

Generierung und *In vitro* Charakterisierung rekombinanter
bispesifischer CD3 x NCAM und CD3 x VEGFR-2
Antikörper für die Neuroblastomtherapie

I n a u g u r a l D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät
und
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anke Kopacek

aus Berlin

Braunschweig

2009

Berichterstatter/Berichterstatterin

Prof. Dr. med. Andreas Engert

Prof. Dr. rer. nat. Günter Schwarz

Tag der letzten mündlichen Prüfung

10. September 2009

*Egal wo die Welt anfängt
Und wo sie endet
Der Mensch steht immer mittendrin
Auch wenn der Mittelpunkt
Eines jeden ein anderer ist*

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist weltweit die zweithäufigste maligne Krebserkrankung bei Kindern. Der Einsatz immuntherapeutischer Behandlungsmethoden stellt eine große Herausforderung in der Klinik dar. Im Hinblick auf die Etablierung antikörperbasierender Strategien ist der Einsatz bispezifischer CD3 x TAA-Antikörper ein vielversprechender Ansatz. Ihr Potential, eine T-Zellrezeptor-unabhängige Aktivierung von T-Zellen zu vermitteln und aktivierte T-Effektorzellen gegen den Tumor zwecks Zelllyse zu richten, kann von großem therapeutischen Nutzen sein. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, das nahezu auf allen Neuroblastomzellen exprimiert wird, ist ein für die Therapie relevantes *target*-Antigen. Da die Etablierung von Tumoren maßgeblich von der VEGF/VEGFR-vermittelten Vaskularisierung beeinflusst wird, kann auch hier der Einsatz bispezifischer Antikörper von immuntherapeutischer Relevanz sein.

Daran orientiert, umfasste die vorliegende Arbeit die Herstellung und *In-vitro*-Charakterisierung bispezifischer CD3 x NCAM (OKT-3/murin x ERIC-1/murin) und (UCHT-1/humanisiert x D29/humanisiert) sowie CD3 x VEGFR-2 (UCHT-1/humanisiert x A7/murin)-Antikörper im *single chain Fv(bsscFv)*- sowie *single chain (sc)-diabody*-Format.

Die *bsscFv*-Antikörper wurden aus stabil produzierenden Sp2/0-Myelomazellen aufgereinigt. Der r3V *bsscFv* (UCHT-1 x A7) zeigte in der FACS-Titration auf CD3-positiven Jurkat- und VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zellen eine deutliche Bindung ab einer Konzentration von 1 µg/ml. In der Analyse der Proliferation humaner PBMCs kam zum Ausdruck, dass der r3V allein und in Gegenwart inaktivierter PAE/KDR-Zellen in der Lage war, die Stimulation CD3-positiver T-Zellen ab einer Konzentration von 1 µg/ml zu aktivieren. Des Weiteren war der r3V in der Lage, T- und VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen zu vernetzen und aktivierte CD8-positive T-Effektorzellen nach Il-2-Stimulation gegen den Tumor zu richten. Die ermittelte spezifische Zelllyse betrug etwa 30 % bei einem Effektor : Zielzellen-Verhältnis (E : T-Ratio) von 30. Bei der PBMC-Stimulation mittels des r3V erfolgte diese Effektorfunktion nicht. Überraschenderweise war bei der Zytotoxizitätsanalyse mit VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen ein ähnlicher Effekt wie auf PAE/KDR-Zielzellen zu sehen. Daten deuten darauf hin, dass dies auf unspezifische Faktoren zurückzuführen war.

Der r3N *bsscFv* (UCHT-1 x D29) zeigte in der FACS-Titration auf CD3-positiven Jurkatzellen eine klare Bindung ab einer Konzentration von 1 µg/ml. Auf NCAM-positiven TE671-Zellen hingegen zeigte der r3N erst eine deutliche Bindung ab einer Konzentration von 80 µg/ml. Die Analyse der Proliferation humaner CD56-depletierter PBMCs verdeutlichte, dass der Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml und in Gegenwart inaktivierter IMR5-Zellen in der Lage war, CD3-positive T-Zellen zu stimulieren.

Die Stimulation war jedoch im Vergleich zur PBMC-Proliferation in Gegenwart NCAM-negativer LS-Kontrollzellen nicht signifikant erhöht. Dieser Effekt resultierte mutmaßlich aus der schlechten Bindungskapazität der anti-NCAM-Domäne des r3N. In Bezug auf die Bindungseigenschaften der anti-NCAM-Domäne war der r3N im Rahmen dieser Studie weder in der Lage, T- und NCAM-positive IMR5-Zellen zu vernetzen, noch aktivierte Effektorzellen nach Stimulation gegen den Tumor zu richten.

Die Antikörperklone UCHT-1 x A7 und UCHT-1 x D29 wurden zusätzlich im *sc-diabody*-Format stabil in BHK21-Zellen exprimiert. Die Expression der *diabody*-Antikörper konnte auf mRNA- und Proteinebene deutlich nachgewiesen werden. Die spezifische Bindung der sekretierten Antikörper wurde erfolgreich im FACS auf CD3-positiven Jurkat-, VEGFR-2-positiven PAE/KDR- sowie NCAM-positiven IMR5- und TE671-Zellen verifiziert.

Im Gegensatz dazu war der initial untersuchte OKT-3 x ERIC-1 *diabody* für funktionale Analysen nicht hinreichend exprimierbar. Die Analyse stabil transfizierter BHK21-Klone ergab, dass der Antikörper zwar auf mRNA-, aber nicht auf Proteinebene nachweisbar ist. Analoge Studien zum ERIC-1 *scFv* zeigten den gleichen Befund.

Abstract

Neuroblastoma is the second most common malignancy among childhood cancers. To date immunotherapy remains a major challenge in paediatric oncology. Efforts are made to establish antibody based approaches to treat cancer. One promising approach is the application of bispecific CD3 x TAA antibodies. Owing to their ability to bind to T and tumour antigens simultaneously they harbour the potential to mediate a T cell receptor independent expansion of T cells and subsequently to redirect activated CD8 effector T cells to the targeted tumour and hence are able to elicit a cytotoxic function. The neural cell adhesion molecule NCAM that is abundantly expressed on nearly all neuroblastoma cells is a tumour associated antigen with therapeutic relevance. As tumour development and maintenance is highly influenced by VEGF/VEGFR mediated neovascularization the application of bispecific antibodies may also play an important role in antiangiogenic immunotherapies.

Accordingly, the presented study focused on the generation and *in vitro* characterisation of bispecific CD3 x NCAM (OKT-3/murine x ERIC-1/murine) and (UCHT-1/humanised x D29/humanised) as well as CD3 x VEGFR-2 (UCHT-1/humanised x A7/murine) antibodies in the single chain Fv (bscFv) and the single chain (sc) diabody format.

The bscFv antibodies were stably produced in Sp2/0 myeloma cells and purified from the cell culture supernatants. The r3V bscFv (UCHT-1 x A7) demonstrated a clear binding on CD3 positive Jurkat and VEGFR-2 positive PAE/KDR cells in a FACS titration analysis at concentrations higher than 1 µg/ml. The evaluation of the antibody's potential to stimulate PBMCs revealed that the r3V was able to activate CD3 positive T cells alone and in the presence of inactivated PAE/KDR target cells at concentrations higher than 1 µg/ml. Furthermore the r3V elicited the ability to crosslink T and VEGFR-2 positive PAE/KDR target cells and to redirect activated CD8 effector T cells after Il-2 stimulation to exert their cytotoxic function. Thereby the calculated specific lysis accounted to about 30 % at an E : T ratio of 30. When PBMCs were stimulated with the bscFv r3V instead of Il-2 cytotoxic effects could not be observed. Surprisingly, the assessment of cytotoxicity with VEGFR-2 negative PAE/FLT1 control cells yielded a similar cytotoxicity as with PAE/KDR target cells. Data indicate that this was due to unspecific responses.

The r3N bscFv (UCHT-1 x D29) exhibited a clear binding on CD3 positive Jurkat cells at concentrations higher than 1 µg/ml. In contrast, the r3N revealed a low binding capacity on NCAM positive TE671 cells and required a concentration of 80 µg/ml to elicit a clear target cell binding. The assessment of the r3N ability to stimulate human CD56 depleted PBMCs demonstrated that the r3N alone as well as in the presence of inactivated IMR5 target cells was able to activate T cell proliferation at concentrations higher than 1 µg/ml.

However, the stimulation was not significantly increased in comparison to the stimulation in the presence of NCAM negative LS control cells. This effect presumably resulted from the low binding capacity of the r3N anti-NCAM domain. In regard to the binding character of the anti-NCAM domain the r3N as applied in this study was neither able to crosslink T and NCAM positive IMR5 cells nor to redirect activated effector T cells post stimulation to the targeted tumour cells.

Additionally, the antibody clones UCHT-1 x A7 and UCHT-1 x D29 were stably expressed as sc-diabodies in BHK21 cells. The expression of both diabodies was clearly detected on mRNA and protein level. The specific binding of the secreted antibodies on CD3 positive Jurkat, VEGFR-2 positive PAE/KDR as well as on NCAM positive IMR5 and TE671 cells could be successfully verified using FACS analysis.

In contrast, the initially characterised OKT-3 x ERIC-1 diabody proved to be insufficiently expressed for functional analysis. The analysis of stably transfected BHK21 clones revealed antibody expression on mRNA but not on protein level. Studies performed with the ERIC-1 scFv showed the same results.

Danksagung

Danken möchte ich all denen, die mich wissentlich als auch unwissentlich unterstützt und an der Entstehung dieser Arbeit Anteil haben und Anteil nehmen.

Hiermit danke ich Herrn Prof. Frank Berthold und Herrn Dr. Thomas Böldicke für die Bereitstellung des Themas und der Betreuung der Arbeit in Köln und Braunschweig. Herrn Böldicke danke ich in dem Zusammenhang für die Möglichkeit der Durchführung der Experimente in seinem Labor.

Zudem bedanke ich mich bei dem MD-PhD-Programm der Universität zu Köln, in dessen Rahmen die Arbeit entstanden ist und die durch die Koordinatorin Frau Dr. Debora Grosskopf-Kroiher und den Tutoren Herrn Prof. Andreas Engert und Herrn Prof. Günter Schwarz in Köln begleitet worden ist.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Ludger Grosse-Hovest für seine maßgebliche und wertvolle Kooperationsarbeit sowie für die lehrreiche Vermittlung seines Wissens- und Erfahrungsschatzes.

Dem anschließend gilt ein besonderer Dank Herrn Dr. Markus Jensen. Seine Bereitschaft zur aktiven Auseinandersetzung mit dem Projekt und seine begleitende Beratertätigkeit waren für das Gelingen der Arbeit von großem Wert.

Allen Kolleginnen und Kollegen, die innerhalb und außerhalb des Labors beruflich als auch privat involviert waren, danke ich für den wissenschaftlichen als auch den persönlichen Austausch. Für die kollegiale und kommunikative Atmosphäre, die innerhalb des Labors zum Alltag gehörte, danke ich all denen, die während meiner Zeit im Labor mitgearbeitet und zu einer ausgeglichenen Stimmung beigetragen haben.

Mein persönlichster Dank gilt meiner Familie sowie meinen Freunden für ihre jahrelange Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Zuneigung. Dank gebührt vor allem denen, die zu privatem Ausgleich und Austausch beigetragen und meine Zeit in Braunschweig mit begleitet und verlebt haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XV

1	Einleitung	1
1.1	Das Neuroblastom	1
1.1.1	Entstehung des Neuroblastoms	1
1.1.2	Molekulare und genetische Eigenschaften des Neuroblastoms	2
1.1.3	Therapie des Neuroblastoms	3
1.2	<i>Eigenschaften des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM)</i>	4
1.2.1	Aufbau und Funktion	4
1.2.2	NCAM-vermittelte Signaltransduktion	5
1.2.3	Die Rolle von NCAM in der Tumorentwicklung	6
1.2.4	NCAM als <i>target</i> der Neuroblastomtherapie	7
1.3	<i>Eigenschaften des VEGF-Rezeptors-2 (VEGFR-2/KDR)</i>	7
1.3.1	Aufbau, Funktion und Signaltransduktion	7
1.3.2	Die Rolle von VEGFR-2 in der Tumorangiogenese	8
1.3.3	Das VEGF-VEGFR-System im Fokus der Tumorthherapie	9
1.3.4	Das VEGF-VEGFR-System als <i>target</i> der Neuroblastomtherapie	11
1.4	<i>Rekombinante Antikörpertechnologie in Forschung und Medizin</i>	12
1.4.1	Übersicht über Herstellung rekombinanter Antikörper und ihre Formate	13
1.4.2	Rekombinante Antikörper <i>versus</i> monoklonale Antikörper	14
1.4.3	Das Konzept der bispezifischen Antikörperstrategie	16
1.5	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	19
2	Material und Methoden	20
2.1	<i>Material</i>	20
2.1.1	Medien und Zelllinien	21
2.1.2	Oligonukleotide und DNA-Matrizen	22

2.1.3	Antikörper	25
2.1.4	Enzyme, Molekulargewichtsmarker und rekombinante Proteine	25
2.1.5	Klonierungs- und Expressionsplasmide und sonstige Vektoren	26
2.1.6	Kits	26
2.1.7	Zellkulturmaterialien und -geräte	26
2.1.8	Chemikalien und Farbstoffe	27
2.1.9	Geräte und sonstige Materialien	27
2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	28
2.2.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Hybridoma- und Säugetierzellen	28
2.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.2.3	Qualitätsanalyse der RNA mittels denaturierender Agarosegel- elektrophorese	28
2.2.4	Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkription	29
2.2.5	Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen V _H und V _L mittels PCR	29
2.2.6	Amplifizierung des <i>single chain Fv</i> (<i>scFv</i>)-Linkers mittels PCR	30
2.2.7	Herstellung des <i>scFv</i> -Antikörpers und der reziproken <i>scFv</i> -Formate mittels Assembly-PCR	31
2.2.8	Herstellung der bispezifischen <i>diabody</i> -Antikörper	32
2.2.9	Herstellung der bispezifischen <i>scFv</i> -Antikörper	32
2.2.10	Ortsspezifische DNA-Mutagenese	32
2.2.11	Auftrennung der amplifizierten DNA mittels Agarosegelelektrophorese	33
2.2.12	Aufreinigung und Elution von DNA	33
2.2.13	Klonierung der Antikörper-PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1	33
2.2.14	Klonierung der Antikörper-DNA-Konstrukte in die Expressionsvektoren pCANTAB5E und pSeqTag/HygroA	34
2.2.15	Analyse der Genexpression der stabil transfizierten <i>scFv</i> - und der bispezifischen <i>diabody</i> -Antikörper mittels RT-PCR	34
2.2.16	DNA-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen	35
2.3	<i>Zellbiologische Methoden</i>	35
2.3.1	Herstellung von Glycerinkulturen	35
2.3.2	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Bakterien	36
2.3.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mittels Elektroporation	36
2.3.4	Periplasmatische Expression der löslichen Antikörperproteine in <i>E. coli</i>	37
2.3.5	Kultivierung und Konservierung von Säugetierzellen	37
2.3.6	Transiente Transfektion von Säugetierzellen mittels Kalziumphosphat	38

2.3.7	Stabile Transfektion von Säugetierzellen mittels Kalziumphosphat	39
2.3.8	Bestimmung der Konzentration von Hygromycin für die Selektion resistenter BHK21-Zellen mittels einer <i>kill curve</i>	40
2.3.9	Stabile Transfektion von Sp2/0-Myelomazellen mittels Elektroporation	40
2.3.10	Kultivierung der antikörperexprimierenden Myelomklone für die Produktion	40
2.3.11	Isolation humaner PBMCs gesunder Spender aus LRS-Kammern mittels Ficoll	41
2.4	<i>Proteinchemische Methoden</i>	41
2.4.1	Isolation der antikörperenthaltenden periplasmatischen <i>E.coli</i> -Fraktion	41
2.4.2	Isolation der <i>scFv</i> - und <i>diabody</i> -Antikörperproteine aus dem Kulturüberstand transienter und stabiler BHK21-Klone mittels NiNTA-gekoppelten magnetischen Agarosebeads	42
2.4.3	Analyse der Proteinexpression mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	42
2.4.4	Analyse der Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz	43
2.4.5	Aufreinigung der bispezifischen <i>scFv</i> -Antikörper mittels Protein-L-Affinitätschromatographie	44
2.4.6	Ultrafiltration und Dialyse der aufgereinigten bispezifischen <i>scFv</i> -Antikörperproteine	44
2.4.7	Analyse der Antikörperproteinkonzentration mittels BCA-Bestimmung	44
2.4.8	Qualitätsanalyse der aufgereinigten Antikörperproteine mittels Silberfärbung	44
2.5	<i>Immunologische Methoden</i>	45
2.5.1	Analyse der Bindung der anti-VEGFR-2/KDR-Domäne des bispezifischen r3V <i>scFv</i> -Antikörpers an lösliches KDR mittels ELISA	45
2.5.2	Analyse der Bindung der bispezifischen r3V und r3N <i>scFv</i> - und der UCHT-1 x A7 und UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -Antikörper mittels <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS)	45
2.5.3	BrdU-Assay zur Analyse der Proliferation humaner PBMCs nach Stimulation mit dem bispezifischen r3V und r3N <i>scFv</i> -Antikörper	46
2.5.4	BrdU-Assay zur Analyse der Proliferation humaner PBMCs nach Stimulation mit dem bispezifischen r3V und r3N <i>scFv</i> -Antikörper in Gegenwart der antigenpositiven Ziel- und der antigennegativen Kontrollzelllinie	47

2.5.5	Zytotoxizitätsanalyse der bispezifischen r3V und r3N <i>scFv</i> -Antikörper	48
3	Ergebnisse	50
3.1	<i>Generierung und Expression der OKT-3 und ERIC-1 scFv- und des OKT-3 x ERIC-1 diabody-Antikörpers in E.coli sowie BHK21-Zellen</i>	50
3.1.1	Herstellung der <i>scFv</i> - und <i>diabody</i> -DNA-Konstrukte	50
3.1.2	Transiente Expression des OKT-3 und ERIC-1 <i>scFv</i> - sowie des OKT-3 x ERIC-1 <i>diabody</i> -Antikörpers in HB2151 <i>E. coli</i> -Zellen	52
3.1.3	Transiente Expression des OKT-3 und ERIC-1 <i>scFv</i> -Antikörpers in BHK21-Zellen	54
3.1.4	Stabile Expression des OKT-3 und ERIC-1 <i>scFv</i> - sowie des OKT-3 x ERIC-1 <i>diabody</i> -Antikörpers in BHK21-Zellen	55
3.1.4.1	Analyse der Gen- und Proteinexpression der OKT-3 und ERIC-1 <i>scFv</i> -Antikörper	55
3.1.4.2	Analyse der Gen- und Proteinexpression des OKT-3 x ERIC-1 <i>diabody</i> -Antikörpers	57
3.1	<i>Generierung und Expression des UCHT-1 x A7 diabody-Antikörpers in E. coli und BHK21-Zellen</i>	59
3.2.1	Herstellung des UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -DNA-Konstrukts	59
3.2.2	Transiente Expression des UCHT-1 und des A7 <i>scFv</i> - sowie des UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers in HB2151 <i>E. coli</i> -Zellen	60
3.2.3	Stabile Expression des UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers in BHK21-Zellen	62
3.2.3.1	Analyse der Gen- und Proteinexpression	62
3.3	<i>Generierung und Expression des D29 scFv- und des UCHT-1 x D29 diabody-Antikörpers in E. coli und BHK21-Zellen</i>	63
3.3.1	Herstellung des UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -DNA-Konstrukts	63
3.3.2	Transiente Expression des D29 <i>scFv</i> -Antikörpers in HB2151 <i>E. coli</i> -Zellen	65
3.3.3	Stabile Expression des UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -Antikörpers in BHK21-Zellen	66
3.3.3.1	Analyse der Gen- und Proteinexpression	66
3.4	<i>Funktionsanalyse des UCHT-1 x A7 diabody- sowie des D29 scFv- und UCHT-1 x D29 diabody-Antikörpers</i>	67

3.4.1	Bindungsanalyse des in <i>E. coli</i> exprimierten UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers an CD3 ⁺ Jurkat- und VEGFR-2 ⁺ PAE/KDR-Zellen	67
3.4.2	Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen exprimierten UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers an CD3 ⁺ Jurkat- und VEGFR-2 ⁺ PAE/KDR-Zellen	69
3.4.3	Bindungsanalyse des in <i>E. coli</i> exprimierten D29 <i>scFv</i> -Antikörpers an NCAM ⁺ IMR5- und TE671-Zellen	70
3.4.4	Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen exprimierten UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -Antikörpers an CD3 ⁺ Jurkat- und NCAM ⁺ TE671-Zellen	72
3.5	<i>Herstellung und Auswahl der bispezifischen r3V sowie r3N scFv-Antikörperklone</i>	73
3.5.1	Subklonierung und Selektion stabiler bispezifischer r3V <i>scFv</i> -Klone	73
3.5.2	Subklonierung und Selektion stabiler bispezifischer r3N <i>scFv</i> -Klone	74
3.6	<i>Produktion und Aufreinigung der bispezifischen r3V und r3N scFv-Antikörper</i>	76
3.6.1	Qualitätsanalyse der bispezifischen r3V und r3N <i>scFv</i> -Antikörperproteine	76
3.7	<i>Funktionsanalyse der bispezifischen r3V und r3N scFv-Antikörper</i>	77
3.7.1	Analyse der Bindung des bispezifischen r3V <i>scFv</i> -Antikörpers an CD3 ⁺ Jurkat- und VEGFR-2 ⁺ PAE/KDR-Zellen	77
3.7.2	Analyse der Bindung des bispezifischen r3N <i>scFv</i> -Antikörpers an CD3 ⁺ Jurkat- und NCAM ⁺ TE671-Zellen	81
3.7.3	Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3V <i>scFv</i> -Antikörpers zur Aktivierung der Proliferation CD3 ⁺ T-Zellen einer humanen PBMC-Population	84
3.7.4	Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3N <i>scFv</i> -Antikörpers zur Aktivierung der Proliferation CD3 ⁺ T-Zellen einer humanen CD56-depletierten PBMC-Population	87
3.7.5	Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3V <i>scFv</i> -Antikörpers zur Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen und zur spezifischen Lyse VEGFR-2 ⁺ PAE/KDR-Zellen	90
3.7.6	Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3N <i>scFv</i> -Antikörpers zur Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen und zur spezifischen Lyse NCAM ⁺ IMR5-Zellen	97
4	Diskussion	99
4.1	Bewertung der Relevanz rekombinanter bispezifischer <i>scFv</i> -Antikörper	99

4.2	Bewertung der Evaluierung der <i>E. coli</i> - sowie der Säugetier-expressionssysteme	99
4.3	Gegenüberstellung der anti-NCAM <i>scFv</i> -Antikörper ERIC-1 <i>versus</i> D29	101
4.4	Gegenüberstellung der anti-CD3 <i>scFv</i> -Antikörper OKT-3 <i>versus</i> UCHT-1	103
4.5	Bewertung des bispezifischen r3V <i>scFv</i> -Antikörpers und seiner therapierelevanten Einsatzmöglichkeiten	104
4.6	Bewertung des bispezifischen r3N <i>scFv</i> -Antikörpers	110
4.7	Fazit und Perspektiven	112
	Literaturverzeichnis	113
	Anhang	123
	Lebenslauf	129
	Erklärung	130

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der embryonalen Neuralleiste	2
1.2	Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls und seiner Isoformen	5
1.3	Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur des VEGF-Rezeptors-2 und seiner ligandenvermittelten Signaltransduktion	8
1.4	Zusammenfassung der angiogenetischen Interaktionen von Tumor- und Endothelzelle und therapierelevanter Antiangiogeneseansätze	11
1.5	Schematische Darstellung ausgewählter rekombinanter Antikörperformate	14
1.6	Schematische Darstellung zur Generierung bispezifischer CD3 x TAA <i>scFv</i> -Antikörper aus den monoklonalen Parentalantikörpern und ihrer mechanistischen Interaktion mit T- und Tumorzelle	16
1.7	Gegenüberstellung der MHC-I-vermittelten T-Zell-gekoppelten Tumorzelllyse <i>versus</i> der mittels bispezifischer CD3 x TAA <i>scFv</i> -Antikörper erzeugten Tumorzelleliminierung	17
3.1	Schematische Darstellung der Generierung der ERIC-1 und OKT-3 <i>scFv</i> -DNA-Konstrukte mittels PCR	50
3.2	Schematische Darstellung der Generierung des OKT-3 x ERIC-1 <i>diabody</i> -DNA-Konstrukts mittels PCR	52
3.3	Transiente Expressionsanalyse des OKT-3 und des ERIC-1 <i>scFv</i> - sowie des OKT-3 x ERIC-1 <i>diabody</i> -Antikörpers in <i>E. coli</i>	53
3.4	Transiente Expressionsanalyse des OKT-3 und ERIC-1 <i>scFv</i> -Antikörpers in BHK21-Zellen	54
3.5	Expressionsanalyse der stabil in BHK21-Zellen transfizierten OKT-3 und ERIC-1 <i>scFv</i> -Antikörper auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot	56
3.6	Expressionsanalyse des stabil in BHK21-Zellen transfizierten OKT-3 x ERIC-1 <i>diabody</i> -Antikörpers auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot	58
3.7	Schematische Darstellung der Generierung des UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -DNA-Konstrukts mittels PCR	59
3.8	Transiente Expressionsanalyse des UCHT-1 x A7 <i>scFv</i> - sowie des UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers in <i>E. coli</i>	61

3.9	Expressionsanalyse des stabil in BHK21-Zellen transfizierten UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot	62
3.10	Schematische Darstellung der Generierung des UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -DNA-Konstrukts mittels PCR	64
3.11	Periplasmatische Expressionsanalyse des D29 <i>scFv</i> -Antikörpers in <i>E. coli</i>	65
3.12	Expressionsanalyse des stabil in BHK21-Zellen transfizierten UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -Antikörpers auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot	66
3.13	FACS-Bindungsanalyse des in <i>E. coli</i> exprimierten UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen	68
3.14	FACS-Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen stabil exprimierten UCHT-1 x A7 <i>diabody</i> -Antikörpers an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen	70
3.15	FACS-Bindungsanalyse des in <i>E. coli</i> exprimierten D29 <i>scFv</i> -Antikörpers an NCAM-positive IMR5- sowie TE671-Zellen	71
3.16	FACS-Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen stabil exprimierten UCHT-1 x D29 <i>diabody</i> -Antikörpers an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive TE671-Zellen	72
3.17	FACS-Bindungsanalyse des stabil in Sp2/0-Myelomazellen exprimierten r3V <i>bsscFv</i> -Subklons an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen	74
3.18	FACS-Bindungsanalyse der stabil in Sp2/0-Myelomazellen exprimierten r3N <i>bsscFv</i> -Subklone an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive TE671-Zellen	75
3.19	Nicht-denaturierende SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung zur Analyse der Proteinqualität der bispezifischen <i>scFv</i> -Antikörper	76
3.20	FACS-Titration zur Analyse der Bindung des aufgereinigten r3V <i>bsscFv</i> an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen	78
3.21	ELISA-Titration zur Analyse der Bindung des aufgereinigten r3V <i>bsscFv</i> an lösliches VEGFR-2/KDR-Protein	79
3.22	FACS-Bindungsanalyse des aufgereinigten r3V <i>bsscFv</i> an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen	80
3.23	FACS-Titration zur Analyse der Bindung des aufgereinigten r3N <i>bsscFv</i> an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive TE671-Zellen	82

3.24	FACS-Bindungsanalyse des aufgereinigten r3N <i>bsscFv</i> an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive IMR5-Zellen	83
3.25	BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner PBMCs mittels des r3V <i>bsscFv</i>	85
3.26	BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner PBMCs mittels des r3V <i>bsscFv</i> in Gegenwart inaktivierter PAE/KDR-Ziel- und PAE/FLT1-Kontrollzellen	86
3.27	BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner CD56-depletierter PBMCs mittels des r3N <i>bsscFv</i>	88
3.28	BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner CD56-depletierter PBMCs mittels des r3N <i>bsscFv</i> in Gegenwart inaktivierter IMR5-Ziel- und LS-Kontrollzellen	89
3.29	Qualitative Analyse der r3V <i>bsscFv</i> -vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Ziel- und VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen	91
3.30	FACS-Analyse der r3V-vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Ziel- und VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen	92
3.31	FACS-Analyse der r3V <i>bsscFv</i> -vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Zielzellen	94
3.32	FACS-Analyse der r3V <i>bsscFv</i> -vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen	96
3.33	FACS-Analyse der r3N <i>bsscFv</i> -vermittelten Zytotoxizität NCAM-positiver IMR5-Zielzellen	97

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bsscFv	<i>bispecific single chain Fv</i> (bispesifischer scFv)
CamKII	Calmodulinabhängige Kinase
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CH	<i>constant heavy domain</i> (konstante schwere Domäne)
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	<i>diethylene pyrocarbonate</i> (Diethylenpyrokarbonat)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittelagentur)
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated protein kinase</i>
E:T ratio	<i>effector : target cell ratio</i> (Effektor : Zielzellen-Verhältnis)

EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment, antibody binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
Fc	<i>fragment, crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FDA	<i>US food and drug administration</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flk-1	<i>fetal liver kinase 1</i> (= VEGFR-2)
FLT-1	<i>Fms-related tyrosine kinase</i> (= VEGFR-1)
GFR α	<i>GDNF family receptor alpha</i>
GDNF	<i>glial cell line derived neurotrophic factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HAMA	<i>human anti-mouse antibodies</i> (humane anti-Maus-Antikörper)
IgG	Immunglobulin G
Il-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i> (= VEGFR-2)
LB	<i>lysogeny broth</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LRS	<i>leukoreduction system chambers</i>
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> (Mitogenaktivierte Proteinkinase)
MeOH	Methanol
MHC I	<i>major histocompatibility complex I</i> (Hauptkompatibilitätskomplex I)
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MSD1	<i>muscle specific domain 1</i> (muskelspezifische Domäne 1)
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i> (neurales Zelladhäsionsmolekül)
NF κ B	<i>nucleo factor kappa b</i>
NiNTA	Nickelchelat
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte

PAE	<i>porcine aortic endothelial cells</i> (Schweineaortazellen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
POD	Peroxidase
PP	Periplasma
PSA	<i>polysialic acid</i> (Polysialinsäure)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i> (Rezeptortyrosinkinase)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAA	<i>tumour associated antigen</i> (tumorassoziiertes Antigen)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Trk	<i>tyrosine receptor kinase</i> (Tyrosin-Rezeptorkinase)
TZR	T-Zellrezeptor
ÜS	Überstand
V _H	<i>variable heavy chain</i> (variable schwere Kette)
V _L	<i>variable light chain</i> (variable leichte Kette)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems. Es ist weltweit die zweithäufigste aller pädiatrischen Krebserkrankungen sowie die häufigste extrakranielle solide Tumorerkrankung bei Kindern und steht daher im Fokus von Wissenschaft und Medizin. In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei 1,2 pro 100 000 Kindern unter 15 Jahren (*Kaatsch et al. 1995*). Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, dessen Entstehung auf die Entartung embryonaler neuronaler Zellen, den Neuroblasten, zurückzuführen ist. Es handelt sich beim Neuroblastom um einen sehr heterogenen Tumor, der hinsichtlich morphologischer als auch maligner Charaktereigenschaften in 4 Stufen klassifiziert ist (*Shimada et al. 1999*). Das Neuroblastom kann genetisch prädisponiert sein sowie sporadisch entstehen. Die vererbte Entstehung folgt dabei einem autosomal-dominantem Muster und das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 9 Monaten, während die sporadische Erkrankung bei einem mittleren Alter von 18 Monaten diagnostiziert wird. Bemerkenswert für den Krankheitsverlauf des Neuroblastoms ist, dass die spontane Regression 10 bis 100 mal höher liegt als bei anderen humanen Tumoren (*Evans et al. 1976, Pritchert und Hickmann 1994*). Außerdem kann die maligne Form des Neuroblastoms in ein benignes Ganglioneuroma ausdifferenzieren.

1.1.1 Entstehung des Neuroblastoms

Ursprung aller neuronalen Zelltypen ist die im Embryo angelegte Neuralleiste. Diese unterteilt sich in den kranialen, den vagalen, den trunkalen und den lumbosakralen Abschnitt, aus deren Progenitorzellen verschiedene neuronale Gewebe und Organe hervorgehen. Die embryonalen Vorläuferzellen des trunkalen Abschnitts bilden vor allem die Nebennieren sowie Melanozyten und Schwannsche Zellen aus. Da das Neuroblastom aus diesen Vorläuferzellen gebildet wird, findet sich der Ursprung dieser Tumore zumeist im Bereich der Nebennieren, aber auch in Ganglien des sympathischen Nervensystems, des Abdomens als auch in parasymphatischen Ganglien des Beckens sowie in der Wirbelsäule selbst. Manche Tumore finden ihren Ursprung auch in parasymphatischen Ganglien der Brust und des Nackens. (*Übersichtsartikel Dyer 2004*)

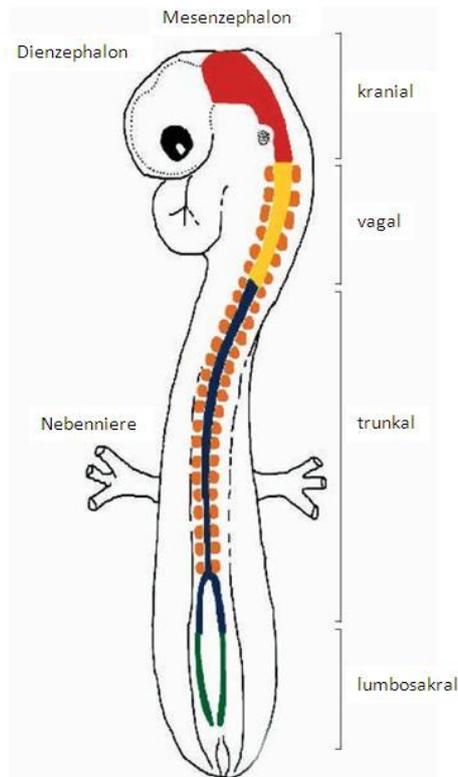


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der embryonalen Neuralleiste Unterteilung der Neuralleiste in den kranialen, vagalen, trunkalen und lumbosakralen Abschnitt. Beispiel der Differenzierung der trunkalen Progenitorzellen unter anderem in Nebennierengewebe, dem Ort häufiger Neuroblastomentwicklungen. (modifiziert nach *Dyer 2004*)

1.1.2 Molekulare und genetische Eigenschaften des Neuroblastoms

Das Neuroblastom ist durch eine Reihe von genetischen Merkmalen gekennzeichnet, von denen die Amplifikation des *MycN*-Protoonkogens eines der prägnantesten in der Entstehung des Neuroblastoms darstellt (*Weiss et al. 1997*). Dieses Phänomen ist in 20 % der Fälle anzutreffen und kann ebenso als prognostischer Marker betrachtet werden, da eine *MycN*-Amplifizierung meist mit einer schlechten Prognose korreliert (*Brodeur et al. 1984*). Weiterhin charakteristisch für das Neuroblastom ist der Zugewinn an genetischem Material des Chromosoms 17q in Form einer Trisomie, die mit einer adversen Prognose in Verbindung steht (*Bown et al. 1999*). Im Gegensatz dazu tragen auch Verluste genetischen Materials zur Krankheitsentstehung bei. Dies zeigt sich in allelischem Verlust, dem sogenannten *loss of heterozygosity* (LOH), der Chromosomenbanden 1p36, 11q23 sowie 14q23 (*Übersichtsartikel Maris und Matthay 1999*). Dabei steht die 1p LOH in Korrelation zu einer erhöhten *MycN*-Expression und trägt im Gegensatz zu LOH 11q und 14q zu einer schlechten Prognose bei (*Caron et al. 1996*). Ein anderes charakteristisches Merkmal ist die Expression der zu der Tyrosin-Rezeptorkinase-Familie zählenden Neurotrophinrezeptoren TrkA, B und C (*Übersichtsartikel Barbacid 1995*).

Diese Rezeptoren spielen physiologisch eine wichtige Rolle in der neurotrophinvermittelten Signaltransduktion und der dadurch gesteuerten neuronalen Entwicklung. Im Neuroblastom korreliert die Expression von TrkA und C mit einer guten und die von TrkB mit einer schlechten Prognose. (Brodeur et al. 1997) Bei den Tumoren, die TrkB exprimieren, konnte auch die Expression des *brain derived neurotrophine factor* (BDNF), dem TrkB-Liganden, nachgewiesen werden (Nakagawara et al. 1994). Dies wiederum ermöglicht die autokrine oder parakrine Aktivierung von TrkB, die die Tumorentwicklung entgegen einer guten Prognose begünstigt. Ebenso wie der Verlust von 1p steht die TrkB-Expression in Korrelation zu einer MycN-Amplifizierung. Ein weiteres charakteristisches Merkmal des Neuroblastoms ist das Vorhandensein von polysialysiertem NCAM (PSA-NCAM). Bei der Polysialysierung handelt es sich um eine posttranslationale dynamisch regulierte Modifikation des NCAM durch langkettige Polysialinsäuremoleküle (Hildebrandt et al. 2008). Normalerweise ist PSA-NCAM universell während der Embryonalentwicklung vorzufinden. Deren Verteilung beschränkt sich jedoch postnatal auf wenige Regionen im Gehirn und in regenerativem peripheren Nervengewebe. Im Neuroblastomgewebe ist PSA-NCAM ein Marker für den Differenzierungsgrad des Tumors. Dabei korreliert eine hohe PSA-NCAM-Expression mit einem niedrigen Differenzierungs- und damit einem hohen Malignitätsgrad und *vice versa* (Glüer et al. 1998). Somit ist der PSA-NCAM-Status ein klinischer Parameter mit prognostischer Relevanz.

1.1.3 Therapie des Neuroblastoms

Ausgangspunkt aller Behandlungen von Neuroblastompatienten ist die operative Entfernung von Tumormaterial zur histologischen Diagnosestellung und Bestimmung stratifizierender molekularer Marker. Bei operablen lokalisierten Neuroblastomen ohne Risikofaktoren ist in den allermeisten Fällen nach der Operation keine Chemotherapie erforderlich. Analog erhalten auch Patienten des 4S-Stadiums trotz Vorliegen von Metastasen nur dann eine Chemotherapie, wenn bedrohliche tumorassoziierte Symptome vorliegen. Ansonsten erfolgt eine Beobachtung, da diese Patienten häufig eine Spontanregression postoperativ vorhandener Tumoren zeigen (Hero et al. 2008). Säuglinge mit Stadium 4-Erkrankung und lokalisierte Neuroblastomen mit entsprechenden klinischen und molekulargenetischen Charakteristika (Simon et al. 2004) werden im Rahmen der mittleren Risikogruppe behandelt. Sie erhalten eine konventionelle Chemotherapie und werden nach Ansprechen einer vollständigen Tumoroperation und gegebenenfalls einer anschließenden Bestrahlung unterzogen. Kinder mit Stadium 4 sowie Patienten mit MycN-Amplifikation werden der Hochrisikopatientengruppe zugeordnet.

Sie erhalten eine intensive Induktionschemotherapie gefolgt von einer Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation (ASCT) (Berthold et al. 2005, Matthay et al. 1999). Verbleibt nach der Induktionschemotherapie und Operation des Primärtumors noch aktives Tumorgewebe, ist eine ergänzende MIBG-Therapie im Rahmen der ASCT (Schmidt et al. 2006) und eine externe Radiotherapie (Simon et al. 2006) nach ASCT erforderlich. Eine darauffolgende weiterführende Strategie der Behandlung ist der Einsatz einer biologischen Therapie in Form von Immuntherapeutika wie zum Beispiel dem chimären monoklonalen anti-GD2-Antikörper ch14.18 (Simon et al. 2004, Simon et al. 2005) oder auch 13-cis-Retinsäure (Finklestein et al. 1992, Villablanca et al. 1995, Matthay et al. 1999). Neben den etablierten konventionellen Ansätzen der Chemo- und Strahlentherapie, die einer hohen Toxizität für den Patienten geschuldet ist, bietet der Einsatz von antikörperbasierenden Therapien die zukünftige klinische Plattform für eine gezielt spezifische und besser verträgliche Anwendung. So werden Studien beschrieben, die den ch14.18 allein (Cheung et al. 2001), mit Zytokinen wie Il-2 und GM-CSF (Cheung und Yu 2000) in Kombination oder als direkt gekoppeltes Immunzytokin wie das hu14.18-Il-2 (Neal et al. 2004) verwenden. Auch in der Applikation von Radioisotopen bieten Antikörper, wie zum Beispiel der radiomarkierte anti-GD2-Antikörper ¹³¹I-3F8 (Cheung et al. 1991), eine Einsatzmöglichkeit zur spezifischen Administration von Therapeutika. Zusätzlich bietet die Anwendung antiangiogenetischer Ansätze für die Behandlung maligner und vor allem stark vaskularisierter Tumore eine alternative Therapiemöglichkeit (Zhang et al. 2009).

1.2 Eigenschaften des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM/CD56)

1.2.1 Aufbau und Funktion

NCAM ist ein membranständiges Adhäsionsmolekül, das physiologisch in 3 Isoformen vorzufinden ist, die aus einem gemeinsamen Genprodukt durch alternatives Splicing entstehen. Die Isoformen haben ein Molekulargewicht von jeweils 120, 140 und 180 kD. Sie alle sind in ihrer zytoplasmatischen Domäne identisch und unterscheiden sich jeweils nur in der Länge der intrazellulären Domäne, die bei der kleinsten 120 kD-Isoform komplett fehlt und dessen Proteinprodukt lediglich durch einen verbliebenen GPI-Anker in der Membran verankert ist, aber keine Signaltransduktion mehr ausführen kann. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus fünf Ig-ähnlichen Einzeldomänen und zwei Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen F3I und F3II zusammen (Cunningham et al. 1987). Die extrazelluläre Ig-Domäne V fungiert als Anheftungsstelle der Polysialinsäure (PSA), dem typischen NCAM-assoziierten Zuckerrest, der posttranslational angefügt wird. (Übersichtsartikel Walmod et al. 2004) Die Struktur der Isoformen ist in Abbildung 1.2 zusammenfassend dargestellt.

Zusätzlich zu den membranständigen Isoformen ist in der Abbildung die lösliche NCAM-Isoform gezeigt, die eine muskelspezifische Domäne 1 (MSD-1) besitzt und in Muskel sowie Gehirn zu finden ist (Gower *et al.* 1988). NCAM wird vor allem auf neuronalen Zellen des Gehirns und des peripheren Nervensystems exprimiert und dient dabei der Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität. Außerdem wird CD56 auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie von NKT-Zellen, einer Subpopulation der CD3-positiven T-Zellen, exprimiert. NCAM-Expression ist aber nicht nur, wie oben beschrieben, in gesundem Gewebe vorhanden, sondern auch als tumorassoziiertes Antigen (TAA) auf Krebszellen exprimiert, insbesondere auf Rhabdomyosarkoma-, Glioma- und Neuroblastomazellen sowie auf Zellen des kleinzelligen Bronchial- und des medullären Schilddrüsenkarzinoms. Dabei besteht im Krebsgewebe zusätzlich die Besonderheit, dass das NCAM-Molekül je nach Entwicklungsstadium des Tumors polysialysiert (PSA-NCAM) vorliegt.

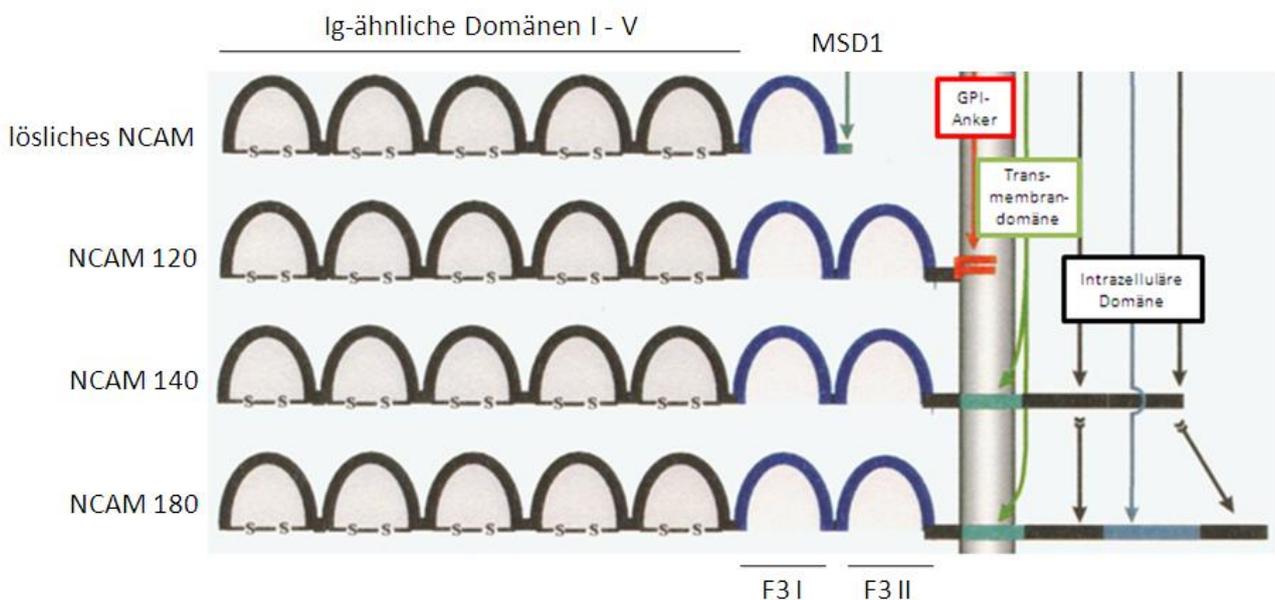


Abbildung 1.2 Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls und seiner Isoformen Darstellung der 120, 140 und 180 kD-Isoformen mit den fünf Ig-ähnlichen Domänen I – V (schwarz) und den Fibronektin-Typ-III-ähnlichen Domänen F3 I und II (blau) sowie den intrazellulären Domänen für NCAM 140 und 180 sowie dem GPI-Anker der NCAM 120-Isoform. Zusätzliche Darstellung der löslichen NCAM-Isoform mit der MSD-1-Domäne. (modifiziert nach Walmod 2004)

1.2.2 NCAM-vermittelte Signaltransduktion

Das neurale Zelladhäsionsmolekül ist in vielfältiger Weise an molekularen Wechselwirkungen und Signaltransduktionskaskaden beteiligt. Die Interaktionen, in denen NCAM involviert ist, sind dabei homo- sowie heterophiler Natur.

NCAM ist in der Lage, homophil an NCAM über *Zipper*-ähnliche Strukturen in *cis*- und *trans*-Konfiguration (Soroka et al. 2003) sowie heterophil an L1-CAM (Kadmon et al. 1990) und HNK-1-vermittelt an Laminin (Hall et al. 1993 und 1997) zu binden und damit Zell-Zell-Adhäsion zu vermitteln. Dabei spielen auch Wechselwirkungen mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Heparin (Kiselyov et al. 1997) und Proteoglykanen (Grumet et al. 1993, Burg et al. 1995) eine wichtige Rolle. Neben der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten ist NCAM an intrazellulär vermittelten Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Migration von Neuriten und synaptischer Plastizität beteiligt (Übersichtsartikel Walsh und Doherty 1997). Dabei spielen unter anderem heterophile Interaktionen von NCAM mit dem *fibroblast growth factor receptor* FGFR-1 (Kiselyov et al. 2003) sowie mit dem *glial cell line derived neurotrophic factor* GDNF und seinem Rezeptor GFR α (Paratcha et al. 2003) eine wichtige Rolle. Die Aktivierung, Dimerisierung und Phosphorylierung von FGFR erfolgt direkt über NCAM-Bindung und zieht eine PLC γ -vermittelte Signaltransduktion nach sich. Durch die GFR/GDNF-NCAM-Wechselwirkung hingegen werden die Adaptermoleküle Fyn und Fak, die zu den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zählen, intrazellulär an NCAM rekrutiert, wodurch Fak phosphoryliert und aktiviert wird. Über ein Netzwerk an Signaltransduktionskaskaden werden schließlich die Proteinkinasen PKA, ERK1/2 und CamKII aktiviert, die die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie ELK-1, CREB und NF κ B zur Folge hat. (Übersichtsartikel Walmod et al. 2004)

1.2.3 Die Rolle von NCAM in der Tumorentwicklung

Wie bereits angesprochen, liegt NCAM in malignen Erkrankungen meist als glykosyliertes Molekül in Form von PSA-NCAM vor. Prozesse wie Tumorwachstum und Metastasierung sind durch eine erhöhte Expression von PSA-NCAM und eine damit einhergehende Unterbindung von NCAM-NCAM-Interaktionen charakterisiert (Tanaka et al. 2000, Suzuki et al. 2005), die in einer verminderten Zelladhäsion resultiert. Studien belegen, dass die Entfernung von PSA auf PSA-NCAM-positiven Krebszellen zur Inhibierung von Tumorzellwachstum- und differenzierung führt (Seidenfaden et al. 2003) und intrazelluläre NCAM-Signaltransduktion gefördert wird. Während NCAM-Expression eine Tumorinvasivität vermindert, werden durch Verlust von NCAM Prozesse wie Tumorlymphangiogenese und Lymphmetastasierung begünstigt. Daraus ergeben sich potentielle Möglichkeiten, durch den Einsatz von NCAM-Liganden in Form von NCAM-Antikörpern (Jensen und Berthold 2007) oder NCAM selbst (Krushel et al. 1998), selektiv intrazellulär NCAM-vermittelte Prozesse im Krebsgewebe zu aktivieren und damit Prozessen wie Proliferation sowie Tumorinvasivität und Metastasierung entgegenzuwirken.

1.2.4 NCAM als *target* der Neuroblastomtherapie

Neben dem bereits erwähnten neuroblastomassoziierten Gangliosid GD2-Antigen hat auch NCAM, als Ziel immuntherapeutischer Ansätze, Einsatz in wissenschaftlichen Studien gefunden (Jensen und Berthold 2007). Eine anti-GD2-Antikörpertherapie ist mit erheblichen klinischen Nebenwirkungen wie dem *capillary leak syndrome* und anderen schweren opioidpflichtigen Schmerzen verbunden (Ozkaynak et al. 2000). Daher besteht eine starke Rationale für die Entwicklung von Therapien gegen andere auf dem Neuroblastom exprimierte Antigenen, wie zum Beispiel NCAM. Dabei basieren einige Ansätze auf der Verwendung des monoklonalen NCAM-Antikörpers ERIC-1 (Bourne et al. 1991). Abgeleitet davon, wurde ein humanisierter *scFv*-Antikörper D29 (Whittington et al. 2001) auf Basis des *CDR grafting* hergestellt, der als Bestandteil für die Herstellung von Immunzytokinen (Dehal et al. 2002) sowie chimären T-Zell-Rezeptoren (Guest et al. 2005) Einsatz gefunden hat. Weiterhin wurde ein vollständig chimärer NCAM-Antikörper ch.MK1 mittels Immunisierung von F004-Mäusen (Jensen et al. 2007) hergestellt, der eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) *in vitro* gegen Neuroblastomzellen ausführt und auch im *SCID*-Mausmodell Wirkung zeigte (Klehr et al. 2009). Neben den genannten monospezifischen NCAM-Antikörpern existiert auch ein muriner bispezifischer CD3 x NCAM-Antikörper (Klon OKT-3 x ERIC-1), der mittels Tetradomatechnologie generiert und hinsichtlich seiner Zytotoxizitätseigenschaften *in vitro* erfolgreich charakterisiert worden ist (Jensen et al. 2003). Des Weiteren sind NCAM-gekoppelte Immunradiokonjugate in Form des ¹³¹J-UJ13A in klinischen (Lashford et al. 1987) und in Form des ¹³¹J-ERIC1 in präklinischen Studien (Bongartz et al. 2008) zur Anwendung gekommen. Auch werden Immuntoxine beschrieben, bei denen unter anderem das humanisierte NCAM-Konjugat huN901-DM (IMGN901) Einsatz findet. Das Präparat IMGN901 befindet sich bereits in klinischen Phase I-Studien zur Therapie CD56-exprimierender solider und hämatologischer Tumore (www.immunogen.com).

1.3 Eigenschaften des VEGF-Rezeptors-2 (VEGFR-2/KDR)

1.3.1 Aufbau, Funktion und Signaltransduktion

Der *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGF-Rezeptor-2) ist ein auf Endothel- und seinen Vorläuferzellen exprimierter membrangebundener Rezeptor der Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie (RTKs). Er stellt in Wechselwirkung mit dem löslichen VEGF-Wachstumsfaktor A als auch VEGF-E (Meyer et al. 1999) einen integralen Bestandteil des Blutlymphgefäßsystems sowie einen Hauptakteur in der Angiogenese, das heißt der Neubildung von Gefäßen, dar.

Der VEGFR-2 besteht aus sieben extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Daraus resultiert auch die Bezeichnung des humanen VEGF-Rezeptor-2 als *kinase inserted domain receptor* (KDR). Typisch, wie für andere RTKs, ist die Eigenschaft, nach Aktivierung durch Ligandenbindung, Homo- oder Heterodimere bilden und über Phosphorylierungsprozesse Signale in die Zelle weiterleiten zu können. Dabei werden Effektorfunktionen vermittelt, die für das Zellwachstum, die Proliferation, die Migration als auch die Differenzierung von Endothelzellen sowie für die vaskuläre Permeabilität wichtig sind. Angiogenese ist so zum Beispiel für physiologische Prozesse wie Embryonalentwicklung, Ovulation, Menstruation als auch Wundheilung unerlässlich. Untypisch ist, dass es sich bei den VEGF-Rezeptoren, im Gegensatz zu zum Beispiel den EGF-Rezeptoren, um eine PLC γ 1- statt Ras-vermittelte MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade handelt.

(Übersichtsartikel McMahon 2000, Ferrara et al. 2003, Shibuya 2006)

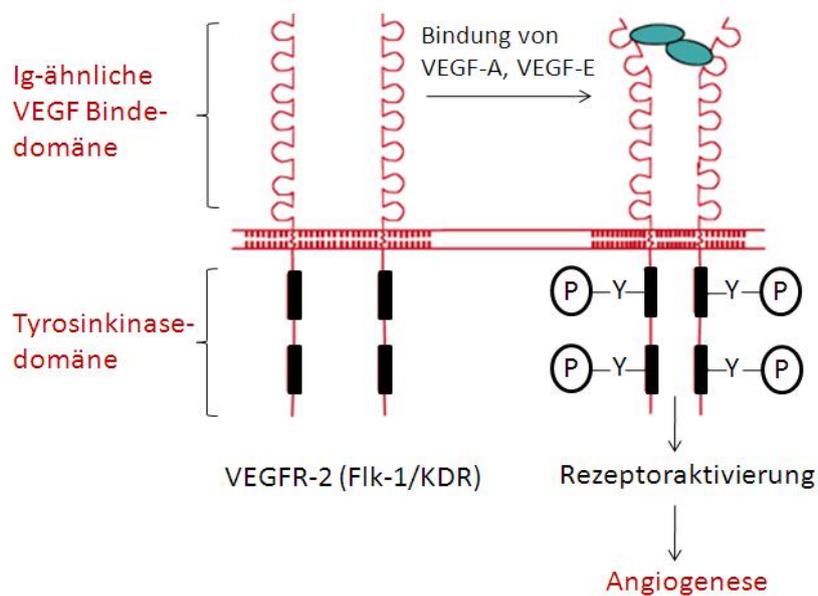


Abbildung 1.3 Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur des VEGF-Rezeptors-2 und seiner ligandenvermittelten Signaltransduktion (modifiziert nach McMahon 2000)

1.3.2 Die Rolle von VEGFR-2 in der Tumorangiogenese

Das Zusammenspiel von VEGF und VEGFR-2 hat neben seiner physiologischen auch eine pathophysiologische Funktion, die besonders im Zusammenhang mit Tumorwachstum und Tumorpropagierung, aber auch bei chronischen inflammatorischen Erkrankungen oder Retinopathien von Bedeutung ist. Tumorangiogenese führt dazu, dass ein Tumor über eine minimale Größe expandieren und sich durch Metastasierung in periphere Organe verteilen kann.

