

Aus dem Charité Comprehensive Cancer Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung und Charakterisierung verschiedener neuartiger
bispesifischer Antikörper basierend auf PankoMab-GEX™ zur
Verbesserung der Tumorthherapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patrik Kehler

aus Witten

Datum der Promotion: 16. Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	1
2. Abstract	3
3. Einleitung	4
3.1 Krebserkrankungen und Therapiemöglichkeiten	4
3.2 Bispezifische Antikörper für die Krebstherapie	5
3.3 Bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörper	9
3.4 Mucin 1	13
3.4.1 Struktur und Expression	13
3.4.2 Funktion	14
3.4.3 MUC-1 bei Krebserkrankungen	15
3.4.4 TA-MUC1 und PankoMab-GEX®	15
3.5 Fragestellung	16
4. Methodik	18
4.1 Zellkultur	18
4.1.1 Isolation von PBMCs aus Leukapheresaten	18
4.1.2 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien	18
4.1.3 Einfrieren von Zellen und Lagerung	19
4.1.4 Zellzählung	19
4.1.5 Generierung stabiler Einzelklone zur Antikörperproduktion	19
4.1.5.1 Transiente Transfektion	19
4.1.5.2 Stabile Transfektion	20
4.1.5.3 Amplifikation und Selektion	21
4.1.5.4 Klonierung von Zellen durch Aussaat in semisolidem Medium	22
4.1.5.5 Bestimmung der spezifischen Produktivitätsrate	22
4.1.5.6 Produktion von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen	23
4.2 Biochemische Methoden	23
4.2.1 Titer-ELISA	24
4.2.2 Protein A-Affinitätschromatographie	24
4.2.3 Proteinbestimmung	25
4.2.4 Größenausschlusschromatographie	25
4.2.5 Endotoxin Bestimmung	26
4.3 Funktionelle Charakterisierung	26

4.3.1	Durchflusszytometrie	26
4.3.2	Fixierung von Zellen	28
4.3.3	Zellbindung	28
4.3.4	T-Zell-Aktivierung	28
4.3.5	T-Zell-Proliferation	29
4.3.6	Zytokinfreisetzung	30
4.3.7	T-Zell ADCC mit voraktivierten T-Zellen	31
4.3.8	NK-Zell ADCC	32
4.3.9	PBMC ADCC	33
5.	Ergebnisse	34
5.1	Auswahl geeigneter anti-CD3 Antikörper zur Generierung von scFv-Fragmenten ..	34
5.1.1	Zellbindungsstudien der anti-CD3 IgG1 Antikörper	34
5.1.2	T-Zell-Aktivierung der anti-CD3 IgG1 Antikörper	35
5.1.3	Anti-CD3 antikörperabhängige Zytokinfreisetzung	38
5.2	Entwicklung von bi-spezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörpern	39
5.2.1	Herstellung von Produktionsklonen	40
5.2.2	Reinigung der Antikörper	42
5.2.3	Aggregationsverhalten der bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörper ..	45
5.2.4	Ausschluss von Endotoxinverunreinigungen	46
5.3	Charakterisierung der Wirkmechanismen der PM-Ck- und TM-Ck-Konstrukte	47
5.3.1	Bindung der PM-Ck-Konstrukte an TA-MUC1	47
5.3.2	Bindung der PM-Ck- und TM-Ck-Konstrukte an CD3	48
5.3.3	Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung	49
5.3.4	PM-Ck und TM-Ck antikörperabhängige Zytokinfreisetzung	52
5.4	Charakterisierung der Wirkmechanismen der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte	57
5.4.1	Zellbindung an TA-MUC1 und Her2	58
5.4.2	Zellbindung an CD3-positive Jurkat-Zellen	59
5.4.3	T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte	61
5.4.4	Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit der der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte	63
5.4.5	NK-Zell vermittelte Zytotoxizität	65
5.4.6	T-Zell vermittelte Zytotoxizität	66

5.4.7	PBMC vermittelte Zytotoxizität	68
5.4.8	T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit der PM- und TM-Konstrukte	69
6.	Diskussion.....	72
6.1	Auswahl geeigneter anti-CD3 Antikörper zur scFv-Domänen Generierung	73
6.2	Rationale für PankoMab als Antikörper für die Konstruktion T-Zell-rekrutierender Moleküle.....	74
6.3	Entwicklung von PankoMab-GEX [®] T-Zell-rekrutierenden Konstrukten	79
6.4	Charakterisierung der Wirkmechanismen der PM-C κ - und TM-C κ -Konstrukte....	82
6.5	Charakterisierung der Wirkmechanismen der C κ -scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte	87
6.6	Fazit und Ausblick.....	92
7.	Literaturverzeichnis	95
	Abkürzungsverzeichnis	106
	Eidesstattliche Versicherung	109
	Lebenslauf	110
	Danksagung	111

1. Abstrakt

T-Zellen besitzen zahlreiche wertvolle Eigenschaften für die Tumorthherapie. Mit bis zu 80% bilden die verschiedenen T-Zell Subpopulationen den Hauptteil der Lymphozyten im peripheren Blut und zeichnen sich zusätzlich durch eine starke Proliferation in Folge einer Aktivierung und einer hohen Zytotoxizität aus. Eine Möglichkeit T-Zellen für die Tumorthherapie gezielt zu nutzen, stellen T-Zell-rekrutierende bispezifische Antikörper dar, wobei die therapeutische Anwendung häufig von hohen Nebenwirkungen aufgrund von Zytokinsekretion der T-Zellen, aber auch aufgrund der unzureichenden Selektivität der Expression des Zielantigens begleitet wird. So zeichnen sich die meisten der aktuell verwendeten Tumorantigene nur durch eine erhöhte Expression auf Tumorzellen aus, werden aber auch auf zahlreichen Normalgeweben exprimiert. Um die Anwendbarkeit von T-Zell-rekrutierenden Antikörpern weiter zu verbessern, sind daher Tumorantigene von höchstem Interesse, die keine Expression auf Normalgeweben zeigen. Ein solches Antigen ist TA-MUC1, das nur auf Tumorzellen für Antikörper zugänglich ist. Das Ziel der Arbeit bestand in der Produktion und Charakterisierung von verschiedenen, gegen TA-MUC1 gerichteten, T-Zell-rekrutierenden Antikörpern, um zu untersuchen, ob TA-MUC1 ein geeignetes Antigen für die Rekrutierung von T-Zellen darstellt.

Als Grundlage für die bispezifischen Antikörper wurden zunächst verschiedene gegen CD3 gerichtete monoklonale Antikörper hinsichtlich ihrer T-Zell-Bindung und -Aktivierung untersucht und die vielversprechendsten Kandidaten für die Expression als bispezifische Antikörper ausgewählt. Dabei konnten auch die bispezifischen Antikörper mit hohen Produktivitäten in GlycoExpress[®] hergestellt und durch die Etablierung geeigneter Aufreinigungsschritte erfolgreich isoliert werden. Funktionell wurden zunächst drei Konstrukte verglichen, bei denen verschiedene anti-CD3 scFv an die Ck-Domäne eines IgG1 fusioniert wurden. Trotz vergleichbarer Bindung zeigten die scFv-Domänen Unterschiede in der vermittelten T-Zell-Aktivierung und induzierten Zytokinfreisetzung in unterschiedlichem Maße, wobei scFvOkt3.2 sich durch eine verringerte Tumorzell-unabhängige Zytokinfreisetzung und T-Zell-Aktivierung auszeichnete. Um einen Einfluss des gewählten Formates zu untersuchen, wurden anschließend zwei Konstrukte detaillierter funktionell analysiert, bei denen scFvOkt3.2 an die Ck- oder an die CH3-Domäne fusioniert wurde. Dabei führte die Fusion an die CH3-Domäne zu den besten funktionellen Ergebnissen. So vermittelte dieses Konstrukt eine im Vergleich verbesserte CD3-Bindung, was zu einer starken Aktivierung und

Proliferation von T-Zellen sowie zu einer starken zytotoxischen Wirkung gegen TA-MUC1-positive Tumorzellen führte. Überraschend war jedoch das Ergebnis, dass trotz der verbesserten CD3-Bindung eine verbesserte Tumorzell-unabhängige Aktivierung und Costimulation durch das C κ -Konstrukt vermittelt wurde.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Eignung von TA-MUC1 als vielversprechendes Tumorantigen für T-Zell-rekrutierenden Antikörper gezeigt werden. Die untersuchten PM-CD3-Konstrukte vermittelten *in vitro* alle wichtigen Funktionsweisen, wie Aktivierung und Proliferation von T-Zellen sowie Zytotoxizität. Für eine klinische Anwendung sind allerdings noch weiterführende sicherheitsrelevante Untersuchungen nötig.

2. Abstract

T cells possess several valuable properties for tumor therapy. With up to 80% different T cell subsets account for the majority of the lymphocyte population within the peripheral blood, which proliferate strongly and are highly cytotoxic after activation. One opportunity to use T cells for tumor therapy is the development of T cell recruiting bi-specific antibodies. However, the therapeutic application of those antibodies is often accompanied by severe adverse events that mainly depend on cytokine release by T cells as well as the non-selective expression of targeted tumor antigen. Most tumor antigens in clinical use are characterized by upregulated expression on tumor cells but show broad expression on normal healthy tissue as well. To reduce effects on healthy cells antigens that are exclusively expressed on tumor cells are of highest interest. One such promising tumor antigen is TA-MUC1. During this study different T cell recruiting bi-specific antibodies that target TA-MUC1 were produced and characterized to analyze if TA-MUC1 is a suitable antigen for T cell recruitment.

Four different anti-CD3 antibodies were analyzed regarding T cell binding and activation to choose the most promising candidates for expression as bi-specific antibodies. As a first step three constructs with three different anti-CD3 scFv's fused to the Ck domain of an IgG1 were compared in functional assays. Despite comparable CD3 binding the scFv's showed clear differences in T cell activation and cytokine release. The antibody construct containing scFvOkt3.2 induced less target cell independent cytokine release and T cell activation compared to the other constructs. Following the analysis of the different scFv's two constructs, scFvOkt3.2 fused to the Ck or CH3 domain, were characterized in more detail to analyze a potential influence of the chosen construct format. The subsequent functional tests showed best results for the CH3 fusion. This construct mediated improved CD3 binding leading to enhanced T cell activation and proliferation as well as to increased cytotoxicity against TA-MUC1 positive tumor cells. Surprisingly stronger target cell independent activation and costimulation was mediated by the Ck construct.

In summary this study shows that TA-MUC1 is a valuable tumor antigen for T cell recruiting bi-specific antibodies. The analyzed PM-CD3 constructs are able to induce *in vitro* T cell activation and proliferation as well as T cell dependent cytotoxicity. However, for clinical application additional assays regarding the safety profile are necessary.

3. Einleitung

3.1 Krebserkrankungen und Therapiemöglichkeiten

Mit 482.500 Neuerkrankungen im Jahr 2013 zählt Krebs zu den häufigsten Krankheiten in Deutschland und obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Fortschritte im Bereich der Krebstherapie gemacht wurden, ist Krebs mit 223.088 Todesfällen im Jahr 2013 auch nach wie vor nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (1). Konventionell wird die Mehrheit der Krebspatienten einer kurativen Operation unterzogen, welche häufig mit einer Chemotherapie oder Bestrahlung kombiniert wird. Da diese Form der Behandlung unspezifisch gegen sich teilende Zellen wirkt, sind neben den Krebszellen auch gesunde Zellen betroffen, was zu starken Nebenwirkungen führt. Um diese sehr breite unspezifische Wirkungsweise und damit verbundene Nebenwirkungen gegen gesundes Gewebe zu verringern, werden mehr und mehr spezifischere alternative Therapiemöglichkeiten entwickelt. Diese zielgerichteten Therapien sollen spezifisch nur gegen Krebszellen wirken und das gesunde Gewebe des Patienten aussparen. Es werden zwei Hauptarten von zielgerichteten Therapien unterschieden: 1. Kleinmolekül-Inhibitoren und 2. Monoklonale Antikörper.

Kleinmolekül-Inhibitoren werden genutzt um für die Progression von Krebs wichtige Signalwege der Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose oder Rezeptoren von Wachstumsfaktoren zu inhibieren (2). Dabei ist die Grundlage für die Entwicklung von Kleinmolekül-Inhibitoren die Erkenntnis, dass zahlreiche durch Mutationen oder Translokationen intrinsisch aktivierte Kinasen den normalen zellulären Kontroll-mechanismen entgehen und so essentiell für die Progression von Krebszellen werden (3). Um diesem Mechanismus entgegen zu wirken, binden Kleinmolekül-Inhibitoren an die entsprechenden Kinasen, inaktivieren diese und verhindern so die Signalweiterleitung. Bis 2015 wurden bereits 10 verschiedene Kleinmolekül-Inhibitoren von der FDA zur Behandlung von verschiedenen Krebsindikationen zugelassen und zahlreiche weitere werden in klinischen Phasen getestet (4).

Eine Alternative zu Kleinmolekül-Inhibitoren bieten monoklonale Antikörper. Zahlreiche monoklonale Antikörper (mAbs) sind bereits für die klinische Anwendung im Bereich der Krebstherapie zugelassen und eine steigende Anzahl wird jedes Jahr in klinischen Phasen getestet oder von der EMA (*European Medicines Agency*) und FDA (*Food and*

Drug Administration) zur Behandlung zugelassen (5). Seit die ersten therapeutischen mAbs mit Hilfe der Hybridom-Technik hergestellt wurden (6), ermöglichten zahlreiche Fortschritte im Bereich der Herstellung und dem Design von monoklonalen Antikörpern die Produktion von chimären, humanisierten und humanen mAbs was zu wichtigen Verbesserungen bei Nebenwirkungen und Effizienz geführt hat. Durch die Bindung von Tumor-assoziierten Antigenen bieten monoklonale Antikörper die Möglichkeit auf verschiedene Weise, wie zum Beispiel Blockierung der Bindung eines Liganden und Störung der Signalweiterleitung oder komplementabhängiger Toxizität (CDC) gegen Tumorzellen zu wirken. Weitere wichtige anti-Tumor Mechanismen, die durch monoklonale Antikörper vermittelt werden, sind antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität (ADCC) und antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP). Dabei binden Immunglobulin G bindende Membranrezeptor (Fc γ -Rezeptoren) tragende Immunzellen an den Fc-Teil der Antikörper und verstärken so die antitumorale Wirkung (7). Obwohl bereits sehr vielversprechende Antikörper für die klinische Behandlung von Krebserkrankungen zugelassen sind, wird Antikörper-*Engineering* routinemäßig angewendet um weitere Verbesserungen wie eine Verringerung der Immunogenität, eine Steigerung der Fc-vermittelten Effektorfunktionen oder eine Verbesserung der Zytotoxizität durch Kopplung von Antikörpern mit zytotoxischen Agenzien zu ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit die Effektivität von monoklonalen Antikörpern zu verbessern, bieten bispezifische Antikörper.

3.2 Bispezifische Antikörper für die Krebstherapie

Bispezifische Antikörper bieten die Möglichkeit einige Nachteile von monospezifischen Antikörpern durch eine weitere Spezifität zu verbessern. Dabei unterscheidet man zwei grundlegende Prinzipien von bispezifischen Antikörpern, bei denen entweder 1) beide Spezifitäten direkt gegen den Krebs, zum Beispiel gegen verschiedene Rezeptoren oder lösliche Faktoren, gerichtet sind oder 2) die zweite Spezifität zur Rekrutierung von Effektorzellen oder Molekülen genutzt wird.

Zahlreiche Formate von bispezifischen Antikörpern befinden sich zurzeit in der prä-klinischen und klinischen Erprobung. Man unterscheidet dabei zwischen Immunglobulin (Ig)-artigen Konstrukten, die einen Fc-Teil tragen, und kleineren Konstrukten. Abbildung 1 zeigt einen Überblick über die am häufigsten beschriebenen Formate.

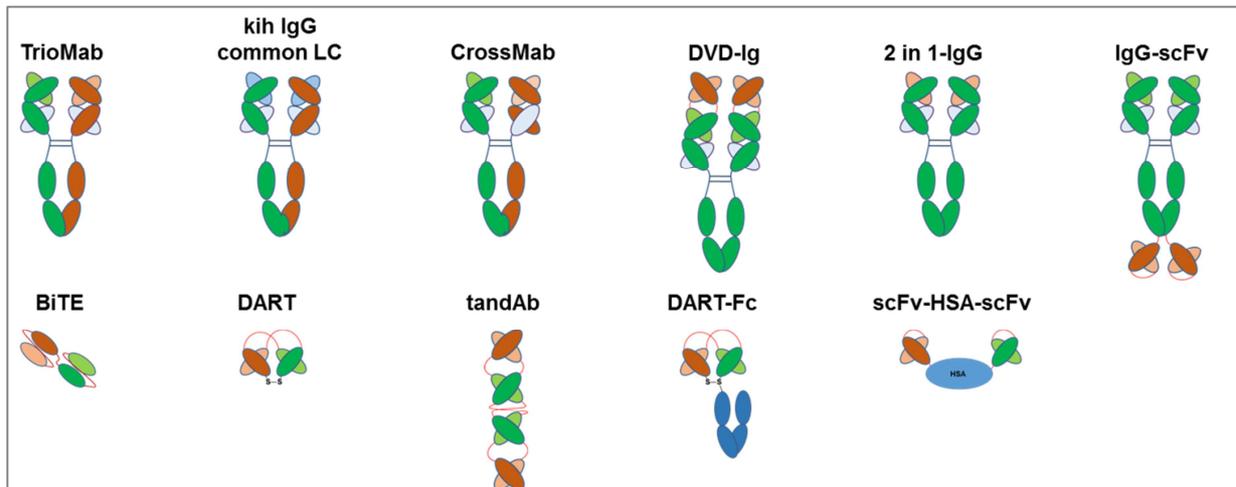


Abbildung 1: Übersicht über verschiedene bispezifische Antikörperkonstrukte.

Die obere Reihe zeigt Immunglobulin (Ig)-artige bispezifische Antikörperkonstrukte wohingegen die untere Reihe kleinere bispezifische Konstrukte und Fusionsproteine zeigt. Adaptiert nach Kontermann und Brinkmann, 2015 (8).

Werden monospezifische Antikörper an ihren Amino- oder Carboxy-Termini durch zusätzliche variable leichte (VL) und schwere Domänen (VH) oder scFv-Fragmente (*single chain variable fragment*) erweitert, entstehen tetravalente bispezifische Antikörper, die jedes Antigen bivalent binden (DVD-Ig, *dual variable domain immunoglobulin*; IgG-scFv, Immunglobulin G-scFv). Eine Alternative um ohne zusätzliche Domänen tetravalente Antikörper zu erhalten, stellt das 2 in 1-IgG Format dar, bei dem die VH- und VL-Domänen unterschiedliche Antigene erkennen können. Ein Vorteil dieser symmetrischen Formate ist, dass sie aus Homodimeren der leichten und schweren Kette gebildet werden, was die Expression und Reinigung der Antikörper deutlich erleichtert. Im Gegensatz dazu führt die Expression von asymmetrischen bispezifischen Antikörpern, die jedes Antigen nur monovalent binden und aus verschiedenen leichten und schweren Ketten gebildet werden, zu einem hohen Grad an fehlgepaarten Antikörpern. Um dies zu verhindern, wurden verschiedene Strategien entwickelt um die gewünschte Heterodimerisierung der unterschiedlichen Ketten zu forcieren. Eine Möglichkeit eine bevorzugte Heterodimerisierung der schweren Ketten zu erreichen ist die Verwendung von chimären Antikörpern, deren eine schwere Kette dem Maus IgG2a Isotyp und deren andere schwere Kette dem Ratten IgG2b Isotyp entspricht (Triomab, Abbildung 1). Dieser Isotypen-Mix bildet bevorzugt Heterodimere und bietet so eine einfache Möglichkeit die Heterodimerisierung der schweren Ketten zu erreichen (9; 10). Die am häufigsten beschriebene Methode um die gewünschte Paarung von unterschiedlichen schweren Ketten zu erreichen, stellt allerdings die *knob-*

into-hole (kih) Methode dar (11). Dabei wird in einer der schweren Ketten eine kleine Aminosäure durch eine große Aminosäure (*knob*), zum Beispiel ein Threonin durch ein Tyrosin, ersetzt und in der zweiten schweren Kette in gegenüberliegender Position eine große Aminosäure durch eine kleinere Aminosäure (*hole*). Dies führt dazu, dass es primär zu der gewünschten Heterodimerisierung der schweren Ketten kommt und prozentual weniger Homodimere gebildet werden. Zwei Konstrukte in denen die *knob-into-hole* Methode genutzt wird, sind CrossMab und kih IgG. Dabei unterscheiden sich beide Formate jedoch in der gewählten Methode, welche eine Fehlpaarung der leichten Ketten verhindern soll. So nutzt das kih IgG die sogenannte *common light chain* (eine leichte Kette, die gemeinsam von beiden schweren Ketten gebunden wird und die Bindung an beide Antigene ermöglicht), wohingegen bei der CrossMab Technologie für ein Paar aus leichter und schwerer Kette die CH1- Domäne mit der konstanten Domäne der leichten Kette getauscht wurde und so eine korrekte Paarung der leichten Ketten forciert wird (12). Immunglobulin-artige Formate bieten durch ihren Fc-Teil einige Vorteile gegenüber kleineren Formaten. So können zum einen für herkömmliche monoklonale Antikörper entwickelte Methoden zur Herstellung und Reinigung wie zum Beispiel die Protein A-Chromatographie meist problemlos auf die bispezifischen Formate übertragen werden und zum anderen werden zahlreiche wertvolle Eigenschaften von monospezifischen Antikörpern über den Fc-Teil vermittelt. Dazu zählt unter anderem die Rekrutierung von Immunzellen für ADCC und ADCP, aber auch die Bindung von Komplement-Proteinen für CDC oder die Bindung des neonatalen Fc-Rezeptors, welcher ein Recycling der Antikörper und damit eine verlängerte Serumhalbwertszeit ermöglicht (13; 14).

Im Gegensatz zu den Immunglobulin-artigen Formaten zeichnen sich kleinere Formate durch eine erhöhte Gewebepenetration und geringere Serumhalbwertszeit aus. Dies führt zwar dazu, dass regelmäßige oder sogar kontinuierliche Infusionen während der Behandlung notwendig werden, ermöglicht aber auch eine bessere Kontrolle bei eventuell auftretenden Nebenwirkungen (15). Kleinere bispezifische Formate werden häufig durch die Fusion von zwei scFv hergestellt, die entweder als ein Polypeptid (BiTE, *Bispecific T cell Engager*) oder zwei Polypeptide (DART, *Dual-Affinity Retargeting*, Abbildung 1) exprimiert werden. Eine Alternative bieten Konstrukte, die über zwei Polypeptide exprimiert werden und eine bivalente Antigenbindung (tandAb, *Tandem diabody*) vermitteln können (16; 17; 18). Um die geringe Serumhalbwertszeit

von kleineren Formaten zu erhöhen, werden zusätzlich Fusionsproteine genutzt. Dabei wird durch zusätzliche Fusion von einem Fc-Teil (DART-Fc) oder humanem Serumalbumin (HSA, scFv-HSA-scFv) ähnlich zu den Immunglobulin-artigen Konstrukten das durch den neonatalen Fc-Rezeptor vermittelte Recycling genutzt um die Serumhalbwertszeit zu erhöhen (19).

Einer der Nachteile, den herkömmliche monoklonale Antikörper haben und der durch bispezifische Konstrukte verbessert werden kann, ist ihre Monospezifität. So handelt es sich bei den meisten Krebsarten um komplexe Krankheiten, die eine Vielzahl von Faktoren wie die gesteigerte Expression von verschiedenen Rezeptoren beinhalten, wodurch die alleinige therapeutische Behandlung eines einzelnen Faktors meist nicht ausreicht. So kann die Therapie mit monoklonalen Antikörpern zu einer angeworbenen Resistenz führen, die häufig auf eine Hochregulation der Expression von alternativen Rezeptoren zurückgeführt werden kann (20; 21). Folglich sollte die Blockierung von mehreren Rezeptoren durch Kombinationstherapien die therapeutische Effizienz verbessern und in der Tat wurden bereits vielversprechende Ergebnisse mit Kombinationstherapien, die gegen verschiedene Wachstumsfaktoren, verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder verschiedene Epitope eines Antigens gerichtet sind, erzielt (22; 23; 24). Dennoch erfordern Kombinationstherapien die Entwicklung und Zulassung von verschiedenen Antikörpern, was mit deutlich gesteigerten Kosten für die Entwicklung, die Herstellung und die klinische Erprobung verbunden ist. Eine günstigere Alternative zu Kombinationstherapien stellen deshalb bispezifische Antikörper dar, die mit beiden Spezifitäten gegen krebsrelevante Faktoren gerichtet sind. Einige Kombinationen gegen die bispezifische Antikörper in fortgeschrittenen klinischen Phasen bereits getestet werden sind: Ang-2 (Angiopoietin-2) und VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) und Her3 (*Human Epidermal growth factor Receptor 3*), IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) und Her3 oder Her1 und MET (*Mesenchymal-Epithelial Transition factor*) (8).

Ein weiterer großer Nachteil, den monospezifische Antikörper haben, ist, dass sie nicht in der Lage sind T-Zellen, die als die stärksten Immunzellen des humanen Immunsystems gelten, direkt zu rekrutieren (25; 26). T-Zellen besitzen zahlreiche wertvolle Eigenschaften, die sie zu einem vielversprechenden Werkzeug der Krebstherapie machen. So kommen T-Zellen in hoher Anzahl im menschlichen Immunsystem vor und vermitteln eine langanhaltende zytotoxische Wirkung, was sie zu einer großen Quelle

von Immunzellen macht, die in der Lage sind den Krebs zu attackieren und zu infiltrieren (25). Zusätzlich proliferieren T-Zellen in Folge einer Aktivierung sehr schnell und besitzen das Potenzial ein immunologisches Gedächtnis zu generieren, was zu einer langanhaltenden antitumoralen Wirkung führen kann (27). Dennoch exprimieren T-Zellen keine Fc-Rezeptoren und können folglich nicht direkt mit dem Fc-Teil von monoklonalen Antikörpern interagieren. Dieser Nachteil kann durch den Einsatz von bispezifischen Antikörpern, deren zweite Spezifität gegen den T-Zell Co-Rezeptor CD3 (*Cluster of Differentiation 3*) auf den T-Zellen gerichtet ist, umgangen werden. Durch die Bindung von CD3 werden T-Zellen effektiv rekrutiert und durch die weitere Spezifität des bispezifischen Antikörpers ist es möglich eine von den Restriktionen des MHC (*major histocompatibility complex*) unabhängige T-Zell-Antwort zu erzeugen (25; 26). Dies hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu einer natürlich auftretenden MHC-abhängigen T-Zell-Aktivierung, die zu einer monoklonalen T-Zell-Antwort führt, durch den bispezifischen Antikörper eine polyklonale T-Zell-Antwort erzeugt wird.

3.3 Bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörper

Es wurden bereits zwei bispezifische T-Zell-rekrutierende Antikörper zur Behandlung zugelassen, Catumaxomab (Removab[®], 2009) und Blinatumomab (Blinicyto[®], 2014). Beide unterscheiden sich dabei maßgeblich in ihrem Format und ihrem Ansatz T-Zellen zu rekrutieren und beide haben dadurch bestimmte Vor- und Nachteile gegenüber dem jeweils anderen Format.

