickelt. Voraussetzung für die Generierung von kleinen Antikörperderivaten war die Entwicklung von sogenannten *single chain* Fv-Molekülen (scFv). Dabei handelt es sich um eine minimalste antigenbindende Einheit, wobei die V<sub>H</sub>- und die V<sub>L</sub>-Domäne über einen Peptid-Linker verbunden sind [98]. Solche Moleküle werden je nach Anordnung der einzelnen Domänen als bispecific scFv (bsscFv; bestehend aus einer Polypeptidkette) oder als *bispecific Diabody* (bsDiabody; bestehend aus zwei Polypeptidketten) bezeichnet. Bei diesen Antikörperderivaten ist die Bindungsstärke, im Vergleich zu Fab-Fragmenten, welche durch die zusätzlichen Verbindungen zwischen C<sub>H</sub>1 und C<sub>L</sub> profitieren, häufig schwächer. Häufig kommt es auch zu unerwünschten Oligomerisierungen [99].

Der Prototyp bispezifischer Antikörper dieser Art stellt Blinatumomab (Blinicyto®, Amgen) dar. Dabei handelt es sich um einen bispezifischen Antikörper mit den Spezifitäten CD19xCD3, welcher zu großen Erfolgen in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) führte und mittlerweile zur Behandlung dieser Erkrankung zugelassen wurde.

In den letzten zwei Dekaden wurden darüber hinaus zahlreiche neue Antikörperformate entwickelt, welche sich in Größe, Halbwertszeit, Pharmakokinetik, Tumorpenetration und Anzahl der Bindungsstellen unterscheiden (Abb. 1.1).

## 1.7 Antikörper

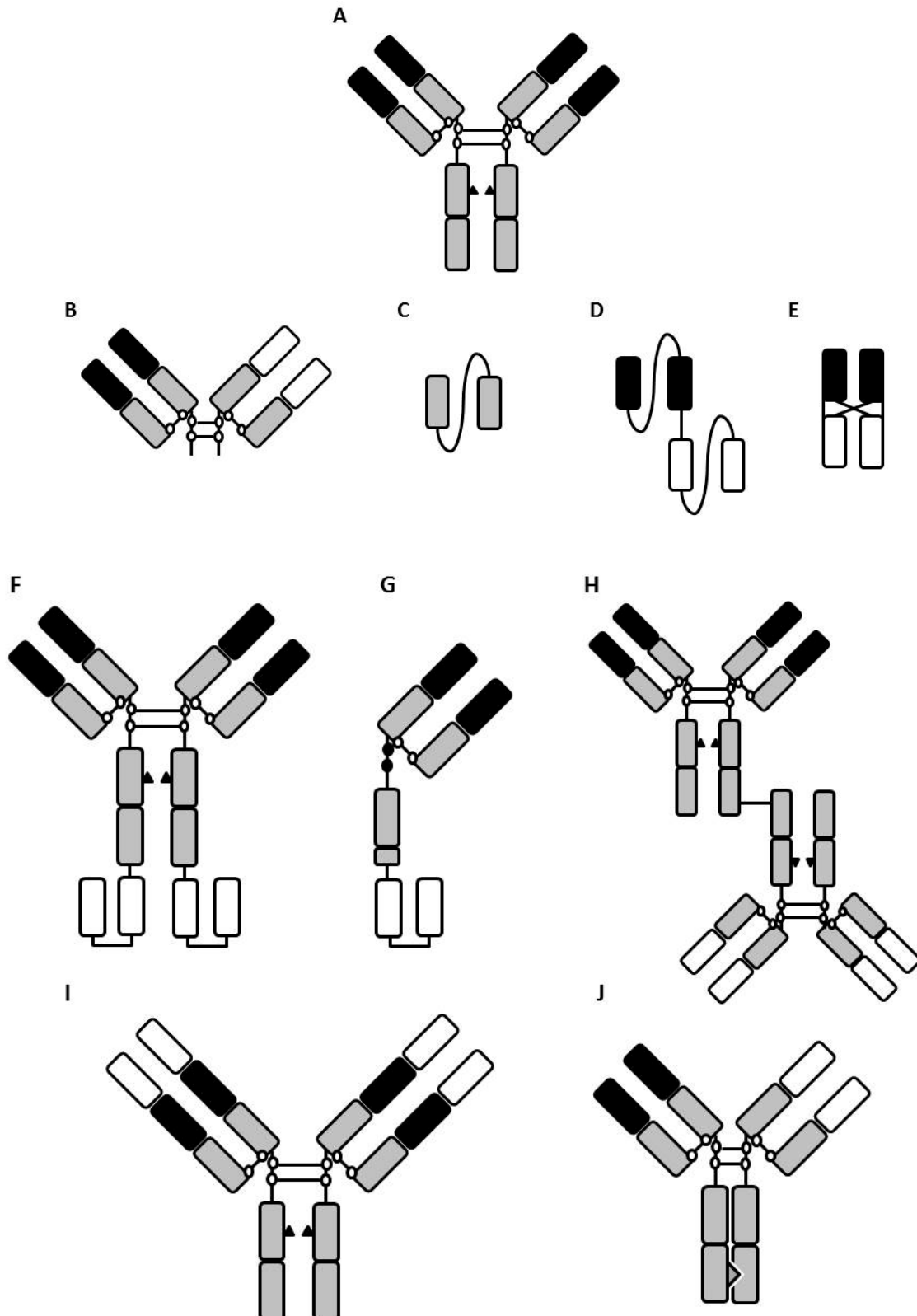


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines IgG und verschiedener bispezifischer Antikörperkonstrukte

- A) Struktur eines monospezifischen Ig $\gamma$ -Antikörpers
- B) Chemisch konjugiertes  $F(ab')_2$
- C) *single chain* Fragment (scFv)

## 1.7 Antikörper

- D) BiTE-Molekül, bestehend aus zwei scFv-Fragmenten
- E) DART-Format, zwei scFv, verbunden mit einem kürzeren Linker
- F) Tetravalentes IgGsc-Format
- G) Fabsc-Format
- H) Heterokonjugat, bestehend aus zwei monoklonalen Antikörpern
- I) DVD-Ig-Format
- J) Knob-into hole-Format

Bei den meisten neu entwickelten Formaten müssen allerdings klinische Studien die Wirksamkeit der entsprechenden Konstrukte noch klären [100].

Diese Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Generierung von neuen bispezifischen Antikörpern zur Tumortherapie, welche T-Zellen und auch spezifisch die Subpopulation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen rekrutieren.

Im Folgenden werden die zellbiologischen Grundlagen der T-Zellaktivierung näher erläutert. Da die vorliegende Arbeit nicht nur  $\alpha\beta$ -T-Zellen zur bispezifischen Antikörpertherapie nutzt, sondern auch spezifisch die Subpopulation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen, wird in einem eigenen Kapitel auf diese Zellen näher eingegangen.

### 1.7.6 Physiologische und Antikörper-abhängige T-Zellaktivierung

T-Zellen erkennen unter physiologischen Bedingungen, mittels des T-Zellrezeptors (TCR), antigenbeladene MHC-Komplexe auf den Zielzellen. Der TCR besteht dabei aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ - beziehungsweise  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Die Ketten des TCRs besitzen je eine Immunglobulin-Domäne im konstanten und im variablen Teil, eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytosolischen Teil am C-Terminus. Weder die  $\alpha$ - noch die  $\beta$ -Kette verfügen über die Fähigkeit zur Signaltransduktion. Dazu ist der  $\alpha\beta$ -TCR, wie auch der  $\gamma\delta$ -TCR, mit den Proteinen des CD3-Komplexes assoziiert. Der CD3-Komplex besteht aus je einem  $\gamma\epsilon$ - und einem  $\delta\epsilon$ -Heterodimer. Diese Ketten besitzen im zytoplasmatischen Bereich spezielle Sequenzmotive, die sogenannten Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenzen (engl.: *immuno tyrosine-based activation motifs*; ITAMs). Die Tyrosinreste dieser ITAMs werden nach TCR-Aktivierung phosphoryliert und dienen dann der Signalübertragung [101-103].

Schon in den 1980er Jahren konnte bewiesen werden, dass es möglich ist T-Zellen mit einem monoklonalen anti-CD3 Antikörper zu aktivieren [104]. Dieser Effekt kam zustande, indem der Antikörper, mittels des Fc-Teils, an Fc $\gamma$ -exprimierende Zellen band und somit dort immobilisiert wurde. Durch die Bindung von mehreren Antikörpern auf der Zelloberfläche von den Fc $\gamma$ -exprimierenden Zellen, kommt es zur Quervernetzung der TCR-CD3-Komplexe und zur Aktivierung von T-Zellen [105].

Bei der T-Zellaktivierung mittels bispezifischen Antikörpern wird das gleiche Prinzip angewendet, hierbei kommt es durch die Bindung an das tumorassoziierte Antigen und simultan an den CD3-Rezeptor ebenfalls zur Quervernetzung des Rezeptors, was zu einer Aktivierung der T-Zelle führt.

Nach der Aktivierung kann die T-Zelle die maligne Zelle durch die Sekretion von Perforin und Granzyme lysieren. Daneben kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, welche einerseits weitere Effektorzellen rekrutieren, die wiederum anti-tumoral Wirken können, oder andererseits durch die Bindung an die Tumorzellen Apoptose induzieren können. Gleichzeitig wird die Proliferation der T-Zellen durch die Aktivierung induziert.

Die bispezifische Strategie ermöglicht es demnach eine MHC-unabhängige Eliminierung der Tumorzellen durch T-Zellen zu induzieren. Die Aktivierung einer großen Zahl an T-Zellen kann

## 1.8 $\gamma\delta$ -T-Zellen

allerdings auch Probleme verursachen, da alle aktivierten T-Zellen in der Folge proinflammatorische Zytokine sezernieren, was zu einem Zytokin-Freisetzungssyndroms (engl.: Cytokine release syndrome) führen kann [106].

Die Arbeit beschäftigt sich in einem zweiten Teil mit der Generierung von Antikörpern gegen die  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation, welche lediglich 1-10 % aller T-Zellen ausmacht. Damit soll eine überschießende T-Zellreaktion verhindert werden.

### 1.8 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden im Jahr 1986 von Brenner et al. erstmals beschrieben [107]. Im selben Jahr wurde entdeckt, dass der exprimierte zweite T-Zellrezeptor ebenfalls mit dem CD3-Rezeptor assoziiert ist [108]. Zu dieser meist CD4- und CD8-T-Zellsubpopulation werden etwa 1 % bis 10 % der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen des peripheren Blutes gezählt [109].

Der  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor wird analog wie bei den  $\alpha\beta$ -T-Zellen durch somatische Rekombination (V-, D-, J-Segmente) zusammen gefügt. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen lassen sich anhand der V $\gamma$ - und V $\delta$ -Segmente in unterschiedliche Gruppen einteilen. Im Menschen sind elf V $\gamma$ - und drei V $\delta$ -Gene kodiert, im Vergleich dazu können 41 V $\alpha$ - und 30 V $\beta$ -Gene für den  $\alpha\beta$ -TCR kodieren.

Die unterschiedlichen  $\gamma\delta$ -TCR-Kettenkombinationen werden gewebspezifisch exprimiert. So exprimieren zum Beispiel die meisten intraepithelialen  $\gamma\delta$ -T-Zellen der nasalen Mukosa sowie des Dünn- und Dickdarms den V $\delta$ 1-T-Zellrezeptoren, wohingegen etwa 90 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR exprimieren [110].

$\gamma\delta$ -T-Zellen übernehmen eine Reihe von physiologischen Aufgaben. So konnte in Mausmodellen, welche defizient für  $\gamma\delta$ -T-Zellen waren, gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen den Organismus vor extra- und intrazellulären Pathogenen sowie vor der Entwicklung von einer Vielzahl von Tumoren schützen können. Jedoch wird eine Subpopulation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche IL-17 produzieren, eher mit Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht [111].

#### 1.8.1 Antigenerkennung und Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2)

$\gamma\delta$ -T-Zellen können dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden. Sie erkennen eine Vielfalt von strukturell unterschiedlichen Liganden.  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen, wie die Zellen des angeborenen Immunsystems, weit verbreitete, konservative, nicht-peptidische Antigene, die das Pathogen selbst oder infizierte, transformierte Körperzellen exprimieren. Nach Antigenkontakt zeigen die  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine MHC-unabhängige Immunreaktion [112]. Die Antigene werden nicht ausschließlich vom  $\gamma\delta$ -TCR erkannt, daher exprimieren die  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *pattern recognition receptors*), welche pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl.: *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) oder Gefahrensignale (engl.: *danger-associated molecular pattern*, DAMP) auf infizierten oder nekrotischen Zellen erkennen und dadurch eine Immunreaktion gegen die Zellen auslösen [113].

Bis heute ist wenig über die genaue Spezifität und die Art und Weise der Antigenerkennung durch den  $\gamma\delta$ -TCR bekannt. Jedoch konnte schon in frühen Arbeiten gezeigt werden, dass Lysate von gram<sup>+</sup>, gram<sup>-</sup>-Bakterien und Protozoen zu einer Proliferation der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen führte. Daraufhin wurden die mikrobiellen Antigene, auf Grund ihrer starken aktivierenden Eigenschaften, näher untersucht. Dabei wurden nicht-peptidische Antigene mit einer essentiellen Phosphatgruppe, sogenannte Phosphoantigene, als Liganden des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCRs

## 1.8 $\gamma\delta$ -T-Zellen

identifiziert [114]. Neben Isopentylpyrophosphat (IPP) konnten weitere intermediäre Metabolite des Mevalonatstoffwechsels als Antigene festgestellt werden [115]. IPP ist der ubiquitäre Schlüsselmetabolit in der Synthese von Cholesterol, Steroiden und Vitaminen, der in fast allen Zellen von Pro- und Eukaryonten durch den klassischen Mevalonatstoffwechsel hergestellt wird. Die Phosphoantigene werden in einer Vielzahl von Mikroorganismen über den DOXP-Syntheseweg (1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat) synthetisiert und führen bereits in geringen Konzentrationen nach Kontakt zur Expansion und Aktivierung der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen [116]. Wie erwähnt produzieren die eukaryotischen Zellen ebenfalls Phosphoantigene über den Mevalonatstoffwechsel, jedoch sind die  $\gamma\delta$ -T-Zellen um das 1000-fach sensitiver gegenüber bakteriellen Phosphoantigenen, sodass eine spezifische Aktivierung nur durch infizierte Zellen gewährleistet ist [115, 117].

Durch eine Dysregulation des Mevalonatzyklus in manchen Tumorzellen kommt es zur erhöhten Synthese von IPP, wodurch transformierte Zellen selektiv von  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt und lysiert werden können [113].

Neben Phosphoantigenen interagiert der  $\gamma\delta$ -TCR auch mit MHC-Molekülen und MHC-ähnlichen Molekülen, wie beispielsweise dem humanen CD1c, aber auch mit anderen Proteintypen, wie herpesviralen Glykoproteinen oder heteromeren ATPase-Komplexen (F1-ATPase) [118].

Die Aktivierung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen findet darüber hinaus nicht ausschließlich über ihren TCR statt, sondern auch über eine Reihe von nicht-klonalen Mustererkennungsrezeptoren. Dabei ist der NKG2D-Rezeptor (engl.: *natural killer group 2, member D*), welcher zur Gruppe der NK-Zellrezeptoren gehört und neben seiner Expression auf NK-Zellen in großer Zahl auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu finden ist von spezieller Relevanz. Die Liganden des NKG2D-Rezeptors sind konservierte MHC-ähnliche Liganden, zu ihnen zählen die stress-induzierten Moleküle MIC-A und MIC-B, *unique long 16 binding protein* (ULBP) und das *retinoic acid early transcript 1* (RAE1), welche von verschiedenen Tumorzellen und infizierten Zellen exprimiert werden [112].

Die Expression des Liganden von NKG2D wurde an einer Reihe epithelialer Tumore sowie auf gewissen hämatologischen Neoplasien nachgewiesen [119-121]. Der NKG2D Rezeptor dient dabei nicht nur als kostimulatorisches Signal für eine TCR-Antigen-Bindung, sondern kann auch direkt – unabhängig vom TCR – V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen aktivieren [122].

Das gemeinsame Merkmal sämtlicher, bis dato beschriebener, Liganden liegt darin, dass sie alle aufgrund einer Infektion oder einer zellularen Fehlregulation von den betroffenen Körperzellen hochreguliert werden und somit als Gefahrensignal fungieren (DAMPs). Jedoch exprimieren die meisten  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch inhibitorische Rezeptoren (z.B. NKG2A), deren spezifische Interaktion mit verschiedenen MHC Klasse I Allelen (v.a. HLA-C Allele) auf den Zielzellen durch ein negatives Signal die Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zelle und somit deren Effektorfunktion unterdrückt, bzw. dazu führt, dass eine fehlende MHC-Klasse I Expression durch ein fehlendes negatives Signal zu einer Verstärkung der Effektorfunktion beiträgt (so genanntes „missing self“ Konzept). Daudi-Zellen (Burkitt-Lymphom) exprimieren keine MHC-I-Moleküle und sind deswegen äußerst suszeptibel für die  $\gamma\delta$ -T-Zellen-vermittelte Lyse [123]. Jedoch kann die spezifische Lyse der Daudi-Zellen durch eine Transfektion des MHC-I-Gens stark reduziert werden [124].

$\gamma\delta$ -T-Zellen können außerdem auch über das Erkennen von doppelsträngiger DNA mittels des TLR-3 (engl.: *Toll-like receptor-3*) aktiviert werden [125].



## 1.8 $\gamma\delta$ -T-Zellen

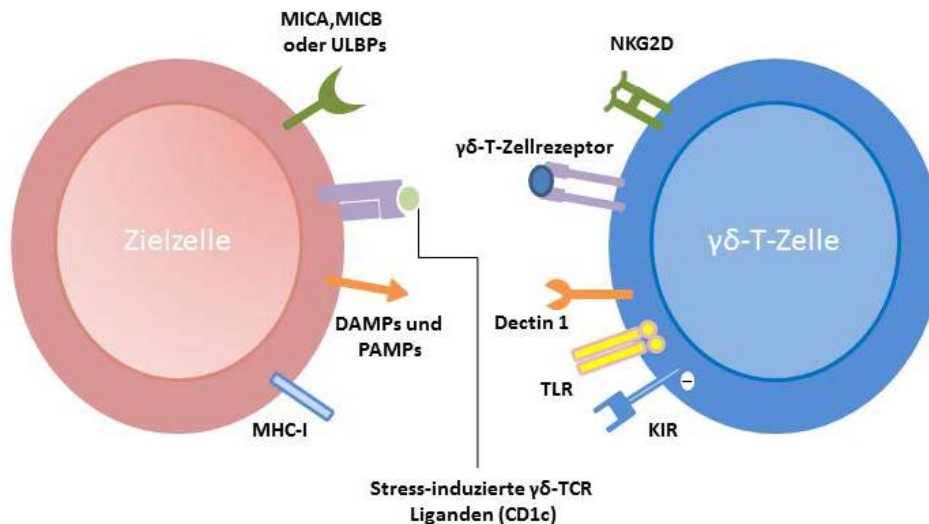


Abbildung 1.2: Antigenerkennung durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Lage über diverse Rezeptoren infizierte oder transformierte Zellen zu erkennen und eine Immunreaktion einzuleiten. So können stressinduzierte Liganden, CD1c oder mikrobielle sowie endogene Phosphoantigene (zum Beispiel IPP) auf der Zielzelle (rot), durch Rezeptoren der  $\gamma\delta$ -T-Zelle (blau), erkannt werden. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von Granula, zur Lyse der Zielzelle und zur klonalen Expansion der aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zelle (Abbildung nach Bonneville et al. 2010 [113]).

### 1.8.2 Anwendung von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immuntherapie

Wie bereits angedeutet spielen  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wichtige Rolle bei der KMT. Einige Studien deuten darauf hin, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Rahmen einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation, zusammen mit NK- und CD34<sup>+</sup>-Zellen, und unter einer Depletion der  $\alpha\beta$ -T-Zellen, das Risiko einer Infektion des Empfängers reduzieren [126]. Des Weiteren konnte, wie bereits erwähnt, ein anti-leukämischer Effekt nach HSCT beobachtet werden. Ein prozentualer Anteil von  $\gamma\delta$ -T-Zellen größer 10 % korreliert außerdem ein Jahr nach HSCT mit einer erkrankungsfreien Überlebensrate von 88 %. Sinkt die  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation unter 10 %, beträgt die Wahrscheinlichkeit für ein erkrankungsfreies Überleben lediglich 33 % [127]. In dem Zeitraum bis etwa Tag 90 nach der HSCT sind die  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einem höheren Anteil als die  $\alpha\beta$ -T-Zellen vertreten. Diese Periode nach einer HSCT beinhaltet ein vielversprechendes therapeutisches Fenster für eine  $\gamma\delta$ -T-Zell-spezifische Therapie von Leukämien, vor allem in einer MRD-Situation (Minimalerestherkrankung, engl.: *minimal residual diseases*).

Ein weiterer Vorteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist es, dass sie, im Vergleich zu NK-Zellen, vor allem gegenüber  $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht alloreaktiv sind, es daher zu keiner Abstoßungsreaktion (GvHD) kommt und so die Nebenwirkungen für die Patienten minimiert werden können [128].

Wie bereits erwähnt, lassen sich  $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Phosphoantigene von gram<sup>-</sup> und gram<sup>+</sup> Bakterien in nanomolaren Konzentrationen aktivieren. Durch chemische Modifikationen konnten synthetische Phosphoantigene, wie das Bromohydrin (BrHPP), abgeleitet werden, welche zu einer selektiven  $\gamma\delta$ -T-Zellstimulation führen. Zudem kann BrHPP durch eine relativ einfache Methode synthetisiert werden und ist somit ein attraktiver Kandidat zur Aktivierung der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen für Immuntherapien [129]. Auch ist es möglich V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen mittels Aminobisphosphonate, wie Pamidronat oder Zoledronat, spezifisch zu aktivieren [130].

## 1.9 Zielantigene für eine Antikörpertherapie

Aminobisphosphonate scheinen allerdings keine direkten Liganden der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen darzustellen, sondern führen durch das Eingreifen in den Melavonatzyklus, durch die Inhibition des Enzyms FPPS (Farnesylpyrophosphatsynthase, engl.: *farnesyl pyrophosphate synthase*), zur Akkumulation von IPP zum Beispiel in Monozyten und zur selektiven Aktivierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen [131].

Ein großer Vorteil der Aminobisphosphonatgruppe (Zometa®) ist es, dass sie bereits zugelassene Medikamente sind und zur Behandlung von Osteoporose und Tumor induzierten Knochenerkrankungen, wie Osteolyse oder Hyperkalzämie, eingesetzt werden können, wodurch eine klinische Verwendung zur Expansion von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen *in vivo* oder *ex vivo* vereinfacht werden könnte.

Diese Expansionsstrategien sind eine wesentliche Grundlage für eine  $\gamma\delta$ -T-Zell-basierte Immuntherapie maligner Erkrankungen.  $\gamma\delta$ -T-Zell-basierte Immuntherapien umfassen die *in vitro* Expansion von  $\gamma\delta$ -T-Zellen, zum Beispiel mittels Zoledronat und in Gegenwart von Il-2, wodurch eine rasche und spezifische Proliferation von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen induziert wird. In immundefizienten Mäusen konnte ein adoptiver Transfer von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen zu einem anti-tumoralen Effekt beitragen [132]. Zudem können V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen auch direkt *in vivo* stimuliert und expandiert werden, indem zum Beispiel Zoledronat in Kombination mit einer geringen Dosis Il-2 verabreicht wird. In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass solche Immuntherapien durchführbar sind und keine schweren Nebenwirkungen auftreten. Teilweise konnte das Fortschreiten der Krebserkrankung oder ein partieller Rückgang des Tumors beobachtet werden [133].

Der Erfolg der  $\gamma\delta$ -T-Zell-basierten Immuntherapie kann möglicherweise durch die Kombination mit monoklonalen- oder bispezifischen Antikörpern gesteigert werden. So konnte gezeigt werden, dass V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen, durch die Expression von CD16, die Fähigkeit haben Tumorzellen mittels ADCC zu lysieren und zu einer gesteigerten Tumorzelllyse beitragen [72].

Die ersten bispezifischen Antikörper, welche direkt  $\gamma\delta$ -T-Zellen und Tumorzellen miteinander verbinden, wurden bereits in den späten 1980er Jahren durch die Hybrid-Hybridom-Methode generiert. Mit diesen Antikörpern konnten Ovarienkarzinomzellen effektiv lysiert werden [134]. Seit kurzer Zeit sind auch die ersten rekombinanten bispezifischen Antikörper gegen den  $\gamma\delta$ -TCR beschrieben, welche unter der Verwendung von selektiv expandierten und aktivierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen *in vitro* und *in vivo* (Mausmodell) zu einer anti-tumoralen Aktivität führten [135].

Jedoch ist die Auswahl des Zielantigens auf den Tumorzellen ebenfalls von enormer Bedeutung für eine aussichtsreiche bispezifische Antikörpertherapie. Um die T-Zellaktivierung, durch die Expression des Antigens auf benignen Zellen zu verhindern, ist es notwendig das Tumorantigen zur Generierung von bispezifischen Antikörpern sorgfältig auszuwählen.

## 1.9 Zielantigene für eine Antikörpertherapie

Im Idealfall sollte das Antigen nur auf Tumorzellen exprimiert sein und auf benignen Zellen abwesend oder deutlich schwächer vorkommen. Des Weiteren muss das Antigen erreichbar für eine Antikörper-vermittelte Therapie sein und homogen von allen Tumorzellen exprimiert werden. Außerdem wäre es optimal, wenn die tumorassoziierten Gefäße ebenfalls dieses Antigen exprimieren würden, da es dadurch möglich wird die Gefäße „aufzubrechen“, sodass Immunzellen in den Tumor einwandern können und der Tumor gleichzeitig nicht mehr mit Nährstoffen versorgt wird.

## 1.10 Prostatakarzinom und das prostataspezifische Membranantigen

Antigene reagieren unterschiedlich auf Antikörperbindung: Einige bleiben stabil auf der Zelloberfläche exprimiert, andere können nahezu komplett verschwinden. Dies kann durch proteolytische Abspaltung (engl.: *shedding*) oder durch Internalisierung des Antigens geschehen. Das abgespaltene Antigen, wie auch Antigene, welche natürlicherweise sekretiert werden, verhindern die Antikörperbindung an die Tumorzellen, da durch lösliche Antigene zirkulierende Antikörper abgefangen werden können.

Wenn die ausgewählte Funktion ADCC, über Fc $\gamma$ -Rezeptor exprimierende Zellen, oder T-Zellrekrutierung, über einen bispezifischen Antikörper, sein soll, ist es wichtig, dass der Antigen-Antikörper-Komplex nicht direkt internalisiert wird, da dadurch die Möglichkeit der Bindung an die Effektorzellen beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu wäre die Induktion der Internalisierung des Antigens unter Verwendung eines Antikörpers von Vorteil, welcher an ein Toxin gekoppelt ist, das seine Wirkung nur spezifisch intrazellulär entfaltet.

Für die vorliegende Arbeit werden im Folgenden die tumorassoziierten Antigene PSMA und CDCP1 näher beschrieben.

PSMA wurde gewählt, da es kaum auf Normalgewebe exprimiert ist und gleichzeitig eine Expression auf Tumorzellen und auf den tumorassoziierten Gefäßen des Prostatakarzinoms festgestellt wurde.

CDCP1 wurde ausgewählt, da die Expression von CDCP1 bei soliden Tumoren mit der Ausbildung von Metastasen korreliert. Ein monoklonaler Antikörper  $\alpha$ -CDCP1 könnte vermutlich durch die Bindung des Antigens den Prozess der Metastasierung reduzieren.

## 1.10 Prostatakarzinom und das prostataspezifische Membranantigen

### 1.10.1 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist bei Männern die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Todesursache nach dem Bronchial- und Darmkarzinom. Jedoch ist die prozentuale Überlebensrate (> 90 %) beim Prostatakarzinom eher günstig. Kommt es allerdings zur Ausbildung von Metastasen, sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf nur noch ca. 28 % [136]. Da die Prostatakarzinomzellen eine geringe Teilungsrates besitzen, sind Zytostatika oft wirkungslos, sodass bisher keine Zytostatikabehandlung zu einer besseren Prognose führen konnte. Daher ist es wichtig neue Therapiemöglichkeiten, vor allem für das metastasierende Prostatakarzinom, zu entwickeln. Des Weiteren stellt das Prostatakarzinom einen ausgezeichneten Tumor zur Behandlung mit einer Immuntherapie dar, da die Prostata nicht essentiell für das Überleben der Patienten ist und die Metastasen vorwiegend in den Lymphknoten oder in den Knochen lokalisiert sind, meist eine geringe Größe haben und dadurch für eine Antikörpertherapie sehr gut zugänglich sind. Der Therapieerfolg kann an Hand des PSA-Spiegels (Prostataspezifisches Antigen; engl.: *prostate specific antigen*, PSA) sehr einfach kontrolliert werden.

### 1.10.2 Expression von PSMA

PSMA (engl.: *prostate specific membran antigen*) wird an der Oberfläche von epithelialen Zellen der Prostata exprimiert. Eine minimale 1000-fach schwächere Expression findet sich auf den Tubuli der normalen Niere [137, 138].

Immunhistologische Studien konnten zeigen, dass die PSMA-Expression mit der Progression des Tumors ansteigt [139-141]. Auch Metastasen und androgen-unabhängige Prostatakarzinome überexprimieren PSMA [139, 142, 143].

Überraschender Weise wurde die Expression von PSMA auch in tumorassoziierten Gefäßen bei zahlreichen soliden Tumoren festgestellt, wobei die Expression im normalen vaskulären Endothelium nicht vorkommt bzw. deutlich geringer ist [140, 144, 145].

### 1.10.3 Struktur von PSMA

Das prostataspezifische Membranantigen ist ein Typ-II membranständiges Glykoprotein, welches auf Prostatazellen exprimiert wird. Im Jahr 1987 wurde PSMA durch Immunopräzipitation in LNCaP-Zellen mittels eines monoklonalen Antikörpers 7E11 identifiziert. Das für das Protein kodierte Gen (*FOLH1*) wurde im Jahr 1993 kloniert [146]. Es ist lokalisiert auf dem Chromosomenabschnitt 11p11-p12, was durch *in situ*-Hybridisierung herausgefunden wurde [147]. Die cDNA ist 2653 Nukleotide lang und kodiert für ein 750 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 84 kDa. Durch das Anfügen von post-translationalen Modifikationen kommt es schließlich zur Expression von einem etwa 100 kDa großen Protein, welches als PSMA identifiziert werden konnte [148].

PSMA kann in drei unterschiedliche Domänen eingeteilt werden. In eine N-terminale, intrazelluläre Domäne (AS 1-19), eine Transmembrandomäne (AS 20-43) und eine C-terminale, extrazelluläre Domäne (AS 44-750).

Die extrazelluläre Domäne ist stark glykosyliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle zehn möglichen Glykosylierungsstellen N-glykosidisch mit Oligosaccharid-Domänen verknüpft sind und zur korrekten Faltung des Proteins beitragen [149].

Die Generierung der 3D-Struktur des Proteins zeigte, dass PSMA als symmetrisches Homodimer an der Oberfläche der Zellen exprimiert ist. Des Weiteren konnte eine Sequenz-, und Strukturhomologie mit dem Transferrinrezeptor gefunden werden [150].

## 1.10 Prostatakarzinom und das prostataspezifische Membranantigen

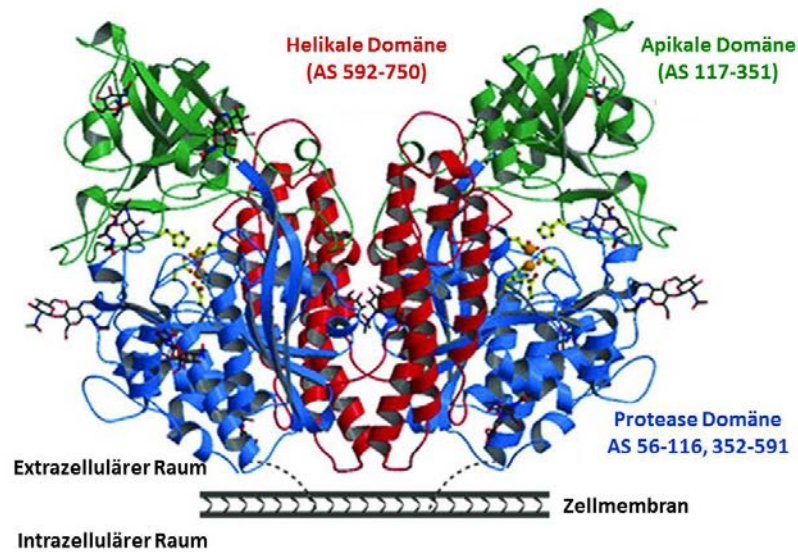


Abbildung 1.3: Seitenansicht der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des PSMA – Homodimers auf der Zelloberfläche

Die Protease (oder Protease-like) Domäne ist in blau, die apikale Domäne in grün, die helikale Domäne in rot und die CPG<sub>2</sub> Dimerisierungsdomäne des PSMA-Proteins in pink dargestellt. Wassermoleküle sind rot, Zinkionen in orange, zinkbindende Stellen in gelb und Kohlenhydrate als Struktur dargestellt (modifiziert nach Davis et al. 2005, [150]).

### 1.10.4 Enzymatische Funktion des PSMA-Proteins

Die Funktion von PSMA in der Prostata ist bis heute unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass PSMA eine NAALADase-Aktivität (engl.: *N-acetylated  $\alpha$ -linked acidic dipeptidase*) aufweist. Die NAALADase spaltet endständiges Glutamat vom Neurodipeptid NAAG (N-acetyl-aspartyl-glutamate) ab, welches in neuronalen Synapsen vorliegt. Daher wird postuliert, dass PSMA an der Oberfläche der Prostata auch als Peptidase dienen könnte und Peptide in der Prostataflüssigkeit hydrolysiert [151].

Des Weiteren konnte PSMA die Funktion als Folsäure-Hydrolase zugeordnet werden. Es dient der Abspaltung von poly- $\gamma$ -gebundenen Glutamatresten von Folsäuremolekülen im Dünndarm, die mit der Nahrung aufgenommen werden.

### 1.10.5 PSMA als Zielantigen zur Behandlung von Tumoren

Die hohe Organspezifität und die deutlich erhöhte Expression auf Tumorzellen, Metastasen sowie tumorassoziierten Blutgefäßen macht PSMA zu einem interessanten Antigen zur Behandlung des Prostatakarzinoms und anderen soliden Tumoren.

Viele prä-klinische und klinische Studien nutzen zurzeit gezielt PSMA als Zielantigen für eine Tumorbehandlung oder zur Tumordiagnose: Dies beinhaltet die PSMA-spezifische Radiotherapie, PSMA-spezifische Wirkstoff-Konjugate [152], PSMA-spezifische CAR-T-Zellen [153], PSMA basierte Peptid-Vakzinierungen [154] und die PSMA-spezifische Antikörpertherapie.

### 1.10.6 PSMA-spezifische Antikörper basierte Therapie

Wie bereits beschrieben, wurde PSMA ursprünglich durch einen monoklonalen Antikörper 7E11 identifiziert, welcher radioaktiv ( $^{111}\text{In}$ ) konjugiert einige Zeit später die Zulassung unter dem Namen ProstaScint®, zur Detektion von PSMA-positiven Tumoren mittels der Immunszintigraphie, erhielt. Jedoch ist es mit diesem Antikörper nur möglich sterbende Tumorzellen zu detektieren, da er ein intrazellulär-liegendes Epitop von PSMA erkennt. Dadurch ist es nicht möglich kleine Lymph- oder Knochenmetastasen zu detektieren [155, 156]. Um auch kleine Tumorzellen zu identifizieren, wurde ein Antikörper hergestellt, welcher an die extrazelluläre Domäne von PSMA binden kann. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass solche Antikörper eine höhere Sensitivität zur Detektion von PSMA-positiven Tumorzellen haben [157]. Auch klinische Studien der Phase I konnten mit Hilfe des radioaktiv-markierten J591 Antikörpers Tumorzellen *in vivo* lokalisieren [158].

Extrazellulär an PSMA bindende Antikörper werden außerdem für therapeutische Zwecke als unkonjugierte, an Radionuklide oder Zytostatika gekoppelte humanisierte Antikörper, benutzt. Erfolgreiche Studien konnten sowohl mit dem J591-Antikörper konjugiert an das radioaktive Molekül Lutetium ( $^{177}\text{Lu}$ , Radioimmuntherapie) als auch mit dem J591-Antikörper konjugiert an DM-1 (MLN2704, Antikörper-Toxin-Konjugat) durchgeführt werden [159].

Des Weiteren werden zurzeit zwei bispezifische Antikörper (BiTE®, Amgen und Bayer und MOR209/ES414, MorphoSys und Emergent BioSolutions) gegen PSMA und CD3 in klinischer Phase I Studien getestet. Die prä-klinischen Ergebnisse mit diesen Konstrukten waren vielversprechend [160].

## 1.11 CUB domain-containing protein-1, CDCP1, CD318)

### 1.11.1 Struktur und Funktion

Bei CDCP1 handelt es sich um ein Typ-1 Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 135 kDa. Das Protein besteht aus 836 Aminosäuren, wird von einer 2511 Nucleotid langen cDNA kodiert und ist lokalisiert auf dem Chromosomabschnitt 3p21-p23. Es kann in verschiedene Domänen unterteilt werden. Das Signalpeptid (AS 1-29) ist identisch mit vielen anderen membranständigen Proteinen. Darauf folgt eine große extrazelluläre Domäne, unter anderem bestehend aus drei CUB-Domänen (AS 30-665), der Transmembrandomäne (AS 666-686) und einer intrazellulären Domäne (AS 687-836).

Die große extrazelluläre Domäne hat 12 potenzielle N-Glykolisierungsstellen und fünf Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Die post-translationalen Modifikationen erhöhen das Molekulargewicht des Proteins um etwa 30-40 kDa. Das unglykolisierte Protein hat ungefähr eine Größe von 90 kDa.

Wie beschrieben, konnten durch Sequenzvergleiche und Sekundärstrukturvorhersagen drei potenzielle CUB-Domänen (engl.: *C*<sub>1r</sub>/*C*<sub>1s</sub>, *u**r**c**h**i**n* *e**m**b**r**y**o**n**i**c* *g**r**o**w**t**h* *f**a**c**t**o**r*, and *b**o**n**e* *m**o**r**p**h**o**g**e**n**e**t**i**c* *p**r**o**t**e**i**n* *1* (*CUB*) *d**o**m**a**i**n*s) in der extrazellulären Domäne des Proteins identifiziert werden (AS 220-350, 425-535, 545-660). Strukturell sind CUB-Domänen den Immunglobulin-Domänen ähnlich und sind Komponenten und Aktivatoren des Komplementsystems. Außerdem besitzen CUB-Domänen eine Proteasefunktion und sind dadurch für die Aktivierung des Trypsinogens sowie für die Spaltung von Kollagen und Fibronectin verantwortlich [161].

## 1.11 CUB domain-containing protein-1, CDCP1, CD318)

Von CDCP1 sind auch kurze Protein-Varianten identifiziert worden. Durch alternatives Splicing entsteht Isoform 2 und 3, welche in unglykolisierter Form eine Molekulargröße von 70 kDa beziehungsweise 40 kDa haben. Auch wurden protolytisch prozessierte Isoformen von CDCP1 beschrieben [162-165].

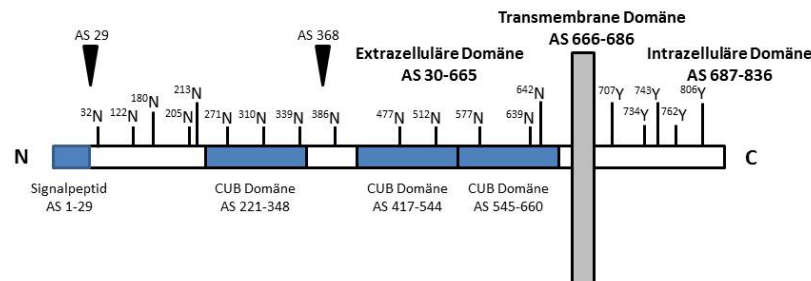


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des humanen CDCP1-Proteins

Die schematische Darstellung repräsentiert das humane CDCP1-Protein mit dem entsprechenden Signalpeptid, den CUB-Domänen, den Glykolisierungsstellen (N) und den intrazellulären Tyrosinen (Y.) Als Dreiecke sind mögliche Schnittstellen dargestellt.

CDCP1 wurde als Adhäsionsprotein identifiziert, welches mit unterschiedlichen Adhäsions- oder Matrixantigenen interagieren kann. Extrazellulär bindet CDCP1 an N-, P-Catherin, Syndecan 1 und 4 und Tetraspanin (CD9). Intrazellulär kann CDCP1 zum Beispiel mit der Familie der Src-Kinasen (SFK) und der Proteinkinase-C $\delta$  interagieren [166]. So konnte gezeigt werden, dass CDCP1, die SFKs und die Proteinkinase-C $\delta$  beteiligt sind an der Ausbildung der Anoikis-Resistenz [166, 167].

### 1.11.2 Expression von CDCP1

CDCP1 wird im Vergleich zum benignen Gewebe in einer Reihe von Tumoren der Lunge, des Kolons, der Prostata, der Brust und der Niere hoch exprimiert [161, 168-170]. Außerdem konnte auch eine Expression von CDCP1 auf hämatopoetischen Stammzellen sowie auf Tumorzellen der AML, ALL und der CLL nachgewiesen werden [171]. Des Weiteren deuten einige Studien an, dass CDCP1 eine Funktion bei der Tumorentwicklung oder der Ausbildung von Metastasen haben könnte.

Studien, welche das Nieren-, Lungen oder das Pankreaskarzinom untersuchten, konnten zeigen, dass eine hohe CDCP1-Expression mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung korreliert (Tumorgrad und Präsenz von Metastasen) und dadurch mit einer schlechteren Prognose einhergeht [172-174]. Dies stimmt mit der Arbeit von Uekita und Kollegen überein, die nachwies, dass die Expression von CDCP1 zu einem invasiven und metastasierenden Phänotyp von Tumorzellen führt. Eine erhöhte Metastasierungsrate konnte bei einem Mausmodell festgestellt werden [166, 175]. Außerdem konnte *in vitro* eine reduzierte Adhäsion an Matrigel gezeigt werden, wodurch ein erhöhtes Metastasierungspotenzial begründet sein könnte [176]. Durch die Bindung eines CDCP1-spezifischen Antikörpers konnte *in vitro* die Migration und Invasion von CDCP1-exprimierenden Prostatakarzinomzellen inhibiert werden. Konjugiert mit einem Toxin, konnte der Antikörper im Mausmodell die Metastasierung in Lymphknoten blockieren [169]. Weitere Studien konnten die Inhibition von Metastasen oder die

### 1.11 CUB domain-containing protein-1, CDCP1, CD318)

Reduzierung von Tumorwachstum in anderen Metastasierung- (Hühnchenembryo) und Xenografmodellen bestätigen [177, 178].

Diese Ergebnisse machen CDCP1 zu einem interessanten Antigen zur Antikörpertherapie, um Tumorzellen, welche durch die erhöhte Expression von CDCP1 einen pro-metastasierenden und anti-apoptischen Phänotyp besitzen, zu eliminieren.