Ein Grund besteht darin, dass die meisten Tumore als auch das tumorassoziierte Stroma eine Überexpression von VEGF aufweisen. VEGF kann dann vermehrt an den VEGF-Rezeptor-2 der Endothelzellen binden und so die Neubildung von Gefäßen aktivieren, die dann das umgebende Tumorgewebe mit Nährstoffen versorgen können. Interessant dabei ist, dass die erhöhte VEGF-Genexpression durch die hypoxischen Bedingungen im Tumorrinneren durch den Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor* (HIF) induziert werden (*Schweiki et al. 1992*). So spielt einerseits ein verstärkter parakriner Effekt des von den Tumorzellen sekretierten VEGF-A auf die Endothelzellen eine entscheidene Rolle. Andererseits jedoch kann die Endothelzelle des Tumorgefäßsystems durch VEGF-induzierte Überexpression von VEGFR-2 selbst zur Tumorangiogenese beitragen. Dabei ist bemerkenswert, dass die VEGFR-2-Expression im vaskulären System des Tumors um das 3 bis 5-fache höher ist als im normalen Gewebe (*Plate et al. 1994*). Der Grad der Angiogenese kann in Form von Gefäßdichte ermittelt und als Maß für die Prognose eines invasiven Tumors herangezogen werden. Dabei korreliert eine hohe Gefäßdichte mit einer hohen Invasivität und einer schlechten Prognose, wie es am Beispiel des Brust- und Prostatakarzinoms beschrieben wird (*Weidner et al. 1991 und 1993*). Hingegen erlaubt eine geringe Gefäßdichte eine gute Prognose und ist Zeichen geringerer Invasivität. Wird das VEGF-VEGFR-System negativ beeinflusst, so kann Tumorwachstum unterbunden werden.

1.3.3 Das VEGF-VEGFR-System im Fokus der Tumorthherapie

In Anbetracht der Tatsache, dass Tumorangiogenese eine Schlüsselstellung in der Entwicklung und Etablierung eines Tumors und dessen Metastasierung inne hat und das VEGF-VEGFR-System maßgebend daran beteiligt ist, stellt es einen attraktiven Angriffspunkt tumortherapeutischer Ansätze dar. Solide Tumore weisen eine geringe Durchblutung, einen hohen interstitiellen Druck und unorganisierte Vaskularität auf. Dies führt dazu, dass konventionelle Chemotherapeutika schlecht im Tumor akkumulieren und daher wenig Wirkung zeigen. Hinzu kommt die Problematik, dass Tumore Resistenzmechanismen entwickeln können, die zu einer verminderten Wirkung von Pharmaka führen. Dementsprechend besteht eine große Nachfrage nach Therapeutika, die selektiver und spezifischer wirken. Eine Perspektive dabei ist, Strategien zu entwickeln, die gezielt an den Endothelzellen des tumorvaskulären Systems statt am Tumor selbst ansetzen. Es existieren eine Vielzahl von Strategien, von denen vor allem der Antikörpertherapie viel Beachtung geschenkt wird und die bereits in der Klinik Einsatz gefunden hat. Eines der bekanntesten Beispiele ist die Applikation des humanisierten anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab (Avastin[®]) (*Ferrara et al. 2004*) in Kombination mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) bei Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom.

Der Antikörper bindet mit hoher Affinität das lösliche VEGF-Protein und blockiert in seiner neutralisierenden Wirkung die ligandenvermittelte Aktivierung von VEGFR-2. Damit unterbindet Avastin als Angiogenesehemmer die Blutversorgung des Tumors und zusätzlich werden durch die Gabe von 5-FU sich teilende Krebszellen zerstört, so dass ein synergistischer Therapieerfolg erzielt werden kann. Ebenso wie VEGF kann mit Hilfe von Antikörpern auch der VEGF-Rezeptor-2 selbst blockiert werden (*Prewett et al. 1999, Krupitskaya et al. 2009*). Dabei finden nicht nur komplette monoklonale Antikörper Anwendung, sondern auch rekombinante *scFv*-Moleküle können von therapeutischer Relevanz sein. Dazu zählen zum Beispiel neutralisierende anti-VEGFR-2 *scFv*-Antikörper (*Zhu et al. 1998*) als auch der anti-VEGFR-2/KDR *scFv*-Antikörper A7, der als intrazellulärer *intrabody*-Antikörper den VEGFR-2 im Endoplasmatischen Retikulum zurückhält und das sogenannte *sprouting* von Endothelzellen verhindert (*Böldicke et al. 2005*). Neben der Antikörpertherapie existieren etliche andere Strategien, die auf Proteinebene eingreifen und klinischen Erfolg erzielen. Eine nicht-antikörpervermittelte Möglichkeit des Eingreifens auf Rezeptorebene ist die Applikation von Kinaseinhibitoren, wie zum Beispiel Soranfenib und Sunitinib, die die Signalweiterleitung nach Ligandenbindung blockieren und von denen sich bereits Inhibitormoleküle für VEGFR-1 und VEGFR-2 in klinischen Phasen befinden (*Übersichtsartikel Kerbel und Folkman 2002, Rosen 2005*). Die Ligand-Rezeptor-Interaktion kann auch durch Gabe von Peptidantagonisten unterbrochen werden. Diese konkurrieren mit dem VEGF-Protein um die Bindung an den Rezeptor und können durch höhere Affinitäten oder höhere Konzentrationen das VEGF verdrängen. Eine ähnliche Wirkung kann ausgenutzt werden, in dem der lösliche VEGFR-1 überexprimiert/überdosiert wird, der ebenfalls VEGF abfängt und somit dem VEGFR-2 seinen Liganden entzieht. Die genannten Blockierungsstrategien des VEGF-VEGFR-Systems sind ausschließlich auf die Endothelzelle als *target* gerichtet. Natürlich kann auch die Tumorzelle als Ziel der Inhibierung von Angiogenese dienen, in dem auf transkriptioneller Ebene die hypoxie-induzierte Überexpression von VEGF mittels *antisense*-Oligonukleotiden blockiert wird. Die gezielten therapeutischen Strategien zur Unterbindung der Tumorangiogenese sind in der Abbildung 1.4 zusammenfassend dargestellt.

(*Übersichtsartikel Matsumoto und Claesson-Welsh 2001*)

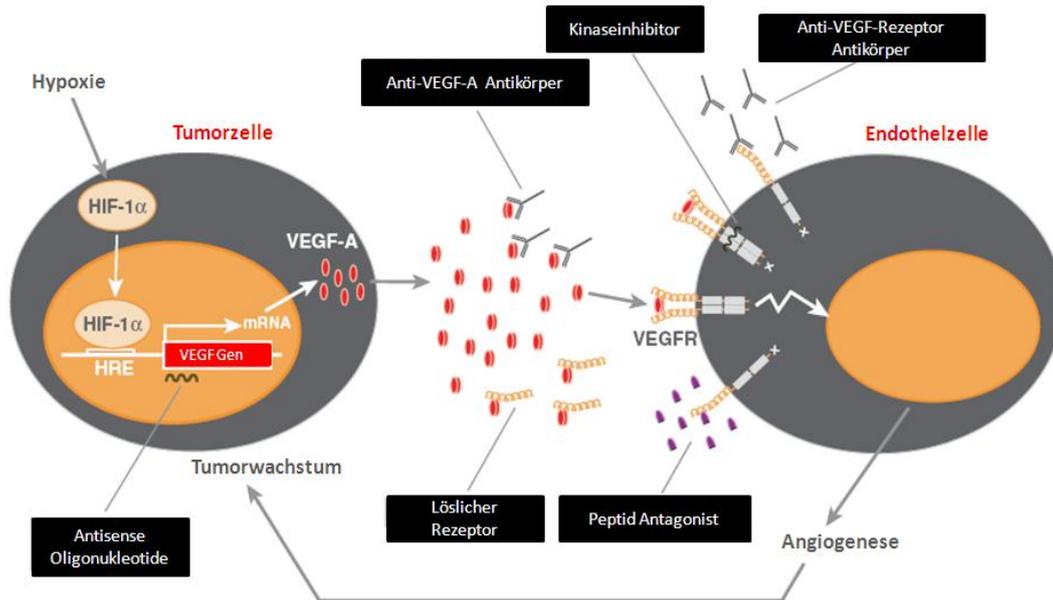


Abbildung 1.4 Zusammenfassung der angiogenetischen Interaktionen von Tumor- und Endothelzelle und therapierelevanter Antiangiogeneseansätze (modifiziert nach *Matsumoto und Claesson-Welsh 2001*)

1.3.4 Das VEGF-VEGFR-System als *target* der Neuroblastomtherapie

Wie der vorangegangene Abschnitt verdeutlicht, liegt in der Antiangiogenese, die mehrheitlich die tumoralen Endothelzellen als zentralen Angriffspunkt verwendet, ein Hauptschwerpunkt der Tumorthherapie. Antiangiogeneseansätze haben den Vorteil, dass sie für viele Tumorerkrankungen und damit universell einsetzbar sind. Dennoch kann das VEGF-VEGFR-System durchaus auch in einem engeren Spektrum Ziel tumortherapeutischer Ansätze sein, in dem zusätzlich auch die Tumorzelle angegriffen wird. Da das Wachstum von VEGFR-2-positiven Tumoren durch autokrine Sekretion von VEGF stimuliert werden kann (*Masood et al. 2001*), bietet das VEGF-VEGFR-System einen therapeutischen Angriffspunkt. Wenn das im Rahmen einer Neuroblastomtherapie erfolgen soll, kann aus den beschriebenen Befunden, dass in manchen Neuroblastomzelllinien als auch in humanen Primärmaterial nicht nur VEGF sondern auch VEGFR-2 überexprimiert wird (*Langer et al. 2000, Meister et al. 1999*), Nutzen gezogen werden. Daraus ergibt sich eine duale Rationale für den Einsatz eines VEGFR-Antikörpers. Diese besteht zum einen in der direkten Modulation des VEGFR und der direkten Hemmung der Tumervaskularisierung und zum anderen in der Vermittlung aktiver immuntherapeutischer Effekte im Tumorgewebe. Eine duale Funktion einer anti-VEGFR-2-Strategie ist zum Beispiel mittels der Applikation des Kinaseinhibitors ZD6474 in einem Neuroblastom-Xenograftmodell evaluiert worden (*Beaudry et al. 2008*).

1.4 Rekombinante Antikörpertechnologie in Forschung und Medizin

Die rekombinante Antikörpertechnologie ist ein umfangreicher, vielseitiger und zukunftssträchtiger Zweig der therapeutischen Forschung und Medizin. Die Etablierung der Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper (*Köhler und Milstein 1975*) und die molekularbiologischen Entwicklungen der letzten Dekaden haben den Weg für alternative antikörperbasierende Therapieformen, vor allem auf dem Gebiet der Infektions- und Krebserkrankungen, geebnet. Native monoklonale Antikörper können sehr potente Krebsmedikamente darstellen, von denen viele bereits den Weg in die Klinik gefunden haben (*Übersichtsartikel Zhang et al. 2007*). Neben ihrer Eigenschaft mittels der variablen Domänen spezifisch an ein bestimmtes Antigen zu binden, sind sie aufgrund der Effektorfunktionen ihres Fc-Teils in der Lage, eine antikörperabhängige zelluläre (*antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC*) sowie eine komplementabhängige (*complement dependent cytotoxicity – CDC*) Zytotoxizität zu vermitteln. Da dies eine systemische Immunantwort auslöst, die mit einer hohen Zytokinsekretion einhergeht, können starke Nebenwirkungen auftreten. Zudem wird bei der Gabe muriner Antikörper eine starke B-Zellantwort des menschlichen Organismus in Form einer HAMA (*human anti-mouse antibody*)-Reaktion ausgelöst, die dem therapeutischen Erfolg entgegenwirkt und für Nebenwirkungen verantwortlich ist. Um diese Faktoren der Immunogenität zu verringern und die Verträglichkeit für den Patienten zu verbessern, werden viele Strategien verfolgt, die das Ziel haben, potente therapeutische Antikörper in rekombinanten Formaten zu entwickeln. Die Entwicklung der rekombinanten Antikörpertechnologie läßt sich in 3 Phasen zusammenfassen. Zu der ersten Generation zählen die murinen Antikörper, die typischerweise mittels Hybridomatechnik hergestellt werden. In einer zweiten Generation haben chimäre sowie humanisierte Antikörper den Weg in die Entwicklung rekombinanter Antikörper gefunden. Bei den chimären Antikörpern sind die variablen Domänen murinen (~ 25 %) und die konstanten Domänen humanen Ursprungs (~ 75 %). Bei den humanisierten Antikörpern hingegen, die mittels *CDR grafting* (*Jones et al. 1986, Riechmann et al. 1988*) hergestellt werden, verbleiben nur noch die *complementary determining regions* (*CDRs*) der variablen Domänen, die für die Antigenbindung essentiell sind, murinen Ursprungs. Die konstanten Domänen sowie die *framework*-Regionen der variablen Antikörperdomänen sind humanen Ursprungs (~ 95 %). Diese Entwicklung hat sich in einer dritten Generation fortgesetzt, in der es möglich ist, komplett humane Antikörper mit Hilfe von transgenen Technologien zu generieren (*Brüggemann et al. 1989, Lonberg et al. 1994*). So exprimieren transgene Mäuse statt der murinen Gene der schweren und der κ -leichten Kette die humanen Antikörpersequenzen, aus denen sich nach Immunisierung antigenspezifische Antikörper mittels Hybridomatechnik isolieren lassen.

Des Weiteren lassen sich voll humane Antikörper aus Maussystemen mittels *yeast artificial chromosomes* (YACs) gewinnen (Green et al. 1994) sowie aus synthetischen humanen Antikörperbibliotheken isolieren. (Übersichtsartikel Lonberg 2005). Abseits davon bietet die transgene Plattform aber auch im Rahmen des sogenannten *gene farming* Möglichkeiten der Großproduktion rekombinanter Antikörper, wie es am Beispiel transgener Milchkühe belegt ist (Grosse-Hovest et al. 2004).

1.4.1 Übersicht über Herstellung rekombinanter Antikörper und ihre Formate

Monoklonale Antikörper bilden die Grundlage aller rekombinanten Antikörperformate. Diese können mittels Pepsinverdau zu sogenannten F(ab)₂-Fragmenten, die die ursprünglichste Form modifizierter Antikörper darstellt, verkleinert werden. Dabei bleibt die disulfidbrückenstabilisierte native Grundstruktur des Ursprungsantikörpers bestehend aus der V_L- und der C_L- sowie der V_H- und der C_{H1}-Domäne erhalten. Für die Herstellung der kleinen rekombinanten Formate dienen molekularbiologische Methoden als Grundlage. Neben *single domain*-Antikörpern bildet das *single chain Fv(scFv)*-Fragment die kleinste funktionale Einheit rekombinanter Antikörper. Es besteht ausschließlich aus den variablen Antikörperdomänen V_H und V_L, die mittels eines 15-Aminosäure(AS)-Peptidlinkers verbunden sind. Ein *scFv*-Fragment kann sowohl in der Anordnung von V_H-V_L als auch in der Orientierung V_L-V_H vorliegen. Die variablen Sequenzen können mit einem Gemisch aus antikörpergenspezifischen degenerierten Primern bei unbekanntem oder mit definierten Primern bei bekannten Sequenzen mittels PCR amplifiziert werden (Orlandi et al. 1989, Dübel et al. 1994, Pope et al. 1996). Die Zusammensetzung der degenerierten Primer basiert dabei auf den stark konservierten Bereichen aller bekannter muriner Antikörpersequenzen im variablen sowie konstanten Bereich. Die Antikörpersequenzen können dabei entweder aus vorliegenden Hybridomen für die direkte Klonierung in pro- oder eukaryotische Vektoren sowie aus Milzzellen immunisierter Mäuse gewonnen werden. Im letzten Fall erfolgt die Selektion spezifischer Antikörper mittels *phage display* (Übersichtsartikel Hoogenboom 2002), nachdem die Antikörpergene in einen Phagemidvektor kloniert worden sind. Aus den *scFv*-Einheiten gehen dann Formate wie zum Beispiel der bispezifische *single chain Fv(bsscFv)* oder der *single chain(sc)-diabody* hervor. Während bei dem *bsscFv* zwei *scFv*-Antikörper mit einem ebenfalls 15-AS-Linker verbunden sind, liegen die variablen Domänen im *diabody vice versa* in einer V_{HA}-V_{LB}-V_{HB}-V_{LA}-Anordnung vor. Die jeweiligen Ketten V_H und V_L sind mit einem Linker von nur 5 AS verbunden. Neben der monocistronischen Expression des in einer Polypeptidkette vorliegenden *sc-diabody* werden die beiden reziproken *scFv*-Fragmente des *diabody*-Antikörpers (Holliger et al. 1993), wie er in Abbildung 1.5 dargestellt ist, bicistronisch exprimiert.

Die beiden Polypeptidketten können sich mittels *self assembly* entsprechend zum *diabody*-Molekül zusammenlagern. Zu den Antikörperformaten, die neben den variablen auch konstante Domänen besitzen, zählt der *minibody*-Antikörper. Hier werden die *scFv*-Fragmente mit der CH₃-Domäne fusioniert, die in der Regel humanen Ursprungs ist. Die genannten rekombinanten Antikörper sind die am häufigsten in Studien verwendeten Formate. Sie können entsprechend diversen Modifikationen unterzogen werden. So können *scFv*-Antikörper mittels *CDR grafting* humanisiert werden. Diese humanisierten Domänen können dann in allen davon abgeleiteten Formaten verwendet werden. Dies kann sich zum Beispiel in der Herstellung teilweise oder komplett humanisierter monospezifischer sowie bispezifischer *scFv*-, *diabody*- oder *minibody*-Antikörper äußern. *Minibody*-Formate können dabei aus murinen oder humanisierten variablen sowie humanen konstanten Domänen bestehen. Bei der Zusammensetzung von murinen und humanen Bestandteilen handelt es sich um sogenannte chimäre Antikörper. In der Abbildung 1.5 ist eine Auswahl rekombinanter Antikörperformate schematisch dargestellt.

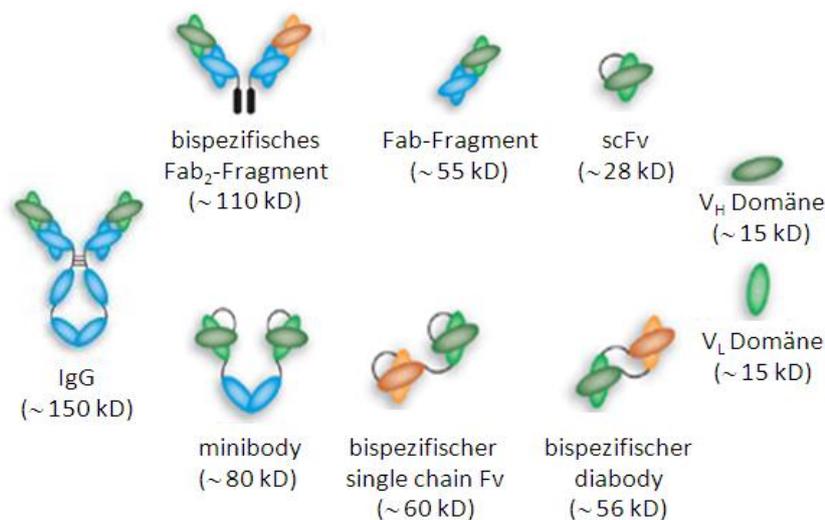


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung ausgewählter rekombinanter Antikörperformate Darstellung der Struktur und der zugehörigen Molekulargewichte im mono- oder bispezifischen Format im Vergleich zum IgG-Parentalantikörper. (modifiziert nach *Holliger und Hudson 2005*)

1.4.2 Rekombinante Antikörper *versus* monoklonale Antikörper

Rekombinante Antikörper, insbesondere die kleinen Formate, haben den Vorteil, dass sie schneller, einfacher und billiger hergestellt werden können als die konventionellen monoklonalen Antikörper. Ihre kleine Größe ermöglicht es, sie in einfache bakterielle Systeme zu klonieren und zu produzieren. Die Expression in *E. coli* ist dabei promotor-, temperatur- sowie sequenzabhängig.

Ebenso sind kleine Antikörper aufgrund ihrer geringen Größe im Vergleich zu größeren Antikörperformaten besser in der Lage, solides Tumorgewebe zu durchdringen. Auch wirken Antikörper, die auf dem *scFv*-Format basieren, weniger immunogen, da sie keinen Fc-Teil besitzen und daher keine Effektorfunktionen wie *ADCC* und *CDC* ausführen können und die Zytokinsekretion vermindert wird. Des Weiteren können durch die Existenz humanisierter *scFv*-Antikörper rekombinante Formate je nach gewünschtem Einsatz und Funktion einfacher entwickelt werden. So können nach Applikation auch entsprechende *HAMA*-Effekte, das heißt die Bildung humaner anti-Maus-Antikörper durch den menschlichen Organismus, verringert werden. Dies ist vor allem für die Herstellung bispezifischer Antikörper von Vorteil. Aufgrund der im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern geringeren Größe und der damit verbundenen geringeren Serumhalbwertszeit besitzen die rekombinanten Antikörper wie *scFv*, *diabody* oder *minibody* eine verminderte Stabilität. Zudem werden Antikörper mit einem Molekulargewicht unter 50 kD, wie es bei *scFv*-Antikörpern der Fall ist, leicht aus dem Blutstrom über die Niere ausgeschieden. Je nach gewünschtem Einsatz des Antikörpermoleküls ist dies aber nicht in jedem Falle von Nachteil. Nützlich ist das zum Beispiel im Falle von radioisotopgekoppelten *scFv*-Antikörpern, die für diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Gleiche Vorteile gelten für zytokin- als auch toxingekoppelte *scFv*-Antikörper, die lediglich eine spezifische Vehikel- und Erkennungsfunktion haben, um das *target* für die gelieferten Zytokine und Toxine zu erkennen. Für *scFv*-Antikörper, die eine Effektorfunktion im Organismus ausführen sollen, gibt es Möglichkeiten, diese mit zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG) oder auch mit einer humanen CH₃-Antikörperdomäne zu fusionieren. PEGylierung ist eine gebräuchliche Methode zur Modifikation von Biopharmaka (*Übersichtsartikel Greenwald et al. 2003*). So sind zum Beispiel pegyliertes Interferon alpha oder pegyliertes Erythropoetin zugelassene Medikamente. Die Modifikation mittels Pegylierung hat den Vorteil, dass das Molekül signifikant vergrößert wird, aber das PEG keinen Einfluss auf die Faltung als auch die Funktion des Antikörpers hat. Das heißt, PEG verhält sich neutral, was bei der CH₃-Domäne so nicht gegeben ist. Dennoch hat auch dieses Format des *minibody* zusätzlich interessante Eigenschaften hinsichtlich einer möglichen verbesserten Effektorfunktion des Antikörpers. Im Gegensatz zu den Antikörperformaten, die keinen Fc-Teil besitzen, können *minibody*-Antikörper mittels der CH₃-Domäne eine Fc γ -Rezeptor(FcR)-vermittelte Effektorfunktion ausüben und FcR-exprimierende Immunzellen, wie zum Beispiel NK-Zellen und Makrophagen, aktivieren. Dies kann einhergehend mit einer erhöhten Zytokinsekretion eine verstärkte Immunantwort hervorrufen und zu einer antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (*ADCC*) führen.

1.4.3 Das Konzept der bispezifischen Antikörperstrategie

Bispezifische Antikörper bieten eine gute Strategie für die Entwicklung spezifischer Krebsmedikamente, die eine therapierelevante Verbindung zwischen der Aktivierung des Immunsystems und der zielgerichteten Tumorzelleliminierung herstellen. Der monoklonale Catumaxomab, der für die Therapie EpCAM-positiver therapierefraktärer maligner Aszites eingesetzt wird (Borges *et al.* 2007), ist der erste von der EMEA zugelassene bispezifische Antikörper dieser Art mit einer guten klinischen Verträglichkeit bei lokoregionaler Applikation. Gemäß ihrer traditionellen Struktur besitzen bispezifische Antikörper zwei unterschiedliche Antigenbindestellen, die einerseits ein T-Zellantigen und andererseits ein tumorassoziiertes Antigen erkennen. Sinn und Zweck dieser Erkennung ist eine spezifische Aktivierung von T-Zellen, die dann in der Lage sind, in zytotoxische T-Zellen zu differenzieren. Die aktivierten T-Effektorzellen können dann aufgrund der dualen Bindungseigenschaften des Antikörpers mit dem Tumor wechselwirken und eine Tumorzelllyse auslösen. Die Abbildung 1.6 gibt eine zusammenfassende Übersicht über das Zusammenspiel von bispezifischem Antikörper, T-Zelle und Tumorzelle.

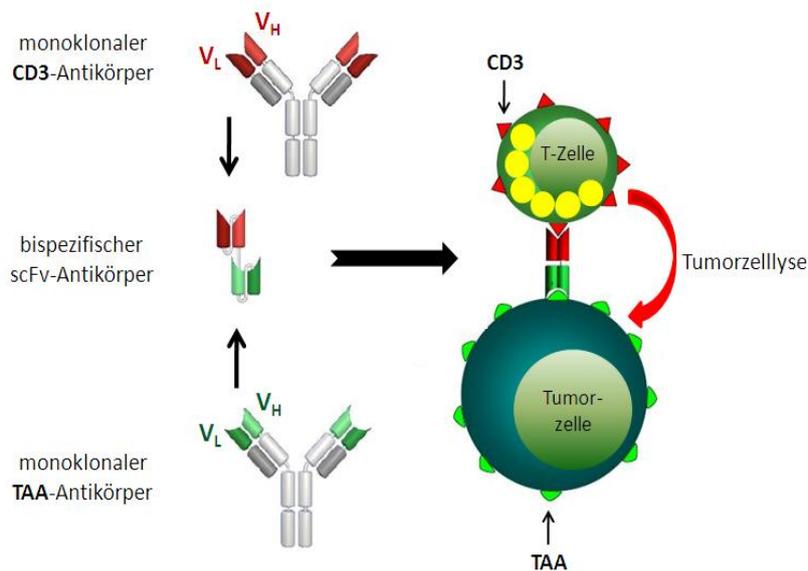


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung zur Generierung bispezifischer CD3 x TAA *scFv*-Antikörper aus den monoklonalen Parentalantikörpern und ihrer mechanistischen Interaktion mit T- und Tumorzelle (modifiziert nach Lutterbuese *et al.* 2008)

Der bispezifische Antikörper wird hier von einem sogenannte *single chain Fv* (*scFv*)-Format repräsentiert. Dieser setzt sich ausschließlich aus den variablen Domänen V_H und V_L der Ursprungsantikörper zusammen und besitzt weder den konstanten noch den Fc-Teil monoklonaler Antikörper.

Wie die Abbildung 1.6 zeigt, werden die variablen Domänen des CD3-Antikörpers (rot dargestellt) mit denen des TAA-Antikörpers (grün dargestellt) zum bispezifischen *scFv* fusioniert, der dann entsprechend an sein korrespondierendes CD3-Antigen auf der T-Zelle sowie an das tumorassoziierte Antigen (TAA) auf der Tumorzelle bindet. Durch diese Vernetzung wird die Tumorzelle von der T-Zelle „erkannt“ und mittels sezernierter Perforine (gelb dargestellt) lysiert. Die bispezifische Strategie ermöglicht es demnach, den Tumor dem Immunsystem gegenüber „sichtbar“ zu machen und somit eine MHC-I-unabhängige Eliminierung der Tumorzelle zu aktivieren (Hombach *et al.* 1997). So erfolgt die Antigenpräsentation nicht in Form eines MHC-I-gekoppelten Tumorpeptids sondern über ein tumorspezifisches Oberflächenantigen, das mittels der Antikörpervernetzung der T-Zelle „präsentiert“ wird. Dieses Szenario ist in der Abbildung 1.7 detaillierter dargestellt.

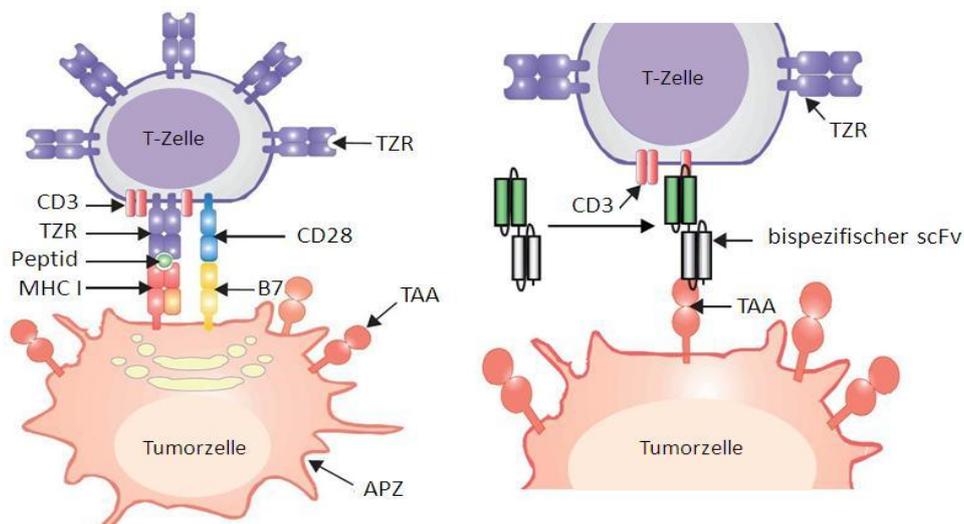


Abbildung 1.7 Gegenüberstellung der MHC-I-vermittelten T-Zell-gekoppelten Tumorzelllyse *versus* der mittels bispezifischer CD3 x TAA *scFv*-Antikörper erzeugten Tumorzelleliminierung (modifiziert nach Baeuerle *et al.* 2009)

Die Tumorzelle exprimiert das MHC-I-Molekül (rosa dargestellt), das das Tumorpeptid (grün dargestellt) präsentiert und durch die Interaktion mit dem T-Zellrezeptor (TZR – violett dargestellt) zu einer Vernetzung führt. Diese wird unterstützt durch die Interaktion des CD28-Korezeptors (blau dargestellt) auf der T-Zelloberfläche mit dem B7-Liganden (gelb dargestellt), der von der Tumorzelle exprimiert wird. Durch dieses Zusammenspiel wird die Signaltransduktionskaskade in der T-Zelle aktiviert, die dann ihrerseits die Tumorzelle eliminieren kann.

Die MHC-I-abhängige T-Zellaktivität beruht dabei auf der klonalen Expansion antigenspezifischer T-Zellen nach einmalig erfolgter Antigenerkennung, die zu einer Rekrutierung eines nur kleinen Teils des T-Zellpools führt. An dieser Stelle kommt der bispezifische CD3 x TAA-Antikörper (grün/weiß dargestellt) zur Entfaltung seiner Eigenschaft, an T- und Tumorzelle gleichzeitig zu binden und eine MHC-I-unabhängige Vernetzung zu erzeugen. In deren Verlauf werden aktivierte T-Zellen veranlasst, lytisch auf die so „präsentierte“ Tumorzelle zu wirken. Entscheidend für die Eigenschaft der zytotoxischen Wirkung ist, dass in einem vorangehenden Prozess CD3-positive T-Zellen stimuliert und zytotoxische Effektorzellen rekrutiert worden sind, die dann über das CD3-Antigen mit der Tumorzelle vernetzt werden können. Wichtig dabei ist, dass unabhängig von der Antigenspezifität des T-Zellrezeptors, ein großer Pool von T-Zellen an den Tumor rekrutiert werden kann. Darin liegt der wesentliche Vorteil der bispezifischen Antikörperstrategie. Der in den Abbildungen 1.6 und 1.7 exemplarisch dargestellte bispezifische *single chain* und der bispezifische *diabody* sind die in der Regel am häufigsten vorkommenden kleinen bispezifischen Antikörperformate. Aber auch Formate wie das bispezifische F(ab)₂-Fragment (*Shalaby et al. 1992*) oder der bispezifische *minibody* (*Shahied et al. 2004*) sind durchaus vorzufinden. Die Auswahl der Zielantigene auf Immunzellen bleibt dabei nicht auf CD3 beschränkt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Auf der Basis der vorliegenden Hybridomazelllinien OKT-3 (muriner CD3-Antikörper) und ERIC-1 (muriner NCAM-Antikörper) sowie der bestehenden *scFv*-Antikörperklone UCHT-1 (humanisierter anti-CD3/human), A7 (muriner anti-VEGFR-2/human) und D29 (humanisierter anti-NCAM/human) soll die Herstellung rekombinanter bispezifischer CD3 x NCAM sowie CD3 x VEGFR-2-Antikörper im *scFv*- und *diabody*-Format erzielt werden. Dafür werden aus der cDNA der Hybridome sowie aus der Plasmid-DNA der *scFv*-Antikörperkonstrukte die variablen Sequenzen der Domänen V_H und V_L mit Hilfe von PCR-Techniken gewonnen und diese gemeinsam mit entsprechenden Linkerfragmenten mittels Assembly-PCR zu den bispezifischen Zielformaten zusammengesetzt. Anschließend sollen diese Formate transient als auch stabil in *E. coli* sowie in Säugetierzellen kloniert und hinsichtlich ihrer Expression mittels RT-PCR und Westernblot analysiert werden.

Ziel dieser Analyse ist die Auswahl eines Formats zur stabilen Produktion und Aufreinigung der bispezifischen Antikörperproteine. Im Rahmen der Studie sollen die CD3 x NCAM und CD3 x VEGFR-2-Antikörper aufgereinigt und hinsichtlich ihrer funktionalen Eigenschaften charakterisiert werden. Dazu zählen die Qualitätskontrolle der Antikörperproteine mittels SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung sowie die Evaluierung der Bindung der Antikörper an jeweils CD3- und NCAM- sowie CD3- und VEGFR-2-positive Zielzellen im FACS. Weitere biologische Eigenschaften, die analysiert werden sollen, sind die Fähigkeit der bispezifischen Antikörper a) mittels der anti-CD3-Domäne die Proliferation von T-Zellen zu stimulieren und b) eine antikörpervernetzte Zytotoxizität aktivierter T-Zellen gegen antigen-exprimierende Zielzellen zu vermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

BD Pharmigen	Heidelberg, Deutschland
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
BioRad	München, Deutschland
BioStep	Jahnsdorf, Deutschland
Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
Braun	Melsungen, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
Dynal Biotech	Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Fluka Chemika	Buchs, Schweiz
GE Healthcare	München, Deutschland
Genomed	Löhne, Deutschland
Gibco	Karlsruhe, Deutschland
Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Heidolph	Schwabach, Deutschland
Hellma	Müllheim, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
J.T. Baker	Griesheim, Deutschland
LabSystems	Vienna, Virginia, USA
Merck	Darmstadt, Deutschland
Micronic	Lelystad, Niederlande
Millipore	Schwalbach/Ts, Deutschland
Miltenyi	Bergisch Gladbach, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Nunc	Langenselbold, Deutschland
Operon	Ebersberg, Deutschland
PAA	Pasching, Österreich
PAN	Aidenbach, Deutschland
Peltier MJ Research	Ramsay, Minnesota, USA
Pierce	Rockford, Illinois, USA
Promega	Mannheim, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
R&D	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Relia Tech	Braunschweig, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz	Heidelberg, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma	München, Deutschland
Spectrum	Breda, Niederlande
Stratagene	La Jolla, California, USA
Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
WTW	Weilheim, Deutschland
Zeiss	Jena, Deutschland

2.1.1 Medien und Zelllinien

Medien

RPMI-1640, MEM, DMEM **Gibco**

IMDM **Invitrogen**

HAM's F12 **Sigma**

FCS **PAN Biotech**

Zelllinie

Hybridoma OKT-3 **Dr. Markus Jensen, Uni Köln**
(Maus monoklonaler CD3/human Antikörper)

Hybridoma ERIC-1 **Dr. Markus Jensen, Uni Köln**
(Maus monoklonaler NCAM/human Antikörper)

Jurkat **Dr. Markus Jensen, Uni Köln**
(humane T-Zelllymphomazellen)

IMR5 **Dr. Markus Jensen, Uni Köln**
(humane Neuroblastomazellen)

LS wt **Prof. Rita Gerardy-Schahn, MHH, Hannover**
(humane Neuroblastomazellen)

PAE/KDR **Dr. Thomas Böldicke, HZI, Braunschweig**
(VEGFR-2/human überexprimierende Schweineaortazellen)

PAE/FLT1 **Dr. Thomas Böldicke, HZI, Braunschweig**
(VEGFR-1/human überexprimierende Schweineaortazellen)

TE671 **Prof. Rita Gerardy-Schahn, MHH, Hannover**
(humane Rhabdomyosarkomazellen)

Sp2/0-Ag14 **Dr. Ludger Grosse-Hovest, Uni Tübingen**
(r3V und r3N stabil transfizierte murine Myelomazellen)

BHK21 **Prof. Peter Müller, HZI, Braunschweig**
(Baby Hamster Nierenzellen)

Kulturmedium*

RPMI plus 10 % FCS

HAM's F12/DMEM 1 : 1 plus 10 % FCS

HAM's F12 plus 10 % FCS plus 0,4 mg/ml G418

HAM's F12 plus 10 % FCS plus 0,4 mg/ml G418

DMEM plus 5 % FCS

IMDM plus 10 % FCS plus 1 mg/ml G418

MEM plus 10 % FCS

*Alle Medien wurden mit 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin **Serva** versetzt und zusätzlich mit Ausnahme von HAM's F12 und IMDM mit 2 mM Glutamin (2 mM) **Serva** supplementiert.

Bakterienstämme

HB2151 *E. coli* **GE Healthcare**

DH5α *E. coli* **Invitrogen**

2.1.2 Oligonukleotide und DNA-Matrizen*

Name	DNA-Sequenz
PCR-Primer	
VH OKT fwd	5' CAg gTg CAg CTg CAg CAg TCT gg 3'
VH OKT rev	5' TgA ggA gAC ggT gAg CgT ggT CCC TTg gCC CC 3'
VL OKT fwd	5' gAC ATT gTg CTC ACC CAg TCT CCA 3'
VL OKT rev	5' CCg GTT TAT TTC CAA CTT TgT CCC 3'
VH OKT fwd SfiI	5' gTC CTC gCA ACT gCg gCC CAg CCg gCC ATg gCC CAg gTg CAg CTg CAg CAg TCT gg 3'
VL OKT rev NotI	5' gAg TCA TTC TgC ggC CgC CCg gTT TAT TTC CAA CTT TgT CCC 3'
scFv linker OKT fwd	5' ggg ACC ACg CTC ACC gTC TCC TCA 3'
scFv linker OKT rev	5' Tgg AgA CTg ggT gAg CAC AAT gTC 3'
VH ERIC fwd	5' ATg gCC CAg gTg AAg CTg CAg gAg 3'
VH ERIC rev	5' TgA ggA gAC ggT gAg CgT ggT CCC TTg gCC CC 3'
VL ERIC fwd	5' AAY ATH GTT ATg ACT CAR gCT gCT 3'
VL ERIC rev	5' YTT DAT YTC AAg YTT AgT CCC CgA 3'
VL ERIC rev db	5' CTT AAT TTC AAg CTT AgT CCC CgA 3'
VH ERIC fwd SfiI	5' gTC CTC gCA ACT gCg gCC CAg CCg gCC ATg gCC CAg gTg AAg CTg CAg gAg TCA gg 3'
VL ERIC rev NotI	5' gAg TCA TTC TgC ggC CgC YTT DAT YTC AAg YTT AgT CCC CgA 3'
scFv linker ERIC fwd	5' ggg ACC ACg gTC ACC gTC TCC TCA 3'
scFv linker ERIC rev	5' AgC AgC CAg AgT CAT AAC AAT ATT 3'
chain AB OKTERIC fwd	5' gAC TAC Tgg ggC CAA ggg ACC ACg 3'
chain AB OKTERIC rev	5' gAC Agg TAC AgA ggg AgC AgC CTg 3'
chain BA OKTERIC fwd	5' gAC TTC Tgg ggC CAA ggg ACC ACg 3'
chain BA OKTERIC rev	5' TgC AgA CAT gAT TgC Tgg AgA CTg 3'
scFv linker OKTERIC fwd	5' TCg ggg ACT AAg CTT gAA ATT AAg 3'
scFv linker OKTERIC rev	5' TCC TgA CTC CTg CAg CTT CAC CTg 3'
VH UCHT fwd	5' gAg gTT CAg CTg gTg gAg TCT ggC 3'
VH UCHT rev	5' CgA ggA gAC ggT gAC CAg ggT TCC 3'
VL UCHT fwd	5' gAT ATC CAg ATg ACC CAg TCC CCg 3'

Name	DNA-Sequenz
VL UCHT rev	5' TTT gAT CTC CAC CTT ggT gCC CTg 3'
VH UCHT fwd SfiI	5' gTC CTC gCA ACT gCg gCC CAg CCg gCC ATg gCC gAg gTT CAg CTg gTg gAg TCT ggC 3'
VL UCHT rev NotI	5' gAg TCA TTC TgC ggC CgC TTT GAT CTC CAC CTT ggT TgC CTg 3'
VH A7 fwd	5' CAg gTg AAA CTg CAg gAg TCT ggA 3'
VH A7 rev	5' TgA ggA gAC ggT gAC CgT ggT CCC TTg gCC CC 3'
VL A7 fwd	5' gAC ATT gAg CTC ACC CAg TCT CCA 3'
VL A7 rev	5' CCg TTT gAT TTC CAg CTT ggT gCC 3'
VH A7 fwd SfiI	5' gTC CTC gCA ACT gCg gCC CAg CCg gCC ATg gCC CAg GTS MAR CTg CAg SAC TCW gg 3'
VL A7 rev NotI	5' gAg TCA TTC TgC ggC CgC CCg TTT gAT TTC CAg CTT ggT gCC 3'
chain AB UA7 fwd	5' gAC gTC Tgg ggT CAA ggA ACC CTg 3'
chain AB UA7 rev	5' TgC AgA CAT gAT TgC Tgg AgA CTg 3'
chain BA UA7 fwd	5' gAC TAC Tgg ggC CAA ggg ACC ACg 3'
chain BA UA7 rev	5' GgC ggA CAg ggA gCT Cgg ggA CTg 3'
scFv linker UA7 fwd	5' Ggg ACC AAg CTg gAg T AAA Cgg 3'
scFv linker UA7 rev	5' TCC AgA CTC CTg CAg TTT CAC CTg 3'
hNCAM VH fwd	5' CAg gTT CAg CTg gTg CAg TCT ggg 3'
hNCAM VH rev	5' TgA ggA gAC ggT gAC TAg ggT TCC 3'
hNCAM VL fwd	5' gAT ATT gTg ATg ACT CAg TCT CC 3'
hNCAM VL rev	5' TTT gAT TTC CAC CTT ggT CCC TTg 3'
hNCAM fwd SfiI	5' gTC CTC gCA ACT gCg gCC CAg CCg gCC ATg gCC CAg gTT CAg CTg gTg CAg TCT gg 3'
hNCAM rev NotI	5' gAg TCA TTC TgC ggC CgC TTT gAT TTC CAC CTT ggT CCC TTg 3'
chain AB UHUN fwd	5' gAC gTC Tgg ggT CAA ggA ACC 3'
chain AB UHUN rev	5' gAC ggg CAg ggA gAg Tgg AgA CTg 3'
chain BA UHUN fwd	5' gAC TTC Tgg ggC CAg ggA ACC CTA 3'
chain BA UHUN rev	5' ggC ggA CAg ggA gCT Cgg ggA CTg 3'
scFv linker UHUN fwd	5' CAA ggg ACC AAg gTg gAA ATC AAA 3'
scFv linker UHUN rev	5' TCC AgA CTg CAC CAg CTg AAC CTg 3'
β-Aktin fwd	5' gAC gAg gCC CAg AgC AAg 3'
β-Aktin rev	5' ATC TCC TTC TgC ATC CTg TC 3'

Name	DNA-Sequenz
Mutageneseprimer	
hNCAM MUT VH fwd	5' TCC ACg AgC ACA gCA TAT ATg CAA CTC AgC AgC 3'
hNCAM MUT VH rev	5' gCT gCT gAg TTg CAT ATA TgC TgT gCT CgT gg 3'
hNCAM MUT VL fwd	5' CAg AAg CCA ggg CAg TCT CCA CAg CTC CTg ATC 3'
hNCAM MUT VL rev	5' gAT CAg gAg CTg Tgg AgA CTg CCC Tgg CTT CTg 3'
Sequenzierprimer	
PCANTABR1	5' CCA TgA TTA CgC CAA gCT TTg gAg CC 3'
PCANTABR2	5' CgA TCT AAA gTT TTg TCg TCT TTC C 3'
DNA-Matrizen	
scFv linker OKT	5' ggg ACC ACg CTC ACC gTC TCC TCA ggT ggA ggC ggT TCA ggC ggA ggT ggC TCT ggC ggT ggC ggA TCg gAC ATT gTg CTC ACC CAg TCT CCA 3'
scFv linker ERIC	5' ggg ACC ACg gTC ACC gTC TCC TCA ggT ggA ggC ggT TCA ggC ggA ggT ggC TCT ggC ggT gC ggA TCg AAC ATT GTT ATg ACT CAg gCT gCT 3'
scFv linker OKTERIC	5' TCg ggg ACT AAg CTT gAA ATT AAg ggTggA ggC ggT TCA ggC ggA ggT ggC TCT ggC ggT ggC ggA TCg CAg gTg AAg CTg CAg gAg TCA ggA 3'
chain linker AB OKTERIC	5' gAC TAC Tgg ggC CAA ggg ACC ACg CTC ACC gTC TCC TCA ggT ggA ggC ggT TCA AAC ATA gTT ATg ACT CAg gCT gCT CCC TCT gTA CCT gTC 3'
chain linker BA OKTERIC	5' gAC TTC Tgg ggC CAA ggg ACC ACg gTC ACC gTC TCC TCA ggT ggA ggC ggT TCA gAC ATT gTg CTC ACC CAg TCT CCA gCA ATC ATg TCT gCA 3'
scFv linker UA7	5' ggg ACC AAg CTg gAg CTg AAA Cgg ggT ggA ggC ggT TCA ggC ggA ggT ggC TCT ggC ggT ggC ggA TCg CAg gTg AAA CTg CAg gAg TCT ggA 3'
chain linker AB UA7	5' gAC gTC Tgg ggT CAA ggA ACC CTg gTC ACC gTC TCC TCg ggT ggA ggC ggT TCA gAC ATT gAg CTC ACC CAg TCT CCA gCA ATC ATg TCT gCA 3'
chain linker BA UA7	5' gAC TAC Tgg ggC CAA ggg ACC ACg gTC ACCgTC TCC TCA ggT ggA ggC ggT TCA gAT ATC CAg ATg ACC CAg TCC CCg AgC TCC CTg TCC gCC 3'
scFv linker UHUN	5' CAA ggg ACC AAg gTg gAA ATC AAA ggT ggA ggC ggT TCA ggC ggA ggT ggC TCT ggC ggT ggC ggA TCg CAg gTT CAg CTg gTg CAg TCT ggA 3'
chain linker AB UHUN	5' gAC gTC Tgg ggT CAA ggA ACC CTg gTC ACC gTC TCC TCg ggT ggA ggC ggT TCA gAT ATT gTg ATg ACT CAg TCT CCA CTC TCC CTg CCC gTC 3'
chain linker BA UHUN	5' gAC TTC Tgg ggC CAg ggA ACC CTA gTC ACC gTC TCC TCA ggT ggA ggC ggT TCA gAT ATC CAg ATg ACC CAg TCC CCg AgC TCC CTg TCC gCC 3'

*Die Oligonukleotide (= Primer) und DNA-Matrizen wurden von **Invitrogen** beziehungsweise **Operon** synthetisiert.

2.1.3 Antikörper

Name	Verdünnung
Primäre monoklonale Antikörper	
Maus anti-E-Tag GE-Healthcare	1 : 1000
Maus <i>scFv</i> anti-VEGFR-2/human (Klon A7) Relia Tech	1 µg/ml
Maus anti-CD3/human (Klon UCHT-1) Santa Cruz	1 : 20
Maus anti-NCAM/human (Klon ERIC-1) Santa Cruz	1 : 20
Maus anti-CD28/human (Klon 28.2) Santa Cruz	1 : 20
Maus anti-myc-Tag (Klon 9E10) Santa Cruz	1 : 200
Isotyp normal Maus IgG1 Santa Cruz	1 : 5
Sekundäre polyklonale Antikörper	
Ziege anti-Maus IgG H+L Peroxidase-konjugiert (POD) Dianova	1 : 2000
Ziege anti-Maus IgG Fcγ Phycoerythrin-konjugiert (PE) Dianova	1 : 100
Ziege anti-Maus IgG H+L Fluoresceinisothiocyanat-konjugiert (FITC) Dianova	1 : 100
Direkt markierte primäre monoklonale Antikörper	
Maus anti-CD8/human FITC-konjugiert BD Pharmigen	1 : 50
Maus IgG1 Isotyp FITC-konjugiert BD Pharmigen	1 : 50
Maus IgG1 Isotyp PE-konjugiert BD Pharmigen	1 : 50
Antikörpergekoppelte magnetische Beads	
anti-CD56/human Miltenyi	
anti-CD8/human Miltenyi	

2.1.4 Enzyme, Molekulargewichtsmarker und rekombinante Proteine

dATP, dCTP, dGTP, dTTP GE Healthcare	Precision Plus Protein Standard All Blue BioRad
Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase Invitrogen	1 kb und 100 bp plus DNA Standard Fermentas
Restriktionsendonukleasen, diverse NEB	humanes rekombinantes Interleukin-2 (IL-2) R&D
T4 DNA-Ligase Promega	lösliches humanes KDR (sKDR) Relia Tech
Kaleidoscope Protein Standard BioRad	AnnexinV-FITC BD Pharmigen

2.1.5 Klonierungs- und Expressionsplasmide und sonstige Vektoren

pCR 2.1 für PCR-Klonierungen
Invitrogen

pCANTAB5E für prokaryotische Expression
GE Healthcare

pSecTag/HygroA für eukaryotische Expression
Invitrogen

pCANTAB5EscFvA7 **Dr. Thomas Böldicke**
(enthält murinen anti-VEGFR-2/KDR *scFv* – Klon A7)

PCANTAB5EscFvUCHT-1 **Dr. Ludger Grosse-Hovest**
(enthält humanisierten anti-CD3ε *scFv* – Klon UCHT-1)

rkat.omlD29.htm.CD32 und rkat.D29.hFc.htm.CD3zIg
Dr. David Gilham, University of Manchester
(enthält humanisierten anti-NCAM *scFv* – Klon D29)

2.1.6 Kits

Jetsorb DNA Gel Extraction Kit **Genomed**

Jetstar DNA Plasmid Purification Maxi Kit **Genomed**

First Strand cDNA Synthesis Kit **GE Healthcare**

PlusOne Silver Staining Kit, Protein **GE Healthcare**

TA Cloning Kit **Invitrogen**

RNeasy Mini Kit **Qiagen**

PCR Purification Kit **Qiagen**

DNA Plasmid Miniprep Kit **Qiagen**

RNase Free DNase Set **Qiagen**

PKH26 Staining Kit **Sigma**

Quick Change Mutagenesis Kit **Stratagene**

Cell Proliferation ELISA, BrdU, calorimetric **Roche**

2.1.7 Zellkulturmaterialien und -geräte

Zellkulturplatten 6, 12, 24, 48 und 96-Loch **BD**

Neubauer Zählkammer **Brand**

Sterile Spitzen und Kanülen **Braun**

Polypropylenröhrchen 15 und 50 ml **Greiner**

Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml **Greiner**

Inkubator **Heraeus**

MACS LS-, LD-Säulen und Magnetständer **Miltenyi**

0,22 µm Sterilvakuumfilter 250 und 500 ml **Millipore**

FACS-Röhrchen **Micronic**

Maxi Sorp ELISA-Platten **Nunc**

Zellkulturflaschen 25, 80 und 125 cm² **Nunc**

Pipettenspitzen, diverse **Roth**

Zellkulturwerkbank **Thermo Scientific**

Durchlichtmikroskop **Zeiss**

Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 **Zeiss**

2.1.8 Chemikalien und Farbstoffe

Bacto Agar, Bacto Hefeextrakt, Bacto Trypton BD	Kaliumchlorid, Natriumhydroxid, Essigsäure Roth
Biocoll-Lösung, Geneticin G418 Biochrom AG	Salzsäure, Formaldehyd, Phenol Roth
Natriumacetat, Formamid Fluka Chemika	NZ Amin Schenker + Co
Agarose, Hygromycin Invitrogen	Ethidiumbromid, X-Gal Serva
Ethanol, Chloroform, Isopropanol, Methanol J.T.Baker	Ammoniumpersulfat, DTT, TEMED Serva
Natriumdihydrogenphosphat J.T. Baker	Acrylamid/Bisacrylamid, BSA, Imidazol Serva
Glucose, Sucrose Merck	DMSO, EDTA, SDS Serva
Kalziumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumazid Merck	Magnesiumsulfat, Natriumchlorid Sigma
Glycerol, β -Mercaptoethanol Merck	DAB, DEPC, Glycin, MOPS, Tris Base Sigma
Bromphenolblau, Türklösung, Xylen-Xyanol Merck	IPTG, Tri Reagent LS, Triton X 100, Tween Sigma
Isoamylalkohol, Paraformaldehyd Merck	Ampicillin, PKH26, Trypanblau Sigma
Hepes, Trypsin-EDTA PAA	Bicinchonsäure, CuSO ₄ -Lösung Sigma

2.1.9 Geräte und sonstige Materialien

FACS Calibur BD Pharmigen	Schüttler, Vortexer Heidolph
Geldokumentationsgerät Biometra	Quarzküvetten Hellma
Elektroporator Gene Pulser BioRad	Horizontschüttler Rockomat Heraeus
Elektroporationsküvetten 0,2 cm BioRad	Tischzentrifuge Biofuge pico Heraeus
Gelelektrophoresekammern Protein BioRad	Rotationsschüttler Labnico BV
Blotfilterpapier, PVDF-Membran BioRad	ELISA-Reader LabSystems
Semi Dry Blotter BioRad	Amicon Ultra 4 Centrifugal Filter Devices Millipore
Stromversorgungsgerät BioRad	PCR Cyclers Peltier MJ Research
Filterpipettenspitzen 10, 20, 200 und 1000 ml Biozym	Protein-L-Chromatographiesäule Pierce
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml Biozym	Kunststoffküvetten Sarstedt
Gelelektrophoresekammern DNA/RNA BioStep	Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml Sarstedt
Dynabeads Magnetständer Dynal Biotech	Feinwaage Sartorius
Thermomixer Eppendorf	Dialyseschläuche Spectro/Por Spectrum
Peristaltische Pumpe GE Healthcare	Maxifuge Sorvall, Megafuge 1.0R Thermo Scientific
UV/VIS-Photometer GE Healthcare	pH-Meter WTW

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Hybridoma- und Säugetierzellen

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Hybridoma- und Säugetierzellen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* gemäß den Angaben des Herstellers oder alternativ mittels Tri Reagent LS in Anlehnung an die Trizolmethode. Dazu wurden die Zellen in 250 µl PBS resuspendiert und mit 750 µl Tri Reagent LS versetzt. Nach der Lyse der Zellen erfolgte eine Chloroformextraktion der RNA. Dazu wurde die Probe mit 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol versetzt, für 15 sec stark geschüttelt und 3 min bei RT stehen gelassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation zwecks Phasentrennung für 15 min bei 13 000 rpm und 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit Chloroform ausgeschüttelt und im Anschluss für 5 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die letzte abgenommene wässrige Phase wurde mit 0,5 ml Isopropanol gefällt. Es erfolgte eine Inkubation der Probe für 10 min bei RT und eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C. Die gefällte RNA wurde einmal mit 1 ml 70 %igem DEPC-EtOH pro 1 ml Trizol gewaschen und nochmals für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die getrocknete RNA wurde in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bei – 70 °C gelagert.