Der erste T-Zell-rekrutierende Antikörper, der behördlich zugelassen wurde, ist Catumaxomab, ein sogenannter trifunktionaler bispezifischer Antikörper, der gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM, *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) gerichtet ist. Catumaxomab ist ein Triomab und besteht folglich aus zwei Halbantikörpern der Maus IgG2a und Ratten IgG2b Isotypen (Abbildung 3). Neben der Rekrutierung von T-Zellen durch die Bindung an CD3 können an den dadurch gebildeten chimären Fc-Teil zusätzlich auch Fcγ-Rezeptor I, IIa und III-positive Immunzellen binden. Dies ermöglicht es Catumaxomab gleichzeitig T-Zellen aber auch andere Arten von Immunzellen wie NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen zu aktivieren, was die Stärke der antitumoralen Wirkung von Catumaxomab deutlich erhöht (28; 29; 30). Die gleichzeitige Bindung von T-Zelle, Krebszelle und einer weiteren Immunzelle wird als Tri-Zell-

Komplex beschrieben (Abbildung 2) und bietet neben der alleinigen Aktivierung von weiteren Immunzellen auch eine physiologische Costimulation für die T-Zellen. Die so vermittelte Costimulation führt dabei zu einer gesteigerten T-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung im Vergleich zu der alleinigen Bindung über CD3. Neben den T-Zell abhängigen Wirkmechanismen vermittelt Catumaxomab durch die breite Aktivierung von verschiedenen Immunzellen diverse weitere antitumorale Mechanismen wie die antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität (ADCC) oder Phagozytose (28). Zusätzlich zu den positiven Effekten auf die antitumorale Wirkung, ist ein weiterer Vorteil die durch den chimären Fc-Teil vermittelte verlängerte Serumhalbwertszeit durch Recycling über den neonatalen Fc-Rezeptor.

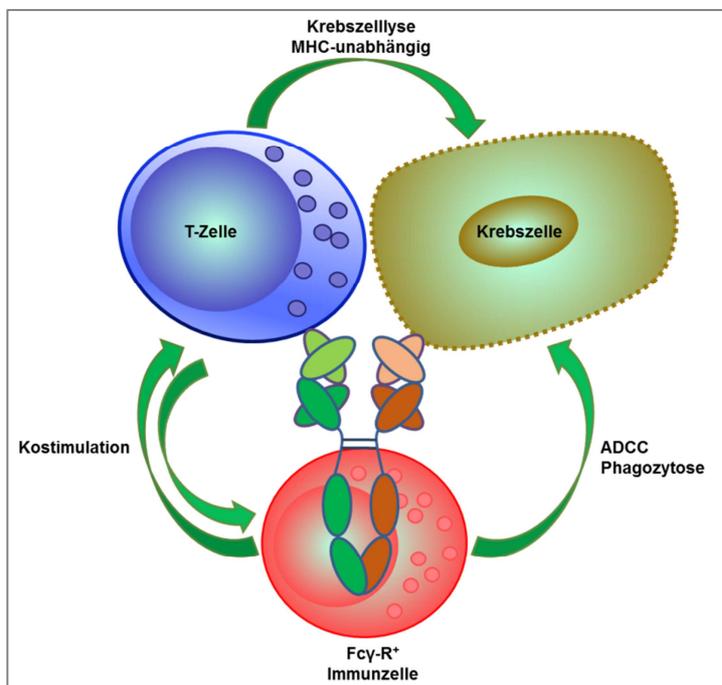


Abbildung 2: Schematische Darstellung des durch Catumaxomab vermittelten Tri-Zell-Komplexes. Die gleichzeitige Bindung von Tumorantigenen, CD3 auf einer T-Zelle und zusätzlicher Fc γ -Rezeptor-positiver Immunzelle führt zur Bildung des Tri-Zell-Komplexes, bei dem durch gegenseitige Costimulation die T- und Immunzellaktivierung gesteigert wird, was zu einer erhöhten antitumoralen Wirkung führt. Adaptiert nach Chelius et al., 2010 (10).

Auch wenn die Bildung des Tri-Zell-Komplexes zu einer gesteigerten T-Zell-Aktivierung führt, ist ein Nachteil dieses Ansatzes, dass die Bindung von T-Zellen über CD3 bei gleichzeitiger Bindung von weiteren Fc γ -Rezeptor-positiven Immunzellen bereits ausreicht um eine Aktivierung der T-Zellen und weiterer Immunzellen zu erreichen (31). Dadurch kann Catumaxomab eine vom eigentlichen Krebsantigen-unabhängige Aktivierung von Immunzellen vermitteln, welche zu Tumorantigen-unabhängiger Toxizität führen kann (32). Die klinische Anwendung von Catumaxomab ist durch starke

Nebenwirkungen wie dem *cytokine release syndrome* geprägt, welche bis heute eine intravenöse Gabe von Catumaxomab verhindern. So wurde Catumaxomab nur für die intraperitoneale Behandlung von malignem Aszites zugelassen und es ist nach wie vor nicht vollständig untersucht, welchen Anteil die Tumorantigen-unabhängige Aktivierung, die nicht humane Ratten-Maus-Hybrid Struktur oder die sehr breite Expression von EpCAM auf Normalgewebe an den beobachteten starken Nebenwirkungen haben (33; 34).

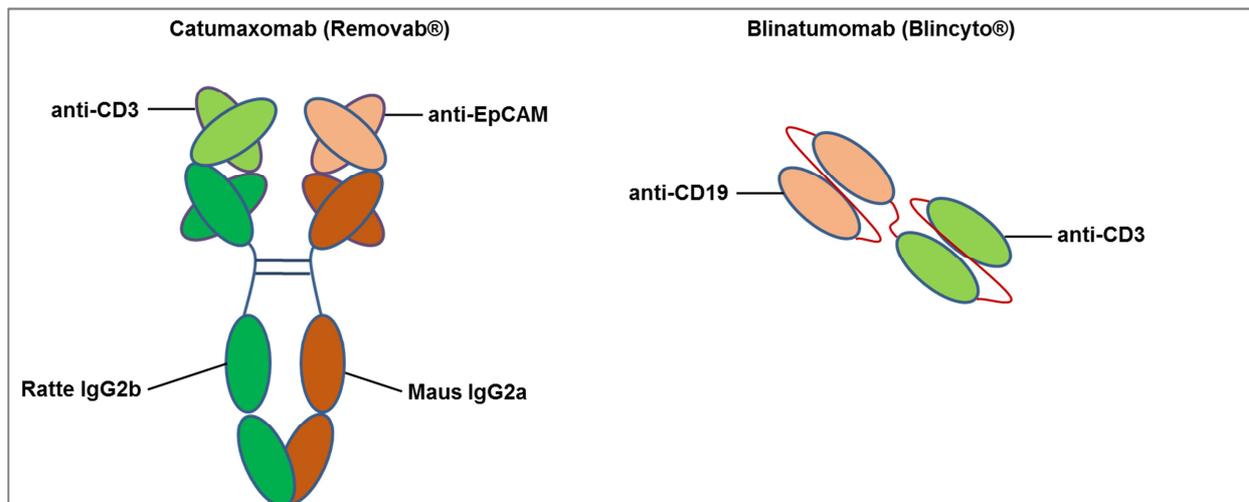


Abbildung 3: Schematische Illustration von Catumaxomab und Blinatumomab.

Catumaxomab wird aus zwei Halbantikörpern des Ratten IgG2b und Maus IgG2a Isotyps gebildet. Blinatumomab hingegen besteht aus zwei scFv, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind.

Im Gegensatz dazu wird Blinatumomab (Blincyto[®]), der zweite T-Zell-rekrutierende bispezifische Antikörper, der zur Behandlung von rezidierten oder refraktären B-Vorläufer akuten lymphatischen Leukämien zugelassen wurde, im BiTE[®] Format produziert. Dabei wurden die VH- und VL-Domänen von zwei gegen CD3 auf T-Zellen und CD19 (*Cluster of Differentiation 19*) auf B-Zellen gerichteten Antikörpern über flexible Linker miteinander verbunden (Abbildung 3). Blinatumomab vermittelt dieselben T-Zell-abhängigen Wirkmechanismen wie Catumaxomab. So aktiviert Blinatumomab T-Zellen und induziert deren Proliferation, Differenzierung und die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität. Da Blinatumomab allerdings alleinig T-Zellen über CD3 bindet und durch den fehlenden Fc-Teil keine weiteren Immunzellen gebunden werden, ist die CD19-Bindung notwendig um eine Stimulation der T-Zellen zu erreichen (35). Obwohl eine strikt antigenabhängige T-Zell-Aktivierung aktuell als allgemein wichtige und wertvolle Eigenschaft angesehen wird, hat auch dieser Ansatz seine eigenen Einschränkungen.

So zeigen neuere Studien, dass hauptsächlich Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, eine Untergruppe der T-Zellen, die unabhängig von Costimulation funktionieren, zu der Effektivität von Blinatumomab und vergleichbaren Formaten beitragen (36). Andere T-Zell Untergruppen hingegen werden aufgrund der fehlenden Costimulation nicht vollständig genutzt, sodass eine zusätzliche Costimulation nötig ist um das vollständige Potenzial des T-Zell-Repertoires zu nutzen und eine gesteigerte Zytotoxizität zu erreichen (37; 38). Eine weitere umstrittene Eigenschaft von BiTE-Konstrukten ist ihre geringe Serumhalbwertszeit. Auf der einen Seite erlaubt die geringe Serumhalbwertszeit eine schnelle Unterbrechung der Therapie, wenn behandlungsabhängige Nebenwirkungen auftreten, was ein großer Vorteil für die Sicherheit dieser Antikörper ist. Auf der anderen Seite jedoch sind durch die geringe Serumhalbwertszeit durchgängige Infusionen notwendig, die eine große Herausforderung für die meisten Patienten darstellen (39). Obwohl die BiTE-vermittelte T-Zell-Aktivierung in *in-vitro* Versuchen strikt antigenabhängig ist, wurde dennoch eine antigenunabhängige T-Zell Umverteilung bei der klinischen Anwendung beschrieben, welche möglicherweise einen Einfluss auf die bei der Behandlung mit Blinatumomab häufig auftretenden Nebenwirkungen des Zentralnervensystems hat. Es ist allerdings zurzeit noch nicht sicher, ob die beobachteten Nebenwirkungen des Zentralnervensystems mit der Bindung an CD3 auf den T-Zellen oder der Bindung an CD19 zusammenhängt (40).

Auch wenn T-Zell-rekrutierende Antikörper sehr vielversprechende Therapeutika sind, ist aufgrund der hohen Wirksamkeit von T-Zellen eine größtmögliche Tumorspezifität notwendig um die sogenannte *on-target/off-tumor* Toxizität zu vermeiden. So werden die meisten für die Krebstherapie genutzten Antigene auf Krebszellen lediglich stärker exprimiert, sind aber auch auf zahlreichen Normalgeweben vorhanden, was das therapeutische Fenster für T-Zell-rekrutierende Antikörper sehr klein macht. Daher richten sich die meisten zurzeit entwickelten T-Zell-rekrutierenden Antikörper gegen hämatologische Tumore um durch die Bindung von Antigenen, die nur auf hämatologischen Zellen exprimiert werden, ungewollte Nebenwirkungen zu reduzieren. Im Bereich der soliden Tumore ist die Wahl des passenden Antigens aufgrund der sehr breiten Expression auf Normalgeweben deutlich schwieriger und zahlreiche Ansätze zeigen hohe Nebenwirkungen durch *on-target/off-tumor* Toxizität (41; 42; 34). Daher ist die einzige Möglichkeit solche Nebenwirkungen zu verhindern hochspezifische Antigene zu nutzen, die keine Expression auf Normalgewebe zeigen, wie zum Beispiel eine

mutierte Variante des EGF-Rezeptors EGFRvIII (43). Da die Auswahl an bekannten Antigenen, die dieser Anforderung entsprechen, allerdings sehr begrenzt ist gilt eins der größten Interessen der derzeitigen Forschung der Evaluierung neuer Antigene, die eine möglichst geringe *off-tumor* Expression zeigen und für die Rekrutierung von T-Zellen geeignet sind.

3.4 Mucin 1

3.4.1 Struktur und Expression

Epitheliales Mucin 1 (MUC-1) ist ein stark glykosyliertes Typ 1 Transmembranprotein Heterodimer, das vom MUC1 Gen kodiert wird. Während seiner Synthese wird MUC-1 im endoplasmatischen Retikulum proteolytisch in zwei Fragmente gespalten. Dabei entstehen die größere N-terminale Untereinheit (MUC1-N) und die kleinere C-terminale Untereinheit (MUC1-C), wobei beide Untereinheiten über nichtkovalente Wechselwirkungen weiter miteinander verbunden bleiben (Abbildung 4).

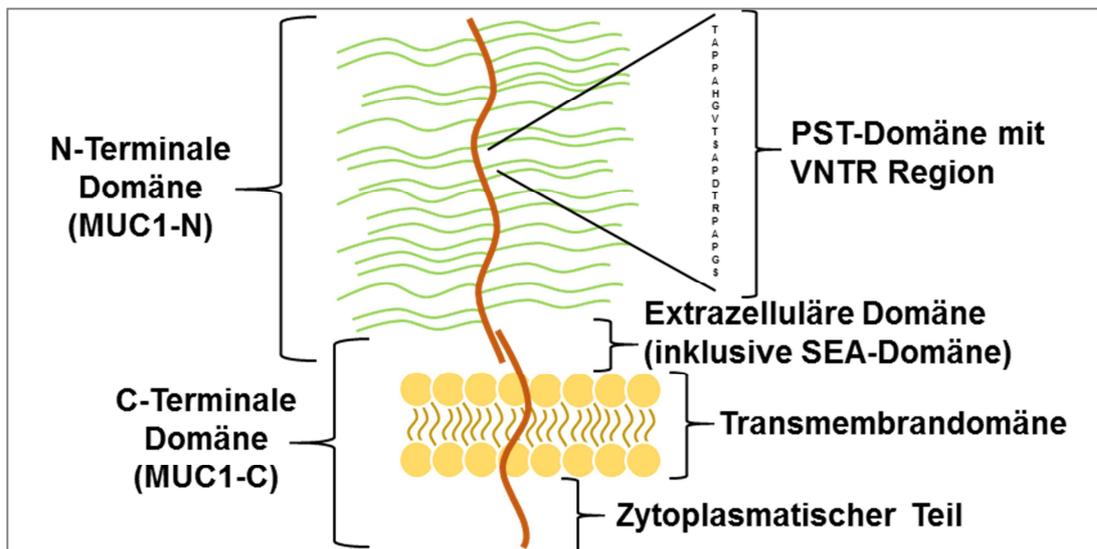


Abbildung 4: Schematische Darstellung von MUC-1.

Die C-terminale Untereinheit (MUC1-C) von MUC-1 besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Teil und ist über die SEA-Domäne (Sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) mit der N-terminalen Untereinheit (MUC1-N) durch nichtkovalente Wechselwirkungen verbunden. MUC1-N besteht aus der PST-Domäne die wiederum aus einer variablen Anzahl an Tandem-Wiederholungen (VNTR Region) aus je 20 Aminosäuren mit fünf potentiellen O-Glykosilierungsstellen besteht. Adaptiert nach Gendler et al., 1990 (46).

Die Untereinheit MUC1-C besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Teil. MUC1-N hingegen besteht aus einer Prolin-, Serin- und Threonin-reichen Domäne (PST-Domäne) sowie der SEA-

(*Sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin*) Domäne, welche auch die Spaltstelle beinhaltet, und bildet den extrazellulären Bereich von MUC-1 (44). Die PST-Domäne selbst besteht wiederum aus einer variablen Anzahl an Tandem-Wiederholungen (VNTR Region, *variable number tandem repeat*) aus je 20 Aminosäuren mit fünf potentiellen O-Glykosilierungsstellen, von denen je nach Individuum 20-120 Wiederholungen exprimiert werden (45). In gesundem Gewebe wird MUC-1 auf der apikalen Zelloberfläche von nahezu allen epithelialen Geweben, wie zum Beispiel den Brustdrüsen, der Lunge, der Niere, der Gallenblase, dem Uterus, dem Magen, dem Oesophagus, der Prostata und dem Pankreas exprimiert (47). Aber auch einige hämatopoetische Zellen wie aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Erythroblasten exprimieren MUC-1 (48; 49; 50).

3.4.2 Funktion

Einhergehend mit der weit verbreiteten Expression von MUC-1 wurden auch zahlreiche verschiedene Funktionen beschrieben. So ist ähnlich zu sekretorischen Mucinen auch MUC-1 bei der Bildung und Aufrechterhaltung des Mucus beteiligt und hat dadurch unter anderem eine schützende Funktion vor bakteriellen Infektionen und viralen Pathogenen (51; 52). Weiterhin wurde eine Rolle von MUC-1 bei Zell-Zell-Interaktionen durch Adhäsions- und Anti-Adhäsions-Mechanismen beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass MUC-1 sowohl Zell-Zell, als auch Zell-Matrix Interaktionen blockieren kann, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass MUC-1 durch die Größe und den Aufbau seiner extrazellulären Domäne andere Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel N-CAM (*Neural cell adhesion molecule*), die eine relativ kurze extrazelluläre Domäne ausbilden, maskiert und damit ihre Interaktion mit anderen Adhäsionsmolekülen sterisch hindert. Zudem scheint die hohe Anzahl an Sialinsäuren der VNTR Region durch ihre negative Ladung einen entscheidenden Einfluss auf die Adhäsion von Zellen zu haben (53; 54). Im Gegensatz dazu kann MUC-1 aber auch an Adhäsionsvorgängen beteiligt sein. So kann MUC-1 unter anderem auch die Lewis Blutgruppenantigene sialyl-Lewis^x und sialyl-Lewis^a tragen, welche wiederum von Selektinen erkannt und gebunden werden können (55). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die VNTR Region von MUC-1 an ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) bindet und somit zur Zellbindung beiträgt (56; 57). Zusätzlich scheint auch die hoch konservierte zytoplasmatische Domäne von MUC-1 einen Einfluss auf die Zell-Zell Interaktion durch Beteiligung an

zahlreichen Signalwegen zu haben. Dafür spricht neben der starken Konservierung der zytoplasmatischen Domäne auch, dass sie sieben Tyrosin-Phosphorylierungsstellen sowie Bindestellen für SH2 (*Src-homology 2*)-Domänen Proteine und Kinasen enthält (58; 59). Zu den verschiedenen Proteinen, die mit MUC-1 interagieren, gehören unter anderem die c-src Tyrosinkinase, die Serinkinase GSK3 β (Glykogensynthase-Kinase 3 β), Grb2/SOS (*Growth factor receptor-bound protein 2/Son of Sevenless*), das an der Ras-Signalkaskade beteiligt ist, sowie β -Catenin, welches am WNT- und src-Signalweg beteiligt ist (60; 61; 62).

3.4.3 MUC-1 bei Krebserkrankungen

Neben den vielfältigen Funktionen in gesundem Gewebe gilt MUC-1 auch als Onkoprotein. So vermittelt MUC-1 die Produktion von Wachstumsfaktoren und fördert die Glukoseaufnahme und den Stoffwechsel von Tumorzellen, was deren Überleben und der Proliferation dient. Zudem wurde auch eine Beteiligung von MUC-1 an Tumorinvasion, Metastasierung, Angiogenese sowie der Resistenz gegen Apoptose und Chemotherapeutika gezeigt (46). Durch seine vielfältige Beteiligung an der Entwicklung und dem Verlauf von Krebserkrankungen dient MUC-1 seit Mitte der 80er Jahre vor allem bei Brustkrebspatienten als Tumormarker und als vielversprechendes Tumorantigen (63). Die Gründe dafür liegen trotz seiner breiten Expression in gesundem Gewebe zum einen darin, dass die hauptsächlich apikale Expression von MUC-1 in gesundem Gewebe in Tumorgewebe verloren geht, wodurch MUC-1 für therapeutische Antikörper erreichbar wird, und zum anderen darin, dass MUC-1 in epithelialen Tumoren zusätzlich stark überexprimiert wird (54).

3.4.4 TA-MUC1 und PankoMab-GEX[®]

Eine Eigenschaft, die MUC-1 zu einem vielversprechenden Antigen für die Rekrutierung von T-Zellen macht, ist eine in Tumorgewebe veränderte O-Glykosylierung durch die im Vergleich zu Normalgewebe neue Peptidepitope und neue Kohlenhydrat-Tumorantigene zugänglich werden (64). PankoMab-GEX[®] ist ein von der Glycotope GmbH entwickelter humanisierter und glykooptimierter monoklonaler Antikörper, der ein solches tumorspezifisches Kohlenhydrat/Protein Kombinationsepitop von MUC-1 (TA-

MUC1) erkennt und dadurch zwischen TA-MUC1 auf Tumorgewebe und MUC-1 auf Normalgewebe unterscheiden kann (65).

TA-MUC1 verbindet die durch die aberrante Glykosylierung vermittelte ausgezeichnete Tumorspezifität mit der hohen Affinität eines Proteinepitops. PankoMab-GEX[®] erkennt dabei innerhalb der Tandem-Wiederholungen von MUC-1 die PDTRP Sequenz (Prolin, Asparaginsäure, Threonin, Arginin, Prolin), wenn das Threonin eine TF (Thomsen-Friedenreich Antigen) oder Tn (TF Vorläufer) Glykosylierung trägt. Die Expression von TA-MUC1 auf humanen Tumorgeweben wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht (66; 67; 68; 69; 70). Dabei konnte gezeigt werden, dass TA-MUC1 in außergewöhnlich vielen epithelialen Tumorarten wie zum Beispiel in Ovarial- und Lungenkarzinomen sowie in Brustkrebsarten in einem hohen Maße (80%-100% der Tumore) exprimiert wird, was die therapeutische Relevanz von TA-MUC1 unterstreicht. Weitere therapeutisch interessante Indikationen, die eine hohe TA-MUC1 Expression zeigen, sind Karzinome mit Ursprung in Zervix, Endometrium, Niere, Urothel und den Schilddrüsen (Glycotope GmbH, nicht veröffentlicht). Weitere Eigenschaften, die TA-MUC1 zu einem wertvollen Antigen für die Krebstherapie machen, sind die Expression auf nahezu allen Zellen der positiven Tumore sowie die Expression auf Metastasen und Krebsstammzellen (Glycotope GmbH, nicht veröffentlicht). Eine erste klinische Bestätigung für die Eignung von TA-MUC1 als wertvolles Antigen für die Krebstherapie hat die Phase-I Studie von PankoMab-GEX[®] bereits geliefert. Dabei zeichnete sich PankoMab-GEX[®] als sicher und gut verträglich, sowie mit einer vielversprechenden anti-Tumor Wirkung aus. Zusätzlich konnten keine antigenabhängigen Toxizitäten beobachtet werden, sodass PankoMab-GEX[®] aktuell in einer Phase-IIb Studie als Erhaltungstherapie bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom getestet wird (71).

3.5 Fragestellung

T-Zell-rekrutierende bispezifische Antikörper sind vielversprechende Wirkstoffkandidaten für die Tumortherapie. Durch die hohe Wirksamkeit der T-Zellen sind jedoch Antigene mit höchster Tumorspezifität nötig um starke *on-target/off-tumor* Toxizität, die für die meisten Antigene, die in der Antikörpertherapie verwendet werden, häufig ist, zu vermeiden. Die einzigartige Tumorspezifität von TA-MUC1 verbunden mit der nahezu nicht vorhandenen Normalgewebsbindung und der breiten Indikations- und

Patientenabdeckung machen TA-MUC1 zu einem aussichtsreichen Antigen für die Rekrutierung von T-Zellen. In dieser Arbeit sollten ausgehend von PankoMab-GEX[®] verschiedene T-Zell-rekrutierende bispezifische Antikörper entwickelt werden um die Eignung von TA-MUC1 für die T-Zell-Rekrutierung zu untersuchen. Um einen Vergleich zu bereits beschriebenen Antigenen zu haben, wurden zusätzlich vergleichbare Konstrukte auf der Basis von Trastuzumab, einem bereits behördlich zugelassenen Antikörper gegen das Antigen Her2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) entwickelt. Dabei sollten sowohl T-Zell-abhängige Mechanismen wie T-Zell-Aktivierung und Zytotoxizität als auch die Ausschüttung von Zytokinen als erste Einschätzung über die Sicherheit einer therapeutischen Anwendung untersucht werden. Da die Eigenschaften von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern deutlich durch die Wahl des jeweiligen Formates beeinflusst werden, wurden für diese ersten *proof of concept* Studien Formate gewählt, die auf den IgG1 Varianten von PankoMab-GEX[®] und Trastuzumab beruhen. So sollte sichergestellt werden, dass ähnlich zu Catumaxomab, über die zusätzliche Rekrutierung von Fcγ-Rezeptor-positiven Immunzellen weitere Costimulationen für die T-Zellen vermittelt werden und eine Nutzung des gesamten T-Zell-Repertoires möglich wird. Um die Bindung von Fcγ-Rezeptor-IIIa positiven Immunzellen zu optimieren, wurden die Antikörper zudem in der humanen GEX[®]-Fuc- Zelllinie des GlycoExpress[®] (GEX[®]) Systems der Glycotope GmbH exprimiert. GEX[®]-Fuc- besitzt ein reduziertes Fucosylierungspotential was zur Produktion von Antikörpern mit reduziertem Fucosegehalt führt, welche eine deutlich erhöhte Bindung an den Fcγ-Rezeptor-IIIa zeigen.

4. Methodik

4.1 Zellkultur

4.1.1 Isolation von PBMCs aus Leukapheresaten

Die Leukapheresate wurden vom Institut für Transfusionsmedizin der Charité Berlin oder dem Haema Blutspendedienst Rostock bezogen. Um PBMCs aus dem Leukapheresat zu gewinnen, wurde die Ficoll-Dichtezerifugation eingesetzt. 20 ml Biocoll Separating Solution (Biochrom, Berlin) wurden mit 10 ml Leukapheresat überschichtet und bei 1045 x g für 12 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die dem Biocoll aufliegende Schicht abgenommen, auf vier 50 ml Röhrchen (TPP, Trasadingen) aufgeteilt und auf jeweils 50 ml mit PBS aufgefüllt, bevor sie erneut bei 700 x g für 10 min bei RT zentrifugiert wurden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellpellets vereinigt und zwei Mal in 25 ml PBS bei 311 x g für 10 min und RT gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Um die PBMCs zu kryokonservieren, wurden sie in Einfriermedium aus 15% AIMV Medium (Gibco, Karlsruhe), 75% hitzeinaktiviertem FKS (Biochrom, Berlin) und 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf 4×10^7 vZ/ml eingestellt und in Flüssigstickstoff eingefroren.

4.1.2 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Zelllinien. Die verschiedenen Zelllinien wurden in ihrem entsprechenden Medium (Biochrom, Berlin; Octapharma, Langenfeld) in Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ kultiviert. Adhärent wachsende Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von ~80% mit Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe) oder Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pasching) vom Flaschenboden gelöst. Suspensionszelllinien wurden durch Verdünnung mit neuem Medium bei Zelldichten zwischen 2×10^5 vZ/ml und 1×10^6 vZ/ml kultiviert.

Tabelle 1: Verwendete humane Tumorzelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Wachstum	Medium
GEX [®] -Fuc ⁻	CML	Suspension	GTM, 0,1% HSA
GEX [®] -H9D8	CML	Suspension	GTM, 0,002% HSA, 1xHT-Supplement, 1x Cycl. LLL
Jurkat	T-Zell Leukämie	Suspension	RPML, 10% FKS, 1% Glutamin
MCF-7	Mammakarzinom	adhärent	RPML, 10% FKS, 1% Glutamin
T-47D	Mammakarzinom	adhärent	RPML, 10% FKS, 1% Glutamin
ZR-75-1	Mammakarzinom	adhärent	RPML, 10% FKS, 1% Glutamin

4.1.3 Einfrieren von Zellen und Lagerung

Serumfrei kultivierte Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^6 vZ/ml mit je 1 ml pro Kryoröhrchen (Cotech, Berlin) eingefroren. Als Einfriermedium wurde Kulturmedium ohne Selektionsdruck und 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Bei serumhaltigen Zellkulturen wurde als Einfriermedium Kulturmedium mit 7,5% DMSO verwendet.

4.1.4 Zellzählung

Zellzählungen wurden entweder mit dem Guava[®] easyCyte (Merck Millipore, Darmstadt) nach Herstellerangaben oder dem Luna-FL Automated Cell Counter (Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq) mittels Trypanblau (Biochrom, Berlin) oder dem AO/PI Cell Viability Kit (Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq) durchgeführt. Alternativ wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und in Neubauer-Zählkammern (VWR, Darmstadt) gezählt.