## 1.12 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel verbesserte therapeutische anti-Tumor-Antikörperkonstrukte zu generieren. Dabei wurden zwei Wege verfolgt:

1. Die Generierung und Charakterisierung neuer Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene (CDCP1 und PSMA) mittels der Hybridomatechnologie. Ausgehend von dem neu generierten PSMA-Antikörper (10B3) sollte im Rahmen dieser Arbeit ein rekombinantes bispezifisches Format zur panklonalen Rekrutierung von T-Zellen (hauptsächlich  $\alpha\beta$ -T-Zellen) entwickelt werden.
2. Dieser Ansatz zielt auf die Rekrutierung und Aktivierung nur eines kleinen Teils der T-Zellpopulation ab, um eine möglichst effektive, aber besser kontrollierbare T-Zellaktivierung zu erhalten. In diesem Teil der Arbeiten sollten daher, mittels der Hybridomatechnologie, Antikörper gegen den  $\gamma\delta$ -TCR hergestellt, charakterisiert und in einem rekombinanten bispezifischen Antikörperkonstrukt funktionell getestet werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

Äkta pure	GE Healthcare, München
Brutschrank Heraeus function line	Thermo Electron, Waltham, USA
Brutschrank APT.line® CB	Binder, Tuttlingen
Dispensor Multipette	Eppendorf, Hamburg
DryEasy Mini-Gel Drying System	Novex, San Diego, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD, Heidelberg
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1	GE Healthcare, München
Einkanalschreiber Rec101	GE Healthcare, München
ELISA-Plattenlesegerät SpectraMax 340	Molecular Devices, München
Heizrührer MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach
MicroBeta Counter 1450 Plus	PerkinElmer, Rodgau
MicroBeta2 2450 Microplate Counter	PerkinElmer, Rodgau
NanoDrop™ 1000	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Peristaltikpumpe P-1	GE Healthcare, München
pH-Messgerät Seven Multi	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer Ultraspec 3000	GE Healthcare, München
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, CH
Schüttler Multitron	Infors, Bottmingen, CH
SMART SYSTEM	GE Healthcare, München
Sterilbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Chur, CH
Thermocycler PTC-100	BioRad, Waltham, USA
Trockenschrank Heraeus ET	Thermo Electron, Waltham, USA
UV-Tisch FLX-20M und TFX-20M	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer Vibro-Fix VF2	Ika Labortechnik, Staufen
Waagen (Fein- und Tischwaage)	Satorius, Göttingen
Wippe Rocky RT-1	Fröbel, Lindau
xCELLigence RTCA SP	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zell-Harvester ICH-110-96	Inotech, Dottikon, CH
Zentrifugen	
Heraeus Biofuge A und Biofuge fresco	Thermo Electron, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0 und 2.0R	Thermo Electron, Waltham, USA
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC 50 Plus	Thermo Electron, Waltham, USA

## 2.1 Material

### 2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Bechergläser, Glas	Schott, Mainz
Bechergläser, Plastik	Vitalab, Großostheim
Bottletop Filter (0,22µm Porengröße)	Millipore, Schwalbach
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cryobox	Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche Visking 12 - 14 kDa	Roth, Karlsruhe
E-Plate 96	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Einmalpipetten Plastik	BD, Heidelberg
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	
Einmalpipetten Plastik 50 ml	Corning, Kaiserslautern
Einmalspritzen Plastik	BD, Heidelberg
ELISA-Platte Maxisorp	Nalgene Nunc international, Rochester NY, USA
	Bohemia Cristal, Selb
Erlenmeyerkolben Simax 500ml, 1 l	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Filtermatten Melti Lex A	Schott, Mainz
Glasflaschen 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l	Packard BioScience, Dreieich
Lumaplate 96	Vitalab, Großostheim
Messzylinder Plastik	
100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l	Millipore, Schwalbach
Mikrokonzentratoren Amicon Ultra-15	Brand, Weinheim
Neubauer Zell-Zählkammer	WU, Mainz
Pasteurpipetten, Long size	Biozym, Oldenburg
PCR-Softtubes 0,5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	
20 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen, gefiltert	
10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Röhrchen 50 ml	BD, Heidelberg
PP-Röhrchen 15 ml	Hellma, Basel, CH
Präzisions-Küvetten Suprasil® halbmikro	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Millipore, Schwalbach
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 µm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen Triple flask	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten 96-well flat/round bottom	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatte 6-well flat bottom	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenbecher 500 ml	Nalgene, Hereford, UK
Zentrifugenröhrchen SS34	Nalgene, Hereford, UK
Zentrikon Amicon Ultra 10 kDa und 30 kDa	Millipore, Schwalbach

## 2.1 Material

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<sup>3</sup> [H]-methyl-Thymidin (1 mCi/ml)	Hartmann Analytic, Braunschweig
7-Aminoactinomycin (7-AAD Viability staining solution)	Biolegend, Fell
8-Azaguanin Hybri-Max™	Sigma, Steinheim
Agarose	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD, Heidelberg
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Lonza, Basel, CH
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethanol, vergällt (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol, zur Analyse (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr) 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse	BD, Heidelberg
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HiTrap – 1ml-Kappa-Select	GE Healthcare, München
HiTrap – 1ml-Protein A	GE Healthcare, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KappaSelect, Agarose-immobilisiert	GE Healthcare, München
Lymphocyte Separation Media LSM1077	Lonza, Basel, CH
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchromat (51Cr, 5 µCi/ml)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol 50 % (w/v) PEG 1500 in 75 mM HEPES	Roche, Mannheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Steinheim
Rekombinantes Protein A, Agarose-immobilisiert	GE Healthcare, München
Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, München

## 2.1 Material

Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer, Rodgau
Triton® X-100	Sigma, Steinheim
Trizma Base (Tris-Base)	Sigma, Steinheim
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, Steinheim
Türk'sche Lösung	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim

### 2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze

Fötale Kälberserum (FCS)	Lonza, Basel, CH
Hybridoma Cloning Supplement (HCS)	Roche, Mannheim
Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT) Mediumzusatz (50x)	Sigma, Steinheim
Hypoxanthin/Thymidin (HT) Mediumzusatz (50x)	Sigma, Steinheim
IMDM	Lonza, Basel, CH
L-Glutamin (200 mM)	Lonza, Basel, CH
MEM-NEAA (100x)	PAA Pasching, A
Natrium-Pyruvat (100mM)	Merck, Darmstadt
Panexin NTS	PAN Biotech, Aidenbach
NEA nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Merck, Darmstadt
RPMI	Lonza, Basel, CH

### 2.1.5 Enzyme

Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt
KAPA HiFi Polymerase	KAPA BIOSYSTEMS, Boston, USA
Restriktionsenzyme, diverse	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	Roche, Mannheim

### 2.1.6 Größenmarker für die Gelelektrophorese

1kB Marker und 100 bp Marker, New England Biolabs, Frankfurt  
1kB+ Gene Ruler, ThermoFisher Scientific, Schwerte  
SeeBlue® Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.7 Gebrauchsfertige Kits

BD™ Anti-Mouse Ig, kappa /Negative control (FBS) Compensation Particles Set	BD Biosciences, Heidelberg
BioTrap Gelelutions-Starterkit	Schleicher & Schuell, Dassel
CD8 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DNA, RNA purification (NucleoSpin®)	Machery Nahel, Düren
TCRγδ+ MicroBead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

## 2.1 Material

IsoGold™ Rapid monoclonal Isotyping Kit	BioAssay Works, Jansville, MD, USA
Mini-PROTEAN® TGX 10 % Precast Gele	Bio-Rad, München
2x Laemmli Sample Puffer	Bio-Rad, München
10x Tris/Glycin/SDS-Puffer	Bio-Rad, München
QIAGEN® Plasmid-DNA Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.

Kons1-hin	5'-gggtgcaaaagagcggccttctagaag-3'
Kons1-rev	5'-tgcagggtccaaggcagtgctgggtg-3'
Kons2-hin	5'-ccagactcaaacttacctacctttatc-3'
Kons2-rev	5'-ggctgttatgccaagctctgtctatg-3'
Kons3-hin	5'-tgtgacatagaagctgcaatagtcag-3'
Kons3-rev	5'-ccaggatattaaccaatgagtgtta-3'
CH2-hin	5'-caaaaccaaggacaccctc-3'
pA-rev	5'-ggaggtaggtgtcagagtc-3'
mRNA-hin1	5'-acatatgtacaatgtcctcaccacag-3'
kmRNA-hin	5'-atgagccacacaaactcagggaagctcg-3'

### 2.1.9 Software

CellQuest Pro	BD, Heidelberg
FlowJo	TreeStar Inc., Ashland, USA
GATC Viewer	GATC Biotech, Konstanz
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
MS Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim
MS Powerpoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim
MS Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Sigma Plot 12.0	SPSS, München

### 2.1.10 Puffer und Medien

Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml)	Ampicillin in H <sub>2</sub> O (bidest.)
dNTP-Stocklösung	dATP, dCTP, dGTP, dTTP [je 10 mM] in H <sub>2</sub> O (bidest)
DNA-Ladepuffer (6x)	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA

## 2.1 Material

	in H <sub>2</sub> O (bidest, pH 7,6)
DNA-Ladepuffer Orange G (6x)	0,6 ml Orange G (10x) 1,8 ml Glycerin 3,6 ml TAE-Puffer (1x)
EtBr-Stocklösung [10 mg/ml]	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (flüssig)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l
LB-Medium (Platten)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l 1 ml Ampicillin-Stocklösung
Orange G (10x)	200 mg Orange G in 5 ml H <sub>2</sub> O (bidest.)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 8,5
TfbI	30 mM Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> COOK) 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (w/v) Glycerin mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt sterilfiltriert
TfbII	10 mM MOPS pH 7 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15 % (w/v) Glycerin sterilfiltriert

## 2.1 Material

### 2.1.11 Zellkulturreagenzien

Einfrüermedium	90 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
Fusions-Komplettmedium (5 % FCS)	IMDM 5 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Fusions-Komplettmedium (20 % FCS)	IMDM 20 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Fusions-Medium (8-Aza)	5 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol 130 µM 8-Azaguanin
Fusions-HAT-medium (2x)	20 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol 10 % Hybridoma cloning supplement 200 µM Hypoxanthin 0,8 µM Aminopterin 32 µM Thymidin
Fusions-HT-medium	20 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA



## 2.1 Material

	1x 50 µM β-Mercaptoethanol 10 % Hybridoma cloning supplement 100 µM Hypoxanthin 16 µM Thymidin
Fusions-Waschmedium	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
IMDM-Komplettmedium	10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
RPMI-Komplettmedium	10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Serumfreies IMDM	10 % Panexin NTS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol
Trypan-Blau	0,1 % Trypan-Blau in DPBS

### 2.1.12 Chromatographische Verfahren

0,1 M Glycin-Puffer pH 2,3	0,1 M Glycin in H <sub>2</sub> O (bidest.) mit HCl auf pH 2,3 justiert
0,1 M Phosphatpuffer pH 8	10 % (v/v) 1 M Kaliumphosphat-Puffer in H <sub>2</sub> O (bidest.) mit NaOH auf pH 8 justiert

## 2.1 Material

### 2.1.13 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer	1 % FCS (hitzeinaktiviert) 0,02 % NaN <sub>3</sub> in DPBS
FACS-Puffer II (zur Standardisierung)	1 % FCS (hitzeinaktiviert) 0,02 % NaN <sub>3</sub> 50 µg/ml humIgG (Flebogamma) 12 % (v/v) BD Negative Compensation Particles 0,5 µg/ml 7-AAD in DPBS

### 2.1.14 Bakterienstämme

*E.coli* DH5α, MBI Fermentas, St. Leon Rot

### 2.1.15 Plasmide

Der Vektor pcDNA3(+) wurde als Expressionvektor verwendet, um zum Beispiel stabile Antigen-exprimierende Transfektanten zu generieren.

Des Weiteren wurden zwei Vektoren (hergestellt von Dr. Ludger Große-Hovest) zur Expression von Antikörpern (leichte und schwere Kette) bzw. Fusionsproteinen verwendet.

Der Vektor für die schwere Kette basiert auf dem Vektor pcDNA×pPCR. Jedoch wurde der CMV-Promotor gegen einen Maus-Promotor für die Igy schwere Kette ausgetauscht.

Die variable Domäne eines Antikörpers (V<sub>H</sub>) wurde von den Schnittstellen AatII und ClaI flankiert, worüber die Domäne auch ausgetauscht werden konnte. Auch der Fc-Teil bzw. der *single chain* konnten über einmalig vorkommende Schnittstellen ausgetauscht werden.

Der Vektor für die leichte Kette basiert auf dem Vektor pPCR-Script™AmpSK(+)Cloning-Vector. Dieser beinhaltet einen Maus-Promotor für die κ-Kette. Auch bei diesem Vektor konnte die variable Domäne (V<sub>L</sub>) über die Restriktionsschnittstellen SpeI und XhoI ausgetauscht werden.

### 2.1.16 Antikörper

In den folgenden Tabellen sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper hinsichtlich Spezifität, Klonname, Isotyp, Konjugat (soweit verfügbar) und Bezugsquelle aufgeführt. Wurden Antikörper selbst gereinigt, so ist die Bezugsquelle des Hybridoms der Tabelle 2.3 zu entnehmen.

## 2.1 Material

Tabelle 2.1: Konjugierte monoklonale Antikörper

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Bezugsquelle</b>
huCD3	UCHT-1	Maus Igy1, κ	FITC	Biolegend, Fell
huCD4	OKT-4	Maus Igy2b, κ	PacificBlue	Biolegend, Fell
huCD8a	HIT8a	Maus Igy1, κ	APC	Biolegend, Fell
huCD20	2H7	Maus Igy2b, κ	PE/Cy7	Biolegend, Fell
huCD25	BC96	Maus Igy1, κ	PE	Biolegend, Fell
huCD45	2D1	Maus Igy1, κ	AmCyan	BD Biosciences, Heidelberg
huCD69	FN-50	Maus Igy1, κ	PE	Biolegend, Fell
huCD326 (EpCAM)	HEA-125	Maus Igy1, κ	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
huyδ-TCR	B1	Maus Igy1, κ	APC	Biolegend, Fell
huαβ-TCR	IP26	Maus Igy1, κ	APC	Biolegend, Fell
unbekannt	MOPC-21	Maus Igy1, κ	alle	Biolegend, Fell
unbekannt	MPC-11	Maus Igy2b, κ	Pacific Blue, PE/Cy7	Biolegend, Fell

Tabelle 2.2: Konjugierte polyklonale Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Bezugsquelle</b>
polyklonales anti-Maus-Igy Serum	murines Igy und Igu H+L spezifisch	Ziege	PE	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-Maus-Igy Serum	murines Igy F(ab') <sub>2</sub> spezifisch	Ziege	PE	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-human-Igy Serum	humanes Igy H+L spezifisch	Ziege	PE	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-human-Igy Serum	humanes Igy spezifisch	Ziege	PE	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-Maus-Igy Serum	murines Igy und Igu H+L spezifisch	Ziege	APC	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-Maus-Igy Serum	murines Igy F(ab') <sub>2</sub> spezifisch	Ziege	APC	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-human-Igy Serum	humanes Igy H+L spezifisch	Ziege	APC	Dianova, Hamburg
polyklonales anti-Maus-Igy Serum	humanes Igy spezifisch	Ziege	APC	Dianova, Hamburg
Polyklonaler anti-human-Igy Serum	humanes Igy spezifisch	Ziege	HRP	Dianova, Hamburg
Polyklonaler anti-human-Igy Serum	humanes Igy spezifisch	Ziege	Biotin	Dianova, Hamburg

## 2.1 Material

Tabelle 2.3: Unkonjugierte Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Isotyp/Forma t</b>	<b>Bezugsquelle</b>
B6	V $\delta$ 2	Maus Igy1	Biologend, Fell
7-2 D/3	V $\delta$ 2	Maus Igy1	selbst hergestellt
8-2 D/11	V $\delta$ 2	Maus Igy1	selbst hergestellt
12-1 F/11	V $\delta$ 2	Maus Igy1	selbst hergestellt
11-1 D/10	V $\delta$ 2	Maus Igy1	selbst hergestellt
10-3 E/9	V $\delta$ 2	Maus Igy1	selbst hergestellt
7-1 A/6	V $\gamma$ 9	Maus Igy1	selbst hergestellt
2-2- A/6	V $\delta$ 2	Maus Igy1	selbst hergestellt
CD19 $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	CD19/V $\gamma$ 9	Fabsc	selbst hergestellt
CD19 $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	CD19/V $\gamma$ 9	IgGsc	selbst hergestellt
CD19 $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	CD19/V $\gamma$ 9	Fabsc	selbst hergestellt
CD19 $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	CD19/V $\gamma$ 9	IgGsc	selbst hergestellt
PSMA $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	PSMA/V $\gamma$ 9	Fabsc	selbst hergestellt
PSMA $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub>	PSMA/V $\gamma$ 9	IgGsc	selbst hergestellt
PSMA $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	PSMA/V $\gamma$ 9	Fabsc	selbst hergestellt
PSMA $\times$ $\gamma$ $\delta$ V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub>	PSMA/V $\gamma$ 9	IgGsc	selbst hergestellt
107-1A4	PSMA	Maus Igy1, $\kappa$	Biozol, Eching
YPSMA-1	PSMA	Maus Igy2b, $\kappa$	Abcam, Cambridge, USA
GCP-04	PSMA	Maus Igy1, $\kappa$	Exbio Antibodies, Praha, Czech Republic
J591	PSMA	Maus Igy2a, $\kappa$	selbst gereinigt
10B3	PSMA	Maus Igy2b, $\kappa$	selbst hergestellt
chimärer PSMA (J591)	PSMA	chimärer Igy1	selbst hergestellt
optimierter PSMA (J591)	PSMA	chimärer Igy1	selbst hergestellt
cimärer PSMA (10B3)	PSMA	chimärer Igy1	selbst hergestellt
PSMA $\times$ CD16	PSMA/CD16	Fabsc	selbst hergestellt
PSMA $\times$ CD3	PSMA/CD3	Fabsc	selbst hergestellt
CD19 $\times$ CD3	CD19/CD3	Fabsc	Dr. Michael Durben, Tübingen
CSPG4 $\times$ CD3	CSPG4/CD3	Fabsc	Dr. Michael Durben, Tübingen
NP-CO	PSMA/CD3	Fabsc	selbst hergestellt
NP-CB	PSMA/TCR $\alpha\beta$	Fabsc	selbst hergestellt
NP-CDIL2K	PSMA/CD3	Fabsc	selbst hergestellt
N10-CO	PSMA	Fabsc	selbst hergestellt
Nh10-CO	PSMA	Fabsc	selbst hergestellt
Nh10-CO1	PSMA	Fabsc	selbst hergestellt
Nh10-CO2	PSMA	Fabsc	selbst hergestellt
PSMA $\times$ CD3 (J591)	PSMA/CD3	IgGsc	Dr. Latifa Zekri
PSMA $\times$ CD3 (h10B3)	PSMA/CD3	IgGsc	Dr. Latifa Zekri
CUB1	CDCP1	Maus Igy2b	Biologend, Fell
9-2	CDCP1	Maus Igy2b	selbst hergestellt
8-3	CDCP1	Maus Igy2a	selbst hergestellt

## 2.1 Material

2-1	CDCP1	Maus Igy $\mu$	selbst hergestellt
UCHT-1	CD3	Maus Igy2b, $\kappa$	selbst gereinigt
Polyklonaler anti-human-Igy Serum	humanes Igy spezifisch	Ziege	Dianova, Hamburg

Tabelle 2.4: Unkonjugierte Isotypkontroll-Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp/Format	Bezugsquelle
F19	FAP- $\alpha$	Maus Igy1, $\kappa$	selbst gereinigt
MOPC-21	unbekannt	Maus Igy1, $\kappa$	Biolegend, Fell
MOPC-173	unbekannt	Maus Igy2a, $\kappa$	Biolegend, Fell
MPC-11	unbekannt	Maus Igy2b, $\kappa$	Biolegend, Fell

### 2.1.17 Zelllinien

Tabelle 2.5: Hybridome

Bezeichnung	Spezifität, Referenz	Isotyp	Bezugsquelle
7-2 D/3	V $\delta$ 2	Maus Igy1,	selbst hergestellt
8-2 D/11	V $\delta$ 2	Maus Igy1,	selbst hergestellt
12-1 F/11	V $\delta$ 2	Maus Igy1,	selbst hergestellt
11-1 D/10	V $\delta$ 2	Maus Igy1,	selbst hergestellt
10-3 E/9	V $\delta$ 2	Maus Igy1,	selbst hergestellt
7-1 A/6	V $\gamma$ 9	Maus Igy1,	selbst hergestellt
2-2- A/6	V $\delta$ 2	Maus Igy1,	selbst hergestellt
F19	FAP- $\alpha$ , Rettig et al. [179]	Maus Igy1, $\kappa$	ATCC, Manassas, USA
J591	PSMA, Liu et al. [144]	Maus Igy2a, $\kappa$	ATCC, Manassas, USA
10B3	PSMA	Maus Igy2b, $\kappa$	selbst hergestellt
9-2	CDCP1	Maus Igy2b,	selbst hergestellt
8-3	CDCP1	Maus Igy2a,	selbst hergestellt
2-1	CDCP1	Maus Igy $\mu$ ,	selbst hergestellt
UCHT-1	CD3, Beverley and Collard [180]	Maus Igy2b, $\kappa$	P. Beverley, Cambridge, UK

Tabelle 2.6: Humane Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
NALM-16	B-Vorläuferzellen-Leukämie	DSMZ, Braunschweig
22RV1	Prostatakarzinom	DSMZ, Braunschweig
LNCap	Prostatakarzinom	DSMZ, Braunschweig
PC-3	Prostatakarzinom	DSMZ, Braunschweig
JURKAT	T-Zelleukämie	DSMZ, Braunschweig

## 2.2 Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen

SKW 6.4	B-Zelleukämie	ATCC, Manassas, USA
HEK-293T	Embryonale Nierenzellen	ATCC, Manassas, USA

Tabelle 2.7: Tierische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Sp2/0-Ag14	Maus-Myelom	ATCC, Manassas, USA

### 2.1.18 Primäre humane Zelllinien

Blutproben gesunder Spender wurden mit deren Einverständnis bearbeitet.

Tabelle 2.8: Primäre humane Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Endothelzellen HUVEC	aus humaner Nabelschnur	PromoCell, Heidelberg

### 2.1.19 Mäuse

Die verwendeten Mausstämme sowie deren Herkunft bzw. Bezugsquelle sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2.9: Mausstämme

Stamm	Bezugsquelle
C57BL/6	Eigenzucht der Abt. für Immunologie oder Charles River Laboratories Wilmington, USA
BALB/c	Eigenzucht der Abt. für Immunologie oder Charles River Laboratories Wilmington, USA
C57BL/6(B6.129(cg).CDCP1<tm1.2Moas</j	Charles River Laboratories Wilmington, USA

## 2.2 Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders beschrieben in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 2.2.1 Passagieren und Ernten von Zellen

Das Kulturmedium von adhärent wachsenden Zellen wurde abgenommen und der Zellrasen einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde Accutase® zu den Zellen zu geben. Es folgte eine Inkubation von einigen Minuten bei 37 °C bis die Zellen sich durch leichtes Klopfen an die Flaschenseite lösten. Der Ablösezustand wurde daraufhin mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Kulturmedium resuspendiert und je nach

## 2.2 Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen

Zelldichte ein entsprechendes Volumen an Zellsuspension verworfen und die Zellkulturflasche mit frischem vorgewärmtem Kulturmedium befüllt.

Bei Suspensionszelllinien oder leicht adhärenen Zelllinien wurden die Zellen durch leichtes Schlagen an die Flaschenseite gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension resuspendiert, ebenfalls je nach Zelldichte ein entsprechendes Volumen an Zellsuspension verworfen und mit frischem Medium wieder aufgefüllt.

### 2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Zellzahl der lebenden Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde die Zellsuspension abhängig von der Zelldichte in einem Verhältnis 1:1, 2:1 oder 10:1 mit einer 0,1 % Trypanblaulösung gemischt. Dieser Farbstoff ermöglicht nach einer kurzen Einwirkzeit eine Diskriminierung zwischen lebendigen und toten Zellen, da tote Zellen durch eine gestörte Membranintegrität den Farbstoff aufnehmen können und dadurch unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer konnte daraufhin die Zellkonzentration bestimmt werden, wobei vier Großquadrate ausgezählt wurden. Die Berechnung der Gesamtzellzahl pro Milliliter erfolgte durch die Multiplikation des arithmetischen Mittels der vier Großquadrate mit dem Kammerfaktor  $10^4$ , dem Gesamtvolumen der Zellsuspension sowie dem Verdünnungsfaktor.

### 2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen für einen kurzen Zeitraum aufzubewahren, wurden diese bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Dazu wurden Zellen wie oben beschrieben abgelöst, abzentrifugiert ( $300 \times g$ ) und das Zellpellet in 1 ml  $4\text{ °C}$  kaltem Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde daraufhin in einen bei  $4\text{ °C}$  vorgekühlten Isopropanolkühler überführt, welcher bei  $-80\text{ °C}$  eine definierte Absenkung der Temperatur um  $1\text{ °C}/\text{min}$  ermöglicht, um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten.

Um Zellen langfristig zu lagern, wurden die Kryoröhrchen nach ca. 24 Stunden in  $-80\text{ °C}$  in flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ °C}$ ) mittels Trockeneis überführt.

Um kryokonservierte Zellen wieder aufzutauen, wurden die gefrorenen Kryoröhrchen in einem  $37\text{ °C}$  warmen Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war, aufgetaut und anschließend in 30 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation ( $300 \times g$ ), sodass das Zellpellet resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß überführt werden konnte.

### 2.2.4 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Im Gegensatz zur stabilen Transfektion findet bei der transienten Transfektion keine Integration der DNA in das Zellgenom statt. Es kommt nur zu einer vorübergehenden Einschleusung der DNA, die dann aktiv abgelesen werden kann und bei der drauffolgenden Zellteilung wieder verloren geht.

Die transiente Transfektion, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, wurde mit Polyethylenimin (PEI) 25 kDa vorgenommen. Dafür wurden HEK-293T-Zellen einen Tag vor der

## 2.2 Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen

Transfektion in große Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) in 38 ml DMEM-Medium ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion zu ca. 70-80 % konfluent waren.

Für eine große Zellkulturflasche wurden 126,67 µg PEI in 1,9 ml DMEM ohne Zusätze verdünnt. Von der transfizierenden DNA wurden pro große Flasche 31,67 µg in 1,9 ml pipettiert. Durch Verwendung zweier unterschiedlicher Vektoren für die Expression der leichten und der schweren Kette wurde ein Verhältnis von 7:3 (schwere Kette 22,15 µg; leichte Kette 9,55 µg) gewählt.

Daraufhin wurde die PEI-Lösung in die DNA-Mischung überführt, gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 3,8 ml der Mischung tropfenweise zu den HEK-293T-Zellen gegeben. Einen Tag nach der Transfektion wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, verworfen und 50 ml frisches DMEM-Medium hinzugegeben.

Daraufhin wurde alle zwei Tage das Medium abgenommen und gesammelt. Dies konnte so lange wiederholt werden, bis die Zellen totgewachsen waren.

### 2.2.5 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur stabilen Transfektion von eukaryotischen Zellen wurden 4-8 µg der entsprechenden Expressionsvektoren mittels eines Restriktionsenzym linearisiert, wobei Schnittstellen im β-Lactamase-Gen, welches für die Ampicillinresistenz generiert, bevorzugt ausgewählt wurden. Die linearisierten Plasmide wurden daraufhin durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von Verunreinigungen befreit und nach Fällung der DNA in 30-40 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) gelöst.

Die zur stabilen Transfektion verwendeten Sp2/0-Ag14-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion erneut subkultiviert, um Zellen zu erhalten, welche sich gerade in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und um die Viabilität am Tag der Transfektion zu erhöhen.

Für die Transfektion wurden 10-20x10<sup>6</sup> Zellen, wie oben beschrieben geerntet und dreimal in kaltem (4 °C) IMDM-Medium ohne Zusätze gewaschen. Die Zentrifuge wurde für die Waschschrte ebenfalls auf 4 °C herunter gekühlt. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 300 µl kaltem IMDM-Medium resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 4 mm) überführt. Zur Zellsuspension wurde daraufhin die DNA hinzugegeben (10 µl Ighg-Kette, 15 µl Igκ-Kette, 10 µl membranständige Antigene) und die Mischung für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Die verwendeten Parameter für die Elektroporation von Sp2/0-Ag14-Zellen waren 230 V und 975 µF. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension in IMDM-Komplettmedium überführt und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:128 in einem Volumen von 50 µl auf 96-well Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde zur Selektion der transfizierten Klone in jede Vertiefung 50 µl IMDM-Komplettmedium mit 2 µg/ml des Antibiotikums G418 (Endkonzentration 1 mg/ml) pipettiert. Nach 8-10 Tagen wurden Zellklone visuell detektiert, markiert und auf Monoklonalität hin mikroskopisch kontrolliert. Von Einzelzellklonen wurden Kulturüberstände abgenommen und auf geeigneten Antigen-positiven Zellen durchflusszytomerisch auf Antikörperproduktion untersucht.



### 2.2.6 Kultivierung von antikörperproduzierenden Zellen

Murine Hybridome wurden nach dem Auftauen beziehungsweise nach der Generierung in IMDM-Komplettmedium kultiviert und für die Antikörperproduktion auf Advanced DMEM mit 1 % FCS umgestellt. Daraufhin wurden die Zellen in 50 ml Zellkulturflaschen, bis zu einem finalen Volumen von etwa 1 Liter expandiert.

Transfizierte, antikörperproduzierende Sp2/0-Ag14-Zellen wurden in IMDM-Komplettmedium kultiviert und ebenfalls in 50 ml Zellkulturflaschen expandiert. Damit wurden 3-Bodenflschen (TripleFlasks™, Thermo Scientific) angeimpft und auf ein Endvolumen von 300 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bis zu einem finalen Volumen von 1,5-2 Liter expandiert.

Wenn mikroskopisch bei den Hybridomen sowie bei den transfizierten Sp2/0-Ag14-Zellen die Viabilität der Zellkultur nur noch etwa 20 % betrug, wurde der Zellüberstand zweimal bei 6079 x g zentrifugiert, um viable Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand zur Aufreinigung der Antikörper mittels NaOH (10 M) auf einen pH 7-8 eingestellt und mit NaN<sub>3</sub> (Endkonzentration 0,02 %) versetzt. Im Anschluss wurde der Überstand mit Hilfe eines Bottle-Top Filters (0,22 µm Porengröße) sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 2.2.7 Subklonierung von Zelllinien

Zur Subklonierung wurden Zellen wie oben beschrieben geerntet, gezählt und in einer theoretischen Dichte von 0,01-10 pro Well in 200 µl auf eine 96-well Flachbodenplatte pro Verdünnung verteilt.

Nach ungefähr sieben Tagen wurden visuell Zellklone identifiziert und mikroskopisch auf Einzelzellklone kontrolliert. So identifizierte Einzelklone wurde auf Antikörperproduktion oder Antigenexpression durchflusszytometrisch getestet und bei positivem Ergebnis durch Überführung auf 48-, 24-, und 6-well Platten expandiert.

### 2.2.8 Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC)

Humane PBMC wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus humanem heparinisiertem Vollblut, von gesunden Spendern, gewonnen.

Der verwendete Biocoll-Dichtegradient enthält ein Polymer Polysucrose, welches ein Molekulargewicht von 400 kDa aufweist. Die Dichte der isotonischen Trennlösung beträgt 1,077 g/ml, wodurch tote Zellen, Granulozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer höheren Dichte durch die Trennschicht absinken und sedimentiert werden können. Die Thrombozyten und das Plasma befinden sich dagegen im Überstand. Die Lymphozyten und Monozyten akkumulieren in der Interphase zwischen dem Überstand und dem Ficoll-Kissen, wo sie isoliert werden können.

Um PBMC zu isolieren, wurde heparinisiertes Vollblut 1:2 mit DPBS verdünnt und gemischt. 25 ml davon wurden in einem 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen über 14 ml Biocoll-Lösung (Biocoll™ Separation Solution, Merck) geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 560 x g bei RT für 30 Minuten und bei ausgeschalteter Bremse. Nach der Zentrifugation wurden die Lymphozyten und die Monozyten mittels einer serologischen 10 ml Stabpipette abgenommen und in ein neues 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen überführt. Daraufhin wurden die PBMC zweimal mit 50 ml DPBS gewaschen (jeweils 10 Minuten 300 x g beziehungsweise 200 x g) um

## 2.2 Zellbiologische Methoden eukaryotischer Zellen

potenzielle Biocoll-Reste oder Kontaminationen mit Erythrozyten oder Thrombozyten zu entfernen.

Die PBMC wurden dann in Vollmedium überführt und mittels Trypanblau sowie mit Türk'scher Lösung (10 µl Zellsuspension + 90 µl Türk'sche Lösung) zur Bestimmung der Lebendzellzahl, gezählt.

### 2.2.9 Kultivierung und Expansion von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen

PBMC wurden wie beschrieben isoliert und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  / ml eingestellt. Als Medium wurde Kompletmedium (RPMI 1640) verwendet. Daraufhin wurden 150 µl der Zellsuspension in eine Vertiefung einer 24-well Flachbodenplatte gegeben. Zu den PBMCs wurden außerdem 150 µl Il-2 (Endkonzentration 100 U/ml) und 150 µl Zoledronsäure (Endkonzentration 400 nM) gegeben, um die  $\gamma\delta$ -T-Zellen zur selektiven Proliferation anzuregen. Das Il-2 bewirkt die Proliferation von T-Zellen, wenn sie über den T-Zellrezeptor stimuliert wurden. Das stickstoffhaltige Bisphosphonat Zoledronsäure erhöht zum Beispiel bei Monozyten die Akkumulation von IPP, was die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen spezifisch erkennen. Die Kombination aus Il-2 und Zoledronsäure bewirkt daher eine selektive Proliferation der V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen. Alle zwei bis drei Tage wurden der Kultur 300 µl frisches Vollmedium hinzugefügt, in welchem die Zusätze (Il-2 und Zolderonsäure) bereits enthalten waren. Nach 12-13 Tagen in Kultur wurden die  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit Hilfe der MACS®-Technologie aufgereinigt. Dazu wurde das TCR $\gamma\delta$ + T cell isolation Kit (negative Isolation) verwendet, um etwaige negative Auswirkungen von an der Zelloberfläche gebundenen Antikörpern zu vermeiden. Nach der Isolation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die Zellen, wie beschrieben gezählt und für weitere drei Tage in Vollmedium mit den Zusätzen Zoledronsäure und Il-2 in 24-well Flachbodenplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und konnten für ein Zytotoxizitätsexperiment eingesetzt werden.

### 2.2.10 Magnetische Zellseparation mittels MACS®-Technologie

Um bestimmte Zelltypen aus einer heterogenen Zellmischung zu isolieren, wurde die magnetische MACS®-Technologie (Miltenyi Biotech) verwendet [181]. Superparamagnetische Partikel, sogenannte MACS® MicroBeads, sind an sekundäre monoklonale Antikörper gebunden, welche wiederum den Biotin-getaggten monoklonalen Primärantikörper auf der Zielzelle erkennen. Das Selektionsprinzip der MACS®-Technologie nutzt daher die spezifische Expression von Zelloberflächenproteinen auf bestimmten Zelltypen. Wird die mit den Zellen beladene MACS®-Säule in einen starken Permanentmagneten eingeführt, werden aufgrund des starken magnetischen Feldes alle markierten Zellen zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen können dagegen die Säule ungehindert passieren (negative Selektion). Wird der MACS®-Separator entfernt, können die restlichen Zellen, an welche der MicroBead gebunden ist, eluiert werden (Positivfraktion).

In dieser Arbeit wurden CD8<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe von anti-CD8<sup>+</sup>-Beads aus PBMC isoliert.

Außerdem wurden  $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels des Kits TCR  $\gamma\delta$ + T cell isolation (human, negative Selektion) aufgereinigt.

Die Aufreinigung der Zellsubtypen erfolgte nach Herstellerprotokoll.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.11 Inaktivierung von Tumorzellen

Die Inaktivierung der Tumorzellen erfolgte durch  $\gamma$ -Strahlung. Die Bestrahlung geschah durch eine  $^{137}\text{Cs}$ Quelle, wodurch die DNA der Tumorzellen geschädigt wurde und keine weitere Proliferation der Zellen stattfinden konnte. Die Inhibition der Zellproliferation der Tumorzellen wurde benötigt, um eine antikörpervermittelte T-Zellproliferation ohne störende Proliferation der Zielzellen (Tumorzellen) zu messen.

Die Bestrahlungszeit betrug 20 Minuten was einer Strahlendosis von etwa 120 Gy entspricht.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Plasmid-Aufreinigung

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte durch kommerzielle Kits der Firma Qiagen (Hilden). Die Aufreinigungsmethode basiert auf der Grundlage der alkalischen Lyse [182].

Je nach gewünschter Ausbeute, wurde entweder das QIAprep® Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder das QIAGEN® Plasmid-DNA Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Plasmidaufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.3.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Zur Extension von DNA-Abschnitten wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR). Hierzu wurden ca. 24 Nukleotide lange Oligonukleotide mit Überhängen generiert, um DNA-Abschnitte zu verlängern oder eine Restriktionsschnittstelle einzufügen, welche sich spezifisch an das zu amplifizierende Template anlagert. Schlüsselenzym der PCR, ist eine thermostabile Polymerase, welche mit Hilfe der zugegebenen vier Desoxyribonucleosid-Triphosphaten (dNTPs) zur Amplifizierung des DNA-Abschnittes führt. Durch die sich mehrfach wiederholenden PCR-Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation), kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der zu amplifizierten DNA, da alle neu gebildeten DNA-Abschnitte im nächsten PCR-Zyklus als Matrize dienen.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ .

Template DNA	1-5 ng
Primer forward (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
Primer reverse (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
dNTPs Stocklsg. (10 mM)	4 $\mu\text{l}$
10x Puffer	5 $\mu\text{l}$
Polymerase	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O (bidest.)	ad 50 $\mu\text{l}$

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Das PCR-Profil wurde folgendermaßen gewählt:

96 °C	5min
96 °C	30 sec
64 °C	30-60 sec 30x
72 °C	30 sec
72 °C	10 min

### 2.3.3 Analytische und präparative Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu DNA-Stücke ihrer Größe nach, durch ein elektrisches Spannungsfeld, zu trennen und mit ebenfalls sich auftrennenden Markerbanden zu vergleichen. Durch die elektrische Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente in der Agarosematrix zur Anode und erfahren gleichzeitig durch die Agarose einen molekularen Siebeffekt. Am Ende eines Laufes befinden sich kleine DNA-Fragmente daher näher an der Anode als größere DNA-Abschnitte. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1 % (w/v) Agarosegelen in 1x TAE mit 1-2 µg/ml Ethidiumbromid.

Die DNA-Lösungen wurden davor mit einem 6-fach Ladepuffer (*Gel Loading Dye, Purple*, New England Biolabs) versetzt. Als Größenmarker wurde ein 1 kb plus Leiter und als Laufpuffer 1x TAE verwendet.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für präparative Gele bei 100V und für analytische Gele bei 120V. Die DNA-Banden wurden nach erfolgter Trennung unter UV-Licht, durch die Fluoreszenz des in der DNA-Helix interkalierten Ethidiumbromids, visualisiert.

### 2.3.4 Aufreinigung von Nukleinsäure-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die DNA-Fragmente wurden unter möglichst kurzer UV-Belichtung mit Hilfe eines sauberen Skalpell ausgeschnitten. DNA-Abschnitte bis zu einer Länge von 10 kB wurden unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus der Agarose eluiert. Dieses System verwendet bestimmte Säulen, welche eine Silicamembran beinhalten, an welche DNA unter Hochsalzbedingungen bindet. Nach mehreren Waschschritten kann die DNA mittels Niedrigsalzpuffer oder H<sub>2</sub>O (bidest.) eluiert werden. Die eluierte DNA wurde direkt weiterverwendet oder konnte über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden.

DNA-Fragmente von einer Größe über 10kB wurden mit dem DNA, RNA und Protein *purification* Kit NucleoSpin® (Gel and PCR clean-up) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### 2.3.5 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Um die linearisierten Expressionsvektoren von hydrophoben Verunreinigungen und Proteinen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl (25:24:1) versetzt, kräftig geschüttelt, gevortext und zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde daraufhin entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um verbliebene Phenolreste zu entfernen, erfolgten drei Extraktionen mit je einem

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Volumenanteil Chloroform. Die Präzipitation der Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase erfolgte durch die Zugabe von 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol für mindestens 1 h bei -80 °C. Daraufhin wurde die DNA mit Hilfe einer Tischzentrifuge bei 17900 x g für 1 h bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet unter möglichst sterilen Bedingungen (unter einer Sterilbank) getrocknet und in H<sub>2</sub>O (bidest.) gelöst.

### 2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente in einen entsprechenden Expressionsvektor zu klonieren, wurden der Vektor wie auch das Insert mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten, um palindromische und identische DNA-Überhänge zu generieren. Nach dem Restriktionsverdau der DNA, wurde diese aufgereinigt und für die Ligation der Vektor mit der 5-fachen Menge an Insert versetzt.

Für die Ligation der DNA-Fragmente wurde das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym generiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Ketten.

Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA betrug dabei 50 ng, wobei das molare Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA ca. 5:1 betrug. Um auch das Verhältnis der Länge der DNA-Abschnitte zu berücksichtigen, wurde zur Berechnung der benötigten Menge Insert-DNA folgende Formel verwendet:

$$\text{Masse[ng]} = 5 \times \text{Masse[ng]} \times \text{Länge[bp]} / \text{Länge[bp]}$$

Die so berechneten Volumina an Vektor- und Insert-DNA-Lösungen wurden mit 10x T4 DNA-Ligasepuffer sowie 1µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) versetzt und mit H<sub>2</sub>O (bidest.) auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min.

Die Reaktionen wurden im Anschluss direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

### 2.3.7 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Alle Reaktionen wurden bei der optimalen Temperatur und unter Berücksichtigung des empfohlenen Puffers der verwendeten Restriktionsendonukleasen durchgeführt.

Analytischer Verdau:

Ein analytischer Verdau wurde durchgeführt, um Bakterienklone auf die Insertion des gewünschten DNA-Fragments in ein Plasmid zu testen.

Alle analytischen Reaktionen wurden in einem Volumen von 10 µl für 30-60 min durchgeführt.

Plasmid-DNA 1 µl

10x Reaktionspuffer 1 µl

Restriktionsendonuklease 10 U

H<sub>2</sub>O (bidest.) ad 10 µl

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### Präparativer Verdau:

Sollten DNA-Fragmente aus bereits bestehenden Vektoren isoliert werden, wurden Ansätze mit einem Volumen von 100 µl verwendet. Der präparative Verdau wurde mit Mineralöl überschichtet und mindestens 6 h, meist aber über Nacht, bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert.

Plasmid-DNA ca. 4 - 8 µg  
10x Reaktionspuffer 5 µl  
Restriktionsendonuklease 10 U  
H<sub>2</sub>O (bidest.) ad 100 µl

Falls nötig und möglich wurde ein Doppelverdau mit beiden Enzymen im selben Reaktionsansatz durchgeführt. Die Auftrennung und Isolierung der Fragmente erfolgte wie beschrieben.

### 2.3.8 Herstellung von kompetenten Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien des Stammes DH5α wurden Bakterien ausgehend von einem Glycerolstocks auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde ein Einzelklon in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. 50 µl dieser Übernachtskultur wurde daraufhin in 5ml LB-Medium überführt und für weitere 1-2 Stunden kultiviert (250rpm, 37 °C). Nach Zugabe von weiteren 95 ml LB-Medium erfolgte die Kultivierung bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>550nm</sub>) von 0,2-0,3, woraufhin die Zellen pelletiert wurden (1560 x g, 10 Minuten, 4 °C). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde dann in 20 ml TfbI-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 4 ml TfbII-Puffer zügig resuspendiert und Aliquots zu je 100 µl bei -80 °C eingefroren und gelagert.

### 2.3.9 Transformation von kompetenten Bakterien (*E.coli*)

Die kompetenten Bakterien es Stammes DH5α wurden bei -80 °C gelagert und vor der Transformation ein Aliquot auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension mit Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C wurden 300 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden, um Einzelklone zu erhalten, unterschiedliche Verdünnungen des Transformationsansatzes auf einer LB-Platte ausgestrichen, welche supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz war. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.4 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

### 2.3.10 Anlegen von Bakterienkulturen

Erkennbare Einzelklone wurden mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf eine neue LB-Platte (Masterplatte) übertragen, mit derselben Pipettenspitze wurden daraufhin 5 ml LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin+25mM Glucose) angeimpft und für die Mini-Plasmid-Präparation für 16 h bei 37 °C und 200 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert.

Da für die Transfektion von Zellen größere Mengen der Expressionsvektoren in hoher Reinheit benötigt wurden, mussten Maxikulturen angesetzt werden. Dazu wurde ein Einzelklon oder Bakterien von der Masterplatte mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt und eine 250 ml LB-Amp-Lösung angeimpft und 16 h (37 °C, 200 rpm) inkubiert.

### 2.3.11 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde extern entweder von der Firma Microsynth (Balgach) oder von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

Die Sequenzierungstechnologie beruht bei beiden Firmen auf der von Sanger et al. beschriebenen Kettenabbruchmethode [183], wobei die radioaktiv markierten Didesoxynukleotide heute durch fluoreszenzmarkierte ersetzt wurden.

Zur Sequenzanalyse wurden 0,8-1,5 µg Plasmid-DNA mit 30 pmol Primer versetzt und bis zum gewünschten Volumen der jeweiligen Firma mit H<sub>2</sub>O (bidest.) aufgefüllt. Die zu sequenzierenden Proben wurden daraufhin per Post an GATC Biotech beziehungsweise Microsynth versendet.