DEPC-H₂O 0,2 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in ddH₂O gelöst unter Schütteln über Nacht bei 37°C und anschließend autoklaviert

2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA wurde jeweils eine geeignete Verdünnung mit einem Volumen von 100 µl hergestellt, die mittels einer Quarzküvette im Photometer vermessen wurde. Für die Kalkulation der Konzentration für die RNA-Bestimmung wurde zusätzlich zum Verdünnungsfaktor ein Faktor von 40 µg/ml und für die DNA-Bestimmung ein Faktor von 50 µg/ml berücksichtigt.

2.2.3 Qualitätsanalyse der RNA mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese

In einem Gesamtvolumen von 10 µl DEPC-H₂O wurden 0,5 µg RNA gelöst und für 10 min bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die RNA-Lösung entsprechend mit 1 x RNA-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Probe auf einem 1,5 %igen denaturierendem RNA-Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurde in mit DEPC-H₂O verdünntem 1 x MOPS-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen mit 6,6 % (v/v) Formaldehyd versetzt. Die Auftrennung der RNA im Gel erfolgte unter Verwendung von 1 x MOPS-Laufpuffer, der entsprechend mit 6,6 % (v/v) Formaldehyd versetzt und mit DEPC-H₂O verdünnt wurde.

10 x MOPS-Puffer 0,4 M MOPS (pH 7,0); 10 mM EDTA (pH 8,0); in ddH₂O gelöst; autoklaviert

5 x RNA-Probenpuffer 80 µl 0,5 M EDTA; 720 µl 37 % (v/v) Formaldehyd; 4 ml 10 x MOPS; 2 ml Glycerin; 3 ml Formamid; 50 µl Ethidiumbromid; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; mit DEPC-H₂O auf 10 ml aufgefüllt; steril filtriert

2.2.4 Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkription

Die aus den Hybridomazelllinien isolierte Gesamt-RNA wurde mittels des *First Strand cDNA Synthesis Kit* gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die eingesetzte Gesamtmenge an RNA betrug dabei in der Regel 2,5 µg.

2.2.5 Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen V_H und V_L mittels PCR

Die variablen Antikörperdomänen der schweren Kette V_H und der leichten Kette V_L wurden mittels sequenzspezifischer Primer in einer primären PCR nach folgendem Programm aus der Gesamt-cDNA amplifiziert.

(1) Denaturierung	94 °C	1 min	} 32 Zyklen
(2) Denaturierung	94 °C	1 min	
(3) Primer-Bindung	65 °C	2 min	
(4) Primer-Extension	70 °C	2 min	
(5) Pause	4 °C	∞	

Die Schritte 2 - 4 wurden in 32 Zyklen durchlaufen und es wurden jeweils 2 µl cDNA in einem Gesamtansatz von 50 µl für die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz 100 pmol/ml Vorwärtsprimer; 100 pmol/ml Rückwärtsprimer; 1 U *Taq*-Polymerase; 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl₂

Diese Strategie wurde angewendet für die Amplifizierung der variablen Domänen des OKT-3 (anti-CD3/murin) und ERIC-1 (anti-NCAM/murin) *scFv*-Antikörpers ausgehend von der aus den korrespondierenden Hybridomazelllinien gewonnenen cDNA. Initial erfolgte die Amplifikation der variablen Domänen für den ERIC-1 mittels degenerierter Primer, die aus der vorliegenden Proteinsequenz abgeleitet wurden (*Whittington et al. 2001*). Für die Vervielfältigung der variablen Domänen des *scFv* A7 (anti-VEGFR-2/murin) und des humanisierten *scFv* UCHT-1 (anti-CD3) wurde stattdessen die vorhandene Plasmid-DNA der pCANTAB5E-Konstrukte (Vergleich Abschnitt 2.15) mit etwa 50 ng als Template für die PCR eingesetzt.

Der humanisierte *scFv* D29 (anti-NCAM) wurde aus den vorliegenden viralen Vektorkonstrukten (Abschnitt 2.15) mit sequenzspezifischen Primern herausamplifiziert und anschließend nach einer notwendigen Mutagenesereaktion in das pCANTAB5E-Plasmid kloniert. Dieses Konstrukt fungierte dann auch als entsprechendes Template für die Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen.

2.2.6 Amplifizierung des *single chain Fv (scFv)*-Linkers mittels PCR

Als Template zur Amplifizierung des *scFv*-Linkers für den *scFv*- und den *diabody*-Antikörper wurde jeweils ein 96-Basenpaar-DNA-Fragment synthetisiert. Dieses Fragment beinhaltet die alternierende linkertypische Glycin-Serin-Anordnung (GlySer₄)₃. Das Glycin-Serin-Motiv ist für das *scFv*-Format jeweils am 5'-Ende von überlappenden Sequenzen mit dem Ende der variablen schweren Kette V_{HA} und am 3'-Ende mit überlappenden Sequenzen des Anfangs der variablen leichten Kette V_{LA} flankiert. Im *diabody*-Format hingegen wird das Glycin-Serin-Motiv am 5'-Ende mit überlappenden Sequenzen des Endes der variablen leichten Kette V_{LB} und am 3'-Ende mit überlappenden Sequenzen des Anfangs der schweren variablen Kette V_{HB} flankiert. Der Linker, der im *diabody*-Format jeweils die Ketten V_{HA} und V_{LB} beziehungsweise V_{HB} und V_{LA} verbindet, wurde analog zum *scFv*-Linker konzipiert, jedoch besteht das Glycin-Serin-Motiv nur aus der einmaligen Abfolge Gly₄Ser. Alle Linkersequenzen wurden jeweils mit sequenzspezifischen Primern nach folgendem Programm amplifiziert.

(1) Denaturierung	94 °C	1 min	
(2) Denaturierung	94 °C	1 min	} 25 Zyklen
(3) Primer-Bindung	55 °C	2 min	
(4) Primer-Extension	70 °C	2 min	
(5) Pause	4 °C	∞	

Die Schritte 2 - 4 wurden in 25 Zyklen durchlaufen und es wurden jeweils 500 ng Template-DNA in einem Gesamtansatz von 50 µl für die PCR eingesetzt.

2.2.7 Herstellung des *scFv*-Antikörpers und der reziproken *scFv*-Formate mittels

Assembly-PCR

Die aufgereinigten DNA-Fragmente der variablen Antikörperdomänen V_H und V_L und des flexiblen $(\text{GlySer}_4)_3$ -Peptidlinkers wurden mit jeweils 100 ng pro DNA-Fragment in einer Assembly-PCR zu einem *scFv*-Antikörper zusammengefügt. Im ersten Schritt erfolgte eine PCR, bei der die einzelnen Templates ohne Primer in einer Reaktion zu einem *scFv*-Fragment zusammengesetzt wurden. Als Primer fungieren dabei die mit dem Ende von V_H und mit dem Anfang von V_L überlappenden komplementären Enden. In einem zweiten Schritt wurde dann entsprechend das *scFv*-Fragment mittels sequenzspezifischer Primer amplifiziert und in einer anschließenden Gelelektrophorese zur Aufreinigung aufgetrennt.

PCR # 1

(1) Denaturierung	94 °C	1 min	
(2) Denaturierung	94 °C	1 min	} 25 Zyklen
(3) Primer-Bindung	55 °C	2 min	
(4) Primer-Extension	70 °C	2 min	
(5) Pause	4 °C	∞	

Die Schritte 2 - 4 wurden in 25 Zyklen durchlaufen und es wurden jeweils 100 ng Template-DNA in einem Gesamtansatz von 25 μl für die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz 1 U *Taq*-Polymerase; 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl_2

PCR # 2

(1) Denaturierung	94 °C	1 min	
(2) Denaturierung	94 °C	1 min	} 10 - 20 Zyklen
(3) Primer-Bindung	65 °C	2 min	
(4) Primer-Extension	70 °C	2 min	
(5) Pause	4 °C	∞	

Die Schritte 2 - 4 wurden in 10 beziehungsweise 20 Zyklen durchlaufen und es wurden jeweils 100 ng Template-DNA in einem Gesamtansatz von 25 μl für die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz 100 pmol/ml Vorwärtsprimer; 100 pmol/ml Rückwärtsprimer; 1 U *Taq*-Polymerase; 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl_2

Während die OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörper nach der oben beschriebenen zweistufigen Assembly-PCR hergestellt wurden, erfolgte die Amplifizierung des *scFv* A7, des humanisierten *scFv* UCHT-1 und des humanisierten *scFv* D29 direkt aus den vorliegenden pCANTAB5E-Konstrukten gemäß dem Protokoll des zweiten Assembly-PCR-Schritts. Im Gegensatz dazu, wurden alle reziproken *scFv*-Antikörper aufgrund der *Vice-versa*-Anordnung der variablen Domänen mittels der oben beschriebenen zweistufigen PCR-Methode erhalten.

2.2.8 Herstellung der bispezifischen *diabody*-Antikörper

Entsprechend des PCR-Protokolls zur Herstellung des reziproken *scFv*-Antikörperformats wurde der *diabody*-Antikörper mittels Assembly-PCR zusammengefügt. Dafür wurden die beiden reziproken *scFv*-Formate und der (Gly₄Ser)₃-*diabody*-Peptidlinker (Abschnitt 2.26) mit jeweils 100 ng als Template in der unter Abschnitt 2.2.7 beschriebenen zweistufigen PCR amplifiziert. Die Generierung der einzelnen *diabody*-Antikörper OKT-3 x ERIC-1, UCHT-1 x A7 und UCHT-1 x D29 ist im Kapitel 3 detaillierter beschrieben. Die entsprechenden Sequenzen der *diabody*-Antikörper sind im Kapitel 6 dargestellt.

2.2.9 Herstellung der bispezifischen *scFv*-Antikörper

Die bispezifischen anti-CD3 x anti-VEGFR-2 (Konstrukt r3V) und anti-CD3 x anti-NCAM (Konstrukt r3N) *single chain Fv (bscFv)*-Antikörper wurden im Labor von Dr. Ludger Grosse-Hovest in Tübingen hergestellt und in einen eukaryotischen Expressionsvektor zur Transfektion in Sp2/0-Ag14-Myelomazellen kloniert. Die bispezifischen *scFv*-Konstrukte bestehen jeweils aus den *scFv*-Molekülen UCHT-1 und A7 sowie UCHT-1 und D29. Der Linker, der die entsprechenden variablen Domänen V_H und V_L der einzelnen *scFv*-Antikörper verbindet, besteht aus einer 15-Aminosäuren-(Gly₄Ser)₃-Abfolge. Der Linker, der die beiden *scFv* verbindet, besteht aus einer 18-Aminosäuresequenz, die von der der *hinge*-Region eines IgG-Antikörpers abgeleitet ist. Die Sequenzen der variablen Domänen V_H und V_L der entsprechenden *scFv*-Antikörper entspricht der Darstellung für die *diabody*-Antikörper in Kapitel 6.

2.2.10 Ortsspezifische DNA-Mutagenese

Die ortsspezifische DNA-Mutagenese wurde gemäß den Angaben des Herstellers mittels des *Quick Change Mutagenesis Kit* durchgeführt. Die Sequenzen der Mutageneseprimer wurden entsprechend entwickelt und zur Synthese in Auftrag gegeben. Die Mutagenese-PCR wurde nach folgendem Programm in 16 Zyklen durchgeführt.

(1) Denaturierung	95 °C	30 sec	
(2) Denaturierung	95 °C	30 sec	} 16 Zyklen
(3) Primer-Bindung	55 °C	1 min	
(4) Primer-Extension	68 °C	5 min	
(5) Pause	4 °C	∞	

NZY⁺-Medium 10 g/l NZ Amin; 5 g/l Hefextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,5; Zugabe von 12,5 mM MgCl₂; 12,5 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose; steril filtriert

2.2.11 Auftrennung der amplifizierten DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die amplifizierte DNA wurde jeweils mit 1 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1 %igen DNA-Agarosegel, dem entsprechend Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben wurde, aufgetragen und in 1 x TAE-Laufpuffer aufgetrennt.

50 x TAE-Puffer 2 M Tris HCL (pH 8); 0,75 M Natriumacetat; 62,5 mM EDTA; steril filtriert

10 x DNA-Probenpuffer 50 % (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA; 0,4 % (w/v) Bromphenolblau; 0,4 % (w/v) Xylen-Xyanol; steril filtriert

2.2.12 Aufreinigung und Elution von DNA

Saubere PCR-Produkte und auch Restriktionsansätze wurden nach Bedarf über die Säule mittels des *PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Amplifizierte oder gespaltene DNA, die nach Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurde, wurde mittels des *Gel Elution Kit* gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte DNA wurde jeweils in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-Puffer pH 8 eluiert.

2.2.13 Klonierung der Antikörper-PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1

Die aus dem Agarosegel eluierten PCR-Produkte wurden direkt in das pCR2.1-Plasmid kloniert. Das mittels *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkt besitzt einen beidseitigen PolyA-Überhang und ist daher mit den Thymidinüberhängen des pCR2.1-Plasmids kompatibel. Der entsprechende Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert und anschließend erfolgte eine Inaktivierung der DNA T4-Ligase für 10 min bei 70 °C.

Ligationsansatz 50 ng Plasmid; 200 ng Insert; 1 U T4 DNA-Ligase; 1 x Ligasepuffer in einem Endvolumen von 10 µl

2.2.14 Klonierung der Antikörper-DNA-Konstrukte in die Expressionsvektoren pCANTAB5E und pSeqTag/HygroA

Alle Antikörperkonstrukte wurden im Laufe der Assembly-PCR mit einer 5' *Sfi*I- und einer 3' *Not*I-Schnittstelle versehen, so dass eine schnittstellenkompatible Klonierung mittels überlappender klebender Enden in die Plasmide ermöglicht wurde. Das prokaryotische Plasmid pCANTAB5E lag dabei bereits vom Hersteller als geschnittenes Konstrukt vor, während das eukaryotische Plasmid pSeqTag/HygroA entsprechend mit *Sfi*I und *Not*I verdaut und im Anschluss mittels DNA-Gelelektrophorese und Elution aus dem Gel aufgereinigt wurde. Die entsprechenden antikörperkonstrukttragenden pCR2.1-Klone wurden ebenfalls mit *Sfi*I und *Not*I verdaut. Nach anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Spaltansätze wurden die entsprechenden Antikörper-DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert und mit dem geschnittenen Vektor ligiert. Die Ligationsansätze wurden gemäß den Angaben für den pCR2.1-Vektor (Vergleich 2.2.13) angesetzt. Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte jeweils für 3 h bei 22 °C und einer anschließenden Inaktivierung der T4 DNA-Ligase für 10 min bei 70 °C.

Restriktionsansatz 2 µg DNA, 2 U Restriktionsenzym, 1 x Restriktionspuffer in einem Endvolumen von 10 µl, *Not*I-Verdau bei 37 °C über Nacht und nach DNA-Fällung *Sfi*I-Verdau bei 50 °C für 4 h

2.2.15 Analyse der Genexpression der stabil transfizierten *scFv*- und der bispezifischen *diabody*-Antikörper mittels RT-PCR

Die in 6-Loch-Zellkulturplatten oder 25 cm²-Zellkulturflächen kultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt der Konfluenz geerntet und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA und die cDNA-Synthese gemäß den Angaben unter Abschnitt 2.2.1 und 2.2.4. Für die RT-PCR wurden je 2 µl der cDNA als Template eingesetzt und die entsprechenden Antikörpersequenzen mittels sequenzspezifischer Primer amplifiziert. Als *housekeeping*-Kontrolle wurde die Sequenz für β -Aktin mit β -Aktinspezifischen Primern vervielfältigt. Als Positivkontrolle der PCR fungierte das jeweils sequenzspezifisch amplifizierte Antikörperfragment aus den zur Transfektion verwendeten antikörpersequenztragenden Plasmiden. Die PCR-Produkte für die verschiedenen Antikörper- sowie die β -Aktintranskripte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel zur Analyse aufgetrennt.

PCR für Antikörpersequenzen

Vergleich Abschnitt 2.2.7 PCR #2

PCR für β -Aktinsequenzen

(1) Denaturierung	94 °C	2 min	} 35 Zyklen
(2) Denaturierung	94 °C	20 sec	
(3) Primer-Bindung	55 °C	2 min	
(4) Primer-Extension	72 °C	2 min	
(5) Finale Extension	72 °C	7 min	
(6) Pause	15 °C	∞	

Als Template wurden jeweils 2 μ l cDNA in einem Gesamtansatz von 20 μ l eingesetzt. Die Schritte 2 - 4 wurden entsprechend in 35 Zyklen durchlaufen.

PCR-Ansatz 100 pmol/ml Vorwärtsprimer; 100 pmol/ml Rückwärtsprimer; 1 U *Taq*-Polymerase; 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl₂

2.2.16 DNA-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

Alle Sequenzierreaktionen wurden von der Zentralen Bioanalytik der Universitätsklinik zu Köln im Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt. Für die Reaktionen wurden jeweils 400 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 4 μ l für Sequenzierungen mit Standardprimern (*M13fwd*, *M13rev*, *T7*, *BGH*) und einem Volumen von 6 μ l für Sequenzierungen mit Nicht-Standardprimern (*PCANTABR1*, *PCANTABR2*) in ddH₂O gelöst. Die Nicht-Standardprimer wurden entsprechend in einer Stoffmenge von 10 pmol zu den 6 μ l-Ansätzen dazugegeben, während die Standardprimer von der Sequenziereinheit gestellt wurden. Die Daten und Elektropherogramme wurden im ABI-PRISM-Format übermittelt und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software von Vektor NTI[®].

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung von Glycerinkulturen

Für die Konservierung plasmidtragender transformierter Bakterienklone wurde mittels Inokulation eines Einzelklons in 4 ml LB-Amp eine Übernachtskultur angesetzt. Von dieser Übernachtskultur wurden dann jeweils 1 ml Bakteriensuspension mit 1 ml Glycerin in entsprechenden Kryoröhrchen homogen gemischt und bei -70 °C gelagert.

LB-Medium 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; autoklaviert

LB-Amp LB-Medium plus 100 μ g/ml Ampicillin (50 mg/ml Stammlösung; steril filtriert)

2.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden vorerst alle Materialien und Lösungen autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Zuerst wurde aus einer Glycerinkultur des gewünschten Stamms eine kleine Menge mit der Impföse auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Einzelklon in 10 ml LB-Medium angeimpft und erneut über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde dann in 1 l LB-Medium angeimpft und die Kultur bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bis 1 geschüttelt. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min unter regelmäßigem Schwenken. Anschließend wurde die Kultur auf je 330 ml aufgeteilt und die Bakterien bei 8000 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen jeweils in 330 ml kaltem dH₂O gewaschen. Die Zellpellets wurden anschließend in insgesamt 500 ml kaltem dH₂O resuspendiert und in je 2 x 250 ml-Fractionen zentrifugiert. Beide Pellets wurden dann mit insgesamt 20 ml kaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach letztmaliger Zentrifugation wurden die Bakterienzellen in insgesamt 2 ml kaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und in je 50 µl-Fractionen in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquote wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 70 °C gelagert.

LB-Agar LB-Medium plus 15 g/l Agar; autoklaviert

2.3.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien mittels Elektroporation

Für die Transformation von Ligationsansätzen in *E. coli*-Zellen wurden jeweils 50 µl auf Eis aufgetaute kompetente Zellen mit je 1 – 2 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 sec auf Eis inkubiert. Danach wurde die Mischung in eine vorgekühlte und trockene Elektroporationsküvette mit einem *gap* von 0,2 cm luftblasenfrei überführt und in das Elektroporationsgerät eingebracht. Nach dem Puls, der auf die Küvette einwirkte, wurde 1 ml RT-warmes SOC-Medium auf die Zellsuspension in der Küvette gegeben, gut gemischt und anschließend die gesamte Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und es wurden Volumina von 50 – 250 µl des Transformationsansatzes auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen. Für die Blau-Weiß-Selektion transformierter pCR2.1-Klone wurden die Transformationsansätze entsprechend auf LB-Amp-Platten, auf denen vorher je 40 µl einer 100 mM IPTG- und einer 40 mg/ml X-Gal-Stammlösung ausgestrichen wurden, plattiert. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Transformation von Plasmiden wurden etwa 50 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 – 2 µl mit den kompetenten Zellen gemischt und wie oben beschrieben, behandelt. Von dem Transformationsansatz wurden jeweils 10 µl ausplattiert.

Alternativ zu selbst hergestellten elektrokompetenten Zellen wurden auch kommerziell erhältliche DH5 α -Zellen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Transformationsparameter 25 μ F; 2,5 kV; 200 Ω

Zeitkonstante 4 – 5 msec, idealerweise bei 4,6 msec

SOC-Medium 2 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

LB-Amp-Agar LB-Agar plus 100 μ g/ml Ampicillin

2.3.4 Periplasmatische Expression der löslichen Antikörperproteine in *E. coli*

Für die periplasmatische Expression löslicher Antikörperproteine erfolgte zuerst eine Retransformation des antikörperkonstrukttragenden pCANTAB5E-Plasmids in kompetente nicht-supprimierende HB2151 *E. coli*-Zellen (Elektroporation Vergleich 2.3.2). Von dem Transformationsansatz wurden je 10 μ l Zellsuspension auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Einzelklon gepickt und entsprechend in 4 ml LB-Amp über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Mittels dieser Über-Nacht-Kultur wurden dann am darauffolgenden Tag 25 ml 2 x YTG-Medium plus 100 μ g/ml Ampicillin als Expressionskultur angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 bis 1 geschüttelt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 8000 rpm für 10 min pelletiert und in frischen 25 ml 2 x YTS-Medium plus 100 μ g/ml Ampicillin resuspendiert. Die Expression der löslichen Antikörper wurde durch Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert. Die Inkubation der Expressionskultur erfolgte bei RT (~ 25 °C) und 220 rpm für etwa 16 h. Die Behandlung nicht-transformierter HB2151 *E. coli*-Zellen als Kontrollansatz für die Induktion und Expression von Antikörperprotein erfolgte analog zu den antikörpertransformierten *E. coli*, jedoch erfolgte die Ausplattierung als auch die Kultivierung der Zellen gemäß fehlender Antibiotikaresistenz der Zellen in ampicillinfreiem LB-Agar und LB-Medium.

2 x YT-Medium 16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; autoklaviert

2 x YTG-Medium 2 x YT plus 100 mM Glucose (2 M Stammlösung; autoklaviert)

2 x YTS-Medium 2 x YT plus 0,4 M Sucrose (2 M Stammlösung; autoklaviert)

2.3.5 Kultivierung und Konservierung von Säugetierzellen

Zur Aufrechterhaltung der in Zucht befindlichen Zelllinien erfolgte das Passagieren der Zellen alle 3 – 4 Tage in einem Verhältnis von 1 ml Zellen zu 4 ml frischem Medium in 25 cm²-Zellkulturflaschen. Adhärente Zellen wurden zum Passagieren mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml TEP trypsiniert.

Nach vollständigem Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden wurden die Zellen in zusätzlich 4 ml Medium plus FCS resuspendiert und das Trypsin inaktiviert. Von dieser Zellsuspension wurde jeweils 1 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium auf ein Endvolumen von 5 ml aufgefüllt. Zellen in 80 cm²-Zellkulturflaschen wurden jeweils in 25 ml Medium kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen in 3 ml TEP trypsinisiert und anschließend mit 7 ml Medium zusätzlich resuspendiert. Von der 10 ml-Zellsuspension wurden jeweils 3 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium auf 25 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Konservierung der Zellen wurden jeweils 10⁶ Zellen für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C pelletiert und nach vollständiger Abnahme des Überstands in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und für 1 h bei – 20 °C und anschließend bei – 70 °C über Nacht inkubiert. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Kultivierung kryokonservierter Zellen wurde das Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff zum Auftauen auf Eis transferiert und anschließend im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die fast aufgetaute 1 ml-Zellsuspension wurde dann gleichmäßig in 10 ml Auftaumedium, das in einem 15 ml-Polypropylenröhrchen vorgelegt wurde, pipettiert und anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem vorgewärmten Medium plus 10 % FCS aufgenommen und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt.

TEP Trypsin-EDTA in PBS

Einfriermedium 95 % (v/v) FCS und 5 % (v/v) DMSO

Auftaumedium 60 % (v/v) Medium und 40 % FCS

2.3.6 Transiente Transfektion von Säugetierzellen mittels Kalziumphosphat

Für die transiente Transfektion wurden am Vortag jeweils 10⁶ BHK21-Zellen in 75 cm² großen Zellkulturflaschen in 25 ml MEM-Medium plus 10 % FCS ausgesät und kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte etwa 3 – 4 Stunden vor Transfektion ein Mediumwechsel. Für die Transfektion wurden jeweils 15 µg DNA in insgesamt 900 µl ddH₂O gelöst. Nach Vortexen der Lösung wurden 100 µl 2,5 mM CaCl₂ hinzupipettiert. Die Lösung wurde nach gründlichem Mischen unverzüglich und tröpfchenweise auf einem Vortexer in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt, in das 1000 µl 2 x HEBS vorgelegt wurden. Die so behandelte DNA-Lösung wurde für 15 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig in das Medium der konfluenten BHK21-Zellen pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Transfektionsansätze wurden im Brutschrank für etwa 12 h über Nacht inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen 3 – 4 x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für weitere 2 – 3 Tage zwecks Antikörperproduktion in 7,5 ml serumfreien MEM kultiviert.

2 x HEBS 300 mM NaCl; 40 mM HEPES, 10 mM KCl; 1,4 mM Na₂HPO₄, pH 7,1

2.3.7 Stabile Transfektion von Säugetierzellen mittels Kalziumphosphat

Das zu transfizierende pSecTag/HygroA-Plasmid, das das jeweilige Antikörperkonstrukt enthielt, wurde vor Beginn der Transfektion zur Steigerung der Integrationseffizienz einer Linearisierung mittels *AhdI*-Spaltung unterzogen. Die *AhdI*-Schnittstelle befindet sich in dem Gen für die Ampicillinresistenz. Demnach beeinträchtigt die Restriktion des Plasmids an dieser Stelle weder die Expression des rekombinanten Antikörperproteins noch die für die Selektion wichtige Hygromycinresistenz. Für die *AhdI*-Spaltung wurden parallel 10 Ansätze von insgesamt 50 µl mit je 15 µg Plasmid-DNA und 15 U *AhdI* über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Einzelspaltungen in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereint und anschließend 1 : 1 mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch im Verhältnis 25 : 24 : 1 versetzt. Diese Lösung wurde auf dem Vortexer gemischt und dann für etwa 1 min bei 13 000 rpm zwecks Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit Chloroform 1 : 1 gemischt und ausgeschüttelt. Erneut wurde die Probe für 1 min bei 13 000 rpm zwecks Phasentrennung zentrifugiert und die Chloroformextraktion ein weiteres Mal wiederholt. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde die DNA-Lösung in zwei gleich große Mengen aufgeteilt und entsprechend mit 2,5 Volumen EtOH und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat pH 5,5 versetzt und für 30 min bei – 70 °C gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der gefällten DNA für 15 min bei 13 000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde einmal mit kaltem 70 %igem EtOH gewaschen und erneut bei gleichen Parametern für 8 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in je 30 µl ddH₂O resuspendiert. Von der aufgereinigten geschnittenen Plasmid-DNA wurden je 30 µg in der Transfektion eingesetzt, die gemäß den Angaben unter 2.3.6 durchgeführt wurde mit dem Unterschied, dass die BHK21-Zellen anstatt in einer Zellkulturflasche in einer Zellkulturschale (Ø 8,5 cm) ausgesät und transfiziert wurden. Nach Ablauf der Transfektion und dem Waschen mit PBS wurden die adhärennten Zellen mit 1 ml TEP behandelt und abgelöst. Die trypsinisierten Zellen wurden in je 10 ml MEM plus 10 % FCS aufgenommen und pelletiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit frischem MEM plus 10 % FCS gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation in 6 ml MEM plus 10 % FCS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einer 1 : 2-Verdünnungsreihe bis auf 1 : 2048 herunterverdünnt und die letzten 3 – 4 Verdünnungsstufen wurden in jeweils 50 µl-Aliquoten auf einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Diese Platten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag wurden jeweils 50 µl MEM plus 10 % FCS plus 800 µg/ml Hygromycin pro Vertiefung zwecks Selektion antibiotikaresistenter stabiler Klone hinzugegeben.

Die Platten wurden entsprechend der Zeitdauer der Selektion von 7 - 14 Tagen kultiviert und die selektierten Klone wurden in angemessenem Maßstab in größere Kulturgefäßen überführt und unter Selektionsdruck in MEM plus 10 % FCS plus 400 µg/ml Hygromycin (Stammlösung 50 mg/ml in PBS) herangezogen.

2.3.8 Bestimmung der Konzentration von Hygromycin für die Selektion resistenter BHK21-Zellen mittels einer *kill curve*

$2 \cdot 10^4$ BHK21-Zellen wurden in eine 24-Loch-Zellkulturplatte pro Vertiefung ausgesät und in je 1 ml MEM plus 10 % FCS über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen entsprechend mit unterschiedlichen Hygromycinkonzentrationen von minimal 100 µg/ml bis maximal 2400 µg/ml in jeweils 100 µg/ml-Abstufungen versetzt. Die Antibiotikakonzentrationen wurden dabei in MEM plus 10 % FCS bezogen auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml angesetzt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen erfolgte jeden zweiten Tag eine mikroskopische Auswertung des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellmenge sowie ein entsprechender Mediumwechsel mit MEM plus 10 % FCS plus Hygromycin. Die minimale Konzentration, bei der nach 14 Tagen alle Zellen tot waren, wurde als Selektionskonzentration ausgewählt.

2.3.9 Stabile Transfektion von Sp2/0-Myelomazellen mittels Elektroporation

Im Labor von Dr. Ludger Grosse-Hovest wurden die hergestellten bispezifischen *scFv*-Antikörper-Konstrukte mittels Elektroporation gemäß dem laborinternen Protokoll in Sp2/0-Ag14-Myelomazellen transfiziert. Das Konstrukt r3V repräsentiert den bispezifischen CD3 x VEGFR-2 (Klon UCHT-1 x A7) *scFv* und das Konstrukt r3N den CD3 x NCAM (Klon UCHT-1 x D29) *scFv*. Die Selektion stabiler Klone erfolgte mittels Zugabe von 1 mg/ml Geneticin (G418). Die selektionierten Ursprungsklone wurde dann nach Aushändigung von Dr. Grosse-Hovest einer Subselektionierung unterzogen, bei der entsprechend 10^6 Zellen wie unter 2.3.7 beschrieben verdünnt und auf 96-Loch-Flachbodenplatten ausplattiert wurden. Die Zellen wurden dann entsprechend unter Selektionsdruck mittels G418 zur Isolation von Einzelklonen kultiviert.

G418 100 mg/ml Stammlösung in ddH₂O; steril filtriert

2.3.10 Kultivierung der antikörperexprimierenden Myelomaklone für die Produktion

Die Kultivierung der stabilen Myelomazellklone zur Produktion der rekombinanten Antikörper erfolgte in 125 cm²-Zellkulturflaschen in einem Gesamtvolumen von 100 ml steril filtriertem IMDM plus 1 % FCS pro Flasche für 6 Tage. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Zellkulturüberstand geerntet und steril filtriert.

Es erfolgte dann eine Reaktivierung der Zellen in IMDM plus 10 % FCS mit darauffolgender Kultivierung in IMDM plus 5 % FCS für jeweils 2 - 3 Tage bevor die Zellen für eine erneute Produktion verwendet wurden.

2.3.11 Isolation humaner PBMCs gesunder Spender aus LRS-Kammern mittels Ficoll

Die humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) wurden aus *leukoreduction system chambers* (LRS-Kammern), die von der Blutspende des Klinikums Braunschweig zur Verfügung gestellt worden sind, gewonnen (*Neron et al. 2007*). Die LRS-Kammern fallen bei der Blutplättchenapherese an und enthalten zum größten Teil Leukozyten, aber auch Reste von Erythrozyten und Blutplättchen sind vorhanden. Die eingeschweißten Enden der LRS-Kammer wurden gekappt und der Inhalt von etwa 10 ml in einem 50 ml-Polypropylenröhrchen aufgefangen. Die stark konzentrierte Probe wurde mit RT-warmen PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml verdünnt. Für den Ficollgradienten wurden jeweils 12,5 ml RT-warmes Ficoll in 50 ml-Polypropylenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit je 25 ml der Probe überschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2000 rpm und RT ohne Bremse zur Trennung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Die Leukozyten, die sich in der klar bildenden Interphase befinden, wurden vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 2 x mit je 50 ml PBS plus 10 mM Glucose gewaschen und zwischendurch mittels Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min mit Bremse pelletiert. Anschließend wurden die PBMCs in 50 ml RPMI plus 10 % FCS aufgenommen und entweder für Experimente weiterverwendet oder eingefroren.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Isolation der antikörperenthaltenden periplasmatischen *E. coli*-Fraktion

Die Bakterien der induzierten mit dem antikörpertragenden Plasmid transformierte HB2151-Kultur wurden bei 8000 rpm für 15 min bei 4 °C pelletiert und in 6,25 ml kaltem 20 mM TRIS pH 8,0 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen bei 5000 rpm für 15 min bei 4 °C wurde das gewaschene Pellet in 15 ml kaltem 50 mM TRIS pH 8,0 plus 20 % Sucrose resuspendiert und es erfolgte eine Zugabe von 50 µl 0,4 M EDTA pH 8,0. Die so behandelte Zellsuspension wurde bei RT für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend bei 10 000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl kaltem 5 mM MgSO₄ aufgenommen und für 10 min bei 4 °C unter starkem Schütteln inkubiert.

Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10 000 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand, der die periplasmatische *E. coli*-Fraktion enthielt, wurde abgenommen und bei – 20 °C gelagert.

2.4.2 Isolation der *scFv*- und *diabody*-Antikörperproteine aus dem Kulturüberstand transienter und stabiler BHK21-Klone mittels NiNTA-gekoppelten magnetischen Agarosebeads

Zur Analyse der Proteinexpression wurden die antikörperproteinenthaltenden Kulturüberstände der in 75 cm²-Zellkulturflaschen transient transfizierten Zellen nach 48 bis 72 h *post* Transfektion abgenommen. Die Kulturüberstände der in 6-Loch-Zellkulturplatten oder 25 cm²-Zellkulturflaschen kultivierten stabilen Antikörperklone wurden entsprechend 2 - 3 Tage nach Konfluenz geerntet. Die Überstände wurden in jeweils 1,5 ml-Fractionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufgeteilt und jeweils mit 50 µl NiNTA-magnetischen Partikeln versetzt und für 1 h bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert, um die Bindung der NiNTA-gekoppelten magnetischen Partikel an die His-Tag-markierten Antikörperproteine zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurde jeweils der Komplex bestehend aus den Antikörperproteinen und den magnetischen Partikeln mittels eines magnetischen Ständers pelletiert und die Überstände abgenommen. Mit Hilfe desselben Verfahrens erfolgte dann ein dreimaliges Waschen der Komplexe mit je 500 µl NiNTA-Waschpuffer. Abschließend wurde das Zell-Magnetpartikel-Pellet mit je 10 µl NiNTA-Elutionspuffer inkubiert, in dessen Zuge die Antikörperproteine infolge der veränderten Imidazolkonzentration von den magnetischen Partikeln abdissoziieren. Die magnetischen Partikel wurden nochmals pelletiert und die antikörperenthaltenden Überstände wurden abgenommen und im Anschluss entsprechend im Westernblot analysiert.

NiNTA –Waschpuffer 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,05 % (v/v) Tween; pH 8,0

NiNTA-Elutionspuffer 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 0,05 % Tween; pH 8,0

2.4.3 Analyse der Proteinexpression mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte auf 10 und 13 %igen Polyacrylamidgelen bei einer konstanten Spannung von 120 V in 1 x TGS-Laufpuffer. Vom Proteinmarker wurden jeweils 8 µl und von den Proben 10 - 15 µl aufgetragen.

5 x SDS-Auftragspuffer 100 mM Tris HCl (pH 6,8); 5 % SDS; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 25 % (v/v) Glycerol; 250 mM DTT; steril filtriert

Für nicht-reduzierende Bedingungen enthält der Auftragspuffer kein DTT und kein SDS.

Trenngel 10 - 13 % (v/v) Acrylamid (Stammlösung: 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1);
375 mM Tris HCl (pH 8,8); 0,1 % (w/v) SDS; 0,036 % (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED
Sammelgel 3 % Acrylamid (Stammlösung: 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1);
125 mM Tris HCl (pH 6,8); 0,1 % SDS 0,03 % APS; 0,1 % TEMED
Trenngelpuffer 150 mM Tris Base pH 8,8; 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer 0,5 mM Tris Base pH 6,8; 0,4 % SDS

Für nicht-reduzierende Bedingungen enthalten Trenngel- als auch Sammelgelpuffer kein SDS.

Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (TGS) 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS (pH 8,3-8,5)

Für den Proteintransfer wurden jeweils die in MeOH inkubierte PVDF-Membran, das Whatman-Filterpapier sowie das Polyacrylamidgel in Transferpuffer äquilibriert und als Sandwich auf den Semi-Dry-Blotter übertragen. Der Transfer erfolgte für 20 min bei konstanten 15 V.

Proteinblotpuffer 48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,04 % SDS

Für die immunologische Detektion der Proteine erfolgte zuerst die Blockierung der Membran, auf der die Proteine immobilisiert wurden, in PBS-T plus 3 % BSA für 30 min bei RT. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper in der geeigneten Verdünnung in PBS-T plus 3 % BSA für 1 ½ - 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 5 min in PBS-T gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären POD-konjugierten Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 2000 in PBS-T plus 3 % BSA für 30 - 60 min bei RT. Die Membran wurde erneut in PBS-T für 3 x 5 min und anschließend 1 x 5 min in ddH₂O gewaschen. Die Membran wurde getrocknet und die chromogene Detektion der Antikörperreaktion erfolgte mittels DAB-Lösung, die entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt wurde.

PBS-T 1 x PBS-Puffer plus 0,05 % Tween 20

2.4.4 Analyse der Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz

Für den Nachweis der Antikörperexpression wurden BHK21-Zellen mit den entsprechenden antikörpersequenztragenden Plasmiden transfiziert und nach 3 Tagen die Proteinexpression analysiert. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS für 10 min mit 4 %igem Paraformaldehyd für 10 min bei RT unter Schwenken fixiert. Die Paraformaldehydlösung wurde abgenommen und im Anschluss wurden die Zellen mit 0,1 %igem Triton-X-100 in PBS für weitere 10 min bei RT unter Schwenken permeabilisiert. Danach erfolgte die immunologische Detektion der Antikörperproteinexpression.

2.4.5 Aufreinigung der bispezifischen *scFv*-Antikörper mittels Protein-L-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der rekombinanten Antikörperproteine, die von den stabil transfizierten Myelomazellklonen produziert und in den Kulturüberstand sekretiert werden, erfolgte mittels einer 1 ml Protein-L-Affinitätschromatographiesäule gemäß den Angaben des Herstellers. Vor der Aufreinigung wurde der steril filtrierte Zellkulturüberstand im Verhältnis 1 : 1 mit Bindungspuffer versetzt. Die Pufferkomponenten wurden zu Anfang vom Hersteller verwendet und im Anschluss mit eigenen Lösungen ersetzt. Das Protein wurde jeweils in 10 x 1 ml-Fractionen eluiert, wobei der Neutralisationspuffer entsprechend in die 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt wurde.

Bindungspuffer 100 mM Natriumphosphat; 100 mM NaCl; pH 7,2; steril filtriert

Elutionspuffer 0,1 M Glycin pH 2-3; steril filtriert

Neutralisationspuffer 1 M Tris pH 7,5 – 9; steril filtriert

Lagerungspuffer 0,02 % (v/v) Natriumazid in autoklaviertem ddH₂O

2.4.6 Ultrafiltration und Dialyse des aufgereinigten bispezifischen Antikörperproteins

Die eluierten Antikörperproteine wurden mittels Amicon Ultrafiltrationsröhrchen nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert und anschließend dialysiert. Zur Vorbehandlung wurden die Dialyseschläuche in 500 – 1000 ml 0,5 M EDTA-Lösung für 30 min unter Rühren mit einem Glasstab gekocht. Danach wurde die EDTA-Lösung über einen Faltenfilter dekantiert und die Dialyseschläuche mehrmals gut mit ddH₂O gewaschen. Die Lagerung der vorbehandelten Dialyseschläuche erfolgte bei 4 °C in ddH₂O.

2.4.7 Analyse der Antikörperproteinkonzentration mittels BCA-Bestimmung

Die Konzentration der aufgereinigten bispezifischen *scFv*-Antikörperproteine wurde mittels BCA-Bestimmung anhand einer BSA-Eichkurve ermittelt. Für die Eichkurve wurden die BSA-Stammlösungen von 0, 25, 50, 100, 150 und 200 µg/ml jeweils 1 : 20 in BCA-Assay-Medium auf ein Endvolumen von 1 ml verdünnt. Die zu bestimmende Proteinprobe wurde entsprechend einer 1 : 40-Verdünnung unterzogen. Die Proben wurden bei 60 °C für 30 min inkubiert und im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen. Die Probenkonzentration wurde dann anhand der Eichgeraden unter Einbeziehung der entsprechenden Verdünnung ermittelt.

BCA-Assay-Medium BCA-Assay-Reagenz A (Bichinonsäure) und Reagenz B (CuSO₄-Lösung) im Verhältnis 50 : 1

2.4.8 Qualitätsanalyse der aufgereinigten Antikörperproteine mittels Silberfärbung

Die Silberfärbung der SDS-Proteinminigele wurde mittels des *Plus One Silver Staining Kit* gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Analyse der Bindung der anti-VEGFR-2/KDR-Domäne des bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers an lösliches KDR mittels ELISA

Zur Analyse der Antikörperbindung an das korrespondierende Antigen wurde aufgereinigtes lösliches KDR-Rezeptorprotein in einer Konzentration von 1 µg/ml in einem Endvolumen von 100 µl PBS über Nacht bei 4 °C auf eine 96-Loch-MaxiSorp-ELISA-Platte gebunden. Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung abgeschlagen und es erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit jeweils 100 µl PBS plus 3 % BSA für 30 min bei RT auf dem Schüttler. Danach erfolgte die Zugabe von je 100 µl des zu untersuchenden bispezifischen r3V-Antikörperproteins in einer 1 : 10-Verdünnungsreihe in PBS von 100 µg/ml bis 0,001 µg/ml. Für die Positivkontrolle der Bindung des anti-VEGFR-2/KDR A7 *scFv*-Antikörpers wurden 100 µl in einer Antikörperkonzentration von 1 µg/ml dazugegeben. Die Inkubation der Antikörper mit dem KDR-Protein erfolgte für 1 ½ h bei RT auf dem Schüttler. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit jeweils 100 µl des sekundären anti-myc-Tag-Antikörpers für die Proben in einer Verdünnung von 1 : 200 in PBS und des anti-E-Tag-Antikörpers für die Positivkontrolle in einer Verdünnung von 1 : 1000 in PBS. Die Platte wurde für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation der Proben mit je 100 µl des POD-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörpers in einer Verdünnung von 1 : 2000 in PBS für erneut 1 h bei RT an. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Platte jeweils 5 x mit 100 µl PBS-T gewaschen. Zum Schluss wurden je 100 µl Substratreagenz (1 : 1 Gemisch von BD Reagenz A und B) dazugegeben und nach 5 – 30 min entsprechender Substratumsetzung und Entwicklung der Blaufärbung erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 2 N H₂SO₄. Die Absorptionsmessung der gelbgefärbten Proben erfolgte mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm.

2.5.2 Analyse der Bindung der bispezifischen r3V und r3N *scFv*- und der UCHT-1 x A7 und UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörper mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)

Für die Analyse der Bindung der bispezifischen Antikörper an ihre korrespondierenden Antigene wurden jeweils humane Zelllinien verwendet, die entweder CD3-, VEGFR-2/KDR- oder NCAM-positiv sind und Kontrollzelllinien, die keines der Zielantigene tragen. In eine 96-Loch-Rundbodenplatte wurden jeweils 250 000 Zielzellen pro Probe in 100 µl ausgesät und es erfolgte die Inkubation der Zellen mit je 100 µl der entsprechenden Antikörper. Der monoklonale UCHT-1 und ERIC-1-Antikörper, die als Positivkontrolle fungierten, wurden in einer Verdünnung von 1 : 20 in 100 µl FACS-Puffer eingesetzt.

Von dem anti-VEGFR-2/KDR A7 *scFv*-Antikörper, der ebenso als Positivkontrolle fungierte, wurden jeweils 100 µl in einer Konzentration von 1 µg/ml pipettiert. Von der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 wurden entsprechend 100 µl einer 1 : 5-Verdünnung eingesetzt. Die Applikation der aufgereinigten bispezifischen Antikörper r3V und r3N erfolgte in einer Konzentrationsreihe von 100 µg/ml – 0,001 µg/ml in 100 µl PBS. Wurden Zellkulturüberstände der stabilen Sp2/0-Myelomklone, bakterieller periplasmatischer Extrakt oder bakterieller Kulturüberstand, die die bispezifischen Antikörper enthalten, getestet, so wurden jeweils 200 µl des jeweiligen Extrakts/Überstands für die Messung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C. Im nächsten Schritt schloss sich im Falle der monoklonalen Antikörper eine Inkubation mit 100 µl FACS-Puffer, im Falle der bispezifischen Antikörper aus Säugetierzellen eine Inkubation mit 100 µl des Maus anti-myc-Tag-Antikörpers in einer Verdünnung von 1 : 200 in FACS-Puffer und im Falle der bakteriellen Extrakte inklusive des anti-VEGFR-2/KDR A7 *scFv*-Antikörpers eine Inkubation mit 100 µl des Maus anti-E-Tag-Antikörpers in einer Verdünnung von 1 : 1000 in FACS-Puffer für erneute 30 min bei 4 °C an. Zum Schluss erfolgte die Inkubation aller Zellen mit 100 µl des PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG1 Fcγ-Antikörpers in einer Verdünnung von 1 : 100 in FACS-Puffer für weitere 30 min bei 4 °C. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Zellen jeweils 1 x mit je 100 µl FACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss an die Inkubationen wurden die Zellen pro Probe in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und jeweils in ein FACS-Röhrchen überführt, in das 200 µl FACS-Puffer vorgelegt wurden. Die Ansätze wurden je nach Bedarf mit 1/1000 einer 1 mg/ml Propidiumiodidlösung zum Anfärben toter Zellen versetzt. Die Proben wurden im Verlauf der FACS-Messung auf Eis unter Schutz vor Lichteinwirkung gehalten.

FACS-Puffer PBS plus 2 % FCS

2.5.3 BrdU-Assay zur Analyse der Proliferation humaner PBMCs nach Stimulation mit dem bispezifischen r3V und r3N *scFv*-Antikörper

Das aufgereinigte bispezifische Antikörperprotein wurde auf eine 96-MaxiSorp-ELISA-Platte über Nacht bei 4 °C gebunden. Es wurde jeweils eine 1 : 10-Verdünnungsreihe des jeweiligen bispezifischen *scFv*-Antikörpers im Bereich von 100 µg/ml - 0,001 µg/ml in PBS hergestellt und jede Konzentration wurde zu jeweils 100 µl auf die Platte ausplattiert. Die Kontrollantikörper UCHT-1 und ERIC-1 sowie der A7 *scFv* wurden jeweils zu 100 µl in Konzentrationen von 1 µg/ml in PBS ausplattiert. Im Anschluss an die Bindung der Antikörperproteine an die Zellkulturplatte wurden jeweils $5 \cdot 10^5$ frisch isolierte humane PBMCs in je 200 µl RPMI plus 10 % FCS in die einzelnen Vertiefungen ausgesät.

(Für die Analyse humaner CD56-depletierter Leukozyten wurden die PBMCs vor Aussaat entsprechend einer CD56-Depletion unterzogen. Diese wurde mittels anti-CD56/human-gekoppelter magnetischer Beads und magnetischer Zellsortierung (MACS) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.) Zusätzlich wurden für die Ansätze mit dem kostimulatorischen monoklonalen CD28-Antikörper je 5 µg/ml des Proteins hinzugegeben. Die Platte wurde für 3 Tage zwecks Stimulation und Proliferation unter Standardbedingungen kultiviert. Im Anschluss daran wurde zu den Ansätzen jeweils 10 µl BrdU-Reagenz in einer 1 : 10-Verdünnung in RPMI plus 10 % FCS pipettiert. Die Platte wurde erneut über Nacht für etwa 18 h kultiviert und am nächsten Tag erfolgte der immunologische Nachweis der BrdU-Inkorporation in die proliferierenden Zellen. Dafür wurden die Zellen vorerst für 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, wobei einige Mikroliter Medium in den einzelnen Vertiefungen verblieben. Das restliche Medium und die Zellen wurden für etwa 15 min unter Einsatz eines Föns eingetrocknet. Danach wurden die Zellen mit 100 µl Fixierungsreagenz versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Abschlagen des Überstands wurden die Zellen mit je 100 µl eines 1 : 100 verdünnten POD-markierten anti-BrdU-Antikörpers für etwa 1 1/2 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dann gründlich 2 – 3 x mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und nach Verwerfen des letzten Überstands wurden je 100 µl der Substratlösung hinzugegeben. Nach 5 – 10 min deutlicher Substratumsetzung und Farbentwicklung wurde die Reaktion mit je 50 µl 2 N H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen.

2.5.4 BrdU-Assay zur Analyse der Proliferation humaner PBMCs nach Stimulation mit dem bispezifischen r3V und r3N scFv-Antikörper in Gegenwart der antigenpositiven Ziel- und der antigennegativen Kontrollzelllinie

Für die Analyse der Stimulation der Proliferation humaner PBMCs mittels der bispezifischen scFv-Antikörper in Anwesenheit der antigentragenden Zelllinie wurde entsprechend, wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben, verfahren. Im Unterschied zu diesem Ansatz sind alle Antikörper nicht an die Platte gebunden sondern löslich zu den Zellen gegeben worden. Zusätzlich wurde das korrespondierende Antigen in Form der entsprechenden antigenexprimierenden Zelllinie in einer Menge von jeweils $5 \cdot 10^3$ Zielzellen zu den PBMCs gegeben. Diese Zielzellen sind vor Zugabe inaktiviert worden, um deren Proliferation zu unterbinden und somit nur die Proliferation der PBMCs zu untersuchen. Die Inaktivierung der Ziel- und Kontrollzellen erfolgte mittels einer Cäsiumquelle ¹³⁷Cs für 840 sec (entspricht 120 Gy).

2.5.5 Zytotoxizitätsanalyse der bispezifischen r3V und r3N *scFv*-Antikörper

PBMCs humaner Spender wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen in RPMI plus 10 % FCS ausgesät und mit 100 Units rekombinantem humanem Interleukin-2 (IL-2) allein, mit Zielzellen plus IL-2 oder mit Zielzellen plus bispezifischem *scFv*-Antikörper für 3 Tage unter Standardkulturbedingungen stimuliert. Anschließend wurden die PBMCs geerntet und die CD8-positive Zellpopulation aus der Gesamtleukozytenpopulation isoliert. Dafür wurden jeweils etwa $2,5 \cdot 10^7$ PBMCs einer positiven CD8-Selektion unterzogen. Diese wurde mittels anti-CD8/human-gekoppelter magnetischer Beads und MACS gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierten CD8-positiven Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl in 1 ml RPMI plus 10 % FCS aufgenommen und bis zur Zytotoxizitätsanalyse auf Eis aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurden die antigenpositiven Ziel- und die antigennegativen Kontrollzellen trypsiniert und geerntet und für die PKH26-Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. PKH26 ist ein rotfluoreszierender Farbstoff, der stabil in die Zellmembran integriert und im PE-Kanal im FACS darstellbar ist. Es wurden jeweils 10^6 Zielzellen der PKH26-Färbung unterzogen. Die Zellen wurden in ein 15 ml-Polypropylenröhrchen gegeben und 4 x mit je 15 ml serumfreiem RPMI-Medium gewaschen. Die Zellen wurden entsprechend bei 1200 rpm für 10 min pelletiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet in 200 µl Verdünnungslösung der Farbstoffreagenz resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 0,8 µl PKH26-Farbstoff unter Schütteln der Zellsuspension auf dem Vortexer. Die so behandelten Zellen wurden im Anschluss auf einem Rotationsschüttler für 30 min bei RT inkubiert. Die Färbung wurde dann durch Zugabe von 500 µl FCS gestoppt, die Zellen bei 1200 rpm für 10 min pelletiert und danach jeweils 3 bis 4 x mit RPMI plus 10 % FCS gewaschen. Die PKH26-gefärbten Zellen wurden abschließend für den Zytotoxizitätsassay jeweils in einem Endvolumen von 1 ml RPMI plus 10 % FCS aufgenommen. Die Güte und Effizienz der CD8-Isolation als auch der PKH26-Färbung wurde mittels FACS-Analyse der einzelnen Zellpopulationen bestimmt. Die CD8-positiven T-Zellen wurden dafür entsprechend mit einem anti-CD8/human FITC-konjugierten Antikörper für 15 min bei 4 °C inkubiert. Als Kontrollen fungierten jeweils die ungefärbte Zielzellpopulation für die PKH26-Färbung und die ungefärbte PBMC-Ursprungspopulation nach der Ernte beziehungsweise die nicht positiv selektierte Population nach MACS-Separation für die CD8-Färbung. Die anschließende Zytotoxizitätsanalyse wurde wie folgt durchgeführt. Die isolierten CD8-positiven T-Zellen wurden in entsprechenden Effektor (E) : Zielzell(T)-Verhältnissen zu jeweils 10^4 PKH26-gefärbten antigenpositiven Ziel- und antigennegativen Kontrollzellen in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit rundem Boden gegeben. Neben den Kompensationsproben für die FACS-Analyse wurde jeweils ein Ansatz pro E : T-Ratio ohne und jeweils ein Ansatz mit bispezifischem *scFv*-Antikörper angesetzt.