4.1.5 Generierung stabiler Einzelklone zur Antikörperproduktion

4.1.5.1 Transiente Transfektion

Am Vortag der transienten Transfektion wurden die GEX[®]-H9D8-Zellen mit 2×10^5 vZ/ml ausgesät und über Nacht in GTM (Biochrom, Berlin) mit 1x HT-Supplement (Gibco, Karlsruhe) und 1x Cyclodextrin LLL (Linolsäure-Cyclodextrin, Linolensäure-Cyclodextrin, Liponsäure-Cyclodextrin; Cyclolab, Budapest) bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am Tag der Transfektion erfolgte eine weitere

Zellzahlbestimmung und die Zellen wurden erneut auf 2×10^5 vZ/ml eingestellt. Für einen 100 ml Ansatz wurden 100 µg DNA ($V_H:V_L$ Verhältnis von 2:1) in 20 ml Opti-MEM® (Gibco, Karlsruhe) aufgenommen und 100 µl Plus™ Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugegeben. Nachdem die Lösung durch vortexen gemischt wurde, wurde sie für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden der Lösung 300 µl Lipofectamine® LTX (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben, gemischt, und weitere 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA-Lösung erneut gemischt und tropfenweise unter Schwenken zu den Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Der Kulturüberstand wurde nach 4 Tagen geerntet und bei -20°C eingefroren. Folgende Expressionsvektoren wurden verwendet:

Tabelle 2: Für die transiente Transfektion verwendete Vektoren.

Vektorname	Konstrukt
pEFdhfrmut(-)Ck_OKT3mVL	leichte κ-Kette Okt3.1 und Okt3.2 IgG1
pEFpuroCg1_OKT3mVH1	schwere γ-Kette Okt3.1 IgG1
pEFpuroCg1_OKT3mVH2	schwere γ-Kette Okt3.2 IgG1
pEFpuroCg1_UCHT1mVH	schwere γ-Kette cUCHT1 IgG1
pEFdhfrmut(-)Ck_UCHT1mVL	leichte κ-Kette cUCHT1 IgG1
pEFpuroCg1_UCHT1hVH	schwere γ-Kette hUCHT1 IgG1
pEFdhfrmut(-)Ck_UCHT1hVL	leichte κ-Kette hUCHT1 IgG1

4.1.5.2 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion der GEX®-Fuc⁻-Zellen wurde durch Elektroporation mit dem Cell Line Nucleofector® Kit (Amaxa, Köln) durchgeführt. In Vorbereitung auf die Transfektion wurde zunächst die Nucleofector® Solution durch Zugabe von Supplement 1 zu der Nucleofector® Solution nach Herstellerangaben angesetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden pro Transfektionsansatz 2×10^6 vZ/ml der am Vortag mit 2×10^5 vZ/ml ausgesäten Zellen in ein 15 ml Röhrchen (TPP, Trasadingen) überführt und 5 min bei RT und 300 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden 100 µl Nucleofector® Solution mit 9 µg DNA gemischt und das Zellpellet nach Abnahme des Überstandes in der Nucleofector®-DNA-Solution resuspendiert. Der Zell-DNA-Mix wurde anschließend in die Elektroporationsküvette überführt und mit dem Nucleofector® (Amaxa, Köln) elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in GTM-Medium überführt und in 6-well Platten für 48 h kultiviert, bevor das entsprechende

Selektionsmedium zugegeben wurde. Folgende Vektoren wurden für die stabile Transfektion verwendet:

Tabelle 3: Für die stabile Transfektion verwendete Vektoren.

Vektorname	Konstrukt
pHBG1AdhfrCkn_hPMVLn	leichte κ -Kette hPankoMab IgG1
pHBG1ApuroCg1nCH3-4GS-Okt3.1scFv_hPMVHn	schwere γ -Kette hPankoMab IgG1 mit Okt3.1 scFv an der CH3-Domäne
pHBG1ApuroCg1nCH3-4GS-Okt3.2scFv_hPMVHn	schwere γ -Kette hPankoMab IgG1 mit Okt3.2 scFv an der CH3-Domäne
pHBG1ApuroCg1nCH3-4GS-Ucht1scFv_hPMVHn	schwere γ -Kette hPankoMab IgG1 mit cUCHT1 scFv an der CH3-Domäne
pHBG1ApuroCg1n_hPMVHn	schwere γ -Kette hPankoMab IgG1
pHBG1AdhfrCkn-4GS-Okt3-1scFv_hPMVLn	leichte κ -Kette hPankoMab IgG1 mit Okt3.1 scFv an der C κ -Domäne
pHBG1AdhfrCkn-4GS-Okt3-2scFv_hPMVLn	leichte κ -Kette hPankoMab IgG1 mit Okt3.2 scFv an der C κ -Domäne
pHBG1AdhfrCkn-4GS-Ucht1scFv_hPMVLn	leichte κ -Kette hPankoMab IgG1 mit cUCHT1 scFv an der C κ -Domäne
pHBG1AdhfrCkneu_hTrasVLneu	leichte κ -Kette hTrastuzumab IgG1
pHBG1ApuroCg1nCH3-4GS-Okt3.1scFv_hTMVHn	schwere γ -Kette hTrastuzumab IgG1 mit Okt3.1 scFv an der CH3-Domäne
pHBG1ApuroCg1nCH3-4GS-Okt3.2scFv_hTMVHn	schwere γ -Kette hTrastuzumab IgG1 mit Okt3.2 scFv an der CH3-Domäne
pHBG1ApuroCg1nCH3-4GS-Ucht1scFv_hTMVHn	schwere γ -Kette hTrastuzumab IgG1 mit cUCHT1 scFv an der CH3-Domäne
pHBG1ApuroCg1n_hTrasVHn	schwere γ -Kette hTrastuzumab IgG1
pHBG1AdhfrCkn-4GS-Okt3.1scFv_hTrasVLn	leichte κ -Kette hTrastuzumab IgG1 mit Okt3.1 scFv an der C κ -Domäne
pHBG1AdhfrCkn-4GS-Okt3.2scFv_hTrasVLn	leichte κ -Kette hTrastuzumab IgG1 mit Okt3.2 scFv an der C κ -Domäne
pHBG1AdhfrCkn-4GS-Ucht1scFv_hTrasVLn	leichte κ -Kette hTrastuzumab IgG1 mit cUCHT1 scFv an der C κ -Domäne

4.1.5.3 Amplifikation und Selektion

Zwei Tage nach erfolgter Transfektion wurde den Zellen Selektionsmedium mit Methotrexat (Sigma Aldrich, Steinheim) und Puromycin (Takara Bio Eur., St. Germain-en-Laye) zugesetzt. Durch die Methotrexat beziehungsweise Puromycin Zugabe wurden die Zellen selektiert, die die leichte beziehungsweise schwere Kette stabil integriert haben. Zusätzlich wurde der eingesetzte Selektionsdruck schrittweise erhöht um eine Genamplifikation und dadurch gesteigerte Produktivität zu erreichen. In Abhängigkeit der Vitalität und des Zellwachstums wurde dabei folgendes Amplifikations-schema verwendet:

Tabelle 4: Verwendetes Amplifikationsschema.

Amplifikationsstufe	Methotrexat [nM]	Puromycin [$\mu\text{g/ml}$]
1. Amplifikationsstufe	50	0,4
2. Amplifikationsstufe	100	0,4
3. Amplifikationsstufe	200	0,8
4. Amplifikationsstufe	400	1,6
5. Amplifikationsstufe	800	3,2

4.1.5.4 Klonierung von Zellen durch Aussaat in semisolidem Medium

Die Klonierung von Zellen durch Aussaat in semisolidem Medium dient dazu, eine genetisch einheitliche Zellpopulation zu erhalten. Hierfür wurden 50 ml 2x konzentriertes GTM-Medium (Biochrom, Berlin), 40 ml CloneMatrix Concentrate for semi-solid media (Molecular Devices, Biberach an der Riß) sowie 500 μl HSA 20% (Octapharma, Langenfeld) und 1x Cyclodextrin LLL gemischt und das semisolidem Medium mit sterilem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die zu klonierenden Zellen (500 Zellen/ml) sowie 500 μl CloneDetect Human IgG (H+L) Specific, FITC (Molecular Devices, Biberach an der Riß) zur Detektion der produzierten Antikörper zugegeben. Die Zellen wurden im semisolidem Medium mit dem Antikörper mit je 2 ml/well in 6-well Platten (Greiner CELLSTAR für Suspensionskultur, Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät und bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit für 14 Tage kultiviert. Die am stärksten fluoreszierenden Einzelzellkolonien wurden danach durch den ClonePix FL (Molecular Devices, Biberach an der Riß) identifiziert und in 96-well Platten mit GTM-Medium ohne Selektionsdruck überführt. Entsprechend dem Wachstum der einzelnen Zellklone wurden die Zellen zunächst in 24-well Platten und anschließend in 6-well Platten mit GTM-Medium und Selektionsdruck überführt. Nachdem die Zellen mindestens 10 Tage unter Selektionsdruck gewachsen waren, wurde die spezifische Produktivitätsrate bestimmt.

4.1.5.5 Bestimmung der spezifischen Produktivitätsrate

Die spezifische Produktivitätsrate (SPR) wird in Pikogramm pro Zelle pro Tag (pcd) angegeben und beschreibt die Menge an Antikörper, die pro Zelle an einem Tag produziert wird. Um die SPR zu bestimmen, wurden die Zellen mit einer

Ausgangszellzahl von 4×10^4 Zellen/ml in frischem GTM-Medium ohne Selektionsdruck aufgenommen und je 500 μ l in 24-well Platten ausgesät. Nach 3 Tagen wurden die Zellzahl (siehe 4.1.4) sowie die Proteinmenge im Überstand mittels Titer-ELISA bestimmt (siehe 4.2.1). Dafür wurden die 500 μ l in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und der Überstand für die Titer-Bestimmung abgenommen. Anhand der ermittelten Ergebnisse wurde die SPR mit folgender Formel berechnet:

$$\text{SPR} = \frac{\text{Gesamtproteinmenge im Überstand}}{\text{Integral Cell Area}}$$

Die *Integral Cell Area* ist dabei folgendermaßen definiert:

$$\text{Integral Cell Area} = \frac{(\text{Endzellzahl} - \text{Anfangszellzahl}) \times \text{Tage in Kultur}}{\log\left(\frac{\text{Endzellzahl}}{\text{Anfangszellzahl}}\right)}$$

SPR-Bestimmungen wurden von den transfizierten Zellpools für die jeweiligen Selektionsdruckstufen sowie zur Klonauswahl von den Einzelzellklonen durchgeführt. Auf Grundlage der SPR-Ergebnisse wurden die Klone ausgewählt, die später kryokonserviert und für die Produktion von Kulturüberständen verwendet wurden.

4.1.5.6 Produktion von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen

Zur Produktion von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen wurden 2×10^5 vZ/ml in GTM-Medium ohne Selektionsdruck in Spinnerflaschen ausgesät. Sobald die Vitalität der Zellen $\leq 80\%$ war, wurden die Überstände geerntet und die Zellen mittels Zentrifugation (30 min, 3000 x g, 4°C) abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand über einen 1,2 μ m Filter (Pall, Dreieich) filtriert und bei -20°C eingefroren.

4.2 Biochemische Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

4.2.1 Titer-ELISA

Um die Antikörper-Titer in den Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurde ein Sandwich-ELISA eingesetzt. Dafür wurden 96-well-Maxisorp Platten (Nunc[®] Thermo Fisher, Dreieich) mit Maus anti-human Igk Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) bei einer Konzentration von 2µg/ml in 0,1M Carbonatpuffer (pH 9,6) mit je 50 µl/well über Nacht bei 4°C beschichtet. Die beschichteten Platten wurden einmal mit Waschpuffer (0.05 % Tween 20 in 1xDPBS) gewaschen und anschließend für 2 h bei RT mit 200 µl/well Blocklösung (5% BSA in 1xDPBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Überstände sowie eine PankoMab-GEX[®] Standardreihe mit 50 µl/well aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Um eine genauere Rückrechnung der Titer der Zellkulturüberstände zu ermöglichen, wurden diese dabei in jeweils 3 Verdünnungen bestimmt. Nach erneutem drei-maligen Waschen der Platten mit Waschpuffer erfolgte die Detektion für 30 min bei RT durch Ziege anti-human IgG Fc-POD (Jackson ImmunoResearch, Newmarket). Der Detektionsantikörper wurde je nach Lot 1:15000 – 1:60000 in 1% BSA/DPBS verdünnt eingesetzt. Vor der Entwicklung wurden drei weitere Waschschrritte durchgeführt, bevor 100 µl/well TMB (Tebu-Bio Laboratories, Offenbach) für 10 min im Dunkeln bei RT zugegeben wurden. Um die Substratentwicklung abzustoppen, wurden 50 µl/well 2.5 N Schwefelsäure zugegeben und anschließend die Absorption bei 450 und 620 nm an einem ELISA-Reader (Plattenreader Infinite-200, Tecan GmbH, Crailsheim) gemessen. Die Rück-rechnung der Proteinkonzentration anhand der Standardkurve erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego) unter einer 4-Parameter-Funktion (4PL, 4-parametric logistic equation) mit Wichtung „1/Y“.

4.2.2 Protein A-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der bispezifischen Antikörper erfolgte mittels Protein A-Affinitätschromatographie über HiTrap rProtein A FF oder MabSelectSuRe Säulen durch eine ÄKTAprime (alle GE Healthcare, Freiburg). Bevor der Überstand mit einer Flussgeschwindigkeit von ≤ 1 ml/min aufgetragen wurde, wurde der Überstand über einen 0,22 µm „rapid“-Filtermax Filter (TPP, Trasadingen) steril filtriert und die Protein A Säule mit Bindungspuffer (PBS, pH 7,4) äquilibriert. Nachdem der Überstand vollständig aufgetragen wurde, wurde die Säule mit Bindungspuffer gewaschen bis die Grundlinie

wieder erreicht war. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper durch saure Elution mit Elutionspuffer (0.1 M Citrat, 0.15 M NaCl, pH 3.6 - 2,2) von der Säule gelöst und in 1 ml Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 200 µl Neutralisationspuffer (2,45 M Kaliumphosphat, pH 7,2) gesammelt. Die gesammelten Fraktionen, die den Elutionspeak enthielten, wurden vereinigt und über 50 kDa Amicon Ultra Filtrations-einheiten (Merck Millipore, Darmstadt) auf 1 x PBS umgepuffert, bevor sie über einen 0,22 µm Millex Filter (Merck Millipore, Darmstadt) steril filtriert wurden. Die Lagerung der gereinigten Antikörper erfolgte bei 4°C.

4.2.3 Proteinbestimmung

Die Konzentration der aufgereinigten Antikörper wurde mittels NanoDrop 2000c UV-Vis Spektralphotometer (Thermo Fisher, Dreieich) bestimmt. Dabei wird die Absorption der Antikörper bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und die Proteinkonzentration in Abhängigkeit der jeweiligen Extinktionskoeffizienten berechnet. Die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen bispezifischen Antikörper wurden anhand der Aminosäuresequenz bestimmt (Expasy, Swiss Institute of Bioinformatics, <http://web.expasy.org/protparam/>). Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten Extinktionskoeffizienten.

Tabelle 5: Übersicht über die für die Proteinbestimmung verwendeten Extinktionskoeffizienten.

Konstrukt	Extinktionskoeffizient
PM-Ck-scFvOkt3.1 / PM-CH3-scFvOkt3.1	1,672
PM-Ck-scFvOkt3.2 / PM-CH3-scFvOkt3.2	1,672
PM-Ck-scFvUCHT1 / PM-CH3-scFvUCHT1	1,619
TM-Ck-scFvOkt3.1 / TM-CH3-scFvOkt3.1	1,697
TM-Ck-scFvOkt3.2 / TM-CH3-scFvOkt3.2	1,697
TM-Ck-scFvUCHT1 / TM-CH3-scFvUCHT1	1,644

4.2.4 Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Superdex™ 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare, Freiburg) an einer ÄKTaprime (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Die analytische Größenausschlusschromatographie (SEC, *size-exclusion chromatography*) erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durch Injektion von 100-

150 µg der gereinigten Antikörper über eine 200 µl Probenschleife. Für präparative Zwecke wurde die Größenausschlusschromatographie hingegen bei einer Flussrate von 0,3 ml/min durchgeführt. Dabei wurden je nach Konzentration der gereinigten Antikörper 0,5-4 mg über eine 500 µl Probenschleife injiziert und die aufgetrennten Monomere in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Als Laufpuffer wurde sowohl für die analytische als auch für die präparative SEC PBS Dulbecco ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ (Biochrom, Berlin) eingesetzt. Um den prozentualen Anteil an Multimeren, Dimeren, Monomeren und Fragmenten zu berechnen, wurde die Prime View Software (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Dabei wurden die Peakflächen des Chromatogramms relativ zueinander berechnet.

4.2.5 Endotoxin Bestimmung

Da sowohl die Protein A-Affinitätschromatographie als auch die Größenausschlusschromatographie unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt wurden, wurden die gereinigten Antikörper im Anschluss auf Endotoxin-Verunreinigungen untersucht. Dazu wurde das *ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit* (GenScript, Piscataway) nach Herstellerangaben verwendet. Als interne Referenzen wurden PankoMab-GEX[®] aus GMP Herstellung sowie Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Steinheim) eingesetzt. Um einen Einfluss von Endotoxinverunreinigungen auf die funktionellen Untersuchungen auszuschließen sollten die untersuchten Proben dabei vergleichbar zur Referenz sein.

4.3 Funktionelle Charakterisierung

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

4.3.1 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Färbungen wurden je nach Aufgabenstellung 1-2x10⁵ Z/well in 96-well Rundbodenplatten gefärbt. Wurden fluoreszenzmarkierte Primärantikörper verwendet, erfolgte die Zugabe der Antikörper zu den Zellen in 50µl PBS mit

5% FKS (Biochrom, Berlin) für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden 150 µl/well PBS zugegeben, die Zellen abzentrifugiert (311 x g; 5 min; RT), der Überstand verworfen und der Waschschrift ein weiteres Mal mit 200 µl/well PBS mit 5% FKS wiederholt, bevor die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse in 100 µl PBS aufgenommen wurden.

Erfolgte die durchflusszytometrische Färbung mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern, wurde das Färbeprotokoll angepasst. Nach einer Inkubation mit den Primärantikörpern für 30 min folgte eine weitere 30 minütige Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern bei 4°C im Dunkeln. Zwischen den beiden Antikörperinkubationen wurden zwei weitere Waschschriffe durchgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) oder am Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher, Dreieich). Für die Auswertung wurde FlowJo vX (FlowJo, LLC, Ashland) oder die FACSDiva Canto II Software (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Antikörper.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie.

Antigen	Fluorophor	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	1:20	eBioscience
CD4	PE-Vio770	REA623	1:800	Miltenyi Biotech
CD8	AF700	SK1	1:400	BioLegend
CD14	APC-Cy7	HCD14	1:200	BioLegend
CD19	FITC	HIB19	1:400	BioLegend
CD25	APC	M-A251	1:20	BD Biosciences
CD45	APC	5B1	1:600	Miltenyi Biotech
CD56	PE	5.1H11	1:150	Miltenyi Biotech
CD69	PE	FN50	1:20	BD Biosciences
Mouse IgG1κ	PE	MOPC-21	1:20	BD Biosciences
Mouse IgG1κ	APC	MOPC-21	1:20	BD Biosciences
Mouse IgG1κ	PerCP-Cy5.5	MOPC-21	1:20	BD Biosciences

AF700, Alexa Fluor[®] 700; APC, Allophycocyanin; APC-Cy7, Allophycocyanin-Cyanine7; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PE-Vio770, Phycoerythrin-Vio[®]770; PerCP-Cy5.5, Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanine5.5

4.3.2 Fixierung von Zellen

War eine sofortige durchflusszytometrische Messung nicht möglich, wurden die Zellen mit dem BD Cytotfix™ Fixation Buffer (BD Biosciences, Heidelberg) nach Herstellerangaben fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse innerhalb einer Woche bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.3.3 Zellbindung

Die Zellbindung der verschiedenen Antikörper und Antikörperkonstrukte wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurde die Bindung an TA-MUC1- und Her2-positive ZR-75-1-Zellen sowie die Bindung an CD3-positive Jurkat-Zellen analysiert. 2×10^5 Zellen/well wurden, wie unter 4.3.1 beschrieben, mit den zu untersuchenden Antikörperverdünnungen inkubiert und die gebundenen Antikörper anschließend mit einem 1:200 verdünnten R-PE gekoppelten Sekundärantikörper (R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, Newmarket) detektiert.

4.3.4 T-Zell-Aktivierung

Um die antikörpervermittelte T-Zell-Aktivierung zu überprüfen, wurden $0,4-1 \times 10^6$ vZ/ml PBMCs in AIM-V oder RPMI mit 10% FKS und 1% L-Glutamin mit den verschiedenen Antikörperverdünnungen versetzt und bei 37 °C für 48 h inkubiert. In einigen Ansätzen, in denen der Einfluss von Zielzelllinien untersucht werden sollte, wurden zusätzlich TA-MUC1- und Her2-positive T-47D-Zellen in einem E:T-Verhältnis (Effektor zu Target Verhältnis) von 1:1 oder 5:1 zugegeben. Nach 24 h und 48 h wurden die PBMCs geerntet und gemäß 4.3.1 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf den CD3-positiven T-Zellen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper (siehe Tabelle 6) bestimmt. Um unspezifische Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, wurden zusätzliche Färbungen mit den entsprechenden Isotyp-Kontrollen durchgeführt.

4.3.5 T-Zell-Proliferation

Die Proliferation der T-Zellen wurde mit Hilfe des CellTrace™ Violet (CTV) Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher, Dreieich) durchflusszytometrisch bestimmt. CTV ist in der Lage in die Zellen zu diffundieren und bindet dort intrazellulär an Amine, wodurch eine Fluoreszenzfärbung der Zellen erreicht wird. Teilen sich die CTV markierten Zellen in Folge einer induzierten Proliferation, wird das CTV mit jeder Zellteilung zu gleichem Maße an beide Tochterzellen weitergegeben, wodurch die Proliferation durch Abnahme der Fluoreszenz geteilter Zellen durchflusszytometrisch messbar wird. Für die Markierung von PBMCs mit CTV wurden PBMCs auf 1×10^6 vZ/ml in PBS eingestellt und mit $2 \mu\text{M}$ CTV in DMSO gemäß den Herstellerangaben für 20 min bei 37°C im Dunkeln markiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem 5-fachen Volumen an RPMI mit 5% FKS gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen ($311 \times g$, 5 min, RT) wurde der Überstand entfernt und der Waschschrift ohne die 5-minütige Inkubation wiederholt. Um die antikörperabhängige Proliferation zu untersuchen, wurden $1,5 \times 10^5$ vZ/ml der CTV markierten PBMCs mit den Antikörperverdünnungen für 5 Tage bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO_2 in RPMI mit 10% FKS und 1% L-Glutamin kultiviert. In einigen Ansätzen, in denen der Einfluss von Zielzelllinien untersucht werden sollte, wurden zusätzlich 3×10^4 vZ/well TA-MUC1- und Her2-positive MCF-7-Zellen (E:T 5:1) zugegeben. Nach der 5-tägigen Kultivierung wurde die Proliferation der CD4^+ - und CD8^+ -T-Zellen gemäß 4.3.1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Um spezifisch die T-Zell-Proliferation zu bestimmen, wurde die in Tabelle 7 dargestellte Färbung eingesetzt. Die lebend/tot Färbung erfolgte durch Zugabe von $20 \mu\text{g/ml}$ 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) vor der Messung.

Tabelle 7: Färbung der T-Zell-Proliferation.

Marker	Population
7-AAD	Lebend/Tot
CTV	proliferierte Zellen
CD4	CD4^+ -T-Zellen
CD8	CD8^+ -T-Zellen
CD14	Monozyten
CD19	B-Zellen
CD45	Lymphozyten
CD56	NK-Zellen

4.3.6 Zytokinfreisetzung

Um die antikörperabhängige Zytokinfreisetzung zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsbedingungen getestet. Dabei wurde die Zytokinfreisetzung zum einen in Vollblut und zum anderen in PBMCs untersucht. Zusätzlich wurden die Antikörper in flüssiger Phase zugegeben oder an 96-well Platten beschichtet. In einigen Ansätzen wurde zudem der Einfluss von TA-MUC1- und Her2-positiven Zielzellen untersucht. Die antikörperabhängige Zytokinfreisetzung wurde in sterilen 96-well Platten (TPP, Trasadingen) untersucht. Zur Beschichtung der Antikörper an die well-Oberfläche wurden in Triplikaten in jedes well 1 µg oder 10 µg der Antikörper in 50 µl PBS gegeben und über Nacht unter einer laufenden Sterilbank antrocknen gelassen. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden dann 200 µl Vollblut beziehungsweise $1,5 \times 10^5$ PBMCs pro well zugegeben und die Platten bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ für 4 h (Vollblut) oder 24 h (PBMCs) inkubiert. In einigen Ansätzen, in denen der Einfluss von Zielzellen auf die Zytokinfreisetzung untersucht werden sollte, wurden zusätzlich noch 1×10^4 T-47D-Zellen pro well zugegeben. In diesen Ansätzen wurden, bedingt durch das maximal mögliche Volumen, nur 150 µl/well Vollblut eingesetzt. In den Ansätzen mit flüssiger Antikörpergabe wurden 1 µg oder 10 µg der Antikörper in PBS direkt zu 150-200 µl/well Vollblut oder den PBMCs ($1,5 \times 10^5$ vZ/well) gegeben und für 4 h (Vollblut) oder 24 h (PBMCs) inkubiert. Bei den transient hergestellten Okt3.1, Okt3.2, cUCHT1 und hUCHT1 konnten aufgrund der vorliegenden Konzentrationen hingegen nur 285 ng/well Antikörper zugegeben werden. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten bei 311 x g, 5 min und RT zentrifugiert und 60 µl Plasma in eine weitere 96-well Platte zur späteren Zytokinbestimmung überführt. Die Lagerung des Plasmas bis zur Analyse erfolgte bei -80°C.

Die freigesetzten Konzentrationen von IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 und TNF-α wurden anschließend mit dem SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery, Rockville) durch das TH1/TH2 10-PLEX Ultra-sensitive Kit, das Human IL-2 Kit und das Human Proinflammatory I Kit (alle Meso Scale Discovery, Rockville) bestimmt und die relative Zytokin-Freisetzung im Verhältnis zu den jeweiligen Ausgangsantikörpern berechnet. Statistische Signifikanzen zwischen den jeweiligen bispezifischen Antikörpern wurden mittels ungepaartem t-test (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., San Diego) bestimmt.

4.3.7 T-Zell ADCC mit voraktivierten T-Zellen

Um die antikörpervermittelte T-Zell abhängige Zytotoxizität zu untersuchen wurden voraktivierte T-Zellen verwendet. Dazu wurden T-Zellen mit dem Dynabeads Untouched Human T cells Kit (Thermo Fisher, Dreieich) nach Herstellerangaben isoliert und für 5 Tage mit dem Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 Kit (Thermo Fisher, Dreieich) in RPMI mit 10% FKS und 1% L-Glutamin oder AIM-V bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ aktiviert. Zur gleichzeitigen Expansion der isolierten T-Zellen wurde dem Medium noch 30 U/ml rekombinantes Interleukin-2 (Peprotech GmbH, Hamburg) zugegeben. Nach 5 Tagen wurden die Dynabeads[®] gemäß Herstellerangaben entfernt und die aktivierten T-Zellen im ADCC als Effektorzellen eingesetzt. Um die durch die verschiedenen Konstrukte vermittelte Zytotoxizität quantifizieren zu können, wurden die Zielzellen mittels Elektroporation mit Europium beladen und die freigesetzte Menge an Europium nach Inkubation mit den voraktivierten T-Zellen ermittelt.