## 2.4 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

### 2.4.1 Immunisierung von Mäusen

Etwa acht Wochen alte BALB/c oder C57BL/6 Mäuse wurden entweder mit Sp2/0-Zellen, in welche durch Transfektion ein Antigen (PSMA oder CDCP1) eingebracht wurde oder mit einem in Sp2/0 produzierten Fusionsprotein, immunisiert. Dafür wurden 5-10x10<sup>6</sup> (Sp2/0-PSMA; Sp2/0-CDCP1) Zellen oder 100 µg Fusionsprotein in 150 µl PBS intraperitoneal (i.p.) appliziert. Bis zu fünf Immunisierungen erfolgten in zweiwöchigen Intervallen. Die finale Immunisierung erfolgte intravenös (i.v.) vier Tage vor der Fusion.

Eine Woche nach jeder Immunisierung wurde den Mäusen mittels einer Glaskapillare retrobulbär etwa 50 µl Blut entnommen, um die spezifischen Antikörpertiter durchflusszytometrisch zu bestimmen.

Tierexperimentelle Arbeiten wurden der zuständigen Genehmigungsbehörde, dem Regierungspräsidium Tübingen, angezeigt (§10a).

### 2.4.2 Generierung von antikörperproduzierenden Hybridomzellen

Vier Tage nach der letzten i.v. Immunisierung wurden die Mäuse mittels letaler CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz entnommen, kurz in PBS gewaschen und mögliche Bindegewebsreste vorsichtig entfernt. Um eine homogene Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Milz mit Hilfe eines Spritzenstempels durch einen Teesieb in eine sterile Petrischale mit vorgewärmtem IMDM-Medium gedrückt. Die Einzelsuspension wurde daraufhin

## 2.4 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

in ein 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen überführt und für ca. 3-5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich die größeren Gewebstücke absetzen konnten. Daraufhin wurde die Einzelzellsuspension abgenommen, in ein neues 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen transferiert, gewaschen (10 min, 400 x g) und die Zellzahl mittels Türk'scher Lösung bestimmt. Die Fusionspartner Sp2/0-Ag14 Zellen wurden in IMDM-Medium (5 % FCS) und mit einer Zelldichte von maximal  $0,5 \times 10^6$  pro ml kultiviert. Für eine optimale Herstellung von Hybridomen, sollten sich die Fusionspartner (Sp2/0 Zellen) am Tag der Fusion in einer logarithmischen Wachstumsphase befinden. Für die Fusion wurden die Fusionspartner dreimal mit IMDM-Medium ohne Zusätze gewaschen (10 min, 200 x g) und mittels Trypanblau und einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt. Zur Fusion wurden  $5 \times 10^6$  Myelomzellen und  $20 \times 10^6$  Milzzellen in einem 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen gemischt und abzentrifugiert (10 min, 400 x g).

Daraufhin wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Zellpellet vorsichtig aufgeschüttelt. Anschließend wurde während einer Minute unter ständigem Schütteln 1 ml vorgewärmte PEG 1500-Lösung tröpfchenweise dazu pipettiert und eine weitere Minute inkubiert. Unter kontinuierlichem Schütteln wurde daraufhin 10 ml IMDM-Medium (ohne Zusätze) über 3 min hinzugegeben und für 5 min inkubiert.

Nach der schrittweisen Verdünnung der PEG 1500-Lösung wurden die 50 ml Plastikzentrifugationsröhrchen auf 50 ml mit IMDM-Medium (ohne Zusätze) aufgefüllt und abzentrifugiert (10 min, 200 x g) und direkt im Anschluss in 30 ml IMDM-Medium (20 % FCS, 10 % HCS) aufgenommen und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette auf drei 96-well Flachbodenplatten verteilt (100  $\mu$ l pro Vertiefung). Die Zellen wurden bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 2.4.3 Selektion von Hybridomzellen

Zur Selektion der Hybridomzellen wurde nach 24 h in jede Vertiefung IMDM-Medium (2x HAT, 20 % FCS, 10 % HCS) hinzugegeben.

Daraufhin wurden die Zellen für weitere 7-10 Tage im Brutschrank bei den oben genannten Bedingungen inkubiert.

### 2.4.4 Austestung von Hybridomüberständen

Nach etwa 7-10 Tagen erfolgte eine visuelle Kontrolle jeder Vertiefung auf wachsende, viable Hybridomkolonien. Überstände dieser Kolonien wurden gesammelt und anschließend durchflusszytometrisch auf Antikörperproduktion und Antikörperspezifität hin untersucht. Positive Klone wurden 2-3 Tage später erneut durchflusszytometrisch getestet.

### 2.4.5 Subklonierung von positiven Hybridomklonen

Zweimalig durchflusszytometrisch positiv getestete Hybridomklone wurden durch das Ansetzen von Verdünnungsreihen subkloniert. Die daraus resultierenden Einzelklone wurden erneut durchflusszytometrisch auf Antikörperproduktion und Antikörperspezifität getestet. Ein Teil der monoklonalen Hybridomzellen wurde kryokonserviert, der andere Teil zur Antikörperproduktion in Advanced-DMEM-Medium (1 % FCS) überführt und expandiert.



## 2.5 Chromatographische Verfahren

### 2.4.6 Retrobulbäre Blutentnahme und Isolierung von Serum bei Mäusen

Zur Gewinnung von Serum erfolgte die Blutentnahme retrobulbär unter einer Äther-Betäubung. Das Vollblut wurde gesammelt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert und anschließend das Serum vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.5 Chromatographische Verfahren

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf Protein-Ligand-Wechselwirkungen an die stationäre Phase des Systems. Dafür können unterschiedliche Liganden wie zum Beispiel spezifische Proteine oder Antikörper verwendet werden, die mit höherer oder geringerer Affinität Proteine aus einer Lösung absorbieren können. In dieser Arbeit wurden zur Aufreinigung von Antikörpern Protein A oder KappaSelect verwendet.

### 2.5.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A

Protein A ist ein Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus* und wird rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Es bindet spezifisch an die konstante Fc-Region von Antikörpern verschiedener Säugetiere der Klasse IgG und einige Antikörper der Klasse IgA und IgM. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgt durch Änderung des pH-Wertes und / oder der Ionenstärke.

Der filtrierte (0,22 µm) Zellüberstand wurde mit Hilfe von NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7-8 eingestellt und anschließend mittels einer ÄKTA pure (GE Healthcare) mit einer Flussgeschwindigkeit von etwa 1 ml/min auf eine Protein A-Säule aufgetragen.

### 2.5.2 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie an KappaSelect

Einige der generierten Antikörperformate haben eine nahezu vollständige Deletion der C<sub>H</sub>3-Domäne, wodurch diese Moleküle keine Bindung an Protein A zeigen. Zur Aufreinigung solcher Antikörperformate konnte als Alternative der Ligand KappaSelect verwendet werden. KappaSelect ist ein 13 kDa großer single-domain Antikörper, welcher rekombinant in *Saccharomyces cerevisiae* produziert wird und spezifisch die konstante Region der leichten (kappa) Kette bindet. Dieser Ligand wird an Agarose-Beads gekoppelt und kann damit als stationäre Phase verwendet werden.

### 2.5.3 Dialyse von monoklonalen Antikörpern

Das Antikörper enthaltende Eluat wurde direkt in einen Dialyseschlauch überführt, um einen neutralen pH-Wert einzustellen und den Elutionspuffer gegen DPBS auszutauschen, in 1,5 Liter DPBS gegeben und unter Rühren für mindestens 12 h bei 4 °C dialysiert.

## 2.6 Analytische Methoden

Die Dialyseschläuche haben eine Ausschlussgrenze (engl.: *Molecular weight cut-off*, MWCO) von 14000 Da. Im Anschluss wurde die Antikörperlösung mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0,22 µm) sterilfiltriert. Die Antikörper-Lösungen wurden in Kryoröhrchen bei 4 °C gelagert.

### 2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen mittels NanoDrop

Von dem sterilfiltrierten und dialysierten Eluat wurde die Konzentration unter Verwendung eines NanoDrop™ 1000-Spektrophotometers (Extinktionskoeffizient "IgG") bestimmt. Es wurden mindestens drei Proben vermessen und davon der Mittelwert der Antikörperkonzentration errechnet.

## 2.6 Analytische Methoden

### 2.6.1 Analytische Gelfiltration

Eluierte und dialysierte Antikörper-Lösungen wurden mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Hierzu wurde das UHPLC-System "Dionex Ulti-Mate 3000 BioRS" mit der Säule "Superdex 200 Increase 10/300 GL" verwendet. Das System wurde mit einer Flussrate von 500 µl/min DPBS betrieben. Es wurden etwa 10 µg eines Antikörpers in maximal 50 µl DPBS aufgetragen. Die Retention der aufgetrennten Proteine auf der Säule wurde bei einer Adsorption von 220 nm ermittelt. Zur genauen Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurde eine Eichkurve mit Proteinen einer definierten Größe (Standard Bio-Rad) verwendet.

### 2.6.2 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Dieses von Laemmli entwickelte elektrophoretische System wird benutzt um die Reinheit einer Proteinlösung sowie das Molekulargewicht der enthaltenen Proteine zu untersuchen [184]. Dabei erfolgt die Trennung des Stoffgemisches abhängig vom Molekulargewicht der Proteine, da durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine ein konstantes Verhältnis zwischen Masse und Ladung aufweisen.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit SDS-Ladepuffer (2x) versetzt und, um die Denaturierung der Proteine zu gewährleisten, für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Bei den reduzierenden Proben wurde dem Ladepuffer zusätzlich β-Mercaptoethanol hinzugefügt, dadurch kommt es zur Reduzierung von Disulfidbrücken und bei Antikörpern zur Dissoziation von leichter und schwerer Kette.

Die elektrophoretische Trennung der Proteine fand in 10 % Mini-PROTEAN® TGX Precast Gelen unter Verwendung einer Mini-PROTEAN® TetraCell bei 120V für ca. 1,5 h statt.

Die Visualisierung, die Färbung der Proteinbanden, erfolgte durch die Zugabe der Coomassie Brilliant Blue-Lösung. Nach Entfärben mittels H<sub>2</sub>O (bidest.) wurden die Gele mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

## 2.7 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

### 2.6.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Grundlage für die durchflußzytometrische FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)- Analyse ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluorochrom-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Durchflusszytometrie wurde mit direkt-konjugierten sowie mit unkonjugierten Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden Zellen wie oben beschrieben geerntet, gezählt und anschließend  $0,1-0,5 \times 10^6$  Zellen pro Messpunkt verwendet. Zur Färbung der Zellen wurde eine 96-well Rundbodenplatte verwendet. Die Zellen wurden für 3 min bei  $600 \times g$  zentrifugiert und anschließend der Überstand abgekippt. Alle Antikörperinkubationen erfolgten in  $50 \mu\text{l}$ , im Dunkeln und bei  $4^\circ\text{C}$ . Nicht-fluorochrom-markierte Antikörper wurden daraufhin dreimal gewaschen ( $200 \mu\text{l}$  FACS-Puffer) und mit den entsprechenden fluorochrom-markierten sekundär Reagenzien nach Herstellerangabe verdünnt und detektiert. Überschüssige sekundäre Antikörper wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Direkt-markierte Antikörpern wurden nach Herstellerangaben verdünnt und ebenfalls in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  verwendet.

Zur Identifizierung viabler Zellen wurden die Zellpellets, nach dem letzten Waschschrift in FACS-Puffer mit 7AAD ( $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) resuspendiert.

Um unspezifische Bindungen beziehungsweise Fc-Rezeptor vermittelte Bindungen zu kontrollieren, wurden bei jeder FACS-Analyse die entsprechenden Isotypkontrollen verwendet. Um unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurde dem FACS-Puffer humanes Ig (FleboGamma  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) hinzugegeben, dies konnte jedoch nur verwendet werden wenn kein human-spezifisches Detektionsreagenz benutzt wurde.

### 2.6.4 Durchflusszytometerische Analyse der Antikörper-vermittelten Expressionsmodulation

Um durch die Antikörperbindung eine Veränderung der Antigenexpression nachzuweisen, wurden  $0,2-0,5 \times 10^6$  Zellen in 96- beziehungsweise 24-well Flachbodenplatten mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen für 24 h oder 48 h im  $\text{CO}_2$ -Begasungsschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt wurden die Zellen resuspendiert beziehungsweise abgelöst und auf eine 96-well Rundbodenplatte übertragen. Nach zwei Waschrufen ( $200 \mu\text{l}$  FACS-Puffer) erfolgte eine Inkubation (im Dunkeln,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min) mit dem Antikörper, mit welchem die Zellen davor inkubiert wurden. Dafür wurde eine saturierende Antikörperkonzentration ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) verwendet. Nach zweimaligem Waschen, erfolgte ein Inkubationsschritt mit einem entsprechenden fluorochrom-markierten Sekundärreagenz. Darauf wurde die Messung der Proben, unter Verwendung von Negativ- und Isotypkontrollen, durchgeführt.

## 2.7 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

### 2.7.1 $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungstest

Der  $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungstest wurde verwendet um Antikörper-vermittelte Zytotoxizität zu messen. Dafür wurden Tumorzellen mit  $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromat inkubiert. Dabei nehmen die Zellen  $\text{Cr}^{6+}$  auf, welches im Zytoplasma zu  $\text{Cr}^{3+}$  umgewandelt wird und unter anderem an

## 2.7 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

Aminosäuren bindet. Diese Komplexe werden von lebenden Zellen nur sehr langsam abgegeben. Wird eine Zelle aber lysiert gelangen die Komplexe direkt in das Kulturmedium und können detektiert werden. Somit korreliert die Menge an  $\text{Cr}^{3+}$  im Zellüberstand mit der Menge an lysierten Tumorzellen. Unter Berücksichtigung folgender Formel kann die spezifische Lyse für jede Probe bestimmt werden:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm\_Probe} - \text{cpm\_Spontanfreisetzung}}{\text{cpm\_maximaleFreisetzung} - \text{cpm\_Spontanfreisetzung}} * 100$$

Tumorzellen wurden wie bereits beschrieben geerntet, gezählt und anschließend in neues Kulturmedium aufgenommen ( $1 \times 10^6$  Zellen/1 ml). Anschließend wurden die Zellen, mit  $150 \mu\text{Ci/ml}$   $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und darauf dreimal mit 12 ml gewaschen. Danach wurden die Zellen ( $1 \times 10^4$ ) auf einer 96-well Flachbodenplatte ausplattiert. Um die Antikörpervermittelte Tumorzellyse zu bestimmen, wurden daraufhin die zu untersuchenden Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  zu den Tumorzellen gegeben. Als Effektorzellen wurden PBMC oder prä-aktivierte  $\text{CD}8^+$  T-Zellen benutzt (3 Tage mit  $25 \text{ ng/ml}$  UCHT-1), welche in definierten Effektor-Tumor-Verhältnissen ebenfalls zu den Tumorzellen pipettiert wurden.

Die Inkubation der Proben erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem  $\text{CO}_2$ -Begasungsschrank für 4-24 h. Nach der Inkubation wurden vorsichtig Überstände von den Kokulturen genommen und auf Feststoffsintillationsplatte (Lumaplate) übertragen. Diese Platten wurden daraufhin bei  $50^\circ\text{C}$  getrocknet und im  $\beta$ -Zähler ausgewertet.

Zur Berechnung der spezifischen Lyse der einzelnen Proben wurden Kontrollen mitgeführt. Es wurde die spontane Chromfreisetzung der Tumorzellen in Vollmedium, sowie die maximale Chromfreisetzung in Vollmedium mit 1 % Triton-X bestimmt.

Alle Proben wurden in einem Endvolumen von  $200 \mu\text{l}$  und als Triplikate angesetzt.

### 2.7.2 $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Proliferationstest

Als Nachweismethode für Zellproliferation wurde der  $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Inkorporationsassay verwendet. Dieser Test verwendet tritiiertes Thymidin, welches während der Zellteilung in neu synthetisierte DNA eingebaut wird und mit dem Maß der Proliferation der Zellen korreliert.

Humane PBMC wurden isoliert und gezählt.  $0,2-0,3 \times 10^6$  PBMC wurden pro Vertiefung einer 96-well Flachbodenplatte ausplattiert. Dazu wurden  $0,1 \times 10^6$  inaktivierte Tumorzellen gegeben. Als letztes wurden die Antikörper in entsprechenden Konzentrationen zu der Zellmischung hinzugefügt. Alle Tests wurden in  $200 \mu\text{l}$  Endvolumen (Komplettmedium) und als Triplikate durchgeführt.

Nach einer Inkubationszeit von 48-72 h wurde zu jeder Probe  $0,5 \mu\text{Ci}$   $^3\text{[H]}$ -Thymidin pipettiert und die Proben für etwa weitere 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels dem Cell Harvester auf Printet Filtermat A Matten geerntet. Nach Trocknung der Filtermatten bei  $50^\circ\text{C}$  wurde das inkorporierte Thymidin mit Hilfe des 2450 Microplate Counters, nach Zugabe des Szintillationscocktails Ultima Gold, quantifiziert.

### 2.7.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Antikörper-vermittelten Lyse

0,5x10<sup>6</sup> PBMCs wurden mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen in einer 96-well Flachbodenplatte inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Das Endvolumen betrug 200 µl und alle Proben wurden als Triplikate angesetzt. Nach der Inkubationszeit von 3-4 Tage wurden die Zellen mittels einer Multikanalpipette auf eine Rundbodenplatte überführt und abzentrifugiert (600 x g, 3 min). Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer, welcher 50 µg/ml Flebo-γ (humanes IgG) enthielt, resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptoren zu blockieren. Daraufhin wurden die Zellen erneut pelletiert (600 x g, 3min) und mit den erforderlichen direkt-markierten Antikörpern in einem Volumen von 50 µl gefärbt (30 min, 4 °C, im Dunkeln). Um unspezifische Bindungen zu erkennen, wurden Kontrollen (FMO, engl.: *Fluorescence minus one*) mitgeführt, wobei ein direkt-markierter Antikörper durch die entsprechende Isotypkontrolle ersetzt wurde. Alle verwendeten Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt. Als Kompensationskontrollen dienten einfach-gefärbte Kompensationspartikel (engl.: *Compensation Particles*, BD Biosciences). Daraufhin erfolgten zwei Waschriffe mit 200 µl FACS-Puffer und anschließend wurden die Zellen in 200 µl FACS-Lyse Puffer aufgenommen.

Die Analyse der Proben geschah mit Hilfe eines FACSCantoII™ (BD Biosciences). Die im FACS-Lyse Puffer beinhalteten Partikel wurden in der SSC-H/SSC-A-Darstellung sichtbar gemacht und eine definierte Anzahl als Stopkriterium der Datenaufzeichnung definiert, wodurch es möglich war die Zellzahl standardisiert zu bestimmen und Zellpopulationen zwischen den einzelnen Proben, bezogen auf zum Beispiel Proliferation oder Zelllyse, zu vergleichen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der FlowJo-Software. Zunächst wurden die viablen Zellen (7AAD<sup>-</sup>) und die CD45<sup>+</sup> identifiziert. Daraufhin wurden die Zielzellen (CD19<sup>+</sup>/PSMA<sup>+</sup>) sowie die Effektorzellen (αβ TCR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>)/(CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD326<sup>+</sup> (EpCAM)) bestimmt. Außerdem konnte der Aktivierungsstatus der Effektorzellen über die Expression des Aktivierungsmarkers CD69<sup>+</sup> festgestellt werden.

Zur Auswertung des Experiments wurden die absoluten Zellzahlen der entsprechenden Populationen herangezogen und mit der Mediumkontrolle beziehungsweise der Isotypkontrolle verglichen.

### 2.7.4 X-Celligence-Test (Impedanzmessung)

Das xCelligence-System ermöglicht die kontinuierliche Überwachung des zellulären Phänotyps in Echtzeit. Das Prinzip beruht auf der Wechselwirkung von adhärennten Zellen zu Biosensoren am Boden von speziellen 96-well E-Platten. Über diese integrierten Mikroelektroden kann der Zellwiderstand (=elektronische Impedanz) gemessen werden. Veränderungen der Zell-Elektroden-Impedanz können kontinuierlich in Echtzeit dokumentiert werden und liefern somit Informationen über Zellzahl, Toxizität, Adhäsion und Morphologie der Zellen.

Die relative Änderung der elektronischen Impedanz im Verlauf der Zeit wird als dimensionsloser „cell Index“ (CI) dargestellt und repräsentiert den Zellstatus. Dies bedeutet, dass eine starke Adhäsion beziehungsweise ein Ausbreiten der Zellen (Proliferation) zu einem größeren Zellwiderstand und somit zu einem Anstieg des CI führt. Im Gegensatz dazu führt ein Ablösen der Zellen beziehungsweise ein Sterben der Zellen zu einem verringerten Zellwiderstand und zu einem Absinken des CI.

Dadurch können im Vergleich zu üblichen Endpunkttests zum Beispiel Antikörper-vermittelte zytotoxische Effekte von Anfang bis Ende des Experimentes exakt dokumentiert werden.

## 2.7 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

Zur Hintergrundmessung der 96-well E-Platte wurden 50 µl des entsprechenden Vollmediums in jede Vertiefung pipettiert, die Platte in der Messstation arretiert und die Messung gestartet. Daraufhin wurden die Tumorzellen in einer definierten Anzahl, abhängig von der verwendeten Zelllinie, in einem Volumen von 50 µl/well ausgesät. Es folgte eine Inkubation der Zellen für ca. 24 h, wobei jede 15 min der CI bestimmt wurde. Nach der Anwachsphase der Zellen wurde die E-Platte aus der Messstation genommen und die PBMC und die Antikörper hinzugegeben. Alle Proben wurden in Triplikaten angesetzt und die Impedanz wurde alle 15 min gemessen.

### 2.7.5 Nachweis von Vγ9Vδ2-Fusionsproteinen mittels ELISA

Der ELISA (engl.: *Enzyme-linked-immunosorbent assay*) wurde verwendet um das Vγ9Vδ2-Fusionsproteine im Überstand von transfizierten Sp2/0 Zellen nachzuweisen. Dafür wurde eine Maxisorb 96-well ELISA Platte über Nacht mit 5 µg/ml Antikörper (Ziege-anti-human Fc-Teil) in PBS beschichtet. Alle Inkubationsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einem Volumen von 50 µl durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Platte ausgekippt und 100 µl Blockierlösung (DPBS + 10% Rinder Serumalbumin) pro well transferiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen (Waschpuffer: DPBS + 0,05 %Tween-20). Die zu testenden Überstände wurden in Waschpuffer verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Darauf folgten vier Waschschrte und die Inkubation mit einem biotinylierten Detektionsantikörpers (Ziege-anti-human Fcγ spezifisch) für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Platte erneut viermal gewaschen und mit 50 µL/well Streptavidin-HRP (1:5000 in Waschpuffer mit 2,5 % BSA) für 30 min inkubiert. Darauf folgten fünf weitere Waschrte und die Inkubation mit der TMB-Substratmischung bis zur gewünschten Farbreaktion. Daraufhin wurde die Reaktion mittels 50 µl/well 1 M Phosphorsäure abgestoppt und der Farbumschlag bei einer optischen Dichte von 450 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenmessgeräts bestimmt.

### 2.7.6 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Die immunhistologische Färbung von humanen Geweben wurde benutzt, um die Antigenexpression auf benignen und malignen Geweben zu untersuchen.

### 2.7.7 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Proben wurden bei -80 °C gelagert und konnten mittels TissueTek® auf den Probenhalter des Kryotoms aufgebracht werden. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 10 µm, bei ca. -20 °C angefertigt und auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgebracht. Daraufhin wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.7.8 Färben von Kryoschnitten

Um die Kryoschnitte zu färben, wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit eiskaltem Aceton für 10 min chemisch fixiert.

Nach diesem Schritt wurden die Schnitte dreimal jeweils für 5 min mit DPBS gewaschen.

## 2.7 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

Anschließend wurde die endogene Peroxidase mittels 1 %iger  $H_2O_2$  in Methanol (v/v) für 10 min blockiert. Daraufhin wurde der Waschschriff wie oben beschrieben wiederholt. Im Anschluss wurde der Primärantikörper in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Des Weiteren wurde der Primärantikörper abgekippt und die Schnitte ein weiteres Mal gewaschen. Darauf folgte die Detektion des murinen Primärantikörpers mittels Meerrettich-Peroxidase-Polymer ZytoChem Plus (engl.: *horse radish peroxidase (HRP) polymer*) für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Das verwendete Polymer besteht aus einem linearen Proteinskelett, an welches mehrere Moleküle Meerrettich-Peroxidase sowie anti-Maus Igy F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente gekoppelt sind. Der Vorteil des Polymers besteht darin, dass kein Biotin gekoppelter Antikörper verwendet werden muss, welcher teilweise zu einer erhöhten Hintergrundfärbung führen kann. Die Verwendung von Polymeren ist auch geeignet um geringe Mengen des Antigens zu detektieren, da die Methode sensitiver als die herkömmliche Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB) ist.

Um die Antikörper-Antigen-Komplexe sichtbar zu machen, wurde das Reagenz 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung verwendet, welches vor Gebrauch nach Herstellerangaben frisch angesetzt wurde. Das sichtbar machen geschieht indem die Peroxidase mit dem Wasserstoff als Katalysator und dem Chromogensubstrat 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) ein braunes Endprodukt an der Stelle des Antigens bildet. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit  $H_2O$  (bidest.) gestoppt und die Zellkerne mittels Papanicolaou-Lösung für 15 Sekunden gegengefärbt und daraufhin dreimal mit  $H_2O$  gewaschen. Des Weiteren wurden die Schnitte zügig durch eine Ethanol/Ammoniak-Lösung geschwenkt. Zur Konservierung und langfristigen Lagerung wurden den Schnitten durch eine ansteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %, 100 %; Inkubation für je 2 min) das Wasser entzogen. Es folgte eine zweimal 5 minütige Behandlung mit Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Deckglases und Entellan Neu® eingebettet. Daraufhin konnten die Schnitte lichtmikroskopisch betrachtet und dokumentiert werden.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -CDCP1-Antikörper

Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Beobachtung in der Arbeitsgruppe, dass CDCP1 transfizierte Sp2/0-Zellen eine deutlich erhöhte Tumorigenität in BALB/c Mäusen aufwiesen (Dr. Martin Hofmann, in Übereinstimmung mit Literaturberichten), wonach eine CDCP1-Expression metastasierungsfördernd ist. Frühere Versuche durch Immunisierung von BALB/c Mäusen CDCP1 produzierende Hybridome zu generieren verliefen aber erfolglos. Um doch noch zum Erfolg zu kommen, wurden für die vorliegende Arbeit zum einen besonders gut exprimierende Transfektanten generiert (Abbildung 3.1) zum anderen wurden wegen der hohen Maus/Mensch Homologie des CDCP1 Proteins CDCP1 defiziente Mäuse (B6.129 (cg).CDCP1<sup>tm1.2Moas</sup>/j, Charles River) zur Immunisierung verwendet.

### 3.1.1 Generierung einer Sp2/0-CDCP1-Transfektante

Die Herstellung von Hybridomen setzt voraus, dass das Antigen zur Immunisierung der Mäuse vorhanden ist. Bei membranständigen Antigenen gibt es die Möglichkeit einerseits das Protein zum Beispiel rekombinant an einen Fc-Teil gekoppelt durch Transfektion von eukaryotischen Zellen zu produzieren und aufzureinigen oder andererseits Antigen-exprimierende Zellen zur Applikation zu verwenden.

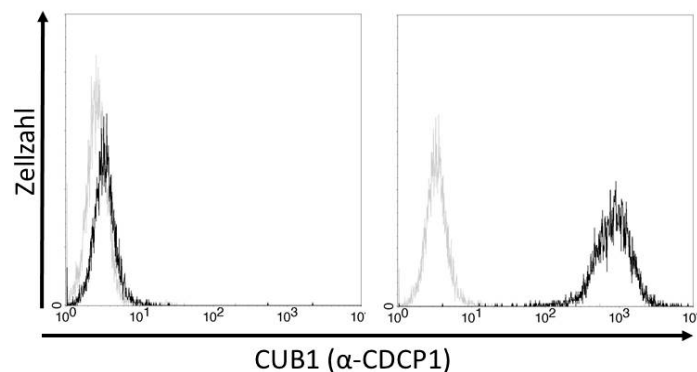


Abbildung 3.1: CDCP1-Expression der neu generierten transfizierten Sp2/0-Ag14-Zellen  
Transfizierte, sowie untransfizierte Sp2/0-Ag14-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  CUB1-Antikörper bzw. eines Kontrollantikörpers (mIgG2b) inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.  
Die Histogramme zeigen die Bindung des  $\alpha$ -CDCP1-Antikörpers (schwarze Linie) bzw. der Isotypkontrolle (graue Linie) auf den Wildtyp Sp2/0-Zellen (untransfizierte Zellen) bzw. den Sp2/0-CDCP1-exprimierenden (transfizierte Zellen) Zellen.



### 3.1 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -CDCP1-Antikörper

#### 3.1.2 Immunisierung von Mäusen mit Sp2/0-CDCP1-Transfektanten und Messung des CDCP1-spezifischen Antikörperserumtiters

Die Immunisierung der CDCP1-defizienten Mäuse erfolgte alle zwei Wochen mit  $1 \times 10^7$  bestrahlten, inaktivierten Zellen. Nach der dritten Immunisierung wurde den Mäusen retrobulbär Blut entnommen und das Serum auf spezifische CDCP1-Antikörper mittels FACS-Analyse auf PC-3 und K562 Zellen hin untersucht.

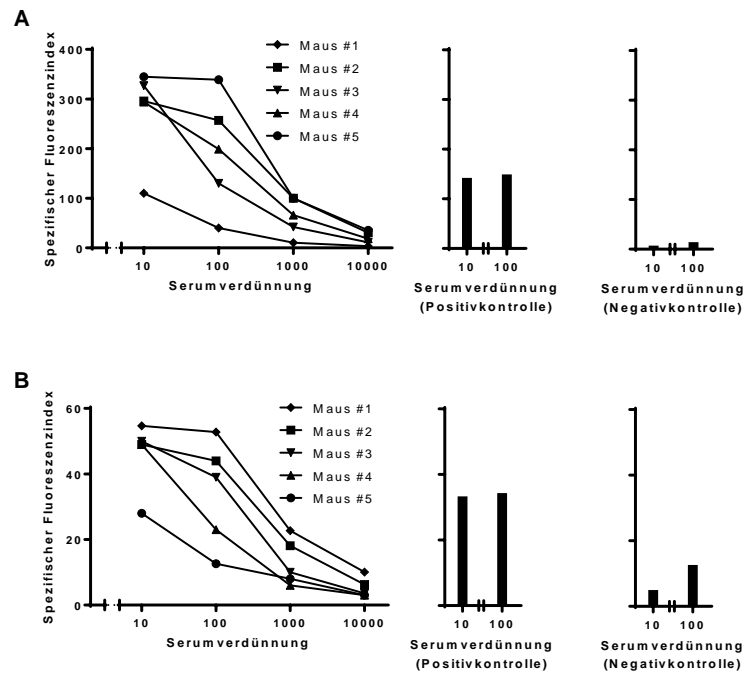


Abbildung 3.2: Spezifische CDCP1-Serumtitersbestimmung mittels FACS-Analyse

Das Serum wurde wie angegeben mit FACS-Puffer verdünnt und durchflusszytometrisch hinsichtlich spezifischer Bindung auf die erwähnten Zelllinien PC-3(A) und K562(B) untersucht. Die Negativkontrolle zeigt die Bindung des Serums der Mäuse vor der Immunisierung. Bei der Positivkontrolle wurde der kommerziell erhältliche CUB1-Antikörper (10  $\mu$ g/ml) ebenfalls in diesem Serum verdünnt.

Die Abbildung 3.2 zeigt, dass durch die Verwendung der CDCP1-defizienten Mäuse ein spezifischer anti-CDCP1 Serumtiter erreicht werden konnte, welcher allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen zeigt. Die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität war dabei von der exprimierenden Menge CDCP1 der untersuchten Zelllinien abhängig.

#### 3.1.3 Generierung von $\alpha$ -CDCP1-Antikörpern mittels der Hybridoma-Technologie

Aufgrund des positiven Ergebnisses der Serumuntersuchung, wurde die Milz von Maus #1 entnommen und mit Sp2/0-Zellen (Wildtyp) fusioniert. Die Hybridomüberstände wurden auf spezifische Bindung mittels einer Zellmischung, bestehend aus PC-3 und untransfizierten Sp2/0 Zellen, untersucht. Dies ermöglicht die Identifizierung von Sp2/0-Zellen bindenden Antikörper, da es möglich ist, dass C57BL/6 Mäuse spezifische Antikörper gegen die MHC-Moleküle der Sp2/0-Zelllinie bilden. Überstände von Hybridomen, welche CDCP1-spezifischen Antikörper

### 3.1 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -CDCP1-Antikörper

produzieren, sollten daher nur an die CDCP1-exprimierende PC-3 Zelllinie, nicht aber an die Sp2/0 Zellen binden können.

In Abbildung 3.3 sind einige Beispiele von Hybridomüberstandsanalysen dargestellt.

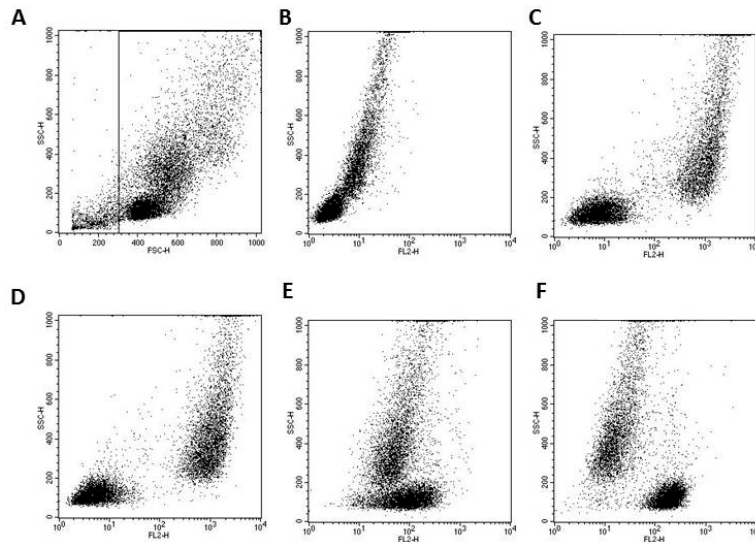


Abbildung 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von unterschiedlichen potenziellen CDCP1 spezifischen Hybridomüberständen

Eine Zellmischung aus Sp2/0 (Wildtyp)- und PC3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Hybridomüberständen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurde die Zellmischung im Forward/Sideward-Scatter identifiziert (A). Das Diagramm (B) zeigt die Negativkontrolle, bei der die Zellmischung ausschließlich mit dem sekundären Antikörper gefärbt wurde. Als Positivkontrolle (C) wurde ein kommerzieller CDCP1-spezifischer Mausantikörper (CUB1) verwendet. In den Diagrammen (D, E und F) wurden unterschiedliche Hybridomüberstände zur primären Inkubation der Zellmischung verwendet.

Die Zellmischung, bestehend aus Sp2/0- (Wildtyp) und PC-3-Zellen, ließ sich eindeutig im Forward/Sideward-Scatter identifizieren, wobei die PC-3 phänotypisch etwas größer und granulärer sind und somit im Forward- wie auch im Sideward-Scatter über den Sp2/0-Zellen liegen. Unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen CDCP1-spezifischen Antikörpers (CUB1, Biolegend) konnte gezeigt werden, dass nur die CDCP1 exprimierende Zelllinie PC-3 ein positives Signal induziert (C), wogegen bei der Verwendung einer Negativkontrolle keine der Zelllinien eine spezifische Färbung erkennen lassen. Mit Abbildung D wurde daher ein CDCP1-spezifischer Hybridomüberstand identifiziert. In Abbildung E scheinen beide Zelllinien positiv zu sein, daher handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um eine unspezifische Antikörperbindung. Auch konnten unter der Verwendung der beiden Zelllinien Hybridome identifiziert werden, welche ausschließlich einen Sp2/0 spezifischen Antikörper sezernieren und somit aus weiteren Analyserunden ausscheiden (F).

Die Spezifitäten der dadurch identifizierten Antikörper wurden anschließend noch auf Sp2/0-CDCP1-Transfektanten mittels Durchflusszytometrie getestet. Alle positiven Hybridome wurden mindestens einmal subkloniert, über Protein-A-Säulen aufgereinigt und der Subtyp unter Verwendung des IsoGold™ Kits bestimmt.

Abschließend konnten zwei Ig $\gamma$  (IgG2a und IgG2b) und ein Ig $\mu$  anti-CDCP1 spezifische Hybridome identifiziert werden.

### 3.1 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -CDCP1-Antikörper

Nummer:	Klon:	Subklasse (schwere Kette)	Subklasse (leichte Kette)
1	8-3	IgG2a	n.d.
2	9-2	IgG2b	n.d.
3	2-1	IgM	n.d.

Tabelle 3.1: Übersicht über die neu generierten  $\alpha$ -CDCP1 Antikörper

#### 3.1.4 Bindungsaffinität der CDCP1-spezifischen Igy-Antikörper

Das Bindungsverhalten der aufgereinigten Igy-Antikörper (8-3 und 9-2) wurde durch Titration mittels Durchflusszytometrie auf PC-3 Zellen bestimmt. Als Vergleich wurde der kommerzielle CUB1-Antikörper mitgeführt.

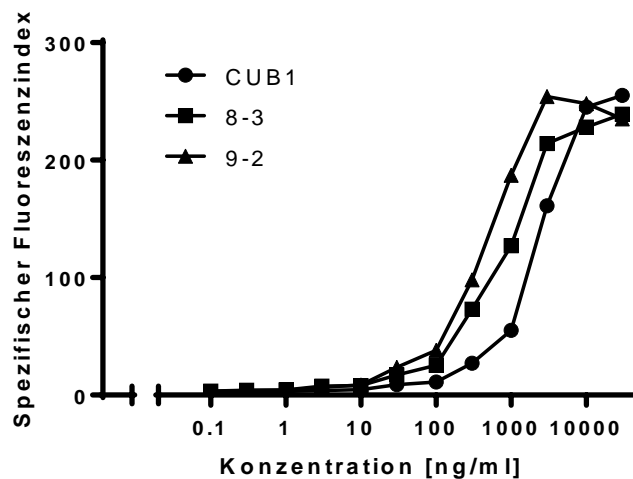


Abbildung 3.4: Bindungsaffinität der neu generierten  $\alpha$ -CDCP1 Igy-Antikörper

PC-3 Zellen wurden mit den unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität viabler PC-3 Zellen.

Alle verwendeten Antikörper zeigen bei ähnlichen Konzentrationen ( $\sim 3 \mu\text{g/ml}$ ) eine saturierende Bindung auf PC-3 Zellen.

#### 3.1.5 Antigen shift (CDCP1)

Grundsätzlich kann das Phänomen des Antigen shifts die therapeutische Aktivität von Antikörpern wesentlich beeinflussen.

Die Expression von CDCP1 auf der Oberfläche von PC-3 Zellen wurde nach Antikörperbindung durchflusszytometrisch bestimmt.

### 3.1 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -CDCP1-Antikörper

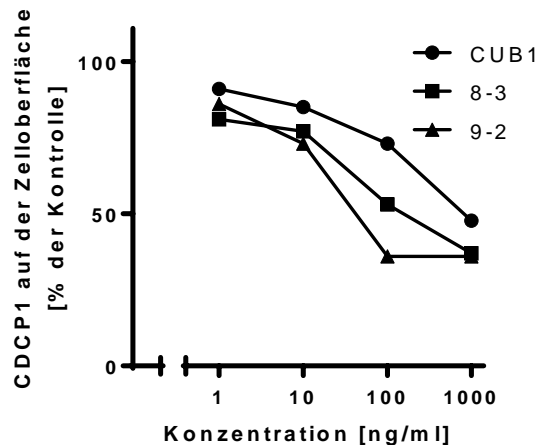


Abbildung 3.5: Anti-CDCP1-Antikörper induzierter Antigenshift

PC-3 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen mit den angegebenen  $\alpha$ -CDCP1-Antikörpern für 20 Stunden inkubiert. Freie CDCP1-Moleküle wurden anschließend mit 10  $\mu$ g/ml des entsprechenden  $\alpha$ -CDCP1-Antikörpers markiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensität unbehandelter Zellen wurde die relative Oberflächenexpression von CDCP1-Molekülen prozentual berechnet.

Bei allen verwendeten Antikörpern ist 20 h nach Antikörperbindung eine konzentrationsabhängige Verminderung der CDCP1-Expression zu erkennen. Außerdem ist zu erkennen, dass der Verlust maximal 60 % der Gesamtmolekülanzahl ausmacht und nicht alle Moleküle von der Zelloberfläche verschwinden. Gleichzeitig geht aus Abbildung 3.5 hervor, dass sich die drei untersuchten Antikörper in der Antigenmodulation etwas unterscheiden, so induziert der Antikörperklon 9-2 einen stärkeren Antigenshift von der Zelloberfläche als die anderen beiden Klone. Dieses Ergebnis könnte mit der davor gemessenen höheren Avidität korrelieren (vgl. Abbildung 3.4).

Ursprüngliches Ziel der oben beschriebenen Arbeit war es die neu generierten Antikörper zur Konstruktion von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern zu verwenden. Nachdem aber ausgedehnte immunhistologische Untersuchungen, unter anderem in der eignen Arbeitsgruppe, gezeigt haben, dass das CDCP1 Protein in erheblichem Umfang auch auf Normalgewebe exprimiert ist (siehe auch [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), haben wir uns entschieden den weiteren Verlauf dieser Dissertation auf PSMA als „bispezifisches Zielantigen“ zu richten. PSMA ist eines der wenigen Antigene das sowohl auf Tumorzellen (Prostatakarzinom) als auch auf tumorassoziierten Gefäßen (bei 30 % aller soliden Tumore) exprimiert wird.

Zunächst haben wir einen etablierten PSMA-Antikörper benutzt, um optimierte monospezifische und bispezifische Fabsc Konstrukte mit PSMAxCD3 Spezifität herzustellen und zu charakterisieren.

Danach wurde ein eigener PSMA-Antikörper generiert, charakterisiert und zur Konstruktion optimierter bispezifischer Antikörper verwendet.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

Zunächst wurde ein chimärer  $\alpha$ -PSMA Antikörper kloniert. Dabei wurden die murinen variablen Domänen eines  $\alpha$ -PSMA Antikörpers (J591) an humane konstante Domänen eines Igy1-Antikörpers fusioniert. Ausgehend von diesem Konstrukt wurde ein optimierter monospezifischer Antikörper generiert, bei dem die Aminosäuren S239D und I332E ausgetauscht wurden. Diese von der Firma Xencor beschriebenen genetischen Veränderungen führen zu einer verstärkten Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren und steigern dadurch die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität deutlich gegenüber Zielantigen exprimierenden Zellen [82].

Analog zum Wirkmechanismus dieser monospezifischen Antikörper zielen bispezifische Antikörper auf die Induktion der Zielzellyse durch Effektorzellen ab. Bispezifische Antikörper gegen ein Zielzellantigen und gegen CD16 haben das Ziel CD16-exprimierende Effektorzellen (vorwiegend NK-Zellen) zu rekrutieren und dadurch eine restringierte Zielzellyse zu induzieren.

Bispezifische Antikörper, welche gegen CD3 gerichtet sind, können T-Zellen rekrutieren, aktivieren und zur Zielzellyse fokussieren. Die bispezifischen Moleküle mit den Spezifitäten gegen PSMA und CD16 bzw. CD3 wurden als Fabsc-Konstrukte hergestellt. Als  $\alpha$ -PSMA Antikörper wurde Klon J591 verwendet.

Die bispezifischen Fabsc Antikörperformate basieren auf Arbeiten, die von Dr. Ludger Große-Hovest und Dr. Michael Durben durchgeführt wurden. Durch die Deletion von einer Aminosäure und die Mutation von weiteren sechs Aminosäuren (E233P; L234V; L235A;  $\Delta$ G236; D265G; A327Q; A330S; EU-index) wurde ein attenuierter Fc-Teil generiert, welcher nicht mehr an Fc $\gamma$ -Rezeptoren bindet. Des Weiteren wurde bei den Fabsc-Konstrukten zwei Cystein-Moleküle innerhalb der *hinge*-Region jeweils zu Serin mutiert (C226S; C229S; EU-index), um die Ausbildung von Disulfidbrücken und die damit verbundene Dimerisierung von zwei Fabsc-Molekülen zu verhindern. Die nahezu vollständige Deletion der C<sub>H</sub>3-Domäne trägt weiterhin zur Verhinderung der Dimerisierung bei. Außerdem wurde im Fabsc-Format das Asparagin an Position 297 zu einem Glutamin mutiert (N297Q; EU-index), um eine Glykosylierung an dieser Stelle zu verhindern. Dies ist begründet durch die außergewöhnliche Exposition der Kohlenhydrate in diesem Format und damit eine mögliche einhergehende Immunreaktion in Patienten. Des Weiteren sollte eine Bindung durch Lektin-Rezeptoren, welche an Glykoproteine binden, verhindert werden [185].