Die Platte mit den Zytotoxizitätsansätzen wurde für 3 - 4 h unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Inkubation wurde die Platte zum Pelletieren der Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in je 100 µl PBS gewaschen und erneut mittels Zentrifugation pelletiert. Danach wurden die Zellen jeweils in 100 µl AnnexinV-Bindopuffer resuspendiert und in FACS-Polypropylenröhrchen überführt. Zu jeder Probe wurden jeweils 5 µl AnnexinV-FITC gegeben und es erfolgte eine Inkubation der Zellen für 10 min bei RT. Danach wurden jeweils 200 µl Bindungspuffer zusätzlich zu den Proben gegeben und im Anschluss daran erfolgte die Analyse der PKH26- und AnnexinV-FITC-gefärbten Zellen im FACS.

AnnexinV-Bindungspuffer 0,1M Hepes (pH 7,4); 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂; steril filtriert

Als Maß zur Quantifizierung der totalen und spezifischen Zelllyse wurden die im FACS ermittelten AnnexinV-FITC-einzelpositiven Populationen herangezogen. Als Kontrolle fungierte die Messung der PKH26-markierten Ziel- und Kontrollzellen, die AnnexinV-FITC gefärbt sind. Zur Auswertung im FACS wurde die Ziel- beziehungsweise Kontrollzellpopulation im Dot-Plot von SSC über FSC dargestellt. Alle Zellen der entsprechenden Population wurden mit Ausnahme der Zelltrümmer in einem Gate zusammengefasst. Die verschiedenen Zytotoxizitätsansätze wurden daran anschließend im Dot-Plot von FITC über PE (= PKH26) in den vier Quadranten dargestellt. Das Kreuz zur Abgrenzung der Quadranten wurde mit Hilfe der FITC- sowie PE-negativen Ziel- und Kontrollzellen erstellt und übernommen. Die totale Zelllyse wurde mittels der folgenden Formel berechnet.

Totale Zelllyse [%] =

$$\frac{(\text{Anzahl AnnexinV-FITC-positive Zellen}_{\text{Probe}} - \text{Anzahl AnnexinV-FITC-positive Zellen}_{\text{Kontrolle}})}{(\text{Anzahl Zellen}_{\text{Probe/gesamt}} - \text{Anzahl AnnexinV-FITC-positive Zellen}_{\text{Kontrolle}})} * 100$$

Die Anzahl der Zellen_{Probe/gesamt} bezieht sich dabei auf die Gesamtanzahl der Zellen im erfassten Gate und die Anzahl der Zellen_{Kontrolle} sowie Zellen_{Probe} auf die Zellen der im erfassten Gate vorhandenen AnnexinV-FITC-einzelpositiven Zellen.

Die spezifische Zelllyse wurde als Betrag der Differenzen der Werte von [%] totale Zelllyse Ansatz mit bispezifischen *scFv*-Antikörper und [%] totale Zelllyse Ansatz ohne bispezifischen *scFv*-Antikörper ermittelt.

3 Ergebnisse

Das der vorliegenden Arbeit vorangegangene Projekt zur Herstellung und Charakterisierung des murinen bispezifischen Parentalantikörpers OE-1 (OKT-3 x ERIC-1) (Jensen *et al.* 2003) bildete die Grundlage für die Herstellung und Charakterisierung rekombinanter bispezifischer CD3 x NCAM-Antikörperformate. In Anlehnung daran, erfolgten in den initialen experimentellen Arbeiten die Herstellung sowie die Expressionsanalyse des korrespondierenden OKT-3 (anti-CD3) *single chain Fv* (*scFv*)- (Klon (Q,C) Kipriyanov *et al.* 1997), des ERIC-1 (anti-NCAM) *scFv*- und des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers im prokaryotischen und eukaryotischen System.

3.1 Generierung und Expression der OKT-3 und ERIC-1 *scFv*- und des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers in *E. coli* sowie BHK21-Zellen

3.1.1 Herstellung der *scFv*- und *diabody*-DNA-Konstrukte

Ausgehend von den beiden Hybridomazelllinien OKT-3 (anti-CD3) und ERIC-1 (anti-NCAM/CD56) wurde die Gesamt-RNA isoliert und anschließend daraus die cDNA synthetisiert, die als Ausgangsprodukt für die Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen diente. Die Generierung der OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörperkonstrukte ist in der Abbildung 3.1 zusammenfassend schematisch dargestellt.

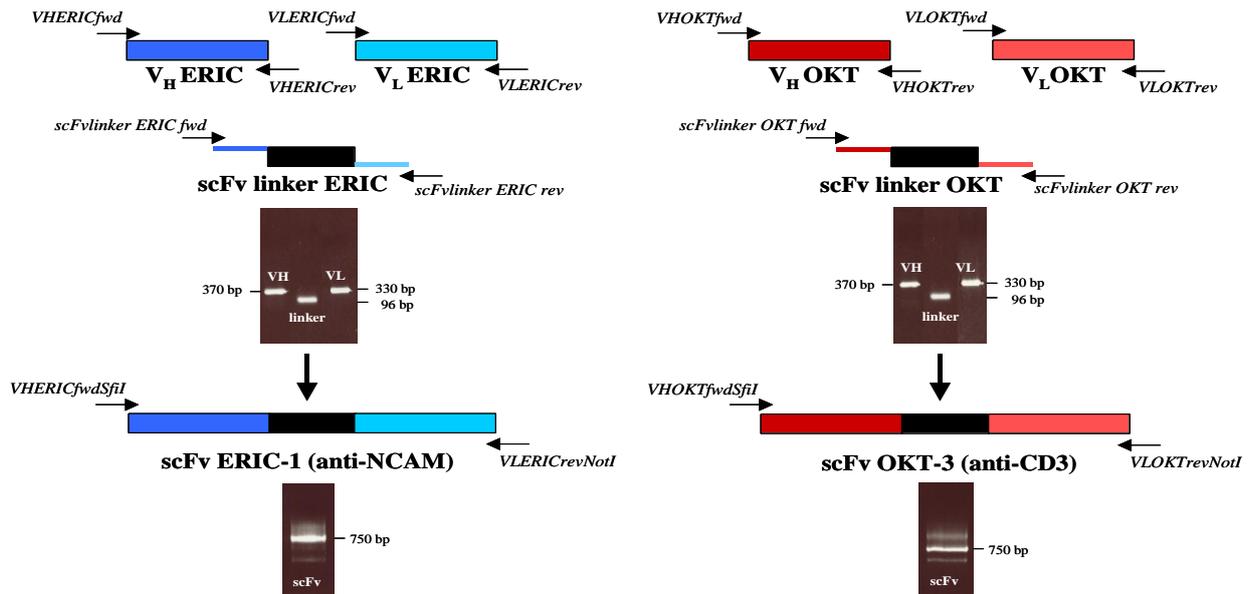


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Generierung der ERIC-1 und OKT-3 *scFv*-DNA-Konstrukte mittels PCR Die jeweiligen variablen Domänen V_H (Molekulargewicht ~ 370 bp) und V_L (Molekulargewicht ~ 330 bp) der Antikörperklone ERIC-1 (blau unterlegt) und OKT-3 (rot unterlegt) wurden durch Verbindung mit einem flexiblen (Gly₄Ser)₃-Linker (schwarz unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) mittels Assembly-PCR zu den entsprechenden *scFv*-Antikörpern mit einem Molekulargewicht von ~ 750 bp zusammengesetzt.

Aus der cDNA wurden mittels der Primer *VHERICfwd* und *VHERICrev* sowie *VLERICfwd* und *VLERICrev* die variablen Antikörperketten V_H (MW ~ 370 bp) und V_L (MW ~ 330 bp) des ERIC-1-Antikörpers amplifiziert. Entsprechend erfolgte die Vervielfältigung der variablen Sequenzen des OKT-3-Antikörpers mittels der Primer *VHOKTfwd* und *VHOKTrev* sowie *VLOKTfwd* und *VLOKTrev*. Aus den so gewonnenen DNA-Fragmenten wurde mittels Assembly-PCR ein *scFv*-Antikörper hergestellt, in dem die variablen Domänen mit einem einzeln synthetisierten und amplifizierten $(Gly_4Ser)_3$ -Peptidlinker (MW Template = 96 bp) verbunden worden sind. Die Fragmente für den 'scFv linker ERIC' wurden mittels der Primer *scFvlinkerERICfwd* und *scFvlinkerERICrev* amplifiziert. Analog dazu erfolgte die Amplifizierung des 'scFv linker OKT' mittels der Primer *scFvlinkerOKTfwd* sowie *scFvlinkerOKTrev*. Das vollständige *scFv*-Konstrukt (MW ~ 750 bp) wurde dann in der Assembly-PCR entsprechend für den ERIC-1 *scFv*-Antikörper mit *VHERICfwdSfiI* und *VLERICrevNotI* und für den OKT-3 *scFv* mit *VHOKTfwdSfiI* und *VLOKTrevNotI* amplifiziert. Die *scFv*-Konstrukte sind somit am N- beziehungsweise C-Terminus mit den für die Klonierung in das pCANTAB5E- und das pSecTag/HygroA-Plasmid kompatiblen Restriktionsschnittstellen versehen. Parallel zur Analyse der OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörper wurde unter Verwendung dieser *scFv*-Klone das OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörperkonstrukt (MW ~ 1500 bp) hergestellt. Die Generierung des *diabody* ist zusammenfassend in Abbildung 3.2 dargestellt. Ausgangspunkt für die Konstruktion waren auch hier die einzelnen variablen Domänen V_H und V_L des OKT-3 sowie des ERIC-1-Antikörpers. Im Unterschied zum *scFv*-Format wurden im ersten Amplifizierungsschritt sogenannte reziproke *scFv*-Formate hergestellt. Das heißt, V_H OKT wurde mit V_L ERIC zum reziproken *scFv* 'chain AB OKTERIC' und V_H ERIC mit V_L OKT zum reziproken *scFv* 'chain BA OKTERIC' verbunden. Die hier eingesetzte Linkersequenz (MW Template = 96 bp) zwischen den variablen Domänen besteht nur aus einer einfachen Gly_4Ser -Abfolge. Dieses Konstrukt ist für die *scFv*-Kette 'AB' von überlappenden Sequenzen des Endes von V_H der Domäne A und dem Anfang von V_L der Domäne B flankiert. *Vice versa* ist der Linker für die *scFv*-Kette 'BA' von Sequenzen des Endes von V_H der Domäne B mit dem Anfang von V_L der Domäne A flankiert. Die Domäne A bezieht sich dabei auf den Klon OKT-3 und die Domäne B auf den Klon ERIC-1. Daran orientieren sind entsprechend die Bezeichnungen der reziproken *scFv* mit 'chain AB' sowie 'chain BA'. Der 'chain linker AB OKTERIC' wurde entsprechend mit den Primern *chainABOKTERICfwd* und *chainABOKTERICrev* amplifiziert. Analog dazu wurde durch Einsatz der Primer *chainBAOKTERICfwd* und *chainBAOKTERICrev* der 'chain linker AB OKTERIC' vervielfältigt. In einem zweiten Amplifizierungsschritt erfolgte die Zusammensetzung der reziproken *scFv*-Konstrukte 'AB' und 'BA' (MW ~ 720 bp) zum *diabody*-Antikörper.

Hier wurde erneut ein flexibler Peptidlinker (MW Template = 96 bp) eingefügt, der die Abfolge (Gly₄Ser)₃ und ebenfalls überlappende Sequenzen besitzt. Die flankierenden Enden sind kompatibel mit dem Ende von dem reziproken *scFv* 'chain AB OKTERIC' und dem Anfang von 'chain BA OKTERIC'. Der ‚*scFv* linker OKTERIC‘ wurde entsprechend mit den Primern *scFvlinkerOKTERICfwd* und *scFvlinkerOKTERICrev* hergestellt. In einer anschließenden Assembly-PCR wurden dann die Ketten 'AB' und 'BA' zusammen mit dem Linker unter Verwendung der Primer *VHOKTfwdSfi* und *VLOKTrevNotI* zum *diabody* (MW ~ 1500 bp) verbunden, der dann entsprechend in die Expressionsplasmide kloniert worden ist.

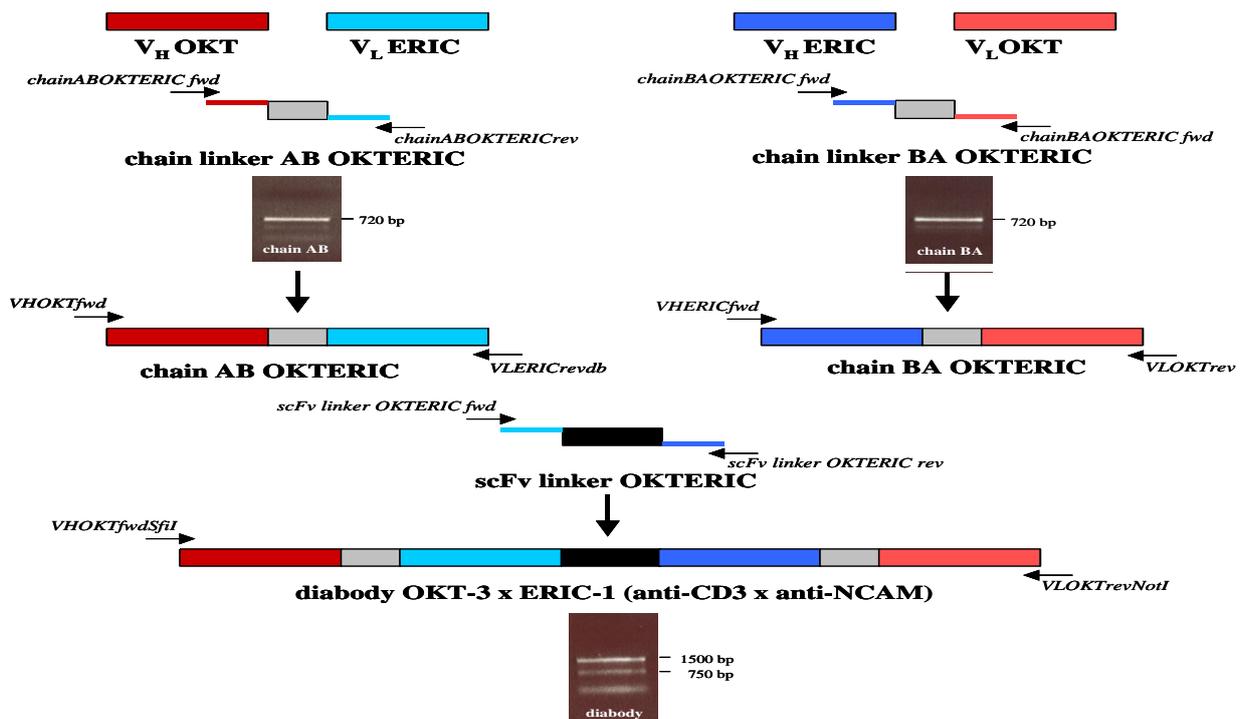


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Generierung des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-DNA-Konstrukts mittels PCR Die jeweiligen variablen Domänen V_H (Molekulargewicht ~ 370 bp) und V_L (Molekulargewicht ~ 330 bp) der Antikörperklone OKT-3 (rot unterlegt) und ERIC-1 (blau unterlegt) wurden in einer ersten Assembly-PCR durch Verbindung mit einem flexiblen Gly₄Ser-Linker ‚chain linker AB OKTERIC‘ sowie ‚chain linker BA OKTERIC‘ (grau unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) zu den entsprechenden reziproken *scFv*-Antikörpern (Molekulargewicht ~ 720 bp) zusammengesetzt. In einer weiteren Assembly-PCR wurden dann die reziproken *scFv*-Konstrukte ‚chain AB OKTERIC‘ und ‚chain BA OKTERIC‘ mit einem flexiblen (Gly₄Ser)₃-Linker ‚*scFv* linker OKTERIC‘ (schwarz unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) zum OKT-3 x ERIC-1 *diabody* (anti-CD3 x anti-NCAM) mit einem Molekulargewicht von ~ 1500 bp zusammengesetzt.

3.1.2 Transiente Expression des OKT-3 und ERIC-1 *scFv*- sowie des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers in HB2151 *E. coli*-Zellen

Die in den Vektor pCANTAB5E klonierten *scFv*- und *diabody*-Konstrukte wurden unter Verwendung des nicht-supprimierenden HB2151-Stamms mittels IPTG-Induktion des LacZ-Promotors des pCANTAB5E-Plasmids löslich im Periplasma der Bakterien exprimiert.

Trotz periplasmatischer Expression besteht die Möglichkeit, dass auch im Kulturüberstand Protein nachweisbar ist. Daher wurde zusätzlich zu der Antikörperexpression in der Periplasmafraktion auch die Expression im Kulturüberstand mittels Westernblot analysiert. Dafür wurden jeweils 15 µl des Kulturüberstands sowie der Periplasmafraktion auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers nachgewiesen. Die Ergebnisse der Expression der *scFv*- und des *diabody*-Antikörpers sind in der Abbildung 3.3 zusammenfassend wiedergegeben.

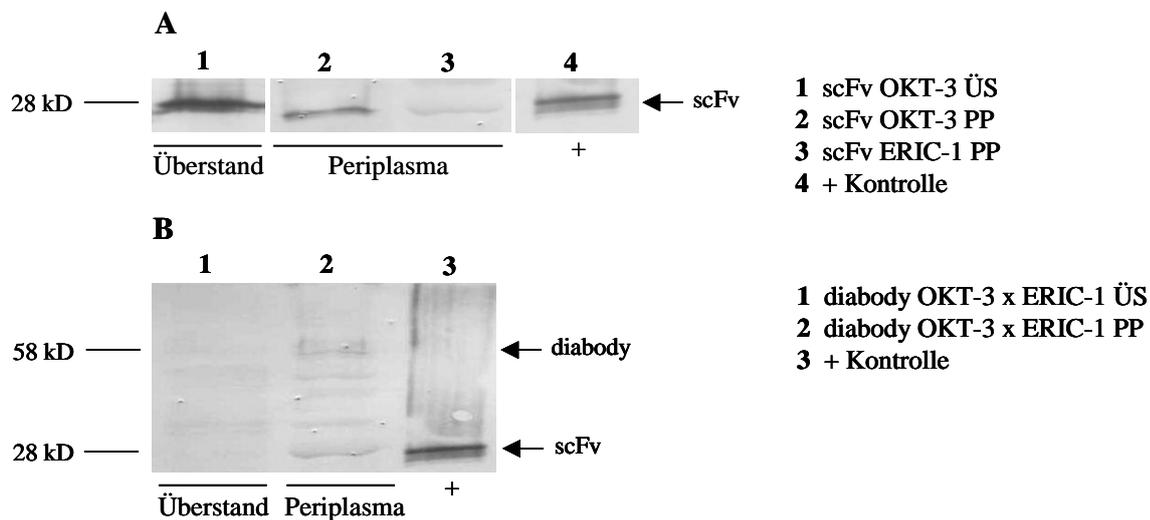


Abbildung 3.3 Transiente Expressionsanalyse des OKT-3 und ERIC-1 *scFv*- sowie des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers in *E. coli* Analyse der Proteinexpression des OKT-3 (anti-CD3) und des ERIC-1 (anti-NCAM) *scFv*-Antikörpers mittels Westernblot. Nachweis des rekombinanten OKT-3 *scFv*-Proteins in der Periplasmafraktion (PP – Spur 2) und im Kulturüberstand (ÜS – Spur 1) und des ERIC-1 *scFv*-Proteins im Periplasma (PP – Spur 3). Detektion der rekombinanten Proteine mit einem Molekulargewicht von jeweils 28 kD mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. **B** Nachweis der Proteinexpression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers mit einem Molekulargewicht von 58 kD mittels den unter **A** beschriebenen Antikörpern im Überstand (ÜS – Spur 1) und im Periplasma (PP – Spur 2). + **Positivkontrolle** aufgereinigtes E-Tag-markiertes A7 (anti-VEGFR-2) *scFv*-Protein (Spur 3) mit einem Molekulargewicht von 28 kD

Während der OKT-3 *scFv* mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kD deutlich im Periplasma (Abbildung 3.3 A, PP – Spur 2) als auch im Überstand (Abbildung 3.3 A, ÜS – Spur 1) exprimiert wird, zeigt der ERIC-1 *scFv* keine Expression im Überstand (nicht dargestellt) und nur eine sehr schwache Expression in der Periplasmafraktion (Abbildung 3.3, PP – Spur 3).

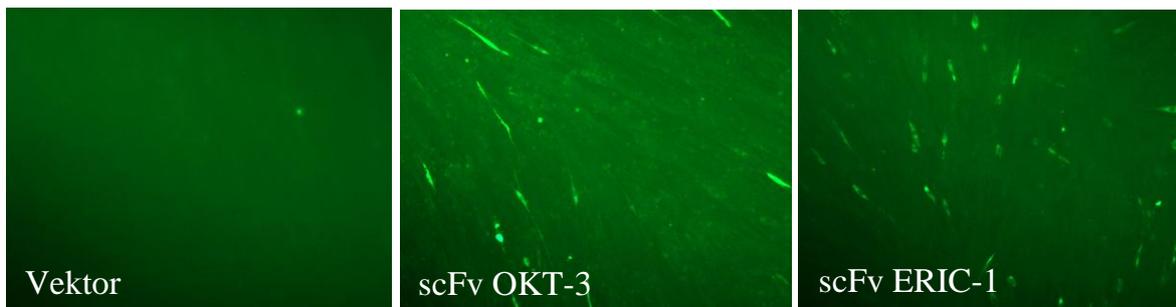
Ähnlich verhält es sich mit der Proteinexpression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody* im ÜS und im PP. Es ist eine erkennbare, wenn auch sehr schwache Proteinbande des *diabody* in der Periplasmafraktion nachweisbar (Abbildung 3.3 B – Spur 2). Im Überstand jedoch konnte kein *diabody*-Protein detektiert werden (Abbildung 3.3 B – Spur 1).

Die *scFv*-Expression in *E. coli* kann bekanntermaßen problematisch sein. Parameter wie zum Beispiel Temperatur sowie die IPTG- und die Zuckerkonzentration im Induktionsmedium sind variable Parameter, die eine wichtige Rolle spielen. Außerdem kann die Codonverwertung, die in *E. coli* anders ausgeprägt ist als bei Säugetierzellen, eine *scFv*-Expression beeinträchtigen. Um auszuschließen, dass die sehr geringe ERIC-1 *scFv*-Expression auf systematische Probleme zurückzuführen ist, wurde der ERIC-1 *scFv* zusätzlich transient in BHK21-Zellen transfiziert und exprimiert. Die Analyse wurde im Vergleich zu dem in *E. coli* gut exprimierbaren OKT-3 *scFv* durchgeführt.

3.1.3 Transiente Expression des OKT-3 und des ERIC-1 *scFv*-Antikörpers in BHK21-Zellen

Die zur sekretorischen Expression in das pSecTag/HygroA-Vektor klonierten OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörper wurden transient in BHK21-Zellen transfiziert. Die Proteine wurden entsprechend hinsichtlich ihrer Expression intrazellulär mittels Immunfluoreszenz sowie als sekretierte Antikörper im Westernblot analysiert. Die Ergebnisse der transienten Expressionsanalyse sind im Überblick in der Abbildung 3.4 dargestellt.

A



B

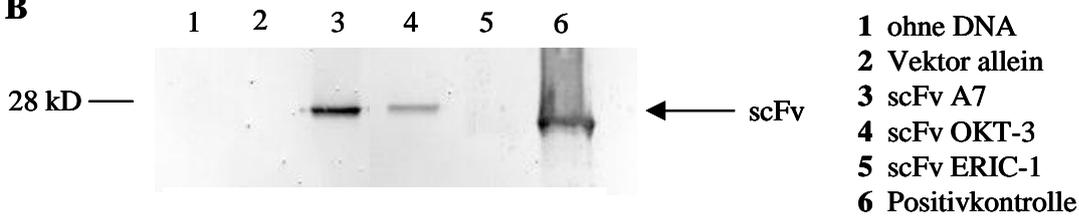


Abbildung 3.4 Transiente Expressionsanalyse des OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörpers in BHK21-Zellen

A Analyse der intrazellulären Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz. Nachweis der rekombinanten Antikörperproteine mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären FITC-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. **B** Analyse der Proteinexpression von sekretiertem *scFv*-Antikörper mittels Westernblot. Nachweis der aus den Zellkulturüberständen mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigten rekombinanten Antikörperproteine mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Expressionsanalyse von *scFv*-Protein für das OKT-3 (Spur 4), das A7 (Spur 3) und das ERIC-1 *scFv*-Konstrukt (Spur 5) bei 28 kD. **Positivkontrolle** myc-markiertes A7 (anti-VEGFR-2) *intrabody*-Protein aus Zelllysate einer transienten Transfektion (Spur 6)

Der Nachweis in der Immunfluoreszenz erfolgte mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären FITC-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Der Nachweis in Westernblot erfolgte nach NiNTA-Aufreinigung der im Zellkulturüberstand löslich vorliegenden Antikörperproteine mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Maus IgG H+L-Antikörpers. Wie in Abbildung 3.4 A ersichtlich ist, kann eine intrazelluläre Proteinexpression für beide *scFv*-Antikörper nachgewiesen werden. Hingegen zeigt die Westernblotanalyse der antikörperenthaltenden Überstände nach NiNTA-Aufreinigung in Abbildung 3.4 B, dass der OKT-3 *scFv* (Abbildung 3.4 B - Spur 4), jedoch nicht der ERIC-1 *scFv* (Abbildung 3.4 - Spur 5) im Überstand nachgewiesen werden kann – ähnlich wie zuvor in *E. coli*. Im Vergleich wurde entsprechend auch Überstand aus einer transienten Transfektion des anti-VEGFR-2 A7 *scFv* (Böldicke *et al.* 2001) aufgereinigt und analysiert. Die Expression des A7-Proteins ist eindeutig nachweisbar (Abbildung 3.4 B - Spur 3). Als weitere Positivkontrolle fungierte anti-VEGFR-2 myc-markiertes *intrabody*-Protein aus Zelllysate einer transienten Transfektion, die als sicher positiv eingestuft werden konnte. Der Nachweis der Antikörperexpression im Westernblot erfolgte in allen Fällen mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Die transiente Expression des ERIC-1 *scFv* in BHK21-Zellen erbrachte im Vergleich zur *E. coli*-Expression keine Unterschiede. Da anzunehmen war, dass dies auch bei dem OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörper der Fall sein würde, ist auf die transiente Expressionsanalyse des *diabody* verzichtet worden. Es ist zu erkennen, dass das ERIC-1 *scFv*-Konstrukt offensichtlich translatiert wird, da intrazelluläre Proteinexpression nachweisbar ist (Abbildung 3.4 A). Es lag dementsprechend die Vermutung nahe, dass die transiente Expression eine unzureichende Proteinmenge liefert. Daher erfolgte eine stabile Transfektion des OKT-3 und ERIC-1 *scFv* sowie des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*.

3.1.4 Stabile Expression des OKT-3 und des ERIC-1 *scFv*- sowie des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers in BHK21-Zellen

3.1.4.1 Analyse der Gen- und Proteinexpression der OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörper

Die OKT-3 sowie ERIC-1 *scFv*-pSecTag/HygroA-Vektorkonstrukte wurden einer *AhdI*-Spaltung unterzogen und stabil in BHK21-Zellen unter Hygromycinselektionsdruck transfiziert. Es wurden jeweils 4 Klone selektiert, deren Expression auf mRNA- und Proteinebene evaluiert wurde. Die Ergebnisse der Analyse sind in der Abbildung 3.5 zusammenfassend dargestellt.

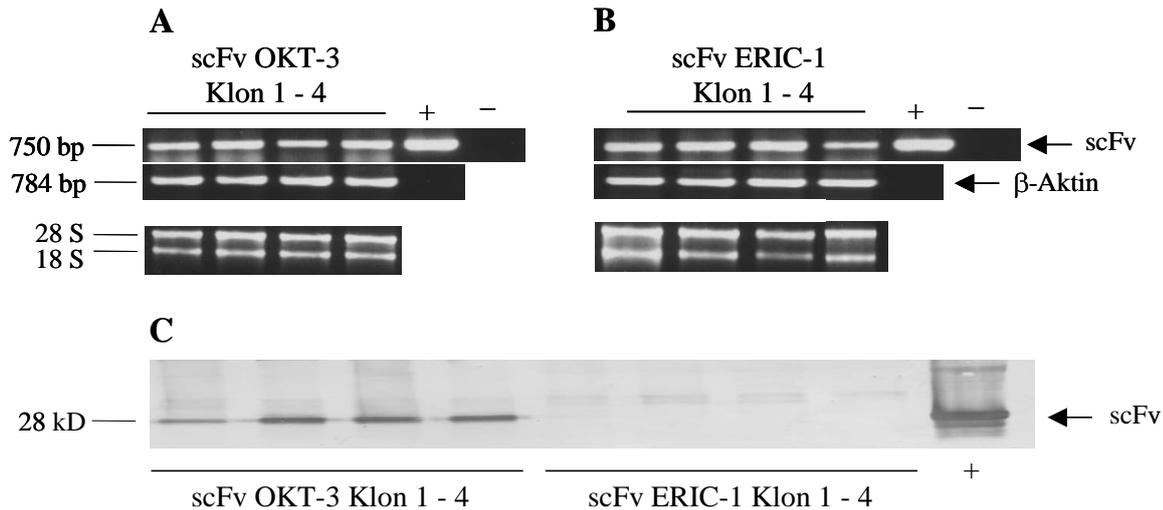


Abbildung 3.5 Expressionsanalyse der stabil in BHK21-Zellen transfizierten OKT-3 und ERIC-1 *scFv*-Antikörper auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot **A obere Zeile** Nachweis der Genexpression des OKT-3 *scFv* mit einem Molekulargewicht von 750 bp **mittlere Zeile** Nachweis der Genexpression des *housekeeping*-Gens β-Aktin mit einem Molekulargewicht von 784 bp **untere Zeile** isolierte RNA der stabilen OKT-3 *scFv*-Klone **B obere Zeile** Nachweis der Genexpression des ERIC-1 *scFv*-Antikörpers mit einem Molekulargewicht von 750 bp **mittlere Zeile** Nachweis der Genexpression des *housekeeping*-Gens β-Aktin mit einem Molekulargewicht von 784 bp **untere Zeile** isolierte RNA der stabilen ERIC-1 *scFv*-Klone **C** Nachweis der Proteinexpression der aus Zellkulturüberständen mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigten *scFv*-Proteine mit einem Molekulargewicht von 28 kD mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers für den **linke Spalte** OKT-3 *scFv*-Antikörper und **rechte Spalte** dem ERIC-1 *scFv*-Antikörper + **Positivkontrolle** **Abbildung A + B** Amplifikat des entsprechenden *scFv*-Antikörpers aus ungeschnittenem Ausgangsvektor + **Positivkontrolle** **Abbildung C** aufgereinigtes A7 *scFv*-Protein aus stabiler Transfektion – **Negativkontrolle** **Abbildung A + B** ddH₂O

Als *housekeeping*-Gen für die RT-PCR wurde β-Aktin eingesetzt und als Ladungskontrolle für die eingesetzte Menge an cDNA fungierte die isolierte RNA, die in einer Gesamtmenge von 1 µg aufgetragen wurde. Für die RT-PCR wurden jeweils 2 µl cDNA eingesetzt. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Wie die gelelektrophoretische Darstellung der RNA verdeutlicht (Abbildung 3.5 A + B untere Zeile), wurden äquivalente Mengen an RNA in cDNA umgeschrieben und für die RT-PCR eingesetzt. Dies spiegelt sich auch entsprechend in der gleichen Intensität der Expression des *housekeeping*-Gens β-Aktin, dessen Transkript bei einem Molekulargewicht von 784 bp detektiert wurde, wider (Abbildung 3.5 A + B mittlere Zeile). Die selektierten anti-CD3 *scFv*-Klone 1 – 4 (dargestellt in Abbildung 3.5 A obere Zeile) zeigen eine klare und identische Antikörpergenexpression bei einem Molekulargewicht von 750 bp. Entsprechend dazu wird in Abbildung 3.5 C linke Spalte eine gleich stark vorhandene Proteinexpression des anti-CD3 *scFv*-Antikörpers deutlich. Die selektierten ERIC-1 *scFv*-Klone 1 – 4 (Abbildung 3.5 B obere Zeile) zeigen vergleichend zu den OKT-3 *scFv*-Klone eine deutliche und in sich gleiche Antikörpergenexpression mit vergleichbaren Intensitäten.

Augenfällig jedoch ist, dass im Gegensatz zu der Proteinexpression des OKT-3 *scFv*-Antikörpers trotz Vorhandensein des Transkripts (Abbildung 3.5 obere Zeile) die Expression des ERIC-1 *scFv*-Proteins nicht detektierbar ist (Abbildung 3.5 C rechte Spalte). Die stabile Expression verdeutlicht, dass der ERIC-1 *scFv* auf transkriptioneller Ebene, aber nicht auf Proteinebene exprimiert wird. Die Ursachen dafür konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Im gewählten Expressionssystem können sie sicher nicht vermutet werden. Auch erwies sich der ERIC-1 *scFv* in anderen Arbeiten auf Proteinebene als nicht exprimierbar (Kapitel 4). Zudem war das Ziel, einen funktionierenden anti-NCAM *scFv* zur Herstellung bispezifischer CD3 x NCAM-Formate verwenden zu können. Da der Einsatz des ERIC-1 *scFv* sich in dieser Hinsicht als nicht zielführend erwies, wurde der ERIC-1-Klon im Folgenden durch den humanisierten anti-NCAM *scFv* D29 ersetzt (Abschnitt 3.3).

3.1.4.2 Analyse der Gen- und Proteinexpression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers

Das OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-pSecTag/HygroA-Konstrukt wurde analog zu den *scFv*-Konstrukten stabil in BHK21-Zellen transfiziert und die selektionierten Klone 1 – 5 entsprechend hinsichtlich ihrer Gen- und Proteinexpression analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 zusammenfassend dargestellt. Wie im obigen Absatz beschrieben, wurden auch hier für die RT-PCR vergleichbare Menge an cDNA eingesetzt. Dies äußert sich vergleichend in der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA in Abbildung 3.6 A untere Zeile und der Intensitäten der Transkripte des *housekeeping*-Gens β -Aktin in Abbildung 3.6 A mittlere Zeile. Wie in Abbildung 3.6 A obere Zeile zu erkennen ist, zeigt nur Klon 5 eine deutliche Genexpression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Transkripts. Dennoch ist, wie im Falle des ERIC-1 *scFv*-Antikörpers (Abbildung 3.5 B Westernblot), eine Expression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers auf Proteinebene nicht nachweisbar (Abbildung 3.6 B). In Anlehnung zum ERIC-1 *scFv* erbrachte auch die Expression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody* nicht den erwünschten Erfolg. Im Zuge der vorliegenden Studie wurde diese Strategie hinsichtlich funktionaler Analysen nicht weiter verfolgt.

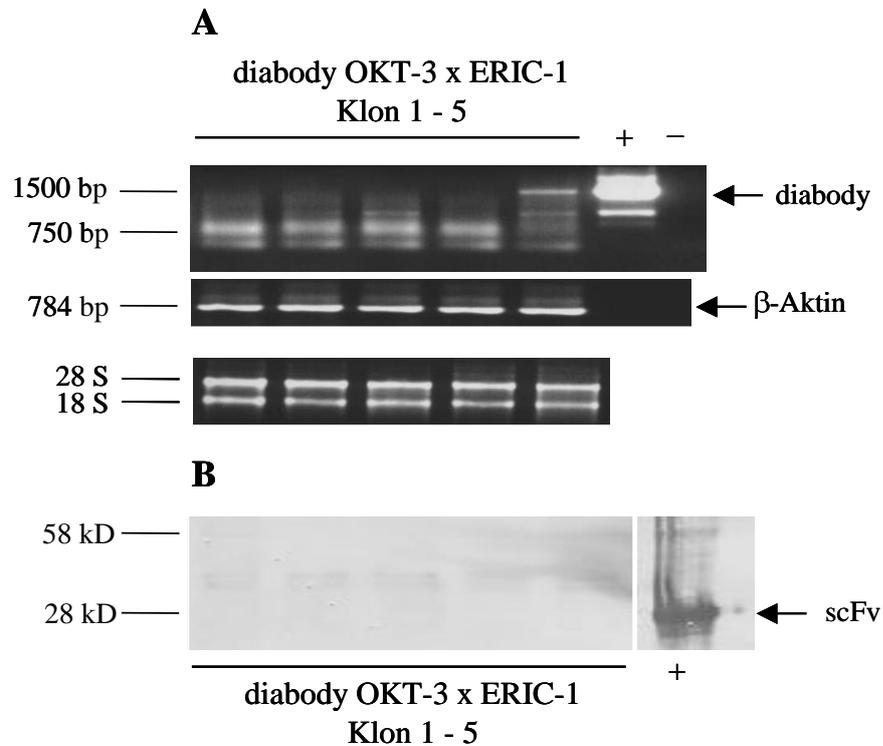


Abbildung 3.6 Expressionsanalyse des stabil in BHK21-Zellen transfizierten OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot **A obere Zeile** Nachweis der Genexpression des OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers mit einem Molekulargewicht von 1500 bp **mittlere Zeile** Nachweis der Genexpression des *housekeeping*-Gens β-Aktin mit einem Molekulargewicht von 784 bp **untere Zeile** isolierte RNA der stabilen OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Klone **B** Analyse der Proteinexpression des aus Zellkulturüberständen mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigten OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers mit einem Molekulargewicht von 58 kD mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. + **Positivkontrolle** **Abbildung A** Amplifikat des entsprechenden *diabody*-Antikörpers aus ungeschnittenem Ausgangsvektor + **Positivkontrolle** **Abbildung B** aufgereinigtes A7 *scFv*-Protein aus stabiler Transfektion – **Negativkontrolle** **Abbildung A** ddH₂O

In weiterführenden Arbeiten wurde auch der OKT-3 *scFv* aus beschriebenen Gründen (Kapitel 4) für die Herstellung bispezifischer Formate nicht weiter verwendet. Der humanisierte *scFv*-Klon UCHT-1 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ludger Grosse-Hovest, Uni Tübingen) wurde anstelle des OKT-3 für die Herstellung der bispezifischen Formate eingesetzt (Abschnitt 3.2 und 3.3). Im Folgenden wurde ein UCHT-1 x D29 *diabody* (anti-CD3/humanisiert x anti-NCAM/humanisiert) generiert und analysiert (Abschnitt 3.3). Parallel zu diesem Projekt erfolgte zusätzlich die Herstellung und Analyse eines UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers (anti-CD3/humanisiert x anti-VEGFR-2/murin) (Abschnitt 3.2). Da dieser Antikörper zeitlich eher als der UCHT-1 x D29 *diabody* für funktionale Analysen vorlag, wird zuerst auf die Ergebnisse der mit dem UCHT-1 x A7 *diabody* durchgeführten Experimente Bezug genommen.

3.2 Generierung und Expression des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers in *E. coli* und BHK21-Zellen

3.2.1 Herstellung des UCHT-1 x A7 *diabody*-DNA-Konstrukts

Die Herstellung des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörperkonstrukts (anti-CD3/humanisiert x anti-VEGFR-2/murin) ist zusammenfassend in Abbildung 3.7 dargestellt.

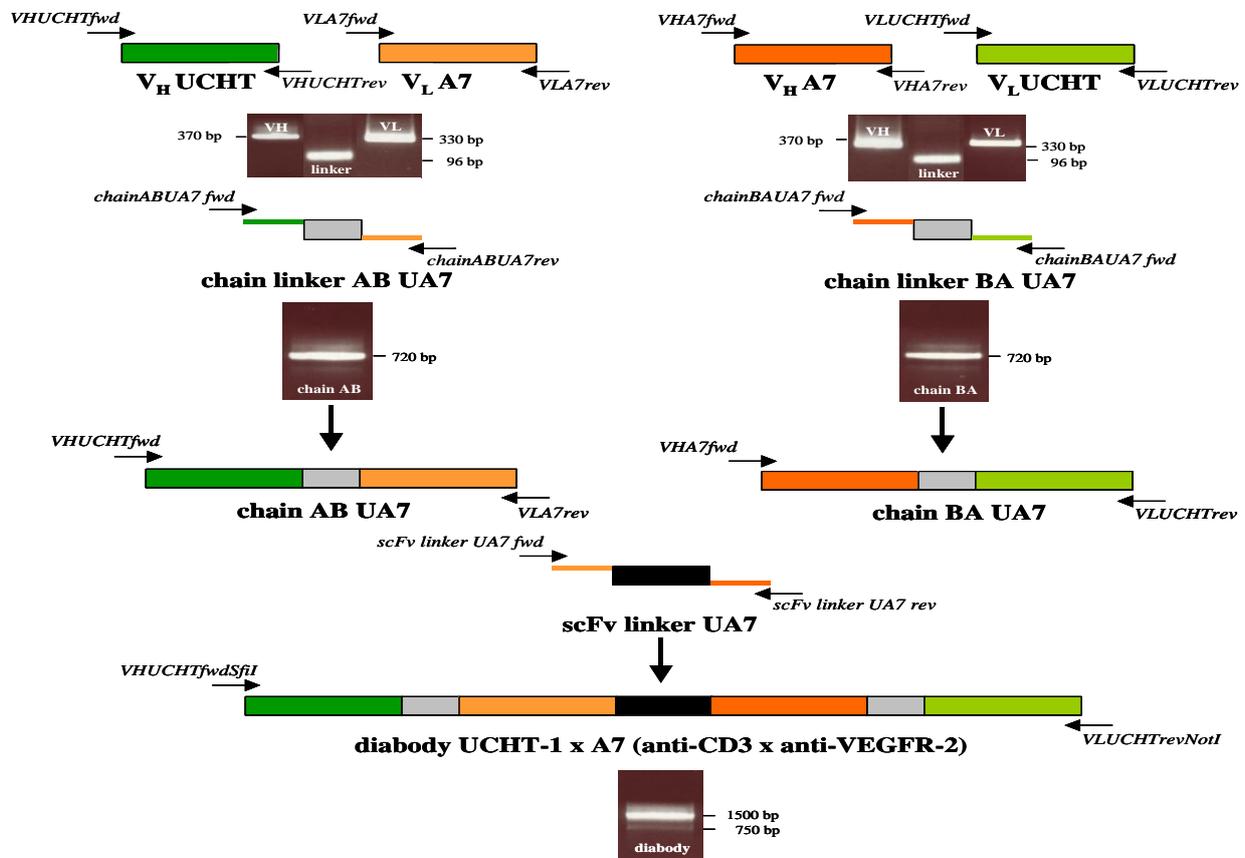


Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der Generierung des UCHT-1 x A7 *diabody*-DNA-Konstrukts mittels PCR Die jeweiligen variablen Domänen V_H (Molekulargewicht ~ 370 bp) und V_L (Molekulargewicht ~ 330 bp) der Antikörperklone UCHT-1 (grün unterlegt) und A7 (orange unterlegt) wurden in einer ersten Assembly-PCR durch Verbindung mit einem flexiblen Gly₄Ser-Linker ‚chain linker AB UA7‘ sowie ‚chain linker BA UA7‘ (grau unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) zu den entsprechenden reziproken *scFv*-Antikörpern (Molekulargewicht ~ 720 bp) zusammengesetzt. In einer weiteren Assembly-PCR wurden dann die reziproken *scFv*-Konstrukte ‚chain AB UA7‘ und ‚chain BA UA7‘ mit einem flexiblen (Gly₄Ser)₃-Linker ‚scFv linker UA7‘ (schwarz unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) zum UCHT-1 x A7 *diabody* mit einem Molekulargewicht von ~ 1500 bp zusammengesetzt.

Als Ausgangspunkt für die Klonierung des *diabody*-Antikörpers wurden für die anti-CD3-Bindedomäne die Ketten V_H UCHT (MW ~ 370 bp) und V_L UCHT (MW ~ 330 bp) mit den Primerpaaren $VHUCHT_{fwd}/VHUCHT_{rev}$ sowie $VLUCHT_{fwd}/VLUCHT_{rev}$ amplifiziert. Für die anti-VEGFR-2-Bindedomäne wurden analog die Ketten V_H A7 (MW ~ 370 bp) und V_L A7 (MW ~ 330 bp) mit den Primerpaaren $VHA7_{fwd}/VHA7_{rev}$ sowie $VLA7_{fwd}/VLA7_{rev}$ hergestellt.

Entsprechend der *diabody*-Konstruktion unter Abschnitt 3.11 wurden hier aus den einzelnen variablen Domänen V_H und V_L des UCHT-1 sowie des A7 die reziproken *scFv*-Formate ‚AB‘ und ‚BA‘ (MW ~ 720 bp) hergestellt. Die Domäne A bezieht sich dabei auf den Klon UCHT-1 und die Domäne B auf den Klon A7. Daran orientiert sind entsprechend die Bezeichnungen der reziproken *scFv* mit 'chain AB UA7' sowie 'chain BA UA7'. Der Gly₄Ser 'chain linker AB UA7' (MW Template = 96 bp) wurde entsprechend mit den Primern *chainABUA7fwd* und *chainABUA7rev* amplifiziert. Analog dazu wurde durch Einsatz der Primer *chainBAUA7fwd* und *chainBAUA7rev* der Gly₄Ser 'chain linker BA UA7' (MW Template = 96 bp) vervielfältigt. In einem zweiten Amplifizierungsschritt erfolgte die Zusammensetzung der reziproken *scFv*-Konstrukte 'AB' und 'BA' zum *diabody*-Antikörper (MW ~ 1500 bp). Der (Gly₄Ser)₃ ‚scFv linker UA7‘ (MW Template = 96 bp) wurde entsprechend mit den Primern *scFvlinkerUA7fwd* und *scFvlinkerUA7rev* hergestellt. In einer anschließenden Assembly-PCR wurden dann die Ketten 'AB' und 'BA' zusammen mit dem ‚scFv linker‘ unter Verwendung der Primer *VHUCHTfwdSfiI* und *VLUCHTrevNotI* zum *diabody* verbunden. Um sicherzustellen, dass der UCHT-1 x A7 *diabody* erfolgreich als Protein exprimierbar ist, wurde das *diabody*-Konstrukt vorerst transient in *E. coli* transformiert und analysiert.

3.2.2 Transiente Expression des UCHT-1 und des A7 *scFv*- sowie des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers in HB2151 *E. coli*-Zellen

Das UCHT-1 und das A7 *scFv*- sowie das UCHT-1 x A7 *diabody*-Konstrukt wurden wie unter 3.1.1 beschrieben in das pCANTAB5E-Plasmid kloniert und im *E. coli*-Stamm HB2151 exprimiert. Zusätzlich zur Evaluierung des Hintergrunds als auch als negative Expressionskontrolle wurde ein nicht-transformierter HB2151-Klon den gleichen Expressionsbedingungen unterzogen. Auch hier wurden je 15 µl der Überstand- (Abbildung 3.8, ÜS - Spur 1 - 4) und Periplasmafraktion (Abbildung 3.8, PP - Spur 5 - 8) aufgetragen und gelelektrophoretisch zur Analyse aufgetrennt. Die Expressionsergebnisse sind in der Abbildung 3.8 zusammenfassend dargestellt. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels eines primären Maus anti-E-Tag sowie eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Als Positivkontrolle fungierte aufgereinigtes A7 *scFv*-Protein (Abbildung 3.8 - Spur 9).

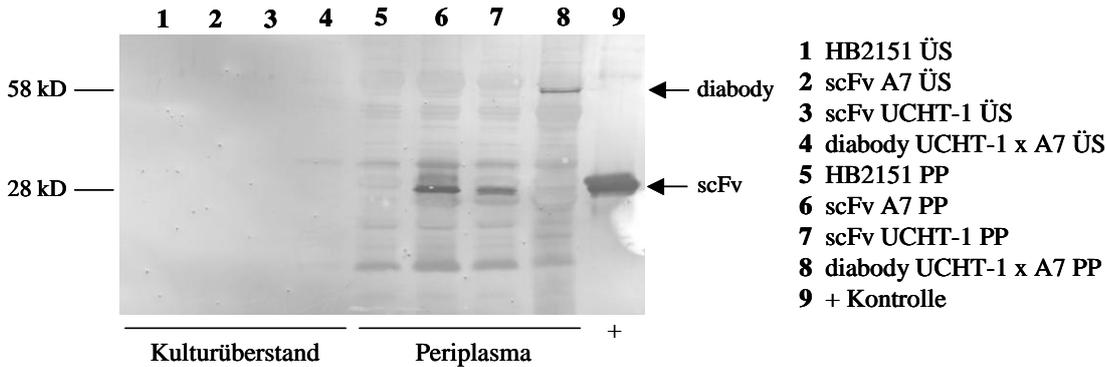


Abbildung 3.8 Transiente Expressionsanalyse des UCHT-1 und A7 *scFv*- sowie des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers in *E. coli*. Nachweis der Proteinexpression mittels Westernblot im Kulturüberstand (ÜS, Spur 1 – 4) und im Periplasma (PP, Spur 5 – 8) mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Detektion der *scFv*- und *diabody*-Proteine mit einem Molekulargewicht von 28 beziehungsweise 58 kD – **Negativkontrolle** Extrakte aus nicht-transformiertem HB2151 *E. coli*-Klon (repräsentiert durch ÜS, Spur 1 und PP, Spur 5) + **Positivkontrolle** aufgereinigtes A7 *scFv*-Protein mit einem Molekulargewicht von 28 kD (Spur 9)

Wie aus der Darstellung 3.8 hervorgeht, führen die Kulturbedingungen ausschließlich zu einer periplasmatischen Expression der Antikörperproteine (Abbildung 3.8 Spur 6 – 8). Dabei zeigt sich deutlich, dass die UCHT-1 und A7 *scFv*-Proteine im Periplasma gut exprimierbar sind und bei einem Molekulargewicht von 28 kD klar detektiert werden können (Abbildung 3.8 PP, Spur 6 und 7). Das gilt ebenso für das UCHT-1 x A7 *diabody*-Protein, dass bei einem Molekulargewicht von 58 kD eindeutig im Periplasma detektierbar ist (Abbildung 3.8 PP, Spur 8). Im Kulturüberstand jedoch ist der UCHT-1 x A7 *diabody* ähnlich wie zuvor der OKT-3 x ERIC-1 *diabody* nicht nachweisbar. Die Expressionskontrolle des nicht-transformierten HB2151-Klons (Abbildung 3.8 PP, Spur 5) veranschaulicht den Hintergrund durch die Antikörperfärbung und es ist klar ersichtlich, dass sich die Banden für die rekombinanten Antikörperproteine hervorheben und ein spezifisches Signal widerspiegeln.

Die Analyse der in *E. coli* exprimierten *scFv*- und *diabody*-Proteine (Abschnitt 3.1.2 und 3.2.2) verdeutlicht, dass deren Produktion im HB2151-Stamm mittels der gewählten Kulturbedingungen zu einer klaren periplasmatischen Expression führt. Da in den meisten *E. coli*-Expressionsstudien im Kulturüberstand kein rekombinantes Protein nachgewiesen werden konnte, wurde in folgenden Untersuchungen auf die Analyse der Proteinexpression in den Kulturüberständen verzichtet (Abschnitt 3.3.2).

3.2.3 Stabile Expression des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers in BHK21-Zellen

3.2.3.1 Analyse der Gen- und Proteinexpression

Für die funktionalen Analysen der *diabody*-Antikörper ist die Produktion ausreichender Mengen an rekombinantem Protein vonnöten. Da dies mittels transienter Expression nicht geleistet werden kann, wurde der UCHT-1 x A7 *diabody* ausschließlich stabil in BHK21-Zellen exprimiert und analysiert. Das *AhdI*-geschnittene UCHT-1 x A7 *diabody*-pSecTag/HygroA-Konstrukt wurde in BHK21-Zellen transfiziert und anschließend wurden unter Hygromycinselektionsdruck stabile *diabody*-Klone isoliert. Die Evaluierung der Expression des Antikörpers auf mRNA- sowie Proteinebene erfolgte wie unter Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Zur Analyse wurden jeweils 3 Klone herangezogen. Als *housekeeping*-Gen fungierte β -Aktin und die isolierte RNA wurde als Standard für die cDNA-Synthese und als Ladungskontrolle herangezogen. Die Ergebnisse der Analyse sind zusammenfassend in Abbildung 3.9 dargestellt.

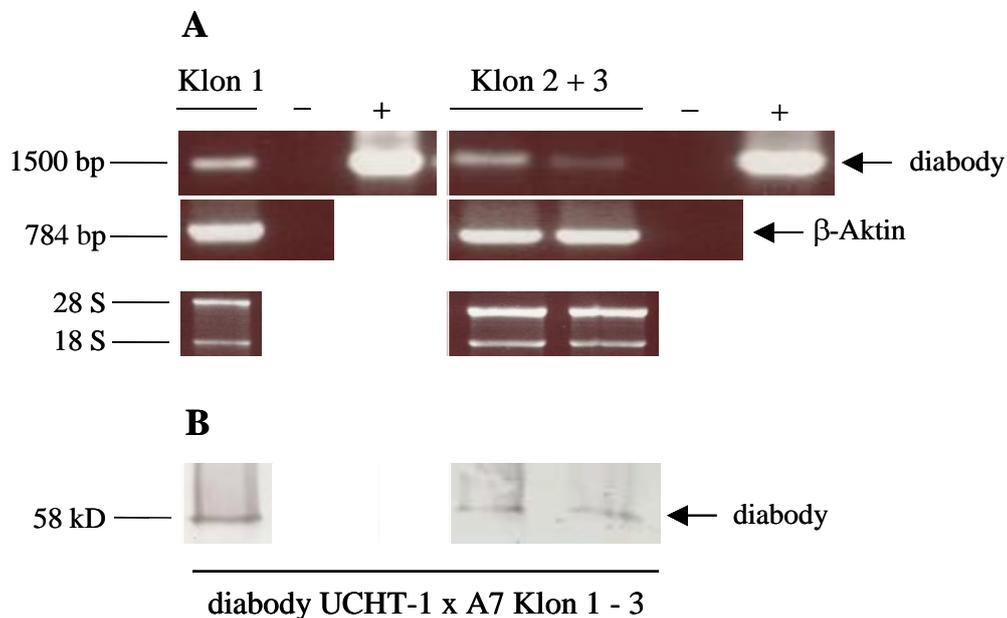


Abbildung 3.9 Expressionsanalyse des stabil in BHK21-Zellen transfizierten UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot **A obere Zeile** Nachweis der Genexpression des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers mit einem Molekulargewicht von 1500 bp **mittlere Zeile** Nachweis der Genexpression des *housekeeping*-Gens β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 784 bp **untere Zeile** isolierte RNA der stabilen UCHT-1 x A7 *diabody*-Klone **B** Nachweis der Proteinexpression des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers. Detektion des aus den Zellkulturüberständen mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigten Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 58 kD mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. + **Positivkontrolle** **Abbildung A** Amplifikat des entsprechenden *diabody*-Antikörpers aus ungeschnittenem Ausgangsvektor – **Negativkontrolle** **Abbildung A** ddH₂O

Wie in der Darstellung 3.9 erkennbar ist, wurden für die cDNA-Synthese der Klone 1 - 3 vergleichbare Mengen an RNA eingesetzt (Abbildung 3.9 A untere Zeile). Dementsprechend sind die Intensitäten für die Amplifikate der β -Aktintranskripte (Abbildung 3.9 A mittlere Zeile) in allen Fällen identisch. Ebenso ist in allen drei selektionierten Klonen die Genexpression (Abbildung 3.9 A obere Zeile) des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers nachweisbar, wobei die Expression in Klon 1 am stärksten und in Klon 3 am schwächsten ausgeprägt ist. Dieses Verhältnis ist auch aus der Analyse der Proteinexpression im Westernblot klar ersichtlich (Abbildung 3.9 B). Der aus den Zellkulturüberständen mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigte UCHT-1 x A7 *diabody* konnte bei gleichen Expressionsbedingungen im Gegensatz zum stabil transfizierten OKT-3 x ERIC-1 *diabody* (Abbildung 3.6 B) deutlich nachgewiesen werden.