Europiumbeladung der Zielzellen:

3×10^6 T-47D-Zellen wurden in 100 µl kaltem Europiumpuffer (50 mM HEPES, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM DTPA, 2 mM Europium-III-acetat, pH 7,4) aufgenommen, in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette überführt, und 6-10 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen mit dem Nucleofector[®] (Amaxa, Köln) elektroporiert wurden. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen erneut 6-10 min auf Eis inkubiert, bevor sechs Waschschriffe mit jeweils 14 ml Medium (RPMI mit 5% FKS) durchgeführt wurden. Zwischen jedem Waschschriff erfolgte die Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 311 x g. Nach dem 6. Waschschriff wurde das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und auf 5×10^4 vZ/ml eingestellt.

Durchführung des ADCC-Assays:

Die zu testenden Antikörperverdünnungen wurden 10-fach konzentriert in RPMI mit 5% FKS angesetzt und in Triplikaten je 20 µl in 96-well Rundbodenplatten vorgelegt. Zu den Antikörpern wurden anschließend 100 µl der europiumbeladenen Zielzellen (5×10^4 vZ/ml) sowie 80 µl der voraktivierten T-Zellen ($6,25 \times 10^5$ vZ/ml) in einem E:T Verhältnis von 10:1 zugegeben und 4 h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ inkubiert. Nach der vierstündigen Inkubation wurden die 96-well Platten 5 min bei 311 x g zentrifugiert und 25 µl des Überstandes in weiße 96-well Flachbodenplatten (Corning GmbH, Kaiserslautern) überführt, in denen 200 µl DELFIA[®] Enhancement Solution

(Perkin Elmer, Waltham) vorgelegt waren. Das bei der Zelllyse freigesetzte Europium chelatisiert dabei mit Liganden in der DELFIA[®] Enhancement Solution, wobei stark fluoreszierende Chelate entstehen, die nach 10-minütiger Inkubationszeit mittels zeitverzögerter Fluoreszenzmessung gemessen wurden. Die Fluoreszenzmessung wurde am Tecan Infinite F200 (Tecan, Crailsheim) mit einer Zeitverzögerung von 400 µs, einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 612 nm durchgeführt.

Für die Berechnung der spezifischen Lyse wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{(ER - SR)}{(MR - BR)} \cdot 100$$

ER = Experimenteller Release (100 µl Zielzellen + 80 µl Effektorzellen + 20 µl Antikörper)

SR = Spontanrelease (100 µl Zielzellen + 100 µl Medium)

BR = Basalrelease (100 µl Überstand der Zielzellen nach Europiumbeladung + 100 µl Medium)

MR = Maximalrelease (100 µl Zielzellen + 20 µl Triton-X-100 (10%) + 80 µl Medium)

SR, BR und MR wurden dabei in Sechsfach-Bestimmungen angesetzt.

Als weiteres Maß für die erfolgreiche Europiumbeladung der Zielzellen wurde zudem die spontane Lyse der Zielzellen, welche ≤ 30% sein sollte, nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spontane Lyse [\%]} = \frac{(SR - BR)}{(MR - BR)} \cdot 100$$

Die berechneten spezifischen Lysen wurden als *Dose-Response* Kurven dargestellt und der Kurvenfit mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego) mittels 4-Parameter logistischem Plot berechnet.

4.3.8 NK-Zell ADCC

Die antikörpervermittelte NK-Zell abhängige Zytotoxizität wurde ebenfalls durch Europiumfreisetzung nach dem unter 4.3.7 beschriebenen Protokoll bestimmt. Dabei wurde statt der voraktivierten T-Zellen eine NK-Zelllinie der Glycotope GmbH als

Effektoren eingesetzt, die mit dem V-Allotyp des Fc γ -Rezeptors IIIa (KHyG1-CD16aV) transfiziert ist.

4.3.9 PBMC ADCC

Um die T-Zell vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität ohne Voraktivierung der T-Zellen untersuchen zu können, wurde ein weiterer Versuchsaufbau verwendet, der es ermöglicht die antikörperabhängige spezifische Lyse von Zielzellen über 24 h zu beobachten. Dafür wurden $1,5 \times 10^4$ MCF-7-Zellen/well in 200 μ l RPMI + 10% FKS + 1% L-Glutamin in 96-well Flachbodenplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Platten für 3 min bei 311 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen, bevor 2×10^5 PBMCs sowie die Antikörperverdünnungen in Triplikaten in einem gesamt Volumen von 200 μ l Phenolrot-freiem RPMI (Biochrom, Berlin) + 1% FKS zugegeben wurden. Die Bestimmung der spezifischen Lyse der Zielzellen erfolgte durch Quantifizierung der bei der Lyse freigesetzten Menge an Lactat-Dehydrogenase (LDH) mithilfe des Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Dazu wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ die Platten 10 min bei 250 x g zentrifugiert und 100 μ l des Überstandes in eine 96-well Flachbodenplatte überführt. Nach Zugabe von 100 μ l Reaction mixture und maximal 30-minütiger Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Absorption bei 492 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm am EnSpire[®] 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham) gemessen.

Für die Berechnung der spezifischen Lyse wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{ER} - \text{BR})}{(\text{MR} - \text{BR})} \cdot 100$$

ER = Experimenteller Release (Zielzellen + Effektorzellen + Antikörper)

BR = Basalrelease (Zielzellen + Effektorzellen)

MR = Maximalrelease (Zielzellen + 1% Triton-X-100)

ER, BR und MR wurden dabei in Triplikaten angesetzt.

5. Ergebnisse

5.1 Auswahl geeigneter anti-CD3 Antikörper zur Generierung von scFv-Fragmenten

Die Rekrutierung der T-Zellen sollte durch scFv-Fragmente erfolgen, die gegen CD3 gerichtet sind. Daher wurden zunächst vier verschiedene anti-CD3 Antikörper transient in GEX[®]-H9D8-Zellen transfiziert und die so produzierten Antikörper hinsichtlich ihrer Zellbindung und T-Zell-Aktivierung untersucht. Um einen Einfluss des Isotyps auszuschließen, wurden alle Antikörper als humane IgG1 exprimiert. Bei den getesteten anti-CD3 Antikörpern wurden bei dem intern als Okt3.1 bezeichneten Antikörper die variablen Domänen (VH und VL) von der CD3-Bindedomäne von Blinatumomab übernommen. Der intern als Okt3.2 bezeichneten Antikörper trägt in Anlehnung an eine Publikation von Kipriyanov und Kollegen (72) eine zusätzliche Mutation (C100AA) in der VH-Domäne, da für die Mutation C100AS ein positiver Effekt auf die Stabilität und bakterielle Expression beschrieben wurde. Neben Okt3.1 und Okt3.2 wurden noch die variablen Domänen von einer chimären Variante sowie einer humanisierten Variante des UCHT1 Antikörpers verwendet (73). Die getesteten UCHT1 Varianten binden die ϵ -Untereinheit von CD3 wohingegen die Okt3.1 und Okt3.2 Varianten ein Konformations-epitop binden, das zusammen mit der γ - oder δ -Untereinheit gebildet wird (74).

5.1.1 Zellbindungsstudien der anti-CD3 IgG1 Antikörper

Ein wichtiges Kriterium für die erfolgreiche Rekrutierung der T-Zellen ist die Bindung an CD3. Um eventuelle Unterschiede der vier getesteten Antikörper hinsichtlich ihrer CD3-Bindung zu untersuchen, wurden die Antikörper in zwei Konzentrationen (1 $\mu\text{g/ml}$ und 4 $\mu\text{g/ml}$) mit CD3-positiven Jurkat-Zellen inkubiert und die Bindung an CD3 mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen und in der Durchflusszytometrie analysiert.

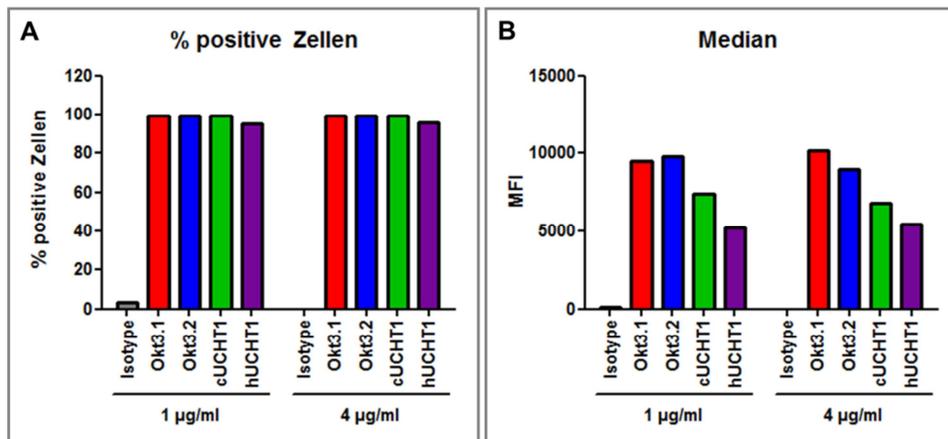


Abbildung 5: Bindung der anti-CD3 Antikörper an CD3-positive Jurkat-Zellen.

Jurkat-Zellen wurden mit 1 µg/ml und 4 µg/ml der anti-CD3 Antikörper hUCHT1, cUCHT1, Okt3.1 und Okt3.2 sowie einem unspezifischen hIgG1 als Isotypkontrolle inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgt mit einem anti-human IgG (H+L) RPE gekoppeltem Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen (A) sowie der medianen Fluoreszenzintensität (B).

Alle anti-CD3 Antikörper zeigten in den eingesetzten Konzentrationen eine starke Zellbindung an CD3-positive Jurkat-Zellen. Bezogen auf die Anzahl der positiven Zellen zeigten cUCHT1, Okt3.1 und Okt3.2 mit >99% gebundener Jurkat-Zellen in beiden Konzentrationen eine vergleichbare Bindung (Abbildung 5.A). Betrachtet man jedoch auch den Median der Fluoreszenzintensität, wird deutlich, dass bei zwar vergleichbarer Anzahl gebundener Jurkat-Zellen cUCHT1 (MFI mit 1µg/ml von 7367) im Vergleich mit Okt3.1 (MFI mit 1µg/ml von 9490) und Okt3.2 (MFI mit 1µg/ml von 9819) eine geringere Anzahl an CD3-Molekülen pro Zelle gebunden hat (Abbildung 5.B). Die insgesamt schwächste CD3-Bindung vermittelt die humanisierte Variante von UCHT1, hUCHT1, was sich sowohl in einer leichten Reduktion des prozentualen Anteils an positiven Zellen sowie in einer deutlichen Reduktion der Fluoreszenzintensität gezeigt hat. So wurden mit 1 µg/ml hUCHT1 nur 95,2% der Jurkat-Zellen (MFI von 5213) und mit 4 µg/ml nur 96,2% (MFI von 5458) gebunden.

5.1.2 T-Zell-Aktivierung der anti-CD3 IgG1 Antikörper

Die Bindung von Antikörpern an CD3 auf T-Zellen kann zu einer Aktivierung der T-Zellen führen. Zwei typische Marker für die T-Zell-Aktivierung sind CD69 und CD25. CD69 ist das erste induzierte Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von T-Zellen nach ihrer Aktivierung messbar wird und gilt daher als ein früher Aktivierungsmarker. Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des IL-2 Rezeptors, dessen Expression

ebenfalls in Folge einer T-Zell-Aktivierung stattfindet und eine Aussage über den Grad der T-Zell-Aktivierung ermöglicht. Um die antikörpervermittelte T-Zell-Aktivierung zu untersuchen wurden PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) von einem gesunden Spender mit den verschiedenen anti-CD3 Antikörpern in einer Konzentrationsreihe von 0,1 ng/ml bis 10 ng/ml für 48h inkubiert und die Expression von CD69 nach 24h und die Expression von CD25 nach 48h mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Dabei führte die Inkubation mit Okt3.1 und Okt3.2 zur stärksten T-Zell-Aktivierung. Beide Antikörper induzierten bereits bei 0,1 ng/ml eine vergleichbare CD69-Expression auf 35,8%, beziehungsweise 40,7% der CD3-positiven T-Zellen (Abbildung 6.A). Auch die CD25-Expression nach 48-stündiger Inkubation war mit 12,6% und 16,8% der CD3-positiven Zellen vergleichbar (Abbildung 6.C). Durch eine Erhöhung der Antikörperkonzentration auf 10 ng/ml konnte ein weiterer Anstieg des Anteils an CD25- und CD3-positiven T-Zellen auf 26,7% und 30,3% erreicht werden. Die CD69-Expression ließ sich hingegen durch die Konzentrationserhöhung nur geringfügig auf 45,5% beziehungsweise 45,6% steigern. Auch die Auswertung der medianen Fluoreszenzintensität der CD69- und CD25-Expression (Abbildung 6.B und D) bestätigt die vergleichbare T-Zell-Aktivierung durch Okt3.1 und Okt3.2.

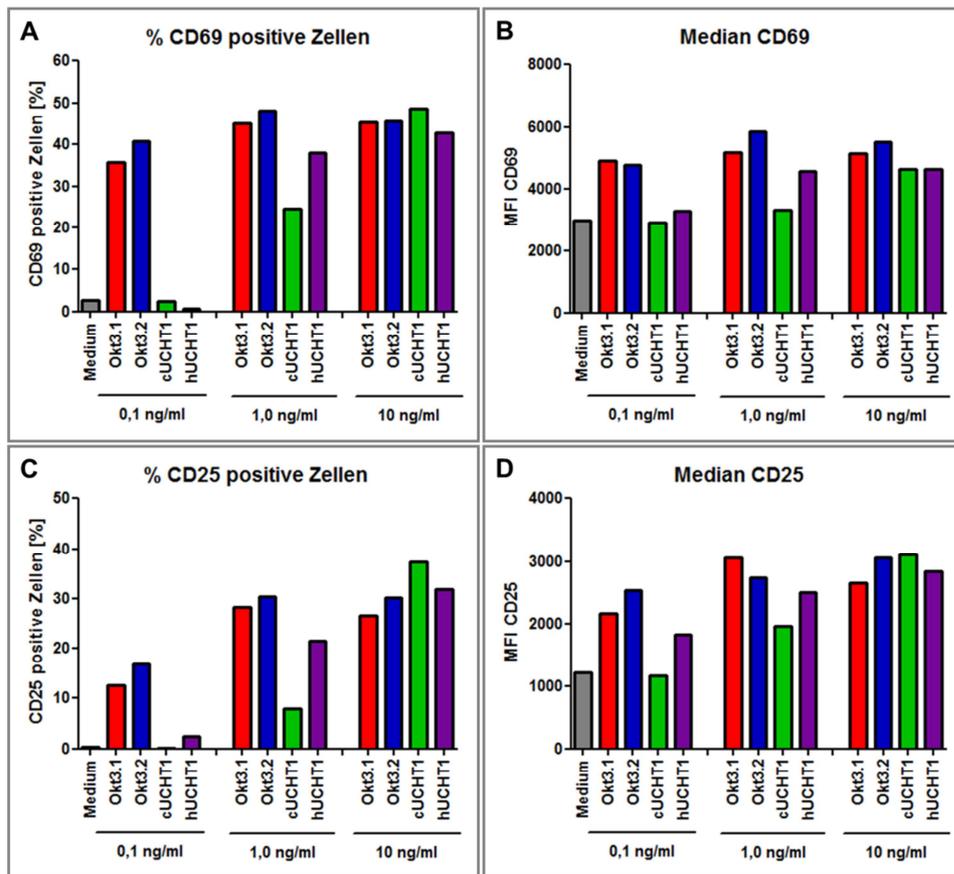


Abbildung 6: Anti-CD3 Antikörper vermittelte T-Zell-Aktivierung.

PBMCs wurden mit 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml Okt3.1, Okt3.2, cUCHT1 und hUCHT1 inkubiert und die CD69-Expression (A und B) nach 24h sowie die CD25-Expression (C und D) der CD3-positiven T-Zellen nach 48h mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die durch cUCHT1 und hUCHT1 erreichte T-Zell-Aktivierung war im Vergleich zu Okt3.1 und Okt3.2 bei niedrigen Antikörperkonzentrationen schwächer. So zeigten von den mit 0,1 ng/ml cUCHT1 und hUCHT1 inkubierten CD3-positiven T-Zellen lediglich 2,4% und 0,6% nach 24h eine CD69-Expression (Abbildung 6.A) und 0,1% beziehungsweise 2,5% nach 48h eine CD25-Expression (Abbildung 6.C). Bei höherer Antikörperkonzentration war die durch cUCHT1 und hUCHT1 vermittelte T-Zell-Aktivierung vergleichbar zur Okt3.1- und Okt3.2-vermittelten T-Zell-Aktivierung. So exprimierten nach der Inkubation mit 10 ng/ml cUCHT1 und hUCHT1 48,7% und 42,9% der T-Zellen CD69 und 37,5% beziehungsweise 32,0% der T-Zellen CD25. Auch die Auswertung des Medians der Fluoreszenzintensität der CD69-Färbung (Abbildung 6.B) und der CD25-Färbung (Abbildung 6.D) bestätigen die stärkere T-Zell-Aktivierung durch Okt3.1 und Okt3.2 im Vergleich zu den Antikörpern hUCHT1 und cUCHT1.

5.1.3 Anti-CD3 antikörperabhängige Zytokinfreisetzung

Die Bindung von anti-CD3 Antikörpern an T-Zellen führt nicht nur zu einer antikörpervermittelten T-Zell-Aktivierung, sondern dadurch auch zu einer oftmals starken Zytokinfreisetzung, die in der therapeutischen Anwendung zu starken Nebenwirkungen führen kann und eine große Herausforderung darstellt. Um frühzeitig mögliche Unterschiede in der Zytokinfreisetzung zu untersuchen, wurde neben der T-Zell-Aktivierung auch die durch die verschiedenen anti-CD3 Antikörper verursachte Zytokinfreisetzung untersucht. Dafür wurde Vollblut mit den vier anti-CD3 Antikörpern inkubiert und die freigesetzte Menge an IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN- γ und TNF- α quantitativ mittels Elektrochemilumineszenz bestimmt.

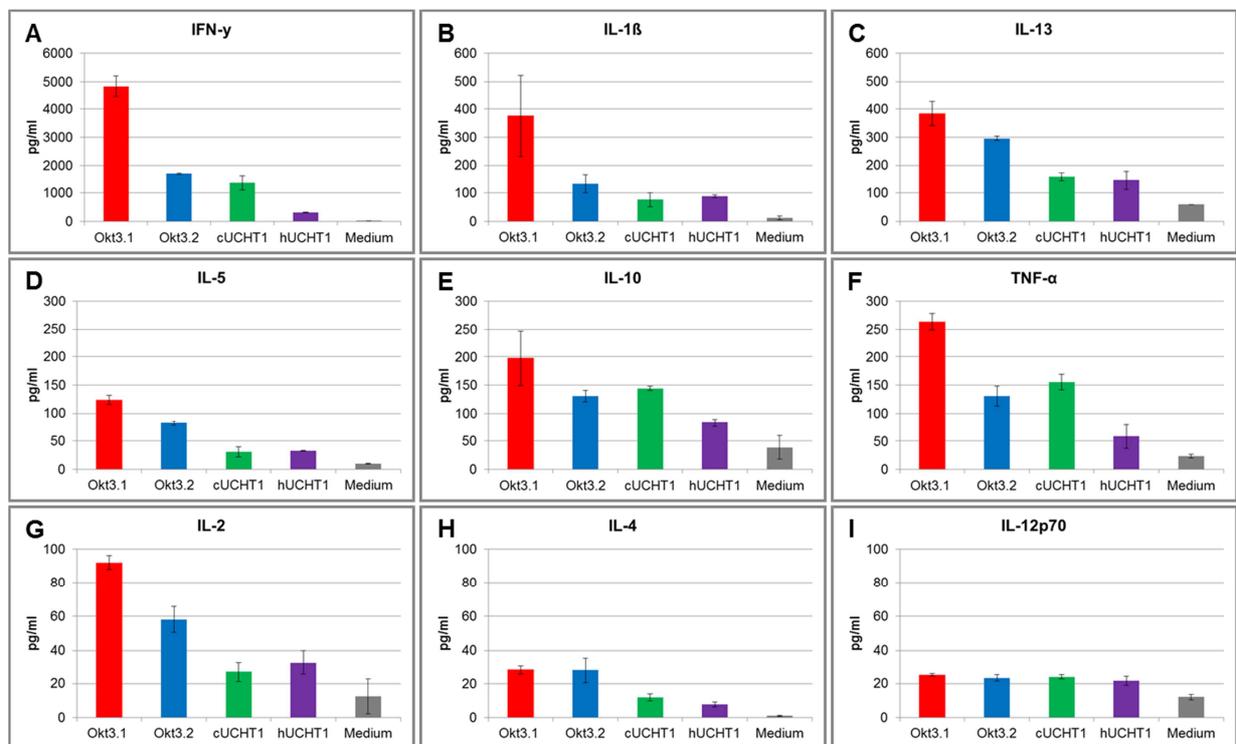


Abbildung 7: Anti-CD3 Antikörper abhängige Zytokinfreisetzung in Vollblut.

Okt3.1, Okt3.2, cUCHT1 und hUCHT1 wurden mit Vollblut eines gesunden Spenders inkubiert und die freigesetzte Menge an IFN- γ (A), IL-1 β (B), IL-13 (C), IL-5 (D), IL-10 (E), TNF- α (F), IL-2 (G), IL-4 (H), IL-12p70 (I) und IL-8 (nicht gezeigt) mit dem TH1/TH2 10-PLEX Ultra-sensitive Kit von Meso Scale Discovery bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert (n=3) \pm SD der freigesetzten Zytokine.

Die höchste Konzentration an IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-1 β , IFN- γ und TNF- α konnte dabei in dem mit Okt3.1 inkubierten Vollblut, gefolgt von dem mit Okt3.2 inkubierten Vollblut bestimmt werden (Abbildung 7). Lediglich bei IL-10 und TNF- α wurde in dem mit cUCHT1 behandelten Vollblut eine etwas höhere Freisetzung als in dem mit Okt3.2 inkubierten Vollblut gemessen. Im Vergleich mit hUCHT1 verursachte

cUCHT1 eine höhere IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ und TNF- α Freisetzung wohingegen mit hUCHT1 eine höhere IL-1 β , IL-2 und IL-5 Freisetzung ausgelöst wurde. Von den vier untersuchten Antikörpern verursachte keiner eine im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant höhere Freisetzung von IL-12p70. Da zur Bestimmung der Zytokine ein Kit verwendet wurde, wurde auch die freigesetzte Menge von IL-8 gemessen. Dabei lagen die gemessenen IL-8 Konzentrationen in allen Ansätzen oberhalb des Standards und damit außerhalb des dynamischen Bereichs des Assays. Ursache hierfür, ist die hohe Konzentration von an Erythrozyten gebundenem IL-8, weswegen eine Aussage über die Wirkung der getesteten Antikörper auf die IL-8 Freisetzung in diesem Ansatz nicht getroffen werden kann. Zusammenfassend verursachen alle vier untersuchten Antikörper einen Anstieg der verschiedenen gemessenen Zytokine, der mit dem Grad der T-Zell-Aktivierung korreliert.

5.2 Entwicklung von bi-spezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörpern

Um die Eignung von PankoMab-GEX[®] als T-Zell-rekrutierenden Antikörper zu testen, wurden sechs verschiedene Konstrukte hergestellt (Abbildung 8). Dabei wurden ausgehend von PankoMab-GEX[®] einem IgG1 über flexible Linker drei verschiedene gegen CD3 gerichtete scFv-Fragmente an die Ck-Domäne der leichten Kette oder an die CH3-Domäne der schweren Kette von PankoMab-GEX[®] fusioniert. Aufgrund der Ergebnisse zur T-Zell-Aktivierung, Zellbindung und Zytokinfreisetzung in Vollblut wurden für die Generierung des scFv-Konstruktes die anti-CD3 Antikörper Okt3.1, Okt3.2 und cUCHT1 gewählt. Die variablen Domänen von Okt3.2 wurden für das scFv-Konstrukt ausgewählt, da Okt3.2 bei vergleichbarer CD3-Bindung und T-Zell-Aktivierung eine geringere Zytokinfreisetzung als Okt3.1 vermittelte. Weil Okt3.2 aber auch eine zusätzliche Mutation trägt, die zuvor noch nicht beschrieben oder analysiert wurde, wurde zusätzlich Okt3.1 zur Generierung des scFv-Konstruktes genutzt, der von Blinatumomab abstammt, welcher sich zu Beginn dieser Arbeit bereits in fortgeschrittenen klinischen Studien befand. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass sich das scFv-Fragment für die Rekrutierung von T-Zellen eignet. Um zusätzlich noch ein Konstrukt zu erhalten, das bei einer vergleichbaren CD3-Bindung eine verringerte T-Zell-Aktivierung und Zytokinfreisetzung vermittelt, wurde cUCHT1 gewählt. Für die Optimierung der Bindung von Fc γ -Rezeptor-IIIa positiven Immunzellen an den Fc-Teil der Antikörper, die unter anderem antikörperabhängige zellvermittelte

Zytotoxizität durch NK-Zellen erhöht, wurden alle Konstrukte in der GEX[®]-Fuc- Zelllinie der GlycoExpress[®]-Plattform der Glycotope GmbH produziert.

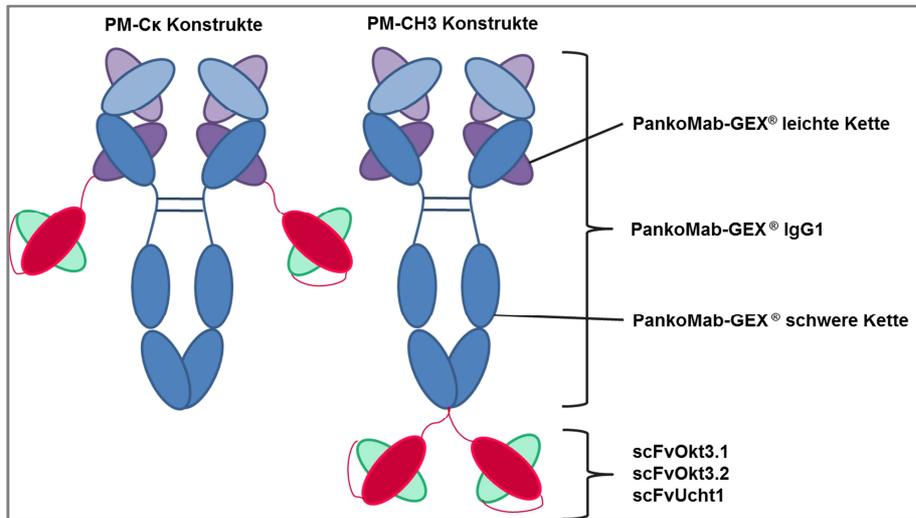


Abbildung 8: PankoMab-CD3-Konstrukte zur Rekrutierung von T-Zellen.

Blau: Schwere Kette von PankoMab-GEX[®] bestehend aus VH-, CH1-, CH2- und CH3-Domäne; Lila: Leichte Kette von PankoMab-GEX[®] bestehend aus VL- und Cκ-Domäne; Grün/Rot: anti-CD3 scFv-Fragment bestehend aus anti-CD3 VH- und VL-Domäne.

Zusätzlich wurden Konstrukte hergestellt, die als Kontrolle für mögliche Effekte dienen sollten, die vom Zielantigen TA-MUC1 abhängig sind. Dabei handelt es sich um sechs weitere Konstrukte, die auf Trastuzumab, einem gegen Her2 gerichteten IgG1, beruhen und analog zu den PankoMab-CD3-Konstrukten aufgebaut sind.

5.2.1 Herstellung von Produktionsklonen

Die verschiedenen Konstrukte wurden in GEX[®]-Fuc- der GlycoExpress[®]-Plattform der Glycotope GmbH exprimiert. Dabei wurde die Zelllinie zunächst transfiziert und um eine Produktivitätssteigerung zu erreichen jeweils der entstandene Zellpool unter steigendem Selektionsdruck kultiviert bevor durch Einzelzellklonierung stabile Produktionszellklone gewonnen wurden. Da nur Material für biochemische und funktionelle Charakterisierungen gewonnen werden sollte und kein Hochproduktionsklon gesucht wurde, wurden eine zum normalen Vorgehen verkürzte Selektionsdruckerhöhung und auch nur eine einmalige Einzelzellklonierung durchgeführt.