Alle generierten Konstrukte sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

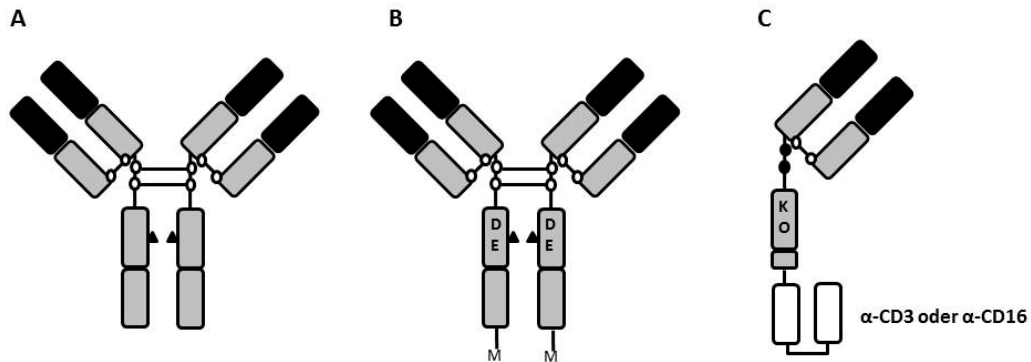


Abbildung 3.6: Übersicht über die unterschiedlichen Antikörperformate gegen PSMA

Schematische Abbildung der verschiedenen Antikörperkonstrukte. (A) ist der chimäre  $\alpha$ -PSMA, (B) der optimierte  $\alpha$ -PSMA und (C) die bispezifischen Antikörperkonstrukte PSMA $\times$ CD16 und PSMA $\times$ CD3.

Die variablen Domänen des  $\alpha$ -PSMA Antikörpers sind in schwarz, die der CD3 bzw. CD16 Spezifität in weiß dargestellt. DE: SDIE-Optimierung der CH<sub>2</sub>-Domäne. M: myc-Tag.

KO: Mutationen in der CH<sub>2</sub>-Domäne, zur Attenuierung der FC-Rezeptorbindung. ● : Cystein-Moleküle, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

● zeigen Cystein zu Serin Mutationen auf, um die Zusammenlagerung zweier Fabsc zu verhindern.

▲ kennzeichnen Glykolisierungsstellen.

Wie bereits beschrieben, wurden die variablen Domänen der entsprechenden Antikörper in die jeweiligen Expressionsvektoren kloniert und mittels Elektroporation in Sp2/0-Zellen transfiziert. Die produzierenden Transfektanten wurden anschließend expandiert und die Antikörperformate mittels KappaSelect-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturmedium aufgereinigt.

#### 3.2.1 Charakterisierung der generierten $\alpha$ -PSMA Konstrukte

Die aufgereinigten Antikörper wurden zuerst auf Homogenität und Aggregationsverhalten mittels Größenausschlusschromatographie untersucht, danach wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Bindungsanalyse durchgeführt.

Bei der analytischen Gelchromatographie zeigen die Moleküle J591-chimär und J591-SDIEM einen distinkten Einzelpeak bei einem Elutionsvolumen von  $\sim 1,3$  ml. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Die Größenausschlusschromatographie der bispezifischen Fabsc-Formate zeigen zwei distinkte Peaks mit einer Retentionszeit von 1,45ml. Hierbei entspricht der zweite Peak der erwarteten Größe von etwa 90 kDa. Der erste Peak repräsentiert höhermolekulare Moleküle, welche möglicherweise Molekül-Dimere ( $\sim 200$  kDa) darstellen.

Das Fabsc-Format mit der Spezifität für  $\alpha$ -PSMA und CD3 zeigt im Vergleich zu dem Fabsc-Format mit den Spezifitäten PSMA und CD16 einen kleineren Anteil an dem möglichen Dimer-Vorpeak.

Die Bindung der unterschiedlichen Konstrukte an PSMA wurde mit der Zelllinie 22RV1 durchgeführt. Für die Bindungsanalyse an CD3 wurden JURKATS und für CD16 eine CD16-exprimierende Sp2/0-Transfektante verwendet (hergestellt von Dr. Martin Hofmann).

Ein exemplarisches Ergebnis dieser Analysen ist in der Abbildung 3.7 (E, F und G) dargestellt. Alle Konstrukte zeigen eine sehr gute und vergleichbare Affinität an PSMA.

Die Unterschiede bezüglich des mittleren Fluoreszenzindex sind auf das Sekundärreagenz zurückzuführen.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

Des Weiteren zeigt der bispezifische Antikörper Fabsc PSMAxCD3 eine hohe Affinität gegenüber dem Effektorantigen (CD3). Das Fabsc PSMAxCD16 hingegen erreicht auf Sp2/0-CD16-Zellen keine Sättigung auf der Effektorseite (CD16).

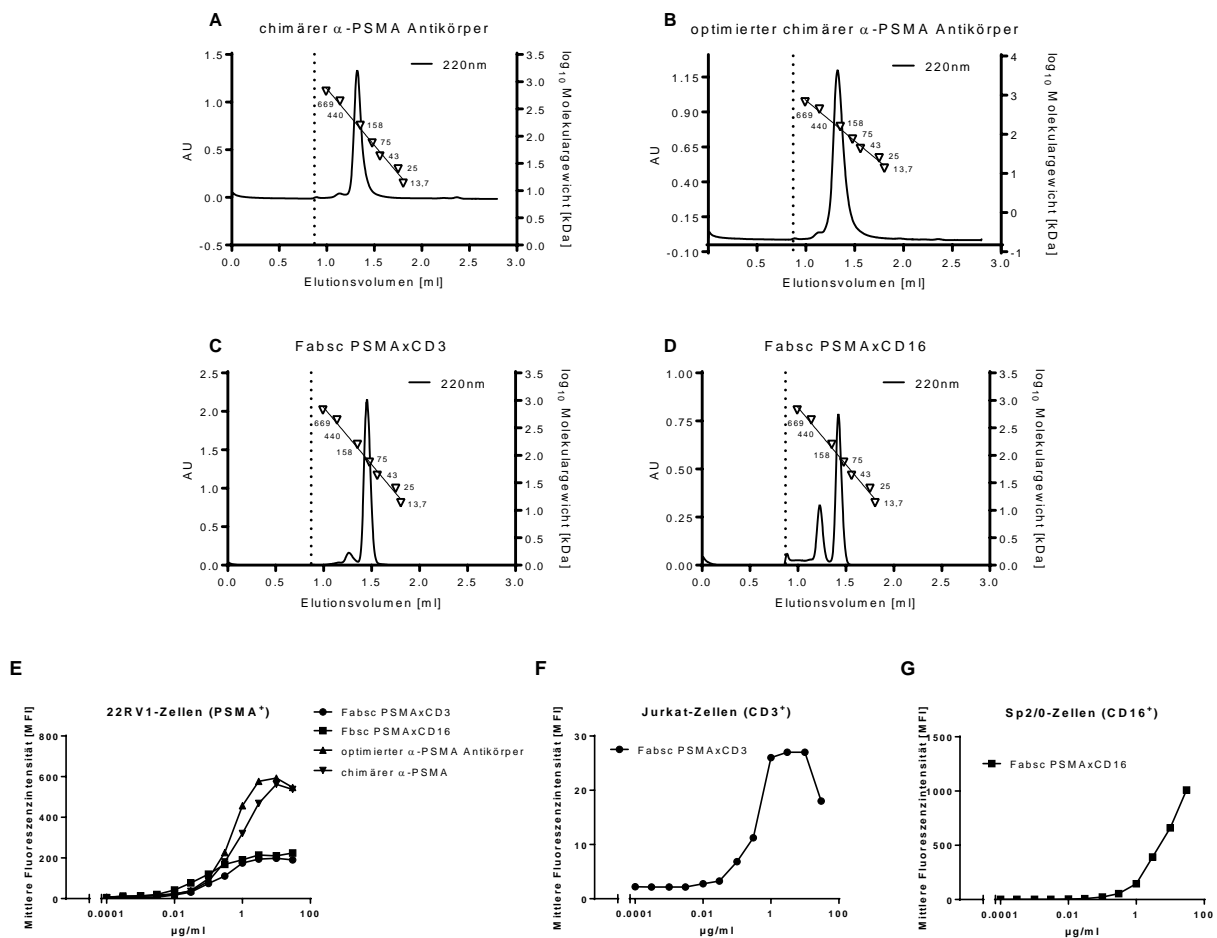


Abbildung 3.7: Analytische Gelchromatographie und Bindungsanalyse der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Konstrukte

Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine J591-chimär (A), J591-SDIEM (B), Fabsc PSMAxCD3 (C) und Fabsc PSMAxCD16 (D). Aufgetragen wurden 10  $\mu\text{g}$  Protein.

PSMA<sup>+</sup> 22RV1 Zellen (E), CD3<sup>+</sup> Jurkats (F), sowie CD16<sup>+</sup> Sp2/0-Transfektanten (G) wurden mit angegebenen Konzentrationen der verschiedenen Antikörperkonstrukte inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen.

Im Rahmen der proteinbiochemischen Charakterisierung der neu generierten Antikörperkonstrukte wurde des Weiteren eine elektrophoretische Trennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) unter reduzierten und nicht-reduzierten Bedingungen durchgeführt.

Anhand der Aminosäuresequenz ließ sich die Größe der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte bestimmen. Die errechnete Größe für die Fabsc-Konstrukte beträgt etwa 90 kDa und für die IgG-Konstrukte etwa 160 kDa.

Abbildung 3.8A zeigt, dass unter nicht-reduzierten Bedingungen eine distinkte Bande für alle Fabsc-Konstrukte bei der erwarteten Größe ( $\sim 90$  kDa) nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnten zusätzliche Banden bei einer Größe von  $\sim 64$  kDa und 22 kDa detektiert werden. Für die IgG-Konstrukte konnte eine distinkte Bande bei ca. 160 kDa detektiert werden.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

Bei diesen Banden handelt es sich um freie schwere und leichte Ketten der Fabsc-Konstrukte. In Abbildung 3.8B sind die analogen Ergebnisse der Fabsc- und IgG-Konstrukte unter reduzierten Bedingungen dargestellt. Für die Fabsc-Konstrukte lassen sich zwei distinkte Proteinbanden erkennen, welche mit den errechneten Größen für die leichte (25 kDa) bzw. der schweren Kette (65 kDa) übereinstimmen. Auch für die IgG-Moleküle sind zwei distinkte Banden für die leichte (25k Da) und die schwere Kette (55 kDa) klar zu erkennen.

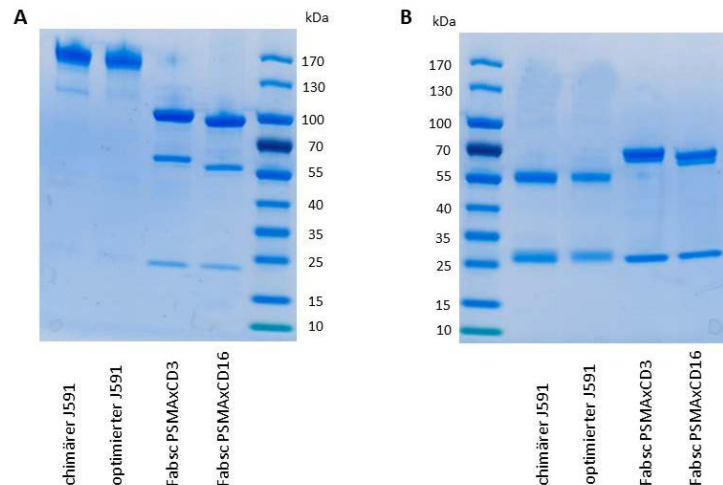


Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen  $\alpha$ -PSMA Antikörperkonstrukte 2  $\mu$ g der unterschiedlichen Proteine wurden unter nicht-reduzierten (A) und reduzierten (B) Bedingungen auf 10 % Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Roti<sup>®</sup>-Blue (Roth) mit anschließender Entfärbung der Gele mit Hilfe von bidest. H<sub>2</sub>O. Des Weiteren ist ein Größenstandard (PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) als Vergleich mit aufgetragen.

#### 3.2.2 Funktionelle Charakterisierung der unterschiedlichen $\alpha$ -PSMA-Konstrukte

Zunächst wurden die neu generierten Antikörper drauf analysiert wie potent PSMA<sup>+</sup>-Tumorzellen in *in vitro* Experimenten eliminiert werden konnten. Dazu wurde ein <sup>51</sup>Chromfreisetzungsexperiment mit 22RV1 als Zielzellen durchgeführt. Die Abbildung 3.9 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieser Untersuchungen.



### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

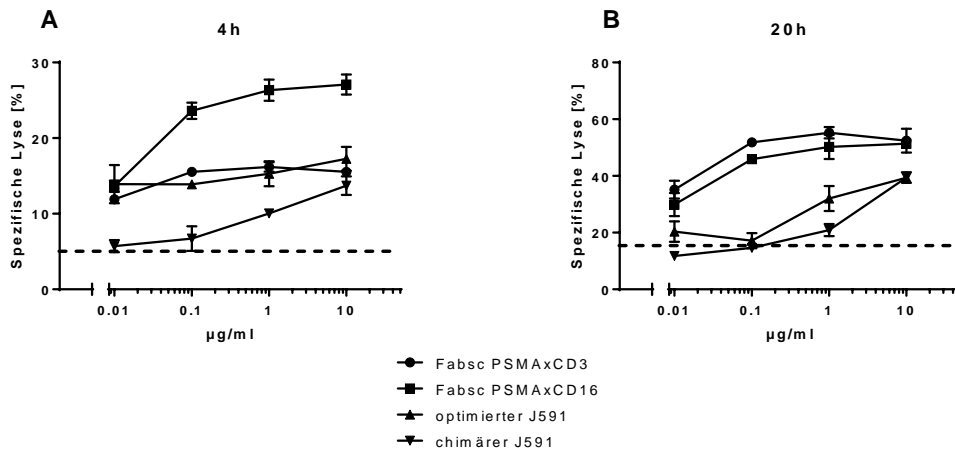


Abbildung 3.9: Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Antikörperkonstrukte

$^{51}\text{Cr}$ -markierte 22RV1-Zellen wurden mit PBMCs (1:50) und den verschiedenen Antikörperkonstrukten in den angegebenen Antikörperkonzentrationen inkubiert. Die Zielzelllyse wurde nach 4 h (A) und 20 h (B) gemessen. Die Standardabweichung präsentiert die Messung von Triplikaten. Gezeigt ist ein charakteristisches Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, induzieren alle getesteten Antikörperkonstrukte  $\alpha$ -PSMA eine konzentrationsabhängige Tumorzelllyse nach 4 h (A) wie auch nach 20 h (B).

Nach 4 h lysiert der Fabsc PSMAxCD16 Antikörper am effektivsten 22RV1-Zellen. Außerdem zeigt sich, dass der Fc-Teil optimierte  $\alpha$ -PSMA-Antikörper (J591-SDIEM) dem chimären  $\alpha$ -PSMA-Antikörper überlegen ist.

Nach 20 h ist die Lyse durch das Fabsc-Konstrukt PSMAxCD3 überlegen. Da dieses Konstrukt als Effektorzellen T-Zellen rekrutiert und diese vor einer effektiven Tumorzelllyse aktivieren muss, ist es nicht verwunderlich, dass die spezifische Zielzelllyse mit der Zeit deutlich zunimmt. Des Weiteren ist zu erkennen, dass der bispezifische Fabsc PSMAxCD16, im Vergleich zu den monoklonalen (J591-chimär und J591-SDIEM) Antikörpern bezüglich der konzentrationsabhängigen Lyse der Zielzellen, auch nach 20 h eine deutlich höhere Aktivität besitzt.

Um die Ergebnisse unter veränderten Bedingungen zu untersuchen, wurde ein X-Celligence-Assay durchgeführt (Impedanzmessung), mit dem es möglich ist ein niedrigeres Effektor-Zielzell-Verhältnis zu benutzen und die Tumorzelllyse über einen längeren Zeitraum kontinuierlich zu beobachten.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

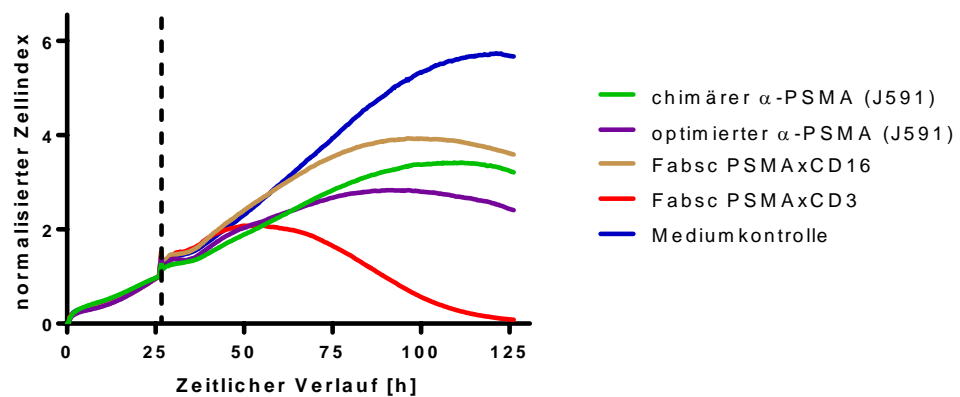


Abbildung 3.10: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte unter Verwendung eines limitierenden Effektor-Zielzell-Verhältnisses. Die Tumorzelllyse wurde mittels Impedanzmessung analysiert. Nach einer Anwachsphase der Tumorzellen von  $\sim 24$  h wurden PBMCs eines gesunden Spenders und die verschiedenen Antikörperkonstrukte in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  hinzugegeben (--). Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen betrug 1:1. Der Zellindex, welcher zugleich die Vitalität der Tumorzellen beschreibt, wurde kontinuierlich alle 15 min gemessen. Die dargestellten Messdaten repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten. Dargestellt ist ein charakteristisches Ergebnis von drei Experimenten.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass in diesem Experiment, anders als bei dem  $^{51}\text{Chrom}$ freisetzungsexperiment, der optimierte monospezifische Antikörper zu einer besseren Lyse als der bispezifische Antikörper Fabsc PSMAxCD16 führte.

Da diese Ergebnisse sehr deutlich zeigen, dass das Fabsc PSMAxCD3 Konstrukt, auch unter der Verwendung eines limitierenden Effektor-Zielzell-Verhältnis, am effektivsten Tumorzellen eliminieren kann und das Zielantigen (PSMA) nur sehr restringiert auf gesunden Gewebe exprimiert wird, konzentriert sich diese Arbeit nun auf den bispezifischen Fabsc PSMAxCD3-Antikörper.

#### 3.2.3 Analyse der Fähigkeit des bispezifischen Antikörpers zur Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsexperiments dargestellt. Unter der Verwendung von PSMA<sup>+</sup>-22RV1-Zellen ist eine sehr deutliche bispezifische Antikörper-vermittelte T-Zellproliferation zu erkennen. Ab einer Konzentration von  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  scheint die maximale T-Proliferation erreicht. In der Anwesenheit von SK-MEL-63-Zellen, welche PSMA nicht exprimieren, wird durch den Fabsc PSMAxCD3-Antikörper eine sehr schwache aber erkennbare T-Zellproliferation induziert.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

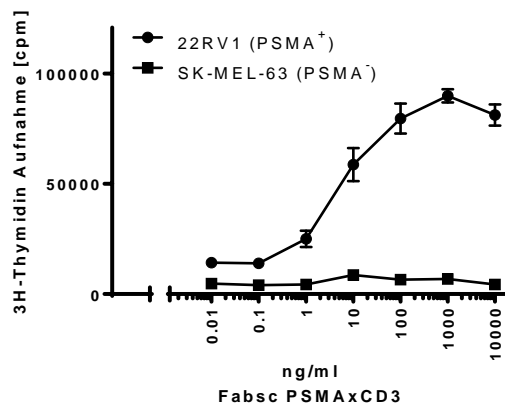


Abbildung 3.11: Induktion der spezifischen T-Zellproliferation mittels des bispezifischen Antikörpers Fabsc PSMAxCD3

PBMCs eines gesunden Spenders wurden mit der PSMA<sup>+</sup>-Zielzelllinie 22RV1 (●) oder der PSMA<sup>-</sup>-Ziellinie SK-MEL-63 (■) und der angegebenen Konzentration des bispezifischen Fabsc PSMAxCD3-Antikörpers für 72 h in einem Verhältnis von 10:1 inkubiert. Anschließend wurde die aufgenommene Radioaktivität detektiert.

Anschließend wurde mittels einer durchflusszytometrischen Analyse die Tumorzelllyse und die Induktion der Expression von Aktivierungsmarkern (CD69 und CD25) durch den bispezifischen Antikörper PSMAxCD3 auf T-Zellen bestimmt.

In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse des durchflusszytometrisch basierten Lyseexperiments dargestellt. Nach drei Tagen Inkubation konnte eine drastische Eliminierung der PSMA<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden. Des Weiteren wurde durch den bispezifischen PSMAxCD3 Antikörper die Expression von Aktivierungsmolekülen induziert. Der bispezifische Kontrollantikörper (Fabsc CSPG4xCD3) induzierte eine marginale Expression von CD69 auf CD4<sup>+</sup>- wie auch CD8<sup>+</sup>-Zellen.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

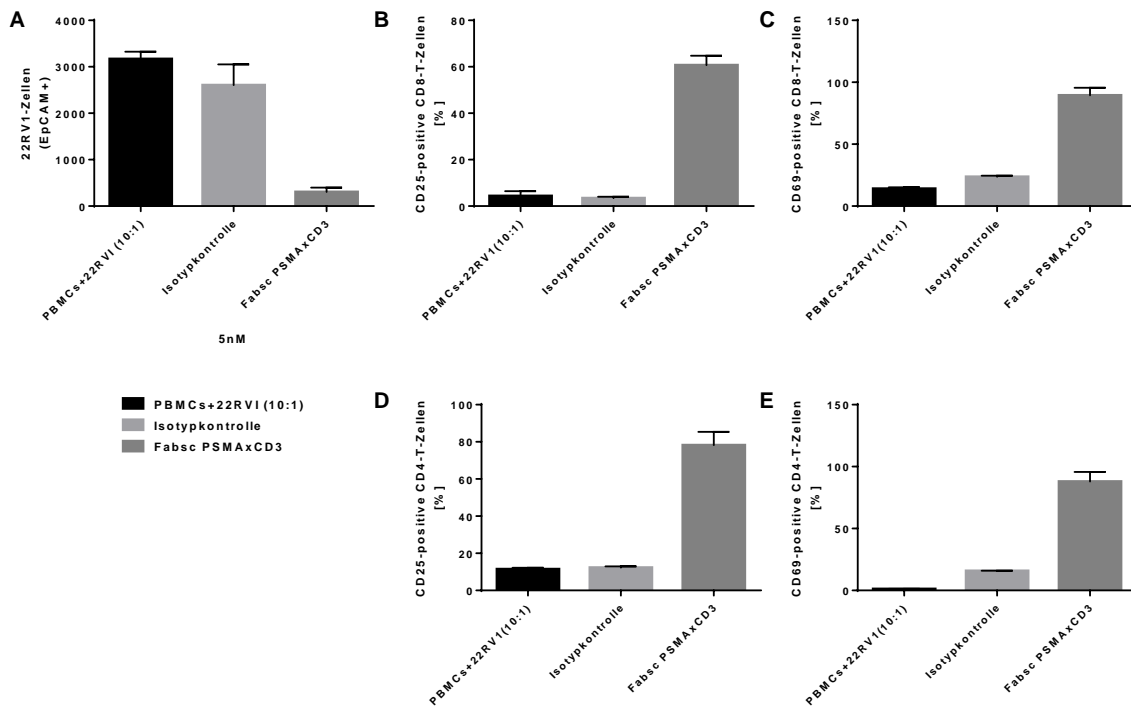


Abbildung 3.12: Induktion der spezifischen T-Zellaktivierung und Zielzellyse

Frisch isolierte PBMCs und 22RV1-Zellen (10:1) wurden für drei Tage zusammen mit dem bispezifischen Antikörperkonstrukt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit  $\alpha$ -CD45-,  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8-,  $\alpha$ -CD25-,  $\alpha$ -CD69- und  $\alpha$ -CD326 (EpCAM)-Antikörpern, sowie 7AAD gefärbt. Die dargestellten Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

Diese Ergebnisse der spezifischen T-Zellaktivierung, T-Zellproliferation und Zielzellyse konnten auch durch mikroskopische Eindrücke qualitativ bestätigt werden. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs mit PSMA-exprimierenden Zellen für 72 h kokultiviert (24-Loch-Zellkulturplatte, 10:1 Effektor-Zielzell-Ratio). Die Ansätze wurden anschließend mikroskopisch begutachtet und dokumentiert.

Eine Zusammenstellung der mikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 3.13 zu sehen. In der Darstellung ist klar zu erkennen, dass unter der Verwendung der Isotypkontrolle die Tumorzellen normal wachsen, nicht von den PBMCs beeinflusst werden und keinen erkennbaren zytotoxischen Einflüssen unterliegen. Dies ist an der normalen Morphologie und Adhärenz der Tumorzellen zu erkennen. Unter dem Einfluss des bispezifischen Antikörpers Fabsc PSMAxCD3 ändert sich dieses Bild drastisch. Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen ist, sind keine normal wachsenden Tumorzellen zu erkennen. Außerdem sind deutliche Zellcluster ersichtlich, welche auf eine spezifische T-Zellproliferation hindeuten.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

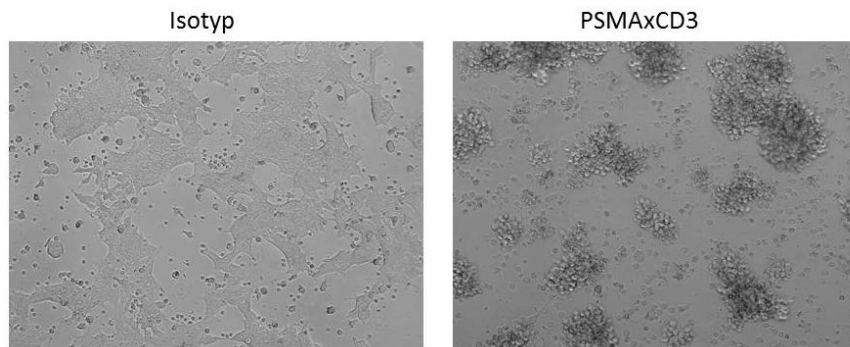


Abbildung 3.13: Qualitative Analyse der bispezifischen Antikörper vermittelten Zytotoxizität und Rekrutierung von Effektorzellen

Dargestellt sind Kokulturen von PBMCs und PSMA<sup>+</sup> Zielzellen in einem Verhältnis von 10:1 für 72 h. Die benutzten bispezifischen Antikörper Isotyp Fabsc CSPG4xCD3 (A) und Fabsc PSMAxCD3 (B) wurden mit einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet.

Da eine marginale unspezifische T-Zellaktivierung bzw. -proliferation in den oben beschriebenen Experimenten beobachtet werden konnte, welche möglicherweise zu Nebenwirkungen in den Patienten führt und somit Dosis limitierend sein kann, ist es wichtig zu untersuchen, ob ein bispezifischer Antikörper diesen Effekt über die monoklonale Bindung an CD3 induziert.

Um den Effekt der unspezifischen T-Zellaktivierung (*engl.: off-target effect*) zu untersuchen, wurde ein <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsexperiment in Abwesenheit von Tumorzellen durchgeführt (Abb.: 3.14). Die Ergebnisse des <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsexperimentes zeigen unverkennbar eine geringe konzentrationsabhängige Fabsc PSMAxCD3-vermittelte Induktion der T-Zellproliferation in Abwesenheit von PSMA<sup>+</sup>-Tumorzellen.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass unter Anwesenheit von PSMA<sup>-</sup> primären humanen Endothelzellen (*engl.: Human Umbilical Vein Endothelial, HUVEC*) oder SKW 6.4-Zellen die unspezifische T-Zellaktivierung durch den Fabsc PSMAxCD3 weiter verstärkt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Weitere Ergebnisse zu diesem Effekt und mögliche Wege diesen ohne Verlust der spezifischen T-Zellaktivierung zu blockieren, sind in der Dissertation mit dem Titel „*The role of stimulating bystander cells in bispecific antibody-mediated T-cell activation*“ von cand. med. Joseph Kauer, enthalten. Diese Untersuchungen wurden vom Verfasser dieser Arbeit wesentlich mit betreut.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

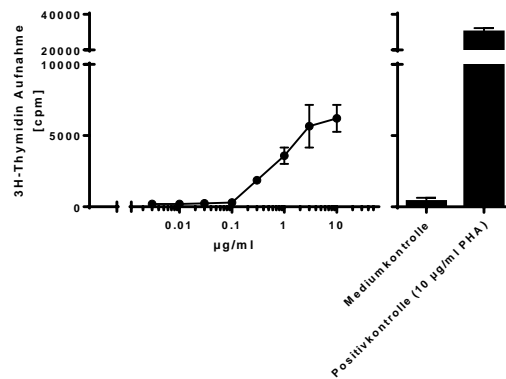


Abbildung 3.14: Unspezifische T-Zellproliferation durch den bispezifischen Antikörper Fabsc PSMAxCD3

PBMCs wurden mit den angegebenen Konzentrationen Fabsc PSMAxCD3 für 72 h inkubiert und anschließend die inkorporierte Menge <sup>3</sup>H-Thymidin detektiert.

Um die Rolle des CD3 Antikörpers bei der *on-* und *off-target* Aktivierung zu untersuchen, wurden neue Fabsc-Konstrukte mit den Antikörpern OKT-3 ( $\alpha$ -CD3), BMA031 ( $\alpha$ - $\alpha$ -TCR) und eine de-immunisierte Version des Mausantikörpers L2K (anti-CD3), welche als *single chain* verwendet wurden generiert. Alle drei *single chain*-Fragmente wurden jeweils in der V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-wie auch in der V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Orientierung in das Fabsc-Konstrukt kloniert.

Jedoch zeigten die V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Orientierungen zu CD3 auf JURKAT-Zellen bei den drei neu verwendeten Antikörpern eine deutlich schlechtere Avidität, sodass ausschließlich Daten und Proteine in der V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-Orientierung präsentiert werden.

Dazu wurden die synthetisierten *single chain*-Fragmente der entsprechenden Antikörper in die jeweiligen Expressionsvektoren kloniert und mittels Elektroporation in Sp2/0-Zellen transfiziert. Die produzierenden Transfektanten wurden anschließend expandiert und die Antikörperperformate mittels KappaSelect-Materials aus dem Zellkulturmedium aufgereinigt.

Um die neuen bispezifischen Antikörperkonstrukte zu unterscheiden, wurde eine auf den verwendeten Antikörperklonen bzw. Antigenen basierende Nomenklatur verwendet. Somit wird das bispezifische Fabsc-Konstrukt PSMA (J591)xCD3 (UCHT-1) nachfolgend als NP-CU bezeichnet. Dabei bezieht sich das N auf die Bindungsstelle am N-Terminus und das C auf die Bindungsstelle am C-Terminus des bispezifischen Moleküls. Der bispezifische Fabsc Antikörper PSMA (J591)xCD3 (OKT-3) wird folglich als Fabsc NP-CO bezeichnet. Dementsprechend wird der bispezifische Antikörper, welcher BMA031 bzw. DIL2K als *single chain* verwendet NP-CB und NP-CDIL2K genannt.

### 3.2.4 Proteinbiochemische Charakterisierung der bispezifischen Antikörperkonstrukte

Zuallererst wurden die aufgereinigten Proteine bezüglich Homogenität und Aggregation mittels Größenausschlusschromatographie untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.15 dargestellt.

Alle Fabsc-Konstrukte zeigen einen distinkten Peak. Des Weiteren sind bei allen Molekülen Vorpeaks zu erkennen, welche auf höhermolekulare Multimere hinweisen. Jedoch deutet die geringe Menge auf ein geringes Aggregationspotenzial hin.

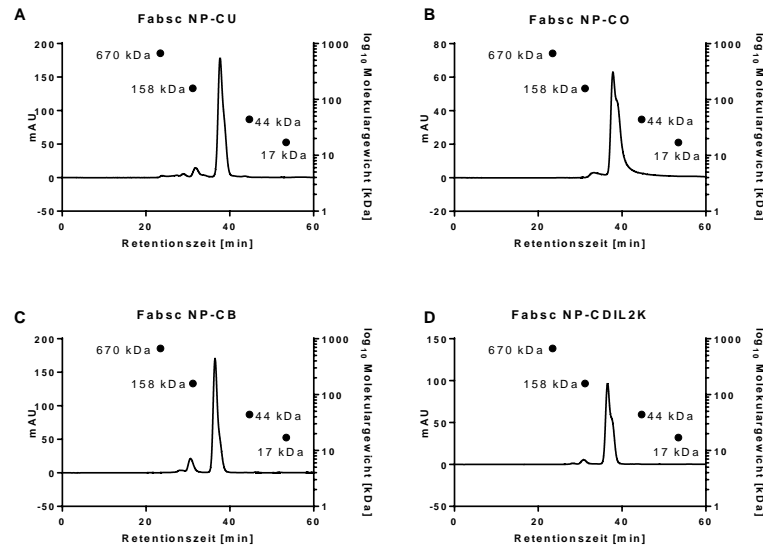


Abbildung 3.15: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukte. Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine NP-CU- V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> (A), NP-CO- V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (B), NP-CB- V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (C) und NP-DIL2K- V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (D). Die aufgetragene Proteinmenge betrug zwischen 3,5-10  $\mu$ g.

Auf der Abszisse (linke Ordinate) ist die Retentionszeit des eluierten Proteins aufgetragen. Die Menge des Proteins wird durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 220 nm angegeben. Die rechte Ordinate beschreibt das Molekulargewicht der unterschiedlichen Eichproteine (●) anhand ihrer Retentionszeiten.

In Abbildung 3.16A konnte unter nicht-reduzierten Bedingungen eine distinkte Bande für alle Fabsc-Konstrukte bei der erwarteten Größe (~ 90 kDa) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten zusätzliche Banden bei einer Größe von ~ 64 kDa und 22 kDa detektiert werden.

Bei diesen Banden handelt es sich um freie schwere und leichte Ketten der Fabsc-Konstrukte.

In Abbildung 3.16B sind die analogen Ergebnisse der Fabsc-Konstrukte unter reduzierten Bedingungen dargestellt. Hier lassen sich zwei distinkte Proteinbanden erkennen, welche mit den errechneten Größen für die leichten (25 kDa) bzw. der schweren Kette (80 kDa) übereinstimmen.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

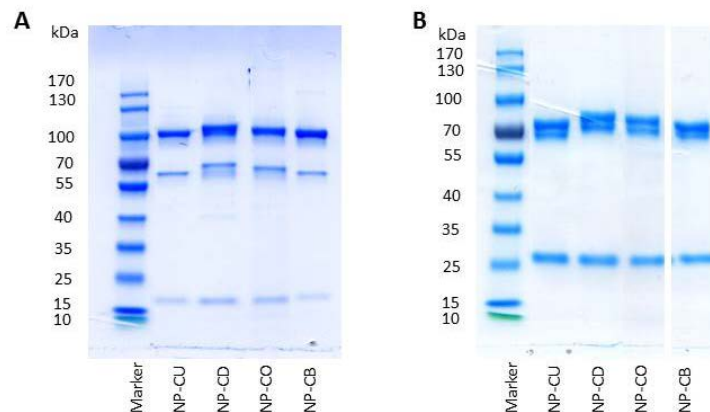


Abbildung 3.16: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen  $\alpha$ -PSMA Fabsc Antikörperkonstrukte

2  $\mu$ g der unterschiedlichen Proteine wurden unter nicht-reduzierten (A) und reduzierten (B) Bedingungen auf 10 % Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Roti®-Blue (Roth) mit anschließender Entfärbung der Gele mit Hilfe von bidest. H<sub>2</sub>O. Des Weiteren ist ein Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) als Vergleich mit aufgetragen.

Daraufhin wurde die Bindung der neu generierten Fabsc bispezifischen Antikörper an das Zielzellantigen PSMA wie auch auf der Effektorzelleseite ( $\alpha\beta$ -TCR bzw. CD3) analysiert.

#### 3.2.5 Bindung der bispezifischen Moleküle an den TCR/CD3-Komplex und PSMA

Die Bindung an den  $\alpha\beta$ -TCR/CD3 bzw. PSMA wurde unter Verwendung einer  $\alpha\beta$ TCR/CD3<sup>+</sup> T-Zellleukämie Zelllinie (JURKAT) bzw. der PSMA<sup>+</sup> Zelllinie 22RV1 durchflusszytometrisch analysiert.

Ein repräsentatives Ergebnis dieser Analysen ist in der Abbildung 3.17 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine Antikörper-vermittelte, konzentrationsabhängige Bindung an die verwendeten Zielzellen.

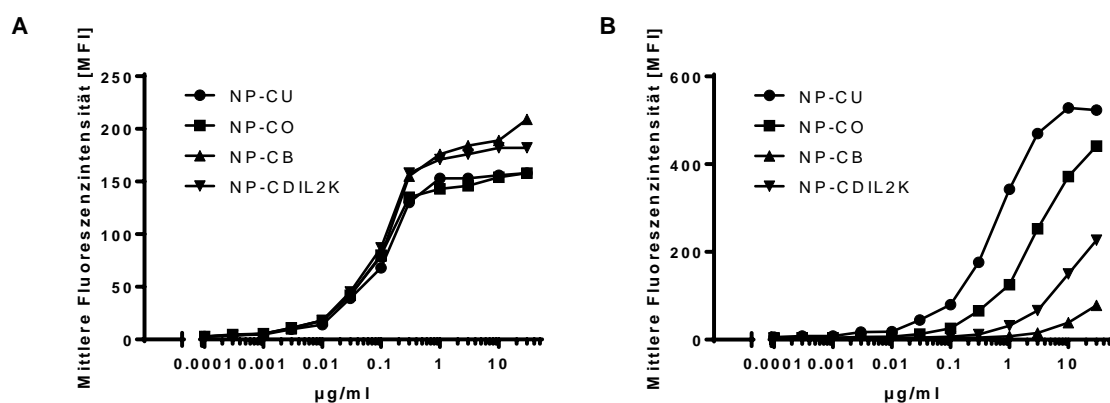


Abbildung 3.17: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Fabsc-Konstrukte an  $\alpha\beta$ -TCR/CD3 und PSMA

22RV1-Zellen (A) oder JURKAT-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukten inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen.



### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

Die Abbildung 3.17A zeigt die Bindung der Fabsc-Konstrukte an 22RV1-Zellen. Alle Konstrukte zeigen eine vergleichbare Bindung an das Zielantigen PSMA.

In Abbildung 3.17B ist die konzentrationsabhängige Bindung der verschiedenen Fabsc-Konstrukte an JURKAT-Zellen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass das NP-CU-Konstrukt die höchste Affinität zu  $\alpha\beta$ -TCR/CD3 hat, gefolgt von NP-CO, NP-DIL2K und NP-CB.

Um herauszufinden, ob diese Affinitätsunterschiede zwischen den unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukten auch einen Einfluss bei funktionellen Experimenten haben, wurde als nächstes ein  $^{51}\text{Cr}$ Chromfreisetzungsexperiment mit 22RV1 als Zielzellen durchgeführt.

#### 3.2.6 Zielzellyse durch die verschiedenen $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukte

Dafür wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert und anschließend für 96 h mit 25 ng/ml mUCHT-1 stimuliert. Daraufhin wurden die  $\text{CD8}^+$  zytotoxischen T-Zellen mittels MACS®-Technologie aufgereinigt und mit Chrom-markierten 22RV1-Zellen, unter der Verwendung von unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen, koinkubiert.

Die Abbildung 3.18 zeigt ein repräsentatives Experiment zur Untersuchung des Lysepotenzials von 22RV1-Zellen durch die generierten Fabsc-Moleküle der PSMA-Familie im direkten Vergleich.

Bei diesem Experiment zeigt sich, dass alle  $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukte ab einer Konzentration von 1 ng/ml eine Lyse der Zielzellen nach einer Inkubation von 8 h induzieren. Konzentrationsabhängig kann die Lyse der Zielzellen bei allen Konstrukten weiter verstärkt werden. Als Isotypkontrolle diente der Fabsc-Antikörper NM-CU (CSPG4xCD3), ein bispezifisches Konstrukt mit irrelevanter Bindungsspezifität. Der bispezifische Fabsc-Antikörper NM-CU induziert keine Lyse der 22RV1-Zellen, wodurch es sich bei den verwendeten  $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukten um eine antigenspezifische Lyse der Tumorzellen handelt.

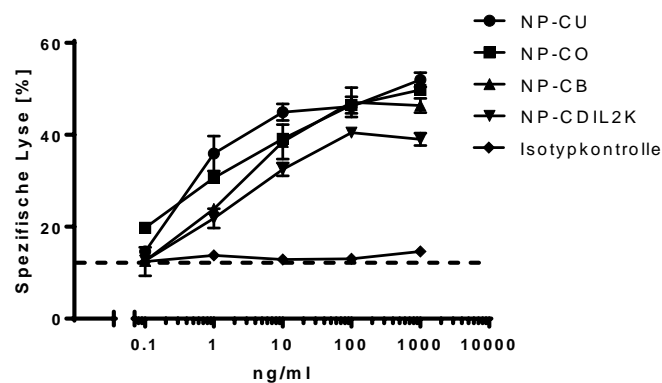


Abbildung 3.18: Antikörper-vermittelte Tumorzellyse der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Antikörperkonstrukte

$^{51}\text{Cr}$ -markierte 22RV1-Zellen wurden mit prä-aktivierten  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen (gesunder Spender) und den verschiedenen Antikörperkonstrukten in den angegebenen Antikörperkonzentrationen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Effektor- und Zielzellen ausschließlich mit RPMI-Komplettmedium inkubiert (-). Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen betrug 5:1. Die Zielzellyse wurde nach 8 h durch die Quantifizierung der Radioaktivität im Zellüberstand gemessen. Die Standardabweichung präsentiert die Messung von Triplikaten. Gezeigt ist ein charakteristisches Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

Da bei diesem Experiment alle Antikörperkonstrukte, trotz der unterschiedlichen Affinität zu dem  $\alpha\beta$ TCR bzw. CD3, ähnlich potent  $^{51}\text{Chrom}$ -markierte PSMA<sup>+</sup> Zielzellen lysierten, wurde zur weiteren Analyse der Konstrukte mit isolierten PBMCs ein Impedanzexperiment (xCELLigence) über mehrere Tage durchgeführt, um mögliche Unterschiede zwischen den Antikörpern zu identifizieren.

Die Ergebnisse des Impedanztests zeigen, dass bei limitierenden Effektor-Zielzellverhältnissen und unter der Verwendung von frisch isolierten PBMCs, Unterschiede bei der Tumorzellyse zwischen den verschiedenen  $\alpha$ -PSMA Fabsc-Konstrukten zu erkennen sind.

So wird deutlich, dass der Fabsc NP-CU die Zielzellen am effektivsten lysiert, gefolgt vom Fabsc NP-CO-Antikörper. Die Fabsc-Konstrukte NP-CDIL2K und NP-CB zeigen im Vergleich dazu einen deutlich verringerten Zielzellyseeffekt. Diese Effekte spiegeln die Bindungsaffinität an die Effektorseite über den  $\alpha\beta$ -TCR bzw. CD3 wieder. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Affinität zur Effektorzelle direkt mit dem Lysepotenzial der bispezifischen Fabsc-Konstrukte korreliert.

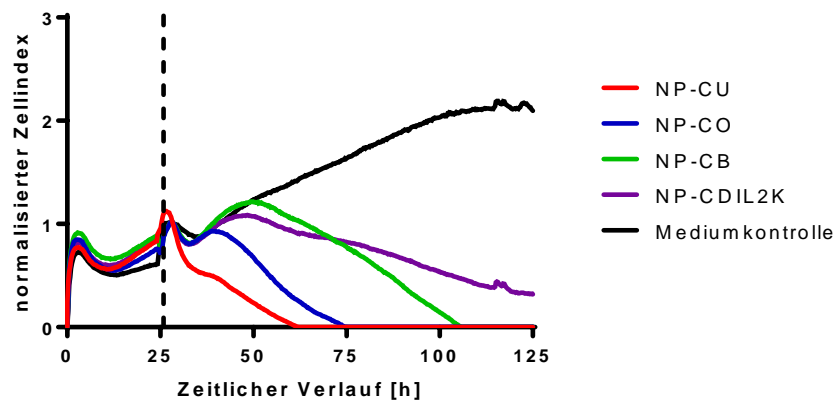


Abbildung 3.19: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte

Die Tumorzellyse wurde mittels Impedanzmessung analysiert. Nach einer Anwachsphase der Tumorzellen von ~24 h wurden PBMCs und die verschiedenen, angegebenen Antikörperkonstrukte in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  hinzugegeben (--). Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen betrug 1:1.