3.3 Generierung und Expression des D29 *scFv*- und des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers in *E. coli* sowie BHK21-Zellen

3.3.1 Herstellung des UCHT-1 x D29 *diabody*-DNA-Konstrukts

Die Herstellung des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörperkonstrukts (anti-CD3/humanisiert x anti-NCAM/humanisiert) ist zusammenfassend in Abbildung 3.10 dargestellt. Als Ausgangspunkt für die Klonierung des *diabody*-Antikörpers wurden für die anti-CD3-Domäne die Ketten V_H UCHT (MW ~ 370 bp) und V_L UCHT (MW ~ 330 bp) mit den Primerpaaren *VHUCHTfwd/VHUCHTrev* sowie *VLUCHTfwd/VLUCHTrev* amplifiziert. Für die anti-NCAM-Domäne wurden analog die Ketten V_H D29 (MW ~ 370 bp) und V_L D29 (MW ~ 330 bp) mit den Primerpaaren *hNCAMVHfwd/hNCAMVHrev* sowie *hNCAMVLfwd/hNCAMVLrev* hergestellt. Entsprechend der *diabody*-Konstruktion unter Abschnitt 3.1.1 wurden hier aus den einzelnen variablen Domänen V_H und V_L des UCHT-1 sowie des D29 die reziproken *scFv*-Formate ‚AB‘ und ‚BA‘ (MW ~ 720 bp) hergestellt. Die Domäne A bezieht sich dabei auf den Klon UCHT-1 und die Domäne B auf den Klon D29. Daran orientiert sind entsprechend die Bezeichnungen der reziproken *scFv* mit 'chain AB UHUN' sowie 'chain BA UHUN'. Der Gly₄Ser 'chain linker AB UHUN' (MW Template = 96 bp) wurde entsprechend mit den Primern *chainABUHUNfwd* und *chainABUHUNrev* amplifiziert. Analog dazu wurde durch Einsatz der Primer *chainBAUHUNfwd* und *chainBAUHUNrev* der Gly₄Ser 'chain linker BA UHUN' (MW Template = 96 bp) vervielfältigt. In einem zweiten Amplifizierungsschritt erfolgte die Zusammensetzung der reziproken *scFv*-Konstrukte 'AB' und 'BA' zum *diabody*-Antikörper (MW ~ 1500 bp). Der (Gly₄Ser)₃ ‚scFv linker UHUN‘ (Molekulargewicht Template = 96 bp) wurde entsprechend mit den Primern *scFvlinkerUHUNfwd* und *scFvlinkerUHUNrev* hergestellt.

In einer anschließenden Assembly-PCR wurden dann die Ketten 'AB' und 'BA' zusammen mit dem ‚scFv linker‘ unter Verwendung der Primer *VHUCHTfwdSfiI* und *VLUCHTrevNotI* zum *diabody* verbunden.

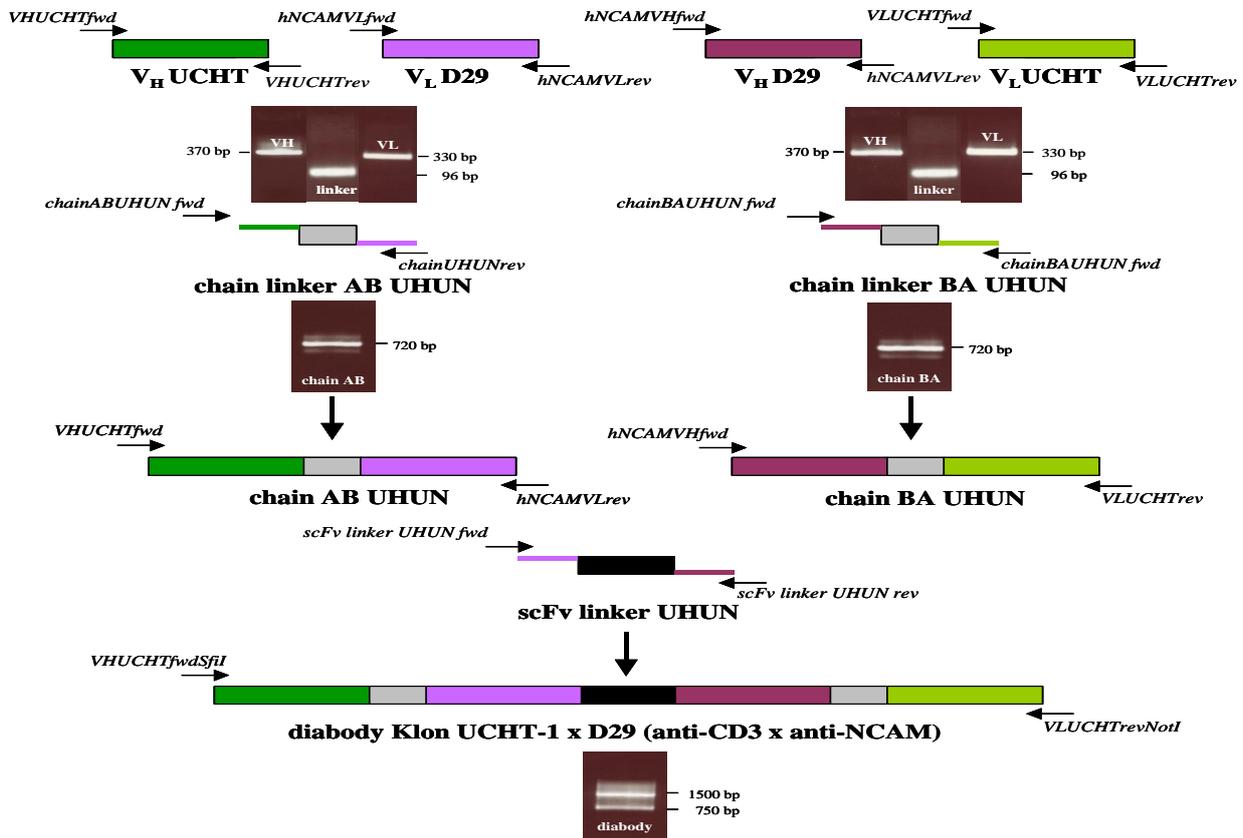


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung der Generierung des UCHT-1 x D29 *diabody*-DNA-Konstrukts mittels PCR Die jeweiligen variablen Domänen V_H (Molekulargewicht ~ 370 bp) und V_L (Molekulargewicht ~ 330 bp) der Antikörperklone UCHT-1 (grün unterlegt) und D29 (violett unterlegt) wurden in einer ersten Assembly-PCR durch Verbindung mit einem flexiblen Gly₄Ser-Linker ‚chain linker AB UHUN‘ sowie ‚chain linker BA UHUN‘ (grau unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) zu den entsprechenden reziproken *scFv*-Antikörpern (Molekulargewicht ~ 720 bp) zusammengesetzt. In einer weiteren Assembly-PCR wurden dann die reziproken *scFv*-Konstrukte ‚chain AB UHUN‘ und ‚chain BA UHUN‘ mit einem flexiblen (Gly₄Ser)₃-Linker ‚scFv linker UHUN‘ (schwarz unterlegt – Molekulargewicht Template = 96 bp) zum UCHT-1 x D29 mit einem Molekulargewicht von ~ 1500 bp zusammengesetzt

Der Herstellung des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers ging eine Expressionsanalyse des verwendeten D29 *scFv* voraus. Da der Klon zwar bereits beschrieben ist (*Whittington et al. 2001*), aber Proteinexpressionsanalysen in der Arbeit nicht explizit enthalten sind, wurde der D29 *scFv* eigenen überprüfenden Analysen unterzogen. Zudem wurde der D29 nicht aus der Originalquelle bezogen und mußte zusätzlich mittels Reamplifikation und Mutagenese in eigener Arbeit als *scFv*-Konstrukt generiert werden. Der so hergestellte Klon wurde zur Überprüfung als auch zum Vergleich mit dem ERIC-1 *scFv* in der *E. coli*-Expression mittels der etablierten Kulturbedingungen evaluiert. Die Expression des D29 *scFv* blieb dabei auf die transiente Expression in *E. coli* beschränkt.

3.3.2 Transiente Expression des D29 *scFv*-Antikörpers in HB2151 *E. coli*-Zellen

Ausgehend von den DNA-Konstrukten rkat.omlD29.htm.CD32 und rkat.D29.hFc.htm.CD3zIg wurde die Sequenz für den humanisierten D29 *scFv* mittels der sequenzspezifischen Primer *hNCAMfwdSfiI* und *hNCAMrevNotI* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zunächst zur Überprüfung in den pCR2.1-Vektor kloniert und sequenziert. Die vergleichende Analyse mit dem publizierten D29 (Whittington *et al.* 2001) wies aufgrund einer jeweiligen Punktmutation zwei Aminosäureaustausche auf. Zum einen war in der variablen Domäne V_H das Tyrosin an Position 80 mit einem Histidin und zum anderen das Serin an Position 48 mit einem Prolin in der Domäne V_L ausgetauscht. Daraufhin wurde eine ortsspezifische Mutagenese mittels der Primerpaare *hNCAMMUTVHfw* und *hNCAMMUTVHrev* sowie *hNCAMMUTVLfwd* und *hNCAMMUTVLrev* durchgeführt, um die in der Sequenz publizierten Aminosäuren wieder herzustellen. Nach erfolgreicher Mutagenese wurde der mit dem D29 übereinstimmende *scFv*-Klon in das Expressionsplasmid pCANTAB5E kloniert und im HB2151-Stamm exprimiert. Zur Analyse der Proteinexpression im Periplasma wurden 4 transformierte Klone herangezogen. Wie der Blot in Abbildung 3.11 zeigt, konnte das Protein des humanisierten D29 *scFv* in allen Klonen klar und in der Intensität vergleichbar exprimiert werden. Die deutliche Detektion des Proteins mit einem Molekulargewicht von 28 kD erfolgte mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. Als Negativkontrolle für die periplasmatische Expression und Isolation des D29 *scFv*-Proteins diente ein nicht-transformierter HB2151-Klon.

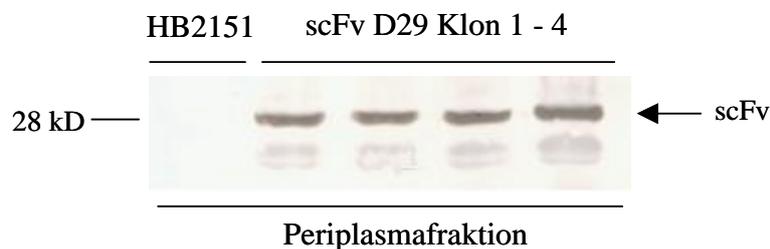


Abbildung 3.11 Periplasmatische Expressionsanalyse des D29 *scFv*-Antikörpers in *E. coli* Nachweis der Proteinexpression mittels Westernblot. Detektion des D29 *scFv*-Proteins mit einem Molekulargewicht von 28 kD mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers – **Negativkontrolle** Periplasmaextrakt aus nicht-transformiertem HB2151 *E. coli*-Klon

Die Verifizierung der *E. coli*-Expression des D29 *scFv* sowie auch die Bindungsanalysen der D29-enthaltenden Periplasmafraktion (Abschnitt 3.4.3) bildeten entsprechend die Basis für die Herstellung und Analyse des UCHT-1 x D29 *diabody*. Diese wurde weiterführend nur im eukaryotischen System durchgeführt.

Analog zum UCHT-1 x A7 wurde der UCHT-1 x D29 im Hinblick auf die *diabody*-Produktion ausschließlich stabil in BHK21-Zellen transfiziert und exprimiert.

3.3.3 Stabile Expression des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers in BHK21-Zellen

Während der UCHT-1 x A7 *diabody* in *E. coli* als auch in BHK21-Zellen exprimiert wurde, beschränkte sich die Expression des UCHT-1 x D29 *diabody* auf die stabile Expression in BHK21-Zellen. Da die Klonierung in den pCANTAB5E des UCHT-1 x D29 *diabody* nicht zielführend war und für die Produktion aufzureinigender Antikörper die stabile Expression in Säugetierzellen vonnöten ist, wurde auf die *E. coli*-Expression des UCHT-1 x D29 *diabody* projektbezogen verzichtet.

3.3.3.1 Analyse der Gen- und Proteinexpression

Für die Analyse der Expression des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers wurde analog zu der unter 3.2.3 beschriebenen Evaluierung verfahren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 zusammengefasst.

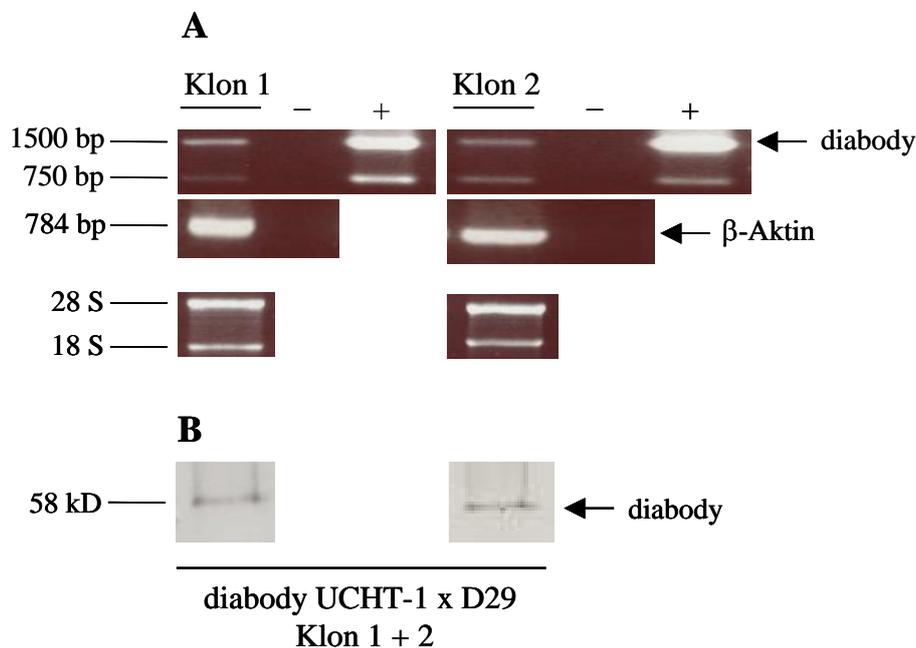


Abbildung 3.12 Expressionsanalyse des stabil in BHK21-Zellen transfizierten UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und Westernblot **A obere Zeile** Nachweis der Genexpression des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers mit einem Molekulargewicht von 1500 bp **mittlere Zeile** Nachweis der Genexpression des *housekeeping*-Gens β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 784 bp **untere Zeile** isolierte RNA der stabilen UCHT-1 x D29 *diabody*-Klone **B** Nachweis der Proteinexpression des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers. Detektion des aus den Zellkulturüberständen mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigten Proteins mit einem Molekulargewicht von 58 kD mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. + **Positivkontrolle** **Abbildung A** Amplifikat des entsprechenden *diabody*-Antikörpers aus ungeschnittenem Ausgangsvektor – **Negativkontrolle** **Abbildung A** ddH₂O

Wie die Abbildung 3.12 zeigt, wurden für die cDNA-Synthese der Klone 1 und 2 vergleichbare Mengen an RNA eingesetzt (Abbildung 3.12 A untere Zeile). Entsprechend ist die Expression der β -Aktin *housekeeping*-Gentranskripte (Abbildung 3.12 A mittlere Zeile) in beiden Klonen vergleichbar. Des Weiteren ist in beiden selektionierten Klonen die Genexpression (Abbildung 3.12 A obere Zeile) des *diabody*-Antikörpers nachweisbar, wobei die Intensitäten der Transkripte vergleichbar ausgeprägt ist. Dies kommt entsprechend auch in der Analyse der Proteinexpression im Westernblot zum Ausdruck (Abbildung 3.12 B). Die Proteinexpression des UCHT-1 x D29 *diabody* in den mittels NiNTA-magnetischen Partikeln aufgereinigten Zellkulturüberständen ist deutlich nachweisbar. Dies steht in guter Korrelation zu der stabilen Expression des UCHT-1 x A7 *diabody* (Abbildung 3.9) und ebenso im klaren Gegensatz zu dem OKT-3 x ERIC-1 *diabody* (Abbildung 3.6).

3.4 Funktionsanalyse des UCHT-1 x A7 *diabody*- sowie des D29 *scFv*- und UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers

Die funktionelle Analyse des UCHT-1 x A7 und des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers wurde im Rahmen dieser Studie auf die Bindung der im *E. coli*-Periplasma beziehungsweise in den BHK21-Zellkulturüberständen enthaltenden Proteine im FACS an antigenexprimierende Zielzellen beschränkt. Zur funktionalen Analyse der aufgereinigten bispezifischen Antikörper wurden nur die korrespondierenden bispezifischen *single chain (scFv)*-Antikörper r3V sowie r3N, die in einem zusätzlichen Kooperationsprojekt entwickelt wurden und vor den *diabody*-Antikörpern zur Verfügung standen, herangezogen (Abschnitt 3.5). In Anlehnung an die Arbeiten zur Gewinnung des D29 *scFv*, wurde der D29-Klon zusätzlich zu der Proteinexpression hinsichtlich seiner Bindung an NCAM-positive Zielzellen überprüft.

3.4.1 Bindungsanalyse des in *E. coli* exprimierten UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers an CD3⁺ Jurkat- und VEGFR-2⁺ PAE/KDR-Zellen

Nach Transformation des UCHT-1 x A7 *diabody*-Konstrukts in den HB2151 *E. coli*-Stamm wurde ein Bakterienklon selektiert und zur Proteinproduktion nach IPTG-Induktion kultiviert. Anschließend wurde die Periplasmafraktion, die den löslichen Antikörper enthält, isoliert und im FACS zur Analyse der Antikörperbindung an CD3-positive Jurkat- und VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen getestet. Die entsprechenden Zellen wurden jeweils mit 200 μ l Periplasmaextrakt inkubiert. Die Ergebnisse sind als Übersicht in der Abbildung 3.13 dargestellt.

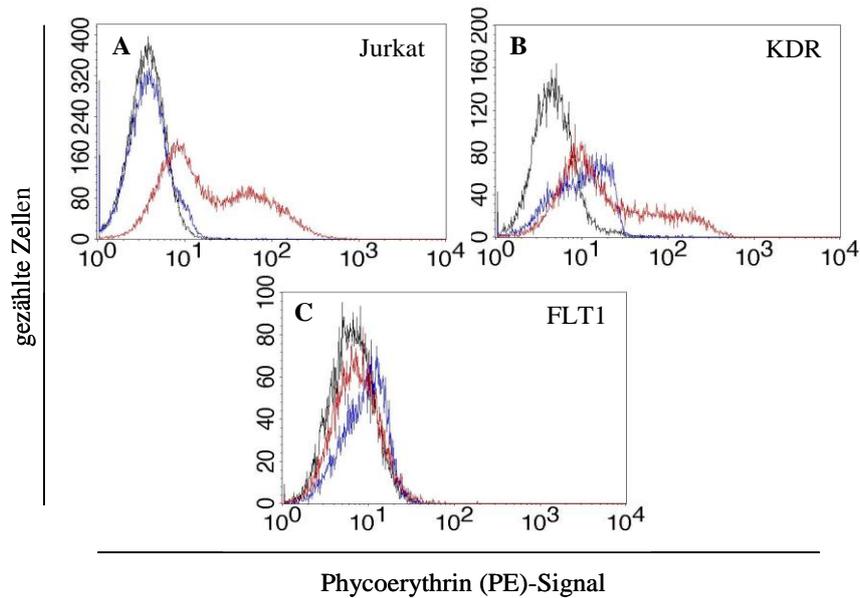


Abbildung 3.13 FACS-Bindungsanalyse des in *E. coli* exprimierten UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen. Analyse des *diabody*-enthaltenden Periplasmaextrakts. Nachweis der Bindung des UCHT-1 x A7 *diabody* mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm), des Periplasmaextrakts des nicht-transformierten HB2151 *E. coli*-Klons (blaues Histogramm) und des Periplasmaextrakts des *diabody*-transformierten HB2151 *E. coli*-Klons (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des bispezifischen Antikörpers an **A** CD3-positive Jurkatzellen **B** VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen **C** Analyse der Bindung des bispezifischen Antikörpers an CD3- und VEGFR-2-negative PAE/FLT1-Zellen

Als Kontrolle zur Analyse der antikörperspezifischen Bindung wurde die Periplasmafraktion eines nicht-transformierten HB2151-Klons, der analog zu dem antikörpertransformiertem Klon behandelt wurde, eingesetzt (blaues Histogramm). Als Negativkontrolle fungierte die Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm). Der Nachweis der Bindung der *diabody*-enthaltenden Periplasmaextrakte erfolgte mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Der Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle erfolgte direkt mittels des sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Die Bindung der *diabody*-Periplasmafraktion ist entsprechend im Vergleich zusammen mit den Kontrollen dargestellt (rotes Histogramm). Wie die Graphik in Abbildung 3.13 veranschaulicht, bindet das in *E. coli* exprimierte UCHT-1 x A7 *diabody*-Protein deutlich an CD3-positive Jurkatzellen (Abbildung 3.13 A). Der Periplasmaextrakt des nicht-transformierten *E. coli*-Klons ist deutlich negativ, so dass die Bindung an die Jurkatzellen auf spezifische *diabody*-Bindung zurückzuführen ist.

Im Falle der Bindungsanalyse des Antikörpers an VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen (Abbildung 3.13 B) ist der Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle nicht so deutlich ausgeprägt, da aber eine deutliche Verschiebung des roten zum blauen Histogramms erkennbar ist, erscheint auch hier die Bindung spezifisch zu sein. Die Spezifität der Bindung äußert sich auch darin, dass das PE-Signal der *diabody*-Periplasmafraktion auf CD3- sowie VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Zellen klar negativ ist und der medianen Fluoreszenzintensitäten der Isotyp- und der Periplasmakontrolle entspricht (Abbildung 3.13 C).

3.4.2 Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen exprimierten UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers an CD3⁺ Jurkat und VEGFR-2⁺ PAE/KDR-Zellen

Die stabilen *diabody*-Klone wurden ab Konfluenz für 3 Tage in IMDM plus 10 % FCS zur Antikörperproduktion in 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert und die antikörperenthaltenden Überstände wurden zur Analyse geerntet. Die Zielzellen wurden jeweils mit 200 µl Überstand pro Klon inkubiert und die Bindung im FACS gemessen. Die Messung erfolgte auf CD3-positiven Jurkat- und VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zellen sowie auf den für beide Antigene negativen Zelllinien PAE/FLT1 und TE671. Als Isotypkontrolle fungierte normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und die Probe ist jeweils vergleichend dazu dargestellt (rotes Histogramm). Der Nachweis der Bindung der *diabody*-enthaltenden Zellkulturüberstände erfolgte mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Der Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle erfolgte direkt mittels des PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 wiedergegeben. Die Abbildung 3.14 zeigt zusammenfassend eine deutliche Bindung des UCHT-1 x A7 *diabody*-enthaltenden Kulturüberstands an die CD3-positiven Jurkat- (Abbildung 3.14 A) und die VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen (Abbildung 3.14 B). Die Bindungsanalyse des Antikörpers auf den CD3- und VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen (Abbildung 3.14 C) liefert ein deutlich negatives Signal und verdeutlicht die Spezifität des Antikörpers (Abbildung C). Als zusätzliche Negativkontrolle wurde die Bindung an CD3- und VEGFR-2-negative TE671-Zellen ergänzend im Bild dargestellt (Abbildung 3.14 D).

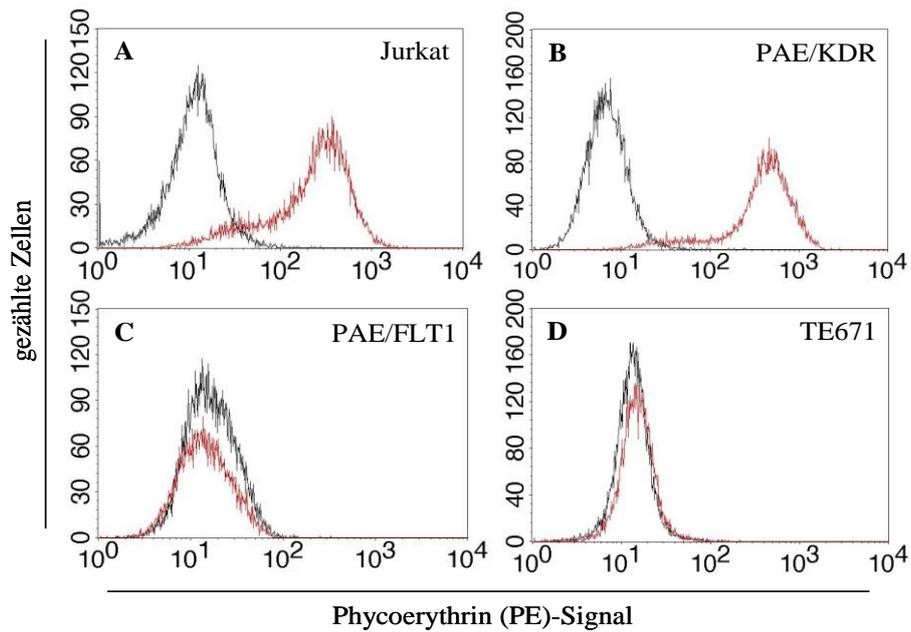


Abbildung 3.14 FACS-Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen stabil exprimierten UCHT-1 x A7 diabody-Antikörpers an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR2-positive PAE/KDR-Zellen Analyse des im Überstand enthaltenen *diabody*. Nachweis der Bindung des UCHT-1 x A7 *diabody* mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Nachweis der Bindung des Isotyps mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und des Kulturüberstands des *diabody*-transfizierten BHK21-Klons (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des *diabody*-Antikörpers an **A** CD3-positive Jurkatzellen **B** VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen **C + D** Analyse der Bindung des *diabody*-Antikörpers an CD3- und VEGFR-2-negative PAE/FLT1 sowie TE671-Zellen

3.4.3 Bindungsanalyse des in *E. coli* exprimierten D29 *scFv*-Antikörpers an NCAM⁺ IMR5- und TE671-Zellen

Zur Analyse der Bindung des D29 *scFv* wurden entsprechende Zielzellen mit dem antikörperenthaltenden Periplasmaextrakt inkubiert und im FACS getestet. Der Bindungsnachweis des D29 *scFv* erfolgte mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Die eingesetzten Kontrollen und der verwendete Antikörpernachweis entsprechen denen, die unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben worden sind. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

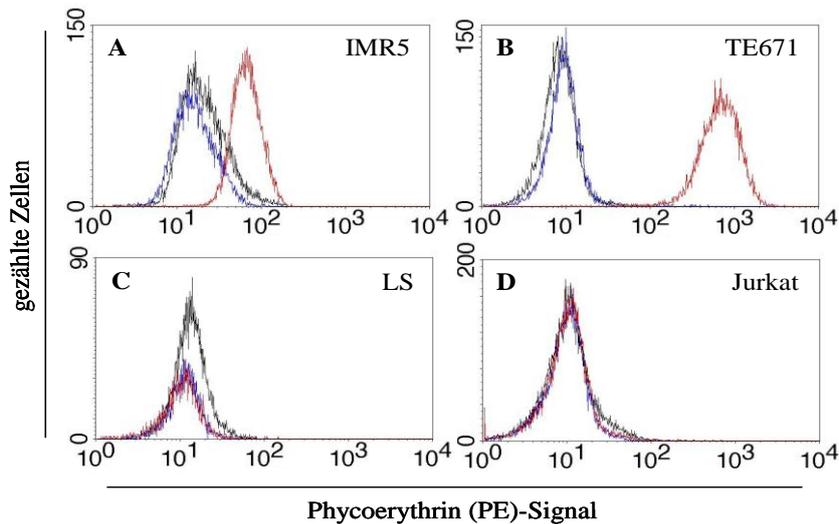


Abbildung 3.15 FACS-Bindungsanalyse des in *E. coli* exprimierten D29 *scFv*-Antikörpers an NCAM-positive IMR5- sowie TE671-Zellen Analyse des *scFv*-enthaltenden Periplasmaextrakts. Nachweis der Bindung des D29 *scFv* mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Nachweis der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm), des Periplasmaextrakts des nicht-transformierten HB2151 *E. coli*-Klons (blaues Histogramm) und des Periplasmaextrakts des *scFv*-transformierten HB2151 *E. coli*-Klons (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des D29 *scFv*-Antikörpers an **A + B** NCAM-positive IMR5- sowie TE671-Zellen **C + D** Analyse der Bindung des D29 *scFv*-Antikörpers an NCAM-negative LS- und Jurkatzellen

Die FACS-Analyse in Abbildung 3.15 veranschaulicht eine deutliche Bindung des D29 *scFv*-Antikörpers an die NCAM-positiven Zelllinien IMR5 (Abbildung 3.15 A) und TE671 (Abbildung 3.15 B) und zeigt ein klares negatives Signal auf der NCAM-negativen Zelllinie LS (Abbildung 3.15 C). Während die TE671-Zellen aufgrund der klaren NCAM-Expression und der klaren Darstellung im FACS in den meisten weiterführenden Bindungsanalysen als Zielzellen eingesetzt wurden, ist im Bezug auf die Verwendung der IMR5-Zellen als Zielzellen in den funktionalen Assays (Abschnitt 3.7) zusätzlich die D29-Bindung auf dieser Zelllinie dargestellt. Als ergänzende Negativkontrolle ist die Bindung des D29 *scFv* an die NCAM-negativen Jurkatzellen dargestellt (Abbildung 3.15 D). In allen Fällen kann auf eine antikörperspezifische Bindung geschlossen werden, da die Bindung des Periplasmaextrakts des nicht-transformierten *E. coli*-Klons jeweils der medianen Fluoreszenzintensität des Isotyps entspricht.

3.4.4 Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen exprimierten UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers an CD3⁺ Jurkat und NCAM⁺ TE671-Zellen

Die Klone wurden wie unter 3.4.2 kultiviert und die Überstände geerntet und getestet. Die FACS-Messungen erfolgten auf den CD3-positiven Jurkat- und den NCAM-positiven TE671-Zellen sowie auf den für beide Antigene negativen Zelllinien LS und PAE/FLT1. Die eingesetzte Kontrolle und der verwendete Antikörpernachweis entsprechen den unter Abschnitt 3.4.2 beschriebenen. Die Bindungsanalysen des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers sind in Abbildung 3.16 zusammengefasst.

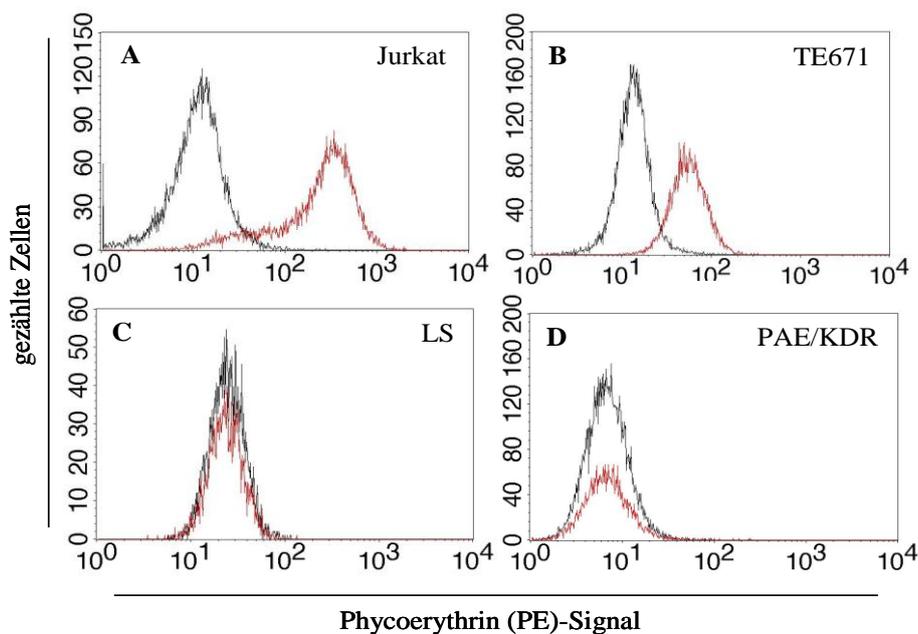


Abbildung 3.16 FACS-Bindungsanalyse des in BHK21-Zellen stabil exprimierten UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive TE671-Zellen Analyse des im Überstand enthaltenen *diabody*. Nachweis der Bindung des UCHT-1 x D29 *diabody* mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und des Kulturüberstands des *diabody*-transfizierten BHK21-Klons (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des *diabody* an **A** CD3-positive Jurkatzellen **B** NCAM-positive TE671-Zellen **C + D** Analyse der Bindung des *diabody* an CD3- und NCAM-negative LS- sowie PAE/KDR-Zellen

Die Abbildung 3.16 zeigt zusammenfassend eine deutliche Bindung des antikörperenthaltenden Kulturüberstands an CD3-positive Jurkat- (Abbildung 3.16 A) und NCAM-positive TE671-Zellen (Abbildung 3.16 B) sowie ein klares negatives Signal auf CD3- und VEGFR-2-negativen LS-Zellen (Abbildung 3.16 C). Die Bindung des UCHT-1 x D29 *diabody* an CD3- und NCAM-negativen PAE/KDR-Zellen ist als ergänzende Negativkontrolle dargestellt (Abbildung 3.16 D).

Die mediane Fluoreszenzintensität für die Bindung der anti-CD3-Domäne des UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpers an Jurkatzellen korreliert dabei deutlich mit der des UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörpers (Abbildung 3.14 A).

Die Untersuchungen zu den UCHT-1 x A7 und UCHT-1 x D29 *diabody*-Antikörpern ist innerhalb der vorliegenden Arbeit hiermit abgeschlossen. Weiterführende Studien zu Produktion, Aufreinigung und funktionalen Analysen wurden ausschließlich mit den korrespondierenden bispezifischen *scFv*-Formaten r3V (UCHT-1 x A7) und r3N (UCHT-1 x D29), die zeitlich früher vorlagen als die *diabody*-Antikörper, durchgeführt und sind im Folgenden dargestellt.

3.5 Herstellung und Auswahl der bispezifischen r3V sowie r3N *scFv*-Antikörperklone

Beide Antikörperkonstrukte wurden im Rahmen des Kooperationsprojekts im Labor von Herrn Grosse-Hovest stabil in Sp2/0-Myelomazellen transfiziert. Die Überstände produzierender Klone wurden im FACS hinsichtlich ihrer Bindung an CD3-positive Jurkatzellen analysiert. Die Klone mit den stärksten Signalen wurden entsprechend selektioniert und zur Verfügung gestellt. Die ausgewählten Ursprungsklone wurden dann im Rahmen dieser Arbeit subkloniert und die selektionierten Subklone wurden entsprechend den folgenden Arbeiten und Analysen unterzogen. Da der r3V als erster der beiden bispezifischen *single chain Fv* (*bsscFv*)-Antikörper vorlag, sind die dazugehörigen Daten denen des r3N vorangestellt.

3.5.1 Subklonierung und Selektion stabiler bispezifischer r3V *scFv*-Klone

Für die Selektion des r3V *bsscFv* wurden die antikörperenthaltenden Kulturüberstände von insgesamt 120 subklonierten Klonen im ELISA auf Bindung an lösliches humanes KDR-Protein getestet. Davon wurden 12 Klone mit der höchsten Absorption bei 450 nm ausgewählt. (Daten nicht gezeigt) Weiterführend wurden die Überstände dieser Klone auf Bindung im FACS an CD3-positive Jurkat- und VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen analysiert. Aufgrund der FACS-Bindung wurde der Subklon 88 für die Produktion des Antikörperproteins herangezogen. Die Bindungsanalyse für den Subklon 88 (r3V Klon 1) an CD3-positive Jurkat- und VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen ist im Abbildung 3.17 in der Übersicht dargestellt. Eine Analyse der Bindung an CD3- und VEGFR-2-negativen Zelllinien ist im Rahmen der Subklonierung nicht vorgenommen worden. Der Nachweis der Bindung des r3V-Subklons erfolgte mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Der Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle erfolgte direkt mittels des PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers.

Während die Applikation des antikörperenthaltenden Überstands eine deutliche Bindung an PAE/KDR-Zellen mit einer medianen Fluoreszenzintensität von 186,01 zeigt (Abbildung 3.17 B), fällt die Bindung an Jurkatzellen nicht so deutlich aus (Abbildung 3.17 A). Dennoch liegt die mediane Fluoreszenzintensität der Probe an Jurkatzellen mit 18,11 (Abbildung 3.17 A rotes Histogramm) deutlich über dem Vergleichswert von 10,65 der Negativkontrolle (Abbildung 3.17 schwarzes Histogramm). Da der monoklonale UCHT-1 (1 µg/ml), dessen Bindung direkt mittels des PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers nachgewiesen wurde, mit einer medianen Fluoreszenzintensität mit 39,60 ein ebenfalls ungewöhnlich niedrig schwaches Signal ergab (Daten nicht gezeigt), und die Geometrie der Kurve einen hohen Anteil CD3-negativer Jurkatzellen zeigt, ist die niedrige mediane Fluoreszenzintensität für den r3V-Subklon offenbar auf das Durchwachsen einer CD3-negativen Jurkatpopulation zurückzuführen. Dies ist ein bekanntes Phänomen von Jurkat. Die Bindung der Antikörper an den CD3-positiven Jurkatanteil war deutlich besser als die, die der Wert für die mediane Fluoreszenzintensität suggeriert. Für die Selektion der Klone ist dies vorerst vernachlässigt worden. Zudem wurden die Ursprungsklone aufgrund ihrer anti-CD3-Bindungsfähigkeit selektiert und ein Verlust der Bindungsfähigkeit der subklonierten Antikörperklone konnte aufgrund der aufgeführten Gründe vorerst ausgeschlossen werden.

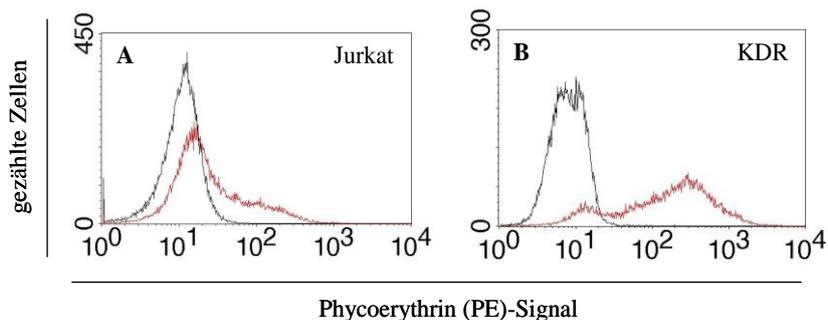


Abbildung 3.17 FACS-Bindungsanalyse des stabil in Sp2/0-Myelomazellen exprimierten r3V *bsscFv*-Subklons an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen Nachweis der Bindung des r3V mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und des Kulturüberstands des *bsscFv*-transfizierten r3V-Myelomaklons (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des r3V an **A** CD3-positive Jurkatzellen **B** VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen

3.5.2 Subklonierung und Selektion stabiler bispezifischer r3N *scFv*-Klone

Für die Selektion des r3N *bsscFv* wurden die antikörperenthaltenden Kulturüberstände von insgesamt 22 subklonierten Klone im FACS auf Bindung an CD3-positive Jurkatzellen getestet. Davon wurden 12 der bindenden Klone weiterführend auf Bindung an NCAM-positive TE671-Zellen im FACS analysiert. (Daten nicht gezeigt)

Für die Produktion des r3N-Antikörperproteins wurden die Subklone 4 und 12 (r3N Klon 1 und r3N Klon 2) ausgewählt, da sie die stärksten medianen Fluoreszenzintensitäten lieferten. Die FACS-Daten sind in Abbildung 3.18 zusammengefasst.

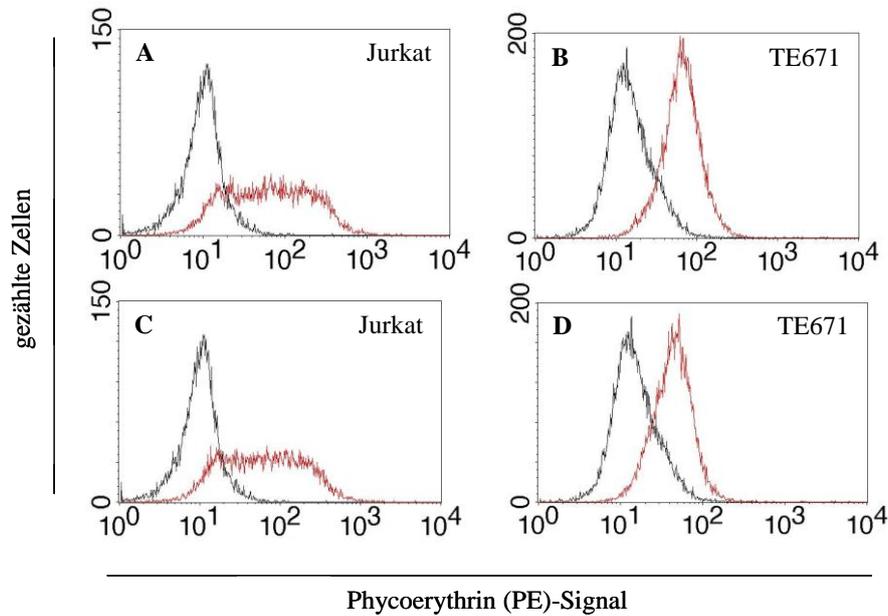


Abbildung 3.18 FACS-Bindungsanalyse der stabil in Sp2/0-Myelomzellen exprimierten r3N *bsscFv*-Subklone an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive TE671-Zellen Nachweis der Bindung des r3N mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und des Kulturüberstands der *bsscFv*-transfizierten r3N-Myelomklone (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des r3N-Subklons 4 an **A** CD3-positive Jurkatzellen **B** NCAM-positive TE671-Zellen sowie des r3N-Subklons 12 an **C** CD3-positive Jurkatzellen und **D** NCAM-positive TE671-Zellen

Die Darstellung bezieht sich dabei ausschließlich auf die Bindung an die CD3-positiven Jurkat- und NCAM-positiven TE671-Zellen. Eine Bindungsanalyse auf CD3- und NCAM-negativen Zelllinien ist im Rahmen der Subklonierung nicht vorgenommen worden. Der Nachweis der Bindung des r3N und der Isotypkontrolle erfolgte wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Beide Subklone zeigen ein klares und vergleichbares Bindungsmuster an CD3-positive Jurkat- und NCAM-positive TE671-Zellen. Die medianen Fluoreszenzintensitäten liegen dabei für den Subklon 4 bei 60,98 (Abbildung 3.18 A rotes Histogramm) sowie 62,64 (Abbildung 3.18 B rotes Histogramm) und für den Subklon 12 bei jeweils 58,82 (Abbildung 3.18 C rotes Histogramm) sowie 42,55 (Abbildung 3.18 D rotes Histogramm). Die Applikation der Positivkontrolle, dem monoklonalen ERIC-1 (1 μ g/ml), dessen Bindung direkt mittels des PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers nachgewiesen wurde, ergab eine erwartete hohe mediane Fluoreszenzintensität von 3307,74 (Daten nicht gezeigt).

3.6 Produktion und Aufreinigung der bispezifischen r3V und r3N *scFv*-Antikörper

Die entsprechend ausgewählten stabilen r3V und r3N-Antikörpersubklone wurden zur Produktion und Proteingewinnung herangezogen. Die *bsscFv*-Antikörper wurden jeweils mittels Protein-L-Affinitätschromatographie aufgereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Nach anschließender Dialyse und der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die aufgereinigten Proteine einer Qualitätsanalyse unterzogen.

3.6.1 Qualitätsanalyse der bispezifischen r3V und r3N *scFv*-Antikörperproteine

Von dem aufgereinigten Antikörper r3V sowie r3N wurden vergleichend jeweils 0,5 sowie 1 µg Protein auf einem SDS-Gel unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die Qualität des Proteins wurde mittels Silberfärbung, wie in Abbildung 3.19 gezeigt, analysiert. Für den r3V *bsscFv*-Antikörper konnte deutlich eine saubere Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 60 kD detektiert werden. Weder finden sich in der Präparation degradierte noch dimerisierte oder aggregierte Proteinprodukte. Für den r3N *bsscFv*-Antikörper hingegen sind neben dem 60 kD-Produkt des bispezifischen *scFv* auch Banden in Größe von 45 kD (z.B. degradiertes *bsscFv*-Protein) sowie Banden mit einem Molekulargewicht von 250 kD (z.B. Proteinaggregate) detektierbar.

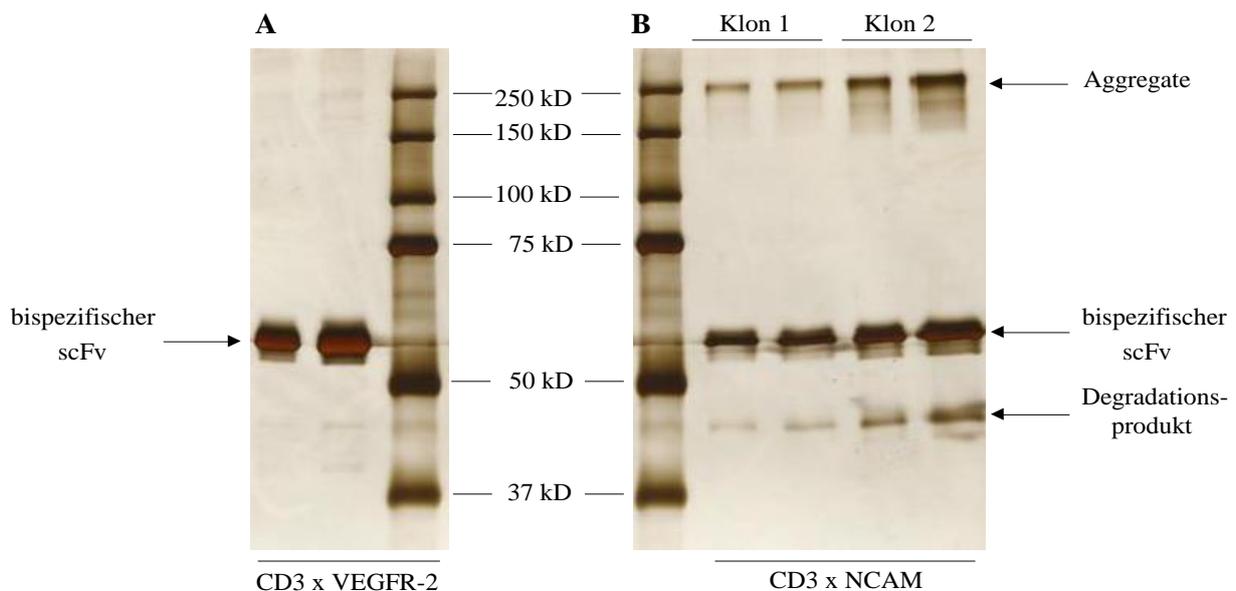


Abbildung 3.19 Nicht-denaturierende SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung zur Analyse der Proteinqualität der aufgereinigten bispezifischen *scFv*-Antikörper A r3V *bsscFv* B r3N *bsscFv*. Detektion des jeweiligen bispezifischen *scFv*-Proteins mit einem Molekulargewicht von 60 kD.

Die Ursachen für die Aggregatbildung, wie sie bei dem r3N *bsscFv* zu beobachten ist (Abbildung 3.19 B), konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Auch war es zeitlich nicht möglich, andere Aufreinigungsmethoden sowie Verfahren zur Trennung der Aggregate von den r3N-Monomeren zu evaluieren.

3.7 Funktionsanalyse der bispezifischen r3V und r3N *scFv*-Antikörper

Im ersten Schritt der funktionellen Analyse wurden beide *bsscFv*-Antikörper r3V und r3N hinsichtlich der funktionalen Bindung ihrer Antigenbindedomänen an die korrespondierenden Zielantigene analysiert.

3.7.1 Analyse der Bindung des bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers an CD3⁺ Jurkat- und VEGFR-2⁺ PAE/KDR-Zellen

Die Bindung des aufgereinigten r3V an die entsprechenden Zielantigene wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,001 – 100 µg/ml im FACS getestet. Für die Darstellung der Titrationskurve wurde jeweils die mediane Fluoreszenzintensität ermittelt und in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration aufgetragen. Der Nachweis der Bindung im FACS erfolgte mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Als Isotypkontrolle fungierte normales Maus IgG1 und als Positivkontrolle wurden der monoklonale UCHT-1 sowie der *scFv* A7 in einer Konzentration von je 1 µg/ml eingesetzt. Der Nachweis der Bindung des monoklonalen UCHT-1 und der Isotypkontrolle erfolgte direkt mittels des PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Der Nachweis der Bindung des *scFv* A7 erfolgte mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Die Titrationskurven sind in Abbildung 3.20 zusammenfassend dargestellt. Aus den dargestellten Daten geht hervor, dass die Bindung des bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers an die jeweiligen CD3-positiven Jurkat- und die VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zellen einem konzentrationsabhängigen sigmoiden Kurvenverlauf entsprechen, die im exponentiellen Teil der Kurve in einem Konzentrationsbereich von 1 – 10 µg/ml stark ansteigt und sich einem Sättigungswert annähert. Dieser Effekt ist auf der PAE/KDR-Zelllinie (Abbildung 3.20 B) sehr explizit und auf der Jurkat-Zelllinie (Abbildung 3.20 A) weniger deutlich ausgeprägt. Vor allem der Sättigungsbereich ist hier weniger deutlich zu sehen. Dennoch wird auch in diesem Falle ein klarer Anstieg der Bindungskurve des r3V-Antikörpers in dem oben genannten Konzentrationsbereich ersichtlich.

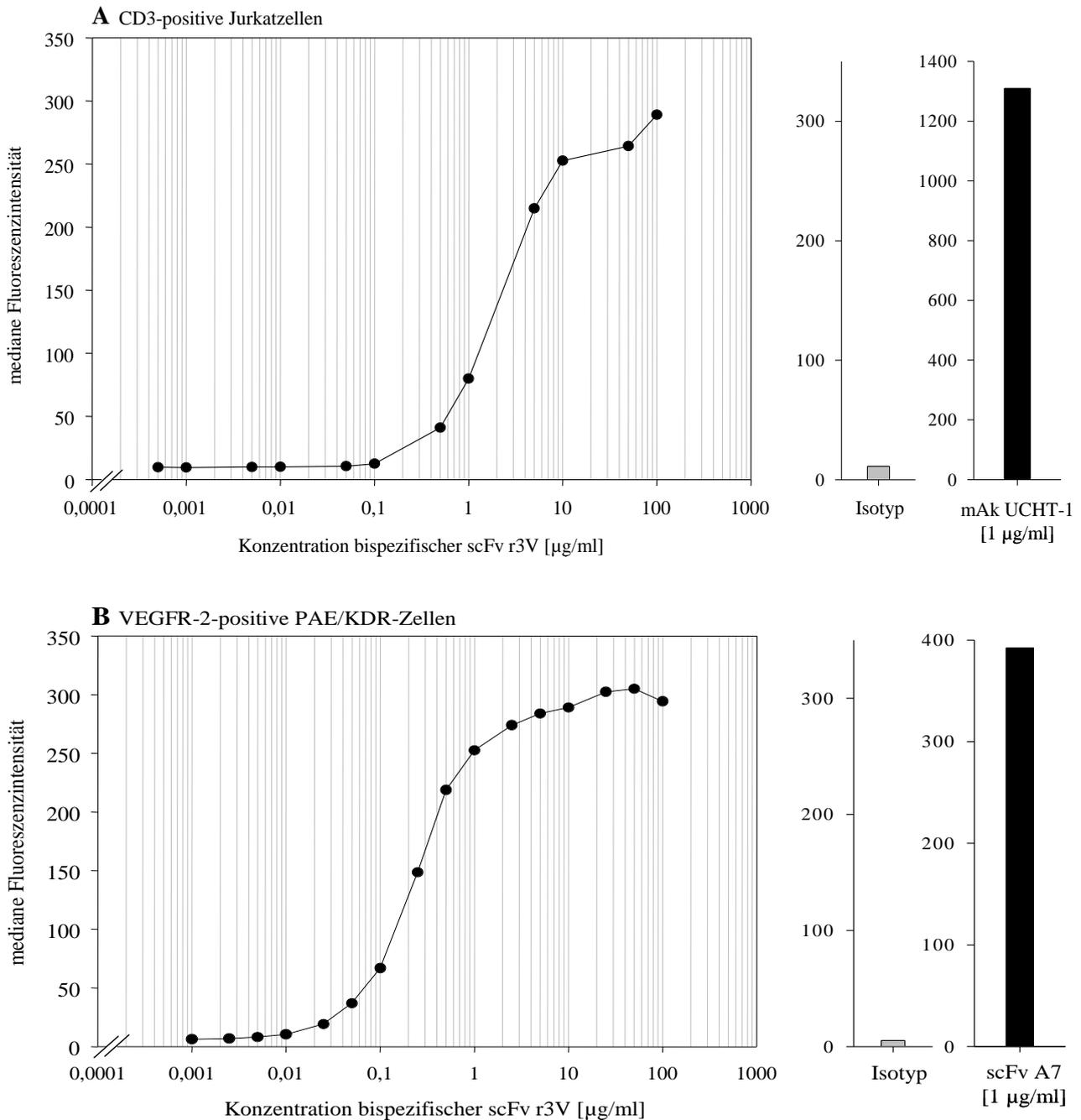


Abbildung 3.20 FACS-Titration zur Analyse der Bindung des aufgereinigten r3V *bsscFv* an CD3-positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen Darstellung der Bindungseigenschaften im Titrationsversuch. Nachweis der Bindung mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. **A** Titrationskurve für die Bindung der anti-CD3-Domäne des r3V (0,001 – 100 $\mu\text{g/ml}$) an Jurkatzellen. **Positivkontrolle** = monoklonaler UCHT-1, 1 $\mu\text{g/ml}$ (schwarzer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. **B** Titrationskurve für die Bindung der anti-VEGFR-2-Domäne des r3V (0,001 – 100 $\mu\text{g/ml}$) an PAE/KDR-Zellen. **Positivkontrolle** = *scFv* A7, 1 $\mu\text{g/ml}$ (schwarzer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. **Negativkontrolle** **Abbildung A + B** = Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (grauer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers.

Ebenso deutlich wird, dass die mediane Fluoreszenzintensität des monoklonalen UCHT-1 (1 µg/ml), der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, deutlich über der der anti-CD3 *scFv*-Domäne des *bsscFv* r3V liegt (Abbildung 3.20 A schwarzer Balken). Hingegen korreliert die mediane Fluoreszenzintensität für die anti-VEGFR-2-Domäne des *bsscFv* r3V gut mit der des als Positivkontrolle eingesetzten A7 *scFv* (1 µg/ml) (Abbildung 3.20 B schwarzer Balken).