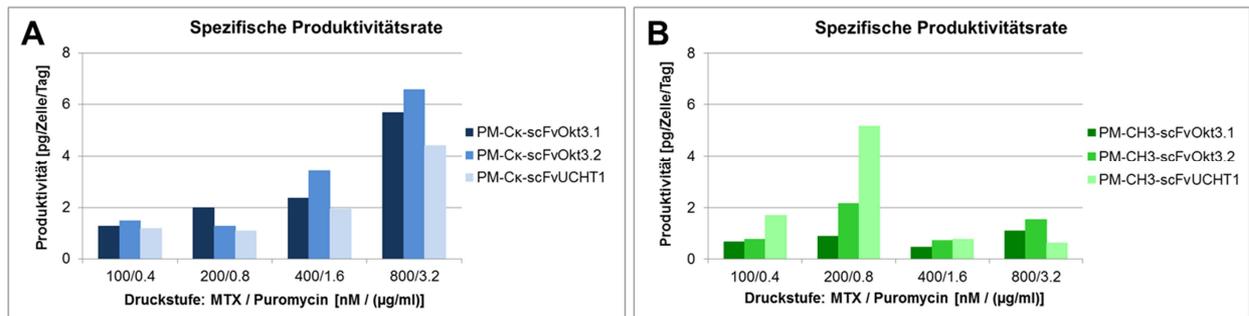


Abbildung 9: Spezifische Produktivitätsrate der PM-CH3- und PM-Ck-Konstrukte.

Zur Bestimmung der spezifischen Produktivitätsrate der Zellpool wurde nach drei tägiger Kulturdauer der Antikörpertiter der Kulturen mittels Titer-ELISA bestimmt und anhand der Anfangs- und Endzellzahlen die spezifische Produktivitätsrate errechnet. Die spezifische Produktivitätsrate wird in pg/Zelle/Tag (pcd) angegeben.

Bei den PM-CH3-Konstrukten zeigte PM-CH3-scFvUCHT1 mit 5,1 pg/Zelle/Tag (pcd) die höchste spezifische Produktivitätsrate (SPR) gefolgt von PM-CH3-scFvOkt3.2 mit 2,1 pcd (Abbildung 9.B). Die Erhöhung des Selektionsdrucks sorgte bei allen Konstrukten bis zu der Druckstufe von 200 nM MTX und 0,8 µg/ml Puromycin für eine Steigerung der SPR wohingegen die weitere Erhöhung des Selektionsdrucks zu keiner weiteren Steigerung führte. Im Gegensatz dazu konnte bei den PM-Ck-Konstrukten die SPR durch eine Steigerung des Selektionsdrucks weiter erhöht werden. Ein weiterer Unterschied zu den PM-CH3-Konstrukten zeigte sich darin, dass PM-Ck-scFvUCHT1 mit 4,4 pcd im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.1 mit 5,7 pcd und PM-Ck-scFvOkt3.2 mit 6,6 pcd die geringste Produktivität aufwies (Abbildung 9.A).

Bei den als Kontrollkonstrukten hergestellten TM-CH3-Konstrukten führte die Erhöhung des Selektionsdrucks nur in der Druckstufe von 400 nM MTX und 1,6 µg/ml Puromycin zu einer Steigerung der spezifischen Produktivitätsrate und auch zwischen den einzelnen Konstrukten unterschied sich die Produktivität nur sehr gering, wobei der Zellpool von TM-CH3-scFvOkt3.1 in allen Druckstufen im Vergleich zu den anderen Konstrukten eine etwas höhere Produktivität zeigte (Abbildung 10.B). Wie schon bei den PM-Ck-Konstrukten konnte im Gegensatz dazu bei den TM-Ck-Konstrukten die SPR durch die Steigerung des Selektionsdrucks mit jeder Druckstufe weiter erhöht werden. Dabei zeigten die drei Konstrukte in den Druckstufen 100/0,4, 200/0,8 und 400/1,6 (nM MTX/µg/ml Puromycin) jeweils vergleichbare spezifische Produktivitätsraten von ungefähr 2 bis 3,5 pcd und erst bei der Druckstufe von 800 nM MTX und 3,2 µg/ml Puromycin zeigte TM-Ck-scFvUCHT1 mit 8,3 pcd im Vergleich zu TM-Ck-

scFvOkt3.1 mit 3,3 pcd und TM-Ck-scFvOkt3.2 mit 5,9 pcd eine deutlich höhere spezifische Produktivitätsrate (Abbildung 10.A).

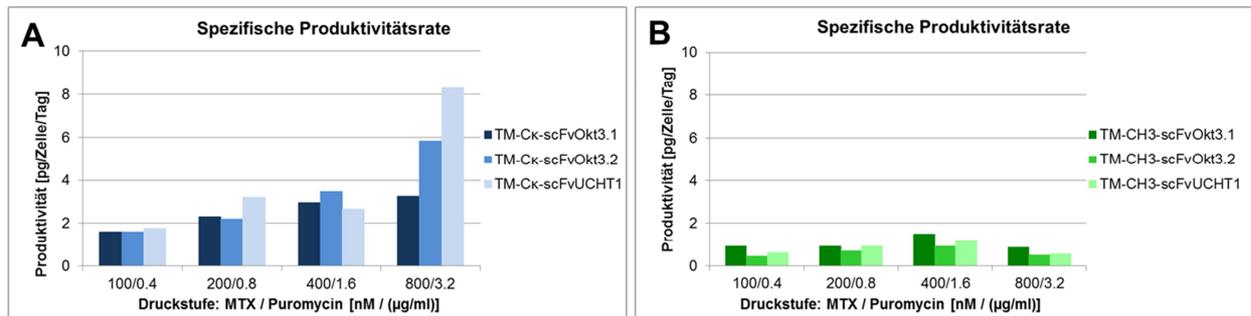


Abbildung 10: Spezifische Produktivitätsrate der TM-CH3- und TM-Ck-Konstrukte.

Zur Bestimmung der spezifischen Produktivitätsrate der Zellpoole wurde nach drei tägiger Kulturdauer der Antikörpertiter der Kulturen mittels Titer-ELISA bestimmt und anhand der Anfangs- und Endzellzahlen die spezifische Produktivitätsrate errechnet. Die spezifische Produktivitätsrate wird in pg/Zelle/Tag angegeben.

Um eine genetisch einheitliche Zellpopulation zur Produktion der Antikörper zu erhalten, wurden alle Konstrukte auf der Druckstufe 200 nM MTX / 0,8 µg/ml Puromycin und die PM-Ck-Konstrukte zusätzlich auf der Druckstufe 400 nM MTX / 1,6 µg/ml Puromycin sowie die TM-Ck-Konstrukte zusätzlich auf der Druckstufe 800 nM MTX / 3,2 µg/ml Puromycin durch Aussaat in semisolidem Medium kloniert. Die daraus gewonnen Einzelzellklone wurden erneut nach ihrer Produktivität selektiert und jeweils ein Klon für die Produktion von antikörperhaltigem Überstand ausgewählt. Zusammenfassend konnten alle Konstrukte trotz der verkürzten Klonentwicklung und unterschiedlicher Produktivität in ausreichender Menge für die folgenden funktionellen Untersuchungen produziert werden.

5.2.2 Reinigung der Antikörper

Die verschiedenen Antikörper wurden über Protein A-Säulen gereinigt. Da Protein A die Antikörper im Bereich der CH2- und CH3-Domäne bindet und die zusätzlichen scFv-Fragmente eventuell das Bindeverhalten an Protein A beeinflussen könnten, wurde zunächst ein Screening durchgeführt um den optimalen pH-Wert für die Elution der Antikörper von der Protein A-Säule zu bestimmen. Dafür wurde ein Natriumcitratpuffer mit pH 3,6 hergestellt und der pH-Wert schrittweise um pH 0,2 reduziert bis kein Produkt mehr von der Säule eluiert wurde. Um sicherzugehen, dass das gesamte

Produkt von der Säule eluiert wurde, wurde anschließend ein zusätzlicher Elutionsschritt mit pH 2,2 durchgeführt.

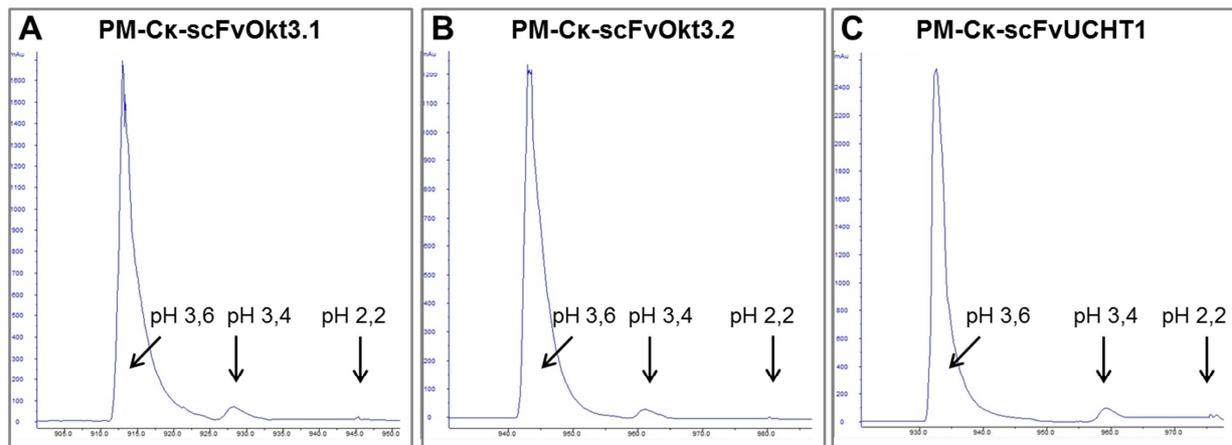


Abbildung 11: Screening der Elutionsbedingungen der PM-Ck-Konstrukte.

Elution von PM-Ck-scFvOkt3.1 (A), PM-Ck-scFvOkt3.2 (B) und PM-Ck-scFvUCHT1 (C) von der Protein A-Säule mit variierendem pH-Wert des Elutionspuffers. Durch eine anschließende Elution bei pH 2,2 wird kein Protein mehr von der Säule eluiert.

Alle PM-Ck-Konstrukte werden wie auch der Ausgangsantikörper PankoMab-GEX[®] bei einem pH-Wert von 3,6 fast vollständig von der Protein A Säule eluiert. Durch eine weitere Reduzierung des pH-Wertes auf 3,4 konnte keine weitere Steigerung der Ausbeute erzielt werden (Abbildung 11). Obwohl auch der Ausgangsantikörper TrasGEX[®] (Trastuzumab produziert in GlycoExpress[®]) bei einem pH-Wert von 3,6 vollständig eluiert wird, eluiert im Gegensatz dazu bei den TM-Ck-Konstrukten ein Elutionspuffer mit pH-Wert 3,6 die Antikörper nicht vollständig von der Protein A-Säule und bei einer weiteren schrittweisen Reduzierung des pH-Wertes bis pH 3 kann weiteres Produkt eluiert werden. Je nach scFv-Fragment konnte dabei ein unterschiedlich starker Einfluss auf die Elutionsbedingungen beobachtet werden. So eluiert TM-Ck-scFvUCHT1 fast vollständig bei pH 3,4 und bei TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 wurden bis zu pH 3,2 noch deutliche Produktmengen eluiert, die weiter analysiert wurden (Abbildung 12).

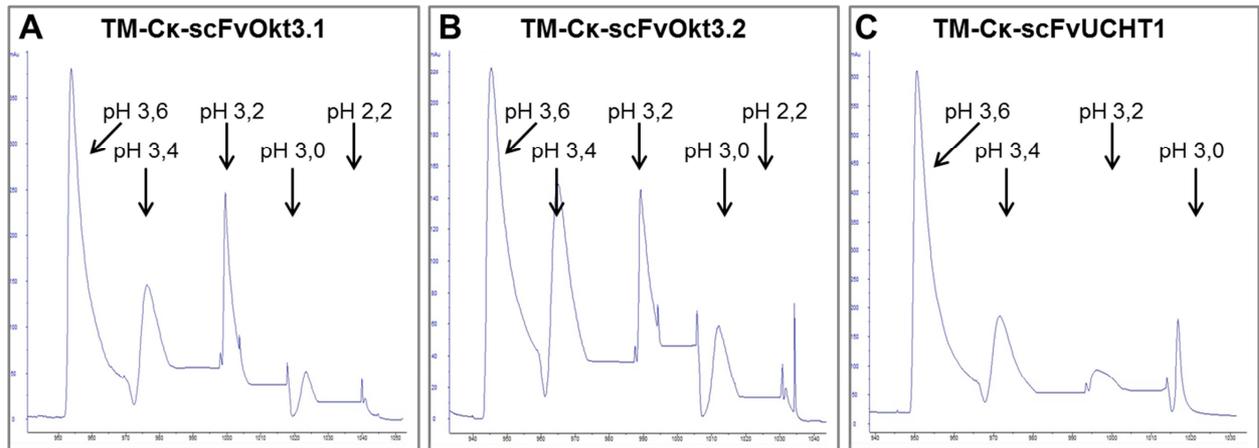


Abbildung 12: Screening der Elutionsbedingungen der TM-Cκ-Konstrukte.

Elution von TM-Cκ-scFvOkt3.1 (A), TM-Cκ-scFvOkt3.2 (B) und TM-Cκ-scFvUCHT1 (C) von der Protein A-Säule mit variierendem pH-Wert des Elutionspuffers. Durch eine anschließende Elution bei pH 2,2 wird kein Protein mehr von der Säule eluiert.

Um die pH Bedingungen für die Elution der TM-Cκ-Konstrukte zu analysieren, wurden exemplarisch die bei unterschiedlichen pH-Werten eluierten Fraktionen von TM-Cκ-scFvOkt3.1 und TM-Cκ-scFvOkt3.2 mittels analytischer Größenausschlusschromatographie (SEC, *size-exclusion chromatography*) untersucht.

Tabelle 8: Monomergehalt der bei pH 3,6, pH 3,4 und pH 3,2 eluierten Fraktionen von TM-Cκ-scFvOkt3.1 und TM-Cκ-scFvOkt3.2.

Der Monomeranteil der einzelnen Fraktionen wurde mittels analytischer Größenausschlusschromatographie (SEC) bestimmt.

Konstrukt	pH-Wert	Monomer Anteil [%]	Monomer Anteil bezogen auf Gesamt Monomer [%]
TM-Cκ-scFvOkt3.1	3,6	75,4	82,5
	3,4	44,6	13,6
	3,2	9,8	3,8
TM-Cκ-scFvOkt3.2	3,6	86,6	69,1
	3,4	59,3	24,4
	3,2	11,2	2,6

Sowohl bei TM-Cκ-scFvOkt3.1 als auch bei TM-Cκ-scFvOkt3.2 eluierte bei pH 3,6 mit 82,5% und 69,1% bereits der Hauptanteil der Monomerfraktion der Antikörper. Dennoch wurden durch die Reduktion des pH-Wertes auf 3,4 noch weitere 13,6% Monomere von TM-Cκ-scFvOkt3.1 und 24,4% Monomere von TM-Cκ-scFvOkt3.2 eluiert. Durch die weitere Reduzierung des pH-Wertes auf 3,2 konnten entsprechend die restlichen 3,8% der Monomere von TM-Cκ-scFvOkt3.1 und bei TM-Cκ-scFvOkt3.2 die restlichen 2,6% der Monomere eluiert werden (Tabelle 8). Die bei pH 3,0 gesammelten Fraktionen enthielten keine ausreichende Menge des Antikörpers um mittels analytischer SEC

untersucht zu werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden bei allen nachfolgenden Reinigungen die PM-Konstrukte bei einem pH-Wert von 3,6 und die TM-Konstrukte bei einem pH-Wert von 3,4 eluiert.

5.2.3 Aggregationsverhalten der bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörper

Bispezifische Antikörper zeigen häufig eine höhere Tendenz zu aggregieren. Um den Einfluss des scFv-Anteils auf die Aggregation der Antikörper zu untersuchen, wurden von allen TM-Ck- und PM-Ck-Konstrukten die bei pH 3,6 eluierten Fraktionen durch analytische Größenausschlusschromatographie untersucht und der enthaltene Monomeranteil verglichen.

Tabelle 9: Bestimmung der Aggregation der TM-Ck- und PM-Ck-Konstrukte.

Der prozentuale Anteil an Multimeren, Dimeren, Monomeren und Fragmenten der bei pH 3,6 eluierten Antikörper wurde durch analytische Größenausschlusschromatographie bestimmt.

Konstrukt	Ausgangskonzentration [mg/ml]	Multimer [%]	Dimer [%]	Monomer [%]	Fragmente [%]
PM-Ck-scFvOkt3.1	2,1	1,69	9,21	88,77	0,33
PM-Ck-scFvOkt3.2	2,8	1,28	6,80	91,93	-
PM-Ck-scFvUCHT1	3,6	3,59	17,99	78,42	-
TM-Ck-scFvOkt3.1	1,6	4,13	13,05	75,43	3,26
TM-Ck-scFvOkt3.2	1,7	4,01	9,39	86,60	-
TM-Ck-scFvUCHT1	8,6	1,91	10,63	87,43	-

Bei den PM-Ck-Konstrukten enthielt PM-Ck-scFvOkt3.2 mit 92% den größten Anteil an Monomeren gefolgt von PM-Ck-scFvOkt3.1 mit 89%. Der geringste Monomergehalt wurde bei PM-Ck-scFvUCHT1 mit 78% bestimmt (Tabelle 9). Umgekehrt wurde jeweils für das PM-Ck-scFvUCHT1 Konstrukt, das den niedrigsten Monomergehalt aufweist, der höchste Anteil an Multimeren (3,6%) und Dimeren (18%) bestimmt. Einhergehend mit dem höheren Monomergehalt enthielten dementsprechend PM-Ck-scFvOkt3.1 sowie PM-Ck-scFvOkt3.2 deutlich geringere Multimer- und Dimeranteile. Fragmente (0,3%) wurden nur bei PM-Ck-scFvOkt3.1 bestimmt.

Im Gegensatz dazu wurde bei den TM-Ck-Konstrukten für TM-Ck-scFvUCHT1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 mit ~87% der höchste Monomergehalt bestimmt. Bezogen auf den Dimer- und Multimeranteil unterschieden sich beide Konstrukte jedoch leicht. So hatte

TM-Ck-scFvUCHT1 einen höheren Dimeranteil und TM-Ck-scFvOkt3.2 einen höheren Anteil an Multimeren. Die Elutionsfraktionen von TM-Ck-scFvOkt3.1 enthielten mit 75% den geringsten Monomeranteil und entsprechend den höchsten Anteil an Dimeren (13%) und Fragmenten (3%). Der Multimeranteil von TM-Ck-scFvOkt3.1 war hingegen vergleichbar zu TM-Ck-scFvOkt3.2 (4%).

Zusammenfassend ergab sich, bezogen auf den Monomeranteil, bei den PM-Ck Konstrukten folgende Abstufung:

PM-Ck-scFvOkt3.2 > PM-Ck-scFvOkt3.1 > PM-Ck-scFvUCHT1

Und bei den TM-Ck-Konstrukten folgende Abstufung:

TM-Ck-scFvUCHT1 = TM-Ck-scFvOkt3.2 > TM-Ck-scFvOkt3.1

Um die TM-Ck und PM-Ck-Konstrukte funktionell vergleichen zu können, wurden von allen Antikörpern Monomerpräparationen mit >95% Monomeren durch präparative Größenausschlusschromatographie hergestellt. So sollte ein Einfluss der verschiedenen Aggregatgehalte ausgeschlossen werden.

5.2.4 Ausschluss von Endotoxinverunreinigungen

Bevor die funktionellen Untersuchungen der Antikörper erfolgten, wurden die jeweiligen Monomerpräparationen mittels LAL-Assay untersucht um sicherzustellen, dass während der Reinigung der Antikörper sowie der präparativen SEC zur Abreicherung des Aggregatgehaltes keine Endotoxine in die jeweiligen Proben gelangt sind. So sollte ausgeschlossen werden, dass es durch Endotoxine zu einer Verfälschung der Ergebnisse bei der funktionellen Untersuchung kommt.

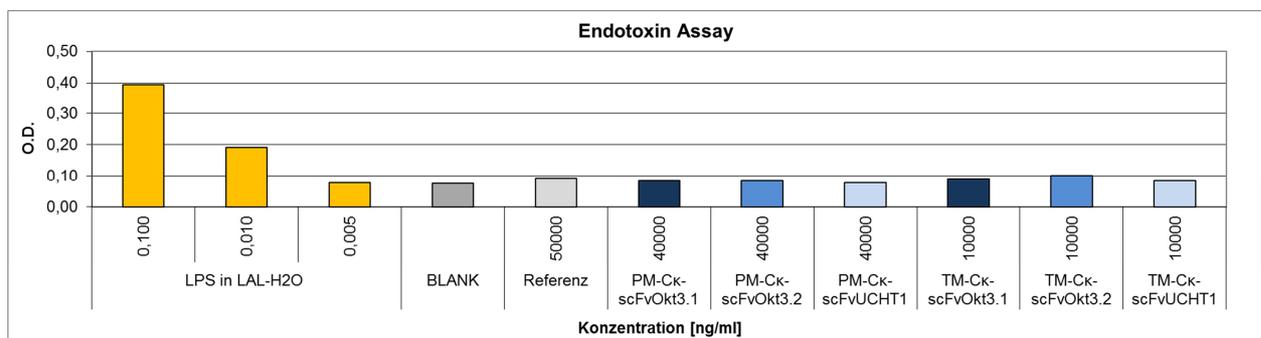


Abbildung 13: LAL-Assay zur Untersuchung einer eventuellen Endotoxinverunreinigung der Monomerpräparationen.

Die Bestimmung des Endotoxingehaltes erfolgte mittels LAL-Assay. Als Kontrollen wurden der Blank, PankoMab-GEX[®] aus GMP Herstellung (Referenz) sowie Lipopolysaccharide aus *E.coli* als Positivkontrolle gemessen. Die TM-Ck-Konstrukte wurden mit einer Konzentration von 10000 ng/ml und die PM-Ck-Konstrukte mit einer Konzentration von 40000 ng/ml getestet. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2).

Die später in den funktionellen Untersuchungen eingesetzten Antikörper enthielten nach der Präparation der Monomere kein Endotoxin (Abbildung 13). Die für die verschiedenen Monomerpräparationen bestimmten O.D.-Werte lagen alle im Bereich des Blank-Wertes und der internen Referenz.

5.3 Charakterisierung der Wirkmechanismen der PM-C κ - und TM-C κ -Konstrukte

5.3.1 Bindung der PM-C κ -Konstrukte an TA-MUC1

Zunächst wurde anhand der PM-C κ -Konstrukte überprüft, ob die zusätzlichen scFv-Fragmente die Antigenbindung an TA-MUC1 stören. Dafür wurde mittels Durchflusszytometrie die Zellbindung der verschiedenen PM-C κ -Konstrukte in einer Konzentrationsreihe von 100 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 ng/ml mit der Zellbindung des IgG1 Ausgangsantikörpers PankoMab-GEX[®] an TA-MUC1-positive ZR-75-1-Zellen verglichen.

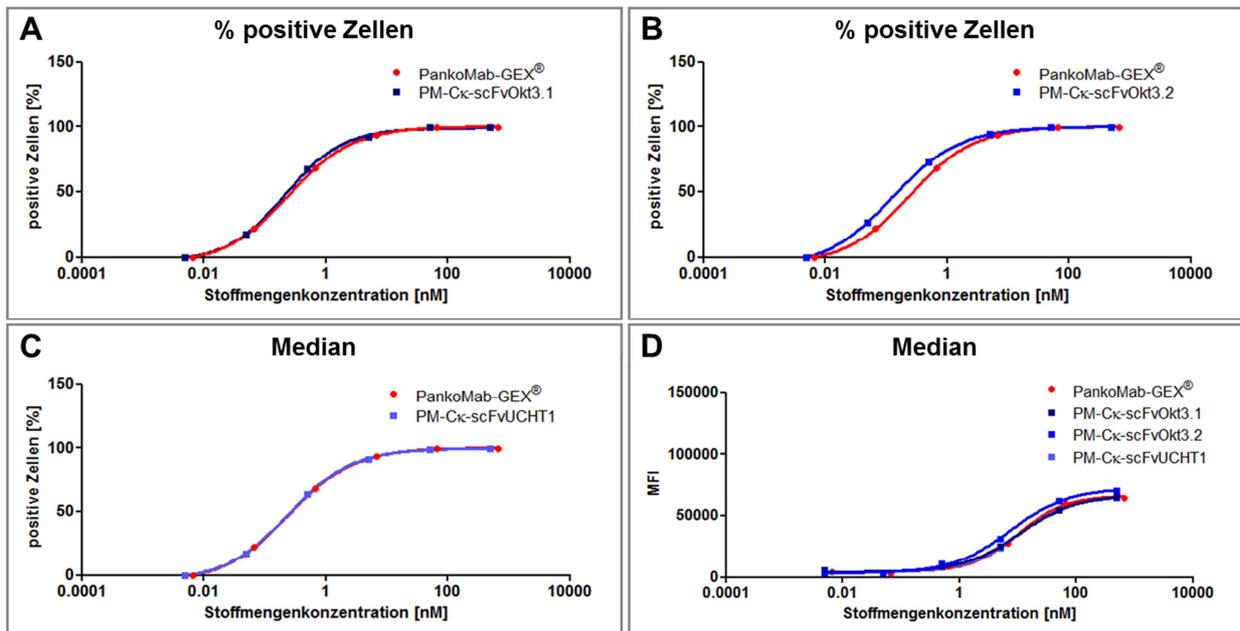


Abbildung 14: Zellbindung der PM-C κ -Konstrukte an TA-MUC1-positive ZR-75-1-Zellen.

ZR-75-1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (100 $\mu\text{g/ml}$; 5x 1:10 verdünnt) von PM-C κ -scFvOkt3.1 (A), PM-C κ -scFvOkt3.2 (B), PM-C κ -scFvUCHT1 (C) sowie PankoMab-GEX[®] inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgt mit einem anti-human IgG (H+L) RPE gekoppeltem Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen (A bis C) sowie der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) (D) in Abhängigkeit der Stoffmengenkonzentration.

Die durch Durchflusszytometrie bestimmte Zellbindung von PM-C κ -scFvOkt3.1 (Abbildung 14.A), PM-C κ -scFvOkt3.2 (Abbildung 14.B) und PM-C κ -scFvUCHT1 (Abbildung 14.C) an TA-MUC1-positive ZR-75-1-Zellen war über den getesteten Konzentrationsbereich bezogen auf die prozentual positiven Zellen und die mediane Fluoreszenzintensität (Abbildung 14.D) vergleichbar zu dem Ausgangsantikörper PankoMab-GEX[®]. Die zusätzlich an die C κ -Domäne fusionierten scFv-Fragmente zeigten keinen Einfluss auf die TA-MUC1-Bindung.