Um die Fabsc-Konstrukte NP-CU und NP-CO hinsichtlich ihrer spezifischen, wie auch unspezifischen Aktivierung bzw. Proliferation von T-Zellen näher zu untersuchen, wurden  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsexperimente durchgeführt. Da diese beiden Konstrukte PSMA<sup>+</sup>-Zellen am effektivsten lysierten, wurde sich auf diese Fabsc-Konstrukte konzentriert.

Um die unspezifisch induzierte Proliferation der bispezifischen Antikörperkonstrukte zu untersuchen, wurde ein  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsexperimente mit SKW 6.4-Zellen, welche diesen Effekt steigern, aber kein PSMA exprimieren, verwendet. Für die spezifische Antigen-abhängige Aktivierung der T-Zellen durch die Fabsc-Konstrukte wurden PSMA<sup>+</sup>-Tumorzellen benutzt.

### 3.2.7 Induktion der unspezifischen (*off-target*) bzw. spezifischen (*on-target*) T-Proliferation bzw. -aktivierung durch die Fabsc-Konstrukte NP-CU und NP-CO

In Abbildung 3.20 sind die Ergebnisse des <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsexperiments dargestellt. Unter der Verwendung von PSMA<sup>+</sup>-22RV1-Zellen (A) ist eine sehr deutliche konzentrationsabhängige, bispezifische Antikörper-vermittelte T-Zellproliferation zu erkennen. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass der Fabsc NP-CU-Antikörper zu einer stärkeren T-Zellproliferation führt als NP-CO. Diese Ergebnisse korrelieren mit der besseren Lyse von PSMA<sup>+</sup>-Tumorzellen beim Impedanzexperiment.

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass SKW 6.4-Zellen den unspezifischen Effekt des bispezifischen Antikörpers weiter verstärken. In diesem Fall wurde eine Kokultur von bestrahlten SKW 6.4-Zellen und PBMCs angesetzt, um die unspezifische Aktivierung der Antikörper NP-CU und NP-CO miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse des <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsexperiments zeigen sehr deutlich, dass der Fabsc-Antikörper NP-CU konzentrationsabhängig eine unspezifische T-Zellproliferation induziert. Im Vergleich dazu kommt es in der Gegenwart des NP-CO-Antikörpers zu keiner unspezifischen Proliferation.

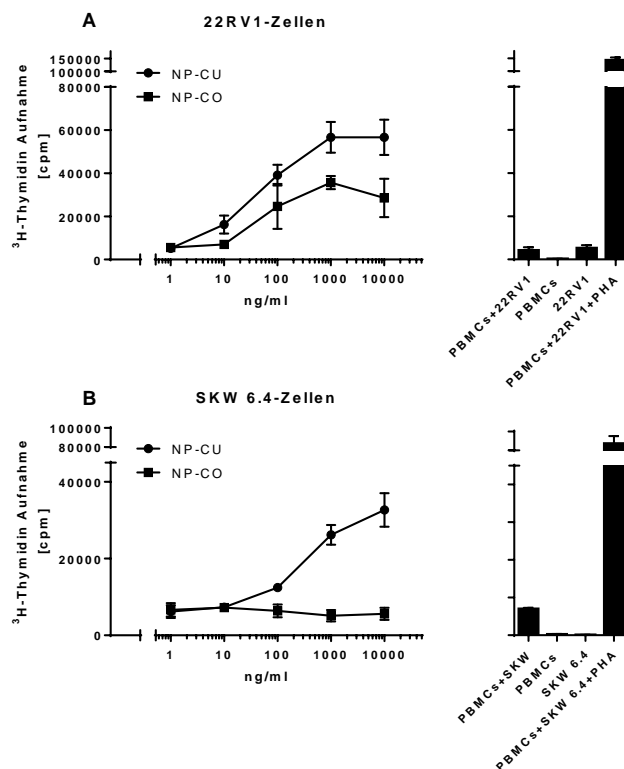


Abbildung 3.20: Induktion der spezifischen und unspezifischen T-Zellproliferation mittels der bispezifischen Antikörper Konstrukte NP-CU und NP-CO

PBMCs wurden mit der PSMA<sup>+</sup>-Zelllinie 22RV1 (A) oder der PSMA<sup>-</sup>-Zelllinie SKW 6.4 (B) und der angegebenen Konzentration des bispezifischen Fabsc-Antikörpers für 72 h inkubiert und anschließend die inkorporierte Menge <sup>3</sup>H-Thymidin detektiert. Um die maximale T-Zellproliferation zu bestimmen, wurden die Zellen mit 10 µg/ml PHA inkubiert.

Um diese unspezifische Aktivierung genauer zu untersuchen, wurden über MACS®-Technologie aufgereinigte T-Zellen für 48 h mit einer bispezifischen Antikörperkonzentration von 1 µg/ml

### 3.2 Generierung von optimierten monospezifischen und bispezifischen Antikörpern gegen PSMA

inkubiert und anschließend die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 durchflusszytometrisch analysiert.

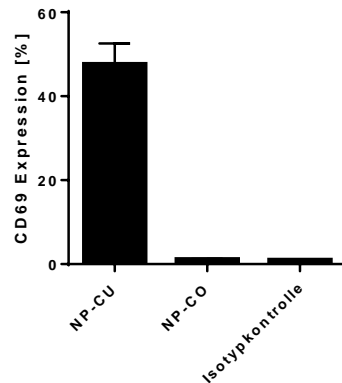


Abbildung 3.21: Unspezifische T-Zellaktivierung mittels der bispezifischen Antikörper Konstrukte Fabsc NP-CU und Fabsc NP-CO

Aufgereinigte T-Zellen wurden 48 h mit 1 µg/ml der beschriebenen bispezifischen Antikörperkonstrukten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes (von zweien) sind in Abb. 3.21 gezeigt. Nach der Inkubation der aufgereinigten T-Zellen mit den unterschiedlichen Fabsc-Konstrukten, konnte eine deutliche Diskrepanz zwischen den verwendeten Antikörpern erkannt werden. So induziert der Antikörper NP-CU eine drastische Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf etwa 50 % aller CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Im Gegensatz führt das Fabsc-Konstrukt NP-CO zu keiner PSMA-unabhängigen, unspezifischen Induktion des Aktivierungsmarkers CD69.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass NP-CU eine stärkere Proliferation der T-Zellen und eine effektivere Lyse von PSMA<sup>+</sup>-Zellen induziert. Jedoch führt das Konstrukt auch zu einer unspezifischen Aktivierung bzw. Proliferation unter PSMA-unabhängigen Bedingungen. Dies könnte in Patienten zu Nebenwirkungen führen, wodurch eine effektive Dosis nicht erreicht werden könnte.

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf den „benchmark“ α-PSMA Antikörper J591. Um dem translationalen Prozess „vom Labor in die Klinik“ ernsthaft weiterverfolgen zu können, sollte im weiteren Verlauf zum einen ein neuer, proprietärer Antikörper gegen PSMA entwickelt und zum anderen ein alternatives, bispezifisches Format (IgGsc) mit einer deutlich verbesserten Serumhalbwertszeit erprobt werden.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

Um neue PSMA-spezifische, monoklonale Antikörper zu generieren, wurde zunächst eine neue Sp2/0-Ag14-PSMA-Transfektante generiert, welche als Immunisierungsreagenz verwendet werden kann (siehe Abbildung 3.22).

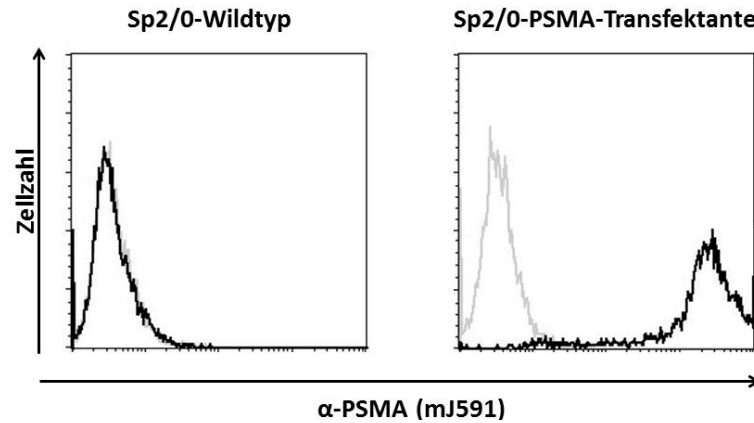


Abbildung 3.22: PSMA-Expression der neu generierten transfizierten Sp2/0-Ag14-Zellen  
Transfizierte sowie untransfizierte Sp2/0-Ag14-Zellen wurden mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  J591-Antikörper bzw. Kontrollantikörper (mIgG2a) inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.  
Die Histogramme zeigen die Bindung des  $\alpha$ -PSMA-Antikörpers (schwarze Linie) bzw. der Isotypkontrolle (graue Linie) auf den Wildtyp Sp2/0-Zellen (untransfizierte Zellen) bzw. den Sp2/0-CDCP1-exprimierenden (transfizierte Zellen) Zellen.

#### 3.3.1 Immunisierung von Mäusen mit Sp2/0-PSMA-Transfektanten und Messung des PSMA-spezifischen Antikörperserumtiters

Die Immunisierung der Mäuse (BALB/c) erfolgte mit  $1 \times 10^7$  bestrahlten Zellen alle zwei Wochen. Nach der dritten Immunisierung wurde den Mäusen retrobulbär Blut entnommen und das Serum auf spezifische PSMA-Antikörper mittels FACS-Analyse auf 22RV1-Zellen hin untersucht.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

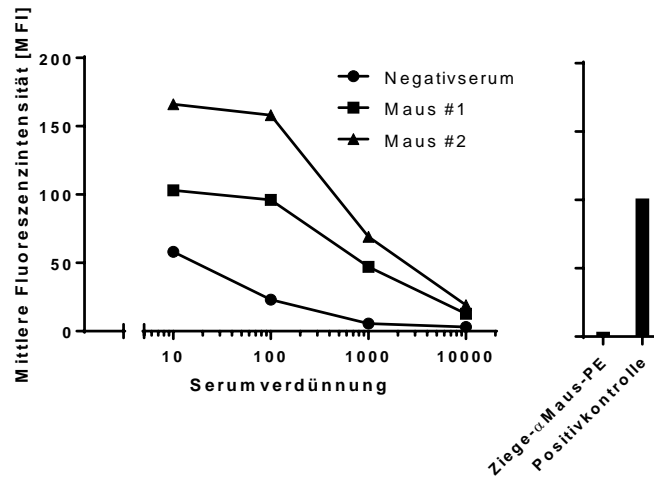


Abbildung 3.23: Spezifische PSMA-Serumtiterbestimmung mittels FACS-Analyse

Das Serum wurde wie angegeben mit FACS-Puffer verdünnt und durchflusszytometrisch hinsichtlich spezifischer Bindung auf 22RV1-Zellen untersucht. Die Negativkontrolle zeigt die Bindung des Serums der Mäuse vor der Immunisierung. Bei der Positivkontrolle wurde der mJ591-Antikörper (10  $\mu$ g/ml) ebenfalls in diesem Serum verdünnt.

Die Abbildung 3.23 zeigt, dass ein PSMA-spezifischer Serumtiter in beiden immunisierten Mäusen induziert werden konnte. Die Ergebnisse lassen auch erkennen, dass es Unterschiede beim PSMA-spezifischen Serumtiter bei den immunisierten Mäusen gibt. Die Maus mit dem höheren PSMA-spezifischen Serumtiter wurde daraufhin zur Antikörperherstellung benutzt.

#### 3.3.2 Generierung von $\alpha$ -PSMA-Antikörpern mittels der Hybridoma-Technologie

Aufgrund des positiven Ergebnisses der Serumuntersuchung, wurden die Milzen der Mäuse, entnommen und mit Sp2/0-Zellen (Wildtyp) fusioniert. Die Hybridomüberstände (etwa 1000) wurden mittels Durchflusszytometrie, unter Verwendung der PSMA-positiven 22RV1-Zelllinie, auf spezifische PSMA-Bindung, untersucht. Dabei konnte ein spezifisches Hybridom, welches PSMA-spezifische Antikörper sekretiert, generiert werden.

Das Hybridom wurde zweimal subkloniert, da mikroskopisch ein weiteres Hybridom in der Kulturplatte zu erkennen war. Der Antikörper wurde anschließend über Protein-A-Säulen aufgereinigt und der Subtyp unter Verwendung des IsoGold™ Kits bestimmt. Abschließend konnte ein PSMA-spezifischer Igy-Antikörper (IgG2b) identifiziert werden.

#### 3.3.3 Bindungsaffinität des neu generierten-PSMA Igy-Antikörpers 10B3

Anschließend wurde das Bindungsverhalten des neu generierten Antikörpers 10B3 durch Titration mittels Durchflusszytometrie auf 22RV1 Zellen bestimmt. Als Vergleich wurde der benchmark-Antikörper J591 mitgeführt.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

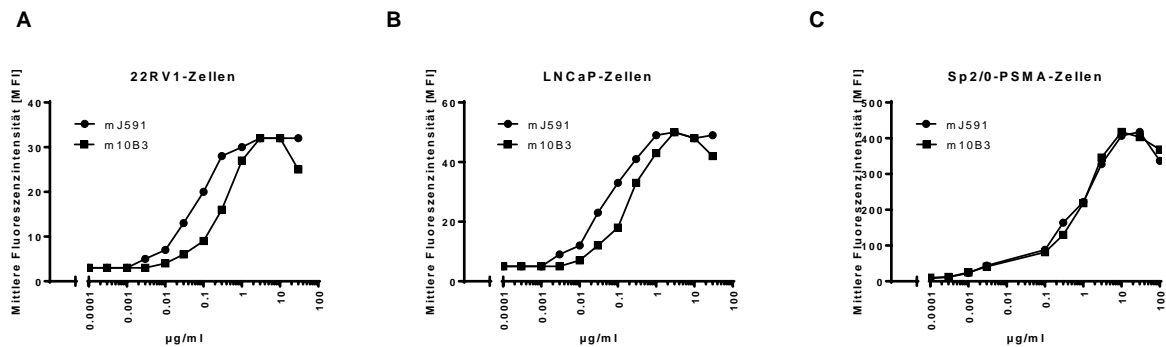


Abbildung 3.24: Bindungsaffinität des neu generierten  $\alpha$ -PSMA Igy-Antikörpers

22RV1- (A), LNCaP (B) und Sp2/0-PSMA-Zellen (C) wurden mit den angegebenen Antikörperkonzentrationen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität lebender Zellen.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.24 zeigen, dass beide Antikörper konzentrationsabhängig an die verwendeten Zelllinien binden. Unter der Verwendung von 22RV1- bzw. LNCaP-Zellen bindet der J591-Antikörper mit einer leicht höheren Affinität als der neu generierte 10B3-Antikörper. Im Gegensatz dazu binden beide Antikörper nahezu identisch an Sp2/0-PSMA-Zellen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Antigen PSMA durch die Bindung eines Antikörpers internalisiert werden kann. Für die Rekrutierung von Effektorzellen (NK- wie auch T-Zellen) ist jedoch eine möglichst stabile Expression des Antigens auf der Zielzelle wünschenswert. Daher wurde der J591-Antikörper mit dem neu generierten Antikörper 10B3, hinsichtlich der Induktion des Antigenshifts auf den Zielzellen, verglichen.

#### 3.3.4 Antigenshift (PSMA)

Die Expression von PSMA auf der Oberfläche von Sp2/0-PSMA-Zellen wurde nach Antikörperbindung durchflusszytometrisch nach 24 h bestimmt.

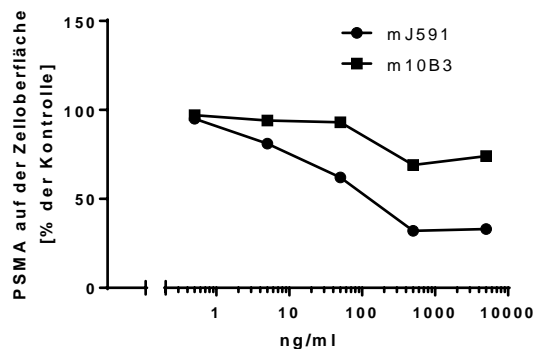


Abbildung 3.25:  $\alpha$ -PSMA-Antikörper induzierter Antigenshift

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

Sp2/0-PSMA-Zellen wurden für 20 h mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Antikörper J591 (●) oder 10B3 (■) inkubiert. Freie PSMA-Moleküle wurden anschließend mit 10  $\mu\text{g/ml}$  des entsprechenden gleichen  $\alpha$ -PSMA-Antikörpers markiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensität unbehandelter Zellen wurde die relative Oberflächenexpression von PSMA-Molekülen prozentual berechnet.

Bei den verwendeten Antikörpern ist eine konzentrationsabhängige Verminderung der PSMA-Expression zu erkennen. Des Weiteren zeigt sich sehr deutlich, dass der mJ591-Antikörper einen stärkeren Antigenshift, etwa 60 % der gesamten Moleküle, induziert als der m10B3-Antikörper, wobei nur ca. 20 % der Antigene von der Oberfläche der Zielzellen verschwinden.

#### 3.3.5 Kompetition mit J591

Die Ergebnisse von Abbildung 3.26 zeigen deutlich, dass es nicht möglich war den chimären J591-Antikörper zu detektieren, wenn davor die Zellen mit hohen Konzentrationen mJ591 inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu war durch die Vorinkubation mit dem m10B3-Antikörper das Signal des chimären J591-Antikörpers bei allen verwendeten Konzentrationen m10B3 zu detektieren. Dies deutet sehr stark daraufhin, dass die Antikörper 10B3 und J591 unterschiedliche Epitope des extrazellulären Bereichs von PSMA erkennen.

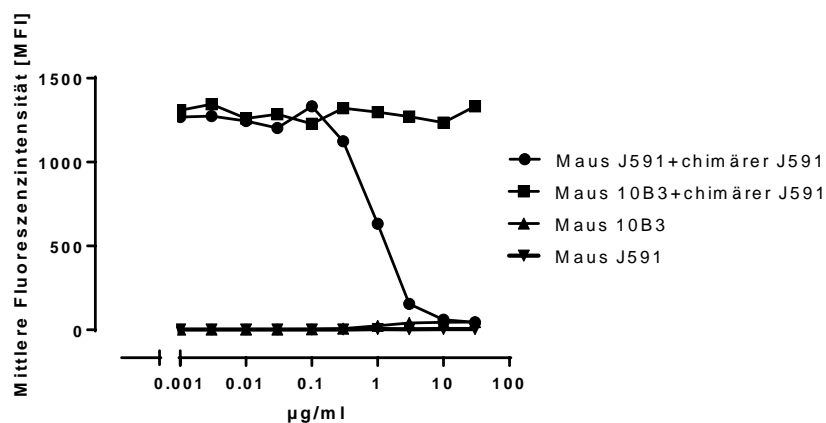


Abbildung 3.26: Verdrängungsexperiment zwischen dem Maus 10B3 und dem chimären J591  $\alpha$ -PSMA Antikörperklon

22RV1-Zellen wurden mit dem mJ591- bzw. m10B3-Antikörper inkubiert und anschließend eine gesättigte Konzentration des chimären J591-Antikörpers (10  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugegeben und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen.

#### 3.3.6 Immunhistochemische Charakterisierung

Für eine immunhistologische Charakterisierung wurde das Färbemuster des Antikörpers auf einer Vielzahl von benignen aber auch malignen Gewebeschnitten untersucht und mit dem J591-Antikörper verglichen. Diese Arbeiten wurden unter der Leitung von Prof. Bence Sipos, durch Dennis Thiele am Institut für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt.



### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

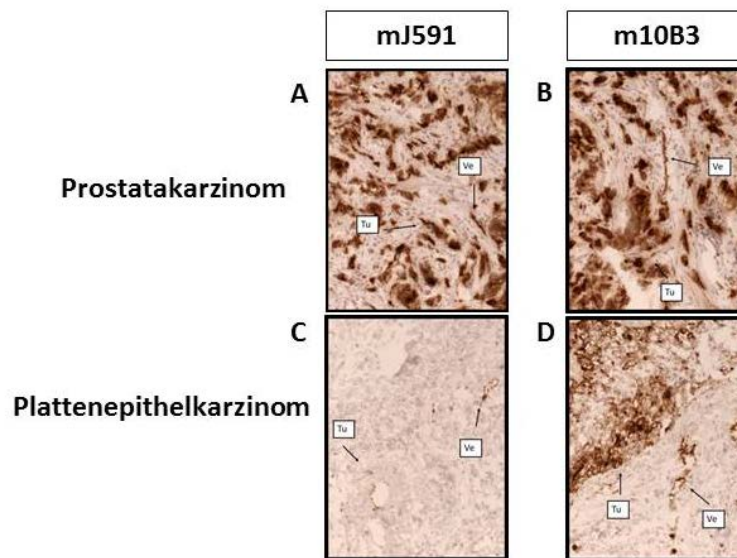


Abbildung 3.27: Immunhistologisches Färbemuster der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Antikörper 10B3 und J591

Immunhistologische Färbung der unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Antikörper J591 (A, C) und 10B3 (B, D) auf Prostatakarzinomgewebe (A, B) oder Plattenepithelkarzinomgewebe (C, D). Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml verwendet. Die spezifische Antikörperbindung wurde mittels einem HRP-Polymer und DAB-Färbung detektiert und sichtbar gemacht (braune Färbung). Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt (blaue Färbung). Tu=Tumorgewebe, Ve=tumorassoziierte Gefäße

Gegenüber benignem Gewebe zeigen beide Antikörper ein sehr vergleichbares Färbemuster. Auf nur wenigen gesunden Geweben, zum Beispiel auf den Nierentubuli und der gesunden Prostata, konnte eine spezifische Bindung der Antikörper nachgewiesen werden. Jedoch ist die Expression auf Normalgewebe deutlich schwächer als auf Prostatakarzinomgewebe.

Auf Prostatakarzinomgewebe (A, B) zeigen beide Antikörperklone eine deutliche spezifische Färbung des Tumorgewebes (Tu) und der tumorassoziierten Gefäße (Ve). Im Gegensatz dazu konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass nur der neu generierte Antikörper 10B3 spezifisch Plattenepithelkarzinomzellen färbt. Um zu klären, ob andere PSMA-Klone ebenfalls an Plattenepithelkarzinomzellen binden, wurden die PSMA-Klone 107-1A4, YPSMA-1 und GCP-04 ebenfalls auf eine spezifische Bindung getestet. Nur der GCP-04-Klon konnte ebenfalls Plattenepithelkarzinomzellen detektieren, jedoch handelte es sich hierbei um eine sehr schwache Reaktion deren Spezifität derzeit noch unklar ist.

Da unser favorisierter bispezifischer Antikörper aus einem Fabsc-Konstrukt, mit einem *single chain* des OKT-3-Antikörpers besteht, wurden die variablen Domänen des 10B3-Antikörpers in einen dafür verwendbaren Expressionsvektor kloniert und in Sp2/0-Zellen produziert.

Daraufhin wurden die bispezifischen Moleküle gegen PSMAxCD3 einerseits mit dem J591-Antikörper (NP-CO) und andererseits mit dem neu generierten 10B3-Antikörper (N10-CO), hinsichtlich T-Zellaktivierung und dem Potenzial PSMA<sup>+</sup> Tumorzellen zu lysieren, funktionell verglichen.

#### 3.3.7 Funktionelle Charakterisierung des neu generierten bispezifischen Fabsc-Konstrukts N10-CO im Vergleich zu NP-CO

Um zu überprüfen, ob das neu generierte Fabsc-Konstrukt N10-CO dem bis dahin, durch die bereits beschriebenen Eigenschaften (keine unspezifische T-Zellaktivierung, gute Tumorzelllyse), favorisierten Fabsc-Konstrukts NP-CO überlegen bzw. ebenbürtig ist, wurden einige T-Zellproliferationsexperimente wie auch Tumorzelllyseexperimente durchgeführt. In Abbildung 3.28 sind die Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsexperiments dargestellt. Unter der Verwendung von PSMA<sup>+</sup>-22RV1-Zellen ist eine sehr deutliche konzentrationsabhängige, bispezifische Antikörper-vermittelte T-Zellproliferation zu erkennen. Des Weiteren wird deutlich, dass beide Konstrukte N10-CO und NP-CO eine spezifische T-Zellproliferation induzieren. Zwischen den Konstrukten sind keine Unterschiede bezüglich der Induktion der T-Zellproliferation zu erkennen.

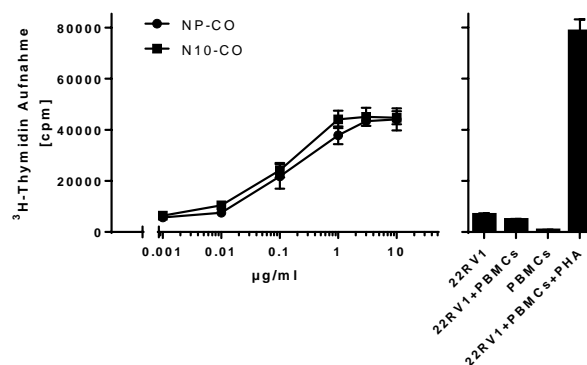


Abbildung 3.28: Induktion der spezifischen T-Zellproliferation mittels der bispezifischen Antikörper NP-CO und N10-CO

PBMCs und bestrahlte 22RV1-Zellen wurden mit den Fabsc-Konstrukten NP-CO (●) und N10-CO (■) für 48 h koinkubiert und anschließend die inkorporierte Menge  $^3\text{H}$ -Thymidin detektiert.

Um mögliche Unterschiede zwischen den Konstrukten hinsichtlich der Tumorzelllyse zu erkennen, wurde ein Impedanzexperiment durchgeführt.

Die Ergebnisse des Impedanztests zeigen, dass die Fabsc-Konstrukte N10-CO wie auch NP-CO effektiv PSMA<sup>+</sup> Tumorzellen lysieren.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

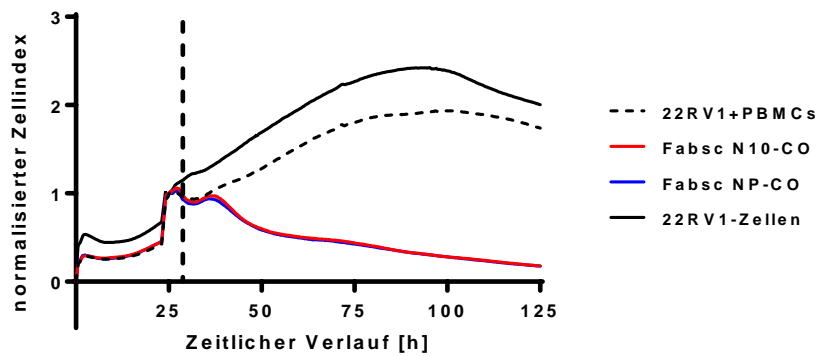


Abbildung 3.29: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der Fabsc-Konstrukte NP-CO und N10-CO  
Nach einer Anwachsphase der Tumorzellen von ~24 h wurden PBMCs und die verschiedenen, angegebenen Antikörperkonstrukte in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hinzugegeben (--). Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen betrug 5:1. Dargestellt ist ein charakteristisches Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Durchführung der funktionellen Experimente machte deutlich, dass es unter der Verwendung des neu generierten PSMA-Antikörpers (10B3), im Gegensatz zum benchmark Antikörper J591, im Fabsc-Konstrukt (OKT-3 *single chain*) zu einer vergleichbaren T-Zellproliferation bzw. Tumorzelllyse kommt. Darüber hinaus hat das neue bispezifische Antikörperkonstrukt den Vorteil, dass der neu generierte PSMA-Antikörper nicht nur maligne Prostatakarzinomzellen und tumorassoziierte Gefäße von einer Vielzahl von soliden Tumoren, sondern auch Tumorzellen von Plattenepithelkarzinomzellen (engl.: *squamous cell carcinoma*, SSC) sowie die tumorassoziierten Gefäße bindet. Dies macht den Antikörper für eine therapeutische Anwendung besonders interessant.

Um ein effektives therapeutisches einsetzbares Reagenz zu erhalten, ist es sinnvoll die eingesetzten variablen Sequenzen von Mausantikörpern zu humanisieren, um die Bildung von neutralisierenden Antikörpern möglichst zu verhindern. „Humanisieren“ bedeutet, dass die CDR-Sequenzen von Mausantikörpern in ein humanes Antikörpergerüst (FR1-4-Regionen) übertragen werden (engl.: *CDR-grafting*), um so große Teile der Mausaminosäuresequenz zu eliminieren.

Mittels der Technik des *CDR-graftings* wurden die murinen variablen Regionen des 10B3-Antikörpers ( $\alpha$ -PSMA) und die des OKT-3-Antikörpers ( $\alpha$ -CD3) humanisiert.

Folgende Keimbahnsequenzen wurden zur Humanisierung verwendet: Für OKT-3 IGHV3-23\*23 und IGKV1-9\*01; IGHV1-46\*03 und IGKV1-39\*01 und für 10B3 IGHV3-11\*06 und IGKV3-20\*02.

Um eine erfolgreiche Humanisierung zu überprüfen, wurden durchflusszytometrische Analysen sowohl auf der Zielseite (PSMA) als auch auf der Effektorseite durchgeführt.

#### 3.3.8 Bindungsanalyse der humanisierten Antikörperfragmente im Fabsc-Konstrukt

Dabei zeigte sich, dass die Humanisierung des 10B3-Antikörper erfolgreich verlaufen ist, da der humanisierte 10B3-Antikörper keinen Verlust hinsichtlich der Affinität gegenüber 22RV1-Zellen zeigt. Die Humanisierung des CD3-Antikörper OKT-3, war dagegen nicht erfolgreich, da ein Affinitätsverlust festzustellen war.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

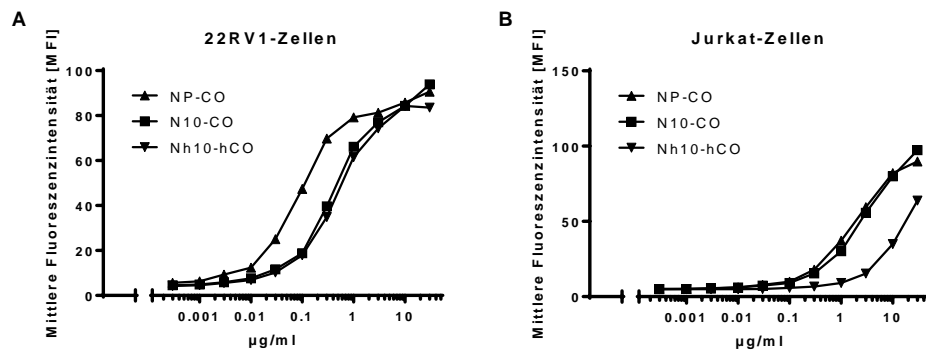


Abbildung 3.30: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der humanisierten bispezifischen Fabsc-Konstrukte

22RV1 Zellen (A) und JURKAT-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Fabsc-Konstrukte inkubiert. Gebundener Antikörper wurde daraufhin mittels RPE-markierten Ziege- $\alpha$ Mensch (Fc $\gamma$ -spezifischen) F(ab)<sup>2</sup>-Fragmenten markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen.

Da mit dem humanisierten Konstrukt keine spezifische Tumorzelllyse (Impedanzexperiment) bzw. T-Zellaktivierung induziert werden konnte, was vermutlich mit dem Verlust der Affinität an CD3 korreliert (Experimente nicht gezeigt), entschieden wir uns den OKT-3-Antikörper ein weiteres Mal zu humanisieren, um einen humanisierten OKT-3 Antikörper im *single chain* Format zu erhalten, welcher mit einer höheren Affinität an CD3 bindet, spezifische T-Zellaktivierung und Tumorzelllyse induziert. Dafür wurde die Humanisierungstechnik leicht verändert, indem einige Aminosäuren von der Mausequenz beibehalten bzw. rückmutiert wurden, um eine mögliche Strukturveränderung des Antikörpers zu verhindern.

Eine genaue Beschreibung der verwendeten Humanisierungstechnik ist nachzulesen in der Dissertation von Martin Pflügler: *Humanization, optimization and preclinical characterization of bispecific anti-endoglin antibodies for tumor-cell restricted activation of NK-cells*.

In Abbildung 3.31 ist die Bindungsanalyse von zwei neu humanisierten Fabsc-Konstrukte auf Ziel- wie auch Effektorseite dargestellt.

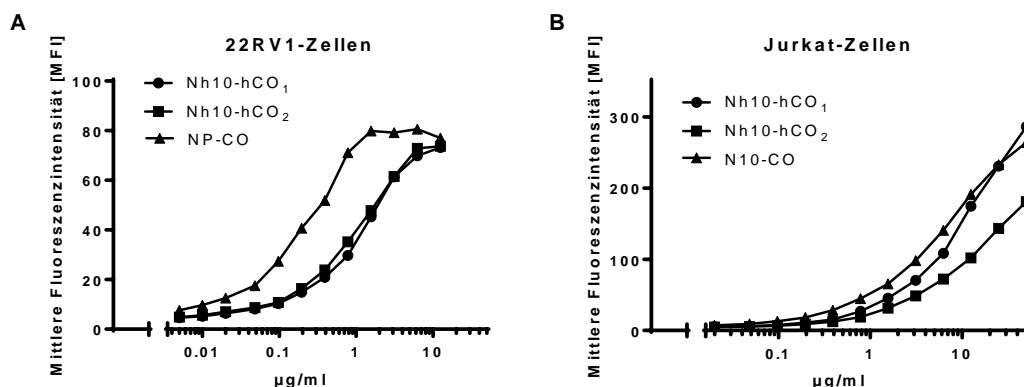


Abbildung 3.31: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der humanisierten bispezifischen Fabsc-Konstrukte Nh10-ChO<sub>1</sub> und Nh10-ChO<sub>2</sub>

22RV1 Zellen (A) und JURKAT-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Fabsc-Konstrukte inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

Aus Abbildung 3.31B geht hervor, dass die neu generierten *single chain* Varianten mit einer deutlich höheren Affinität an CD3 binden als bei der vorherigen Humanisierung.

Um nun die neu generierten Fabsc-Konstrukte funktionell zu untersuchen, ob sie T-Zellproliferation induzieren, wurde ein  $^3\text{H}$ -Thymidinexperiment durchgeführt.

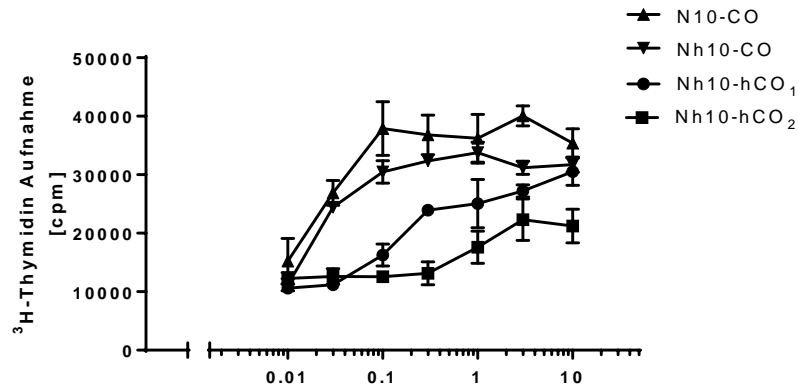


Abbildung 3.32: Induktion der spezifischen T-Zellproliferation mittels der neu generierten humanisierten bispezifischen Antikörper

PBMCs eines gesunden Spenders und bestrahlte 22RV1-Zellen wurden mit den Fabsc-Konstrukten N10-CO

(▲) und Nh10-CO (▼), Nh10-hCO<sub>1</sub> (●) und Nh10-hCO<sub>2</sub> (■) für 48 h koinkubiert und anschließend die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme bestimmt.

In Abbildung 3.32 sind die Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsexperiments dargestellt.

Unter der Verwendung von PSMA<sup>+</sup>-22RV1-Zellen ist eine deutlich konzentrationsabhängige bispezifische Antikörper-vermittelte T-Zellproliferation zu erkennen. Des Weiteren ist deutlich, dass beide neu humanisierten Konstrukte N10-CO<sub>1</sub> und NP-CO<sub>2</sub> eine spezifische T-Zellproliferation induzieren, diese fällt jedoch im Vergleich zu den nicht-humanisierten (CD3) bispezifischen Antikörperkonstrukten etwas schwächer aus.

Durch die erneute Humanisierung des OKT-3 Antikörperklons konnte demnach eine *single chain* Variante identifiziert werden, welche eine spezifische zielzellabhängige T-Zellproliferation induziert, aber nicht zu einer unspezifischen Aktivierung der T-Zellen führt. Dieses neue Fabsc-Konstrukt N10-CO<sub>1</sub> scheint bis dahin das vielversprechendste PSMAxCD3-Format zu sein.

#### 3.3.9 Generierung bispezifischer PSMAxCD3 IgGsc-Konstrukte

Von Dr. Latifa Zekri wurden IgGsc-Konstrukte mit dem neuen h10B3- und dem J591-Antikörper kloniert, transfiziert, aufgereinigt und charakterisiert. Insbesondere wegen der überraschend kurzen Serumhalbwertszeit der Fabsc-Konstrukte.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

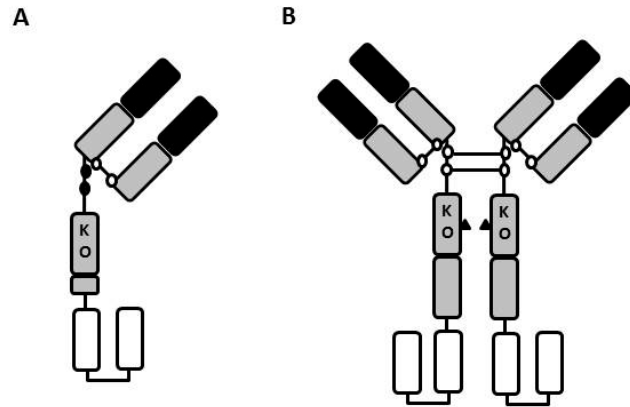


Abbildung 3.33: Schematische Übersicht über die unterschiedlichen bispezifischen Antikörperformate

In Abbildung A ist als Vergleich das bereits beschriebene bivalente Antikörperformat (Fabsc) dargestellt, und in B das tetravalente bispezifische Antikörperformat (IgGsc).

Die variablen Domänen der Zielantigene als Fab-Fragmente (PSMA) sind in schwarz, die variablen Domänen mit CD3-Spezifität als *single chain* in weiß und die konstanten Domänen in grau dargestellt. KO: Mutationen in der CH2-Domäne, zur Attenuierung der FC-Rezeptorbindung. ●: Cystein-Moleküle, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

- zeigen Cystein zu Serin Mutationen auf, um die Zusammenlagerung zweier Fabsc zu verhindern.
- ▲ kennzeichnen Glykosylierungsstellen.

Die IgGsc-Konstrukte basieren auf Arbeiten, die von Coloma und Morrison durchgeführt wurden und verfügen über die gleichen Aminosäureveränderungen wie die Fabsc-Konstrukte innerhalb der C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Domäne, um eine Fc-Rezeptorbindung zu blockieren (Abschnitt 3.2).

In den ersten *in vitro* Experimenten zeigte sich überraschenderweise, dass es unter der Verwendung des UCHT-1 *single chains* im IgGsc-Konstrukt, in Abwesenheit von PSMA<sup>+</sup> Tumorzellen, zu keiner unspezifischen Aktivierung der T-Zellen kam, wie es für das Fabsc-Konstrukt bereits in dieser Arbeit beschrieben wurde und wodurch auf den Antikörperklon OKT-3 für dieses Format ausgewichen wurde. In Abbildung 3.34 sind die repräsentativen Ergebnisse eines <sup>3</sup>H-Thymidinexperimentes dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Fabsc-Konstrukte unabhängig vom verwendeten PSMA-Klon zu einer unspezifischen Aktivierung führen. Im Gegensatz dazu kommt es in Anwesenheit der IgGsc-Konstrukte zu keiner „*off-target*“ T-Zellaktivierung.

Die Abbildung 3.34B lässt auch erkennen, dass bei allen verwendeten bispezifischen Antikörpern es zu einer T-Zellaktivierung kommt. Zwar ist die spezifische Aktivierung der T-Zellen durch die IgGsc-Konstrukte, im Vergleich zu den Fabsc-Konstrukten, etwas schwächer. Jedoch scheinen diese Konstrukte, durch die längere Halbwertszeit und die Reduktion der unspezifischen Aktivierung der T-Zellen, deutliche Vorteile zu haben.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

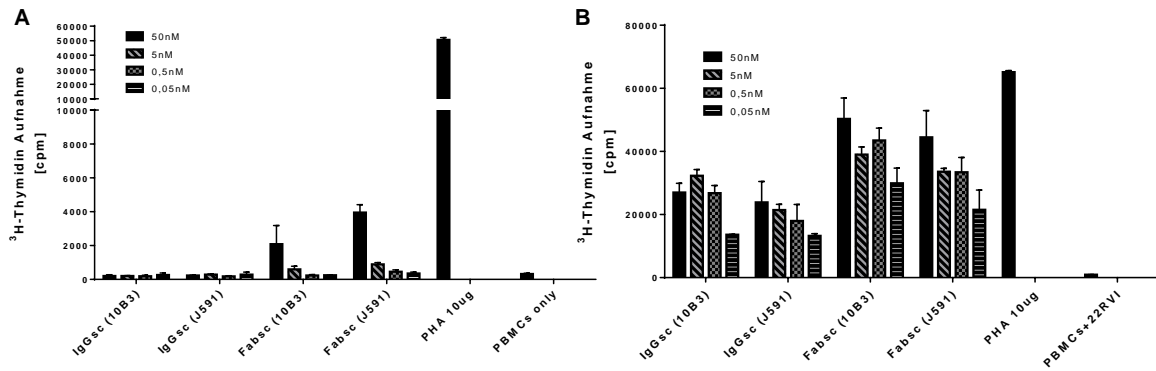


Abbildung 3.34: Induktion der unspezifischen (A) bzw. spezifischen (B) T-Zellproliferation mittels der bispezifischen IgGsc-Antikörper. PBM Cs eines gesunden Spenders wurden in Abwesenheit (A) oder Anwesenheit von 22RV1-Zellen (B) mit den neuen IgGsc-Konstrukten 48 h kokultiviert. Anschließend wurde den Zellen 0,5  $\mu\text{Ci}$ /Vertiefung für ca. 16 h hinzugefügt. Um die maximale T-Zellproliferation zu bestimmen, wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PHA inkubiert.

#### 3.3.10 Proteinbiochemische Charakterisierung der bispezifischen IgGsc-Antikörper

Zuallererst wurden die aufgereinigten Proteine bezüglich Homogenität und Aggregation mittels Größenausschlusschromatographie untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.35 dargestellt. Die IgGsc-Formate  $\alpha$ -PSMA zeigen einen Hauptpeak. Der Peak hat eine Retentionszeit von 30 min, was einer Größe von ca. 200 kDa entspricht.

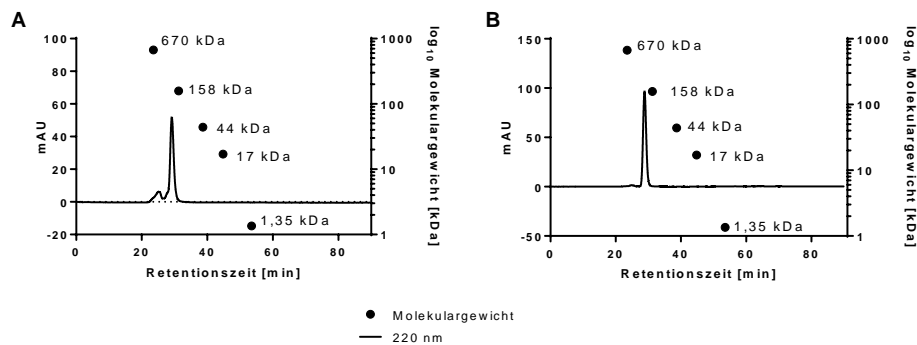


Abbildung 3.35: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen IgGsc-Konstrukte. Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine IgGsc Nh10-CU(A) und IgGsc NP-CU(B). Die aufgetragene Proteinmenge betrug zwischen 5-10  $\mu\text{g}$ . Auf der Abszisse (linke Ordinate) ist die Retentionszeit des eluierten Proteins aufgetragen, die Menge des Proteins wird durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 220 nm angegeben. Die rechte Ordinate beschreibt das Molekulargewicht der unterschiedlichen Eichproteine (●) anhand derer Retentionszeiten.

Wie aus Abbildung 3.36 hervorgeht, konnten unter nicht-reduzierten Bedingungen die erwarteten Molekulargewichte der IgGsc-Konstrukte bei etwa 200 kDa belegt werden. Unter

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

reduzierten Bedingungen sind zwei distinkte Proteinbanden zu erkennen, welche die leichte und die schwere Kette des Proteins repräsentieren.