Die Bindung des aufgereinigten bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers an sein VEGFR-2-Antigen wurde zusätzlich in einem ELISA auf gereinigtem löslichen VEGFR-2/KDR-Protein überprüft. Dafür wurde das KDR-Protein auf eine 96-Loch-MaxiSorp-ELISA-Platte gebunden und anschließend mit dem *bsscFv* r3V in einer Verdünnung von 100 – 0,001 µg/ml inkubiert. Als Negativkontrolle fungierte das lösliche Antigen alleine und als Positivkontrolle wurde 1 µg/ml des aufgereinigten *scFv* A7 verwendet. Der Nachweis erfolgte mittels eines primären Maus anti-myc-Tag für die Proben und eines anti-E-Tag-Antikörpers für die Positivkontrolle sowie eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers und einer über POD-gekoppelten chromogenen Signalentwicklung.

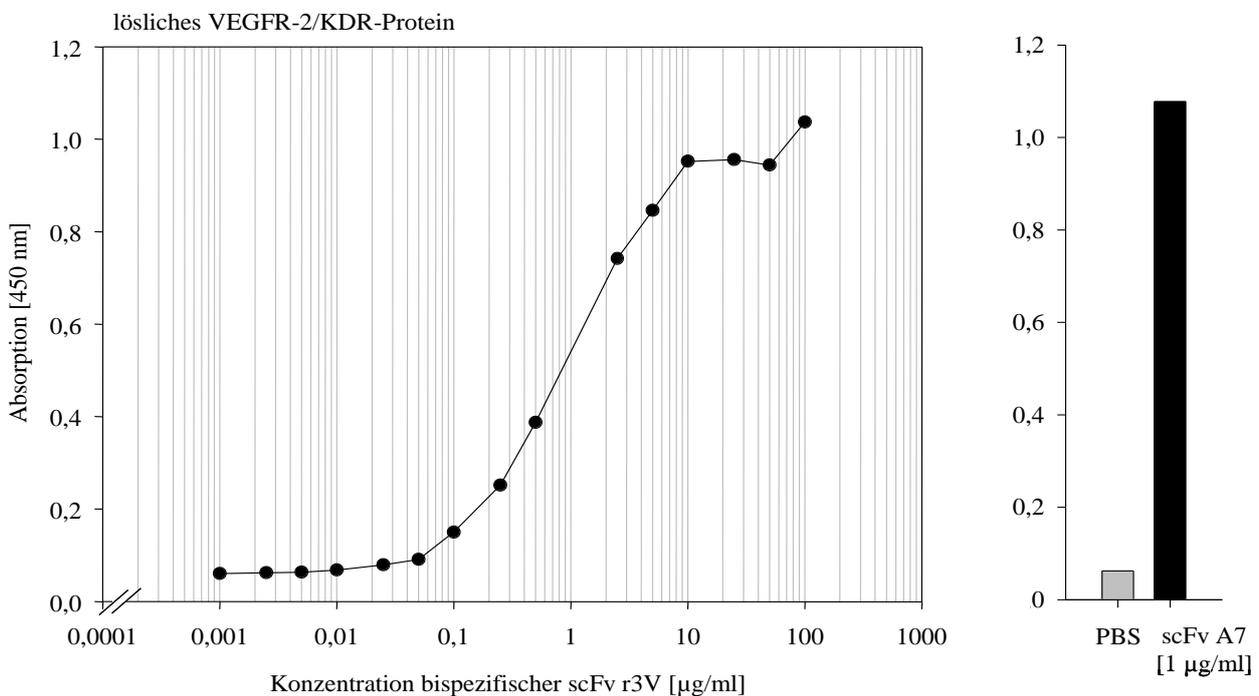


Abbildung 3.21 ELISA-Titration zur Analyse der Bindung des aufgereinigten r3V *bsscFv* an lösliches VEGFR-2/KDR-Protein Darstellung der Bindungseigenschaften im Titrationsversuch. Nachweis der Bindung der anti-VEGFR-2-Domäne des r3V (0,001 – 100 µg/ml) mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. **Positivkontrolle** = anti-VEGFR-2 *scFv* A7, 1 µg/ml (schwarzer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines primären Maus anti-E-Tag und eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers. **Negativkontrolle** = lösliches VEGFR-2/KDR-Protein in PBS (grauer Balken). Nachweis mittels eines sekundären POD-konjugierten Ziege anti-Maus IgG H+L-Antikörpers

Wie die Graphik in Abbildung 3.21 zeigt, liegt im ELISA die Konzentration, bei der die Signalintensität der Bindung der anti-VEGFR-2-Domäne des r3V an lösliches VEGFR-2/KDR-Protein stark ansteigt im Bereich von 1 – 10 µg/ml. Die Kurve erreicht die Sättigung bei einer Konzentration von etwa 10 µg/ml, bei der sich auch in etwa das Niveau der A7 scFv-Positivkontrolle (1 µg/ml) (Abbildung 3.21 schwarzer Balken) befindet. Der im ELISA beschriebene Kurvenverlauf ist vergleichbar mit dem der r3V-Bindungsanalyse an VEGFR-2/KDR-positive PAE/KDR-Zellen in der FACS-Titration (Abbildung 3.20 B) und bestätigt die Eigenschaften der anti-VEGFR-2-Domäne des r3V *bsscFv*.

Die Bindungsanalyse mittels ELISA blieb im Zuge kommerziell nicht erhältlichem aufgereinigtem CD3- sowie NCAM-Protein auf die hier dargestellte Analyse der anti-VEGFR-2-Domäne des r3V beschränkt.

In einer zusätzlichen FACS-Analyse wurde die Bindung des r3V *bsscFv* im Vergleich zu den CD3-positiven Jurkat- und den VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zellen auch auf CD3- und VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Zellen mit dem Nachweissystem aus Abbildung 3.20 untersucht. Dafür wurde der r3V in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Das Ergebnis der vergleichenden Bindungsanalyse ist in der Abbildung 3.22 ergänzend zu den Titrationskurven in Abbildung 3.20 in Form der Histogrammdarstellung zusammenfassend dargestellt.

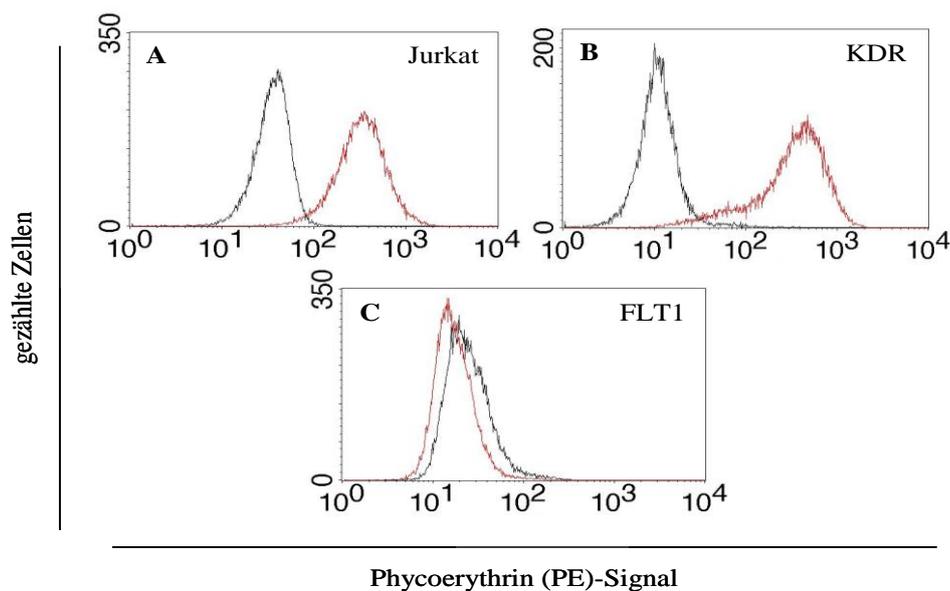


Abbildung 3.22 FACS-Bindungsanalyse des aufgereinigten r3V *bsscFv* an CD3- positive Jurkat- sowie VEGFR-2-positiv PAE/KDR-Zellen Nachweis der Bindung des r3V mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und des r3V (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des r3V an **A** CD3-positiv Jurkatzellen **B** VEGFR-2-positiv PAE/KDR-Zellen **C** Analyse der Bindung des r3V an CD3- und VEGFR-2-negativ PAE/FLT1-Zellen

3.7.2 Analyse der Bindung des bispezifischen r3N *scFv*-Antikörpers an CD3⁺ Jurkat- und NCAM⁺ TE671-Zellen

Der Nachweis der Bindung des aufgereinigten r3N erfolgte analog zu der Vorgehensweise wie unter Abschnitt 3.7.1 beschrieben. Im Unterschied zur Analyse des bispezifischen r3V *scFv* wurden für den bispezifischen r3N *scFv* maximal 80 µg/ml an Protein eingesetzt und als Positivkontrolle wurde der monoklonale ERIC-1 in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Als Isotypkontrolle fungierte normal Maus IgG1. Der Nachweis der Bindung des r3N *bsscFv* an seine korrespondierenden Antigene sowie die Bindung der Positiv- und Negativkontrolle wurde analog dem unter Abschnitt 3.7.1 beschriebenen Verfahren für den UCHT-1 und den Isotyp durchgeführt. Die ermittelten Titrationskurven für den r3N *bsscFv* sind in Abbildung 3.23 zusammengefasst. Abbildung 3.23 A veranschaulicht die Bindung der anti-CD3-Domäne des r3N an CD3-positive Jurkatzellen. Die Bindung des r3N *bsscFv* an CD3 mit einer medianen Fluoreszenzintensität von 160 fällt insgesamt deutlich gering aus. Dennoch steigt die Signalintensität im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abbildung 3.23 A grauer Balken) im Konzentrationsbereich von 1 – 10 µg/ml stark an und zeigt eine deutliche Bindung an die CD3-positiven Jurkatzellen (Abbildung 3.23 A). Die Bindungskurve nähert sich bei 100 µg/ml einem Sättigungswert an, erreicht diesen aber im abgebildeten Konzentrationsbereich nicht. Die Abbildung 3.23 B zeigt die Bindungskurve für die anti-NCAM-Domäne des r3N. Im Konzentrationsbereich von 1 – 10 µg/ml liegt die Bindungsaffinität im Bereich der Isotypkontrolle beziehungsweise leicht darüber (Abbildung 3.23 B grauer Balken). Ein deutlicher Anstieg in der Signalintensität ist erst ab einer Konzentration von etwa 80 µg/ml zu verzeichnen und die Kurve erreicht in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht die Asymptote. Die Applikation der Vergleichsantikörper, des monoklonalen UCHT-1 (1 µg/ml) und des monoklonalen ERIC-1 (1 µg/ml), zeigt erwartungsgemäß eine explizit höhere mediane Fluoreszenzintensität als die anti-CD3- und anti-NCAM *scFv*-Domäne allein (Abbildung 3.23 A + B schwarzer Balken). Die Bindung der anti-CD3-Domäne des r3N zeigt trotz der niedrigen gesamten medianen Fluoreszenzintensität vergleichbare Eigenschaften zur Bindung der anti-CD3-Domäne des r3V an CD3-positive Jurkatzellen (Abbildung 3.20 A). Im Gegensatz zu den unterschiedlichen medianen Fluoreszenzintensitäten der anti-CD3-Domäne der beiden bispezifischen *scFv*-Antikörper r3V und r3N sind die medianen Fluoreszenzintensitäten für den monoklonalen UCHT-1 in beiden Analysen gut vergleichbar (Abbildung 3.20 A und 3.23 A schwarzer Balken).

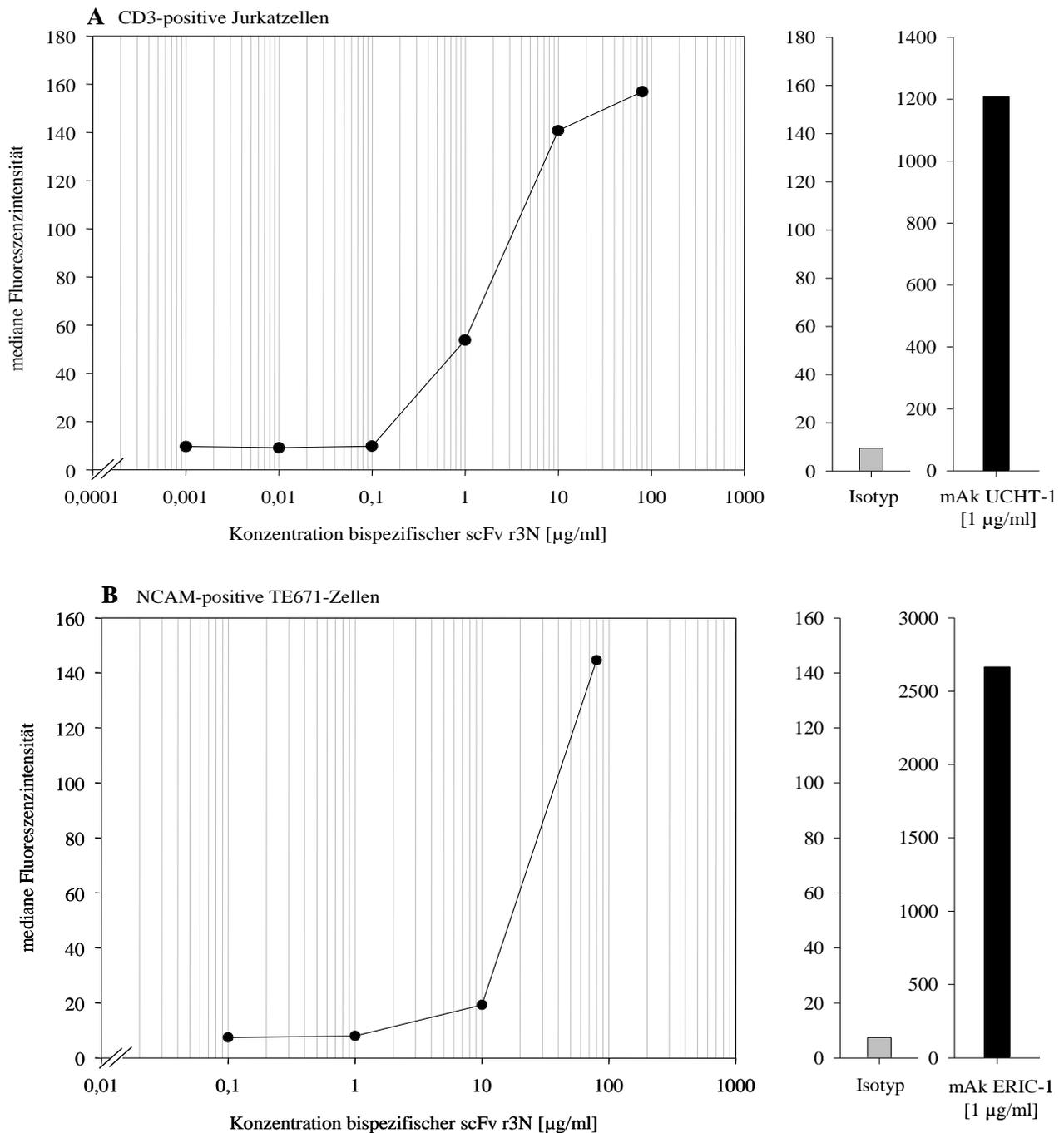


Abbildung 3.23 FACS-Titration zur Analyse der Bindung des aufgereinigten r3N *bsscFv* an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive TE671-Zellen Darstellung der Bindungseigenschaften im Titrationsversuch. Nachweis der Bindung des r3N mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. **A** Titrationskurve für die Bindung der anti-CD3-Domäne des r3N (0,001 – 100 $\mu\text{g/ml}$) an Jurkatzellen. **Positivkontrolle** = monoklonaler UCHT-1, 1 $\mu\text{g/ml}$ (schwarzer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. **B** Titrationskurve für die Bindung der anti-NCAM-Domäne des r3N (0,1 – 80 $\mu\text{g/ml}$) an T671-Zellen. **Positivkontrolle** = monoklonaler ERIC-1, 1 $\mu\text{g/ml}$ (schwarzer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers. **Negativkontrolle** Abbildung **A + B** = Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (grauer Balken). Nachweis der Bindung mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fc γ -Antikörpers.

In einer weiteren FACS-Analyse wurde die Bindung des aufgereinigten r3N *bsscFv* in einer Konzentration von je 10 µg/ml analysiert. Ergänzend zu der in Abbildung 3.23 dargestellten Titrationskurven zeigt Abbildung 3.24 die durchflusszytometrischen Ergebnisse der r3N-Bindung an CD3-positive Jurkat-, NCAM-positive IMR5- und CD3- sowie NCAM-negative LS-Zellen in der Histogrammdarstellung. Dabei ist hier die Bindung an IMR5-Zellen, die in weiterführenden Funktionsanalysen als Zielzellen verwendet wurden, zusätzlich zu TE671-Zellen (Abbildung 3.23 B) dargestellt. Der Nachweis der Bindung des r3N und der Isotypkontrolle erfolgte analog zu dem der Titration (Abbildung 3.23). Wie in Abbildung 3.24 zu erkennen ist, bindet der r3N deutlich an CD3-positive Jurkatzellen (Abbildung 3.24 A). Die Verschiebung zum Isotyp kommt klar zum Ausdruck und die mediane Fluoreszenzintensität ist vergleichbar zu der der Titrationskurve (Vergleich Abbildung 3.23 A). Die Bindung des r3N auf NCAM-positiven IMR5-Zellen fällt sehr gering aus. Die schwache Bindung des r3N bei einer Konzentration von 10 µg/ml äußert sich hier genauso wie bei der in der Titration dargestellten Bindung auf TE671-Zellen (Vergleich Abbildung 3.23 B) und unterstützt die unzureichende Bindungsfähigkeit. Dennoch zeigt sich, dass der Antikörper deutlich nicht an die CD3- sowie NCAM-negative LS-Zelllinie bindet (Abbildung 3.24 C).

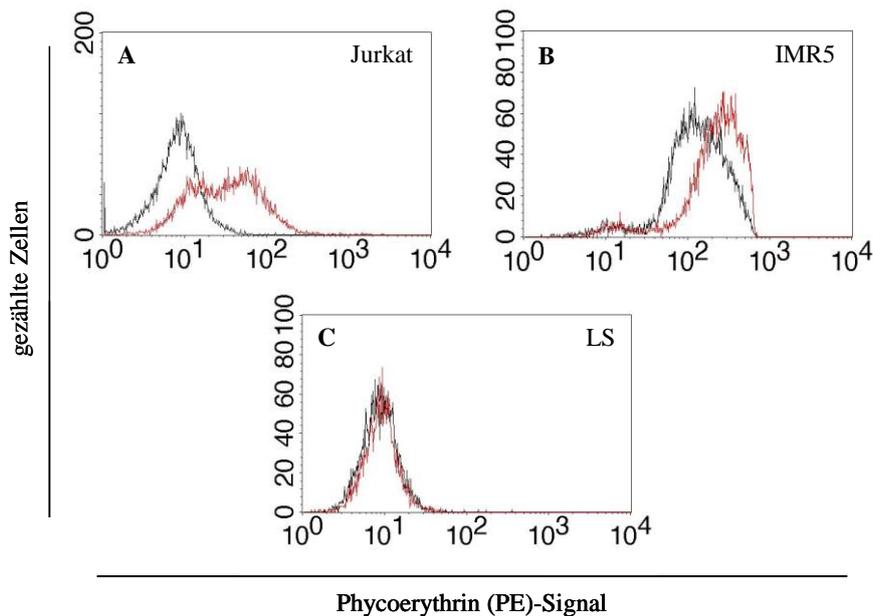


Abbildung 3.24 FACS-Bindungsanalyse des aufgereinigten r3N *bsscFv* an CD3-positive Jurkat- sowie NCAM-positive IMR5-Zellen Nachweis der Bindung des r3N mittels eines primären Maus anti-myc-Tag und eines sekundären PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Nachweis der Bindung der Isotypkontrolle mittels eines PE-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Fcγ-Antikörpers. Darstellung der Isotypkontrolle normal Maus IgG1 (schwarzes Histogramm) und des r3N (rotes Histogramm). Darstellung der Bindung des r3N an **A** CD3-positive Jurkatzellen **B** NCAM-positive IMR5-Zellen **C** Analyse der Bindung des r3N an CD3- und NCAM-negative LS-Zellen

Im Hinblick auf die deutliche Bindung des D29 *scFv*-Antikörpers (Abbildung 3.15 B) und der r3N-Subklone an die NCAM-positiven TE671-Zellen fiel die Bindung der anti-NCAM-Domäne des aufgereinigten r3N-Antikörpers an die TE671-Zellen schlechter aus als erwartet. Die geringe Bindungsfähigkeit des r3N im Konzentrationsbereich von 1 – 10 µg/ml steht dabei mutmaßlich in Zusammenhang mit der Aggregatbildung, die in der aufgereinigten r3N-Präparation zu beobachten war (Abbildung 3.19 B).

Im zweiten Schritt der Funktionsanalyse wurde untersucht, ob die bispezifischen r3V und r3N *scFv*-Antikörper in der Lage sind, die Proliferation humaner T-Zellen einer frisch isolierten humanen PBMC-Population gesunder Spender zu stimulieren.

3.7.3 Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers zur Aktivierung der Proliferation CD3⁺ T-Zellen einer humanen PBMC-Population

Die antikörpervermittelte Proliferation humaner T-Zellen innerhalb einer PBMC-Population mittels des BrdU-Inkorporation-ELISAs wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Im Ansatz 1 (Abbildung 3.25) wurden der bispezifische Antikörper in einer Konzentration von 0,001 – 100 µg/ml sowie der monoklonale UCHT-1 (1 µg/ml) über Nacht an den Boden der 96-Loch-MaxiSorp-ELISA-Platte gebunden. Danach erfolgte eine Inkubation von PBMCs unter Standardbedingungen für 3 Tage. Im Ansatz 2 (Abbildung 3.26) wurden die PBMCs mit inaktivierten (120 Gy) VEGFR-2-positiven PAE/KDR- sowie VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Zielzellen in einem Verhältnis von 30 : 1 kokultiviert und der *bsscFv* r3V sowie der Kontrollantikörper wurden löslich zu den Zellen hinzugegeben. In beiden Ansätzen fungierte der nicht-stimulierende *scFv* A7 in einer Konzentration von 1 µg/ml als Negativkontrolle. Als weitere Positivkontrolle wurde die Proliferation durch SEB (0,5 µg/ml) ($OD_{450} = 0,509$) gemessen, die fast den gleichen Wert wie die mit UCHT-1 ($OD_{450} = 0,569$) erreichte. Unstimulierte PBMCs ($OD_{450} = 0,224$) sowie die *scFv* A7-Kontrolle ($OD_{450} = 0,174$) zeigten niedrige Werte, die nur unwesentlich über der Mediumkontrolle ($OD_{450} = 0,109$) lagen. Die Abbildung 3.25 fasst die Ergebnisse des Ansatzes 1 zusammen. Wie deutlich zu erkennen ist, liegt die maximale BrdU-Inkorporation bei einer Applikation des r3V-Antikörpers bei einer Konzentration von 0,1 bis 1 µg/ml (Abbildung 3.25 A). Der maximale Absorptionswert ($OD_{450} = 0,525$) liegt dabei im vergleichbaren Bereich zur PBMC-Stimulation mittels des monoklonalen UCHT-1-Antikörpers (Abbildung 3.25 B schwarzer Balken). Der Versuch zeigt ein klar erkennbares Proliferationsmaximum bei 0,1 – 1,0 µg/ml immobilisiertem r3V und liefert den Nachweis der Stimulation (Proliferation) von PBMC durch den bispezifischen Antikörper.

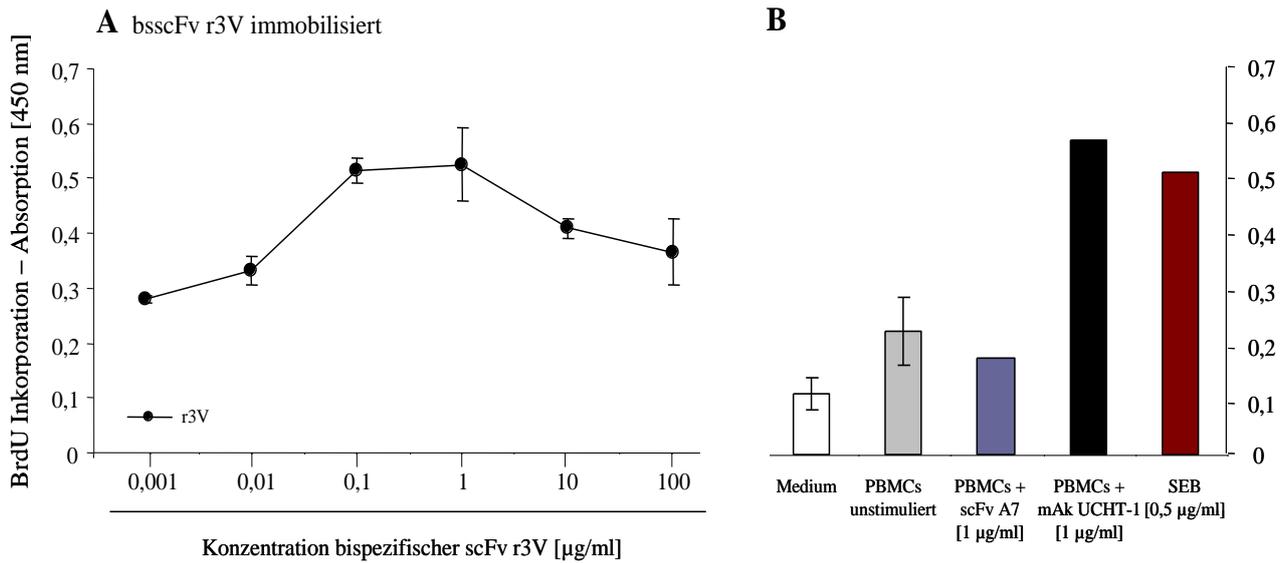


Abbildung 3.25 BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner PBMCs mittels des r3V bsscFv Der r3V (0,001 – 100 µg/ml) sowie der monoklonale UCHT-1 (1 µg/ml) liegen an die Zellkulturplatte gebunden vor. **A** Darstellung der Absorption bei 450 nm als Maß für die BrdU-Inkorporation proliferierender T-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des r3V (●) **B** Darstellung der BrdU-Inkorporation für die Inkubation der Kontrollen und Vergleichsantikörper. Als **Negativkontrollen** fungieren Medium, PBMCs unstimuliert und PBMCs + scFv A7 (1 µg/ml). Als **Positivkontrollen** fungieren PBMCs + UCHT-1 und PBMCs + Staphylokokkenenterotoxin SEB (0,5 µg/ml).

Die Ergebnisse von Ansatz 2 sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Hier nimmt mit steigender Konzentration des r3V-Antikörpers die BrdU-Inkorporation progredient zu und es wird kein Plateau im Bereich von 0,1 - 1 µg/ml erreicht. Die maximale Stimulation der PBMCs mit r3V war bei 100 µg/ml zu messen, dem höchsten der getesteten Konzentrationen (Abbildung 3.26 A volles Rechteck, $OD_{450} = 1,639$), und lag damit deutlich oberhalb der Positivkontrolle PBMCs + PAE/KDR + UCHT-1, die eine OD_{450} von 0,801 erreichte (Abbildung 3.26 B, schwarzer Balken). Die PBMCs + PAE/KDR + SEB-Positivkontrolle lag mit einer OD_{450} von 0,774 in der Höhe der UCHT-1-Positivkontrolle. Weitere Kontrollen mit PBMCs + PAE/KDR ohne Antikörper ($OD_{450} = 0,114$) oder mit scFv A7 ($OD_{450} = 0,206$) zeigten ähnlich niedrige Werte wie die Mediumkontrolle ($OD_{450} = 0,106$). In Anwesenheit der VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen induziert r3V einen deutlich verspäteten (ab 10 µg/ml) und niedrigeren Anstieg der Proliferation als in Gegenwart der PAE/KDR-Zielzellen. Der im abgebildeten Konzentrationsbereich maximal erzielte Wert für die PBMC-Proliferation in Gegenwart der VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen erreicht bei 100 µg/ml ähnliche Werte ($OD_{450} = 0,770$) wie die UCHT-1-Positivkontrolle bei 1 µg/ml ($OD_{450} = 0,801$) (Abbildung 3.26 B schwarzer Balken). Unter den gewählten Versuchsbedingungen des Ansatzes 2 (löslicher r3V in Gegenwart von PAE/KDR-Zielzellen) induziert der r3V ein deutlich stärkeres und insbesondere die Positivkontrollen übersteigendes Proliferationsmaximum, als in Ansatz 1 (immobilisierte Antikörper Abbildung 3.25).

Der signifikante Proliferationsunterschied im Bereich höherer Konzentrationen ($> 1 \mu\text{g/ml}$) in Gegenwart VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Zielzellen (im Vergleich zu VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen) ist als Nachweis der spezifischen CD3/VEGFR-2-Bindung und T-Zellaktivierung von r3V zu sehen. Offenbar liegt in den niedrigen Konzentrationsbereichen ($< 1 \mu\text{g/ml}$) aber auch zusätzlich ein deutlich unspezifischer Effekt vor, wie der Anstieg der Proliferation im Gegenwart der VEGFR-2 negativen PAE/FLT-1-Kontrollzellen zeigt.

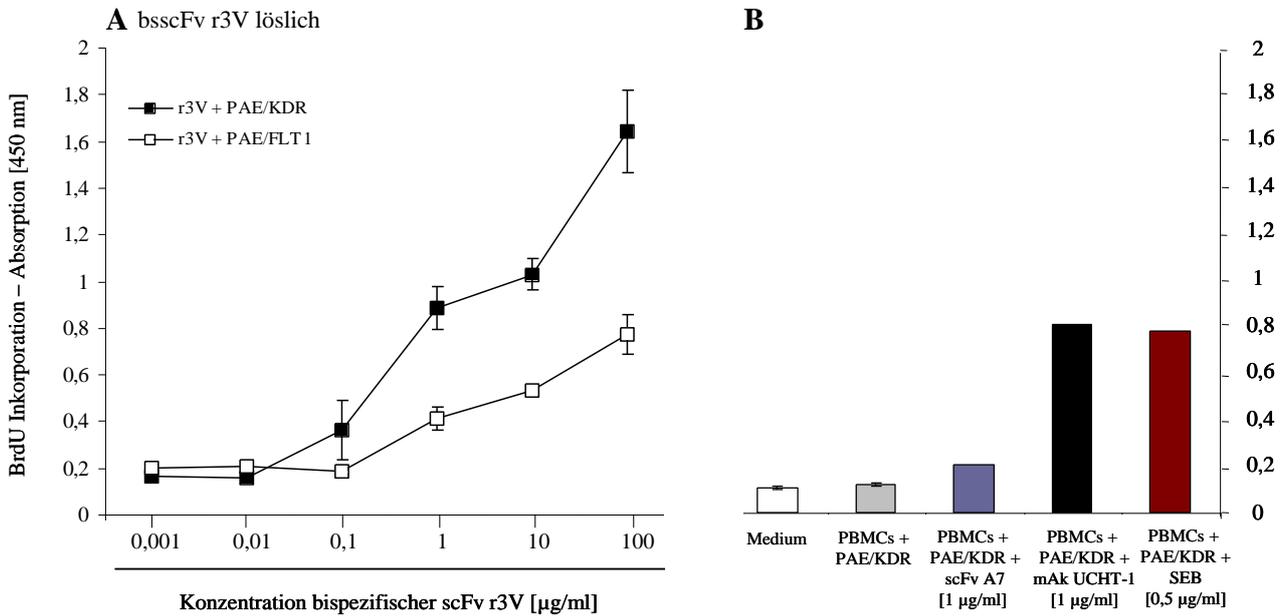


Abbildung 3.26 BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner PBMCs mittels des r3V *bsscFv* in Gegenwart inaktivierter PAE/KDR-Ziel- und PAE/FLT1-Kontrollzellen Der r3V (0,001 – 100 $\mu\text{g/ml}$) sowie der monoklonale UCHT-1 (1 $\mu\text{g/ml}$) liegen löslich vor. **A** Darstellung der Absorption bei 450 nm als Maß für die BrdU-Inkorporation proliferierender T-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des r3V. Applikation des r3V in Gegenwart von (■) VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen und (□) von VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen **B** Darstellung der BrdU-Inkorporation für die Inkubation der Kontrollen und Vergleichsantikörper. Als **Negativkontrollen** fungieren Medium, PBMCs + PAE/KDR unstimuliert und PBMCs + PAE/KDR + *scFv* A7 (1 $\mu\text{g/ml}$). Als **Positivkontrollen** fungieren PBMCs + PAE/KDR + UCHT-1 und PBMCs + PAE/KDR + Staphylokokkenenterotoxin SEB (0,5 $\mu\text{g/ml}$).

Die in der Graphik dargestellten Positivkontrollen von PAE/KDR-Zellen mit UCHT-1- und SEB-Stimulation sowie die Negativkontrolle mit *scFv* A7-Stimulation wurden mit den PAE/FLT1-Kontrollzellen nicht durchgeführt, da sie nicht essentiell waren und der Umfang der Kontrollen durch die Kapazität der verwendeten 96-Loch-Mikrotiterplatten begrenzt war. Die ermittelte Absorption für PAE/FLT1-Zellen plus PBMCs (ohne Antikörper) liegt mit 0,121 im vergleichbaren Bereich zu der des Ansatzes PAE/KDR-Zellen + PBMCs (ohne Antikörper) und verdeutlicht, dass auch die PAE/FLT1-Zellen inaktiviert vorlagen und die Proliferation der PBMCs auf den Einfluss des r3V zurückzuführen ist.

Die Proliferationsassays wurden in der gleichen Art und Weise auch unter dem Aspekt einer CD28-Kostimulation mittels eines monoklonalen CD28-Antikörpers (Klon 28.2) durchgeführt. Es sind zahlreiche *In-vitro*-Analysen mit (nicht rekombinanten) CD3-stimulierenden bispezifischen Antikörpern publiziert, die zeigen, dass eine CD28-Kostimulation zu einer Steigerung der Proliferation führt. Die Wirkung des CD28-Antikörpers fiel in den hier durchgeführten Proliferationsversuchen enttäuschend aus. Da die Proliferationsresultate auch ohne CD28-Kostimulation deutlich und aussagekräftig waren, wurde der Frage der CD28-Kostimulation mangels Relevanz nicht weiter nachgegangen.

3.7.4 Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3N *scFv*-Antikörpers zur Aktivierung der Proliferation CD3⁺ T-Zellen einer humanen CD56-depletierten PBMC-Population

PBMCs sind eine gemischtzellige Leukozytenpopulation, die unter anderem NCAM (CD56)-positive NK-Zellen und NKT-Zellen enthalten. Um unerwünschte Störeffekte durch Bindung des r3N *bsscFv* an diese NCAM-positiven Zellen zu vermeiden, wurden vor Durchführung der Proliferationsassays PBMCs bezüglich NCAM-positiver Zellen depletiert. Ziel war ein Nachweis, dass auf dem Boden einer Mikrotiterplatte immobilisierte r3N-Antikörper T-Zellen *via* CD3-Bindung zur Proliferation anzuregen in der Lage sind. Die Analyse der Proliferation von T-Zellen mittels des r3N erfolgte analog zu Abschnitt 3.7.3 in den dort beschriebenen Ansätzen 1 und 2. Die Abbildung 3.27 stellt die Analyse des Ansatzes 1 zusammenfassend dar. Mit zunehmender Konzentration des eingesetzten r3N zeigt sich ein Anstieg der gemessenen Proliferation, beginnend bei etwa 1 µg/ml. Der höchste Wert ($OD_{450} = 1,341$) wird bei 100 µg/ml erreicht. Es ist unklar, ob sich hier die Ausbildung eines Plateaus abzeichnet, da keine noch höheren Konzentrationen eingesetzt wurden. Die Positivkontrolle mit immobilisiertem UCHT-1 (1 µg/ml) zeigt mit einer OD_{450} von 1,341 einen ähnlich hohen Wert wie die SEB-Kontrolle (0,5 µg/ml) mit einer OD_{450} von 1,038. Die Negativkontrollen PBMCs + ERIC-1 (1 µg/ml) ($OD_{450} = 0,204$) und PBMCs alleine ($OD_{450} = 0,093$) sowie die Mediumkontrolle ($OD_{450} = 0,111$) zeigen sehr niedrige Extinktionswerte. Insgesamt erreichen die durch den r3N erzielten Werte, trotz hundertfach höherer eingesetzter Konzentration, mit einer maximalen OD_{450} von 0,782 nur gut die Hälfte der Werte der Positivkontrolle UCHT-1 ($OD_{450} = 1,341$). Die Daten zeigen deutlich eine Stimulation (Proliferation) der NCAM-depletierten PBMCs, ausgelöst durch den r3N. Es ist davon auszugehen, dass es sich um eine durch die CD3-Seite des r3N spezifisch ausgelöste Proliferation handelt.

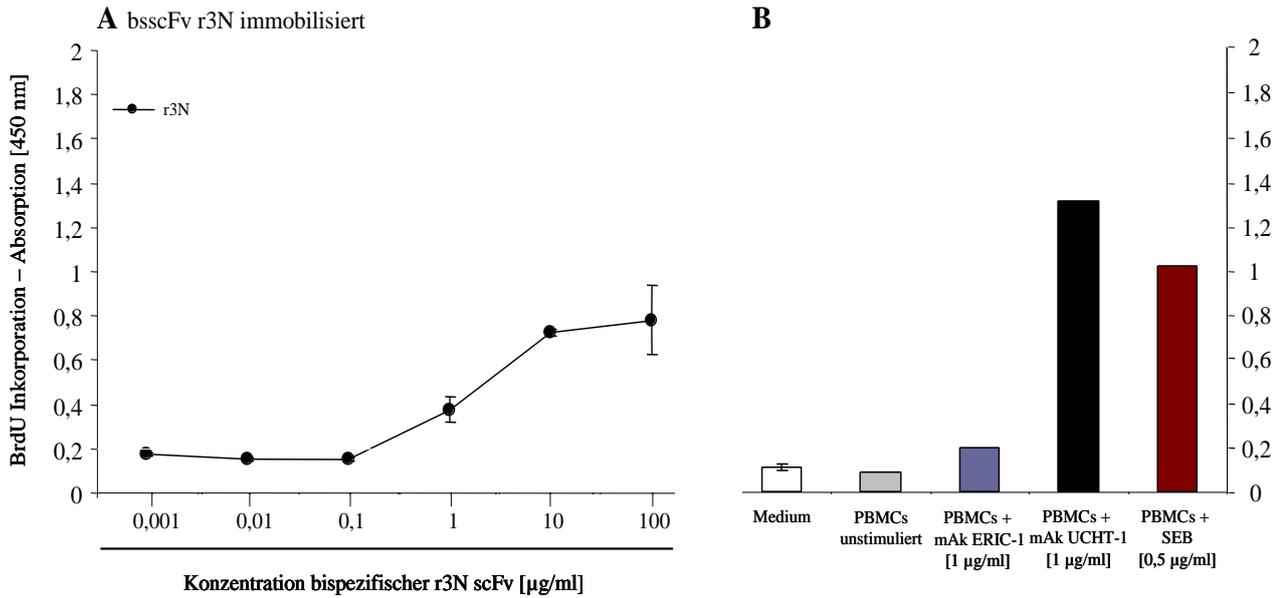


Abbildung 3.27 BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner CD56-depletierter PBMCs mittels des r3N *bsscFv* Der r3N (0,001 – 100 µg/ml) sowie der monoklonale UCHT-1 (1 µg/ml) liegen an die Zellkulturplatte gebunden vor. **A** Darstellung der Absorption bei 450 nm als Maß für die BrdU-Inkorporation proliferierender T-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des r3N (●) **B** Darstellung der BrdU-Inkorporation für die Inkubation der Kontrollen und Vergleichsantikörper. Als **Negativkontrollen** fungieren Medium, PBMCs unstimuliert und PBMCs + monoklonaler ERIC-1 (1 µg/ml). Als **Positivkontrollen** fungieren PBMCs + UCHT-1 und PBMCs + Staphylokokkenenterotoxin SEB (0,5 µg/ml).

Die Ergebnisse des Ansatzes 2 (löslicher r3N + Zielzellen) sind in der Abbildung 3.28 zusammengefasst. Als Zielzellen wurden inaktivierte NCAM-positive IMR5- sowie inaktivierte NCAM-negative LS-Zellen eingesetzt. Die Ansätze mit dem r3N *bsscFv* zeigen eine Aktivierung der Proliferation, die sich proportional zur applizierten Antikörperkonzentration verhält und ihren höchsten Wert bei 5 µg/ml erreicht (Abbildung 3.28 A geschlossenes und offenes Rechteck). Beide Kurven (IMR5 sowie LS) verhalten sich dabei nahezu gleich und erreichen eine maximale OD₄₅₀ von 0,876 beziehungsweise von 0,735. Ein Plateau wird im abgebildeten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Die Negativkontrollen PBMCs + IMR5 + ERIC-1 (1 µg/ml) (OD₄₅₀ = 0,124) und PBMCs + IMR5 (OD₄₅₀ = 0,106) sowie die Mediumkontrolle (OD₄₅₀ = 0,102) zeigen sehr niedrige Extinktionswerte. Anders als bei dem analog aufgebauten Versuch mit dem r3V bispezifischen Antikörper (Abbildung 3.26) gelang es hier nicht einen tumorantigen-(NCAM)-spezifischen Effekt herauszuarbeiten. Die Proliferationsstudie in Abbildung 3.28 konnte aufgrund der zum Ende der Arbeit vorliegenden limitierenden Mengen an r3N-Protein nur bis zu einer maximalen Konzentration von 5 µg/ml durchgeführt und abgebildet werden. So konnte das funktionale Potential des r3N vermutlich nicht vollständig erfasst werden. In diesem Zusammenhang sind die zuvor beschriebenen Bindungsanalysen wichtig. Da in den Bindungsanalysen der r3N an die NCAM-negativen LS-Zellen (Abbildung 3.24 C) klar negativ ist, erscheint eine Kreuzreaktion des r3N-Antikörpers mit den LS-Zellen unwahrscheinlich.

Vielmehr muss hier die unzureichende Bindung des r3N an NCAM-positive IMR5 als auch TE671-Zellen in Betracht gezogen werden. Wie die Titrationskurve (Abbildung 3.23 B) und die Bindungsanalyse (Abbildung 3.24 B) zeigen, ist eine klare Bindung erst ab einer Konzentration des r3N von über 10 µg/ml zu erkennen. Analog zu dem in Abbildung 3.26 dargestellten Versuch wurden auch hier die Positivkontrollen IMR5-Zellen mit UCHT-1 und SEB-Stimulation sowie die Negativkontrolle IMR5-Zellen mit ERIC-1-Stimulation mit den LS-Zellen, aufgrund nachrangiger Relevanz und des beschränkten Platzangebots auf den verwendeten 96-Loch-Mikrotiterplatten, nicht durchgeführt. Die ermittelte Absorption für LS-Zellen + PBMCs liegt mit 0,114 im vergleichbaren Bereich zu der des Ansatzes IMR5-Zellen + PBMCs und verdeutlicht, dass auch die LS-Zellen inaktiviert vorlagen und hier die Stimulation (Proliferation) ausschließlich auf den Einfluss des r3N zurückzuführen ist.

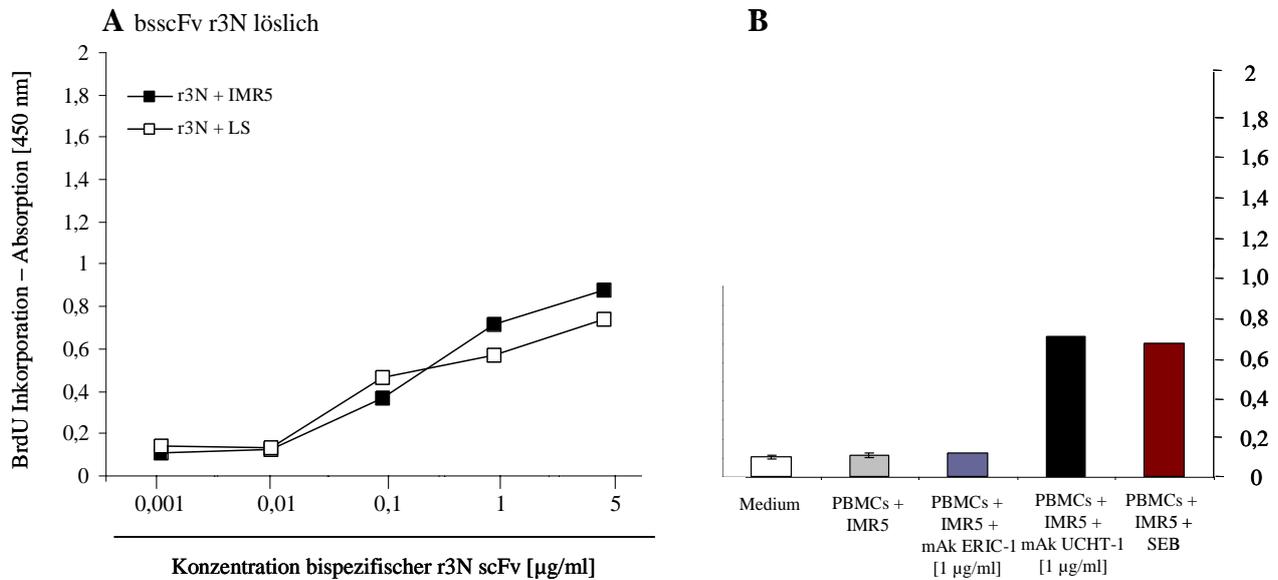


Abbildung 3.28 BrdU-Assay zur Analyse der Aktivierung humaner CD56-depletierter PBMCs mittels des r3N *bsscFv* in Gegenwart inaktivierter IMR5-Ziel- und LS-Kontrollzellen. Der r3N (0,001 – 5 µg/ml) sowie der monoklonale UCHT-1 (1 µg/ml) liegen löslich vor. **A** Darstellung der Absorption bei 450 nm als Maß für die BrdU-Inkorporation proliferierender T-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des r3N. Applikation des r3N in Gegenwart von (■) NCAM-positiven IMR5-Zielzellen und von (□) NCAM-negativen LS-Kontrollzellen **B** Darstellung der BrdU-Inkorporation für die Inkubation der Kontrollen und Vergleichsantikörper. Als **Negativkontrollen** fungieren Medium, PBMCs + IMR5 unstimuliert und PBMCs + IMR5 + monoklonaler ERIC-1 (1 µg/ml). Als **Positivkontrollen** fungieren PBMCs + IMR5 + UCHT-1 und PBMCs + IMR5 + Staphylokokkenenterotoxin SEB (1 µg/ml).

Auch hier wurden, wie in Abschnitt 3.7.3 beschrieben, die CD28-Kostimulationsanalysen durchgeführt. Dabei ergab sich ein vergleichbares Bild. Die zusätzliche Aktivierung mittels des CD28.2 war auch hier nicht zielführend und für die daraus resultierende funktionale Analyse des r3N gilt entsprechend dasselbe wie für den r3V.

Im dritten Schritt der funktionalen Analyse der bispezifischen *scFv*-Antikörper r3V und r3N erfolgte die Evaluierung der zytotoxischen Eigenschaften. Dabei sollte untersucht werden, ob die *bsscFv*-Antikörper in der Lage sind, Effektor-T-Zellen zu rekrutieren und diese gegen die antigen-tragenden Zielzellen zwecks Zelllyse zu richten.

3.7.5 Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers zur Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen und zur spezifischen Lyse VEGFR-2⁺ PAE/KDR-Zellen

In einem Pilotexperiment hinsichtlich einer qualitativen Analyse der durch den r3V vermittelten Zytotoxizität wurden frisch isolierte humane PBMCs entweder gemeinsam mit VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Ziel- oder VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen koinkubiert. Die Zellen wurden dabei in einem Effektor : Zielzellen-Verhältnis von 30 : 1 in Gegenwart sowie Abwesenheit des r3V-Antikörpers (je 1 µg/ml) für 3 Tage in einer 6-Loch-Zellkulturplatte kultiviert. Die Ansätze wurden anschließend mikroskopisch begutachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung der entsprechenden Mikroskopiedaten. In der Darstellung kommt klar zum Ausdruck, dass in Abwesenheit des r3V die VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen (Abbildung 3.29 A) als auch die VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen (Abbildung 3.29 C) normal wachsen und keinen erkennbaren zytotoxischen Einflüssen unterliegen. Dies äußert sich sichtbar in der normalen Morphologie und Adhärenz der Zellen. Dieses Bild ändert sich unter dem Einfluss des r3V drastisch. Wie Abbildung 3.29 B und D verdeutlichen, sind keine normal wachsenden adhärennten Zellen mehr erkennbar, was auf zytotoxische Prozesse, ausgehend von den r3V-vernetzten Effektorzellen, schließen lässt. Auffällig dabei ist, dass dieser Effekt gleichermaßen bei den VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen (Abbildung 3.29 B) als auch bei den VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen (Abbildung 3.29 D) zu beobachten ist. Wie in der Abbildung 3.29 klar zum Ausdruck kommt, sind die VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen im Zuge der PBMC-Inkubation mit dem r3V zytolytisch gleichermaßen betroffen wie die VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen. Da der r3V deutlich nicht an die PAE/FLT1-Zellen bindet (Abbildung 3.22), ist eine ungewünschte Kreuzreaktion auszuschließen. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass hier mutmaßlich eine unspezifische *bystander*-Zytotoxizität vorliegt, die auf die Wirkung von Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen zurückzuführen ist. Um unspezifische Effekte in der Analyse der r3V-vermittelten Zytotoxizität zu minimieren beziehungsweise zu unterbinden, wurden aufgrund dieser Hypothese die weiteren quantitativen Zytotoxizitätsanalysen mit isolierten CD8-positiven T-Zellen durchgeführt.

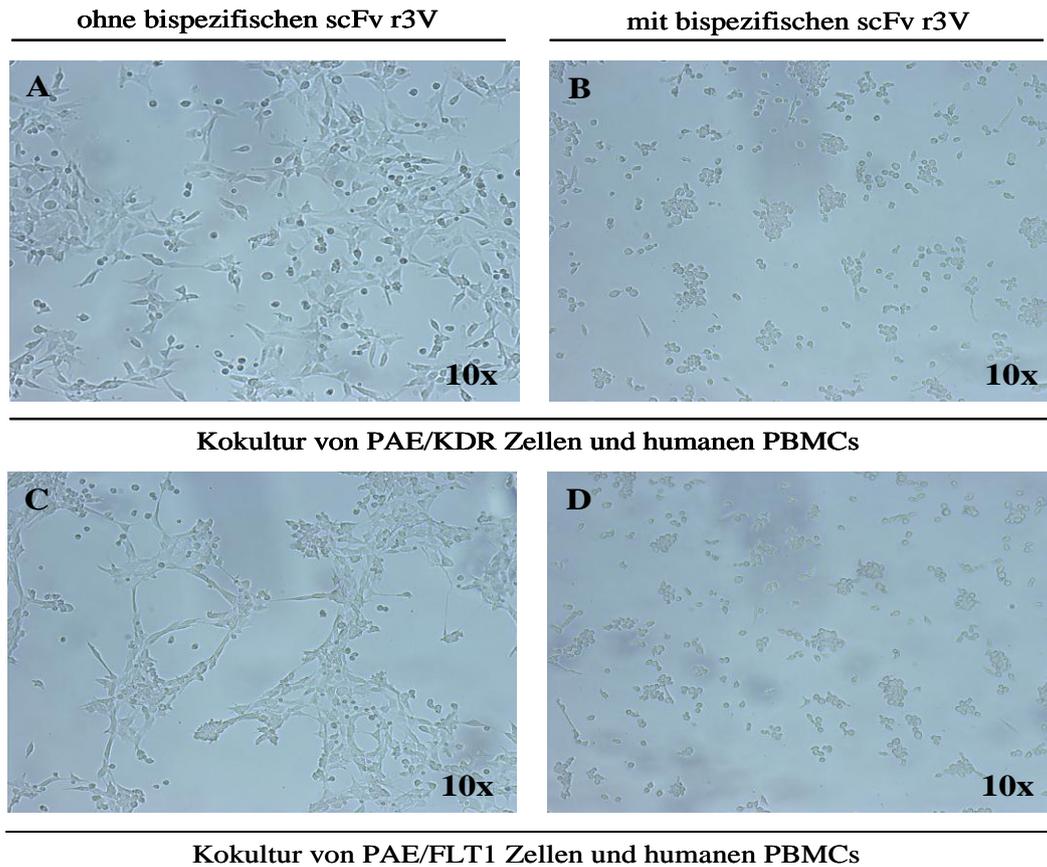


Abbildung 3.29 Qualitative Analyse der r3V *bsscFv*-vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Ziel- und VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen Kokultivierung von humanen PBMCs mit Ziel- sowie Kontrollzellen im Verhältnis 30 : 1 für 3 Tage. Applikation des r3V in einer Konzentration von 1 µg/ml
A Koinkubation von PBMCs und PAE/KDR-Zielzellen ohne r3V **B** Koinkubation von PBMCs und PAE/KDR-Zielzellen mit r3V **C** Koinkubation von PBMCs und PAE/FLT1-Kontrollzellen ohne r3V **D** Koinkubation von PBMCs und PAE/FLT1-Kontrollzellen mit r3V

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der r3V in der Lage ist, eine spezifische Zelllyse von PAE/KDR-Zielzellen durch CD8-positive T-Effektorzellen herbeizuführen. Die PAE/FLT1-Zellen wurden hier als Kontrollzelllinie eingesetzt. Für die Zytotoxizitätsanalyse wurden frische humane PBMCs für 3 Tage mit Il-2 (100 U/ml) prästimuliert. Anschließend erfolgte eine positive Selektion der CD8-T-Zellen. Die Inkubation der PAE/KDR-Ziel- und der PAE/FLT1-Kontrollzellen mit den CD8-positiven Effektorzellen erfolgte in verschiedenen E : T-Ratios für 4 h in Gegenwart und Abwesenheit des r3V in einer Konzentration von 10 µg/ml. Die Auswertung der Zytotoxizitätsanalysen erfolgte mittels FACS (Vergleich 2.5.4). Mit der hier verwendeten Strategie werden über die AnnexinV-FITC-Färbung sämtliche toten Effektor- und Zielzellen erfasst (apoptotische und lysierte). Die Zielzellen werden durch PKH26-Färbung von den CD8-positiven Effektorzellen unterschieden.

Eine zusätzliche PI-Färbung für die spätapoptotischen/lysierten Zellen wurde nicht vorgenommen, da beschrieben ist, dass dies gegenüber der AnnexinV-FITC-Färbung keine signifikante Zusatzinformation liefert (*Fischer und Mackensen 2003*). Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalyse für die PAE/KDR-Ziel- und die PAE/FLT1-Kontrollzellen sind in der Graphik 3.30 zusammenfassend dargestellt.