5.3.2 Bindung der PM-C κ - und TM-C κ -Konstrukte an CD3

Um die CD3-Bindung der aus den unterschiedlichen anti-CD3 Antikörpern entwickelten scFv-Fragmente zu untersuchen, wurde die Zellbindung an CD3-positive Jurkat-Zellen untersucht. Dafür wurden die verschiedenen PM-C κ - und TM-C κ -Konstrukte ausgehend von 100 μ g/ml in einer 10-fachen seriellen Verdünnung bis 1 ng/ml mit Jurkat-Zellen inkubiert und die Zellbindung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

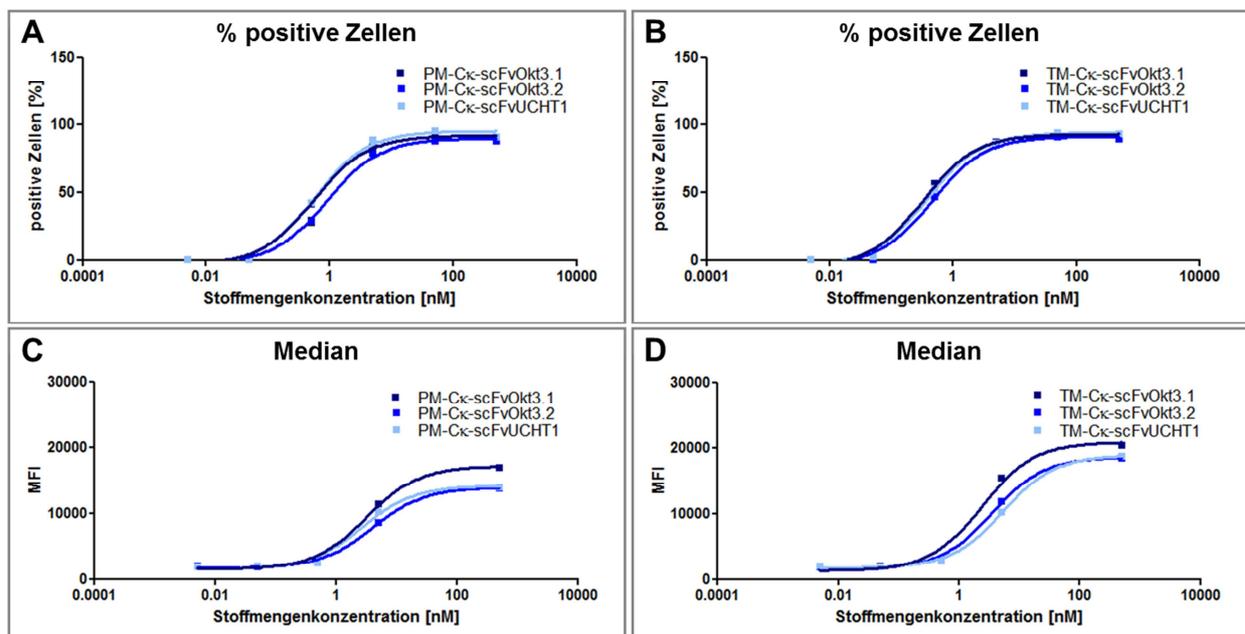


Abbildung 15: Zellbindung der TM-C κ - und PM-C κ -Konstrukte an CD3-positive Jurkat-Zellen.

Jurkat-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (100 μ g/ml; 5x 1:10 verdünnt) von PM-C κ -scFvOkt3.1, PM-C κ -scFvOkt3.2 und PM-C κ -scFvUCHT1 (A und C), sowie TM-C κ -scFvOkt3.1, TM-C κ -scFvOkt3.2 und TM-C κ -scFvUCHT1 (B und D) inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgt mit einem anti-human IgG (H+L) RPE gekoppeltem Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen (A und B) sowie der medianen Fluoreszenzintensität (C und D) in Abhängigkeit der Stoffmengenkonzentration.

Bezogen auf die prozentual positiven Zellen ist die Bindung der scFv-Fragmente von TM-Ck-scFvOkt3.1, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvUCHT1 an CD3-positive Jurkat-Zellen vergleichbar (Abbildung 15.B). So beträgt der Anteil gebundener Zellen bei 1 µg/ml Antikörper mit TM-Ck-scFvOkt3.1 87,4%, mit TM-Ck-scFvOkt3.2 85,0% und mit TM-Ck-scFvUCHT1 87,0%. Auch bei den PM-Ck-Konstrukten zeigen die unterschiedlichen scFv-Fragmente wie bereits die anti-CD3 Ausgangsantikörper (Abbildung 5) eine vergleichbare Bindung der Jurkat-Zellen (Abbildung 15.A). Betrachtet man jedoch die mediane Fluoreszenzintensität, zeigen jeweils TM-Ck-scFvOkt3.1 (Abbildung 15.D) und PM-Ck-scFvOkt3.1 (Abbildung 15.C) eine leicht erhöhte mediane Fluoreszenzintensität, was darauf schließen lässt, dass im Vergleich zu den anderen Konstrukten mehr Antikörpermoleküle pro Zelle gebunden haben.

5.3.3 Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung

Da die verschiedenen Konstrukte einen funktionellen Fc-Teil besitzen, wurde vermutet, dass sie eine Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung vermitteln. Um dies zu untersuchen, wurden PBMCs mit den entsprechenden Antikörperkonstrukten inkubiert und die Expressionen von CD69 und CD25 als Marker für die T-Zell-Aktivierung durch Durchflusszytometrie bestimmt.

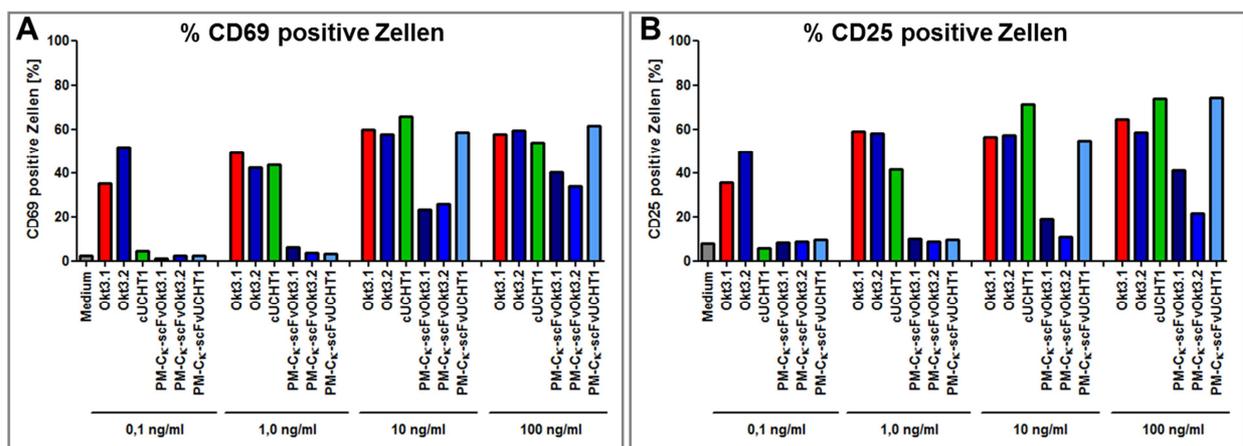


Abbildung 16: Anti-CD3 Antikörper vermittelte T-Zell-Aktivierung.

PBMCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen (100 ng/ml; 3x 1:10 verdünnt) von Okt3.1, Okt3.2, cUCHT1 sowie PM-Ck-scFvOkt3.1, PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-Ck-scFvUCHT1 bei für 24h inkubiert und die CD69-Expression (A) sowie die CD25-Expression (B) der CD3-positiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen in Abhängigkeit der Konzentration.

Die stärkste T-Zell-Aktivierung wurde durch die IgGs Okt3.1 und Okt3.2 induziert (Abbildung 16.A und B). So exprimierten bereits 35,6% und 52,1% der T-Zellen, die mit 0,1 ng/ml Okt3.1 und Okt3.2 inkubiert wurden, CD69 und 35,9% beziehungsweise 49,9% der T-Zellen exprimierten CD25. Wie schon in den Vorversuchen gezeigt (siehe Abbildung 6), weist cUCHT1 erneut eine deutlich geringere T-Zell-Aktivierung auf und induzierte bei 0,1 ng/ml eine CD69-Expression bei nur 4,4% und eine CD25-Expression bei 6,0% der T-Zellen. Eine deutliche Aktivierung der T-Zellen durch cUCHT1 wurde erst bei 1 ng/ml mit 44% CD69- und 41,6% CD25-positiven T-Zellen gemessen. Die maximale T-Zell-Aktivierung wurde bei Okt3.1, Okt3.2 und cUCHT1 mit 10 ng/ml Antikörper erreicht und lag ungefähr bei 60% CD69- und CD25-positiven T-Zellen.

Im Vergleich zu den Ausgangsantikörpern zeigten die PM-Ck-Konstrukte hingegen alle eine reduzierte T-Zell-Aktivierung. So induzierte keines der Konstrukte bei einer Konzentration von 1 ng/ml eine erhöhte Expression von CD25 oder CD69. Weiterhin war auffällig, dass entgegen der stärkeren T-Zell-Aktivierung durch die IgGs Okt3.1 und Okt3.2 im Vergleich zu cUCHT1, bei den PM-Ck-Konstrukten PM-Ck-scFvUCHT1 die stärkste T-Zell-Aktivierung ausgelöst hat. Die Inkubation mit PM-Ck-scFvUCHT1 führte bei einer Antikörperkonzentration von 10 ng/ml zu einer CD69-Expression bei 58,9% und einer CD25-Expression von 54,8% der T-Zellen. 10 ng/ml PM-Ck-scFvOkt3.1 und PM-Ck-scFvOkt3.2 führte hingegen nur bei 23,6% beziehungsweise 26,1% der T-Zellen zu einer CD69-Expression und bei 19,2% und 10,7% der T-Zellen zu einer CD25-Expression. Damit induzierten beide Konstrukte noch eine deutlich geringere T-Zell-Aktivierung als die Ausgangsantikörper. Auch durch eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 100 ng/ml konnten beide Konstrukte nicht die gleiche maximale T-Zell-Aktivierung induzieren wie PM-Ck-scFvUCHT1 und die Ausgangsantikörper.

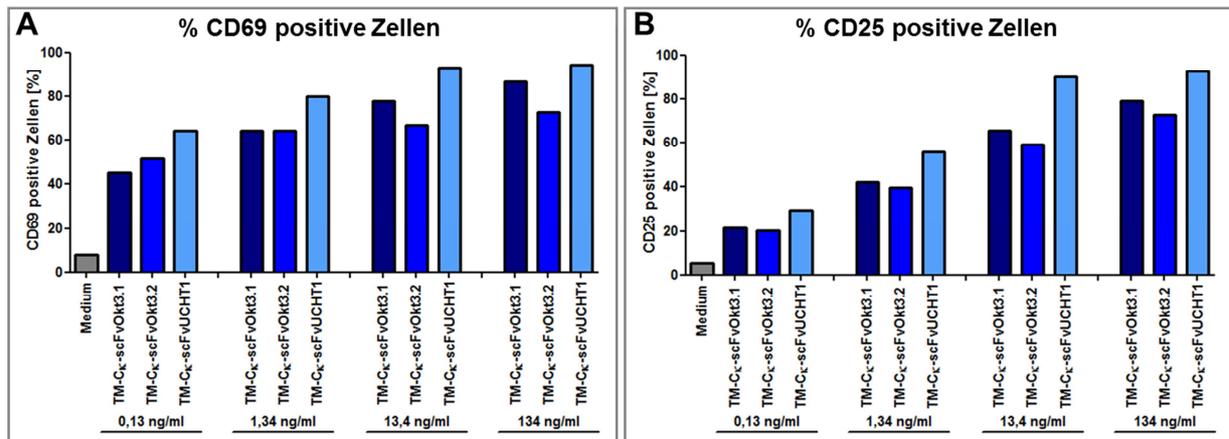


Abbildung 17: T-Zell-Aktivierung durch die TM-Ck-Konstrukte.

PBMCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen (134 ng/ml; 3x 1:10 verdünnt) von TM-Ck-scFvOkt3.1, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvUCHT1 für 48h inkubiert und die CD69-Expression (A) nach 24h sowie die CD25-Expression (B) nach 48h der CD3-positiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen in Abhängigkeit der Konzentration.

Um die Ergebnisse der PM-Ck-Konstrukte zu bestätigen wurde die durch die TM-Ck-Konstrukte vermittelte T-Zell-Aktivierung untersucht. Dazu wurden erneut PBMCs mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und die Expressionen von CD69 und CD25 als Marker für die T-Zell-Aktivierung durch Durchflusszytometrie bestimmt. Auch bei dem Vergleich der TM-Ck-Konstrukte induzierte TM-Ck-scFvUCHT1 die stärkste T-Zell-Aktivierung (Abbildung 17). Durch die Inkubation mit TM-Ck-scFvUCHT1 (13,4 ng/ml) exprimierten 93,1% der T-Zellen CD69 und 90,3% der T-Zellen exprimierten CD25. Im Vergleich dazu wurden mit TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 die T-Zellen nicht so stark aktiviert. So betrug nach der Inkubation mit TM-Ck-scFvOkt3.1 die Anzahl der positiven Zellen nur 77,7% (CD69) und 65,4% (CD25) und nach der Inkubation mit TM-Ck-scFvOkt3.2 nur 66,7% (CD69) und 59,1% (CD25). Diese Ergebnisse wurden auch mit den PM-Ck-Konstrukten erzielt. Das scFvUCHT1-Konstrukt vermittelt die stärkste Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung. Da die Zellen des hier verwendeten Spenders jedoch allgemein eine deutlich stärkere T-Zell-Aktivierung zeigt als der Spender in dem Versuch mit den PM-Ck-Konstrukten fällt der Unterschied zu TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 geringer aus. Zusammenfassend konnten durch die Auswahl der drei unterschiedlichen scFv-Fragmente Konstrukte entwickelt werden, die zum einen eine deutlich reduzierte Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung zeigen als die Ausgangsantikörper und zum anderen durch die Wahl der verschiedenen scFv-Fragmente ein variables Maß an T-Zell-Aktivierung ermöglichen.

5.3.4 PM-Ck und TM-Ck antikörperabhängige Zytokinfreisetzung

Um die Wirkung der bispezifischen Antikörper auf T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Zytokinfreisetzung untersucht. Dafür wurden die PM-Ck- und TM-Ck-Konstrukte, sowie PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] mit PBMCs oder Vollblut unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und die Zielzell-unabhängige Zytokinfreisetzung bestimmt. Dabei wurde zum einen die Inkubationsdauer angepasst, je nachdem ob PBMCs (24 Stunden) oder Vollblut (4 Stunden) verwendet wurden. Zum anderen wurden die Antikörper entweder flüssig hinzugegeben oder durch vorheriges Antrocknen an Mikrotiterplatten beschichtet. Um zusätzlich die Zielzell-abhängige Zytokinfreisetzung zu untersuchen, wurden in einigen Ansätzen noch TA-MUC1-positive T-47D-Zellen zugegeben. Als Positivkontrolle wurde MabCampath[®] (Alemtuzumab) eingesetzt, ein Antikörper, der bereits klinisch zugelassen ist und dessen Anwendung mit Zytokinfreisetzung verbunden ist. Die freigesetzten Konzentrationen von IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 und TNF- α wurden quantitativ mittels Elektrochemilumineszenz bestimmt und die erhöhte Freisetzung im Verhältnis zu den jeweiligen Ausgangsantikörpern berechnet.

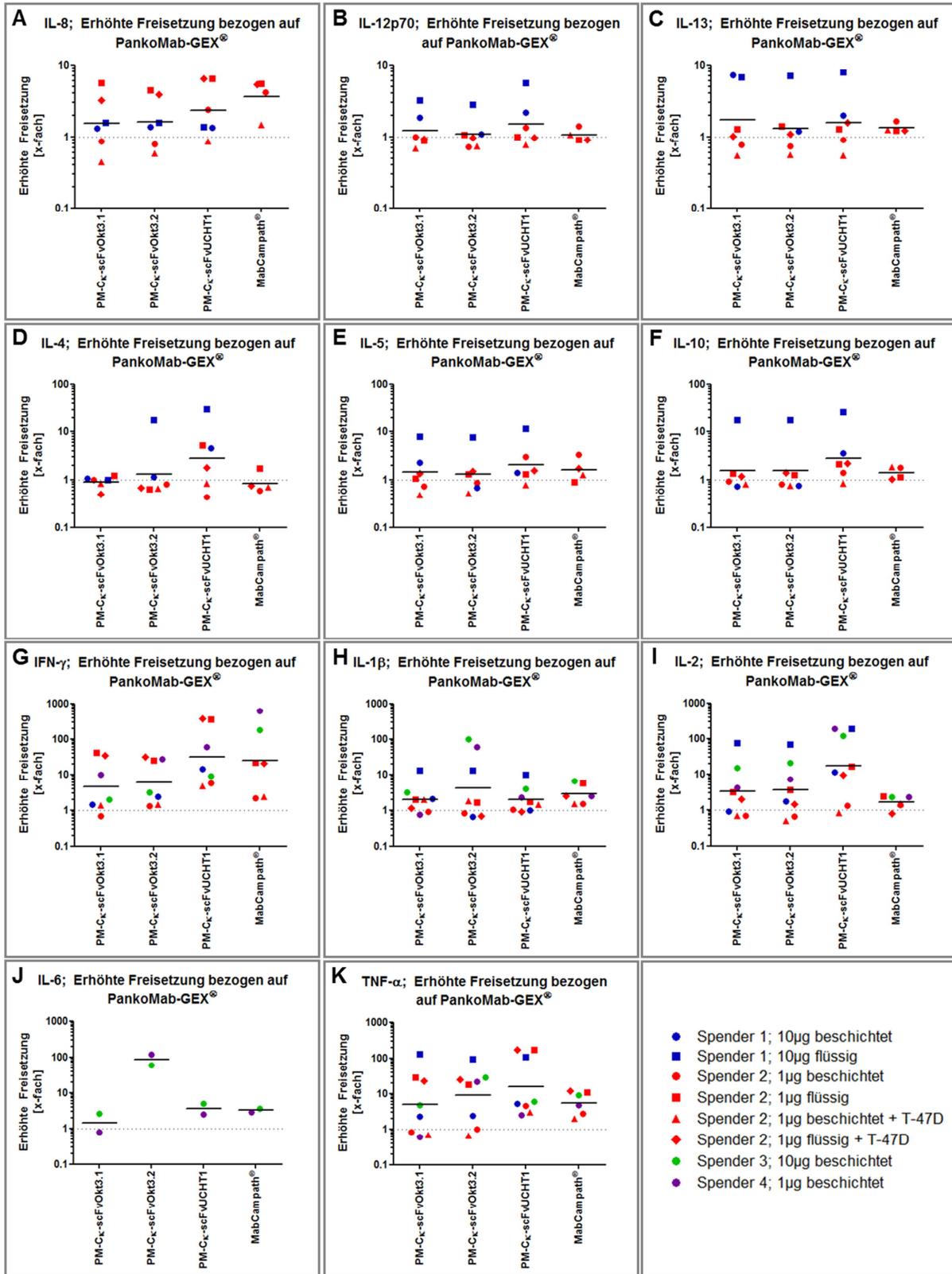


Abbildung 18: PM-Ck induzierte Zytokinfreisetzung.

PBMCs (Spender 1) oder Vollblut (Spender 2-4) wurden mit den PM-Ck-Konstrukten, PankoMab-GEX® und MabCampath® inkubiert und die freigesetzte Konzentration an IL-8 (A), IL-12p70 (B), IL-13 (C), IL-4 (D), IL-5 (E), IL-10 (F), IFN- γ (G), IL-1 β (H), IL-2 (I), IL-6 (J) und TNF- α (K) gemessen. Die verschiedenen Spender sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet wobei verschiedene Symbole unterschiedliche Versuchsbedingungen kennzeichnen (● Antikörper beschichtet; ▲ Antikörper beschichtet + Zielzellen; ■ flüssiger Antikörper; ◆ Antikörper flüssig + Zielzellen). Dargestellt ist die Erhöhung der Zytokinfreisetzung bezogen auf PankoMab-GEX® (n=3) sowie der Mittelwert aller Experimente.

Generell war die freigesetzte Menge an Zytokinen stark abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen sowie den individuellen Spendern von Vollblut oder PBMCs. So wurden zum Beispiel mit dem Vollblut von Spender 4 deutlich höhere Zytokinkonzentrationen freigesetzt als mit dem von Spender 2 (jeweils durch Inkubation mit 1 µg beschichtetem Antikörper, siehe z.B. Abbildung 18.G und Abbildung 19.D). Weiterhin bewirkten die bispezifischen Antikörper eine höhere Zytokinfreisetzung, wenn sie in flüssiger Phase vorlagen und nicht zuvor an die 96-well Platten gebunden wurden (siehe Spender 1 und Spender 2). Werden MabCampath[®] und die Ausgangsantikörper PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] hingegen an die 96-well Platte gebunden, induzieren sie eine höhere Zytokinfreisetzung als bei flüssiger Antikörpergabe. Durch die unterschiedliche Auswirkung des Beschichtens von mono- und bispezifischen Antikörpern ist ein direkter Vergleich zwischen MabCampath[®] und den bispezifischen Antikörpern in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Dennoch kann das Profil der verschiedenen freigesetzten Zytokine verglichen werden. Da allerdings keine ausreichenden Daten in der Literatur darüber vorliegen, welches Modell die im Patienten zu erwartende Zytokinfreisetzung genauer widerspiegelt, wurden dennoch beide Versuchsansätze durchgeführt und die jeweilige Zytokinfreisetzung immer in Bezug auf PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] dargestellt, da beide Antikörper schon in einer klinischen Phase I als verträglich eingestuft wurden.

Zusammenfassend wurden durch die PM-Ck-Konstrukte jeweils geringe Menge der Zytokine IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und IL-13 freigesetzt, die in etwa der Zytokinfreisetzung durch PankoMab-GEX[®] entsprachen (Abbildung 18). Eine Ausnahme bildet dabei die durch PM-Ck-scFvOkt3.2 freigesetzte Menge an IL-1β und IL-6, die mit den Spendern 3 und 4 deutlich erhöht war. Da diese erhöhte Freisetzung mit Spender 1 und 2 nicht gemessen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Verunreinigung handelt. Weiterhin induzierten die PM-Ck-Konstrukte eine vergleichbare Freisetzung an TNF-α, die allerdings in den Ansätzen mit flüssiger Antikörperzugabe im Vergleich zu PankoMab-GEX[®] deutlich erhöht war (Abbildung 18.K). Ein Unterschied in der durch die verschiedenen PM-Ck-Konstrukte induzierten Zytokinfreisetzung konnte nur bei IL-2 und IFN-γ bestimmt werden (Abbildung 18.G und I). Dabei induzierte PM-Ck-scFvUCHT1 eine im Mittelwert über alle Experimente 5-fach höhere IL-2 und 9-fach höhere IFN-γ Freisetzung im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.1 und PM-Ck-scFvOkt3.2. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen lassen

sich für die Mittelwerte aller Versuche keine Signifikanzen berechnen. Betrachtet man jedoch die Versuche einzeln (n=3) ergibt sich bei jedem Versuchsansatz eine für PM-Ck-scFvUCHT1 signifikant erhöhte IFN- γ Freisetzung im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.1 ($p < 0,05 - 0,0001$) sowie PM-Ck-scFvOkt3.2 ($p < 0,05 - 0,001$), mit Ausnahme der Versuche mit dem Vollblut von Spender 3. Auch bei der IL-2 Freisetzung ergibt sich bei jedem Versuchsansatz, mit Ausnahme eines Ansatzes (Spender 2, 1 μg Antikörper beschichtet + Zielzellen), eine signifikant höhere Freisetzung von PM-Ck-scFvUCHT1 im Vergleich mit PM-Ck-scFvOkt3.1 ($p < 0,05 - 0,0001$) und PM-Ck-scFvOkt3.2 ($p < 0,05 - 0,0001$). MabCampath[®] hingegen induzierte lediglich eine erhöhte TNF- α und IFN- γ Freisetzung im Vergleich zu PankoMab-GEX[®].

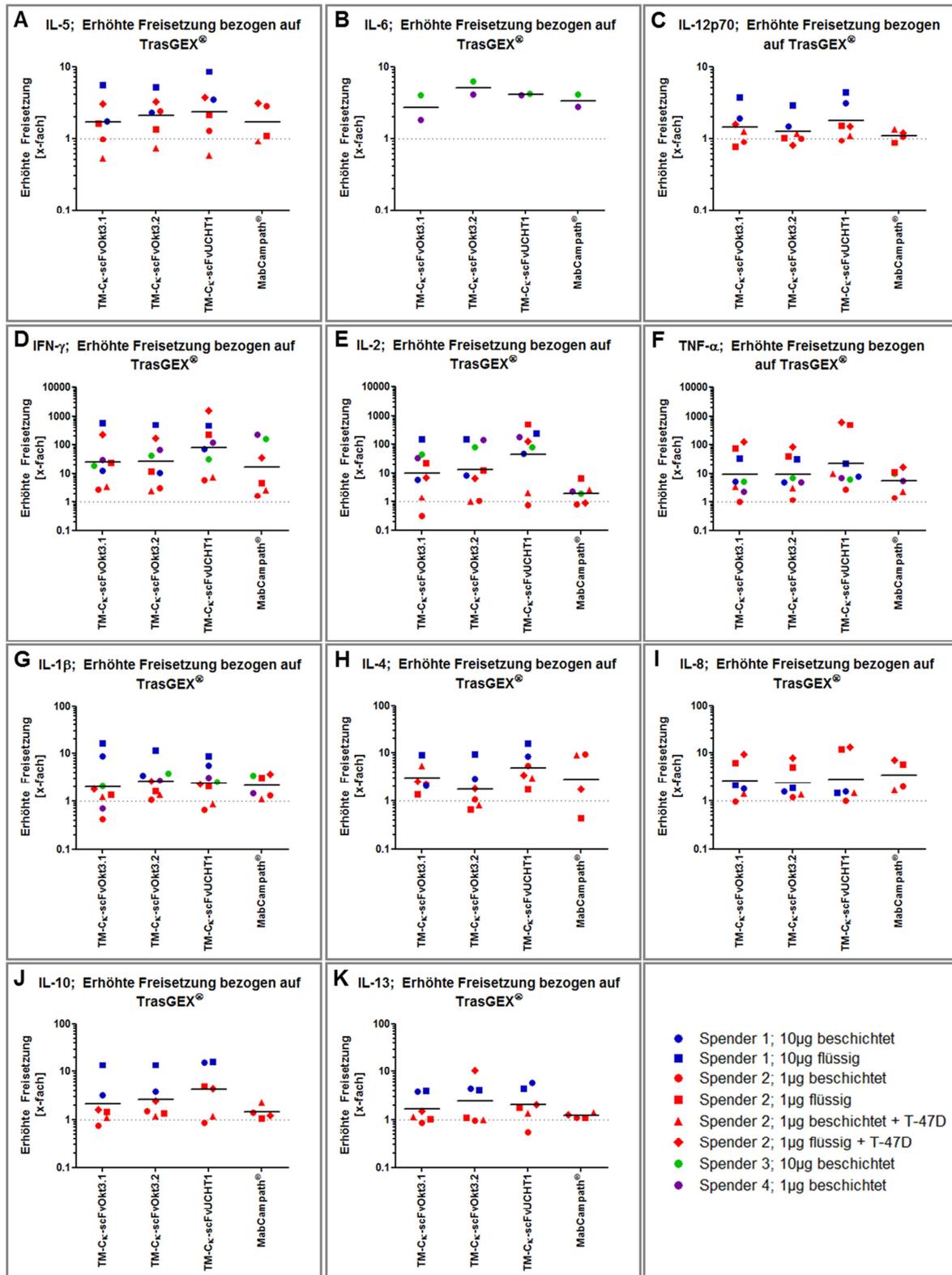


Abbildung 19: TM-Ck induzierte Zytokinfreisetzung.

PBMCs (Spender 1) oder Vollblut (Spender 2-4) wurden mit den TM-Ck-Konstrukten, TrasGEX® und MabCampath® inkubiert und die freigesetzte Konzentration an IL-5 (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), IFN- γ (D), IL-2 (E), TNF- α (F), IL-1 β (G), IL-4 (H), IL-8 (I), IL-10 (J) und IL-13 (K) gemessen. Die verschiedenen Spender sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet wobei verschiedene Symbole unterschiedliche Versuchsbedingungen kennzeichnen (● Antikörper beschichtet; ▲ Antikörper beschichtet + Zielzellen; ■ flüssiger Antikörper; ◆ Antikörper flüssig + Zielzellen). Dargestellt ist die Erhöhung der Zytokinfreisetzung bezogen auf TrasGEX® (n=3) sowie der Mittelwert aller Experimente.