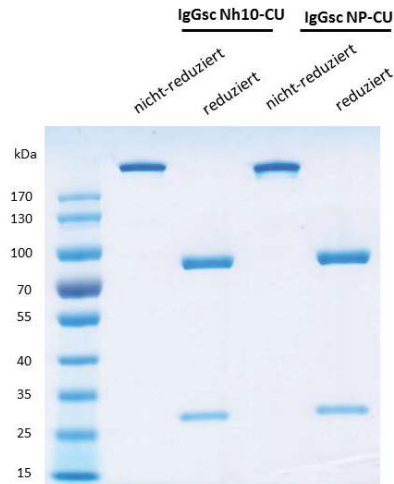


Abbildung 3.36: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen IgGsc Antikörperkonstrukte. Die erwähnten Proteine (2  $\mu$ g) wurden unter nicht-reduzierten und reduzierten Bedingungen auf 10 % Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 3.3.11 Bindung an CD3 und PSMA

Ein repräsentatives Ergebnis dieser Analysen ist in der Abbildung 3.37 dargestellt.

Die Unterschiede der maximalen mittleren Fluoreszenzintensität zwischen Fabsc- und IgGsc-Konstrukten ist durch die unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen und durch den sekundär verwendenden fluoreszenz-markierten Antikörper zu erklären.

Die Abbildung 3.37A zeigt die konzentrationsabhängige Bindung der bispezifischen Konstrukte an 22RV1 (PSMA<sup>+</sup>).

Dabei zeigte sich, dass alle neu generierten bispezifischen Konstrukte konzentrationsabhängig an PSMA<sup>+</sup>-Zellen binden, wobei die Konstrukte, welche den J591 Klon verwenden, mit einer etwas höheren Affinität gebunden haben als die Konstrukte die den 10B3 Antikörper benutzen.

Die Abbildung 3.37B zeigt die konzentrationsabhängige Bindung der bispezifischen Konstrukte an JURKAT-Zellen (CD3).

Dabei ist zu erkennen, dass das Fabsc-Konstrukt mit einer deutlich erhöhten Affinität an CD3 bindet als das IgGsc-Konstrukt.



### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

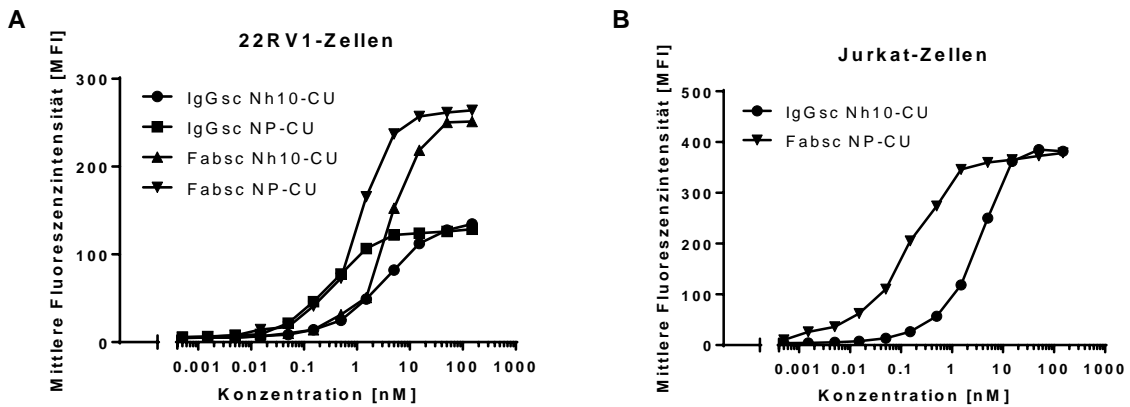


Abbildung 3.37: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der bispezifischen  $\alpha$ -PSMA Konstrukte

22RV1 Zellen (A) und JURKAT-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Fabsc- bzw. IgGsc-Konstrukte inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Um die Tumorzelllyse zwischen den Konstrukten zu vergleichen, wurde ein Impedanzexperiment mit 22RV1 Tumorzellen durchgeführt.

Wie Abbildung 3.38 zeigt, induzieren alle  $\alpha$ -PSMA bispezifischen Moleküle über die gemessene Zeit eine Tumorzelllyse. Es ist zu erkennen, dass die Fabsc-Konstrukte zu einer marginal besseren Lyse der Tumorzellen führen als die IgGsc-Konstrukte. Zwischen den verwendeten PSMA-Antikörperklonen J591 und h10B3 ist bei beiden Konstrukten kein Unterschied zu erkennen.

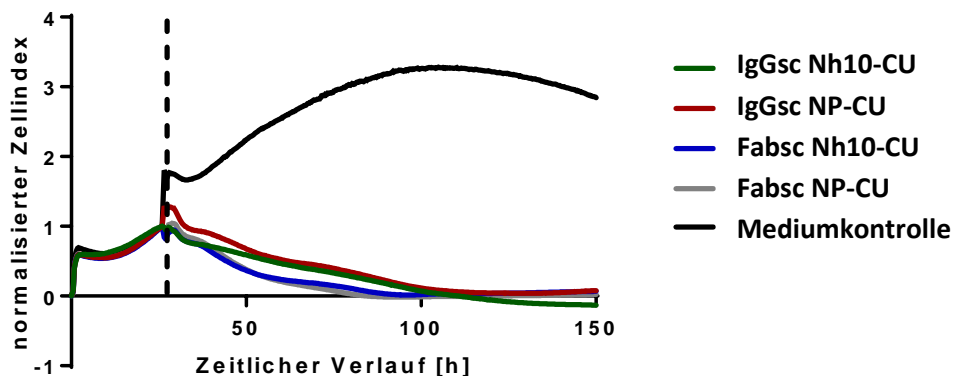


Abbildung 3.38: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen bispezifischen  $\alpha$ -PSMA Konstrukten

Die Tumorzelllyse wurde mittels Impedanzmessung analysiert. Nach einer Anwachsphase der Tumorzellen von  $\sim 24$  h wurden PBMCs und die verschiedenen Antikörperkonstrukte in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  hinzugegeben (--). Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen betrug 1:1.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Generierung der IgGsc PSMAxCD3 Konstrukte ein Format gefunden wurde, was sehr viele Vorteile bietet. Zum einen führen die IgGsc-Konstrukte, im Vergleich mit den Fabsc-Molekülen, zu keiner „off-target“ Aktivierung und könnten dadurch unter Umständen mit einer höheren Konzentration appliziert werden. Zum anderen haben diese Konstrukte eine sehr viel höhere Halbwertszeit und müssten nicht kontinuierlich infundiert werden.

Bezogen auf die Induktion einer spezifischen T-Zellaktivierung oder die Lyse von PSMA+ Tumorzellen lieferten die Fabsc- und die IgGsc-Konstrukte vergleichbare Ergebnisse.

### 3.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

Nach diesen Untersuchungen scheint ein bispezifischer PSMAxCD3 Antikörper im IgGsc-Format mit dem humanisierten 10B3 Antikörper als Zielteil und UCHT-1 als Effektorteil für die klinische Applikation am besten geeignet.

Auch bei optimalem Design bispezifischer Antikörper kann die Rekrutierung des gesamten T-Zellsystems über das CD3 Molekül problematisch sein. Eine *off-target* Aktivierung entweder durch Expression des Zielantigens auf normalen Zellen oder durch direkte zielzell-unabhängige Wechselwirkung des anti-CD3 Teils mit T-Zellen kann zu erheblichen Nebenwirkungen in Form eines Zytokinfreisetzungsyndroms führen. Deshalb könnte die Rekrutierung des  $\gamma\delta$ -T-Zellsystems das mengenmäßig maximal 10 % der T-Zellen ausmacht, ein alternatives Konzept sein, dass in dieser Arbeit zusätzlich erprobt werden soll. Hierzu wurden zunächst geeignete Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR Subtyp generiert, aus dem ca. 90 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut bestehen. Mit diesen Antikörpern sollten dann verschiedene bispezifische Konstrukte generiert und getestet werden.

### **3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor**

Um Antikörper gegen die variablen Domänen des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptors zu generieren, muss der spezifische T-Zellrezeptor entweder als aufgereinigtes Protein oder als zellständiges Antigen vorliegen. Zur Immunisierung könnten demnach entweder ein V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein oder Zellen die den Rezeptor als transfiziertes Antigen exprimieren, benutzt werden.

Da alle T-Zellrezeptoren aus zwei Ketten  $\gamma\delta$ -Heterodimer oder  $\alpha\beta$ -Heterodimer bestehen und ohne die humane CD3 $\zeta$ -Kette nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden, ist die Generierung einer Transfektante problematisch. Aufgereinigte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen könnten im Prinzip zur Immunisierung verwendet werden, jedoch exprimieren die V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen eine Vielzahl von Antigenen auf der Zelloberfläche, die alle ein mögliches Ziel einer Immunantwort darstellen können, wodurch sich das Testverfahren für positive Hybridome sehr zeitintensiv und schwierig gestalten würde. Daher wurde ein rekombinantes Fusionsprotein, aus den variablen Regionen des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptors und der konstanten Domäne eines Antikörpers, hergestellt [186].

#### **3.4.1 Generierung eines V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins zur Hybridomherstellung**

Wie bereits erwähnt, besteht das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins aus der variablen Domäne des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCRs und des Fc-Teils eines Antikörpers. Um die Immunogenität spezifisch auf die variablen Domänen des TCRs zu lenken, wurde ein Fc-Teil eines Mausantikörpers (IgG2a) verwendet. Jedoch wurde das Fusionsprotein zusätzlich auch mit einem humanen Fc-Teil produziert. Die variablen Domänen des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCRs wurden von der Firma Entelechon GmbH synthetisiert und anschließend in einen Expressionsvektor kloniert. Die spezifische Produktion des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins wurde mit einem ELISA-Test, welcher spezifisch den Maus- bzw. den humanen-Fc-Teil detektierten, kontrolliert. Das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein konnte anschließend vom Zellmedium über Protein-A-Säulen, welche mit dem Maus- bzw. dem humanen Fc-Teil interagieren, aufgereinigt werden.

#### **3.4.2 Charakterisierung des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins**

Um das konstruierte, exprimierte und aufgereinigte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein weiter zu charakterisieren, wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor

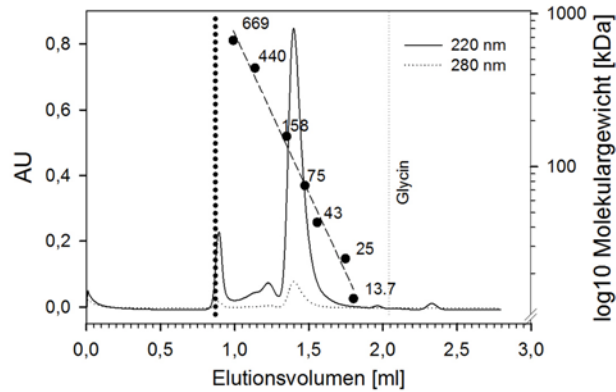


Abbildung 3.39: Analytische Gelfiltration des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins

Dargestellt ist das Elutionsprofil des V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsproteins. Es wurden 10  $\mu$ g des Proteins aufgetragen.

Das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein zeigt einen distinkten Einzelpeak bei einem Elutionsvolumen von 1,4 ml. Des Weiteren zeigt sich ein zweiter Peak, welcher über die Ausschlussgrenze reicht und auf molekulare Aggregate hinweist.

Anschließend wurde ein ELISA-Test mit einem kommerziell erhältlichen  $\alpha$ -V $\delta$ 2-Antikörper durchgeführt, um die korrekte Faltung des artifizierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCRs zu untersuchen und dadurch zu gewährleisten, dass die damit neu generierten Antikörper auch natürlich gefaltete, membranständige V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCRs auf der Zelloberfläche von  $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen können.

Dazu wurden 5  $\mu$ g/ml Ziege-anti-human Fc $\gamma$  spezifischer Antikörper über Nacht an eine ELISA-Platte geheftet und das Fusionsprotein dazu gegeben. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit einem spezifischen  $\alpha$ -V $\delta$ 2-Antikörper bzw. der Isotypkontrolle gebunden und mittels eines Detektionssystems, bestehend aus einem Biotin-markierten Antikörper und Streptavidin-polyHRP, visualisiert.

Die Ergebnisse des ELISA-Tests zeigen, dass der spezifische V $\delta$ 2-Antikörper an das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein bindet, was auf eine korrekte Faltung des Proteins schließen lässt. Somit ist es im Prinzip geeignet, um in Mäusen spezifische  $\alpha$ -V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR Antikörper zu generieren.

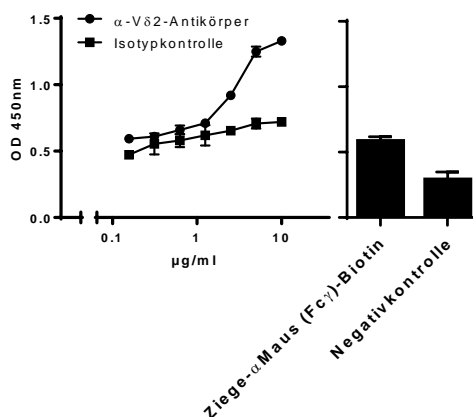


Abbildung 3.40: Spezifische Bindung eines  $\alpha$ -V $\delta$ 2-Antikörpers an das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein

Dargestellt ist die Bindung eines V $\delta$ 2-Antikörpers (●) bzw. der Isotypkontrolle (■) an das V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fusionsprotein (5  $\mu$ g/ml).

### 3.4.3 Immunisierung von Mäusen mit einem $V\gamma 9V\delta 2$ -Fusionsproteins und Messung des $V\gamma 9\delta 2$ -TCRs -spezifischen Antikörperserumtiters

Die Immunisierung der Mäuse (BALB/c und C57BL/6) erfolgte mit 100  $\mu\text{g}$  des  $V\gamma 9V\delta 2$ -Fusionsproteins alle zwei Wochen. Nach der dritten Immunisierung wurde den Mäusen retrobulbär Blut entnommen und das Serum auf spezifische  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR-Antikörper mittels FACS-Analyse auf humanen PBMCs hin untersucht.

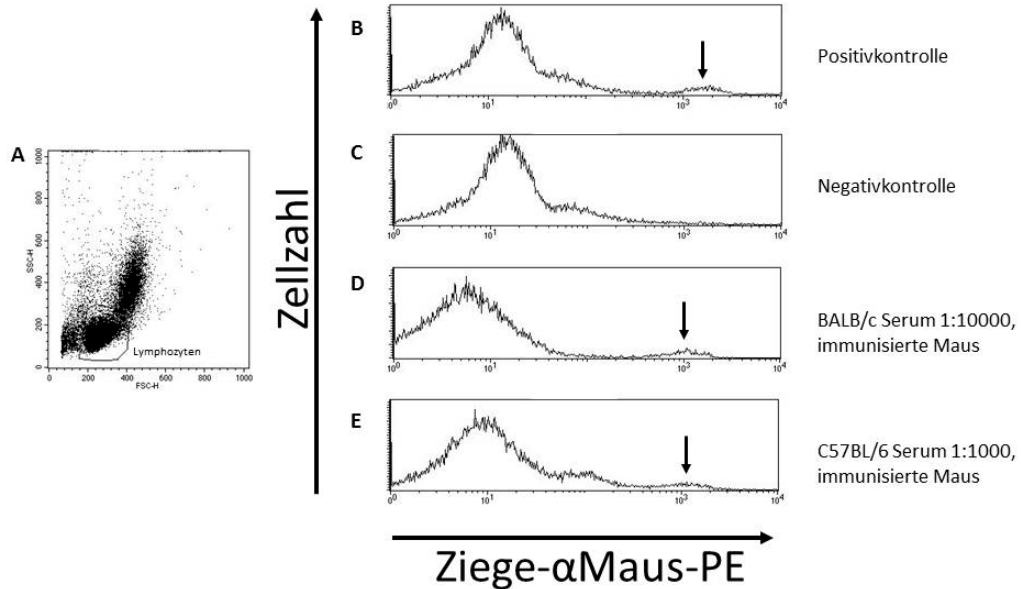


Abbildung 3.41: Spezifische  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR-Antikörper Serumtiterbestimmung mittels FACS-Analyse auf humanen PBMCs

Das Serum wurde wie angegeben mit FACS-Puffer verdünnt und durchflusszytometrisch hinsichtlich spezifischer Bindung auf humanen PBMCs untersucht. Die viablen Lymphozyten wurden über die FSC/SSC-Darstellung identifiziert (A). Die Positivkontrolle (Serum 1:10 verdünnt) bzw. Negativkontrolle sind in den Graphen B und C dargestellt. (B) Die Histogramme D und E zeigen Serumverdünnungen unterschiedlicher Mäuse (BALB/c und C57BL/6). Es wurden jeweils fünf Mäuse jedes Stammes untersucht. Die dargestellten Graphen stellen eine repräsentative Probe jeder Gruppe dar. Die Pfeile markieren die spezifisch angefärbte  $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellpopulation.

Die Abbildung 3.41 zeigt, dass ein spezifischer anti- $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR Serumtiter, welcher Unterschiede zwischen den Mausstämmen zeigt, erreicht werden konnte. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei BALB/c-Mäusen bei einer Serumverdünnung von 1:10000 noch eine spezifische  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation mittels FACS-Analyse zu erkennen ist, im Vergleich dazu konnte bei C57BL/6 verwendeten Mäusen eine spezifische Population nur noch bei einer Serumverdünnung von 1:1000 beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass die BALB/c-Mäuse eine stärkere Antikörper-abhängige Immunreaktion induzieren. Daher wurden zur Generierung von spezifischen anti- $V\gamma 9V\delta 2$ -Antikörpern mittels Hybridoma-Technologie BALB/c-Mäuse verwendet.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

#### 3.4.4 Generierung von monoklonalen $\alpha$ - $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR-Antikörpern mittels der Hybridoma-Technologie

Aufgrund des positiven Ergebnisses der Serumuntersuchung, wurde die Milz der BALB/c-Maus mit dem höchsten spezifischen Serumtiter entnommen und mit Sp2/0-Zellen (Wildtyp) fusioniert. Die Hybridomüberstände wurden mittels Durchflusszytometrie auf spezifische  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR-Bindung unter Verwendung von humanen PBMCs untersucht. In Abbildung 3.42 sind einige Beispiele von durchflusszytometrischer Analysen von unterschiedlichen Hybridomüberständen gezeigt.

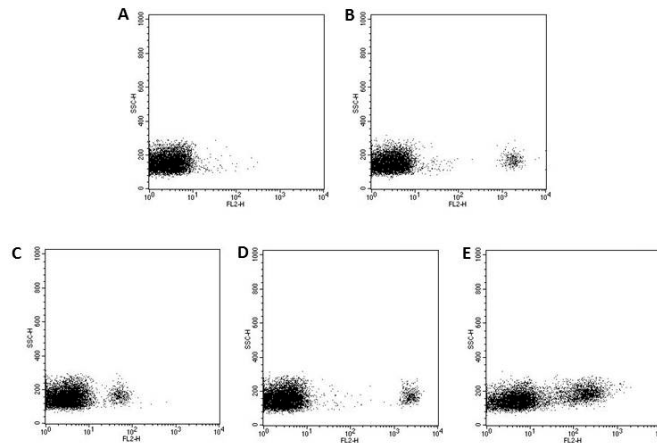


Abbildung 3.42: Durchflusszytometrische Analyse von unterschiedlichen potenziellen  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR spezifischen Hybridomüberständen

Humane PBMCs wurden mit unterschiedlichen Hybridomüberständen inkubiert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität viabler Lymphozyten. Das Diagramm (A) zeigt die Negativkontrolle, bei welcher die humanen PBMCs ausschließlich mit dem sekundären RPE-markierten Ziege- $\alpha$ Maus-Antikörper gefärbt wurden. Als Positivkontrolle (B) wurde ein kommerzieller  $V\delta 2$ -spezifischer Mausantikörper verwendet. In den Diagrammen (C, D und E) wurden unterschiedliche Hybridomüberstände zur primären Inkubation der humanen PBMCs verwendet.

Die Diagramme 3.42A und 3.42B stellen die Negativ- bzw. die Positivkontrolle dar und geben ein Indiz über eine  $\gamma\delta$ -T-Zell spezifische Färbung. Eine von der Zellzahl vergleichbar positive Zellpopulation ist in den Hybridomüberständen der Diagramme C und D zu erkennen. In Diagramm E wird eine größere Zellpopulation durch den Hybridomüberstand detektiert, was darauf hin deutet, dass dieses Hybridom einen Antikörper sekretiert, welcher eine unspezifische Bindung an Lymphozyten induziert und nicht  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR spezifisch ist.

Alle positiven Hybridome wurden mindestens einmal subkloniert und die Spezifität immer wieder auf humanen PBMCs mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Anschließend wurden die Antikörper über Protein-A-Säulen aufgereinigt und der Subtyp unter Verwendung des IsoGold™ Kits bestimmt.

Abschließend konnten sieben Igy anti-  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR spezifische Hybridome identifiziert werden.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

Nummer:	Klon:	Subklasse (schwere Kette)	Subklasse (leichte Kette)
1	7-2 D/3	IgG1	n.d.
2	8-2 D/11	IgG1	n.d.
3	12-1 F/11	IgG1	n.d.
4	11-1 D/10	IgG1	n.d.
5	10-3 E/9	IgG1	n.d.
6	7-1 A/6	IgG1	kappa
7	2-2 A/6	IgG1	n.d.

Tabelle 3.2: Übersicht über die neu generierten  $\alpha$ - $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper

#### 3.4.5 Bindungsaffinität und -spezifität der $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR spezifischen Igy-Antikörper

Das Bindungsverhalten der aufgereinigten Igy-Antikörper wurde durch Titration auf isolierten (MACS®-Technologie) und davor expandierten (400nm Zoledronsäure und 100 U/ml IL-2 für 14 Tage)  $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen bestimmt.

Alle getesteten Antikörper zeigen eine Bindung an die aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Affinitätsunterschiede sind zu erkennen.

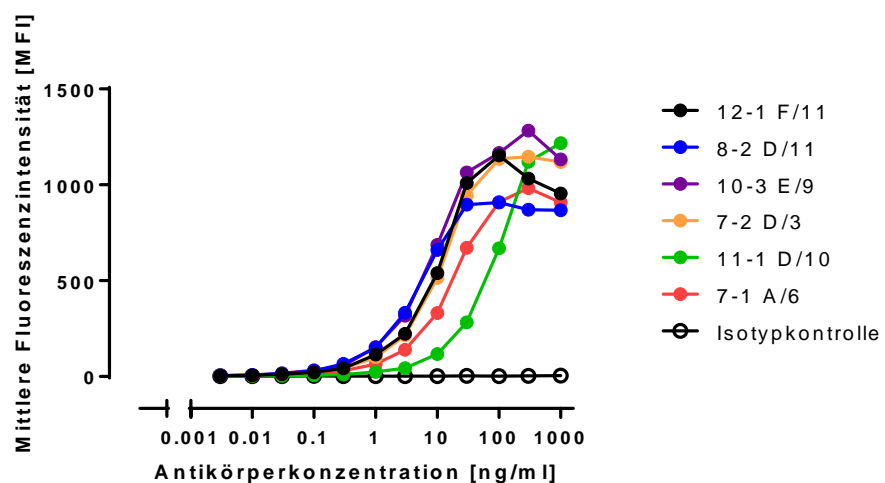


Abbildung 3.43: Bindungsaffinität der neu generierten  $\alpha$ -  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR Igy-Antikörper

Die aufgereinigten und expandierten  $V\gamma 9V\delta 2$ -Zellen wurden mit den unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität.

Die Bindungsspezifität der generierten  $\alpha$ -  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR Antikörper wurde durch Bindung auf die  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation unter Verwendung eines Sekundärreagenz auf humanen PBMCs mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dafür wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert und mit direkt markierten Antikörpern inkubiert, wodurch die Zellpopulationen  $CD45^+$ ,  $CD3^+$ , pan  $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden konnten.

In Abbildung 3.44 ist ersichtlich, dass die generierten Antikörper sehr spezifisch an  $\gamma\delta$ -T-Zellen binden. Dargestellt sind exemplarisch zwei der sieben neu hergestellten Antikörper.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

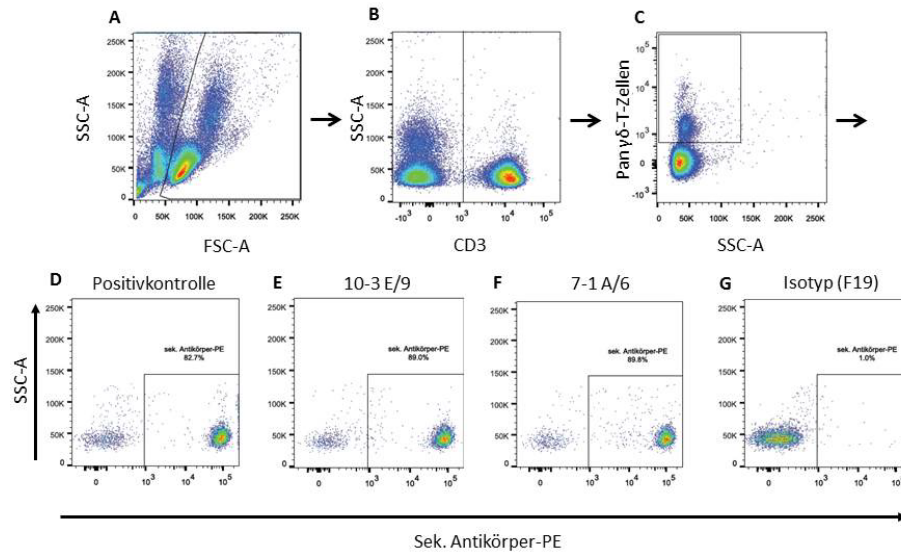


Abbildung 3.44: Bindungsspezifität der neu generierten  $\alpha$ - $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR Antikörper  
PBMCs eines gesunden Spenders wurden mit  $\alpha$ -CD45-AmCyan,  $\alpha$ -CD3-FITC,  $\alpha$ -pan  $\gamma\delta$ -T-Zellen-APC gefärbt. Lymphozyten (A) wurden anhand der SSC/FSC-Darstellung identifiziert. CD3<sup>+</sup>-Zellen wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (B). Im Folgenden wurden die  $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert (C). Als Positivkontrolle (D) wurde ein kommerzieller  $V\delta 2$ -spezifischer Mausantikörper verwendet. In den Diagrammen (E und F) wurden aufgereinigte Antikörper (10  $\mu$ g/ml) zur primären Inkubation der humanen PBMCs verwendet. Diagramm G stellt die Isotypkontrolle dar (10  $\mu$ g/ml).

Darüber, ob die Antikörper gegen die  $V\gamma 9$ - oder  $V\delta 2$ -Kette des TCRs gerichtet sind lässt sich jedoch noch keine Aussage treffen.

#### 3.4.6 Aktivierungspotenzial der generierten Antikörper

Um aus den sieben neu generierten Antikörpern den auszuwählen, welcher in einem bispezifischen Konstrukt verwendet werden sollte, wurden PBMCs isoliert und mit den unterschiedlichen monospezifischen Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) für vier Tage inkubiert und das Aktivierungspotenzial untersucht. Indem die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert wurde.

Dabei zeigte sich, dass der Antikörper 7-1 A/6 bei etwa 50 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 induzierte. Alle anderen Antikörper induzierten bei ca. 20 % der Zellen die Expression des Aktivierungsmarkers. Bei der Isotypkontrolle exprimierten etwa 10 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen CD69.

Aus diesem Grund wurde der 7-1 A/6 Antikörper zur Generierung von bispezifischen Antikörperkonstrukten verwendet.



### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor

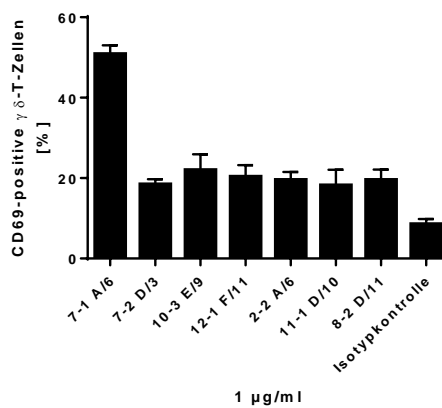


Abbildung 3.45: Aktivierungspotenzial der monospezifischen Antikörper

PBMCs wurden mit den angegebenen Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) für vier Tage inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

#### 3.4.7 Nähere Charakterisierung der Antikörperbindung (V $\gamma$ 9 vs. V $\delta$ 2)

Später wurde die Spezifität gegen V $\gamma$ 9 oder V $\delta$ 2 der generierten Antikörper untersucht. Dazu wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Antikörper mit einem V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 Klon, welcher aus PBMCs generiert wurden, durchgeführt. Dadurch konnte die Spezifität der generierten Antikörper näher untersucht werden. Diese Experimente, die Generierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellklone sowie die durchflusszytometrische Analyse der Antikörper, wurden an der Kinderklinik Tübingen von Christian Welker (AG PD Dr. Karin Schilbach) durchgeführt.

Einige exemplarische Ergebnisse sind in Abbildung 3.46 dargestellt und zeigen deutlich, dass nur der 7-1 A/6-Antikörper an den ausgewählten  $\gamma\delta$ -T-Zellklon bindet und somit spezifisch die V $\gamma$ 9-Kette des TCRs erkennt. Gleichzeitig bedeutet dies, dass alle anderen hergestellten Antikörper spezifisch gegen die V $\delta$ 2-Kette gerichtet sein müssen.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor

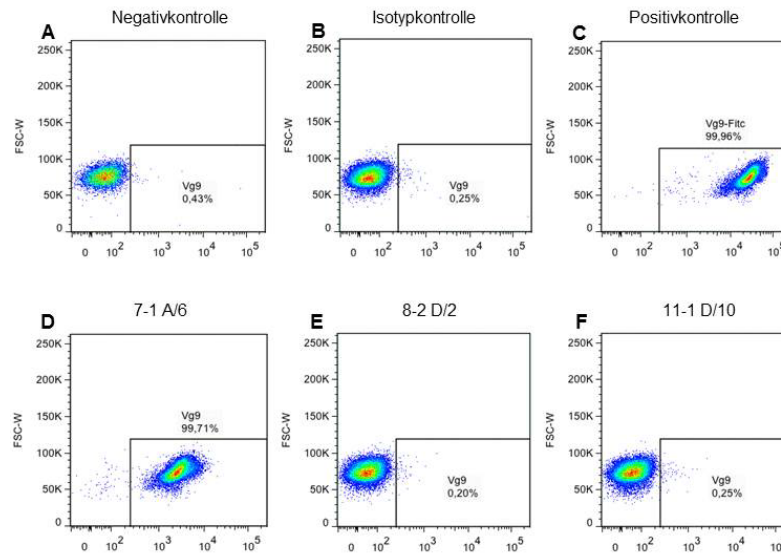


Abbildung 3.46: Bindungsnachweis der generierten Antikörper an einen V $\gamma$ 9V $\delta$ 1-TCR exprimierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellklon

Der expandierte  $\gamma\delta$ -T-Zellklon (V $\gamma$ 9V $\delta$ 1) wurde mit 5  $\mu$ g/ml der aufgereinigten Antikörper inkubiert (D, E und F). Das Diagramm (A) zeigt die Negativkontrolle, Diagramm (B) die Isotypkontrolle. Als Positivkontrolle (C) wurde ein anti-V $\delta$ 9-spezifischer (FITC markiert) Mausantikörper verwendet.

Nummer:	Klon:	Subklasse (schwere Kette)	Subklasse (leichte Kette)	Spezifität
1	7-2 D/3	IgG1	n.d.	V $\delta$ 2
2	8-2 D/11	IgG1	n.d.	V $\delta$ 2
3	12-1 F/11	IgG1	n.d.	V $\delta$ 2
4	11-1 D/10	IgG1	n.d.	V $\delta$ 2
5	10-3 E/9	IgG1	n.d.	V $\delta$ 2
6	7-1 A/6	IgG1	kappa	V $\gamma$ 9
7	2-2 A/6	IgG1	n.d.	V $\delta$ 2

Tabelle 3.3: Übersicht über die neu generierten  $\alpha$ -V $\gamma$ 9 oder  $\alpha$ -V $\delta$ 2 Antikörper

#### 3.4.8 Generierung von bispezifischen Antikörpern mit Spezifitäten für die V $\gamma$ 9-Kette des $\gamma\delta$ -TCRs (Effektorantigen) und CD19 oder PSMA (Zielantigen)

Bispezifische Antikörper für ein Zielantigen und gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR sollten eine Zielzellyse durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren, die diesen Rezeptor exprimieren. Im Folgenden wird die Generierung, Optimierung und Charakterisierung solcher bispezifischer Antikörperformate beschrieben.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

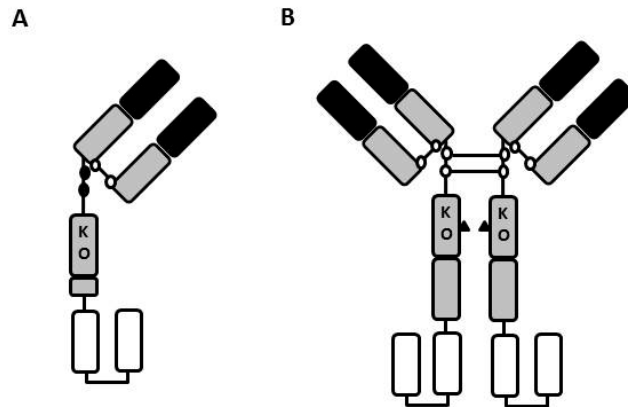


Abbildung 3.47: Schematische Übersicht über die unterschiedlichen bispezifischen Antikörperformate

In Abbildung A ist das bivalente Antikörperformat (Fabsc) dargestellt. Dieses Antikörperkonstrukt wurde mit den Zielantigenen CD19 und PSMA sowie als Effektorantigen dem  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR hergestellt. Das tetravalente bispezifische Antikörperformat (IgGsc) wurde ebenfalls mit den Zielantigenen CD19 und PSMA sowie als Effektorantigen dem  $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR generiert.

Die variablen Domänen der Zielantigene als Fab-Fragmente (CD19 oder PSMA) sind in schwarz, die variablen Domänen mit  $V\gamma 9$ -Spezifität als *single chain* in weiß und die konstanten Domänen in grau dargestellt. KO: Mutationen in der CH2-Domäne, zur Attenuierung der FC-Rezeptorbindung. ●: Cystein-Moleküle, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

- zeigen Cystein zu Serin Mutationen auf, um die Zusammenlagerung zweier Fabsc zu verhindern.
- ▲ kennzeichnen Glykosylierungsstellen.

Die Fabsc- bzw. IgGsc-Konstrukte wurden bereits in Abschnitt 3.2 näher beschrieben.

Die IgGsc-Konstrukte sind für die  $\gamma\delta$ -T-Zellrekrutierung sehr gut geeignet, da sie im Vergleich zu den Fabsc-Konstrukten eine verbesserte Halbwertszeit zeigen. Auch sollten durch die lange Halbwertszeit keine unerwarteten Nebenwirkungen, durch zum Beispiel eine Aktivierung aller T-Zellen, entstehen, da mit diesen Antikörperkonstrukten nur ein kleiner Teil der T-Zellen gebunden wird und es somit zu einer langsameren kontrollierten Aktivierung kommt.

#### 3.4.9 Klonierung, Expression und Aufreinigung der bispezifischen Antikörperformate

Die variablen Domänen ( $V_H$  und  $V_L$ ) des 7-1 A/6-Antikörpers (anti- $V\gamma 9$ -Kette) wurden von der Firma Aldevron (Freiburg, Deutschland) aus dem generierten Hybridom kloniert. Die erhaltene Sequenz wurde daraufhin von der Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) als *single chain* in beiden Orientierungen  $V_H-V_L$  und  $V_L-V_H$  *de novo* synthetisiert und im Labor in verfügbare, etablierte Vektoren, über die Restriktionsschnittstellen BspEI und SpeI in das Fabsc- oder das IgGsc-Format, kloniert. Die variablen Domänen der  $\alpha$ -CD19 und  $\alpha$ -PSMA wurden von Dr. Ludger Große-Hovest aus kommerziell erhältlichen Hybridomen ( $\alpha$ -CD19:4G7  $V_H$ : CAD88275.1  $V_L$ : CAD88204.1 und  $\alpha$ -PSMA:J591  $V_H$ : CCA78124.1  $V_L$ : CCA78125.1) isoliert und über die Restriktionsschnittstellen ClaI und AatII in die Expressionsvektoren für die bispezifischen Antikörper kloniert. Die variable Domäne der leichten Kette der Zielantigene wurde in einen weiteren Expressionsvektor, über die Restriktionsschnittstellen SpeI und XhoI, kloniert.

Die Expressionsvektoren für die bispezifischen Antikörper wurden zusammen mit dem äquivalenten Expressionsvektor für die leichte Kette, welcher abhängig vom Zielantigen ist,

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor

mittels Elektroporation in Sp2/0-Ag-14 Zellen transfiziert. Stabile Antikörper-sezernierende Transfektanten wurden mittels Durchflusszytometrie identifiziert und expandiert. Die produzierten bispezifischen Antikörper wurden schließlich über eine kappaSelect-Säule aufgereinigt.

#### 3.4.10 Proteinbiochemische Charakterisierung der bispezifischen Antikörperkonstrukte

Zuallererst wurden die aufgereinigten Proteine bezüglich Homogenität und Aggregation mittels Größenausschlusschromatographie untersucht.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.48 dargestellt.

Die IgGsc-Formate mit der Zielspezifität  $\alpha$ -CD19 zeigen einen distinkten Peak, wobei die Retentionszeit bei allen Konstrukten ungefähr 25 min beträgt. Die IgGsc-Formate mit PSMA-Spezifität zeigen einen Hauptpeak und einen kleinen Vorpeak. Der Hauptpeak hat eine Retentionszeit von 30 min, was einer Größe von ca. 200 kDa entspricht, und der Vorpeak deutet auf höhermolekulare Aggregate hin.

Die Größenausschlusschromatographie der Fabsc-Formate zeigen im Vergleich zu den IgGsc-Formaten alle zwei distinkte Peaks mit einer Retentionszeit von 22 und 26 min. Wobei der zweite Peak der erwarteten Größe von ca. 90 kDa entspricht. Der erste Peak repräsentiert höhermolekulare Moleküle, welche möglicherweise Dimere ( $\sim$  200 kDa) darstellen.

Die Fabsc-Formate mit der Spezifität für  $\alpha$ -PSMA zeigen im Vergleich zu den Fabsc-Formaten mit der Spezifität  $\alpha$ -CD19 einen höheren Anteil an dem Dimer-Peak.

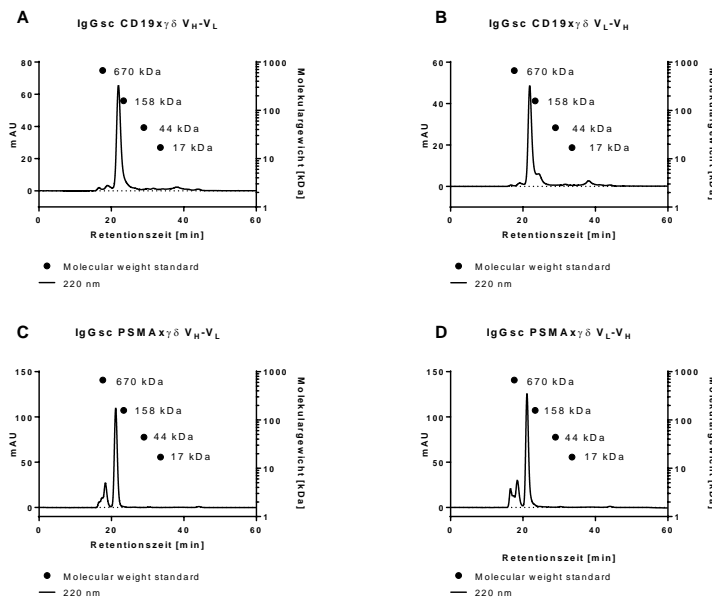


Abbildung 3.48: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen IgGsc-Konstrukte

Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine CD19xy $\delta$ -V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (A), CD19xy $\delta$ -V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> (B), PSMAxy $\delta$ -V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (C) und PSMAxy $\delta$ -V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> (D). Die aufgetragene Proteinmenge betrug zwischen 5-10  $\mu$ g.

Auf der Abszisse ist die Retentionszeit des eluierten Proteins aufgetragen, die Menge des Proteins wird durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 220 nm angegeben (linke Ordinate). Die rechte Ordinate beschreibt das Molekulargewicht der unterschiedlichen Eichproteine (●) anhand deren Retentionszeiten.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

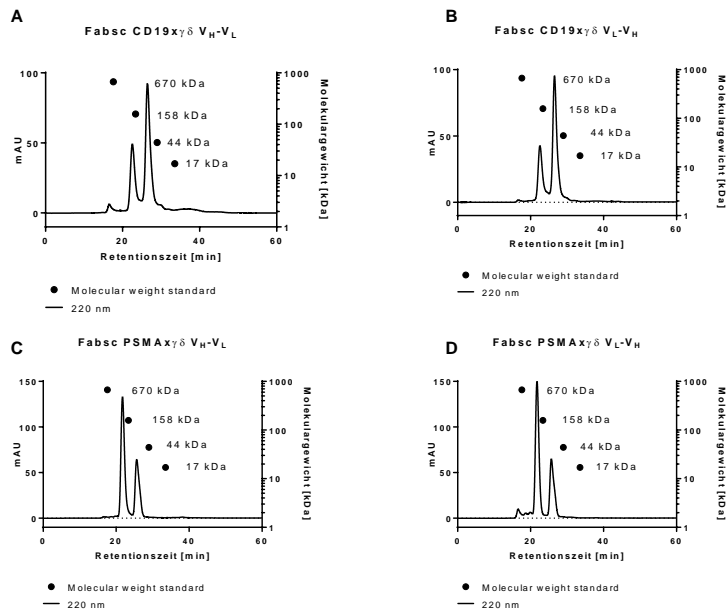


Abbildung 3.49: Analytische Chromatographie der unterschiedlichen Fabsc-Konstrukte

Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine  $CD19x\gamma\delta-V_H-V_L$  (A),  $CD19x\gamma\delta-V_L-V_H$  (B),  $PSMAx\gamma\delta-V_H-V_L$  (C) und  $PSMAx\gamma\delta-V_L-V_H$  (D). Die aufgetragene Proteinmenge betrug etwa 5-10  $\mu$ g.

Auf der Abszisse ist die Retentionszeit des eluierten Proteins aufgetragen, die Menge des Proteins wird durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 220 nm angegeben (linke Ordinate). Die rechte Ordinate beschreibt das Molekulargewicht der unterschiedlichen Eichproteine (●) anhand deren Retentionszeiten.

Im Rahmen der proteinbiochemischen Charakterisierung der neu generierten bispezifischen Antikörper wurde des Weiteren eine elektropoetische Trennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) unter reduzierten und nicht-reduzierten Bedingungen durchgeführt.

Anhand der Aminosäuresequenz ließ sich die Größe der unterschiedlichen bispezifischen Antikörperkonstrukte bestimmen. Die errechnete Größe für die Fabsc-Konstrukte beträgt etwa 90 kDa und für die IgGsc-Konstrukte etwa 200 kDa.

In Abbildung 3.50B, unter nicht-reduzierten Bedingungen, konnte eine distinkte Bande für alle Fabsc-Konstrukte bei der erwarteten Größe ( $\sim 90$  kDa) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten zusätzliche Banden bei einer Größe von  $\sim 64$  kDa und 22 kDa detektiert werden. Bei diesen Banden handelt es sich um freie schwere und leichte Ketten der Fabsc-Konstrukte.

In Abbildung 3.50A sind die analogen Ergebnisse der Fabsc-Konstrukte unter reduzierten Bedingungen dargestellt. Hier lassen sich zwei distinkte Proteinbanden erkennen, welche mit den errechneten Größen für die leichte (25 kDa) bzw. der schweren Kette (80 kDa) übereinstimmen.