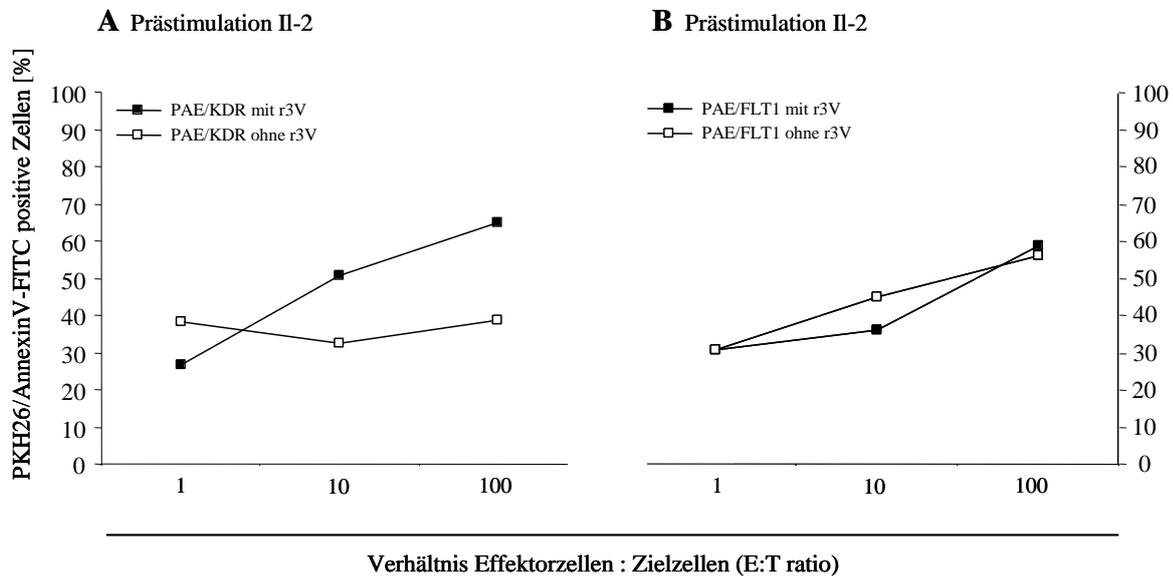


Abbildung 3.30 FACS-Analyse der r3V bsscFv-vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Ziel- und VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen Darstellung der prozentualen Anzahl PKH26/AnnexinV-FITC-doppelpositiver Ziel- und Kontrollzellen in Abhängigkeit steigender E : T-Ratios. Applikation des r3V in einer Konzentration von 10 µg/ml. Inkubation der Ziel- und Kontrollzellen nach Il-2-Stimulation von PBMCs und Selektion CD8-positiver T-Zellen. Darstellung der **A** PAE/KDR-Zielzellen in Gegenwart (■) und Abwesenheit (□) des r3V und **B** der PAE/FLT1-Kontrollzellen in Gegenwart (■) und Abwesenheit (□) des r3V

Wie in der Graphik deutlich zum Ausdruck kommt, ist ein r3V-spezifischer Effekt auf die Lyse der PAE/KDR-Zielzellen zu erkennen. Mit zunehmender E : T-Ratio steigt die Anzahl PKH26/AnnexinV-FITC-doppelpositiver Zellen in Gegenwart des r3V proportional an (Abbildung 3.30 A geschlossenes Rechteck) und erreicht im abgebildeten E : T-Ratio-Bereich einen maximalen Wert von etwa 65 %. Werden die PAE/KDR-Zielzellen indes ohne r3V inkubiert, so bleibt die Anzahl der doppelpositiven Zellen mit steigender E : T-Ratio mit etwa 40 % konstant groß (Abbildung 3.30 A offenes Rechteck). Im Falle der Analyse der Zelllyse von PAE/FLT1-Kontrollzellen (Abbildung 3.30 B) sind keine Unterschiede in der Stärke der Zelllyse zu verzeichnen. Die Anzahl der PKH26/AnnexinV-FITC-gefärbten Zellen ist in Gegenwart des r3V (Abbildung 3.30 B geschlossenes Rechteck) vergleichbar groß wie in Abwesenheit des r3V (Abbildung 3.30 B offenes Rechteck).

So wird ersichtlich, dass der r3V in der Lage ist, nach Il-2-Prästimulation und positiver CD8-Selektion eine spezifische Lyse von VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen durch Vernetzung mit den aktivierten Effektorzellen zu vermitteln.

Im Hinblick auf die durch die Einwirkung des r3V erfolgte spezifische Zelllyse der PAE/KDR-Zielzellen und der Tatsache, dass der r3V keine spezifische Zelllyse gegenüber den PAE/FLT1-Kontrollzellen vermittelt, wurden weiterführende Stimulationsbedingungen evaluiert, um die zytotoxischen Eigenschaften des r3V, vor allem hinsichtlich seiner stimulierenden Eigenschaften, näher zu charakterisieren.

Im Zuge der folgenden quantitativen Evaluierung der r3V-vermittelten Zytotoxizität wurden zwei verschiedene Ansätze der Prästimulierung der PBMCs untersucht. Im Stimulationsansatz 1 wurden die PBMCs in Gegenwart von Il-2 (100 U/ml) und VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zellen und im Stimulationsansatz 2 in Gegenwart des r3V (1 µg/ml) und VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zellen für 3 Tage stimuliert. Die Überprüfung der PKH26-Färbung erfolgte mittels FACS. Dabei war nur ein sehr geringer Anteil toter Zellen, die mittels PI erfasst wurde, zu verzeichnen. Zusätzlich zeigte sich, dass auch ein Teil PKH26-ungefärbter Zielzellen vorlag (Daten nicht gezeigt). Da bereits ein hoher Anteil der PKH26-gefärbten Zielzellen AnnexinV-FITC-positiv war, was auf apoptotische Effekte durch die Färbung zurückzuführen sein kann, wurde anhand der AnnexinV-FITC-einzelpositiven Population die totale Zelllyse für die Ansätze mit und ohne r3V ermittelt und daraus die spezifische Lyse abgeleitet. In der Abbildung 3.31 sind die quantitativen zytotoxischen Ergebnisse dargestellt. Der Wert der totalen Zelllyse mit r3V bei Il-2-prästimulierten Effektorzellen steigt proportional zur E:T-Ratio an (Abbildung 3.31 A geschlossener Rhombus). Die totale Zelllyse beträgt dabei etwa 50 % bei einer E : T-Ratio von 1 und erreicht bei dem höchsten Verhältnis von E : T = 30 einen Wert von etwa 70 %. Im Gegensatz dazu bleibt die Höhe der Zelllyse ohne r3V (Abbildung 3.31 A offener Rhombus) mit steigender E : T-Ratio in etwa gleich beziehungsweise fällt leicht ab. Der maximale Wert beträgt 40 %. Die isolierte Betrachtung von Abbildung 3.31 A legt eine spezifische zytotoxische Aktivität des bispezifischen r3V-Antikörpers nahe (siehe hierzu auch Abbildung 3.30). Im Kontrast dazu zeigen r3V-prästimulierte Effektorzellen ein nahezu identisches Verhalten in beiden Fällen (in An- sowie Abwesenheit des r3V im Zytotoxizitätsassay). Die totale Zelllyse steigt in beiden Fällen mit steigender E : T-Ratio deutlich an. Bei r3V-Prästimulation und der Anwesenheit des r3V im Zytotoxizitätsassay (Abbildung 3.31 A geschlossener Rhombus) beträgt die totale Zelllyse bei E : T = 1 etwa 50 % und bei E : T = 30 etwa 70 %.

Vergleichbar dazu beträgt die totale Zelllyse bei r3V-Prästimulation in Abwesenheit des r3V (Abbildung 3.31 B offener Rhombus) bei E : T = 1 etwa 54 % und bei E : T = 30 etwa 65 %. Das Verhalten beider Kurven ist prinzipiell vereinbar mit einer spezifischen zytotoxischen Aktivität des r3V, der mutmaßlich als Folge der Vorinkubation der PBMCs mit r3V noch in hoher Konzentration auf der Oberfläche der Effektorzellen verblieben ist, so dass die erneute Zugabe von r3V im Zytotoxizitätstest offenbar zu keiner weiteren Steigerung der Zytotoxizität führt.

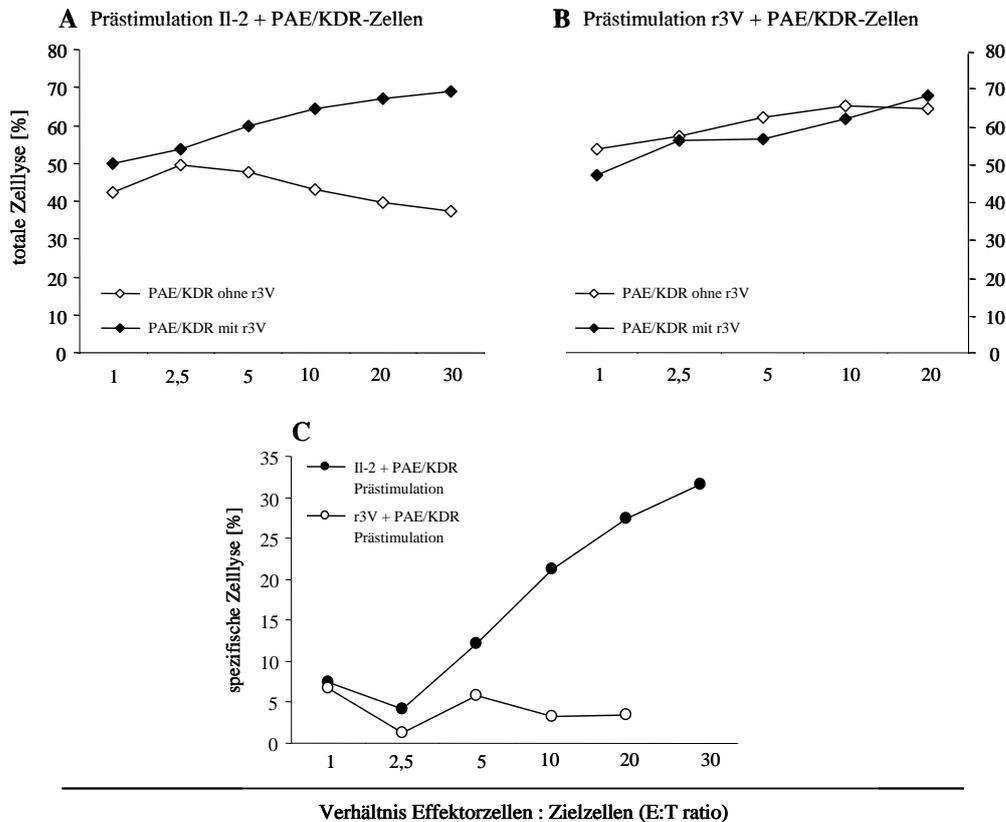


Abbildung 3.31 FACS-Analyse der r3V *bsscFv*-vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Zielzellen Bestimmung der totalen und spezifischen Zelllyse durch Ermittlung der AnnexinV-FITC-einzelpositiven Populationen von Ansätzen verschiedener E : T-Ratios. Applikation des r3V in einer Konzentration von 1 µg/ml. Darstellung der totalen Zelllyse VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Zielzellen. **A** nach Inkubation mit den CD8-positiven Zellen aus Prästimulationsansatz 1 (Il-2 + PAE/KDR) in Gegenwart (◆) und Abwesenheit (◇) des r3V **B** nach Inkubation mit den CD8-positiven Zellen aus Prästimulationsansatz 2 (r3V + PAE/KDR) in Gegenwart (◆) und Abwesenheit (◇) des r3V **C** Darstellung der spezifischen Zelllyse von PAE/KDR-Zellen aus Prästimulationsansatz 1 (●) und 2 (○) nach Subtraktion der Werte der totalen Zelllyse bei An- und Abwesenheit des r3V aus **A** und **B**

Auffällig ist in der Graphik 3.31 A, dass bereits ein hoher Hintergrund ohne r3V erreicht wird. Dieser resultiert wahrscheinlich daher, dass auch lysierte Effektorzellen in den Wert der totalen Lyse mit eingehen. Wird dies so betrachtet, kann die totale Zelllyse in Abwesenheit des r3V als unspezifischer Effekt gewertet werden.

Wird nun die Differenz, berechnet als Betrag, aus beiden Graphen der Abbildung 3.31 A betrachtet, so ergibt sich die kalkulierte r3V-vermittelte spezifische Lyse VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Zellen von einem maximalen Wert von 30 % bei einer E : T-Ratio von 30 (Abbildung 3.31 C geschlossener Kreis). Somit scheint der bispezifische r3V *scFv* in der Lage zu sein, die durch Il-2-Stimulation rekrutierten potentiellen zytotoxischen Effektorzellen erfolgreich gegen die PAE/KDR-Zielzellen zu richten (Abbildung 3.31 C geschlossener Kreis).

Im nächsten Schritt und zur weiteren Kontrolle wurde der gleiche Assay mit VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.32). Im Wesentlichen zeigt die Analyse ein vergleichbares Bild, das die Stimulationsansätze 1 und 2 auf PAE/KDR-Zielzellen zeigen (Abbildung 3.30 A + B). Während die Kokultivierung von CD8-Zellen aus Prästimulation 1 mit PAE/FLT1-Kontrollzellen (Abbildung 3.32 A) einen Unterschied zeigen zwischen Ab- und Anwesenheit des r3V, zeigen die CD8-Effektorzellen aus der Prästimulation 2 (Abbildung 3.32 B) keinen Unterschied in den Ansätzen mit und ohne r3V. Die daraus resultierende spezifische Zelllyse beläuft sich dabei für die PAE/FLT1-Kontrollzellen aus Prästimulation 1 auf etwa 45 % bei einer E : T-Ratio von 30 (Abbildung 3.32 C geschlossener Kreis) und die aus Prästimulation 2 auf etwa 5 % (Abbildung 3.31 C offener Kreis). Unter Betrachtung der subtrahierten Werte als Betrag aus Abbildung 3.32 A des Ansatzes ohne r3V (offener Rhombus) mit dem Ansatz mit r3V (geschlossener Rhombus), resultiert *de facto* eine höhere spezifische Zelllyse von PAE/FLT1-Kontroll- als für PAE/KDR-Zielzellen (Abbildung 3.31 C geschlossener Kreis). Im Vergleich zu der in Abbildung 3.30 dargestellten Zytotoxizitätsanalyse kommt trotz Applikation der isolierten CD8-positiven Effektor-T-Zellen jetzt ein unspezifischer Effekt auf die PAE/FLT1-Kontrollzellen zur Darstellung, ähnlich wie zu Beginn in der pilotierenden mikroskopischen Zytotoxizitätsanalyse (Abbildung 3.29 D). Da in Abbildung 3.30 ein klarer antigenspezifischer zytotoxischer Effekt des r3V-Antikörpers gezeigt werden konnte und zwischenzeitlich signifikante Änderungen am Versuchsaufbau durchgeführt wurden, wie zum Beispiel das Hinzufügen bestrahlter PAE/KDR-Zielzellen während der Prästimulationsphase, sind die Ergebnisse sich nicht ausschließend. Worin jedoch die Ursachen für die hohe Lyse der PAE/FLT1-Kontrollzellen liegen, konnte im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht ergründet werden. Der Vollständigkeit halber werden die Daten hier jedoch dargestellt. Aufgrund der Tatsache, dass bei alleiniger Il-2-Prästimulation der PBMCs keine unspezifischen Effekte auftreten (Abbildung 3.30 B), liegt es nahe, dass bei Il-2-Stimulation mit PAE/KDR-Zielzellen die Ursachen in der Anwesenheit der PAE/KDR-Zellen zu finden sind. Aufschluss dazu sollten weiterführend geplante Untersuchungen mittels eines ⁵¹Cr-Release-Assays geben.

Diese Analysen werden zusätzlich auch die untransfizierten PAE-Ursprungszellen, die zur Herstellung der PAE/KDR- sowie der PAE/FLT1-Zelllinien verwendet wurden, einschließen. Damit könnte geklärt werden, ob die Zelllinie *per se* einen unspezifischen Einfluss auf die Zytotoxizitätsanalysen hat. Dass im Zuge der CD8-Isolation in dem Ansatz 1 der PBMC-Stimulation mittels Il-2 plus PAE/KDR-Zellen trotz einer Reinheit der CD8-positiven Population von 92 % (Daten nicht gezeigt) zusätzlich Zellen in den Zytotoxizitätsanalysen eingehen, die die großen unspezifischen Effekte hervorrufen, erscheint eher unwahrscheinlich.

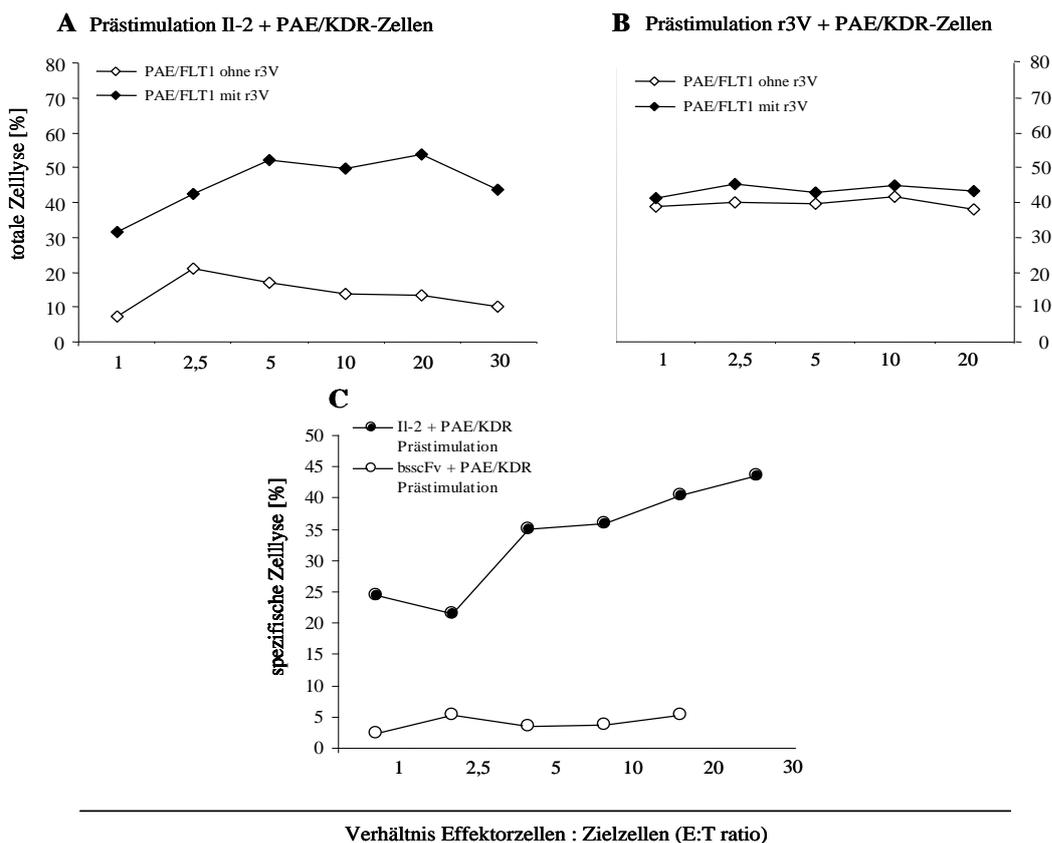


Abbildung 3.32 FACS-Analyse der r3V bsscFv-vermittelten Zytotoxizität VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen Bestimmung der totalen und spezifischen Zellyse durch Ermittlung der AnnexinV-FITC-einzelpositiven Populationen von Ansätzen verschiedener E : T-Ratios. Applikation des r3V in einer Konzentration von 1 µg/ml. Darstellung der totalen Zellyse VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen **A** nach Inkubation mit den CD8-positiven Zellen aus Prästimulationsansatz 1 (Il-2 + PAE/KDR) in Gegenwart (♦) und Abwesenheit (◇) des r3V **B** nach Inkubation mit den CD8-positiven Zellen aus Prästimulationsansatz 2 (r3V + PAE/KDR) in Gegenwart (♦) und Abwesenheit (◇) des r3V **C** Darstellung der spezifischen Zellyse von PAE/FLT1-Kontrollzellen aus Prästimulationsansatz 1 (●) und 2 (○) nach Subtraktion der Werte der totalen Zellyse bei An- und Abwesenheit des r3V aus **A** und **B**

3.7.6 Analyse der Fähigkeit des bispezifischen r3N *scFv*-Antikörpers zytotoxische Effektorzellen zu rekrutieren und NCAM⁺ IMR5-Zellen zu eliminieren

Die Analyse der r3N-vermittelten Zytotoxizität durch Rekrutierung von Effektorzellen wurde entsprechend, wie in Abschnitt 3.7.5 dargestellt, durchgeführt. Zum einen wurden PBMCs mit Il-2 und NCAM-positiven IMR5-Zielzellen prästimuliert und zum anderen mit dem r3N und den NCAM-positiven IMR5-Zielzellen. Die Zytotoxizitätsanalyse erfolgte auch hier mittels Koinkubation der aus den Prästimulationsansätzen isolierten CD8-positiven T- und den PKH26-markierten Zielzellen. Ausgewertet wurden die Ansätze mittels FACS und die AnnexinV-FITC-einzelpositive Zellpopulation wurde zur Kalkulation der totalen und spezifischen Zelllyse herangezogen. Analog zu der Darstellung der Ergebnisse für den r3V in Abbildung 3.31, sind die Ergebnisse für den r3N in der graphischen Darstellung der Abbildung 3.33 zusammengefasst.

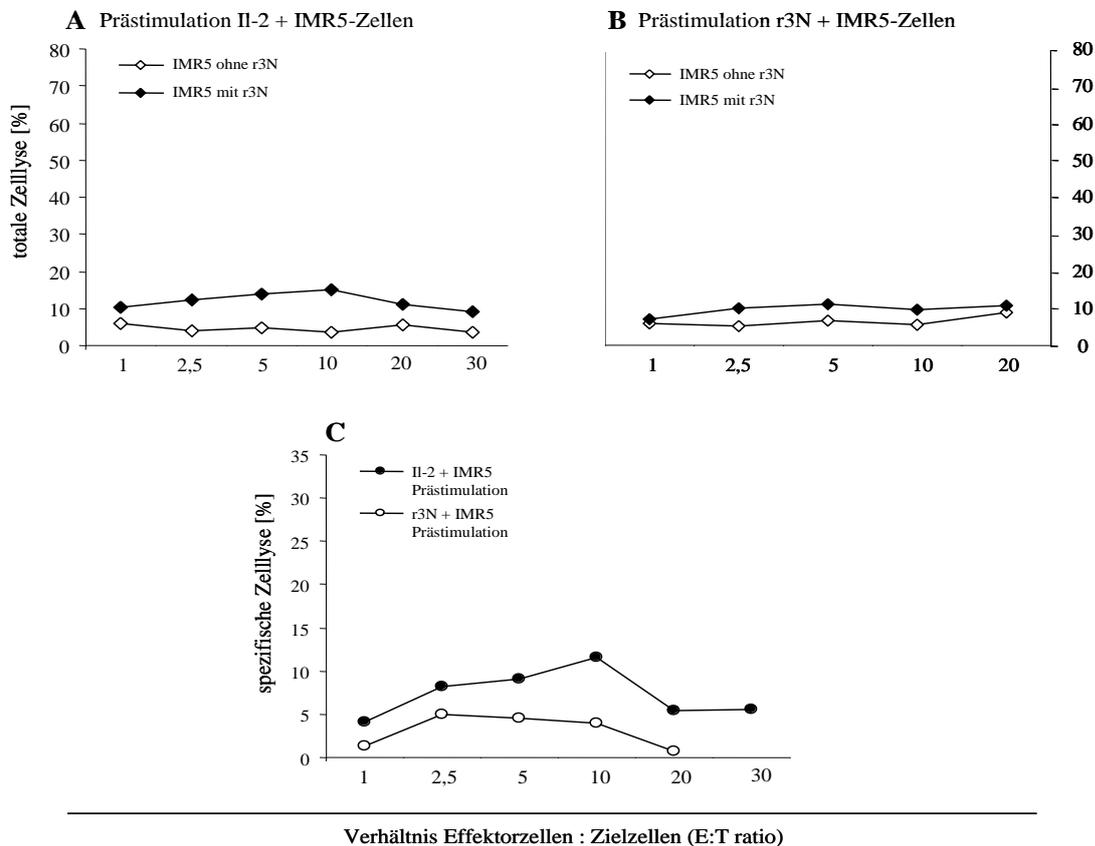


Abbildung 3.33 FACS-Analyse der r3N *bsscFv*-vermittelten Zytotoxizität NCAM-positiver IMR5-Zielzellen
Bestimmung der totalen und spezifischen Zelllyse durch Ermittlung der AnnexinV-FITC-einzelpositiven Populationen von Ansätzen verschiedener E : T-Ratios. Applikation des r3N in einer Konzentration von 1 µg/ml. Darstellung der totalen Zelllyse NCAM-positiver IMR5-Zielzellen **A** nach Inkubation mit den CD8-positiven Zellen aus Prästimulationsansatz 1 (Il-2 + IMR5) in Gegenwart (◆) und Abwesenheit (◇) des r3N **B** nach Inkubation mit den CD8-positiven Zellen aus Prästimulationsansatz 2 (r3N + IMR5) in Gegenwart (◆) und Abwesenheit (◇) des r3N **C** Darstellung der spezifischen Zelllyse von IMR5-Zielzellen aus Prästimulationsansatz 1 (●) und 2 (○) nach Subtraktion der Werte der totalen Zelllyse bei Abwesenheit des r3N aus **A** + **B**

In beiden Abbildungen 3.33 A und B kommt zum Ausdruck, dass bei der Analyse der zytotoxischen Effekte der CD8-Zellen aus Prästimulation 1 und 2 auf NCAM-positive IMR5-Zielzellen keine Unterschiede in den Ansätzen mit (geschlossener Rhombus) und ohne r3N (offener Rhombus) zu erkennen sind und die totale Zelllyse insgesamt mit einem maximalen Wert von etwa 10 % sehr niedrig ausfällt. Dieser Effekt spiegelt sich auch in der spezifischen Zelllyse wider (Abbildung 3.33 C), die entsprechend gering und vergleichbar ausfällt wie die totale Zelllyse, und die dabei unabhängig von der Art der PBMC-Prästimulation ist. Somit zeigt der bispezifische r3N *scFv*-Antikörper keinen erkennbaren spezifischen zytotoxischen Effekt auf NCAM-positive IMR5-Zielzellen. Der Versuch konnte jedoch leider nicht, wie schon zuvor in Abbildung 3.28 beklagt, mit der anzunehmenden optimalen Antikörperkonzentration (etwa 10 µg/ml oder darüber) durchgeführt werden. Der Einsatz höherer Konzentrationen in dieser Zytotoxizitätsstudie, die für die Evaluierung des r3N vonnöten wären, war experimentell, aufgrund limitierender Proteinmengen und aufgrund des Zeitfaktors, in dieser Arbeit nicht durchführbar.

4 Diskussion

4.1 Bewertung der Relevanz rekombinanter bispezifischer *scFv*-Antikörper

Die Nachfrage an rekombinanten Antikörpern für die klinische Anwendung ist groß und die vielfältigen wissenschaftlichen Studien belegen die Bemühungen, dieses Ziel umzusetzen. Da konventionelle Chemotherapie nicht nur mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden ist, sondern auch in der Behandlung von therapieresistenten, stark metastasierenden oder nicht-resektierbaren Tumoren an ihre Grenzen stößt, wird den rekombinanten Antikörpern und insbesondere auch den kleinen bispezifischen Formaten zukünftig eine wesentliche Rolle zukommen. Einige Arbeiten beschreiben die Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern im bispezifischen *scFv*-Format, die gegen ein T-Zell- sowie ein Tumorantigen gerichtet sind (Mack et al. 1995, Löffler et al. 2000, Kriangkum et al. 2000). Dass rekombinante Antikörper dieser Art in der klinischen Forschung an Bedeutung gewonnen haben, zeigt sich in Bestrebungen, wie der Firma Micromet, aus den bereits in der Therapie angewandten monoklonalen Antikörpern, wie zum Beispiel Cetuximab oder Trastuzumab, bispezifische CD3 x TAA *scFv*-Formate für den klinischen Einsatz zu generieren (Lutterbüse et al. 2008). Zudem befindet sich unter den FDA-genehmigten Studien bereits ein bispezifischer *scFv* in Form des r28M (Grosse-Hovest et al. 2003) in der klinischen Phase I. Dieser Antikörper ist gegen das humane T-Zellantigen CD28 und das humane Melanomaantigen HMV-MAA gerichtet und soll für die Behandlung von metastasierendem und nicht-resektierbarem Melanoma eingesetzt werden (www.clinicaltrials.gov). Diese Tatsache bringt klar zum Ausdruck, dass der Weg bis zur Klinik realisierbar ist und dazu auffordert, verstärkt rekombinante bispezifische Antikörper gegen geeignete Tumorantigene herzustellen und zu charakterisieren, um potentielle Kandidaten in den Prozess der klinischen Studien führen zu können.

4.2 Bewertung der Evaluierung der *E. coli*- sowie der Säugetierexpressionssysteme

Da die Expression von *single chain* (*scFv*), bispezifischen *scFv* (*bsscFv*) und *diabody*-Antikörpern ein etabliertes Verfahren ist und die entsprechenden Voraussetzungen der experimentellen Durchführung gegeben waren, wurde die Expression der *scFv*-Antikörper OKT-3, ERIC-1 und D29 sowie der *diabody*-Antikörper OKT-3 x ERIC-1 und UCHT-1 x A7 zunächst im prokaryotischen System exprimiert. Der *diabody* UCHT-1 x D29 wurde aufgrund von Klonierungsproblemen nicht in *E. coli* exprimiert. Mit Hilfe des pCANTAB5E-Vektors, der aufgrund eines *gen3*-Leaders für die periplasmatische Expression kleiner rekombinanter Antikörper einsetzbar ist, wurden die oben genannten Konstrukte in den nicht-supprimierenden *E. coli*-Stamm HB2151 transformiert und nach IPTG-Induktion des LacZ-Promotors zur Antikörperproduktion die Proteine isoliert.

Wie die einzelnen Analysen der Proteinexpression zeigen, konnten die Antikörper *scFv* OKT-3 (Abbildung 3.3), *diabody* UCHT-1 x A7 (Abbildung 3.8) und *scFv* D29 (Abbildung 3.11) deutlich im Periplasma exprimiert werden. Im Gegensatz dazu war die Expression der Antikörper *scFv* ERIC-1 und *diabody* OKT-3 x ERIC-1 (Abbildung 3.3) nicht erfolgreich. Mögliche Ursachen werden im Weiteren in Abschnitt 4.3 kommentiert. Probleme, die mit der zu Säugetierzellen unterschiedlichen Codonverwertung auftreten können und eine Expression in *E. coli* erschweren oder verhindern, scheinen für die beschriebenen Konstrukte nicht relevant zu sein. Die verwendeten Produktionsbedingungen führten zu einer ausschließlichen periplasmatischen Proteinexpression. Darin liegt der Vorteil, dass die Antikörper im Periplasma, sofern keine Faltungsprobleme auftreten, in ihrer nativen Struktur und somit funktional vorliegen. Dies ist bei einer zytoplasmatischen Expression, wo eine Renaturierung des Proteins vonnöten ist, die mit großen Mengenverlusten und einem hohen Anteil an nicht aktivem Protein verbunden sein kann, nicht ohne Weiteres gegeben. Auch wenn die Proteine deutlich im Periplasma nachweisbar waren, so ist die erzielte Gesamtproteinmenge, vor allem der *diabody*-Antikörper, sehr gering und unter den normalen Laborbedingungen war eine erfolgreiche Aufreinigung mittels einer E-Tag-Affinitätssäule nicht umsetzbar. Da die Expression in *E. coli* transientser Natur ist, sind fermentationsähnliche Kulturbedingungen nötig, um entsprechende Mengen an rekombinantem Protein zu gewinnen. Alternativ ließe sich möglicherweise mehr Material durch eine lösliche Expression in den Überstand gewinnen. Dennoch ist die periplasmatische Antikörperproduktion für die Analyse der Proteinexpression geeignet und auch die Bindung der Antikörper kann mittels der Periplasmafraktion gut evaluiert werden (Abbildung 3.13 und 3.15). Entsprechend der Antikörperexpression in *E. coli* ist die transiente Produktion von Antikörperproteinen in Säugetierzellen nur für Expressionsstudien sinnvoll anwendbar. Für die ausreichende Produktion der bispezifischen Antikörper zur Aufreinigung und funktionalen Analyse ist daher eine stabile Expression in Säugetierzellen unerlässlich. Im Gegensatz zu den im Rahmen des Kooperationsprojekts parallel generierten bispezifischen *scFv*-Antikörpern r3V (Klon UCHT-1 x A7) und r3N (Klon UCHT-1 x D29), die in Sp2/0-Myelomazellen exprimiert wurden, erfolgte die Expression der korrespondierenden *diabody*-Antikörper stabil in BHK21-Zellen. Neben CHO-Zellen werden BHK-Zellen üblicherweise zur stabilen Produktion von Proteinen verwendet. Die Expression der Antikörper erfolgte mit Hilfe des eukaryotischen pSecTaq/HygroA-Vektors, der einen IgG κ -Leader besitzt und für die sekretorische Produktion von löslichen Antikörpern einsetzbar ist.

Wie die Daten zur Proteinexpression der stabilen *diabody*-Klone zeigen, ist dieses System erfolgreich einsetzbar (Abbildung 3.9 und 3.12). Im Zuge einer Anzucht der Klone sollte eine ausreichende Menge an Protein produziert und aufgereinigt werden können. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter evaluiert, da die bispezifischen *scFv*-Klone r3V und r3N frühzeitig zur Produktion verwendet werden konnten. Die Evaluierung von aufgereinigten Antikörpern hinsichtlich ihrer Bindung und funktionalen Eigenschaften blieb daher auf diese Formate beschränkt. Die r3V und r3N *scFv*-Antikörper wurden für die Produktion mittels eines für die stabile Expression in Sp2/0-Myelomazellen zugeschnittenen Vektorsystems generiert (Labor Dr. Grosse-Hovest). Da diese Zellen zur Herstellung von Hybridomazelllinien verwendet werden, eignet sich dieses System sehr effizient für die Herstellung rekombinanter Antikörper. Der Vorteil der Verwendung von Myelomazellen gegenüber den BHK21-Zellen liegt dabei darin, dass die Zellen in Suspension mit nur leichter Adhärenz wachsen. So können die stabilen Antikörperklone einfacher gehandhabt und zudem kann vergleichend eine höhere Zellmenge zur Produktion als mittels der ausgewiesenen adhärennten BHK21-Zellen erzielt werden. Die Antikörperexpression in Myelomazellen scheint somit das bessere eukaryotische System von beiden darzustellen.

4.3 Gegenüberstellung der anti-NCAM *scFv*-Antikörper ERIC-1 versus D29

In einem initialen Forschungsprojekt wurde der monoklonale bispezifische CD3 x NCAM-Antikörper OE-1 (Klon OKT-3 x ERIC-1) mittels Tetradomatechnologie hergestellt und erfolgreich charakterisiert (Jensen *et al.* 2003). Aus dieser Ausgangssituation heraus ist die Hypothese entstanden, mittels eines kleinen rekombinanten bispezifischen Formats, das die obengenannten Klone als Ausgangsmaterial verwendet, einen Antikörper herzustellen, der in seinen Eigenschaften dem parentalen vergleichbar und in einer relevanten therapeutischen Anwendung optimierbarer einsetzbar ist. Demzufolge wurde neben dem anti-CD3 *scFv* (Klon OKT-3), der vielfach in rekombinanten Formaten verwendet wird, der anti-NCAM *scFv* (Klon ERIC-1) als Fusionspartner hergestellt. Unerwarteterweise war der ERIC-1 als *scFv* nicht hinreichend exprimierbar (Abbildung 3.3, 3.4 und 3.5), womit die Expression des bispezifischen OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers entsprechend nicht realisierbar war (Abbildung 3.3 und 3.6). Die Expression des ERIC-1 *scFv* als lösliches Protein konnte weder in *E. coli* noch in BHK21-Zellen nachgewiesen werden. Da die verwendeten Expressionssysteme für die Antikörper, die nicht ERIC-1-Antikörper oder damit hergestellte Fusionsprodukte waren, gut funktioniert haben, ist ein problembehaftetes Expressionssystem auszuschließen.

Auch eine durch die *E. coli*-Codonverwertung beeinträchtigte Expression scheint aufgrund dessen unwahrscheinlich. Offensichtlich ist, dass der stabil in BHK21-Zellen exprimierte *scFv* ERIC-1 und der *diabody* OKT-3 x ERIC-1 nachgewiesenermaßen auf transkriptioneller Ebene exprimiert werden (Abbildung 3.5 und 3.6), und somit das Problem wahrscheinlich in der Expression von löslichem Protein zu sehen ist. Denkbar ist, dass das Protein aufgrund des eingesetzten Expressionsvektors, der für die Sekretion von Antikörpern entwickelt ist, zwar sekretiert wird, aber dies in einem zu geringen Maße erfolgt. In Anlehnung daran, dass intrazellulär Antikörperprotein mittels Immunfluoreszenz nachweisbar ist (Abbildung 3.4 A), kann ebenfalls vermutet werden, dass ein großer Anteil an Antikörperprotein intrazellulär akkumuliert und/oder abgebaut wird.

Die Ursachen für dieses Phänomen wurden experimentell nicht eingehender analysiert, da das Ziel der Arbeit in der Herstellung funktionaler bispezifischer Antikörper bestand. Außerdem untermauerten parallele, von Kommilitaden durchgeführte Expressionsstudien, bei dem der ERIC-1 *scFv* Bestandteil war, dass es sich um ein fundamentales und klonspezifisches Problem handelt und der Klon als solcher nicht erfolgreich einsetzbar ist. Zusätzlich zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Analysen, zeigte auch die von Dr. Grosse-Hovest durchgeführte Herstellung und stabile Expression eines bispezifischen *scFv*-Antikörpers rOKTN (Klon OKT-3 x ERIC-1) keinen Erfolg. Zwar konnten stabil transfizierte *scFv*-Klone selektiert werden, aber die Analyse der Klone in einer Evaluierung auf CD3-positiven Jurkatzellen ergab keine signifikante Bindung (*Grosse-Hovest, persönliche Mitteilung*). Interessanterweise ergab aber auch die Selektion von bispezifischen *scFv*-Klonen rOKTM, bei denen der OKT-3 *scFv* mit dem gut funktionierenden anti-Melanoma *scFv*, wie er im rM28 (siehe Abschnitt 4.1) vorliegt, fusioniert wurde, ebenfalls keine erfassbare Bindung. Offensichtlich erweisen sich beide *scFv*-Klone, ERIC-1 sowie OKT-3, als ungeeignet für die Herstellung bispezifischer Antikörper dieses Formats. Ein möglicher Grund für die Bindungsineffektivität des OKT-3 *scFv* wird im folgenden Abschnitt 4.4 behandelt. In einem Parallelprojekt innerhalb der Arbeitsgruppe wurde der ERIC-1 *scFv* als auch der humanisierte anti-NCAM *scFv* (Klon D29) als intrazellulärer Antikörper (*intrabody*) kloniert und analysiert. Interessanterweise konnte für den ERIC-1 auch hier, weder in der Immunfluoreszenz noch im Westernblot, eine Proteinexpression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war der D29 *intrabody* sehr gut exprimierbar und auch funktional (*Galina Sergeev, Diplomarbeit 2008*). Dies stimmte mit der Erwartung der erfolgreichen Expression und Bindung von D29-Derivaten, wie sie aus der Arbeit zur Herstellung und Charakterisierung des D29 *scFv* abzuleiten war, (*Whittington et al. 2001*) überein. Da der humanisierte D29 mittels *CDR grafting* aus dem ERIC-1 *scFv* hervorgegangen ist, bleibt es überraschend, dass der ERIC-1 *scFv* stark problembehaftet ist und diese Probleme nicht einfach zu lösen sind.

Aufgrund der beschriebenen Studien von *scFv* ERIC-1-Derivaten, die von verschiedenen Komitarbeitern durchgeführt wurden und nicht den erwünschten Erfolg zeigten, lag es schlussfolgernd nahe, den ERIC-1 zu ersetzen. Dementsprechend wurde, nachdem der humanisierte D29 *scFv*-Klon durch die freundliche Aushändigung durch Dr. David Gilham zur Verfügung stand, alternativ als Fusionspartner eingesetzt. Dieser Klon lag in einem viralen Expressionskonstrukt vor und konnte nach Reamplifizierung und notwendiger Mutagenese zur Eliminierung von zwei Punktmutationen erfolgreich in *E. coli* exprimiert und das *scFv*-Protein im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Zusätzlich wurde auch die Bindung des Antikörpers an NCAM-positive TE671- und IMR5-Zellen klar reproduziert (Abbildung 3.15). Die Expressions- und Bindungsanalysen des D29 *scFv* sind als notwendige Kontrolle nach Mutagenese und zum Vergleich mit dem ERIC-1 *scFv* in die vorliegende Arbeit mit eingeflossen.

4.4 Gegenüberstellung der anti-CD3 *scFv*-Antikörper OKT-3 versus UCHT-1

In Anlehnung an den parentalen bispezifischen Vergleichsantikörper OE-1 wurde der anti-CD3 *scFv* (OKT-3) initial auch zur Herstellung des bispezifischen OKT-3 x ERIC-1 *diabody*-Antikörpers eingesetzt. Aufgrund der unzureichenden Exprimierbarkeit des *scFv* ERIC-1 in *E. coli* als auch BHK21-Zellen wurde für die Fortführung des Projekts eine Entscheidung zugunsten des gut exprimierbaren humanisierten D29 *scFv* getroffen. Da gleichzeitig ein humanisierter anti-CD3 *scFv* (Derivat des murinen UCHT-1-Antikörpers) verfügbar war, wurde dieser nun anstelle des OKT-3 *scFv*, mit dem Ziel einen vollständig humanisierten bispezifischen Antikörper zu generieren, eingesetzt

Der humanisierte *scFv* UCHT-1 hat zwei Vorteile gegenüber dem OKT-3-Klon. Erstens ist er aufgrund der Humanisierung therapeutisch relevanter für die Anwendung am Menschen und zweitens zeigt er eine deutlich bessere Bindungsaffinität als der OKT-3 *scFv*. Der OKT-3 *scFv*-Klon, wie er in Anlehnung an die Arbeit von *Kipriyanov et al. 1997* hergestellt und verwendet wurde (Klon Q,C), zeigt in den Studien derselben Arbeit erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml ein Bindungsverhalten im Sättigungsbereich. In Korrelation dazu ist in einer weiteren Arbeit zu einem CD3 x CD19 *diabody* (*Kipriyanov et al. 1998*) eine deutliche Bindung der anti-CD3-Domäne des OKT-3 bei einer Antikörperkonzentration von 50 µg/ml dokumentiert. Der UCHT-1 *scFv* zeigt im Gegensatz dazu bereits ab einer Konzentration von 1 - 10 µg/ml ein Bindungsverhalten im exponentiellen sowie im Sättigungsbereich (Abbildung 3.20 und 3.22), und es ist von einer höheren Bindungsaffinität auszugehen. Die Bindungsanalysen (Daten nicht gezeigt) des in der vorliegenden Arbeit in *E. coli* exprimierten OKT-3 *scFv* im Zellkulturüberstand (Abbildung 3.3 A) deuteten ebenfalls auf eine verhältnismäßig niedrige Bindungsaffinität hin.

Während für die FACS-Bindungsanalyse des UCHT-1 *scFv* die üblicherweise eingesetzte Menge von 200 µl Kulturüberstand ausreichte, um eine klare Bindung zu erzielen, mußte für den OKT-3 *scFv* die 50-fache Menge Zellkulturüberstand eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Der OKT-3 x ERIC-1 *diabody* konnte leider hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften aufgrund der unzureichenden Proteinexpression nicht evaluiert werden.

Da weitere Publikationen existieren, in denen der OKT-3 *scFv* erfolgreich für die Generierung funktionaler *diabody*-Antikörper beschrieben wird (*Hayashi et al. 2004*), ist der OKT-3 *scFv* jedoch generell für die Generierung von *diabody*-Antikörpern geeignet. Da aufgrund der beschriebenen Vorteile im Laufe des Projekts jedoch die Entscheidung zur Herstellung der bispezifischen Formate zugunsten des UCHT-1 *scFv* ausfiel, ist auf weitere Analysen mit dem OKT-3 *scFv* und davon abgeleiteten Derivaten verzichtet worden.

4.5 Bewertung des bispezifischen r3V *scFv*-Antikörpers und seiner therapierelevanten Einsatzmöglichkeiten

Da rekombinante bispezifische Antikörper zur Anwendung für die antiangiogenetische Immuntherapie in dieser Form in der Literatur bisher nicht zu finden sind, wird hier ein neu entwickelter Antikörper beschrieben, der hinsichtlich seiner *In-vitro*-Eigenschaften in einem VEGFR-2-überexprimierenden PAE/KDR-Zellkulturmodell charakterisiert worden ist. Analysen des aufgereinigten Proteins mittels nicht-denaturierender SDS-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung zeigen, dass der Antikörper als rein monomeres Molekül mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kD vorliegt (Abbildung 3.19 A). Dieser Befund konnte nach Durchführung einer analytischen Gelfiltration bestätigt werden (*Dr. Grosse-Hovest, persönliche Mitteilung*). Auch da lag die Hauptfraktion des Proteins monomer vor. Nur ein sehr kleiner Anteil des analysierten Proteins war dimeren Charakters. Die Fragestellung, ob der bispezifische Antikörper als Monomer oder Dimer vorliegt, ist von starker Relevanz in Bezug auf *In-vitro*-Versuche, da dimer- oder multimer vorliegenden Antikörper zu einer Quervernetzung von Leukozytenoberflächenantigenen führen und mitunter eine spontane Effektorzellaktivierung induzieren kann, auch in Abwesenheit von Targetzellen. Der Effekt, dass Dimere eine effektivere Stimulation von PBMCs (hier in Anwesenheit der Melanoma-Zielzellen) aktivieren können, ist am Beispiel des CD3 x HMV-MAA-Antikörpers rM28 beschrieben worden (*Grosse-Hovest et al. 2003*).

Die Bindungseigenschaften des r3V-Antikörpers wurden im FACS an CD3-positive Jurkat- und VEGFR-2-positive PAE/KDR-Zellen analysiert.

Für beide Bindungsseiten zeigt sich eine Sättigungskinetik (Abbildung 3.20) bereits im Bereich von 1 - 10 µg/ml, was eine ausreichende Bindungsaffinität anzeigt. Eine exakte Bestimmung der Dissoziationskonstanten, durch zum Beispiel Plasmonresonanz, wurde nicht durchgeführt. Der Befund für die anti-VEGFR-2-Domäne (Abbildung 3.20 A) korreliert dabei gut mit Untersuchungen zu einem bispezifischen *scFv*-Antikörper, bei dem der anti-VEGFR-2 *scFv* (Klon A7) als Fusionspartner mit einem anti-CD28 *scFv* verwendet wurde (Lothar Dieterich, *Diplomarbeit 2006*). Der beschriebene r28V liegt dabei im gleichen Vektor- und Expressionssystem vor wie der r3V und der Vergleich verweist auf reproduzierbare Bindungseigenschaften des Klons A7 in einem bispezifischen *scFv*-Format dieser Art.

Nach erfolgreicher Bindungsanalyse wurde mittels eines BrdU-Proliferationsassays die Fähigkeit des r3V untersucht, humane PBMCs *via* der CD3-Domäne zu aktivieren (Abbildung 3.25 und 3.26). Dafür wurden unterschiedliche Stimulationsbedingungen evaluiert. Zum einen wurden die PBMCs mit dem bispezifischen *scFv* allein und zum anderen in Kombination mit dem monoklonalen anti-CD28-Antikörper 28.2 appliziert. Der bispezifische Antikörper als auch die Kontrollantikörper, monoklonaler UCHT-1 (anti-CD3) und *scFv* A7 (anti-VEGFR-2), wurden in der ersten Untersuchung an die Zellkulturplatte gebunden (Abbildung 3.25) und in einer zweiten löslich in Gegenwart inaktivierter VEGFR-2-positiver PAE/KDR- sowie VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Kontrollzellen (Abbildung 3.26) eingesetzt. Der Antikörper 28.2 wurde in allen Untersuchungen löslich appliziert. Da CD28-Kostimulation die Aktivierung von T-Zellen üblicherweise verstärkt und eine antiapoptotische Funktion ausübt, war es wichtig, den Effekt einer CD28-Kostimulation bei gemeinsamer Applikation mit dem bispezifischen *scFv*-Antikörper zu untersuchen.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist der r3V in der Lage, die Proliferation humaner PBMCs zu aktivieren. Dabei ist auffällig, dass bei gebundenem r3V *bsscFv* (Abbildung 3.25) die Aktivierung einen Plateauwert bei einer Konzentration von 0,1 – 1 µg/ml erreicht und dann wieder abfällt. Offenbar konnte mit der Versuchsanordnung das Proliferationsmaximum erfasst und dargestellt werden. Nach Hinzufügen des anti-CD28-Kostimulus zeigte sich, anders als ursprünglich erwartet, keine weitere Verstärkung der Proliferation. Das mag teilweise an der bereits sehr guten durch den r3V erreichten Proliferation liegen. Der Effekt war jedoch über alle Konzentrationsbereiche des r3V (auch die suboptimalen) zu beobachten, so dass hier vermutlich auch andere Faktoren eine Rolle spielten. Diese Faktoren weiter zu untersuchen lag nicht im Fokus der Arbeit.

In der zweiten Versuchsserie steigt, unter Verwendung von löslichem r3V *bsscFv* und in Gegenwart bestrahlter Zielzellen, die Zellproliferation bei löslicher Applikation des r3V (Abbildung 3.26) progredient mit steigender Konzentration an und erreicht kein Plateau bis einschließlich 100 µg/ml, der höchsten der getesteten Konzentrationen.

Interessant ist, dass, obwohl eine vollständige Rezeptorabsättigung bereits im Bereich von 1 und 10 µg/ml anzunehmen ist, eine optimale Stimulation sogar 1 - 2 logarithmische Stufen höher noch nicht erreicht wurde. In diesem Zusammenhang ist die Überlegung interessant, ob möglicherweise die On/Off-Rate eines anti-CD3-Antikörpers am CD3-Rezeptor die Stimulation von T-Zellen steigert. Eine Steigerung der Konzentration des r3V *bsscFv* über die Sättigungskonzentration hinaus führt automatisch zu einer höheren Konkurrenz der Antikörper um die begrenzte Anzahl von CD3-Rezeptoren, was mutmaßlich zu einer Steigerung der On/Off-Raten durch gegenseitige Verdrängung der Antikörper führen könnte. Allerdings spielen im Rahmen möglicher Erklärungsversuche auch die anwesenden bestrahlten Zielzellen eine Rolle, die durch Sekretion parakriner Faktoren ebenfalls zu einer Steigerung der Proliferation beitragen könnten. Grundsätzlich zeigen die Versuchsergebnisse eine signifikant stärkere PBMC-Proliferation in Anwesenheit VEGFR-2-positiver PAE/KDR-Zellen als bei Anwesenheit VEGFR-2-negativer PAE/FLT1-Zellen, was als starker Hinweis auf eine antigenspezifische Stimulationswirkung des r3V durch Vernetzung von Ziel- und Effektorzellen gewertet wird. Auch in diesem Versuch führte die Kombination mit dem Antikörper 28.2 zu keiner weiteren Steigerung der Proliferation, sondern eher zu einer Inhibition, ähnlich wie in dem zuvor beschriebenen Versuch. Der Befund, dass die Aktivierung der Proliferation der PBMCs durch den bispezifischen r3V *scFv*-Antikörper keiner zusätzlichen CD28-Kostimulation bedarf, steht im Kontrast zu der gut bekannten kostimulatorischen Funktion monoklonaler anti-CD28-Antikörper zur Aktivierung von T-Zellen, für die dieses kostimulatorische Signal eine wichtige Rolle spielt, wie es anhand einer Studie an T-Zellen, die chimäre *scFv*-T-Zellrezeptoren exprimieren, dokumentiert ist (*Hombach et al. 2001*). Darin wird gezeigt, dass die T-Zellproliferation und die Sekretion von IL-2 bei einer CD28-Kostimulation deutlich erhöht ist gegenüber einer CD3-Stimulation alleine. CD28-Kostimulation nimmt möglicherweise bei kleinen rekombinanten bispezifischen CD3 x TAA *scFv*-Antikörperformaten keine wesentliche Rolle ein, wie zum Beispiel auch in einer Studie mit einem *bsscFv*-Antikörper, der gegen Lymphomazellen gerichtet ist, gezeigt wurde (*Dreier et al. 2002*). Für einen anderen bispezifischen gegen Lymphoma gerichteten Antikörper konnte ebenfalls eine optimale Proliferation unstimulierter humaner PBMCs mittels des bscCD19 x CD3 allein gezeigt werden (*Löffler et al. 2000*).

Auffällig ist, dass in einigen Publikationen zu bispezifischen Antikörpern keine direkten Proliferationsdaten gezeigt, sondern ausschließlich Zytotoxizitätsanalysen dokumentiert werden. Da jedoch die Art und Weise der Stimulation humaner PBMCs ausschlaggebend für die zytotoxischen Eigenschaften ist, besteht darin ein unmittelbarer Zusammenhang.

Die Zytotoxizitätsanalysen wurden mittels einer FACS-basierenden Nachweismethode mit PKH26- und AnnexinV-FITC-Färbung durchgeführt. Üblicherweise werden in den meisten Studien 4h-Standard ⁵¹Cr-Release-Assays durchgeführt. FACS-basierende Assays scheinen in der Analyse der *bsscFv*-gekoppelten T-Zell-vermittelten Zytotoxizität bisher weniger häufig angewendet zu werden, sind aber im Vergleich zum ⁵¹Cr-Release hinsichtlich Aussagekraft und Sensitivität gleichwertig einsetzbar (*Fischer und Mackensen 2003*).