Auch durch die TM-Ck-Konstrukte wurden nur geringe Mengen der Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und IL-13 freigesetzt (Abbildung 19), die in etwa der Zytokinfreisetzung durch TrasGEX[®] entsprachen. Weiterhin induzierten auch die TM-Ck-Konstrukte eine vergleichbare Freisetzung an TNF- α , die in den Ansätzen mit flüssiger Antikörperzugabe im Vergleich zu TrasGEX[®] deutlich erhöht war (Abbildung 19.F). In den beiden Ansätzen mit Spender 2 bei flüssiger Antikörperzugabe induzierte dabei TM-Ck-scFvUCHT1 eine höhere TNF- α Freisetzung als TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 (Abbildung 19.F). Da diese erhöhte Freisetzung mit Spender 1 nicht gemessen wurde, sollten weitere Spender untersucht werden, um gesicherte Ergebnisse zu bekommen. Dabei induzierte TM-Ck-scFvUCHT1 eine im Mittelwert über alle Experimente eine 4,5- beziehungsweise 3-fach höhere IL-2 sowie eine 3-fach höhere IFN- γ Freisetzung im Vergleich zu TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen lassen sich für die Mittelwerte aller Versuche keine Signifikanzen berechnen. Betrachtet man jedoch die Versuche einzeln (n=3) ergibt sich für TM-Ck-scFvUCHT1 im Vergleich zu TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 ($p < 0,05 - 0,0001$) eine signifikant erhöhte IFN- γ und IL-2 Freisetzung in 6 beziehungsweise 5 von 8 Versuchsansätzen.

5.4 Charakterisierung der Wirkmechanismen der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte

In den Zellbindungsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen scFv-Fragmente keinen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers an TA-MUC1 haben und alle eine vergleichbare CD3-Bindung aufweisen. Dennoch induzierten die scFv-Fragmente eine unterschiedliche T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von Zielzellen und verursachten bei der Inkubation mit Vollblut oder PBMCs eine unterschiedlich hohe Zytokinfreisetzung. Da die scFv-Fragmente Okt3.2 und Okt3.1 eine vergleichbare CD69-Expression in Abwesenheit von Zielzellen induzieren und das scFvOkt3.2-Fragment dabei aber eine geringere Zytokinfreisetzung verursacht, wurden PM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 gewählt, um durch den Vergleich mit PM-CH3-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 zu untersuchen, ob die Fusion der scFv-Fragmente an die CH3- oder an die Ck-Domäne der Ausgangsantikörper vorteilhafte Eigenschaften hat.

5.4.1 Zellbindung an TA-MUC1 und Her2

Die Bindung von PM-Cκ-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 sowie TM-Cκ-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 wurde mittels Durchflusszytometrie an TA-MUC1- und Her2-positiven ZR-75-1-Zellen untersucht.

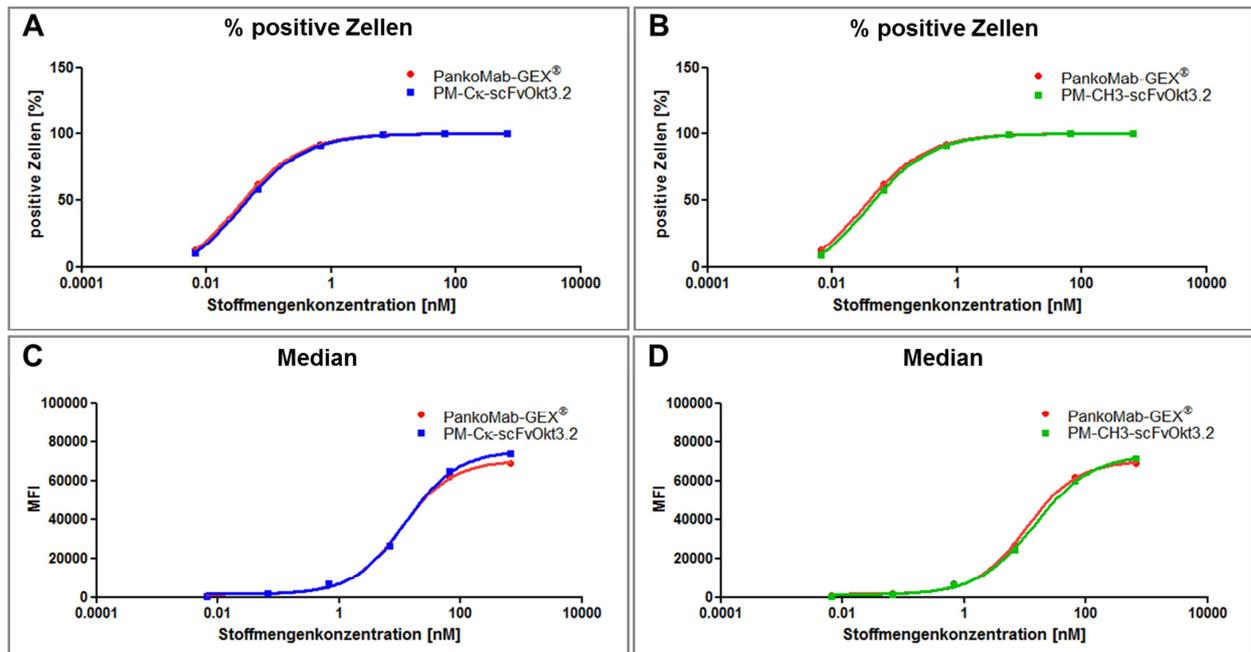


Abbildung 20: Zellbindung von PM-Cκ-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 an TA-MUC1-positive ZR-75-1-Zellen.

ZR-75-1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (666 nM; 5x 1:10 verdünnt) von PankoMab-GEX® sowie PM-Cκ-scFvOkt3.2 (A und C) und PM-CH3-scFvOkt3.2 (B und D) inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit einem anti-human IgG (H+L) RPE gekoppeltem Sekundäntikörper mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen und der medianen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Stoffmengenkonzentration.

PM-Cκ-scFvOkt3.2 zeigte sowohl in der Anzahl positiver Zellen als auch im Median der Fluoreszenzintensität eine zu PankoMab-GEX® vergleichbare Bindung an die Zellen, wie schon beim Vergleich der verschiedenen scFv-Fragmente gezeigt wurde (siehe Abbildung 14). PM-CH3-scFvOkt3.2 bindet ebenso in vergleichbarer Weise zu PankoMab-GEX® an die TA-MUC1-positiven ZR-75-1-Zellen (Abbildung 20). Die zusätzlichen scFv-Fragmente an der Cκ- oder CH3-Domäne zeigen keinen Einfluss auf die Tumorzellbindung.

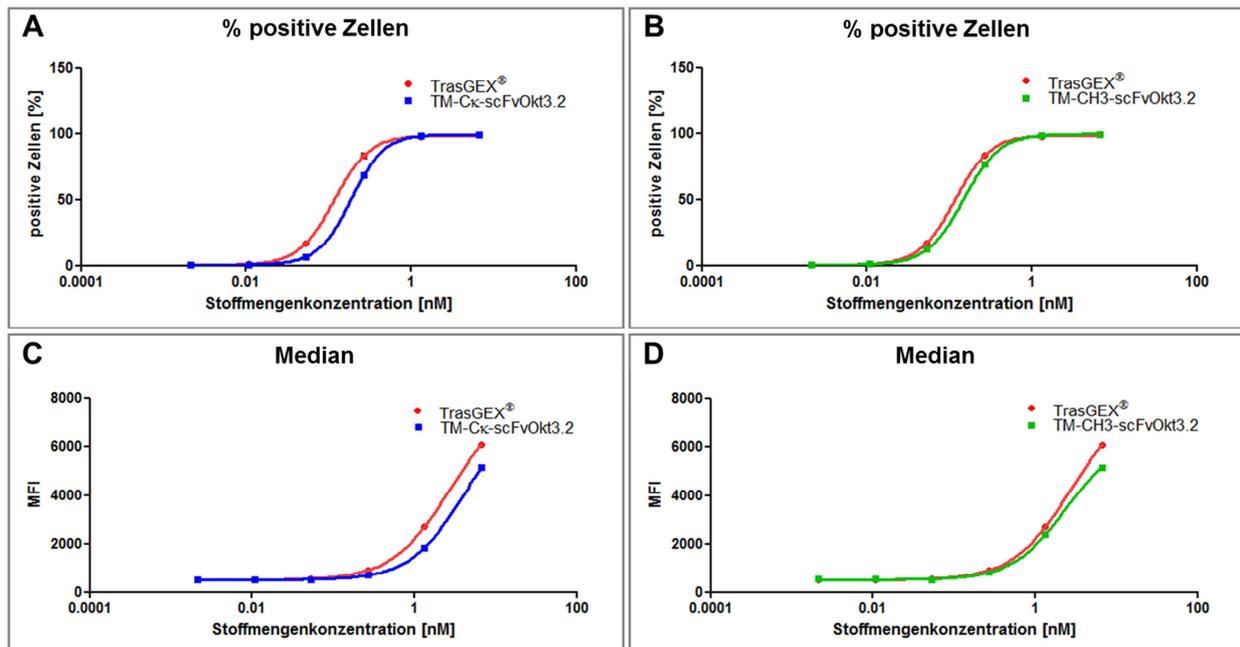


Abbildung 21: Zellbindung von TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 an Her2-positive ZR-75-1-Zellen.

ZR-75-1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (6,66 nM; 5x 1:5 verdünnt) von TrasGEX[®] sowie TM-Ck-scFvOkt3.2 (A und C) und TM-CH3-scFvOkt3.2 (B und D) inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit einem anti-human IgG (H+L) RPE gekoppeltem Sekundäntikörper mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen und der medianen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Stoffmengenkonzentration.

Im Gegensatz zu den PM-Konstrukten war die Bindung von TM-Ck-scFvOkt3.2 an Her2-positive ZR-75-1-Zellen im Vergleich mit TrasGEX[®] sowohl in der Anzahl positiver Zellen als auch im Median der Fluoreszenzintensität etwas geringer. TM-CH3-scFvOkt3.2 hingegen zeigte eine zu TrasGEX[®] vergleichbare Bindung der ZR-75-1-Zellen (Abbildung 21).

5.4.2 Zellbindung an CD3-positive Jurkat-Zellen

Zusätzlich zu der Bindung von TA-MUC1 und Her2 wurde untersucht, ob das Okt3.2 scFv-Fragment eine stärkere CD3-Bindung vermitteln kann, wenn es an die Ck- oder CH3-Domäne der Ausgangsantikörper fusioniert ist. Dazu wurde die Zellbindung von PM-Ck-scFvOkt3.2, PM-CH3-scFvOkt3.2 sowie TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 an CD3-positiven Jurkat-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

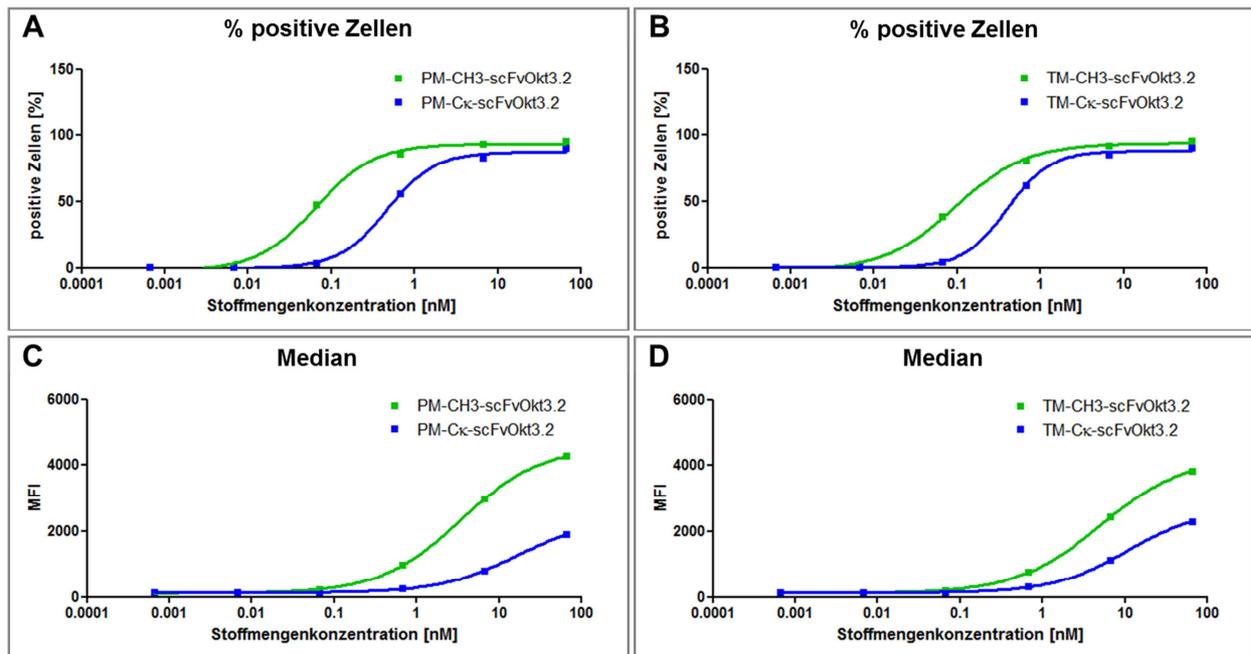


Abbildung 22: Zellbindung von PM-Ck-scFvOkt3.2, PM-CH3-scFvOkt3.2, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 an CD3-positive Jurkat-Zellen.

Jurkat-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (66,6 nM; 5x 1:10 verdünnt) von PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 (A und C) als auch von TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 (B und D) inkubiert. Die Detektion der bispezifischen Antikörper erfolgt mit einem anti-human IgG (H+L) RPE gekoppeltem Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert ($n=2$) der prozentualen Anzahl positiver Zellen und der medianen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Stoffmengenkonzentration.

Die CH3-Fusionsproteine zeigen im Vergleich zu den Ck-Fusionsproteinen eine deutlich verbesserte Bindung an CD3. Bezogen auf die prozentual positiven Zellen zeigte PM-CH3-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 65 \text{ pM}$) eine bessere CD3-Bindung als PM-Ck-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 464 \text{ pM}$), was einer Erhöhung um den Faktor 7 entspricht (Abbildung 22.A). TM-CH3-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 94 \text{ pM}$) erreicht eine um den Faktor 4 bessere CD3-Bindung als TM-Ck-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 396 \text{ pM}$) (Abbildung 22.B). Vergleicht man die CH3- und Ck-Konstrukte untereinander, zeigt PM-CH3-scFvOkt3.2 eine etwas bessere CD3-Bindung als TM-CH3-scFvOkt3.2, wohingegen TM-Ck-scFvOkt3.2 eine etwas bessere Bindung als PM-Ck-scFvOkt3.2 zeigt. Auch im Median der Fluoreszenzintensität zeigten die CH3-Konstrukte eine deutlich verbesserte Bindung an CD3 als die Ck-Konstrukte (Abbildung 22.C und D). Dabei war die mittels Durchflusszytometrie bestimmte Bindung von PM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 an CD3-positiven Jurkat-Zellen vergleichbar zu den Ergebnissen der Untersuchung der verschiedenen scFv-Fragmente (Abbildung 15). Bezogen auf die Zellbindung bietet die Fusion der scFv-Fragmente an die CH3-Domäne der Antikörper daher einen deutlichen Vorteil gegenüber der Fusion an die Ck-Domäne.

5.4.3 T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die CD3-Bindung stärker ist, wenn die scFv-Fragmente mit der CH3-Domäne von PankoMab-GEX[®] oder TrasGEX[®] und nicht mit der Ck-Domäne verknüpft sind, wurde untersucht, ob sich die bessere Zellbindung auch auf die T-Zell-Aktivierung auswirkt. Dafür wurden PBMCs mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert und die Expression von CD69 und CD25 als Marker für die T-Zell-Aktivierung mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zusätzlich wurden zu einigen Ansätzen noch TA-MUC1- und Her2-positive T-47D-Zellen hinzugegeben, um zu untersuchen, ob durch die Anwesenheit von Zielzellen die T-Zell-Aktivierung verstärkt werden kann.

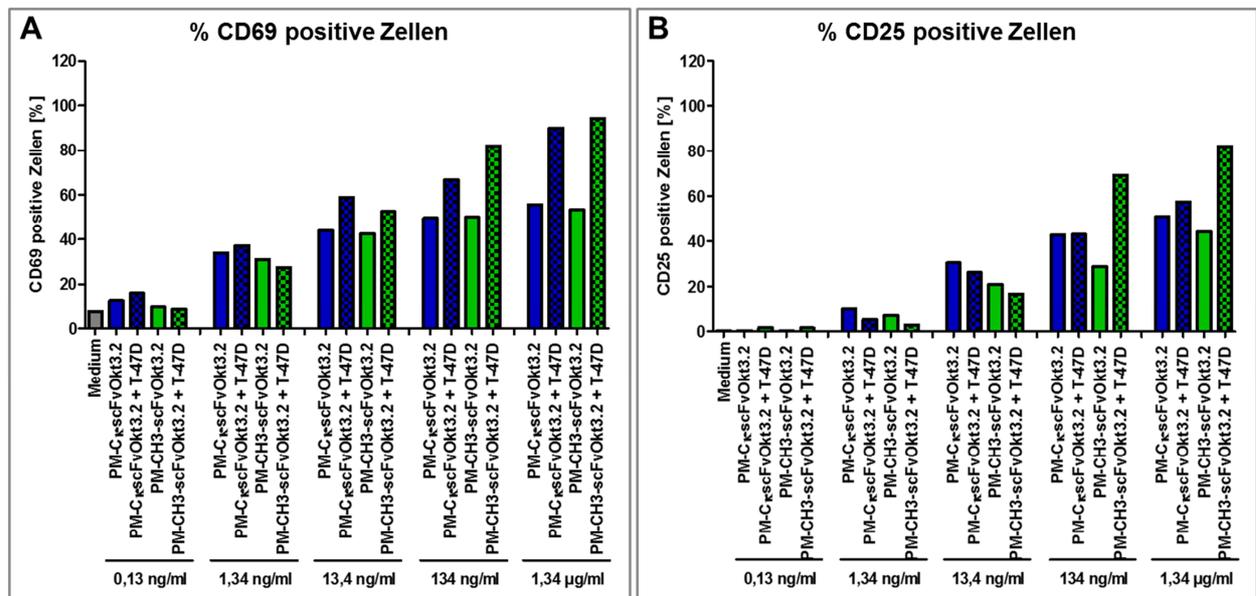


Abbildung 23: T-Zell-Aktivierung durch die PM-Konstrukte.

PBMCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1,34 µg/ml; 4x 1:10 verdünnt) von PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 mit und ohne TA-MUC1-positiven T-47D-Zellen (E:T 5:1) für 48h inkubiert und die CD69-Expression (A) nach 24h sowie die CD25-Expression (B) nach 48h der CD3-positiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen in Abhängigkeit der Konzentration.

Nach 24-stündiger Inkubation der PBMCs mit PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 war die CD69-Expression sowohl mit als auch ohne Zielzellen für beide Konstrukte vergleichbar (Abbildung 23.A). Dabei war in Anwesenheit der Zielzellen die CD69-Expression deutlich gesteigert. Dieser Einfluss der Zielzellen konnte bei der CD25-Expression hingegen nach 48-stündiger Inkubation mit PM-Ck-scFvOkt3.2 nicht gemessen werden (Abbildung 23.B). PM-CH3-scFvOkt3.2 induzierte jedoch ohne

Zugabe von Zielzellen eine im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.2 etwas geringere CD25-Expression. Durch die Zugabe der Zielzellen kam es jedoch in den Ansätzen mit 134 ng/ml und 1,34 µg/ml PM-CH3-scFvOkt3.2 zu einer deutlichen Steigerung der CD25-Expression, wie bereits bei CD69 beobachtet. Zusammenfassend vermittelte PM-CH3-scFvOkt3.2 eine schwächere T-Zell-Aktivierung als PM-Ck-scFvOkt3.2 in Abwesenheit von Zielzellen, in Anwesenheit von Zielzellen jedoch eine gesteigerte CD25-Expression. Entgegen den Ergebnissen der PM-Konstrukte induzierte bei den TM-Konstrukten in den Ansätzen ohne Zugabe von Zielzellen TM-CH3-scFvOkt3.2 ab einer Konzentration von 134 ng/ml eine stärkere CD69-Expression als TM-Ck-scFvOkt3.2, die allerdings bei der wiederholten Messung der CD69-Expression nach 48h und bei einem weiteren Spender nicht bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wie bereits bei den PM-Konstrukten beobachtet, führte auch bei den TM-Konstrukten die Anwesenheit der Zielzellen zu einer stärkeren und für beide Antikörper vergleichbaren CD69-Expression (Abbildung 24.A). Nach 48-stündiger Inkubation mit den Zielzellen konnte jedoch nur in dem Ansatz mit TM-Ck-scFvOkt3.2 eine leichte Steigerung der CD25-positiven T-Zellen beobachtet werden.

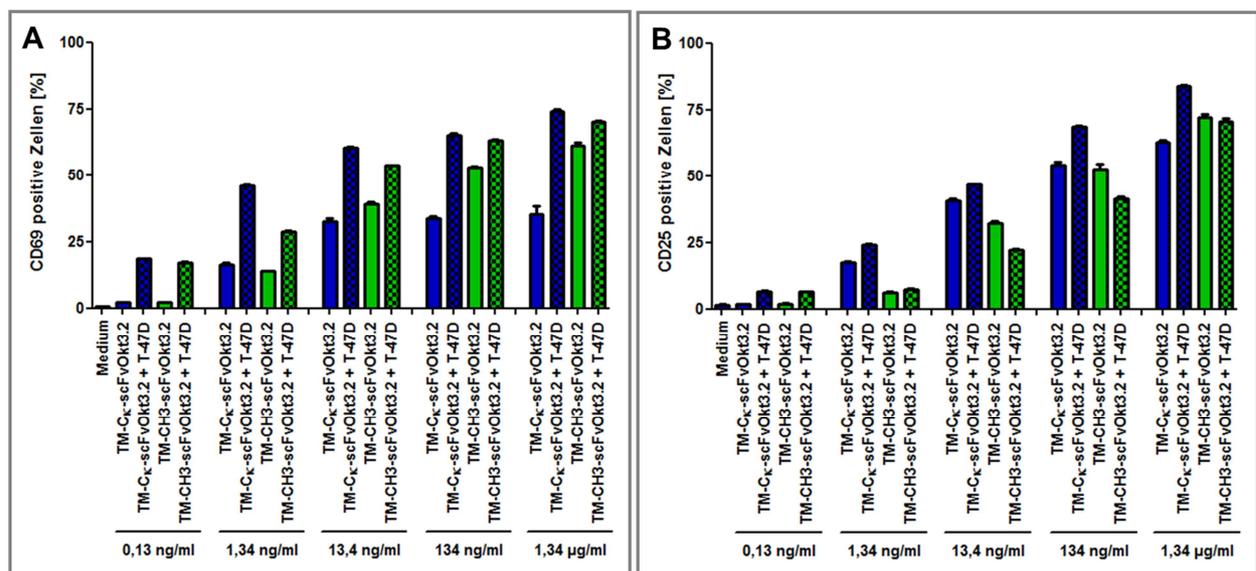


Abbildung 24: T-Zell-Aktivierung durch die TM-Konstrukte.

PBMCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1,34 µg/ml; 4x 1:10 verdünnt) von TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 mit und ohne Her2-positiven T-47D-Zellen (E:T 5:1) für 48h inkubiert und die CD69-Expression (A) nach 24h sowie die CD25-Expression (B) nach 48h mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert (n=2) der prozentualen Anzahl positiver Zellen in Abhängigkeit der Konzentration.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei den PankoMab-Konstrukten das CH3-Konstrukt in Abwesenheit von Zielzellen eine schwächere T-Zell-Aktivierung als

das Ck-Konstrukt vermittelt. In Anwesenheit von Zielzellen induziert jedoch das CH3-Konstrukt eine stärkere CD25-Expression. Bei den TM-Konstrukten ist die induzierte T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von Zielzellen vergleichbar, in Anwesenheit von Zielzellen induziert jedoch das Ck-Konstrukt eine erhöhte CD25-Expression. Die deutlich verbesserte CD3-Bindung durch die CH3-Konstrukte (Abbildung 22) führt daher nicht zu einer per se verbesserten T-Zell-Aktivierung. In Anbetracht der geringeren CD3-Bindung der Ck-Fusionsproteine scheinen diese trotzdem einen Vorteil in der T-Zell-Aktivierung zu haben, die durch Bindung von Fc γ R-positiven Immunzellen am Fc-Teil vermittelt wird.

Allgemein soll an dieser Stelle noch darauf hingewiesen werden, dass bei allen Versuchen, die mit Zielzellen durchgeführt wurden, starke Schwankungen in Abhängigkeit der PBMC Spender und Zielzelllinien beobachtet wurden. So zeigten bei einigen Spendern einige Tumorzelllinien einen stark inhibierenden Effekt auf die T-Zell-Aktivierung, was auf die hohe Immunsuppressivität der Tumorzelllinien zurückzuführen ist (nicht gezeigt). Daher ist es schwierig in *in vitro* Versuchen in denen die T-Zell-Aktivierung mit PBMCs unter optimalen Versuchsbedingungen mit der T-Zell-Aktivierung mit PBMCs und verschiedenen immunsuppressiven Zielzelllinien verglichen werden müssen, eine allgemein gültige Aussage über den Effekt der Anwesenheit von Zielzellen zu treffen.

5.4.4 Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit der der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte

Zusätzlich zu der Zellbindung und T-Zell-Aktivierung wurde auch untersucht, ob die Fusionierung des Okt3.2 scFv-Fragments an die CH3-Domäne von PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] einen Einfluss auf die Antikörper verursachte Zytokinfreisetzung hat. Dafür wurden PM-Ck-scFvOkt3.2, PM-CH3-scFvOkt3.2, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 mit Vollblut inkubiert und die freigesetzte Konzentration an IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α mit dem SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) durch das Human IL-2 Kit (Meso Scale Discovery) und das Human Proinflammatory I Kit (Meso Scale Discovery) bestimmt.

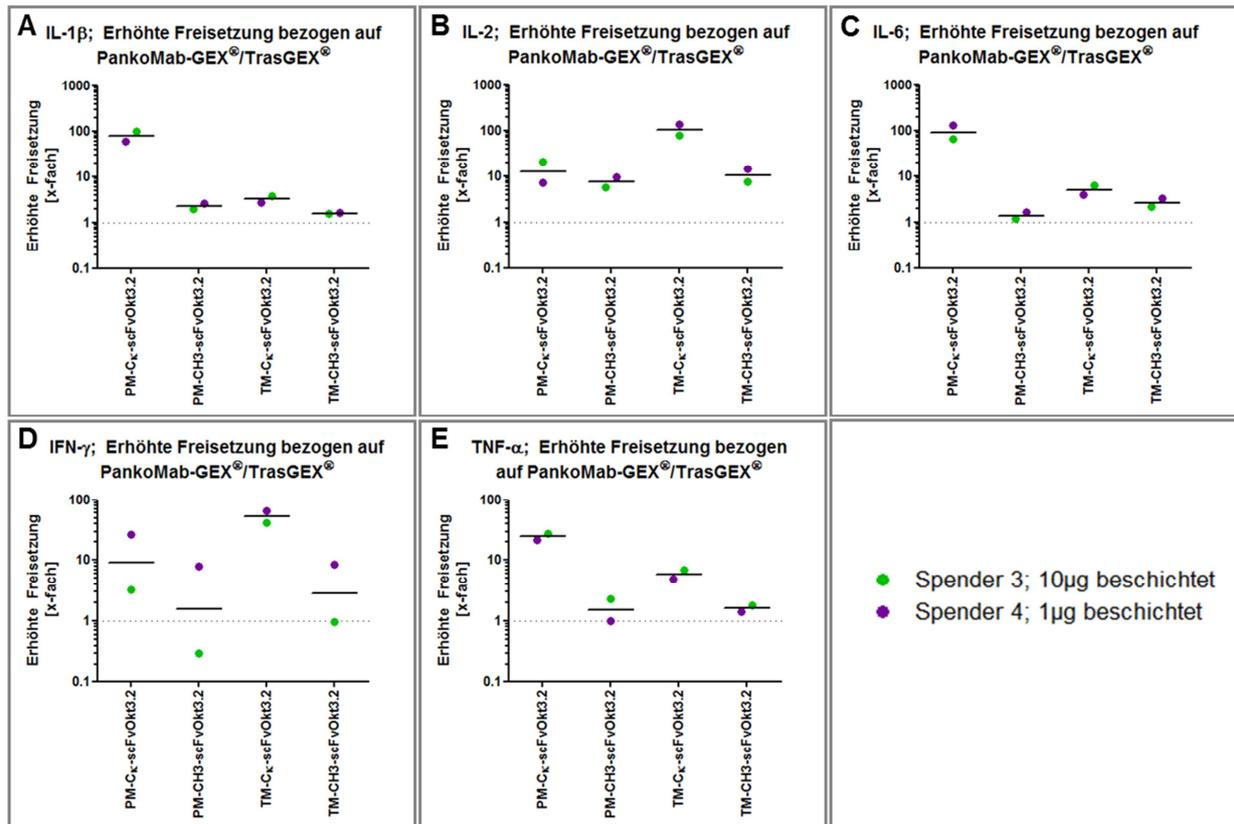


Abbildung 25: PM/TM-Ck und PM/TM-CH3 induzierte Zytokinfreisetzung.