Wie aus Abbildung 3.51A hervorgeht, konnten unter nicht-reduzierten Bedingungen auch die erwarteten Molekulargewichte der IgGsc-Konstrukte, bei etwa 200 kDa, belegt werden. Unter reduzierten Bedingungen (Abbildung 3.51B) sind zwei distinkte Proteinbanden zu erkennen, welche die leichte und die schwere Kette des Proteins repräsentieren.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor

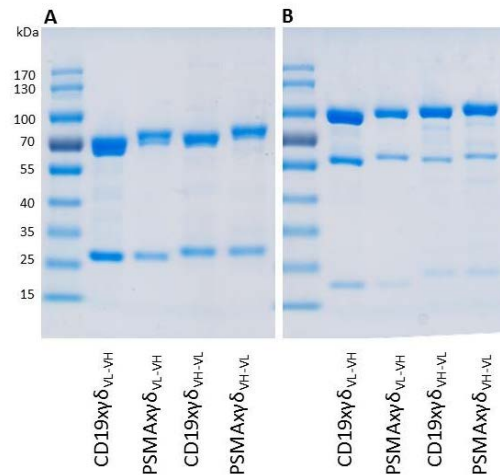


Abbildung 3.50: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen Fabsc Antikörperkonstrukte 2  $\mu$ g der unterschiedlichen Proteine wurden unter reduzierten (A) und nicht-reduzierten (B) Bedingungen auf 10 % Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Roti®-Blue (Roth) mit anschließender Entfärbung der Gele mit Hilfe von bidest. H<sub>2</sub>O. Des Weiteren ist ein Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) als Vergleich mit aufgetragen.

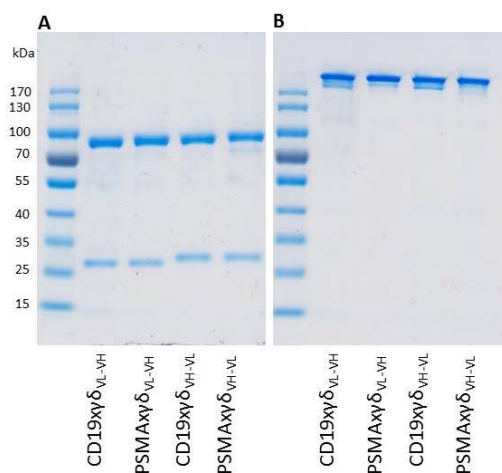


Abbildung 3.51: Gelelektrophoretische Analyse der bispezifischen IgGsc Antikörperkonstrukte 2  $\mu$ g der unterschiedlichen Proteine wurden unter nicht-reduzierten (A) und reduzierten (B) Bedingungen auf 10 % Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Roti®-Blue (Roth) mit anschließender Entfärbung der Gele mit Hilfe von bidest. H<sub>2</sub>O. Des Weiteren ist ein Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) als Vergleich mit aufgetragen.

#### 3.4.11 Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Moleküle an den $\gamma\delta$ -TCR, CD19 und PSMA

Die Bindung an CD19, PSMA und  $\gamma\delta$ -TCR wurde unter Verwendung der CD19<sup>+</sup> Zelllinie NALM-16 bzw. der PSMA<sup>+</sup> Zelllinie 22RV1 und aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Ein repräsentatives Ergebnis dieser Analysen ist in den Abbildungen 3.52A und 3.52B dargestellt. Es zeigt eine Antikörper-vermittelte Bindung an die verwendeten Zielzellen. Die

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

Unterschiede der maximalen mittleren Fluoreszenzintensität zwischen Fabsc- und IgGsc-Konstrukten ist durch die unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen und durch den sekundär verwendenden fluoreszenz-markierten Antikörper zu erklären.

Die Abbildung 3.52A zeigt die Bindung der Fabsc-Konstrukte an expandierte, aufgereinigte  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Alle Fabsc-Konstrukte zeigen eine vergleichbare Bindung an den  $\gamma\delta$ -TCR.

Die Abbildung 3.52B zeigt die Bindung der IgGsc-Konstrukte an expandierte, aufgereinigte  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dabei zeigte sich, dass die IgGsc-Konstrukte eine vergleichbare Affinität zu  $\gamma\delta$ -T-Zellen aufwiesen. Jedoch ist das maximale Fluoreszenzsignal für bispezifische Antikörper mit der PSMA-Spezifität niedriger. Des Weiteren kann erkannt werden, dass die Affinität des anti- $V\gamma 9$  *single chains* im Vergleich zum monoklonalen Antikörper (vgl. Abbildung 3.43) nahezu identisch ist.

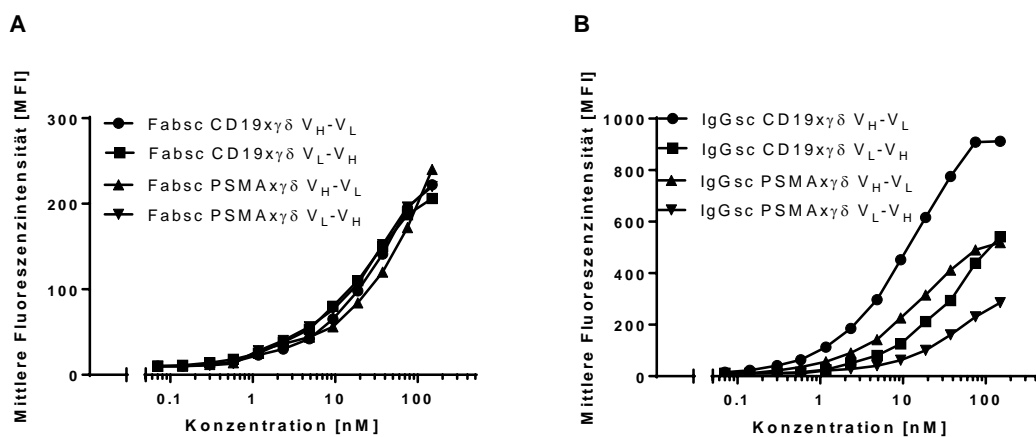


Abbildung 3.52: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Fabsc- und IgGsc-Konstrukte an den  $\gamma\delta$ -TCR

$\gamma\delta$ -T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Fabsc- (A) oder der IgGsc-Konstrukte (B) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen.

Die Abbildung 3.53 zeigt, dass die Fabsc- wie auch die IgGsc-Konstrukte mit einer vergleichbaren hohen Affinität, konzentrationsabhängig an das jeweilige Zielantigen binden.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ -T-Zellrezeptor

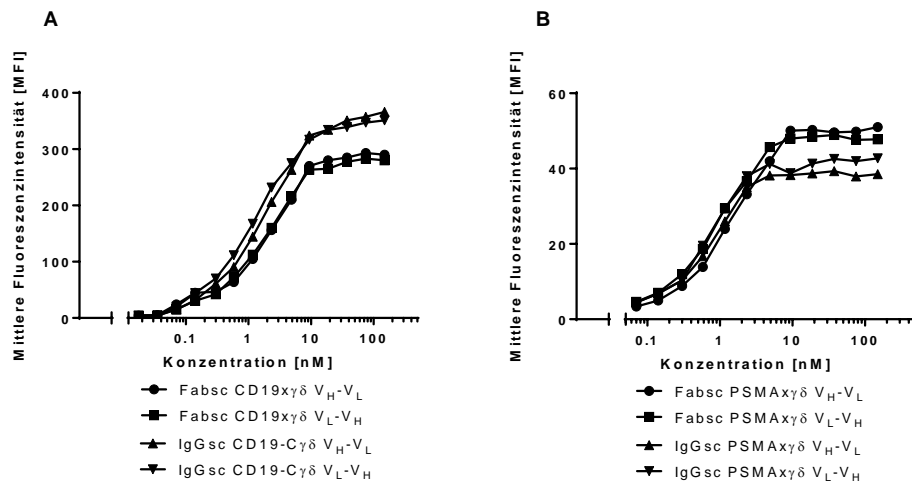


Abbildung 3.53: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Fabsc- und IgGsc-Konstrukte an PSMA bzw. CD19 NALM-16- (A) und 22RV1-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Fabsc- oder der IgGsc-Konstrukte inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen.

#### 3.4.12 *Ex vivo* Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Einem gesunden Spender wurde Blut entnommen und PBMCs isoliert. Die isolierten PBMCs wurden daraufhin für 13 Tage mittels IL-2 (100U/ml) und Zoledronsäure (400nM) stimuliert, expandiert und mit Hilfe des TCR $\gamma/\delta$ + T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) aufgereinigt.

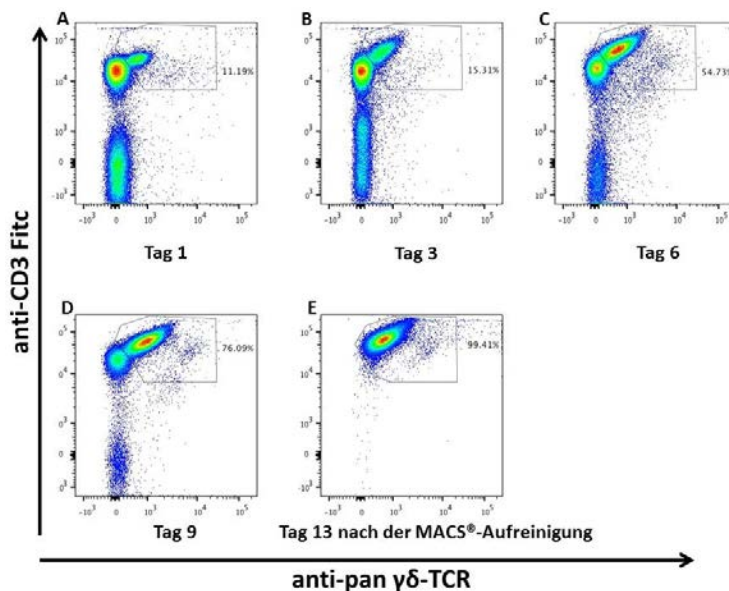


Abbildung 3.54: Expansion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels IL-2 und Zoledronsäure

An Tag 1, 3, 6, 9 und 13 wurde jeweils eine Probe entnommen, um die spezifische Expansion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu analysieren. Die Lymphozyten wurden mit anti-CD45-AmCyan, anti-CD3-FITC und anti-pan  $\gamma\delta$ -T-Zellen-PE gefärbt und anschließend die Vitalität mittels 7AAD bestimmt. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen bezogen auf alle CD45<sup>+</sup>-Zellen an.

Die expandierten und aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen konnten anschließend für durchflusszytometrische Analysen oder funktionelle Lyseexperimente benutzt werden.



### 3.4.13 Tumorzelllyse durch bispezifische Antikörper und prä-aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen

Um die generierten bispezifischen Moleküle funktionell zu charakterisieren, wurde zunächst ein Impedanzexperiment mit CD19 transfizierten MCF-7-Zellen durchgeführt.

Dabei wurde deutlich, dass die  $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels der bispezifischen Antikörperkonstrukte zu einer Tumorzelllyse führen. Unter der Verwendung von prä-aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist kein Unterschied bezüglich der Tumorzelllyse zwischen den *single chain* Orientierungen zu erkennen.

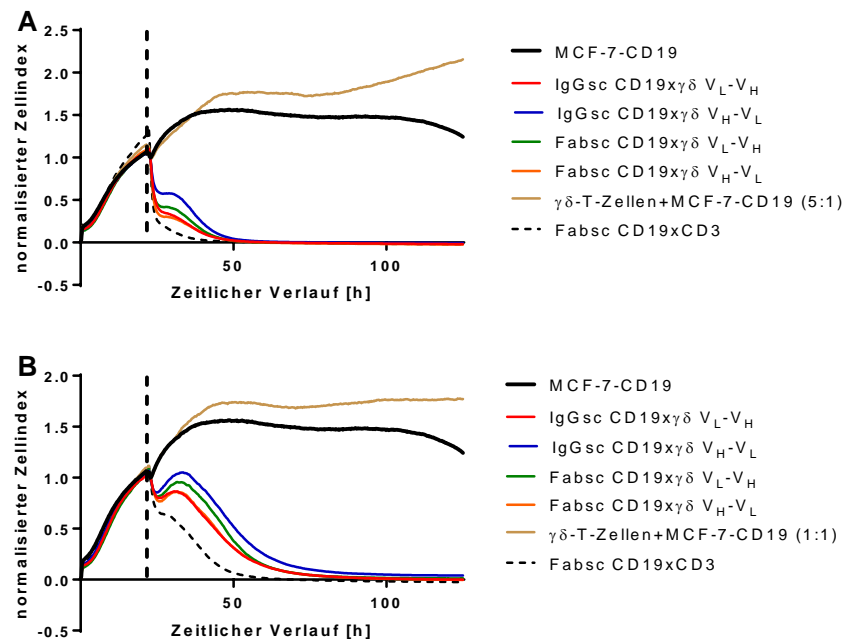


Abbildung 3.55: Antikörper-vermittelte Zytotoxizität der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte unter Verwendung von prä-aktivierten und aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die Tumorzelllyse wurde mittels Impedanzmessung analysiert. Nach einer Anwachphase der Tumorzellen (MCF-7-CD19) von  $\sim 24$  h wurden prä-aktivierte und aufgereinigte  $\gamma\delta$ -T-Zellen eines gesunden Spenders und die verschiedenen Antikörperkonstrukte in einer Konzentration von 10 nM hinzugegeben (--). Das Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen betrug 5:1 (A) und 1:1 (B). Der Zellindex, welcher zugleich die Vitalität der Tumorzellen beschreibt, wurde kontinuierlich alle 15 min gemessen. Die dargestellten Messdaten repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten. Dargestellt ist ein charakteristisches Ergebnis von zwei Experimenten.

### 3.4.14 Depletion von autologen B-Zellen durch bispezifische Antikörper und prä-aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen

In diesem Versuch sollte eine autologe B-Zelllyse durch bispezifische Antikörper und autologe prä-aktivierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen induziert werden. Dazu wurde einem gesunden Spender Blut entnommen, PBMCs isoliert und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels Il-2 und Zoledronsäure für 13 Tage expandiert und anschließend aufgereinigt. Am selben Tag wurde dem gesunden Spender erneut Blut abgenommen und PBMCs isoliert.

Daraufhin wurde für zwei Tage eine Kokultur aus den frisch isolierten PBMCs ( $5 \times 10^5$ ), den aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) und bispezifischen Antikörperkonstrukten angesetzt. In diesem Fall dienten die CD19-exprimierenden B-Zellen als Zielzellen und wurden über das Oberflächenantigen CD20 identifiziert.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

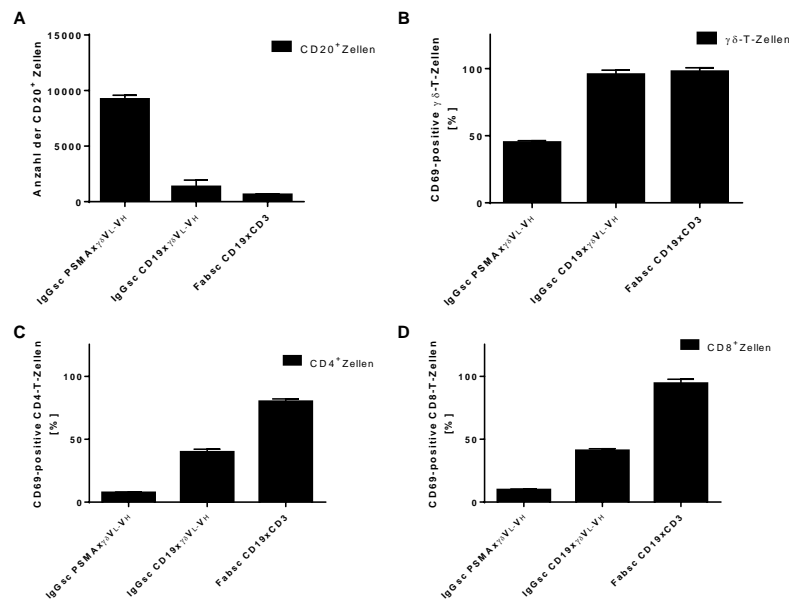


Abbildung 3.56: Lyse autologer CD19<sup>+</sup> Zellen durch die Zugabe aktivierter, expandierter und aufgereinigter  $\gamma\delta$ -T-Zellen

PBMCs und aktivierte, expandierte und aufgereinigte  $\gamma\delta$ -T-Zellen (PBMCs: $\gamma\delta$ -T-Zellen 5:1) eines gesunden Spenders wurden für 48 Stunden mit den Antikörpern IgGsc CD19 $\times\gamma\delta V_L V_H$ , IgGsc PSMA $\times\gamma\delta V_L V_H$  und Fabsc CD19 $\times$ CD3 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der CD20<sup>+</sup> Zellen (A), der aktivierten  $\gamma\delta$ -T- (B), CD4<sup>+</sup>- (C) und CD8<sup>+</sup>-Zellen (D), relativ zur Isotypkontrolle (PSMA $\times\gamma\delta V_L V_H$ ). Die Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

Die Inkubation der frisch isolierten PBMCs mit den aufgereinigten  $\gamma\delta$ -T-Zellen und dem bispezifischen Antikörperkonstrukt IgGsc CD19 $\times\gamma 9V\delta 2 V_L V_H$  resultierte in einer vermehrten Aktivierung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen (90 % der  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimierten CD69, wobei bei der Isotypkontrolle (PSMA $\times\gamma\delta V_L V_H$ ) nur etwa 40 % diesen Aktivierungsmarker exprimierten). Auch führte dieses Antikörperkonstrukt zu einer Aktivierung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (ca. 50 % der Zellen CD69<sup>+</sup> im Vergleich zur Isotypkontrolle etwa 3 % CD69<sup>+</sup>).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch das IgGsc CD19 $\times\gamma 9V\delta 2 V_L V_H$  Antikörperkonstrukt zu einer signifikanten Reduktion der CD20<sup>+</sup>-Zellen kam, ähnlich der Positivkontrolle Fabsc CD19 $\times$ CD3, siehe Abbildung 3.56.

#### 3.4.15 Tumorzellyse nach Aktivierung ruhender $\gamma\delta$ -T-Zellen durch bispezifische Antikörper

Im Anschluss sollte geklärt werden, ob nicht nur die Lyse durch prä-aktivierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen, sondern auch die Aktivierung ruhender  $\gamma\delta$ -T-Zellen in PBMC-Präparationen mit anschließender Lyse vermittelt werden kann. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs ( $5 \times 10^5$ ) mit NALM-16-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) und den bispezifischen Antikörperkonstrukten für drei Tage inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Die Zellzahl von bestimmten Zellpopulationen wurde unter der Verwendung von nicht-reaktiven Beads quantitativ bestimmt.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $\gamma\delta$ 9V $\delta$ 2-T-Zellrezeptor

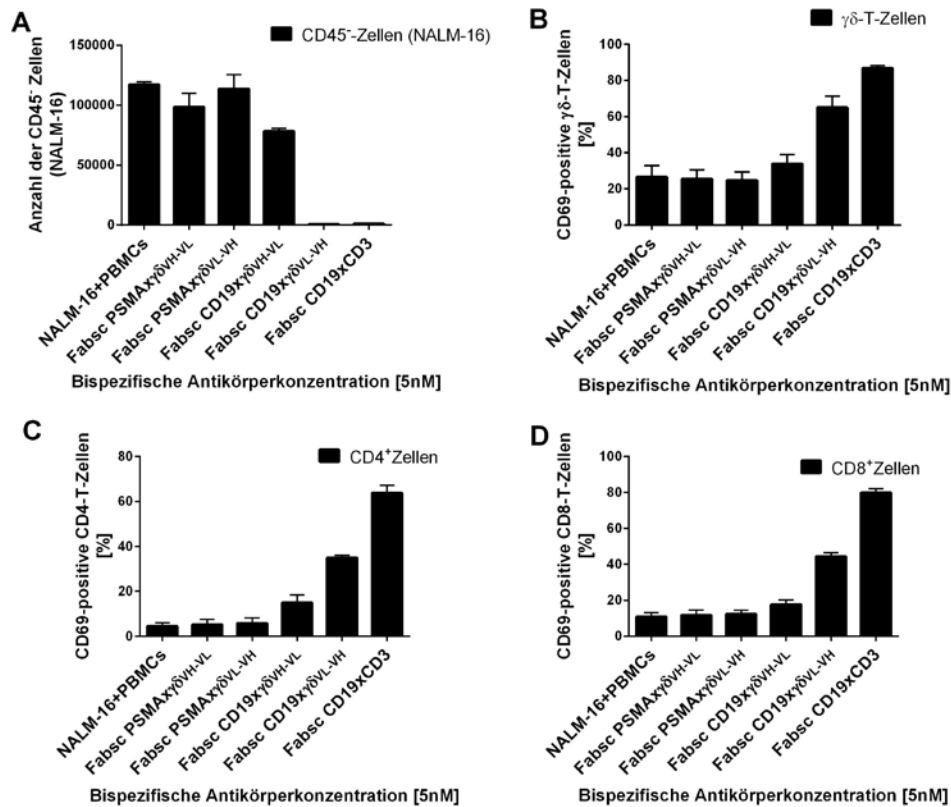


Abbildung 3.57: Lyse CD19<sup>+</sup> NALM-16-Zellen durch die Zugabe frisch isolierter allogener PBMCs. PBMCs und NALM-16-Zellen (5:1) wurden für vier Tage zusammen mit den bispezifischen Antikörperkonstrukten (Fabsc) bzw. ohne Antikörper inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der NALM-16-Zellen (A), der aktivierten  $\gamma\delta$ -T- (B), CD4<sup>+</sup>- (C) und CD8<sup>+</sup>-Zellen (D), relativ zur Isotypkontrolle. Die dargestellten Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

In der Abbildung 3.57 ist die Anzahl der NALM-16-Zellen dargestellt. Die Inkubation der Kokultur, bestehend aus frisch isolierten PBMCs und NALM-16-Zellen, führte dazu, dass nur das Fabsc-Konstrukt CD19x $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> NALM-Zellen eliminiert, obwohl die Avidität der Konstrukte vergleichbar ist. Das Konstrukt Fabsc CD19x $\gamma\delta$ V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> konnte keine Reduktion der NALM-16-Zellen induzieren. Als Positivkontrolle wurde das Fabsc-Konstrukt CD19xCD3 und als Negativkontrolle die Fabsc-Konstrukte PSMAx $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> und PSMAx $\gamma\delta$ V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>, welche als Zielzellantigen die Spezifität für PSMA enthielten, benutzt.

Des Weiteren führte das Fabsc CD19x $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> Konstrukt auch mit frisch isolierten PBMCs zu einer Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ebenfalls auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen.

Das Fabsc CD19x $\gamma\delta$ V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> war nur marginal in der Lage die Expression des Aktivierungsmarker CD69 zu induzieren.

Anschließend wurden die neu generierten IgG-Konstrukte zunächst einmal mit den Fabsc-Konstrukten funktionell verglichen. Dazu wurden, wie oben bereits beschrieben, frische PBMCs ( $5 \times 10^5$ ) mit NALM-16-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) und den bispezifischen Antikörpern für vier Tage inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert und quantifiziert.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

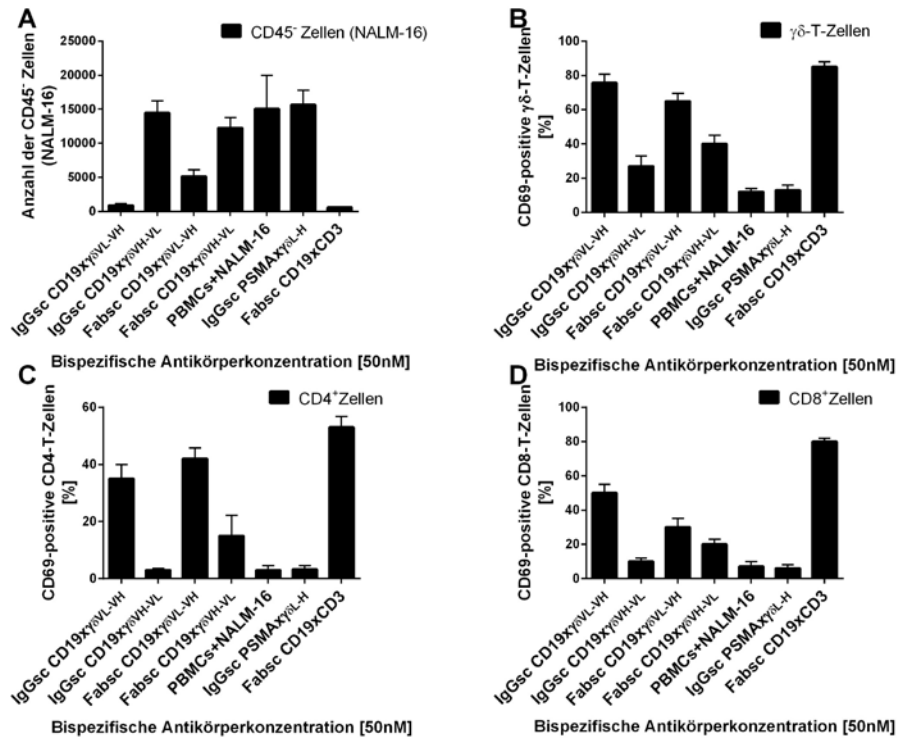


Abbildung 3.58: Lyse CD19<sup>+</sup> NALM-16-Zellen durch die Zugabe frisch isolierter allogener PBMCs. PBMCs und NALM-16-Zellen wurden für vier Tage zusammen mit den bispezifischen Antikörperkonstrukten (IgGsc und Fabsc) bzw. ohne Antikörper inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der NALM-16-Zellen (A), der aktivierten  $\gamma\delta$ -T- (B), CD4<sup>+</sup>- (C) und CD8<sup>+</sup>-Zellen (D), relativ zur Isotypkontrolle (PSMAx $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>). Die Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der CD45-Zellen (NALM-16-Zellen) der Kokultur sind in Abbildung 3.58 dargestellt. Dabei wurde festgestellt, dass nur die Konstrukte mit der V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Orientierung des *single chains* eine effektive NALM-16 Lyse induzierten. Des Weiteren konnte eine etwas bessere Tumorzelllyse durch das IgGsc CD19x $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Konstrukt beobachtet werden. Dabei war die Effektivität der Tumorzelllyse mit der Positivkontrolle (Fabsc CD19xCD3) vergleichbar.

Des Weiteren führte das Fabsc wie auch das IgGsc CD19x $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Konstrukt mit frisch isolierten PBMCs zu einer Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ebenfalls auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen.

Im Folgenden wurde versucht, ob die bispezifischen Antikörper auch im autologen System eine effiziente Aktivierung und nachfolgende Lyse vermitteln können. Dabei wurden die CD19-exprimierenden Zellen (B-Zellen) als Zielzellen angesehen, welche mittels des B-Zellmarkers CD20 identifiziert werden konnten, und die natürlich vorkommenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen als Effektorzellen verwendet.

Dafür wurden frisch isolierte PBMCs ( $5 \times 10^5$ ) für vier Tage mit den bispezifischen Antikörperkonstrukten inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert und quantifiziert.

Die bispezifischen Antikörperkonstrukte CD19x $\gamma\delta$  konnten, unabhängig von der *single chain* Orientierung zu einer Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen führen. Das CD19x $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-Konstrukt induzierte ebenfalls bei ca. 50 % der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen die Expression des Aktivierungsmarkers CD69.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

Jedoch konnte bei diesem Experiment keine Reduktion der B-Zellen (CD20<sup>+</sup>-Zellen) festgestellt werden.

Demnach wurde das Experiment wiederholt und teilweise rekombinantes IL-2 (10ng/ml) hinzugegeben, um die  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu aktivieren und dadurch eine bispezifische Antikörpervermittelte Lyse der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) zu induzieren.

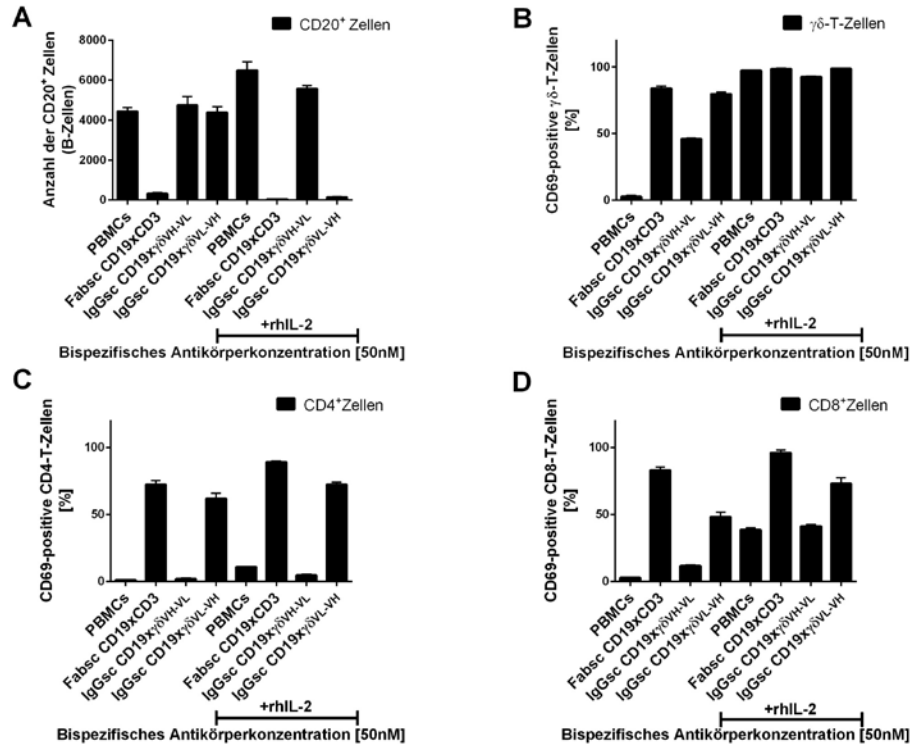


Abbildung 3.59: Lyse CD19<sup>+</sup> B-Zellen durch autologe PBMCs *ex vivo*

Frisch isolierte PBMCs wurden für vier Tage zusammen mit den bispezifischen Antikörperkonstrukten mit und ohne rekombinantes IL-2 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der CD20<sup>+</sup>-Zellen (A), der aktivierten  $\gamma\delta$ -T- (B), CD4<sup>+</sup>- (C) und CD8<sup>+</sup>-Zellen (D). Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten. Die dargestellten Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

PBMCs mit dem bispezifischen Antikörper IgGsc CD19x $\gamma\delta$ V<sub>L</sub>V<sub>H</sub> resultierte in keiner Eliminierung der B-Zellen. Die Zugabe von rhIL-2 führte zu einer spezifischen bispezifischen Antikörpervermittelten Lyse der B-Zellen, welche über das CD20-Antigen identifiziert wurden.

Im Weiteren wurde mit derselben Anordnung untersucht, ob auch rhIL-15, welches bei der klinischen systemischen Anwendung möglicherweise zu weniger gravierenden Nebenwirkungen führt, ebenfalls zu einer Eliminierung der B-Zellen beiträgt. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 3.60 dargestellt und zeigen, dass sowohl rhIL-2 als auch rhIL-15 in Kombination mit bispezifischen Antikörpern eine spezifische Reduktion der B-Zellen induzieren. Keine Reduktion konnte durch die Isotypkontrolle IgGsc PSMAx $\gamma\delta$ V<sub>H</sub>V<sub>L</sub> alleine oder in Kombination mit Zytokinen (rhIL-2 oder rhIL-15) induziert werden. Als Positivkontrolle wurde das bispezifische Antikörperkonstrukt Fabsc CD19xCD3 verwendet, welches bei allen Proben zu einer Lyse der B-Zellen führte.

### 3.4 Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellrezeptor

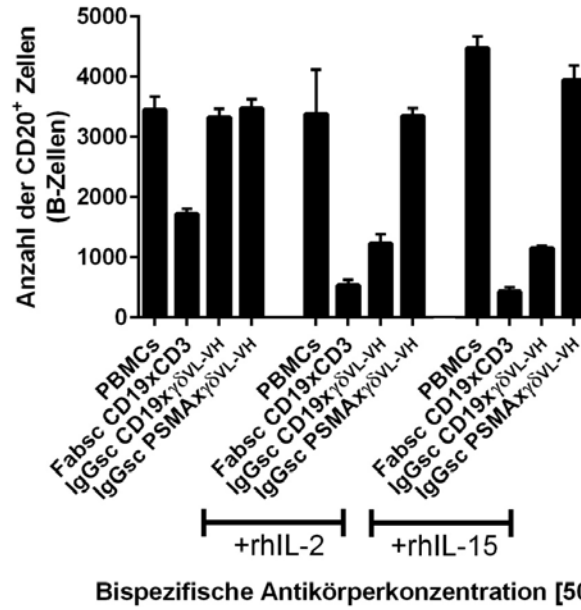


Abbildung 3.60: Lyse CD19<sup>+</sup> B-Zellen *ex vivo* durch autologe PBMCs in Kombination mit Zytokinen

Frisch isolierte PBMCs eines gesunden Spenders wurden für vier Tage zusammen mit den bispezifischen Antikörperkonstrukten und zusätzlich mit rekombinantem IL-2 oder IL-15 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der CD20<sup>+</sup> Zellen (B-Zellen). Die dargestellten Fehlerbalken zeigen Abweichungen innerhalb von Triplikaten.

# 4 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Generierung, Optimierung und Charakterisierung von rekombinanten (bispezifischen) Antikörperkonstrukten zur Rekrutierung und spezifischen Aktivierung von T-Zellen gegen Tumorzellen. Die Optimierung bezieht sich auf alle drei wesentlichen Charakteristika eines bispezifischen Antikörpers (i) Zielspezifität, (ii) Effektorspezifität und (iii) Format.

In den ersten beiden Teilen ist die Generierung neuer Antikörper gegen CDCP1 und PSMA beschrieben, die beide als Zielantigen besonders geeignet erscheinen. CDCP1, weil es die Metastasierung begünstigen kann. PSMA, weil es nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf Gefäßzellen innerhalb von Tumoren exprimiert ist. Da neuere Ergebnisse gezeigt haben, dass die Spezifität von CDCP1 beschränkt ist, wurde im zweiten Teil lediglich der neu generierte PSMA Antikörper zur Konstruktion von bispezifischen Antikörpern in verschiedenen Formaten verwendet.

Der letzte Teil beschreibt die Generierung von neuen Antikörpern gegen den  $\gamma\delta$ -TCR und die Charakterisierung und Optimierung dieser Antikörper in einem bispezifischen Antikörperkonstrukt zur Rekrutierung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen.

## 4.1 Generierung von neuen $\alpha$ -CDCP1 (CD318) monoklonalen Antikörpern zur Therapie von Krebserkrankungen

Nahezu 90 % der Todesfälle durch solide Tumore werden durch Metastasen verursacht. Das Transmembranprotein CDCP1 (CD318) wurde in einer Vielzahl von soliden Tumoren wie auch Leukämien identifiziert [171]. Des Weiteren ist beschrieben, dass die CDCP1-Expression auf malignen Zellen mit dem Proliferationspotenzial bei Brustkrebszellen korreliert. Außerdem scheint eine hohe CDCP1-Expression bei Adenokarzinomen der Lunge mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen zu korrelieren [174]. Ein Zusammenhang zwischen CDCP1-Expression und einer schlechteren Prognose, höherer Rückfallrate und eine Abhängigkeit von DFS (engl.: *disease free survival*) und OS (engl.: *overall survival*) wurde ebenfalls beschrieben. In Mausmodellen konnte eine Reduktion von Metastasen durch monoklonale Antikörper gegen CDCP1 beschrieben werden [178]. Um eine mögliche Behandlung mit eigenen monoklonalen Antikörpern zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit CDCP1-spezifische monoklonale Antikörper, auch mit der Vorstellung dadurch den Prozess der Metastasierung beeinflussen zu können generiert.

Wie bereits erwähnt, war es in früheren Arbeiten nicht möglich CDCP1 spezifischen Antikörpertiter in den immunisierten Mäusen (BALB/c) nachzuweisen, was wahrscheinlich daran liegt, dass das murine CDCP1 dem humanen Molekül zu ähnlich ist, wodurch das exprimierte humane CDCP1 auf den syngeneten Sp2/0-Zellen nicht als fremd erkannt wird und keine Immunreaktion induziert werden kann. Für diese Hypothese spricht, dass nur die CDCP1-defizienten Mäuse, welche in dieser Arbeit mit den Sp2/0-CDCP1-Zellen immunisiert wurden, einen deutlichen spezifischen Antikörpertiter gegen CDCP1 im Serum aufwiesen.

Es konnten zwei Hybridome generiert werden, wobei sich deren weitere Charakterisierung auf die Produktion, Aufreinigung, Bindungsanalyse auf CDCP1<sup>+</sup> Tumorzellen und das

#### 4.1 Generierung von neuen -CDCP1 (CD318) monoklonalen Antikörpern zur Therapie von Krebserkrankungen

Modulationsverhalten des CDCP1-Proteins nach Antikörperbindung beschränkte, da genauere Untersuchungen daraufhin deuteten, dass CDCP1 auch im erheblichen Maß auf „Normalgeweben“ exprimiert ist.

Die Bindungsanalyse zeigte ein sehr einheitliches Bild. So binden die zwei neu generierten Antikörper (8-3 und 9-2) und der kommerziell erhältliche CUB1 mit einer vergleichbaren Affinität an CDCP1.

Auch bei der Modulationsanalyse nach Antikörperbindung sind sehr ähnliche Ergebnisse zwischen den Antikörpern zu erkennen. Jedoch führt der CUB1-Antikörper zu einem etwas geringeren Verlust der CDCP1 Oberflächenexpression als die beiden neu generierten Antikörper. Die Modulation des CDCP1-Proteins induziert, höchstwahrscheinlich als Resultat der Antikörperbindung, eine Internalisierung des Proteins. Dieses Phänomen wurde im Zusammenhang mit der Wirksamkeit der CD20-spezifischen Antikörper Rituximab und Tositumomab beschrieben. Im Zusammenhang mit diesen ADCC-vermittelnden  $\alpha$ -CD20-Antikörpern bedingt das Verschwinden des Antigens von der Zelloberfläche eine verminderte therapeutische Wirkung [187].

Die Internalisierung des Antigens kann aber auch erwünscht sein, nämlich z. B. bei der Konstruktion von sogenannte ADCs (engl.: *Antibody drug conjugates*, z.B. Gemtuzumab Ozogamicin Mylotarg®, produziert von Pfizer). Dabei wird ein Zellgift an den Antikörper gekoppelt, welches erst durch die Internalisierung des Antikörper-Antigen-Komplexes in das Innere der Zelle transportiert wird, wo es enzymatisch abgespalten und dadurch aktiviert wird. Ob solche ADCs oder monoklonale bzw. bispezifische Antikörperkonstrukte als Immuntherapie mit dem Zielantigen CDCP1, Tumore eliminieren oder die Metastasierung verhindern können, müssen in Zukunft weitere Experimente zeigen. In diesem Fall ist mit der Generierung der beschriebenen Antikörper eine zusätzliche Option geschaffen worden. Bei der Bewertung verschiedener Strategien zur „Bewaffnung“ von CDCP1 Antikörpern wird in jedem Fall auch die begrenzte Spezifität dieses Antigens für maligne Zellen zu berücksichtigen sein.

Bei der hohen Anforderung an die Spezifität, insbesondere im Kontext mit bispezifischen Antikörpern, welche über CD3 T-Zellen rekrutieren, und der immunhistologischen nachgewiesenen Expression von CDCP1 auf mehreren gesunden Geweben, wäre es möglicherweise besser CD16 als Effektorantigen CD3 vorzuziehen, um NK-Zellen zu rekrutieren. Diese sind, wie im Folgenden noch diskutiert wird, den T-Zellen zwar was die Antitumoraktivität angeht unterlegen, führen aber auch nicht zu potenziell bedrohlichen Nebenwirkungen, wie das Zytokinfreisetzungssyndroms.



## 4.2 Generierung von optimierten, monospezifischen und bispezifischen Fabsc Antikörpern gegen PSMA

Im Gegensatz zu hämatologischen Krebserkrankungen, bei denen sich Ziel- und Effektorzellen in räumlicher Nähe befinden, ist die Behandlung von soliden Tumoren eine größere Herausforderung, da die Effektorzellen zuerst zum Tumor rekrutiert werden müssen und der Antikörper in das umliegende Gewebe penetrieren muss.

Eine alternative Therapiemöglichkeit zur direkten Antikörper-vermittelten Tumorzelllyse stellt die Zerstörung der tumorversorgenden Blutgefäße dar. Da das Antigen PSMA auf tumorversorgenden Blutgefäßen, wie auch auf den Tumorzellen des Prostatakarzinoms exprimiert ist, stellt es ein besonders geeignetes Zielantigen für eine Antikörper basierte Immuntherapie dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgehend von dem etablierten  $\alpha$ -PSMA Antikörperklon J591 ein chimärer monoklonaler Antikörper, ein chimärer optimierter monoklonaler Antikörper (SDIE-Modifikation) und zwei bispezifische Antikörper im Fabsc-Format, einer zur Rekrutierung von CD16<sup>+</sup>-Zellen (hauptsächlich NK-Zellen) und der andere zur Rekrutierung von T-Zellen (via  $\alpha$ -CD3), hergestellt. Ziel war zunächst der direkte Vergleich aller generierten Konstrukte hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität.

In einem <sup>51</sup>Chromfreisetzungsexperiment konnte gezeigt werden, dass das bispezifische Fabsc-Konstrukt PSMAxCD16 die Tumorzellen nach vier Stunden am effektivsten lysierte. Nach 20 Stunden war jedoch das bispezifische Fabsc-Konstrukt PSMAxCD3 am effektivsten. Dies liegt möglicherweise daran, dass die NK-Zellen direkt nach Antikörperkontakt Tumorzellen zerstören können. T-Zellen hingegen müssen erst aktiviert werden, um Tumorzellen effektiv zu lysieren.

Um die Effektivität der neu generierten Moleküle genauer zu evaluieren, wurde ein XCelligence-Assay durchgeführt. Dabei war klar zu erkennen, dass im Vergleich zu dem optimierten  $\alpha$ -PSMA Antikörper und dem bispezifischen Fabsc PSMAxCD16 Konstrukt nur das bispezifische Antikörperkonstrukt Fabsc PSMAxCD3 eine effektive Tumorzelllyse induziert. Die Gründe hierfür sind wie oben bereits beschrieben, dass die T-Zellen sehr potent sind Tumorzellen zu lysieren und durch den bispezifischen Antikörper aktiviert werden. Außerdem induziert der bispezifische Antikörper über die Quervernetzung von CD3 eine T-Zellproliferation, wodurch das Effektorzell:Zielzell-Verhältnis gegenüber den Tumorzellen verbessert wird und mehr Tumorzellen lysiert werden können.

Zusammenfassend ist das PSMAxCD3 Konstrukt dem optimierten monospezifischen  $\alpha$ -PSMA-Antikörper und dem bispezifischen PSMAxCD16 Konstrukten, hinsichtlich der Tumorzelllyse, deutlich überlegen, jedoch könnte eine *off-target* Aktivierung der T-Zellen zu Nebenwirkungen führen, die schlussendlich eine effektive Konzentration der bispezifischen Antikörper verhindern. Daher ist es notwendig zu untersuchen, ob das beschriebene Antikörperkonstrukt eine antigenunabhängige T-Zellaktivierung induziert.

Es konnte durch den bispezifischen PSMAxCD3 Antikörper im Fabsc-Format eine unspezifische T-Zellproliferation nachgewiesen werden. Es scheint, dass die monovalente Bindung des bispezifischen Antikörpers an CD3 diese unspezifische T-Zellaktivierung induziert. Möglicherweise kommt es durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf z. B. Monozyten zu dieser *off-target activation*, sodass eine monovalente Bindung an CD3 ausreicht, um eine schwache unspezifische T-Zellaktivierung zu induzieren. Für diese Hypothese spricht, dass sich dieser Effekt, durch die Verwendung von zusätzlichen HUVEC- oder SKW 6.4-Zellen in der Kultur, verstärken lässt. Beide Zelllinien exprimieren eine Vielzahl von kostimulierenden Antigenen (Daten cand. med. Joseph Kauer).

#### 4.2 Generierung von optimierten, monospezifischen und bispezifischen Fabsc Antikörpern gegen PSMA

Um die unspezifische Aktivierung der T-Zellen durch die Verwendung anderer Antikörperklone, welche ebenfalls die Möglichkeit haben T-Zellen zu rekrutieren, zu optimieren, wurden neue Fabsc-Konstrukte mit den Antikörpern OKT-3 ( $\alpha$ -CD3), BMA031 ( $\alpha$ - $\alpha\beta$ -TCR) und eine de-immunisierte Version des Mausantikörpers L2K (anti-CD3), welche als *single chain* verwendet wurden, generiert.

Alle bispezifischen Konstrukte zeigten eine sehr vergleichbare Bindung an PSMA. Die Affinität an CD3 war jedoch zwischen den verschiedenen Antikörperkonstrukten sehr unterschiedlich. Ein Grund dafür kann sein, dass die monoklonalen Maus-Ursprungsantikörper bereits eine unterschiedliche Affinität an CD3 haben. Des Weiteren könnte es auch sein, dass manche Antikörper als *single chain*, im Vergleich zum monoklonalen Antikörper, deutlich an Affinität verlieren und somit die gravierenden Affinitätsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Konstrukte zu Stande kommen.