Zuerst wurde die Zytotoxizität nach Stimulation der gesamten PBMC-Population mittels des bispezifischen r3V untersucht. Wie die mikroskopische Untersuchung der mit und ohne r3V inkubierten VEGFR-2-positiven PAE/KDR-Zielzellen und der VEGFR-2-negativen PAE/FLT1-Kontrollzellen hervorhebt, zeigt sich unter diesen gewählten Parametern eine klare Zelllyse beider Zelllinien (Abbildung 3.29). Der Befund weist darauf hin, dass vermutlich unspezifische nicht-T-Zell-vermittelte Effekte, zum Beispiel ausgehend von den NK-Zellen, zum Tragen kommen, denn der r3V kann aufgrund seiner Spezifität nur T- und PAE/KDR-Zellen vernetzen. Eine unspezifische Kreuzreaktion des r3V mit den PAE/FLT1-Zellen war aufgrund der deutlich negativen Bindung des r3V (Abbildung 3.22) auszuschließen. Ein ähnliches Phänomen unspezifischer Effekte ist in der Arbeit zum bispezifischen rM28 *scFv*-Antikörper dokumentiert. In einem ⁵¹Cr-Release-Assay wurden SKMel63-Zielzellen mit PBMCs beziehungsweise mit T-Zell-depletierten PBMCs inkubiert. Interessanterweise wurde in beiden Fällen eine vergleichbare spezifische Zelllyse von 45 – 50 % ermittelt (*Grosse-Hovest et al. 2003*), im Sinne einer signifikanten *bystander*-Zellaktivität. Da alleinige NK-Zelldepletion die unspezifische *bystander*-Zytolyse nur teilweise vermindert, wurden in den folgenden Experimenten aus den prästimulierten PBMCs die CD8-positiven T-Zellen mittels MACS isoliert und für Zytotoxizitätsassays gegen PKH26-markierte PAE/KDR-Zielzellen und PAE/FLT1-Kontrollzellen eingesetzt. Die Prästimulation wurde entweder mit Il-2 in Gegenwart von PAE/KDR-Zellen oder alternativ mit dem r3V *bsscFv* in Gegenwart von PAE/KDR-Zellen durchgeführt. Während sich in Abbildung 3.31 A eine deutliche Steigerung der Zytotoxizität durch Hinzugabe des bispezifischen Antikörpers zeigen lässt, findet sich in Abbildung 3.31 B ein gleichermaßen hoher Lysewert für beide Kurven und es lässt sich keine weitere Steigerung der Zytolyse durch Hinzugabe von bispezifischen Antikörper erreichen, obwohl unten den angewendeten Stimulationsbedingungen in anderen Assays eine zuverlässige Aktivierung der T-Zellen gezeigt wurde. Der Befund ist dahingehend zu erklären, dass auf der Oberfläche der T-Zellen noch *bsscFv* r3V aus der vorherigen Stimulationsphase bei vermutlich weitgehender Absättigung der CD3-Moleküle vorliegt und die erneute Hinzugabe von r3V im Zytotoxizitätsassay zu keiner weiteren Steigerung der Zytolyse führt.

Die Werte der spezifischen Lyse bei verschiedenen publizierten bispezifischen Antikörpern unterscheiden sich erheblich von Konstrukt zu Konstrukt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen soll hier kein direkter Vergleich der Stärke der ausgelösten Zytotoxizität erfolgen. Lediglich ein vorsichtiger Blick auf ähnliche rekombinante bispezifische Antikörper wird versucht, um einen groben Anhaltspunkt zu bekommen, ob der r3V, was die zytotoxische Wirkung anbelangt, als eher über- oder unterdurchschnittlich einzustufen ist.

Bei den meisten publizierten bispezifischen *scFv*-Antikörpern werden sowohl Prästimulation als auch zytotoxische Wirkung von dem *bsscFv* allein hervorgerufen und es bedarf keiner zusätzlichen Il-2-Stimulation. Als Beispiel seien hier der bispezifische CD3 x 17-1A *bsscFv*- (*Mack et al. 1995*) und der rM28 *bsscFv*-Antikörper (*Grosse-Hovest et al. 2003*) erwähnt. In einer anderen Arbeit zu einem CD19 x CD3 *bsscFv* (*Löffler et al. 2000*) wurden PBMCs mit 60 U/ml Il-2 stimuliert. Die PBMCs und die Zielzellen wurden für 4 h inkubiert und in einer E : T-Ratio von 10 in Gegenwart von 0,5 µg/ml bispezifischem Antikörper appliziert. Die ermittelte spezifische Lyse beträgt etwa 40 %. Diese Bedingungen kommen den Experimenten zum r3V relativ nah und zeigen tatsächlich auch eine vergleichbar hohe Zelllyse. Ein zum r3V vergleichbares Ausmaß an Zytotoxizität zeigt sich auch in einer Untersuchung mit einem bispezifischen CD3 x CD19 *diabody* (*Cochlovius et al. 2000*). Bei einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml und einer E : T-Ratio von 10 wurde eine spezifische Lyse von etwa 20 % bestimmt. Insgesamt entsteht der Eindruck, dass der r3V bezüglich der zytotoxischen Wirkung in einer vergleichbaren Dimension wie die genannten Vergleichsantikörper einzuordnen ist. Zur zusätzlichen Evaluierung der dualen Bindung des r3V-Antikörpers an CD3- und VEGFR-2-positive Zielzellen kann ein FACS-Bridge-Assay, wie er von *Kriangkum et al.* durchgeführt wurde, in Erwägung gezogen werden. Diese Nachweismethode wird zwar in den wenigsten Arbeiten angewendet, unterstreicht jedoch sehr gut den bispezifischen Charakter des Antikörpers.

Wie in der Einleitung dargestellt ist, ergeben sich 2 Möglichkeiten einer gezielten immuntherapeutischen anti-VEGFR-2-Strategie. Das ist einerseits die gegen den Tumor selbst und andererseits die gegen die Endothelzellen des tumorassoziierten Blutgefäßsystems gerichteten anti-VEGFR-2-Therapie. Die funktionalen Analysen des r3V zeigen eindeutig einen gut funktionsfähigen bispezifischen r3V *scFv*, der weiterführende Analysen rechtfertigt. So wären Untersuchungen in einem *SCID*-Maus-Tumormodell sinnvoll, um die zytotoxische Wirkung unter *In-vivo*-Bedingungen zu bestätigen.

Für einige Neuroblastomzelllinien ist beschrieben, dass VEGFR-2 exprimiert wird (*Langer et al. 2000, Meister et al. 1999*). Da diese Daten lediglich die Genexpression, aber nicht die Proteinexpression dokumentieren, sind weitere Untersuchungen zur Proteinexpression erforderlich. Die direkte Bindung des bispezifischen Antikörpers an VEGFR-2-positive Tumorzellen und VEGFR-2 positive Gefäßendothelzellen würde einen dualen Angriff des bispezifischen Antikörpers im malignen Gewebe ermöglichen. Ein solcher dualer Angriffsweg auf Tumor und versorgende Gefäße wurde bisher nicht beschrieben und stellt ein neues Prinzip dar.

Der Einsatz des bispezifischen r3V-Antikörpers in einem geeigneten antiangiogenetischen Mausmodell stellt eine Herausforderung dar. In Anbetracht dessen, dass der anti-VEGFR-2 *scFv* (Klon A7) das humane Protein mit hoher Spezifität erkennt und nach Meinungen der Autoren (*Böldicke, persönliche Mitteilung*) keine Kreuzreaktion mit dem murinen VEGFR-2-Protein zu erwarten ist, ist der Antikörper als solcher unter einem antiangiogenetischen Aspekt im Mausmodell nicht ohne Weiteres einsetzbar. Da jedoch der Beweis bisher nicht erbracht wurde, dass ausschließlich der humane VEGFR-2 erkannt wird, ist dies ein wichtiger Aspekt, der einer *In-vivo*-Anwendung vorausgehend untersucht werden sollte. Unter dem Gesichtspunkt, dass eine Kreuzreaktivität auszuschließen ist, ist als mögliche *In-vivo*-Studie ein human-VEGFR-2/KDR Knock-in-Modell denkbar, in dem der *vegfr*-Genlocus der Maus mittels zum Beispiel des Cre/LoxP-Systems durch homologe Rekombination mit dem humanen ersetzt und schließlich in der Maus exprimiert wird. Dies hätte die Ausbildung eines vaskulären Systems zur Folge, in dem das humane VEGFR-2-Protein auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Dies könnte eine Grundlage dafür schaffen, dass nach Xenotransplantation von Tumorzellen im Zuge des Wachstums Tumorangiogenese stattfinden kann und die tumoralen Blutgefäße ebenfalls humanes VEGFR-2 exprimieren. Dass die Knock-in-Strategie humaner Gene oder Gensequenzen ein realisierbares Modell für die Evaluierung immuntherapeutischer Strategien darstellt, belegen Studien, in denen basierend auf dieser Technologie, humane Zielproteine stabil in der Maus exprimiert wurden. Dabei wurde in einem Beispiel das Potential von Therapeutika humanen Ursprungs getestet und in einem anderen Fall eine humane immunologische *In-vivo*-Situation simuliert. So ist ein Knock-in-Mausmodell beschrieben, das eine chimäre Form des RANKL exprimiert und das zur *In-vivo*-Funktionsanalyse eines komplett humanen monoklonalen Antikörpers gegen RANKL verwendet wurde (*Kostenuik et al. 2009*). In einer anderen Arbeit wird der Knock-in einer humanisierten C1qA-Kette des Komplementsystems in die Maus beschrieben, die zur verbesserten *In-vivo*-Analyse der Aktivierung von C1 und deren inflammatorischen Wirkung in der Ausprägung der Alzheimer-Erkrankung herangezogen wurde (*Li et al. 2008*).

Ein großes Hindernis in der *In-vivo*-Analyse des r3V liegt sicher in der universellen Expression von VEGFR-2 auf allen Blutgefäßen.

4.6 Bewertung des bispezifischen r3N *scFv*-Antikörpers

Aufgrund der bisher fehlenden Auswahl an geeigneten für die Immuntherapie einsetzbaren neuroblastomassoziierten Antigenen, ist der bispezifische *scFv* r3N ein grundsätzlich sehr interessantes neues Molekül. Die Tatsache, dass es sich dabei um einen doppelt humanisierten Antikörper handelt, verstärkt die Interessenlage zusätzlich. Da komplett humanisierte bispezifische CD3 x NCAM-Antikörper im *scFv*-Format so bisher nicht beschrieben sind, ist die weitere Untersuchung eines solchen Antikörpers auch von grundsätzlichem Interesse. In den bisherigen Untersuchungen zu den stabil exprimierten r3N-Klone blieb der Antikörper etwas hinter den Erwartungen zurück. Die Analyse des aufgereinigten Antikörpers zeigt, dass das Protein des r3N nicht so sauber wie das des r3V gewonnen werden konnte und offensichtlich Aggregate gebildet werden (Abbildung 3.19 B), die vermutlich die Bindung des Antikörpers negativ beeinflussen. Hier besteht weiterer Optimierungsbedarf bezüglich der Aufreinigungsprotokolle.

Interessanterweise ist die anti-CD3-Domäne in ihrer Bindung wenig beeinträchtigt, wie anhand der Titration auf Jurkatzellen zu sehen ist (Abbildung 3.23 A). Der Antikörper zeigt hinsichtlich seiner Bindung an CD3-positive Zellen mit einer einzusetzenden Konzentration von 1 – 10 µg/ml ein vergleichbares Verhalten wie der r3V. Die Bindung der anti-NCAM-Domäne an NCAM-positive TE671-Zellen hingegen ist mit einer einzusetzenden Konzentration von 80 µg/ml deutlich schlechter (Abbildung 3.23 B). Ob die schlechte Bindung an NCAM mit der Bildung von Aggregaten in Zusammenhang steht, konnte innerhalb der Studie nicht eindeutig erfasst werden. Da der *scFv* D29 allein gut exprimiert wird und gut bindet (Abbildung 3.11 und 3.15), ist der Verlust dieser Eigenschaften in einem bispezifischen *scFv*-Format so nicht zu erwarten. Um eindeutig klären zu können, ob die Aggregatbildung für die hier beobachtete weniger gute Affinität verantwortlich ist, wären zusätzliche Analysen erforderlich, die in ihrer Priorität aber sicherlich hinter einer Optimierung der Aufreinigungsprotokolle zurückstehen.

Die relativ niedrige Affinität sowie der Umstand, dass nur begrenzt aufgereinigtes Proteinmaterial vorrätig war, haben die Möglichkeiten für die Experimente zu den funktionalen Eigenschaften stark begrenzt. So konnte die Stimulierung der Proliferation CD56-depletierter PBMCs in Gegenwart der IMR5-Zielzellen nur bis zu einer maximalen Konzentration von 5 µg/ml untersucht und nur in Einzelwerten ermittelt werden (Abbildung 3.28).

Dennoch zeigt sich deutlich, auch im Vergleich zu der Evaluierung mittels gebundenen Antikörpers allein (Abbildung 3.27), dass der r3N in der Lage ist, *via* der anti-CD3-Domäne, die Proliferation von PBMCs zu aktivieren. Daraus kann auf eine funktional intakte anti-CD3-Domäne geschlossen werden. Dass die Stimulation bei Quervernetzung mit den IMR5-Zielzellen genauso hoch ist wie mit den NCAM-neaktiven LS-Zellen (Abbildung 3.28), kann mit der verminderten Bindungsfähigkeit der anti-NCAM-Domäne in Verbindung gebracht werden. Denn je geringer das Maß der Quervernetzung ist, desto geringer ist auch die Stimulationsfähigkeit. Es ist gut vorstellbar, dass bei besserer Bindung ein deutlicher Unterschied zwischen den antigenpositiven und den antigennegativen Zelllinien zu verzeichnen gewesen wäre, wie es bei dem r3V zu erkennen ist (Abbildung 3.26). Es ist auch nicht auszuschließen, dass bei einer Evaluierung höherer r3N-Konzentrationen ein Unterschied ermittelt worden wäre. Augenfällig ist, wie es auch aus der Analyse des r3V hervorgeht, dass die Stimulation durch den r3N unter den gewählten *In-vitro*-Bedingungen keiner Kostimulation mit dem anti-CD28-Antikörper bedarf.

Für die Zytotoxizitätsanalysen gilt ähnliches wie für die Proliferationsstudien. Die tatsächliche Relevanz des Antikörpers konnte nicht ausreichend untersucht werden. So wurde für die Zytotoxizitätsanalyse nur 1 µg/ml r3N eingesetzt, was aufgrund der schlechten Bindung und damit einhergehender schlechter Quervernetzung eine unzureichende Konzentration ist. Höhere Konzentrationen ließen sich jedoch experimentell nicht einsetzen. In Anlehnung an die Bindungsanalysen zum r3N (Abbildung 3.23 B) sind vermutlich Konzentrationen von bis zu 80 µg/ml erforderlich, um eine explizite Quervernetzung von Zielzellen durch Bindung der anti-NCAM-Domäne zu erzielen. Es lassen sich zwei Hypothesen hinsichtlich der Zytotoxizitätsanalyse, die zu keiner deutlichen spezifischen Zellyse führten (Abbildung 3.33), formulieren. Zum einen wäre mittels der Il-2-Stimulation bei Einsatz eines funktionalen r3N ein zum r3V vergleichbarer Effekt zu erwarten gewesen. Dies läßt sich jedoch nicht zeigen, da anzunehmen ist, dass im Zuge der Il-2-Gabe zwar CD8-positive Effektorzellen rekrutiert wurden, diese aber nicht vernetzt werden konnten. Zum anderen kann vermutet werden, dass im Falle der *bsscFv*-Stimulation in Gegenwart der IMR5-Zielzellen durch unzureichende Quervernetzung durch den r3N bereits die Rekrutierung von Effektorzellen beeinträchtigt war. So bleiben die Fragestellungen zu der Fähigkeit des r3N, zytotoxische T-Zellen zu rekrutieren und diese gegen NCAM-positive Tumorzellen zu richten, weiterhin offen. Damit kann das mögliche Potential des Antikörpers bisher nicht klar bestimmt werden. Dass der rekombinante bispezifische CD3 x NCAM-Antikörper ein zu anderen Antikörpern vorteilhaftes und einzigartiges Potential haben kann, geht aus den Daten zu dem bispezifischen Parentalantikörper OE-1 hervor (*Jensen et al. 2003*).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von CD56-depletierten PBMCs, denen definierte Mengen an angereicherten NK-Zellen in steigenden Konzentrationen beigemischt wurden, durch den bispezifischen Antikörper signifikant gegenüber der Stimulation mit dem monoklonalen OKT-3 und dem ERIC-1 erhöht war. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit dem bispezifischen OE-1 zur Expansion CD4- und CD8-positiver Effektorzellen führte und die Subpopulationen in der Analyse auf Memory-T-Zellmarker positiv getestet werden konnten.

4.7 Fazit und Perspektiven

Mit dem bispezifischen CD3 x VEGFR-2 *scFv*-Antikörper r3V (Klon UCHT-1 x A7) liegt ein neu beschriebener und funktionaler Antikörper vor, der gutes Potential zur Weiterentwicklung und Charakterisierung bietet. Die Analyse der hier gezeigten funktionalen Proliferations- und Zytotoxizitätsdaten zur Verifizierung mittels anderer Nachweismethoden wie ³H-Thymidin-Inkorporation und ⁵¹Cr-Release-Assay sind unterstützend von Wert und bereits in Planung. Die funktionalen Untersuchungen werden aktuell bereits in der Arbeitsgruppe *Grosse-Hovest* weitergeführt. Zudem liegt korrespondierend zum r3V ein stabil exprimierter und bindungsfähiger UCHT-1 x A7 *diabody*-Antikörper vor, der für zukünftige Funktionsanalysen herangezogen werden kann.

Auch der bispezifische CD3 x NCAM *scFv*-Antikörper r3N (Klon UCHT-1 x D29) sowie der korrespondierende *diabody*-Antikörper bieten die Voraussetzungen für weitere funktionale Untersuchungen, die erfolgen sollten, damit das im Vergleich zum r3V-Antikörper bisher weniger gut charakterisierte funktionelle Potential besser abgeschätzt werden kann.

5 Literaturverzeichnis

BAEUERLE PA, KUFER P, BARGOU R. BiTE: Teaching antibodies to engage T cells for cancer therapy. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2009; 11(1): 22-30

BARBACID M. Neutrophic factors and their receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 1995; 7: 148-155

BEAUDRY P, NILSSON M, RIOTH M, PROX D, POON D, XU L, ZWEIDLER-McKAY P, RYAN A, FOLKMAN J, RYEOM S, HEYMACH J. Potent antitumor effects of ZD6474 on neuroblastoma via dual targeting of tumor cells and tumor endothelium. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7 (2): 418-424

BERTHOLD F, BOOS J, BURDACH S, ERTTMANN R, HENZE G, HERMANN J, KLINGEBIEL T, KREMENS B, SCHILLING FH, SCHRAPPE M, SIMON T, HERO B. Myeloablative megatherapy with autologous stem cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: A randomised controlled trial. *Lancet Oncology* 2005; 6 (9): 649-658

BÖLDICKE T, TESAR M, GRIESEL C, ROHDE M, GRÖNE HJ, WALTENBERGER J, KOLLET O, LAPIDOT T, YAYON A, WEICH H. Anti-VEGFR-2 scFvs for cell isolation. Single-chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34⁺ cells from cord blood. *Stem Cells* 2001; 19:24-36

BÖLDICKE T, WEBER H, MUELLER PP, BARLEON B, BERNAL M. Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *Journal of Immunological Methods* 2005; 300: 146-159

BONGARTZ D, FISCHER T, JENSEN M, ZIMERMANN BM, BERTHOLD F, SCHICHA H, SCHOMÄCKER K. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Radioimmuntherapie des Neuroblastoms mit dem I-131-markierten anti-NCAM-Antikörper ERIC-1. *Nuklearmedizin* 2008; 47: A46

BOURNE SP, PATEL K, WALSH F, POPHAM CJ, COAKHAM HB, KEMSHEAD JT. A monoclonal antibody (ERIC-1), raised against retinoblastoma, that recognizes the neural cell adhesion molecule (NCAM) expressed on brain and tumours arising from the neuroectoderm. *Journal of Neurooncology* 1991; 10: 111-119

BOWN N, COTTERILL S, LASTOWSKA M, O'NEILL S, PEARSON ADJ, PLANTAZ D, MEDDEB M, DANGLLOT G, BRINKSCHMIDT C, CHRISTIANSEN H, LAUREYS G, SPELEMAN F. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340: 1954-1961

BRODEUR GM, SEEGER RC, SCHWAB M, VARMUS HE, BISHOP JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224: 1121-1124

BRODEUR GM, NAKAGAWARA A, YAMASHIRO DJ, IKEGAKI N, LIU X, AZAR CG, LEE CP, EVANS AE. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastoma. *Journal of Neurooncology* 1997; 31: 49-55

- BRÜGGEMANN M, CASKEY HM, TEALE C, WALDMANN H, WILLIAMS GT, SURANI MA, NEUBERGER MS. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1989; 86 (17): 6709-6713
- BURG MA, HALFTER W, COLE GJ. Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: Characterization of a heparan sulfate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule. *Journal of Neuroscience Research* 1995; 41: 49-64
- BURGES A, WIMBERGER P, KÜMPER C, GORBOUNOVA V, SOMMER H, SCHMALFELDT B, PFISTERER J, LICHINITSER M, MAKHSON A, MOISEYENKO V, LAHR A, SCHULZE E, JÄGER M, STRÖHLEIN MA, HEISS MM, GOTTWALD T, LINDHOFER H, KIMMIG R. Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: A Phase I/II Study. *Clinical Cancer Research* 2007; 13 (13): 3899-3905
- CARON H, an SLUIS P, de KRAKER J, BÖKKERINK J, EGELER M, LAUREYS G, SLATER R, WESTERVELD A, VOUTE PA, VERSTEEG R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine* 1996; 334: 225-230
- CHEUNG NK, YEH SD, GULATI S, LaQUALIGA M, BURCH L, KUSHNER BH, LARSON S. 131I-3F8: Clinical validation of imaging studies and therapeutic applications. *Progress in Clinical Biological Research* 1991; 366: 409-515
- CHEUNG NK and YU AL. Immunotherapy of neuroblastoma. In BRODEUR GM, SAWADA T, TSUCHIDA Y *et al.* eds. *Neuroblastoma, First Edition*. Amsterdam: Elsevier Science 2000: 541-560
- CHEUNG NK, KUSHNER BH, KRAMER K. Monoclonal antibody-based therapy of neuroblastoma. *Hematology/Oncology Clinics North America* 2001; 15: 853-866
- COCHLOVIUS B, KIPRIYANOV SM, STASSER MJG, CHRIST O, SCHUHMACHER J, STRAUß G, MOLDENHAUER G, LITTLE M. Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3 x CD19 diabody and T cells. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 888-895
- CUNNINGHAM BA, HEMPERLY JJ, MURRAY BA, PREDIGER EA, BRACKENBURY R, EDELMAN GM. Neural cell adhesion molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative splicing. *Science* 1987; 236: 799-806
- DEHAL PK, EMBLETON MJ, KEMSHEAD JT, HAWKINS RE. Targeted cytokine delivery to neuroblastoma. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30: 518-520
- DIETERICH L. Rekombinante Antikörper gegen VEGFR-2 für eine antiangiogenetische Tumorthherapie. *Diplomarbeit* 2006
- DREIER T, LORENCZEWSKI G, BRANDL C, HOFFMANN P, SYRING U, HANAKAM F, KUFER P, RIETHMÜLLER G, BARGOU R, BAEUERLE PA. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *International Journal of Cancer* 2002; 100: 690-697

- DÜBEL S, BREITLING F, FUCHS P, ZEWE M, GOTTER S, WELSCHOF M, MOLDENHAUER G, LITTLE M. Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. *Journal of Immunological Methods* 1994; 175: 89-95
- DYER MA. Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57: 561-576
- EVANS AE, GERSON J, SCHNAUFER L. Spontaneous regression of neuroblastoma. *National Cancer Institute Monographs* 1976; 44: 49-54
- FERRARA N, GERBER HP and LeCOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003; 9 (6): 669-676
- FERRARA N, HILLAN KJ, GERBER HP, NOVOTNY W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGFR antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004; 3: 391-400
- FINKLESTEIN JZ, KRAILO MD, LENARSKY C, LADISCH S, BLAIR GK, REYNOLDS CP, SITARZ AL, HAMMOND GD. 13-*cis*-retinoic acid (NSC 122758) in the treatment of children with metastatic neuroblastoma unresponsive to conventional chemotherapy: Report from the Children Cancer Study Group. *Medical Pediatric Oncology* 1992; 20: 307-311
- FISCHER K and MACKENSEN A. The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T cell mediated cytotoxic activity. *Methods* 2003; 31: 135-142
- GLÜER S, ZENSE M, von SCHWEINITZ D. Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood ganglioneuroma and neuroblastoma of different histological grade and clinical stage. *Langenbeck's Archives of Surgery* 1998; 383: 340-344
- GOWER HJ, BARTON CH, ELSOM VL, THOMPSON J, MOORE SE, DICKSON G, WALSH FS. Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell* 1988; 55: 955-964
- GREEN LL, HARDY MC, MAYNARD-CURRIE CE, TSUDA H, LOUIE DM, MENDEZ MJ, ABDERRAHIM H, NOGUCHI M, SMITH DH, ZENG Y, DAVID NE, SASAI H, GARZA D, BRENNER DG, HALES JF, McGUINNESS RP, CAPON DJ, KLAPHOLZ S, JAKOBOVITS A. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genetics* 1994; 7: 13-21
- GREENWALD RB, CHOE YH, McGUIRE J, CONOVER CD. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; 55: 217-250
- GROSSE-HOVEST L, HARTLAPP I, MARWAN W, BREM G, RAMMENSEE HG, JUNG G. A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *European Journal of Immunology* 2003; 33: 1334-1340
- GROSSE-HOVEST L, MÜLLER S, MINOIA R, WOLF E, ZAKHARTCHENKO V, WENIGERKIND H, LASSNIG C, BESENFELDER U, MÜLLER M, LYTTON SD, JUNG G, BREM G. Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2004; 101(18): 68

- GRUMET M, FLACCUS A, MARGOLIS RU. Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: Interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *The Journal of Cell Biology* 1993; 120: 24650-24653
- GUEST RD, HAWKINS RE, KIRILLOVA N, CHEADLE EJ, ARNOLD J, O'NEILL A, IRLAM J, CHESTER KA, KEMSHEAD JT, SHAW DM, EMBLETON MJ, STERN PL, GILHAM DE. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *Journal of Immunotherapy* 2005; 28: 203-211
- HALL H, LIU L, SCHACHNER M, SCHMITZ B. The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *European Journal of Neurosciences* 1993; 5: 34-42
- HALL H, CARBONETTO S, SCHACHNER M. L1/HNK-1 carbohydrate- and beta 1 integrin-dependent neural cell adhesion to laminin-1. *Journal of Neurochemistry* 1997; 68: 544-553
- HAYASHI H, ASANO R, TSUMOTO K, KATAYOSE Y, SUZUKI M, UNNO M, KODAMA H, TAKEMURA S, YOSHIDA H, MAKABE K, IMAI K, MATSUMO S, KUMAGAI I, KUDO T. A highly effective and stable bispecific diabody for cancer immunotherapy: Cure of xenografted tumors by bispecific diabody and T-LAK cells. *Cancer Immunology/Immunotherapy* 2004; 53: 497-509
- HERO B, SIMON T, SPITZ R, ERNESTUS K, GNEKOW AK, SCHEEL-WALTER HG, SCHWABE D, SCHILLING FH, BENZ-BOHM G, BERTHOLD F. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: Results of the prospective trials NB95-S and NB97. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26 (9): 1504-1510
- HILDEBRANDT H, MÜHLENHOFF M, GERARDY-SCHAHN R. Polysialylation of NCAM. *Neurochemical Research* 2008 DOI 10.1007/s11064-008-9724-7
- HOLLIGER P, PROSPERO T, WINTER G. "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993; 90: 6444-6448
- HOLLIGER P and HUDSON PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* 2005; 23 (9): 1126-1136
- HOMBACH A, TILLMANN T, JENSEN M, HEUSER C, SIRCAR R, DIEHL V, KRUIS W, POHL C. Specific activation of resting T cells against tumour cells by bispecific antibodies and CD28-mediated costimulation is accompanied by Th1 differentiation and recruitment of MHC-independent cytotoxicity. *Clinical Experimental Immunology* 1997; 108: 352-357
- HOMBACH A, SENT D, SCHNEIDER C, HEUSER C, KOCH D, POHL C, SELIGER B, ABKEN H. T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for Interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Research* 2001; 61: 1976-1982
- HOOGENBOOM H und CHISWELL D. Antibody engineering – A practical approach. 1st Edition by Mc Cafferty J. *Oxford University Press, USA* 1996
- HOOGENBOOM HR. Overview of antibody phage display technology and its applications. *Methods in Molecular Biology* 2002; 178: 1-37

- JENSEN M, KLEHR M, VOGEL A, SCHMITZ S, TAWADROS S, MÜHLENHOFF M, PLÜCK A, FISCHER T, SCHOMÄKER T, SCHULTZE T, BERTHOLD F. One step generation of fully chimeric antibodies using C-gamma1 and C-kappa mutant mice. *Journal of Immunotherapy* 2007; 3: 338-49
- JENSEN M and BERTHOLD F. Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. *Cancer Letters* 2007; 258 (1): 9-21
- JENSEN M, ERNESTUS K, KEMSHEAD J, KLEHR M, VON BERGWELT-BAILDON MS, SCHINKÖTHE T, SCHULTZE JL, BERTHOLD F. The bi-specific CD3 x NCAM antibody: A model to preactivate T cells prior to tumour cell lysis. *Clinical & Experimental Immunology* 2003; 134 (2): 253-263
- JONES PT, DEAR PH, FOOTE J, NEUBERGER MS, WINTER G. Replacing the complementarity determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321: 522-525
- KAATSCH P, HAAF G, MICHAELIS J. Childhood malignancies in Germany – methods and results of a nationwide registry *European Journal of Cancer* 1995; 31A: 993-999
- KADMON G, KOWITZ A, ALTEVOGT P, SCHACHNER M. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *The Journal of Cell Biology* 1990; 110: 193-208
- KERBEL R und FOLKMAN J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature* 2002; 2: 727-739
- KIPRIYANOV SM, MOLDENHAUER G, MARTIN ACR, KUPRIYANOVA OA, LITTLE M. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not affinity. *Protein Engineering* 1997; 10 (4): 445-453
- KIPRIYANOV SM, MOLDENHAUER G, STRAUSS G, LITTLE M. Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *International Journal of Cancer* 1998; 77: 763-772
- KISELYOV VV, BEREZIN V, MAAR TE, SOROKA V, EDVARDBSEN K, SCHOUSBOE A, BOCK E. The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 10125-10134
- KISELYOV VV, SKLADCHIKOVA G, HINSBY AM, JENSEN PH, KULAHIN N, SOROKA V, PEDERSEN N, TSETLIN V, POULSEN FM, BEREZIN V, BOCK E. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure* 2003; 11: 691-701
- KLEHR M, KOEHL U, MÜHLENHOFF M, TAWADROS S, FISCHER T, SCHOMÄKER K, HENCKMANN JM, BOCHENNECK K, JENSEN M. The novel chimeric anti-NCAM (neural cell adhesion molecule) antibody ch.MK1 displays antitumor activity in SCID mice but does not activate complement-dependent cytotoxicity (CDC). *Journal of Immunotherapy* 2009; 32 (5): 442-451
- KÖHLER G und MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497

KOSTENUIK PJ, NGUYEN HQ, McCABE J, WARMINGTON KS, KURAHARA C, SUN N, CHEN C, Li L, CATTLEY RC, VAN G, SCULLY S, ELLIOTT R, GRISANTI M, MORONY S, TAN HL, ASUNCION F, LI X, OMINSKY MS, STOLINA M, DWYER D, DOUGALL WC, HAWKINS N, BOYLE WJ, SIMONET WS, SULLIVAN JK. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express a chimeric (murine/human) RANKL. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009; 24 (2): 182-195

KRIANGKUM J, XU B, GERVAIS C, PAQUETTE D, JACOBS FA, MARTIN L, SURESH MR. Development and characterization of a bispecific single-chain antibody directed against T cells and ovarian cancer. *Hybridoma* 2000; 19 (1): 33-41

KRUPITSKAYA Y, WAKELEE HA. Ramacirumab, a fully human mAb to the transmembrane signalling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2009; 10 (6): 597-605

KRUSHEL LA, TAI MH, CUNNINGHAM BA, EDELMAN GM, CROSSIN KL. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; 95: 2592-2596

LANGER I, VERTONGEN P, PERRET J, FONTAINE J, ATASSI G, ROBBERECHT P. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology* 2000; 34: 386-393

LASHFORD L, JONES D, PRITCHARD J, GORDON I, BREATNACH F, KEMSHEAD JT. Therapeutic application of radiolabeled monoclonal antibody UJ13A in children with disseminated neuroblastoma. *National Cancer Institute Monographs* 1987; 53-57

LI M, AGER RR, FRASER DA, TJOKRO NO, TENNER AJ. Development of a humanized C1qA chain knock-in mouse: Assessment of antibody independent β -amyloid induced complement activation. *Molecular Immunology* 2008; 45: 3244-3252

LÖFFLER A, KUFER P, LUTTERBÜSE R, ZETTL F, DANIEL PT, SCHWENKENBECHER JM, RIETHMÜLLER G, DÖRKEN B, BARGOU RC. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 X CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000; 95 (6): 2098-2103

LONBERG N, TAYLOR LD, HARDING FA, TROUNSTINE M, HIGGINS KM, SCHRAMM SR, KUO CC, MASHAYEKH R, WYMORE K, McCABE JG, MUNOZ-O'REGAN D, O'DONNELL SL, LAPACHET ESG, BENGOCHEA T, FISHWILD DM, CARNACK CE, KAY RM, HUSZAR D. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994; 368 (6474): 856-859

LONBERG N. Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology* 2005; 23 (9): 1117-1125

LUTTERBUESE R, SCHALLER E, BURGHART E, SRISKANDARAJAH M, RAUM T, RAU D, MANGOLD S, CIERPKA R, GULLER B, LUTTERBUESE P, BAEUERLE PA, KUFER P. Conversion of cetuximab, panitumumab, trastuzumab and omalizumab into T cell-engaging BiTE antibodies creates novel drug candidates of high potency. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 2008; 99, Abs 2402

MACK M, RIETHMÜLLER G, KUFER P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995; 92: 7021-7025

MARIS JM and MATTHAY KK. Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17: 2264-2279

MASOOD R, CAI J, ZHENG T, SMITH DL, HINTON DR, GILL PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001; 98 (6): 1904-1913

MATSUMOTO T and CLAESSEON-WELSH L. VEGF receptor signal transduction. *Science Signaltransduction* 2001; 112 : DOI 10.1126/stke.2001.112.re21

MATTAY KK, VILLABLANCA JG, SEEGER RC, STRAM DO, HARRIS RE, RAMSAY NK, SWIFT P, SHIMADA H, BLACK CT, BRODEUR GM, GERBING RB, REYNOLDS CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-*cis*-retinoic acid. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1165-1173

McMAHON G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 2000; 5(suppl 1): 3 – 10

MEISTER B, GRÜNEBACH F, BAUTZ F, BRUGGER W, FINK FM, KANZ L, MÖHLE R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. *European Journal of Cancer* 1999; 35 (3): 445 – 449

MEYER M, CLAUSS M, LEPLE-WIENHUES, WALTENBERGER J, AUGUSTIN HG, ZICHE M, LANZ C, BÜTTNER M, RZIHA HJ, DEHIO C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase. *The EMBO Journal* 1999; 18 (2): 363-374

NAKAGAWARA A, AZAR CG, SCAVARDA NJ, BRODEUR GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Molecular and Cellular Biology* 1994; 14: 759-767

NEAL ZC, YANG JC, RAKHMILEVICH AL, BUHTOIAROV IN, LUM HE, IMBODEN M, HANK JA, LODE HN, REISFELD RA, GILLIES SD, SONDEL PM. Enhanced activity of hu14.18-II2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 4839-4847

NERON S, THIBAUT L, DUSSAULT N, COTE G, DUCAS E, PINEAULT N, ROY A. Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: A new source of viable human blood cells. *Transfusion* 2007; 47: 1042-1049

- ORLANDI R, GUSSOW DH, JONES PT, WINTER G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1989; 86: 3833-3837
- OZKAYNAK MF, SONDEL PM, KRAILO MD, GAN J, JAVORSKY B, REISFELD RA, MATTAY KK, REAMAN GH, SEEGER RC. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: A Children's Cancer Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18 (24): 4077-4085
- PARATCHA G, LEDDA F, IBANEZ CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003; 113: 876-879
- PLATE KH, BREIER G, WEICH HA, MENNEL HD, RISAU W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: Coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *International Journal of Cancer* 1994; 59 (4): 520-529
- POPE AR, EMBLETON MJ, MERNAUGH R. Construction and use of antibody gene repertoires. *Published in Hoogenboom and Chiswell. Antibody engineering – A practical approach* 1996
- PREWETT M, HUBER J, LI Y, SANTIAGO A, O'CONNOR W, KING K, OVERHOLSER J, HOOPER A, PYTOWSKI B, WITTE L, BOHLEN P, HICKLIN DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (Fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Research* 1999; 59: 5209-5218
- PRITCHARD J and HICKMANN JA. Why does stage 4S neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 1994; 344 (8925): 869-870
- RIECHMANN L, CLARK M, WALDMANN H, WINTER G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332: 323-327
- ROSEN LS. VEGF-targeted therapy: Therapeutic potential and recent advances. *The Oncologist* 2005; 10: 382-391
- SCHMIDT M, SIMON T, HERO B, ESCHNER W, DIETLEIN M, SUDBROCK F, BONGARTZ R, BERTHOLD F, SCHICHA H. Is there a benefit of 131 I-MIBG in the treatment of children with stage 4 neuroblastoma? A retrospective evaluation of The German Neuroblastoma Trial NB97 and implications for The German Neuroblastoma Trial NB 2004. *Nuklearmedizin* 2006; 45 (4): 145-151
- SCHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, KESHET E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845
- SEIDENFADEN R, KRAUTER A, SCHERTZINGER F, GERARDY-SCHAHN R, HILDEBRANDT H. Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23: 5908-5918
- SERGEEV G. Klonierung, Expression und Funktionsanalyse eines anti-NCAM-Intrabodies. *Diplomarbeit* 2008

- SHAHIED LS, TANG Y, ALPAUGH K, SOMER R, GREENSPON D, WEINER LM. Bispecific minibodies targeting Her2/neu and CD16 exhibit improved tumor cell lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279 (52): 53907-53914
- SHALABY MR, SHEPARD HM, PRESTA L, RODRIGUES ML, BEVERLEY PCL, FELDMANN M, CARTER P. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the *HER2* protooncogene. *The Journal of Experimental Medicine* 1992; 175: 217-225
- SHIBUYA M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 39 (5): 469 – 478
- SHIMADA H, AMBROS IM, DEHNER LP, HATA J, JOSHI VV, ROALD B. The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer* 1999; 86: 364-372
- SIMON T, HERO B, FALDUM A, HANDGRETINGER R, SCHRAPPE M, NIETHAMMER D, BERTHOLD F. Consolidation treatment with chimeric anti-GD2 antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22 (17): 3549-3557
- SIMON T, SPITZ R, FALDUM A, HERO B, BERTHOLD F. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2004; 26 (12): 791-796
- SIMON T, HERO B, FALDUM A, HANDGRETINGER R, SCHRAPPE M, NIETHAMMER D, BERTHOLD F. Infants with stage 4 neuroblastoma: The impact of the chimeric anti-GD2 antibody ch14.18 consolidation therapy. *Klinische Pädiatrie* 2005; 217 (3): 147-152
- SIMON T, HERO B, BONGARTZ R, SCHMIDT M, MÜLLER RP, BERTHOLD F. Intensified external-beam radiation therapy improves the outcome of stage 4 neuroblastoma in children > 1 year with residual local disease. *Strahlentherapie und Onkologie* 2006; 182 (7): 389-394
- SOROKA V, KOLKOVA K, KASTRUP JS, DIEDERICHS K, BREED J, KISELYOV VV, POULSEN FM, LARSEN IK, WELTE W, BEREZIN V, BOCK E, KASPER C. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure* 2003; 11: 1291-1301
- SUZUKI M, NAKAYAMA J, SUZUKI A, ANGATA K, CHEN S, SAKAI K, HAGIHARA K, YAMAGUCHI Y, FUKUDA M. Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* 2005; 15: 887-894
- TANAKA F, OTAKE Y, NAKAGAWA T, KAWANO Y, MIYAHARA R, LI M, YANAGIHARA K, NAKAYAMA J, FUJIMOTO I, IKENAKA K, WADA H. Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 2000; 60: 3072-3080
- VILLABLANCA JG, KHAN AA, AVRAMIS VI, SEEGER RC, MATTHAY KK, RAMSAY NK, REYNOLDS CP. Phase I trial of 13-*cis*-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Oncology* 1995; 13: 894-901
- WALMOD PS, KOLKOVA K, BEREZIN V, BOCK E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochemical Research* 2004; 29 (11): 2015-2035

WALSH FS and DOHERTY P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance. *Annual Review of Cellular and Developmental Biology* 1997; 13: 425-456

WEIDNER N, SEMPLE JP, WELCH WR, FOLKMAN J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 1991; 324 (1): 1-8

WEIDNER N, CARROLL PR, FLAX J, BLUMENFELD W, FOLKMAN J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate cancer. *American Journal of Pathology* 1993; 143 (2): 401-409

WEISS WA, ALDAPE K, MOHAPATRA G, FEUERSTEIN BG, BISHOP JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *The EMBO Journal* 1997; 16 (11): 2985-2995

WHITTINGTON HA, HANCOCK J, KEMSHEAD JT. Generation of a humanised single chain Fv (scfv) derived from the monoclonal Eric-1 recognising the human neural cell adhesion molecule. *Medical and Pediatric Oncology* 2001; 36: 243-246

ZHANG L, SMITH KM, CHONG AL, STEMPAK D, YEGER H, MARRANO P, THORNER PS, IRWIN MS, KAPLAN DR, BARUCHEL S. In vivo antitumor and antimetastatic activity of sunitinib in preclinical neuroblastoma mouse model. *Neoplasia* 2009; 11 (5): 426-435

ZHANG Q, CHEN G, LIU X, QIAN Q. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Research* 2007; 17:89-99

ZHU Z, ROCKWELL P, LU D, KOTANIDES H, PYTOWSKI B, HICKLIN DJ, BOHLEN P, WITTE L. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a phage display library. *Cancer Research* 1998; 58: 3209-3214

6 Anhang

Nukleotid- und Aminosäuresequenz OKT-3 x ERIC-1 *diabody*

	<i>SfiI</i> → VH OKT-3																													
1	M	A	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	R	ATG	GCC	GAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GCA	AGA
46	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC
	CDR-H1																													
91	F	T	R	Y	T	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	TTT	ACT	AGG	TAC	ACG	ATG	CAC	TGG	GTA	AAA	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG
	CDR-H2																													
136	G	L	E	W	I	G	Y	I	N	P	S	R	G	Y	T	GGT	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	TAC	ATT	AAT	CCT	AGC	CGT	GGT	TAT	ACT
181	N	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	T	D	AAT	TAC	AAT	CAG	AAG	TTC	AAG	GAC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	ACA	GAC
226	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAA	CTG	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT
271	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	D	D	H	GAG	GAC	TCT	GCA	GTC	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	TAT	TAT	GAT	GAT	CAT
	CDR-H3																													
316	Y	C	L	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	TAC	TGC	CTT	GAC	TAT	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	CTC	ACC	GTC	TCC
	GLY ₄ SER-LINKER → VL ERIC-1																													
361	S	G	G	G	G	S	D	I	V	M	T	Q	A	A	P	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	AAT	ATA	GTT	ATG	ACT	GAG	GCT	GCT	CCC
406	S	V	P	V	T	P	G	E	S	V	S	I	S	C	R	TCT	GTA	CCT	GTC	ACT	CCT	GGA	GAG	TCA	GTA	TCC	ATC	TCT	TGC	AGG
	CDR-L1																													
451	S	S	K	S	L	L	Y	S	N	G	N	T	Y	L	Y	TCG	AGT	AAG	AGT	CTC	CTG	TAT	AGT	AAT	GGC	AAC	ACT	TAC	TTG	TAT
496	W	F	L	Q	R	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	TGG	TTC	CTG	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCT	CAG	CTC	CTG	ATA	TAT
	CDR-L2																													
541	R	M	S	N	L	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	CGG	ATG	TCC	AAC	CTT	GCC	TCA	GGA	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC
586	S	G	S	G	T	A	F	T	L	R	I	S	R	V	E	AGT	GGG	TCA	GGA	ACT	GCT	TTC	ACA	CTG	AGA	ATC	AGT	AGA	GTG	GAG
	CDR-L3																													
631	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	H	L	E	F	GCT	GAG	GAT	GTG	GGT	GTT	TAT	TAC	TGT	ATG	CAA	CAT	CTA	GAA	TTT
676	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	G	G	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	TCG	GGG	ACT	AAG	CTT	GAA	ATT	AAG	GGT	GGA

														→	VH
	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	Q	V
721	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	CAG	GTG
	ERIC-1			(GLY ₄ SER) ₃ -LINKER											
	K	L	Q	E	S	G	V	E	L	V	R	P	G	T	S
763	AAG	CTG	CAG	GAG	TCA	GGA	GTT	GAA	CTG	GTA	AGG	CCT	GGG	ACT	TCA
												CDR-H1			
	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	A	F	T	N	Y
808	GTG	AAG	GTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GCC	TTC	ACT	AAT	TAC
	L	I	E	W	V	K	K	R	P	G	Q	G	L	E	W
853	TTG	ATA	GAG	TGG	GTA	AAG	AAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GGC	CTT	GAG	TGG
									CDR-H2						
	I	G	V	I	N	P	G	S	G	G	S	N	Y	N	E
898	ATT	GGA	GTG	ATT	AAT	CCT	GGA	AGT	GGT	GGT	AGT	AAT	TAC	AAT	GAG
	K	F	K	G	R	T	T	L	T	A	D	T	S	S	T
943	AAG	TTC	AAG	GGC	AGG	ACA	ACA	CTG	ACT	GCA	GAC	ACA	TCC	TCC	ACT
	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	D	D	S	A
988	ACT	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAT	GAC	TCT	GCG
												CDR-H3			
	V	Y	F	C	A	R	G	T	T	V	I	A	A	D	Y
1033	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	GGG	ACT	ACG	GTA	ATA	GCC	GCC	GAT	TAC
	H	A	M	D	F	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
1078	CAT	GCT	ATG	GAC	TTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACA	GTC	ACC	GTC	TCC
	GLY ₄ SER-LINKER						→ VL OKT-3								
	S	G	G	G	G	S	D	I	V	L	T	Q	S	P	A
1123	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GAC	ATT	GTG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA
	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S
1168	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT
												CDR-L1			
	A	S	S	S	V	S	Y	M	N	W	Y	Q	Q	K	S
1213	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	AAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	TCA
												CDR-L2			
	G	T	S	P	K	R	W	I	Y	D	T	S	K	L	A
1258	GGC	ACC	TCC	CCC	AAA	AGA	TGG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAA	CTG	GCT
	S	G	V	P	A	H	F	R	G	S	G	S	G	T	S
1303	TCT	GGA	GTC	CCT	GCT	CAC	TTC	AGG	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT
	Y	S	L	T	I	S	G	M	E	A	E	D	A	A	T
1348	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	GGC	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT
												CDR-L3			
	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	N	P	F	T	F	G	S
1393	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	AGT	AGT	AAC	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	TCG
	G	T	K	L	E	I	N	R							
1438	GGG	ACA	AAG	TTG	GAA	ATA	AAC	CGG	NotI						

→ VH A7

721 **S G G G G S G G G G S Q V K L**
TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG CAG GTG AAA CTG

(GLY₄SER)₃-LINKER

763 **Q E S G P E L V K P G T S V K**
CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG

CDR-H1

808 **I S C K T S G Y T F T E Y T M**
ATA TCC TGC AAG ACT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAA TAC ACC ATG

853 **H W V K Q S H G K S L E W I G**
CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT GGA

CDR-H2

898 **G I N P N S G G T S Y N Q K F**
GGT ATT AAT CCT AAC AGT GGT GGT ACT AGC TAC AAC CAG AAG TTC

943 **K G K A T L T V D K S S S T A**
AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC

988 **Y M E L R S L T S E D S A V Y**
TAC ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTC TAT

CDR-H3

1033 **Y C A R G L W G G M D Y W G Q**
TAC TGT GCA AGA GGA CTA TGG GGT GGT ATG GAC TAC TGG GGC CAA

→ VL

1078 **G T T V T V S S G G G G S D I**
GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GAT ATC

UCHT-1

GLY₄SER-LINKER

1123 **Q M T Q S P S S L S A S V G D**
CAG ATG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT

CDR-L1

1168 **R V T I T C R A S Q D I R N Y**
AGG GTC ACC ATC ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC CGT AAT TAT

1213 **L N W Y Q Q K P G K A P K L L**
CTG AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA CTA CTG

CDR-L2

1258 **I Y Y T S R L E S G V P S R F**
ATT TAC TAT ACC TCC CGC CTG GAG TCT GGA GTC CCT TCT CGC TTC

1303 **S G S G S G T D Y T L T I S S**
TCT GGT TCT GGT TCT GGG ACG GAT TAC ACT CTG ACC ATC AGC AGT

1348 **L Q P E D F A T Y Y C Q Q G N**
CTG CAA CCG GAG GAC TTC GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA GGT AAT

CDR-L3

1393 **T L P W T F G Q G T K V E I K**
ACT CTG CCG TGG ACG TTC GGA CAG GGC ACC AAG GTG GAG ATC AAA

NotI

Nukleotid- und Aminosäuresequenz UCHT-1 x D29 *diabody*

<i>SfiI</i>	→ VH UCHT-1														
1	M	A	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q
	ATG	GCC	GAG	GTT	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGC	GGT	GGC	CTG	GTG	CAG
46	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	S
	CCA	GGG	GGC	TCA	CTC	CGT	TTG	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGC	TAC	TCC
	CDR-H1														
91	F	T	G	Y	T	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K
	TTT	ACC	GGC	TAC	ACT	ATG	AAC	TGG	GTG	CGT	CAG	GCC	CCA	GGT	AAG
	CDR-H2														
136	G	L	E	W	V	A	L	I	N	P	Y	K	G	V	S
	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	GCA	CTG	ATT	AAT	CCT	TAT	AAA	GGT	GTT	TCC
181	T	Y	N	Q	K	F	K	D	R	F	T	I	S	V	D
	ACC	TAT	AAC	CAG	AAA	TTC	AAG	GAT	CGT	TTC	ACG	ATA	TCC	GTA	GAT
226	K	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A
	AAA	TCC	AAA	AAC	ACA	GCC	TAC	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	CGT	GCT
271	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	G	Y	Y	G
	GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	TAT	TGT	GCT	AGA	AGC	GGA	TAC	TAC	GGC
	CDR-H3														
316	D	S	D	W	Y	F	D	V	W	G	Q	G	T	L	V
	GAT	AGC	GAC	TGG	TAT	TTT	GAC	GTC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	CTG	GTC
	GLY ₄ SER-LINKER → VL D29														
361	T	V	S	S	G	G	G	G	S	D	I	V	M	T	Q
	ACC	GTC	TCC	TCG	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GAT	ATT	GTG	ATG	ACT	CAG
406	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I
	TCT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCC	GTC	ACC	CCT	GGA	GAG	CCG	GCC	TCC	ATC
	CDR-L1														
451	S	C	R	S	S	K	S	L	L	Y	S	N	G	N	T
	TCC	TGC	AGG	TCG	AGT	AAG	AGT	CTC	CTG	TAT	AGT	AAT	GGC	AAC	ACT
496	Y	L	Y	W	F	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L
	TAC	TTG	TAT	TGG	TTC	CTG	CAG	AAG	CCA	GGG	CAG	TCT	CCA	CAG	CTC
	CDR-L2														
541	L	I	Y	R	M	S	N	L	A	S	G	V	P	D	R
	CTG	ATC	TAT	CGG	ATG	TCC	AAC	CTT	GCC	TCC	GGG	GTC	CCT	GAC	AGG
586	F	S	S	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S
	TTC	AGT	AGC	AGT	GGA	TCA	GGC	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC
631	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	M	Q	H
	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TAC	TGC	ATG	CAA	CAT
	CDR-L3														
676	L	E	F	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I
	CTA	GAA	TTT	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC

		(GLY ₄ SER) ₃ -LINKER													
721	K	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G
	AAA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA
		→ VH D29													
763	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P
	TCG	CAG	GTT	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCT
808	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	A	F
	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTC	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGT	TAC	GCA	TTT
		CDR-H1													
853	T	N	Y	L	I	E	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G
	ACC	AAT	TAC	TTG	ATA	GAG	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA	CAA	GGG
		CDR-H2													
898	L	E	W	M	G	V	I	N	P	G	S	S	G	S	N
	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	GTG	ATT	AAT	CCT	GGA	AGT	AGT	GGT	AGT	AAT
943	Y	N	E	K	F	K	G	R	V	T	I	T	A	D	T
	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AGA	GTC	ACC	ATT	ACC	GCA	GAC	ACA
988	S	T	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	R	S	D
	TCC	ACG	AGC	ACA	GCA	TAT	ATG	CAA	CTC	AGC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAC
		CDR-H3													
1033	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	T	V	I	A
	GAC	ACG	GCC	GTT	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GGG	ACT	ACG	GTA	ATA	GCC
1078	A	D	Y	H	A	M	D	F	W	G	Q	G	T	L	V
	GCC	GAT	TAC	CAT	GCT	ATG	GAC	TTC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTA	GTC
		GLY ₄ SER-LINKER													
		→ VL UCHT-1													
1123	T	V	S	S	G	G	G	G	S	D	I	Q	M	T	Q
	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GAT	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG
1168	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
	TCC	CCG	AGC	TCC	CTG	TCC	GCC	TCT	GTG	GGC	GAT	AGG	GTC	ACC	ATC
		CDR-L1													
1213	T	C	R	A	S	Q	D	I	R	N	Y	L	N	W	Y
	ACC	TGT	CGT	GCC	AGT	CAG	GAC	ATC	CGT	AAT	TAT	CTG	AAC	TGG	TAT
1258	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	T
	CAA	CAG	AAA	CCA	GGA	AAA	GCT	CCG	AAA	CTA	CTG	ATT	TAC	TAT	ACC
		CDR-L2													
1303	S	R	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
	TCC	CGC	CTG	GAG	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	TCT	GGT	TCT	GGT
1348	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E
	TCT	GGG	ACG	GAT	TAC	ACT	CTG	ACC	ATC	AGC	AGT	CTG	CAA	CCG	GAG
		CDR-L3													
1393	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	T	L	P	W
	GAC	TTC	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAA	GGT	AAT	ACT	CTG	CCG	TGG
1438	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K				
	ACG	TTC	GGA	CAG	GGC	ACC	AAG	GTG	GAG	ATC	AAA	NotI			

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum 17. April 1975
Geburtsort Berlin
Nationalität deutsch
E-Mail anke.kopacek@googlemail.com

Beruflicher Werdegang

01/2005 - 06/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Kooperationsarbeit Uniklinikum Köln
Abteilung Pädiatrische Onkologie und Hämatologie/
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig
Abteilung Molekulare Biotechnologie

Nebentätigkeiten

01/2001 - 10/2002 Studiumbegleitende wissenschaftliche Laborassistentin
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)/
Robert-Rössle-Klinik, Berlin
Abteilung Chirurgie und chirurgische Onkologie

Akademische Ausbildung

06/2005 - 09/2009 Universität zu Köln
Promotionsstudium - MD-PhD-Programm - Molekulare Medizin
Abschluss - Promotion
Erstellung der Doktorarbeit im Rahmen der wissenschaftlichen
Mitarbeitertätigkeit

10/1997 - 06/2004 Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Biologie, Studium der Biologie
Abschluss - Diplom
Erstellung der Diplomarbeit am Uniklinikum Charité
Centre for Cardiovascular Research (CCR), Berlin
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Berufsausbildung

08/1994 - 06/1997 Lise-Meitner-Schule, Berlin, Biologisch-technische Assistentin
Abschluss - staatlich geprüfte BTA

Schulbildung

09/1990 - 07/1994 1. Gymnasium Treptow, Berlin, Abschluss – Abitur

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Frank Berthold (Universität Köln) und Dr. Thomas Böldicke (HZI Braunschweig) betreut worden.

Braunschweig, den 19.06.2009