In einem <sup>51</sup>Chromfreisetzungsexperiment konnte gezeigt werden, dass alle unterschiedlichen bispezifischen Fabsc Konstrukte vergleichbar PSMA<sup>+</sup> 22RV1-Zellen lysieren können. Dies liegt vermutlich daran, dass das Experiment mit prä-aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durchgeführt wurde. Diese Zellen müssen daher nicht mehr von dem bispezifischen Antikörperkonstrukt aktiviert werden, da allein die Fokussierung der T-Zellen an die Tumorzellen durch den bispezifischen Antikörper ausreicht, um eine effektive Tumorzellyse zu induzieren.

Werden die bispezifischen Antikörper jedoch mit frisch isolierten PBMCs in einem Impedanzexperiment eingesetzt, sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der Lyseeffektivität zu erkennen. Das bispezifische Fabsc-Konstrukt NP-CU lysiert die PSMA<sup>+</sup>-Zellen am effektivsten, gefolgt von den Fabsc-Konstrukten NP-CO, NP-CB und NP-CDIL2K. Diese Reihenfolge spiegelt sich auch in der Bindungsaffinität zu CD3 wider. Die Affinität der bispezifischen Konstrukte korreliert demnach nicht mit der Fähigkeit prä-aktivierte T-Zellen über CD3 zu fokussieren, wohl aber mit der Aktivierung ruhender T-Zellen.

Um die Fabsc-Konstrukte NP-CU und NP-CO hinsichtlich ihrer spezifischen, als auch unspezifischen Aktivierung von T-Zellen näher zu untersuchen, wurden <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsexperimente und eine durchflusszytometrische Analyse (Aktivierungsmarker CD69) durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die spezifische T-Zellenproliferation des Fabsc-Konstrukts NP-CO etwas geringer war als die des Fabsc-Konstrukts NP-CU. Jedoch zeigte sich, dass das Fabsc-Konstrukt NP-CO zu keiner unspezifischen Aktivierung der T-Zellen führte. Die bessere spezifische als auch die unspezifische Aktivierung durch das Fabsc NP-CU Konstrukt könnte daran liegen, dass die Affinität zu CD3 höher ist als bei dem Fabsc NP-CO Konstrukt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Fabsc NP-CO Konstrukt ein besonders geeignetes Konstrukt darstellt, da es im Vergleich zu dem Fabsc NP-CU Konstrukt zu keiner unspezifischen T-Zellaktivierung führt und eine vergleichbare spezifische T-Zellproliferation wie auch Tumorzellyse induziert.

### 4.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

Grund zur Generierung neuer monoklonaler Antikörper gegen PSMA waren unter anderem patentrechtliche Überlegungen, die einen eigenen proprietären Antikörper für die weitere translationale Entwicklung bispezifischer PSMA Antikörper erforderlich machten.

Aus mehreren Fusionen konnte ein neuer  $\alpha$ -PSMA-Antikörper vom Igy2b Subtyp erhalten werden. Dieser weist allerdings im Vergleich zum „benchmark“ Antikörper J591 mehrere für die therapeutische Verwendung interessante Unterschiede auf:

In einem Antigen-shift-Experiment konnte beobachtet werden, dass bei beiden Antikörpern zwar eine konzentrationsabhängige Verminderung der PSMA-Expression zu erkennen war, es zeigte sich aber deutlich, dass der mJ591-Antikörper einen stärkeren Antigen-shift induzierte. Wie andere Membranproteine wird auch PSMA konstitutiv internalisiert, wobei der Prozess der Internalisierung des Antigens nach Literaturangaben durch eine spezifische Bindung eines Antikörpers (zum Beispiel J591) um das 3-fache gesteigert wird [188]. Durch Elektronen- oder Immunfluoreszenzmikroskopie sowie mit biotinyliertem PSMA konnte gezeigt werden, dass die PSMA Antigene bzw. PSMA-Antikörper-Komplexe über Clathrin-ummantelte Vesikel (engl.: *clathrin coated pits*) internalisiert werden. Zurzeit wird darüber diskutiert, ob PSMA vielleicht eine Transportfunktion für einen bis heute unbekanntem Liganden hat [188]. Möglicherweise wird die Internalisierungsrate auch durch die Bindungsstelle des Antikörpers an PSMA beeinflusst. In diesem Fall muss der neu generierte  $\alpha$ -PSMA Antikörper 10B3 ein anderes Epitop binden als der Antikörperklon J591, was durch Folgeuntersuchungen bestätigt wurde.

Des Weiteren wurde die Bindung beider Antikörper auf einer Vielzahl von benignen aber auch malignen Gewebeschnitten immunhistologisch bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass beide Antikörper nur auf wenigen Normalgeweben (Prostatagewebe, Nierentubuli) zu detektieren waren. Auf Prostatakarzinomgewebe zeigten beide Antikörperklone eine markante Färbung des Tumorgewebes und der tumorassoziierten Gefäßen. Beide Antikörper färbten auch tumorassoziierte Gefäße von einer Reihe anderer getesteter solider Tumore. Im Gegensatz dazu konnte unerwarteterweise gezeigt werden, dass nur der neu generierte Antikörper 10B3 spezifisch Plattenepithelkarzinomzellen (engl.: *Squamous cell carcinoma, SCC*) färbt. Auch Wang et al. konnten eine PSMA-Expression auf Tumorzellen von Lungenkarzinomen (NSCLC und SCLC) mittels Immunhistologie nachweisen [189]. Allerdings unter Verwendung eines paraffingängigen Antikörpers, der nicht mit PSMA auf viablen Zellen zu reagieren scheint, wie eigene durchflusszytometrische Daten nahelegen (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise erkennt der 10B3-Antikörper (zusätzlich) eine Splice-Variante von PSMA, welche nur auf SCC-Zellen exprimiert wird. Des Weiteren ist es auch möglich, dass der 10B3-Antikörper kein PSMA sondern eine homologe Sequenz eines anderen Proteins, welches jedoch selektiv auf SCC-Zellen, Prostatagewebe und tumorassoziierten Gefäßen exprimiert wird, erkennt.

In jedem Fall ermöglichen die Bindungscharakteristika des 10B3-Antikörpers eine erweiterte Indikation, da es neben dem Prostatakarzinom zumindest eine weitere Tumorart gibt, bei der der Antikörper nicht nur mit Gefäßzellen sondern auch mit den Tumorzellen selber reagiert.

Im weiteren Verlauf wurde nach Sequenzierung der variablen Domänen von der Firma Aldevron (Freiburg, Deutschland) aus Hybridomzellen des 10B3-Antikörpers die Aminosäuresequenz für die leichte bzw. schwere Kette isoliert, bispezifische Fabsc Antikörperkonstrukte kloniert und aufgereinigt. Der neu generierte bispezifische Fabsc Antikörper N10-CO konnte eine nahezu identische T-Zellproliferation sowie Tumorzelllyse induzieren, im Vergleich zum NP-CO, bei welchem der  $\alpha$ -PSMA Antikörperklon J591 benutzt wurde.

#### 4.3 Generierung neuer, monoklonaler $\alpha$ -PSMA-Antikörper

Um im Patienten die Entstehung von neutralisierenden Antikörpern gegen die Mausequenzen des bispezifischen Antikörpers, die variablen Ketten des 10B3- und OKT-3-Antikörpers, zu verhindern, wurden die variablen Ketten der Antikörper mittels *CDR-grafting* humanisiert. Als Grundlage dafür diente eine möglichst sequenzgleiche Keimbahnantikörpersequenz, in welche die 10B3- bzw. OKT 3-CDRs der leichten bzw. schweren Kette übertragen wurden. Die Humanisierung des 10B3-Antikörperklons war erfolgreich, da die humanisierte Variante nahezu keine Affinität gegenüber der Mausequenz verlor. Die Humanisierung des OKT-3 Antikörperklons, welcher als *single chain* in dem bispezifischen Antikörperkonstrukt verwendet wurde, war dagegen komplizierter. Die ersten beiden Varianten verfügten nur über eine geringe bzw. keine Bindung an CD3. Der Verlust der Funktion bzw. Affinität an das Zielantigen durch die Humanisierung von Antikörpern wurde bereits mehrfach beschrieben [190].

In der Zwischenzeit wurden von Dr. Latifa Zekri-Metref auch IgGsc-Konstrukte mit dem neuen humanisierten 10B3-, dem J591-Antikörper und dem UCHT-1, als CD3-Antikörperklon kloniert, transfiziert, aufgereinigt und charakterisiert. In den ersten *in vitro* Experimenten zeigte sich überraschenderweise, dass es unter der Verwendung des UCHT-1 *single chains* im IgGsc-Konstrukt, in Abwesenheit von PSMA<sup>+</sup> Tumorzellen, zu keiner unspezifischen Aktivierung der T-Zellen kam. Ein Grund dafür könnte sein, dass, wie durchflusszytometrisch analysiert wurde, die Affinität zu CD3 trotz Bivalenz im IgGsc-Konstrukt schwächer ist als im Fabsc-Konstrukt und dass erst ab einer bestimmten Bindungsaffinität die T-Zellen unspezifisch aktiviert werden können.

Bispezifische Antikörper, welche näher an der Zellmembran an das Antigen binden, lysieren Tumorzellen effektiver [191]. Dies bedeutet dementsprechend je kleiner die Distanz zwischen Effektorzelle und Zielzelle, desto effektiver die Aktivierung bzw. Tumorzellyse. Dieser Effekt könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die IgGsc-Konstrukte im Vergleich zu den Fabsc-Konstrukten eine etwas geringere T-Zellaktivierung induzieren, da die Distanz zwischen dem CD3 bindenden Efforterteil und der Zellmembran, durch die C<sub>H</sub>3-Domäne, vergrößert ist. Dies würde auch erklären, dass die Fabsc-Konstrukte in einem Impedanzexperiment 22RV1-Zellen geringfügig besser lysierten als die IgGsc-Konstrukte. Keine Differenz war dagegen zwischen den unterschiedlichen  $\alpha$ -PSMA Antikörperklonen zu erkennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das IgGsc-Konstrukt aktuell unser bevorzugtes bispezifisches Konstrukt unter der Benutzung des neu generierten  $\alpha$ -PSMA Antikörpers 10B3 darstellt. Derzeit wird mit Unterstützung durch den Validierungsfonds der Helmholtzgemeinschaft eine GMP-konforme Produktion dieses Antikörpers durchgeführt.

#### 4.4 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen den $\gamma\delta$ -TCR und die Charakterisierung der bispezifischen Moleküle

Ein wichtiger Schritt in der Antikörpertherapie ist die Zulassung des ersten bispezifischen Antikörpers Blinatumomab, durch die FDA im Dezember 2014 und die EMA im Januar 2015. Im Fall von Blinatumomab werden T-Zellen über CD3 als Effektorzellen rekrutiert, aktiviert und zur Lyse von CD19 exprimierenden Tumorzellen angeregt. Manche Patienten zeigen allerdings durch die systemische Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen erhebliche Nebenwirkungen, die wahrscheinlich durch die Expression des Zielantigens CD19 auf normalen B-Zellen zustande kommen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer wesentlichen Überlegung dieser Arbeit, nur eine Subpopulation von T-Zellen, die  $V\gamma9V\delta2$ -T-Zellen durch bispezifische Antikörper zu aktivieren, um solche Nebenwirkungen zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst Antikörper gegen den  $V\gamma9V\delta2$ -TCR generiert, um diese in einem bispezifischen Format zur Rekrutierung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen zur direkten Tumorlyse einzusetzen.

Es konnten sieben Igy1-Antikörper, welche spezifisch an den  $V\gamma9V\delta2$ -TCR binden, isoliert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einer dieser neu generierten Antikörper das Potenzial besitzt  $V\gamma9V\delta2$ -T-Zellen zu aktivieren. Dieser Antikörper war der einzige, welcher an die  $V\gamma9$ -Kette des  $V\gamma9V\delta2$ -TCRs bindet. Die anderen Antikörper binden daher höchstwahrscheinlich an die  $V\delta2$ -Kette. Der Antikörper wurde ausgewählt, um bispezifische IgGsc- bzw. Fabsc-Konstrukte mit den Zielspezifitäten für CD19 und PSMA zu generieren.

Alle generierten bispezifischen Konstrukte zeigen eine Bindung an das Effektor ( $V\gamma9V\delta2$ )- bzw. Zielantigen (PSMA oder CD19). Die Affinität zu den N-terminalen Spezifitäten (CD19 oder PSMA) sind dabei zwischen den Fabsc- und IgGsc-Konstrukten vergleichbar. Unterschiede in der Höhe des Fluoreszenzsignals sind vermutlich auf eine unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen des sekundär Reagenzes zurückzuführen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die  $V_H$ - $V_L$ -Orientierung des *single chains* eine gering bessere Affinität zu  $V\gamma9V\delta2$ -T-Zellen zeigt als die  $V_L$ - $V_H$ -Orientierung.

Die Effizienz hinsichtlich der Tumorzelllyse der Konstrukte wurde in drei unterschiedlichen Anordnungen verglichen:

Es wurden prä-aktivierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen, ruhende  $\gamma\delta$ -T-Zellen, als Bestandteil von PBMCs in Kokultur mit allogenen NALM-16-Zellen, und frisch isolierte PBMCs verwendet, wobei die vorkommenden B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) als Zielzellen und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen als Effektorzellen dienen.

Unter der Verwendung von prä-aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen führten alle bispezifischen Antikörperkonstrukte zu einer Tumorzelllyse, unabhängig der *single chain*-Orientierung.

Durch den Gebrauch der aktivierten und dadurch immunologisch sehr aktiven  $\gamma\delta$ -T-Zellen, sind möglicherweise keine Unterschiede zwischen den bispezifischen Konstrukten zu erkennen, da in diesem Fall keine ruhenden Zellen aktiviert werden mussten, sondern eine Fokussierung der aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen an die Tumorzellen ausreicht, um eine Tumorzelllyse zu induzieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass NALM-16-Zellen (B-Zelleukämiezelllinie, CD19<sup>+</sup>) durch Kokultur mit frisch isolierten PBMCs nur unter der Verwendung der bispezifischen Konstrukte in der *single chain* Orientierung  $V_L$ - $V_H$  lysiert werden konnten. Cheng et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die Orientierung des *single chains* eine Auswirkung auf die biologische Funktionalität ausüben kann [192]. Möglicherweise spielt die Konfirmation von bestimmten Antigen-bindenden Aminosäuren eine wichtige Rolle. Warum in unserem Fall nur die  $V_L$ - $V_H$ -Orientierung eine effektive Tumorzelllyse induziert, obwohl die Bindungsaffinität der  $V_H$ - $V_L$ -Orientierung zum  $\gamma\delta$ -TCR besser ist, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise spielt eine unterschiedliche Antikörper- $V\gamma9V\delta2$ -TCR Interaktion eine Rolle bei der Aktivität der

#### 4.4 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen den $\gamma\delta$ -TCR und die Charakterisierung der bispezifischen Moleküle

verschiedenen *single chain* Orientierungen der bispezifischen Antikörper. Mit Hilfe der Technologie der Oberflächenplasmonresonanz (engl.: *surface plasmon resonance*, SPR) könnte dies, durch die Analyse der Assoziation bzw. Dissoziation der Antikörper vom  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors, untersucht werden, um mögliche Unterschiede festzustellen, welche die höhere Aktivität der  $V_L$ - $V_H$ -Orientierung erklären könnte. Jedoch zeigten solche Versuche keine Unterschiede zwischen den *single chain* Orientierungen bezüglich Dissoziation oder Assoziation (durchgeführt von Dipl. Biologe Timo Manz).

Um die funktionelle Aktivität der bispezifischen Konstrukte unter physiologischeren Bedingungen durchzuführen, wurden autologe Ziel- ( $\gamma\delta$ -T-Zellen) und Effektorzellen (B-Zellen, CD19<sup>+</sup>) verwendet, welche Bestandteil der frisch isolierten und eingesetzten PBMCs waren. Dabei konnte festgestellt werden, dass die bispezifischen Konstrukte keine B-Zelleliminierung induzieren, unabhängig von der Orientierung des *single chains*. Möglicherweise führen die Konstrukte, welche den variablen Teil des  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors binden, im Vergleich zu anti-CD3 bispezifischen Antikörpern, nicht zu einer so starken Aktivierung der Effektorzellen, dass eine Tumorzelllyse induziert werden kann. Warum die Konstrukte zu einer NALM-16-Zelllyse führen, aber nicht B-Zellen eliminieren, liegt möglicherweise daran, dass es sich dabei um ein allogenes System handelt und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen dadurch leichter aktiviert werden können. Ein anderer Grund könnte sein, dass die Anzahl an Zielzellen möglicherweise zu gering ist, um eine effektive Effektorzellaktivierung zu generieren. Fügt man in diesen Versuchen rekombinantes hIL-2 oder hIL-15 hinzu, kommt es mittels des bispezifischen Antikörpers IgGsc CD19 $\times\gamma\delta_{V_L-V_H}$  zu einer spezifischen Lyse der B-Zellen. Der Grund dafür ist vermutlich, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen durch die zusätzlichen Zytokine aktiviert werden und eine Tumorzelllyse induzieren können.

Auch kam es bei allen Experimenten zu einer teilweisen Aktivierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ -T-Zellen (CD69<sup>+</sup>) durch die bispezifischen  $\gamma\delta$ -Konstrukte. Möglicherweise wurden durch die Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen Zytokine, wie IL-2 oder IL-15 produziert, welche zur Aktivierung der  $\alpha\beta$ -T-Zellen beitragen. Eine andere bereits beschriebene Möglichkeit könnte sein, dass durch den bispezifischen Antikörper eine Tumorzelllyse induziert wurde, wobei Tumorzellbestandteile von den  $\gamma\delta$ -T-Zellen aufgenommen werden können. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen können nun als antigenpräsentierende Zellen den  $\alpha\beta$ -T-Zellen tumorzellassoziierte Peptide, über die MHC-Moleküle präsentieren. Auch erhöht sich bei aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen die Expression von kostimulierenden Molekülen wie CD80 und CD86, um vermutlich eine möglichst effektive  $\alpha\beta$ -T-Zellaktivierung zu induzieren [193, 194].

## 4.5 Ausblick

Die Generierung einer Vielzahl von bispezifischen PSMAxCD3/TCR Antikörperkonstrukten resultierte schlussendlich in der Entwicklung eines bevorzugten IgGsc PSMA (h10B3)xCD3 (hUCHT-1) Konstrukts, CC-1. In diesem Konstrukt wurde der neu hergestellte 10B3 Antikörperklon verwendet.

Warum dieser PSMA-Klon spezifisch an SCC-Gewebe bindet, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Dafür ist es notwendig die genaue Bindungsstelle (Epitop) des neu generierten PSMA-Klons zu identifizieren. Zunächst sollte festgestellt werden, ob der Antikörper mit anderen Spezies wie Maus bzw. Makaken kreuzreagiert, um so die Bindungsstelle näher einzugrenzen. Um dies zu klären, werden zurzeit Sp2/0-PSMA Transfektanten (Maus und Makaken) generiert und analysiert. Anschließend können bestimmte Aminosäuren, welche zwischen den Spezies unterschiedlich sind, in der humanen Sequenz verändert werden, um die genaue Bindungsstelle zu identifizieren.

Durch die Förderung des Validierungsfonds der Helmholtzgemeinschaft ist es nun möglich, den in dieser Arbeit beschriebenen bispezifischen IgGsc PSMAxCD3 Antikörper GMP-konform produzieren zu lassen und dann in einer klinischen Studie zu testen.

Chimärisierte, humanisierte, Fc-optimierte und bispezifische Antikörper haben die Therapie von bestimmten Krebsarten bereits essentiell verbessert. Um die therapeutische Aktivität solcher Antikörper weiter zu steigern, ist es notwendig, neben der Identifizierung und Charakterisierung von neuen Zielantigenen, auch die Auswahl von Effektorzellen und deren Rekrutierung zu optimieren.

Um eine Alternative zu den anti-CD3-basierenden bispezifischen Antikörpern zu generieren, welche alle T-Zellen aktivieren und so zu schweren Nebenwirkungen führen können, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein bispezifischer Antikörper zur Rekrutierung von  $V\gamma 9^+$ -T-Zellen generiert, um mit diesen Zellen nur eine kleine Subpopulation der T-Zellen zielgerichtet und besser kontrollierbar zu aktivieren.

Als nächster Schritt sollten von Leukämiepatienten PBMCs, welche die Tumorzellen und die Effektorzellen beinhalten, isoliert werden, um das Potenzial des bispezifischen Antikörpers unter möglichst physiologischen Bedingungen zu testen.

Eine andere Möglichkeit ist es zu untersuchen, ob der bispezifische Antikörper in Kombination mit einer *in vivo* Aktivierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen, etwa durch Zoledronat, zu nutzen ist. Um dies *in vitro* zu testen, könnten Lymphozyten von Patienten verwendet werden, welche eine Therapie mit einem Bisphosphonat (zum Beispiel Zoledronsäure) und geringer Konzentration rhIL-2 erhielten, um die  $\gamma\delta$ -T-Zellen spezifisch *in vivo* zu aktivieren. Diese Zellen könnten verwendet werden, um zu untersuchen, ob diese aktivierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen Tumorzellen, mittels des bispezifischen Antikörpers lysieren.

Ein weiterer hoch interessanter Aspekt ist die Beobachtung, dass auch  $\alpha\beta$ -T-Zellen durch das bispezifische Konstrukt aktiviert wurden. Daher soll in naher Zukunft durch *in vitro* Experimente geklärt werden, ob es sich dabei um eine direkte (Antigenpräsentation) oder indirekte (Zytokine) Aktivierung der  $\alpha\beta$ -T-Zellen handelt. Des Weiteren könnte versucht werden, die Effektivität der Konstrukte unter autologen Bedingungen durch zusätzliche kostimulierende Antikörper wie zum Beispiel  $\alpha$ -PD1,  $\alpha$ -41BB oder durch Kombination mit Immunzytokinen weiter zu verbessern.

# 5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung meiner Dissertation und für die Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ebenso möchte ich mich ausdrücklich bei Prof. Gundram Jung für die Betreuung meiner Dissertation, die konstruktiven Diskussionen, Ideen und die Bereitstellung des Dissertationsthemas bedanken. Bedanken möchte ich mich auch für das Vertrauen ein eigenes Thema zu bearbeiten und in die Dissertation zu integrieren.

Dr. Ludger Große-Hovest danke ich für die ersten Einblicke in die molekularbiologischen Methoden.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Dr. Martin Hofmann für die Einarbeitung in eine Vielzahl von neuen Methoden und die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Beate Pömmmerl für die Hilfe bei den tierexperimentellen und molekularbiologischen Arbeiten.

Außerdem gilt ein großer Dank der gesamten AG Jung (Berit, Conny, Latifa, Kristina, Caro, Gregor, Martin P., Joseph, Lukas) für eine großartige Zeit, auch abseits des Laboralltags.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Immunologie für die sehr gute Atmosphäre bedanken.

Zuallerletzt möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders bei meiner Freundin Verena bedanken.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Peto, J., *Cancer epidemiology in the last century and the next decade*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 390-5.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Busch, W., *Niederrheinische Gesellschaft für Natur- und Heilkunde in Bonn. Aus der Sitzung der medizinischen Section vom 18. November 1887*. Berliner Klinische Wochenschrift, 1868.
5. Coley, W.B., *The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. Proc R Soc Med, 1910. **3**(Surg Sect): p. 1-48.
6. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. [http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/institut/veroeffentlichungen-von-paul-ehrlich/1906-1914/1909-karzinomforschung.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=1](http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/institut/veroeffentlichungen-von-paul-ehrlich/1906-1914/1909-karzinomforschung.pdf?__blob=publicationFile&v=1). 1908.
7. Baldwin, R.W., *Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours*. Br J Cancer, 1955. **9**(4): p. 652-7.
8. Baldwin, R.W., *Immunity to transplanted tumour: the effect of tumour extracts on the growth of homologous tumours in rats*. Br J Cancer, 1955. **9**(4): p. 646-51.
9. Old, L.J. and E.A. Boyse, *Immunology of Experimental Tumors*. Annu Rev Med, 1964. **15**: p. 167-86.
10. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
11. Stutman, O., *Immunodepression and malignancy*. Adv Cancer Res, 1975. **22**: p. 261-422.
12. Stutman, O., *Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose*. J Natl Cancer Inst, 1979. **62**(2): p. 353-8.
13. Stutman, O., *Spontaneous tumors in nude mice: effect of the viable yellow gene*. Exp Cell Biol, 1979. **47**(2): p. 129-35.
14. Ikehara, S., et al., *Functional T cells in athymic nude mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 886-8.
15. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, *A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 293-9.
16. Shankaran, V., et al., *IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-1111.
17. Smyth, M.J., et al., *Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 661-8.
18. Lanier, L.L., *A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1178-80.
19. Girardi, M., et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. Science, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
20. Fenton, R.G. and D.L. Longo, *Genetic instability and tumor cell variation: implications for immunotherapy*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(4): p. 241-3.
21. Stoler, D.L., et al., *The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15121-6.
22. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
23. Marincola, F.M., et al., *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 181-273.
24. Algarra, I., T. Cabrera, and F. Garrido, *The HLA crossroad in tumor immunology*. Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 65-73.

25. Seliger, B., M.J. Maeurer, and S. Ferrone, *Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth*. Immunol Today, 2000. **21**(9): p. 455-64.
26. Rubinstein, N., et al., *Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege*. Cancer Cell, 2004. **5**(3): p. 241-51.
27. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
28. Khong, H.T. and N.P. Restifo, *Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 999-1005.
29. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
30. Walker, P.R., P. Saas, and P.Y. Dietrich, *Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 564-72.
31. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
32. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
33. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
34. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
35. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody*. Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
36. Woo, E.Y., et al., *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4766-72.
37. Liyanage, U.K., et al., *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2756-61.
38. Yin, Y., et al., *Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: a major link between immune evasion and tumor growth*. Cell Res, 2014. **24**(10): p. 1164-80.
39. Raychaudhuri, B., et al., *Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma*. Neuro Oncol, 2011. **13**(6): p. 591-9.
40. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
41. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
42. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
43. Traversari, C., et al., *A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1453-7.
44. Fakih, M. and R. Wong, *Efficacy of the monoclonal antibody EGFR inhibitors for the treatment of metastatic colorectal cancer*. Curr Oncol, 2010. **17 Suppl 1**: p. S3-17.
45. Coulie, P.G. and P. van der Bruggen, *T-cell responses of vaccinated cancer patients*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 131-7.
46. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 265-77.
47. Rosenberg, S.A. and N.P. Restifo, *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 62-8.
48. 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.

49. Champlin, R., et al., *Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy*. Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 18-29.
50. Luznik, L. and E.J. Fuchs, *Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation*. Cancer Control, 2002. **9**(2): p. 123-37.
51. Plosker, G.L. and D.P. Figgitt, *Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia*. Drugs, 2003. **63**(8): p. 803-43.
52. Winau, F. and R. Winau, *Emil von Behring and serum therapy*. Microbes Infect, 2002. **4**(2): p. 185-8.
53. Van Epps, H.L., *Michael Heidelberger and the demystification of antibodies*. J Exp Med, 2006. **203**(1): p. 5.
54. Waldenström, J.G., *Incipient myelomatosis or „essential“ hyperglobulinemia with fibrinogenopenia - a new syndrome?* In: Acta Medica Scandinavica. Stockholm, 117, 1944, S. 216–247., 1944.
55. Heremans, J.F., M.T. Heremans, and H.E. Schultze, *Isolation and description of a few properties of the beta 2A-globulin of human serum*. Clin Chim Acta, 1959. **4**(1): p. 96-102.
56. Rowe, D.S. and J.L. Fahey, *A New Class of Human Immunoglobulins. Ii. Normal Serum Igd*. J Exp Med, 1965. **121**: p. 185-99.
57. Ishizaka, K., T. Ishizaka, and E.H. Lee, *Physicochemical properties of reaginic antibody. II. Characteristic properties of reaginic antibody different from human gamma-A-isoheamagglutinin and gamma-D-globulin*. J Allergy, 1966. **37**(6): p. 336-49.
58. Johansson, S.G. and H. Bennich, *Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin*. Immunology, 1967. **13**(4): p. 381-94.
59. Porter, R.R., *The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline papain*. Biochem J, 1959. **73**: p. 119-26.
60. Ribatti, D., *Edelman's view on the discovery of antibodies*. Immunol Lett, 2015. **164**(2): p. 72-5.
61. Rossi, G. and A. Nisonoff, *Crystallization of fragment Fab of human IgG myeloma proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1968. **31**(6): p. 914-8.
62. Hilschmann, N. and L.C. Craig, *Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**(6): p. 1403-9.
63. Edelman, G.M., et al., *The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **63**(1): p. 78-85.
64. Wu, T.T. and E.A. Kabat, *An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity*. J Exp Med, 1970. **132**(2): p. 211-50.
65. Tonegawa, S., et al., *Organization of immunoglobulin genes*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1978. **42 Pt 2**: p. 921-31.
66. McKean, D., et al., *Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(10): p. 3180-4.
67. Dunkelberger, J.R. and W.C. Song, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 34-50.
68. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcgamma receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
69. Vidarsson, G., G. Dekkers, and T. Rispens, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 520.
70. Gorter, A. and S. Meri, *Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 576-82.
71. Seidel, U.J., P. Schlegel, and P. Lang, *Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 76.

72. Seidel, U.J., et al., *gammadelta T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 618.
73. De Palma, M. and C.E. Lewis, *Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies*. Cancer Cell, 2013. **23**(3): p. 277-86.
74. Golay, J., et al., *Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab*. Blood, 2013. **122**(20): p. 3482-91.
75. den Haan, J.M., S.M. Lehar, and M.J. Bevan, *CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1685-96.
76. Brandes, M., et al., *Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2307-12.
77. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
78. Tjandra, J.J., L. Ramadi, and I.F. McKenzie, *Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients*. Immunol Cell Biol, 1990. **68 (Pt 6)**: p. 367-76.
79. Winter, G. and C. Milstein, *Man-made antibodies*. Nature, 1991. **349**(6307): p. 293-9.
80. 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.
81. Lonberg, N., *Human monoclonal antibodies from transgenic mice*. Handb Exp Pharmacol, 2008(181): p. 69-97.
82. Lazar, G.A., et al., *Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4005-10.
83. Goede, V., et al., *Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions*. N Engl J Med, 2014. **370**(12): p. 1101-10.
84. Niculescu-Duvaz, I., *Trastuzumab emtansine, an antibody-drug conjugate for the treatment of HER2+ metastatic breast cancer*. Curr Opin Mol Ther, 2010. **12**(3): p. 350-60.
85. Ebbinghaus, C., et al., *Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy*. Int J Cancer, 2005. **116**(2): p. 304-13.
86. Gillies, S.D., et al., *An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3972-8.
87. Kaspar, M., E. Trachsel, and D. Neri, *The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis*. Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4940-8.
88. Muller, D. and R.E. Kontermann, *Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy*. Curr Opin Mol Ther, 2007. **9**(4): p. 319-26.
89. 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.
90. Jung, G., et al., *Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4479-83.
91. Leeuwenberg, J.F., et al., *Induction of nonspecific cytotoxicity by monoclonal anti-T3 antibodies*. J Immunol, 1985. **134**(6): p. 3770-5.
92. 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.
93. Suresh, M.R., A.C. Cuello, and C. Milstein, *Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas*. Methods Enzymol, 1986. **121**: p. 210-28.
94. Milstein, C. and A.C. Cuello, *Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry*. Nature, 1983. **305**(5934): p. 537-40.
95. Linke, R., A. Klein, and D. Seimetz, *Catumaxomab: clinical development and future directions*. MAbs, 2010. **2**(2): p. 129-36.
96. Ridgway, J.B., L.G. Presta, and P. Carter, *'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization*. Protein Eng, 1996. **9**(7): p. 617-21.

97. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 220-33.
98. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. Science, 1988. **242**(4877): p. 423-6.
99. Desplancq, D., et al., *Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3*. Protein Eng, 1994. **7**(8): p. 1027-33.
100. Kontermann, R.E., *Dual targeting strategies with bispecific antibodies*. MAbs, 2012. **4**(2): p. 182-97.
101. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
102. Blumberg, R.S., et al., *Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7220-4.
103. Weiss, A. and D.R. Littman, *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors*. Cell, 1994. **76**(2): p. 263-74.
104. Van Wauwe, J.P., J.R. De Mey, and J.G. Goossens, *OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties*. J Immunol, 1980. **124**(6): p. 2708-13.
105. Landegren, U., J. Andersson, and H. Wigzell, *Mechanism of T lymphocyte activation by OKT3 antibodies. A general model for T cell induction*. Eur J Immunol, 1984. **14**(4): p. 325-8.
106. Maude, S.L., et al., *Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies*. Cancer J, 2014. **20**(2): p. 119-22.
107. Brenner, M.B., et al., *Identification of a putative second T-cell receptor*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 145-9.
108. Bank, I., et al., *A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 179-81.
109. Kabelitz, D., D. Wesch, and W. He, *Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 5-8.
110. Allison, T.J. and D.N. Garboczi, *Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens*. Mol Immunol, 2002. **38**(14): p. 1051-61.
111. Silva-Santos, B., K. Serre, and H. Norell, *gammadelta T cells in cancer*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 683-91.
112. Urban, E.M., A.I. Chapoval, and C.D. Pauza, *Repertoire development and the control of cytotoxic/effector function in human gammadelta T cells*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 732893.
113. Bonneville, M., R.L. O'Brien, and W.K. Born, *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-78.
114. Pfeffer, K., et al., *A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells*. J Immunol, 1992. **148**(2): p. 575-83.
115. Tanaka, Y., et al., *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 155-8.
116. Meraviglia, S., et al., *gammadelta T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 587315.
117. Constant, P., et al., *Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands*. Science, 1994. **264**(5156): p. 267-70.
118. Sciammas, R., et al., *Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell*. J Immunol, 1994. **152**(11): p. 5392-7.
119. Groh, V., et al., *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells*. Science, 1998. **279**(5357): p. 1737-40.
120. Pende, D., et al., *Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6178-86.

121. Salih, H.R., et al., *Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1389-96.
122. Rincon-Orozco, B., et al., *Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2144-51.
123. Sturm, E., et al., *Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor-gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells*. J Immunol, 1990. **145**(10): p. 3202-8.
124. Fisch, P., et al., *Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3368-79.
125. Wesch, D., et al., *Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1348-54.
126. Daniele, N., et al., *Transplantation in the onco-hematology field: focus on the manipulation of alphabeta and gammadelta T cells*. Pathol Res Pract, 2012. **208**(2): p. 67-73.
127. Lamb, L.S., Jr., et al., *Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia*. J Hematother, 1996. **5**(5): p. 503-9.
128. Minculescu, L. and H. Sengelov, *The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation*. Scand J Immunol, 2015. **81**(6): p. 459-68.
129. Jomaa, H., et al., *Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999. **25**(4): p. 371-8.
130. Kunzmann, V., E. Bauer, and M. Wilhelm, *Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate*. N Engl J Med, 1999. **340**(9): p. 737-8.
131. Gober, H.J., et al., *Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 163-8.
132. Kabelitz, D., et al., *Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6767-76.
133. Wu, Y.L., et al., *gammadelta T cells and their potential for immunotherapy*. Int J Biol Sci, 2014. **10**(2): p. 119-35.
134. Ferrini, S., et al., *Re-targeting of human lymphocytes expressing the T-cell receptor gamma/delta to ovarian carcinoma cells by the use of bispecific monoclonal antibodies*. Int J Cancer, 1989. **44**(2): p. 245-50.
135. Oberg, H.H., et al., *Novel bispecific antibodies increase gammadelta T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2014. **74**(5): p. 1349-60.
136. Society, A.C., <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-survival-rates>. 2016.
137. Santana, S.M., et al., *Immunocapture of prostate cancer cells by use of anti-PSMA antibodies in microdevices*. Biomed Microdevices, 2012. **14**(2): p. 401-7.
138. Baccala, A., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms*. Urology, 2007. **70**(2): p. 385-90.
139. Kawakami, M. and J. Nakayama, *Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2321-4.
140. Silver, D.A., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(1): p. 81-5.
141. Ross, J.S., et al., *Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6357-62.
142. Sweat, S.D., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases*. Urology, 1998. **52**(4): p. 637-40.
143. Wright, G.L., Jr., et al., *Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy*. Urology, 1996. **48**(2): p. 326-34.

144. Liu, H., et al., *Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium*. *Cancer Res*, 1997. **57**(17): p. 3629-34.
145. Chang, S.S., et al., *Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3192-8.
146. Israeli, R.S., et al., *Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen*. *Cancer Res*, 1993. **53**(2): p. 227-30.
147. O'Keefe, D.S., et al., *Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1443**(1-2): p. 113-27.
148. Israeli, R.S., et al., *Expression of the prostate-specific membrane antigen*. *Cancer Res*, 1994. **54**(7): p. 1807-11.
149. Barinka, C., et al., *Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity*. *Protein Sci*, 2004. **13**(6): p. 1627-35.
150. Davis, M.I., et al., *Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(17): p. 5981-6.
151. Fair, W.R., R.S. Israeli, and W.D. Heston, *Prostate-specific membrane antigen*. *Prostate*, 1997. **32**(2): p. 140-8.
152. Afshar-Oromieh, A., et al., *The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions*. *J Nucl Med*, 2015. **56**(11): p. 1697-705.
153. Zhong, X.S., et al., *Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication*. *Mol Ther*, 2010. **18**(2): p. 413-20.
154. Murphy, G.P., et al., *Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment*. *Prostate*, 1999. **39**(1): p. 54-9.
155. Rosenthal, S.A., M.K. Haseman, and T.J. Polascik, *Utility of capromab pendetide (ProstaScint) imaging in the management of prostate cancer*. *Tech Urol*, 2001. **7**(1): p. 27-37.
156. Holmes, E.H., *PSMA specific antibodies and their diagnostic and therapeutic use*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001. **10**(3): p. 511-9.
157. Elsasser-Beile, U., et al., *PET imaging of prostate cancer xenografts with a highly specific antibody against the prostate-specific membrane antigen*. *J Nucl Med*, 2009. **50**(4): p. 606-11.
158. Bander, N.H., et al., *Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen*. *J Urol*, 2003. **170**(5): p. 1717-21.
159. Akhtar, N.H., et al., *Prostate-specific membrane antigen-based therapeutics*. *Adv Urol*, 2012. **2012**: p. 973820.
160. 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.
161. Scherl-Mostageer, M., et al., *Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer*. *Oncogene*, 2001. **20**(32): p. 4402-8.
162. Bhatt, A.S., et al., *Adhesion signaling by a novel mitotic substrate of src kinases*. *Oncogene*, 2005. **24**(34): p. 5333-43.
163. Brown, T.A., et al., *Adhesion or plasmin regulates tyrosine phosphorylation of a novel membrane glycoprotein p80/gp140/CUB domain-containing protein 1 in epithelia*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 14772-83.
164. He, Y., et al., *Proteolysis-induced N-terminal ectodomain shedding of the integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by*

- tyrosine phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta.* J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26162-73.
165. Casar, B., et al., *In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated beta1 integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling.* Oncogene, 2014. **33**(2): p. 255-68.
  166. Uekita, T., et al., *CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(21): p. 7649-60.
  167. Benes, C.H., et al., *The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain.* Cell, 2005. **121**(2): p. 271-80.
  168. Perry, S.E., et al., *Expression of the CUB domain containing protein 1 (CDCP1) gene in colorectal tumour cells.* FEBS Lett, 2007. **581**(6): p. 1137-42.
  169. Siva, A.C., et al., *Targeting CUB domain-containing protein 1 with a monoclonal antibody inhibits metastasis in a prostate cancer model.* Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3759-66.
  170. Ikeda, J.I., et al., *Epigenetic regulation of the expression of the novel stem cell marker CDCP1 in cancer cells.* J Pathol, 2006. **210**(1): p. 75-84.
  171. Buhring, H.J., et al., *CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin.* Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 334-43.
  172. Awakura, Y., et al., *Microarray-based identification of CUB-domain containing protein 1 as a potential prognostic marker in conventional renal cell carcinoma.* J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(12): p. 1363-9.
  173. Miyazawa, Y., et al., *CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation.* Cancer Res, 2010. **70**(12): p. 5136-46.
  174. Ikeda, J., et al., *Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung.* Cancer Sci, 2009. **100**(3): p. 429-33.
  175. Uekita, T., et al., *CUB-domain-containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma.* Am J Pathol, 2008. **172**(6): p. 1729-39.
  176. Orchard-Webb, D.J., et al., *CUB domain containing protein 1 (CDCP1) modulates adhesion and motility in colon cancer cells.* BMC Cancer, 2014. **14**: p. 754.
  177. Fukuchi, K., et al., *Inhibition of tumor metastasis: functional immune modulation of the CUB domain containing protein 1.* Mol Pharm, 2010. **7**(1): p. 245-53.
  178. Kollmorgen, G., et al., *Antibody mediated CDCP1 degradation as mode of action for cancer targeted therapy.* Mol Oncol, 2013. **7**(6): p. 1142-51.
  179. Rettig, W.J., et al., *Differential expression of cell surface antigens and glial fibrillary acidic protein in human astrocytoma subsets.* Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6406-12.
  180. Beverley, P.C. and R.E. Callard, *Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody.* Eur J Immunol, 1981. **11**(4): p. 329-34.
  181. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS.* Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
  182. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
  183. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
  184. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
  185. Durben, M., et al., *Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia.* Mol Ther, 2015. **23**(4): p. 648-55.
  186. Lunde, E., et al., *Stabilizing mutations increase secretion of functional soluble TCR-Ig fusion proteins.* BMC Biotechnol, 2010. **10**: p. 61.
  187. Beers, S.A., et al., *Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection.* Blood, 2010. **115**(25): p. 5191-201.



188. Liu, H., et al., *Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen*. *Cancer Res*, 1998. **58**(18): p. 4055-60.
189. Wang, H.L., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in lung cancer cells and tumor neovasculature endothelial cells and its clinical significance*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0125924.
190. Nakanishi, T., et al., *Critical contribution of VH-VL interaction to reshaping of an antibody: the case of humanization of anti-lysozyme antibody, HyHEL-10*. *Protein Sci*, 2008. **17**(2): p. 261-70.
191. Bluemel, C., et al., *Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **59**(8): p. 1197-209.
192. Liu, A., et al., *Expression of V(H)-linker-V(L) orientation-dependent single-chain Fv antibody fragment derived from hybridoma 2E6 against aflatoxin B1 in Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015. **42**(2): p. 255-62.
193. Himoudi, N., et al., *Human gammadelta T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells*. *J Immunol*, 2012. **188**(4): p. 1708-16.
194. Wu, Y., et al., *Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis*. *J Immunol*, 2009. **183**(9): p. 5622-9.

# 7 Appendix

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
C <sub>H</sub>	Konstante Domäne der schweren Kette
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Kette
CMV	Zytomegalievirus
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
CDR	complementary-determining region
CDC	complement-dependent cytotoxicity
Ci	Curie
cpm	counts per minute
Cr	Chrom
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
Da	Dalton
DM-1	Gruppe der Maytansinoide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E:T	Effektor:Target
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm
G-CSF	Maytansinoide
°C	Grad Celsius
h	Stunde
Il	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
HAMA	Human anti-mouse antibody
HRP	Horseradish peroxidase
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
M	Mol
ml	Milliliter
n.d.	Nicht definiert
min	Minute
μl	Mikroliter
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PBMC	peripheral blood mononuclear cell(s)
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimine
RT	Raumtemperatur
SCC	Squamous cell carcinoma
TCR	T-cell receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
SDS	Sodium-(Natrium-)dodecylsulfat
U	Unit
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
x g	relative Erdbeschleunigung

## 7.2 Curriculum vitae

Lebenslauf  
Fabian Vogt

### Persönliche Angaben

---

Geburtsdatum: 20. November 1985, Ulm  
Familienstand: ledig, keine Kinder  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Studium

---

03.2012 – bis heute Promotionsarbeit in der Universität Tübingen  
(Abteilung Immunologie)  
Thema: Entwicklung von bispezifischen  
Antikörpern mit optimierter Ziel- Effektorspezifität

10.2012 – 03.2013 Erfolgreiche Teilnahme am  
„versuchstierkundlichen Privatissimum zur  
Erlangung tierschutz- und versuchstierkundlicher  
Fachkenntnisse“ in Tübingen.

01.2011 – 10.2011 Diplomarbeit an der Kinderklinik Tübingen  
Thema: Reduktion der Disseminierung von  
Tumorzellen durch Erhöhung der  
Apoptosebereitschaft beim Hepatoblastom (Note:  
1,0; Gesamtnote der Diplomprüfung 1,0)

10.2006 – 11.2010 **Studium der Biologie (Diplom)**  
*Universität Tübingen*  
Schwerpunkte

- Hauptfach Immunologie/Zellbiologie  
(Note: 1.0)
- Nebenfach Genetik (Note: 1.0)
- Nicht-biologisches Nebenfach Virologie  
(Note: 1.3)