Vollblut wurde mit den PM-Ck-, TM-Ck-, PM-CH3- und TM-CH3-Konstrukten sowie PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] inkubiert und die freigesetzte Konzentration an IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-6 (C), IFN- γ (D) und TNF- α (E) gemessen. Die verschiedenen Spender sind durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Dargestellt ist die induzierte Zytokinfreisetzung bezogen auf PankoMab-GEX[®] oder TrasGEX[®] (n=3) sowie der Mittelwert beider Versuche.

PM-CH3-scFvOkt3.2 und PM-Ck-scFvOkt3.2 verursachen beide eine im Vergleich zu PankoMab-GEX[®] 7- beziehungsweise 14-fach erhöhte IL-2 Freisetzung (Abbildung 25.B), die aber dennoch aber im niedrigen pg/ml Bereich liegt (0,7-4,6 pg/ml). Auch die durch PM-CH3-scFvOkt3.2 (183 und 189 pg/ml) induzierte IFN- γ Freisetzung ist geringer als die durch PM-Ck-scFvOkt3.2 (604 und 2022 pg/ml) induzierte IFN- γ Freisetzung. Einen vergleichbaren Trend zeigten auch die freigesetzten Konzentrationen an IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die durch PM-Ck-scFvOkt3.2 jeweils stärker induziert wurden als durch PM-CH3-scFvOkt3.2. Wie bereits unter 5.3.4 erwähnt war jedoch auffällig, dass durch PM-Ck-scFvOkt3.2 mit Spender 3 und 4 deutlich erhöhte Konzentrationen an IL-1 β (351 und 475 pg/ml) IL-6 (2705 und 3975 pg/ml) und TNF- α (1350 und 3232 pg/ml) freigesetzt wurden. Da dies für die weiteren mit PM-Ck-scFvOkt3.2 analysierten Spender unter vergleichbaren Versuchsbedingungen nicht beobachtet wurde (Abbildung 18), kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Verunreinigungen handelt. Dennoch stimmten die für PM-Ck-scFvOkt3.2 mit Spender 3

und 4 gemessenen Konzentrationen an IL-2 und IFN- γ gut mit den weiteren Spendern überein.

Vergleichbar zu den PM-Konstrukten induzierten auch TM-CH3-scFvOkt3.2 (10-fach) und TM-Ck-scFvOkt3.2 (106-fach) eine im Vergleich zu TrasGEX[®] erhöhte IL-2 Freisetzung (Abbildung 25.B). Da Spender 3 und 4 mit TM-Ck-scFvOkt3.2 deutlich höhere IL-2 Konzentrationen freigesetzt haben als Spender 1 und 2 unter vergleichbaren Versuchsbedingungen (Abbildung 19), sollten weitere Spender untersucht werden, um gesicherte Ergebnisse zu bekommen. Wie bereits bei den PM-Konstrukten war auch die durch TM-CH3-scFvOkt3.2 (237 und 533 pg/ml) induzierte IFN- γ Freisetzung geringer als die durch TM-Ck-scFvOkt3.2 (4126 und 10310 pg/ml) induzierte IFN- γ Freisetzung. Einen vergleichbaren Trend zeigten die freigesetzten Konzentrationen an IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die durch TM-Ck-scFvOkt3.2 jeweils stärker induziert wurden als durch TM-CH3-scFvOkt3.2.

Zusammenfassend zeigten PM-CH3-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 eine geringere Zytokinfreisetzung als die jeweiligen Ck-Varianten. Auffällig waren die hohe IL-1 β , IL-6 und TNF- α Konzentrationen, die durch PM-Ck-scFvOkt3.2 induziert wurden, was auf eine eventuelle Kontamination der Proben hindeuten könnte.

5.4.5 NK-Zell vermittelte Zytotoxizität

NK-Zell antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität (ADCC) ist ein Hauptwirkmechanismus von therapeutischen anti-Tumor Antikörpern wie PankoMab-GEX[®]. Nach der Antigenbindung rekrutiert der Antikörper NK-Zellen durch die Bindung an Fc-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche und es kommt zur Freisetzung von Zytokinen wie IFN- γ und zytotoxischen Proteinen wie Perforin und Granzymen, die in die Zielzelle eindringen und den Zelltod auslösen. Durch die Verringerung des Fucose-Gehaltes in der Glykosylierung des Fc-Teils von Antikörpern kann ein verbesserter ADCC Effekt erzielt werden. Dieser Effekt wird durch eine erhöhte Affinität des Fucose-reduzierten Antikörpers zum Fc γ -Rezeptor IIIa auf NK-Zellen verursacht. Es sind zwei Allotypen des Fc γ -Rezeptor IIIa bekannt, die an der Aminosäureposition 158 entweder ein Valin (V) oder ein Phenylalanin (F) tragen, wobei der V-Allotyp eine höhere Affinität zu humanen IgG1 Antikörpern hat. Der NK-Zell ADCC wurde mit einer NK-Zelllinie der Glycotope GmbH durchgeführt, die mit dem V-Allotyp des Fc γ -Rezeptors IIIa (KHyG1-CD16aV)

transfiziert wurde. Die NK-Zelllinie wurde als Effektorzelle gewählt, da bereits in früheren Experimenten gezeigt werden konnte, dass sie bei Zielzellen vergleichbare Zelllyse induziert wie NK-Zellen gesunder Spender (Glycotope GmbH, interne Daten). Der Versuch wurde wie unter 4.3.8 beschrieben durchgeführt. Als Zielzellen wurde die TA-MUC1- und Her2-positive Zelllinie T-47D gewählt. Abbildung 26 zeigt die in Abhängigkeit der Antikörper induzierte spezifische Lyse der T-47D-Zellen.

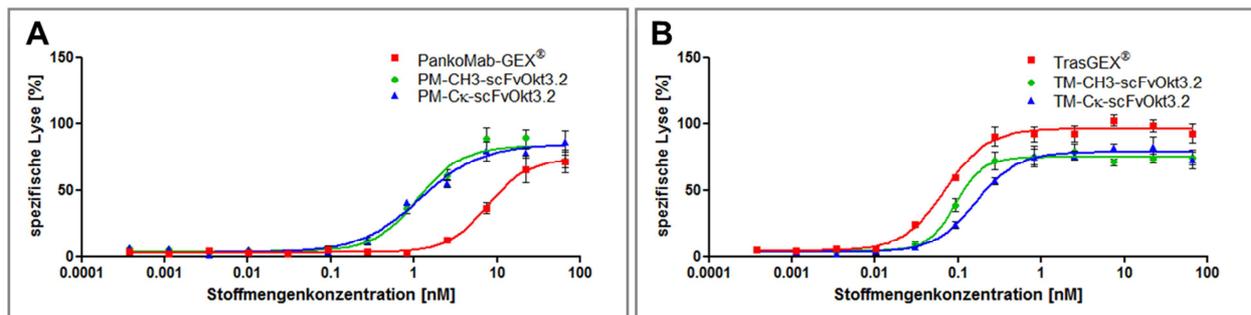


Abbildung 26: NK-Zell vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität.

TA-MUC1- und Her2-positive T-47D-Zellen wurden mit Europium beladen und zusammen mit KHyG1-CD16aV-Zellen (E:T 10:1) sowie PankoMab-GEX[®], TrasGEX[®] und den bispezifischen Antikörpern PM-CH3-scFvOkt3.2, PM-Ck-scFvOkt3.2, TM-CH3-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 inkubiert. Nach 4h wurde anhand der freigesetzten Menge an Europium die spezifische Lyse berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert (n=3) der berechneten spezifischen Lyse [%] ± SEM.

Die durch PM-CH3-scFvOkt3.2 und PM-Ck-scFvOkt3.2 vermittelte antikörperabhängige spezifische Lyse der T-47D-Zellen war sowohl in der EC₅₀ (1 nM) als auch in der maximalen spezifischen Lyse (~85%) vergleichbar. Da beide Konstrukte eine stärkere NK-Zell vermittelte Lyse der Zellen im Vergleich zu PankoMab-GEX[®] (EC₅₀ = 8 nM) zeigten, konnte durch den Einsatz von KHyG1-CD16aV-Zellen als Effektorzellen zusätzlich auch die erfolgreiche Glykooptimierung der Konstrukte gezeigt werden. Dennoch scheinen die zusätzlichen scFv-Domänen die antikörperabhängige Zytotoxizität der NK-Zellen zu stören. Sowohl TM-Ck-scFvOkt3.2 (EC₅₀ = 162 pM) als auch TM-CH3-scFvOkt3.2 (EC₅₀ = 91 pM) vermittelten eine im Vergleich zu TrasGEX[®] (EC₅₀ = 68 pM) geringere NK-Zell Zytotoxizität, die sich sowohl durch eine erhöhte EC₅₀ als auch durch eine geringere maximale spezifische Lyse zeigt.

5.4.6 T-Zell vermittelte Zytotoxizität

T-Zell vermittelter ADCC ist eine der Hauptwirkmechanismen von T-Zell-rekrutierenden Antikörpern. Nachdem die bispezifischen Antikörper an TA-MUC1 gebunden haben,

rekrutieren sie T-Zellen durch Bindung an CD3, was zu einer Freisetzung von zytotoxischen Vesikeln, die Perforin und Granzyme enthalten, führt und den Zelltod der TA-MUC1-positiven Tumorzellen verursacht. Für die T-Zell ADCC Versuche wurden T-Zellen aus PBMCs isoliert und aktiviert, bevor sie als Effektorzellen eingesetzt wurden. Die Verwendung von voraktivierten T-Zellen ermöglicht es unabhängig von Unterschieden in der T-Zell-Aktivierung die T-Zell vermittelte Zytotoxizität zu untersuchen. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Unterschiede, die in der CD3-Bindung beobachtet wurden, auch bei der gleichzeitigen Bindung von Tumor- und T-Zelle auftreten und zu einer andersartigen Freisetzung von Granzymen und Perforin und damit unterschiedlicher spezifischer Lyse der Tumorzellen führen. Der T-Zell vermittelte ADCC Versuch wurde wie bereits der NK-Zell ADCC Versuch über Europium-Freisetzung untersucht. Dafür wurden, wie unter 4.3.7 beschrieben TA-MUC1- und Her2-positive T-47D-Zellen mit PM-Ck-scFvOkt3.2, PM-CH3-scFvOkt3.2, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 und aktivierten T-Zellen inkubiert (siehe Abbildung 27).

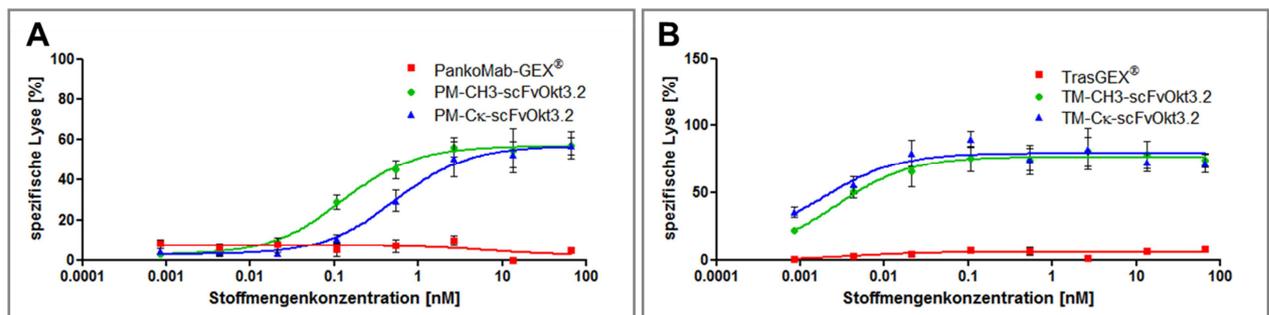


Abbildung 27: T-Zell vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität.

TA-MUC1- und Her2-positive T-47D-Zellen wurden mit Europium beladen und zusammen mit aktivierten T-Zellen in einem Verhältnis von 1:10 sowie PankoMab-GEX®, TrasGEX® und den bispezifischen Antikörpern PM-CH3-scFvOkt3.2, PM-Ck-scFvOkt3.2, TM-CH3-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 für 4h bei 37°C inkubiert. Nach 4h wurde das freigesetzte Europium bestimmt und anhand der freigesetzten Menge die spezifische Lyse berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert (n=3) der berechneten spezifischen Lyse [%] ± SEM

In Abhängigkeit von PM-CH3-scFvOkt3.2 und PM-Ck-scFvOkt3.2 vermittelten die aktivierten T-Zellen eine starke spezifische Lyse der T-47D-Zellen. Im Gegensatz dazu fand in Anwesenheit des Ausgangsantikörpers PankoMab-GEX®, ohne CD3-Bindung, wie erwartet keine spezifische Lyse der T-47D-Zellen statt. Im Vergleich der beiden Konstrukte untereinander vermittelt PM-CH3-scFvOkt3.2 (EC₅₀=125 pM) eine stärkere T-Zell Zytotoxizität als PM-Ck-scFvOkt3.2 (EC₅₀=530 pM) was sich in der niedrigeren EC₅₀ zeigt. Die durch die aktivierten T-Zellen maximal erreichte spezifische Lyse der T-

47D-Zellen war aber für beide Konstrukte vergleichbar. Auch in Abhängigkeit von TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 vermittelten die aktivierten T-Zellen eine starke spezifische Lyse der T-47D-Zellen. Diese Lyse war trotz der deutlich stärkeren CD3-Bindung von TM-CH3-scFvOkt3.2 (siehe 5.4.2) anders als für die PM-Konstrukte beobachtet vergleichbar. Wie auch PankoMab-GEX[®] vermittelte TrasGEX[®] als Ausgangsantikörper wie erwartet keine T-Zell Zytotoxizität. Vergleicht man die PM- mit den TM-Konstrukten, wird durch die TM-Konstrukte wie bereits auch für die NK-Zellen gezeigt eine stärkere Zytotoxizität mit den T-Zellen vermittelt.

5.4.7 PBMC vermittelte Zytotoxizität

Nachdem die T-Zell vermittelte ADCC bereits mit voraktivierten T-Zellen untersucht wurde, um die Bindung und die Freisetzung von Perforin und Granzymen zu ermitteln, wurde ein alternativer Versuchsaufbau etabliert, in dem darüber hinaus Unterschiede in der T-Zell-Aktivierung und der Einfluss der zusätzlichen Bindung von Fc γ -Rezeptor-positiven Immunzellen untersucht werden konnten. Dafür wurden wie unter 4.3.9 beschrieben PM-Ck-scFvOkt3.2, PM-CH3-scFvOkt3.2, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 zusammen mit PBMCs und Antigen-positiven MCF-7-Zellen inkubiert. Um die spezifische Lyse der Tumorzellen zu bestimmen, wurde anschließend die freigesetzte Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand bestimmt (siehe Abbildung 28).

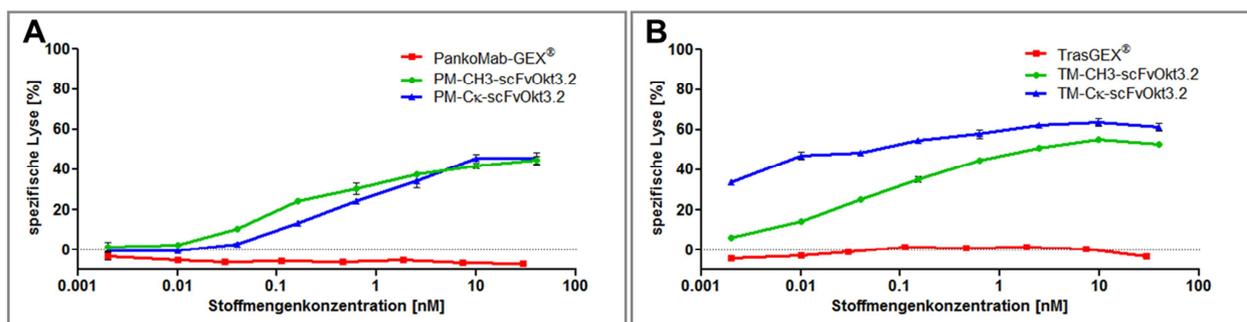


Abbildung 28: PBMC vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität.

TA-MUC1- und Her2-positive MCF-7-Zellen wurden zusammen mit PBMCs in einem Verhältnis von 1:10 sowie PankoMab-GEX[®], TrasGEX[®] und den bispezifischen Antikörpern PM-CH3-scFvOkt3.2, PM-Ck-scFvOkt3.2, TM-CH3-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 für 24h bei 37°C inkubiert. Um die spezifische Lyse der Tumorzellen zu bestimmen, wurde anschließend die freigesetzte Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert (n=3) der berechneten spezifischen Lyse [%] \pm SEM.

Sowohl PankoMab-GEX[®] als auch TrasGEX[®] vermitteln in diesem Versuchsaufbau keine ADCC der MCF-7-Zellen. Die Bindung von Fcγ-Rezeptor-positiven Immunzellen alleine scheint nicht auszureichen, um eine effektive Lyse zu erreichen. In Abhängigkeit von PM-CH3-scFvOkt3.2 und PM-Cκ-scFvOkt3.2 kommt es jedoch zu einer spezifischen Lyse der MCF-7-Zellen, die durch die zusätzliche T-Zell Rekrutierung ermöglicht wird. Dabei vermittelte PM-CH3-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 110 \text{ pM}$) im Vergleich zu PM-Cκ-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 325 \text{ pM}$) eine stärkere spezifische Lyse. Vergleichbar zu den PM-Konstrukten induzierten auch TM-CH3-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 72 \text{ pM}$) und TM-Cκ-scFvOkt3.2 ($EC_{50} = 8 \text{ pM}$) eine deutliche spezifische Lyse. Im Gegensatz zu den PM-Konstrukten vermittelte bei den TM-Konstrukten aber TM-Cκ-scFvOkt3.2 eine deutlich stärkere Lyse der MCF-7-Zellen als TM-CH3-scFvOkt3.2.

5.4.8 T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit der PM- und TM-Konstrukte

Ein weiterer Wirkmechanismus, der von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern vermittelt wird und mit der T-Zell-Aktivierung einhergeht, ist die T-Zell-Proliferation. So führt die Rekrutierung der T-Zellen neben der Aktivierung der T-Zellen und der Vermittlung der Zytotoxizität auch zu einer Proliferation der T-Zellen. Um die durch die bispezifischen Konstrukte vermittelte T-Zell-Proliferation zu untersuchen, wurden PBMCs mit einem Farbstoff markiert und mit TA-MUC1- und Her2-positiven Zellen wie unter 4.3.5 beschrieben kultiviert. Während der Inkubation geben die proliferierenden Zellen den Farbstoff bei der Zellteilung an die Tochterzellen weiter, sodass anschließend durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil proliferierter Zellen bestimmt werden konnte (Abbildung 29).

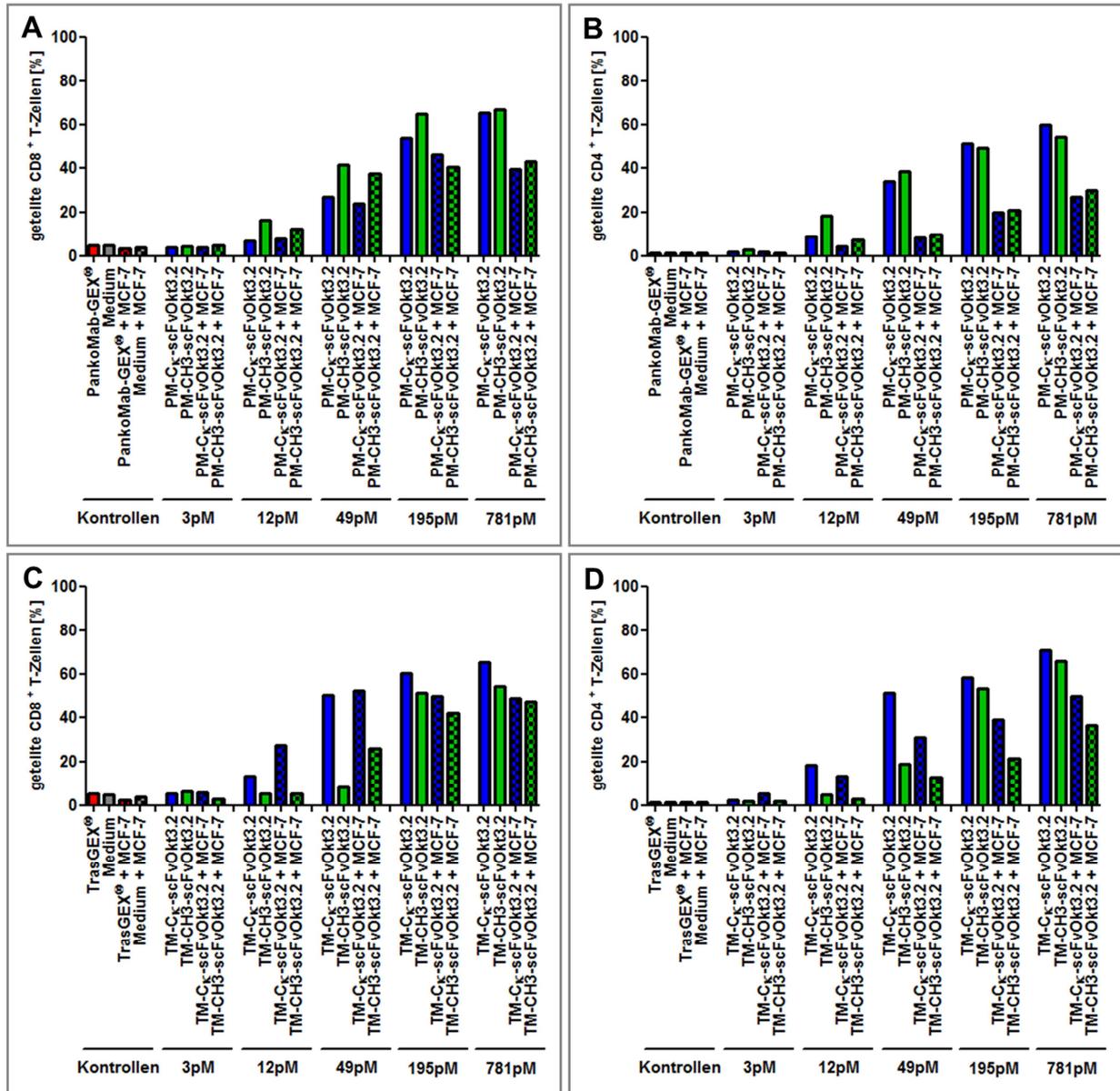


Abbildung 29: T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit der bispezifischen Antikörper.

1,5x10⁶ vZ/ml PBMCs wurden mit dem CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit gefärbt und mit 781 pM, 195 pM, 49pM, 12 pM und 3pM PM-Ck-scFvOkt3.2, PM-CH3-scFvOkt3.2, TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 mit und ohne MCF-7 in einem Verhältnis von E:T 5:1 bei 37°C für 5 Tage inkubiert. Als Kontrollen wurden PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] mit einer Konzentration von 200 nM eingesetzt. Der prozentuale Anteil proliferierter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments in Einzelbestimmung.

Alle bispezifischen Antikörper induzieren eine konzentrationsabhängige T-Zell-Proliferation sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MCF-7-Zellen, wohingegen die zur Kontrolle eingesetzten PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] keine Proliferation induzieren. Sowohl in den Ansätzen mit als auch in den Ansätzen ohne MCF-7 löst PM-CH3-scFvOkt3.2 in niedrigeren Konzentrationen (12 bis 49 pM) eine stärkere Proliferation der CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.2 aus (Abbildung 29.A). Bei einer hohen Konzentration von 781 pM induzieren beide

Konstrukte jedoch eine vergleichbare maximale CD8⁺-T-Zell-Proliferation. Bezogen auf die CD4⁺-T-Zellen induzieren hingegen beide Konstrukte eine vergleichbare Proliferation (Abbildung 29.B). Im Gegensatz zu den PM-Konstrukten vermittelt bei den TM-Konstrukten in den Ansätzen mit und ohne MCF-7 TM-C κ -scFvOkt3.2 sowohl bei den CD8⁺- als auch bei den CD4⁺-T-Zellen über den getesteten Konzentrationsbereich eine stärkere Proliferation als TM-CH3-scFvOkt3.2 (Abbildung 29.C und D). Entgegen den in der T-Zell-Aktivierung eingesetzten T-47D (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24) zeigen die in der Proliferation eingesetzten MCF-7-Zellen einen eher immun-suppressiven Charakter und reduzieren im Vergleich mit den Ansätzen ohne Zielzellen die durch die bispezifischen Konstrukte induzierte Proliferation.

6. Diskussion

Um die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper für die Krebstherapie weiter zu verbessern, sind in den letzten Jahren verstärkt T-Zell-rekrutierende bispezifische Antikörper in den Fokus der Forschung gerückt. Bereits 2009 wurde der erste T-Zell-rekrutierende Antikörper Catumaxomab (Removab[®]) von der EMA zur Behandlung von maligner Aszites zugelassen. Catumaxomab ist ein sogenannter trifunktionaler Ratte-Maus-Hybrid Antikörper, der aus einem Maus IgG2a und einem Ratte IgG2b Antikörper gebildet wird und einen funktionellen Fc-Teil besitzt (9). Aufgrund der durch Catumaxomab ausgelösten hohen Nebenwirkungen ist die therapeutische Anwendbarkeit jedoch begrenzt und weitere Entwicklungen im Bereich der T-Zell-rekrutierenden Antikörper beschränkten sich zunehmend auf kleinere Konstrukte ohne funktionellen Fc-Teil, wie zum Beispiel das BiTE- (75) oder DART-Format (18). Von den unzähligen bispezifischen Formaten, die sich in der präklinischen oder klinischen Entwicklung befinden, wurde 2014 von der FDA und 2015 von der EMA mit Blinatumomab, einem gegen CD19 und CD3 gerichteten BiTE-Antikörper, der erste T-Zell-rekrutierende Antikörper ohne Fc-Teil zugelassen. Obwohl Blinatumomab durch den fehlenden Fc-Teil nur mit T-Zellen interagieren kann und nicht wie Catumaxomab noch weitere Immunzellen direkt aktiviert, ist die Therapie mit Blinatumomab durch ein sehr hohes Nebenwirkungsprofil gekennzeichnet (40). Ein Problem, das alle T-Zell-rekrutierenden Ansätze und Formate gemein haben, ist die Tumorantigenspezifität. Bedingt durch das hohe zytotoxische Potential der T-Zellen ist das therapeutische Fenster für T-Zell-rekrutierende Therapien in der Regel sehr gering, da die meisten auf soliden Tumoren vorkommenden Tumorantigene auch mit geringeren Dichten auf Normalgewebe vorhanden sind. Um solche Probleme zu adressieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene auf PankoMab-GEX[®] basierende T-Zell-rekrutierende Konstrukte untersucht. PankoMab-GEX[®] wurde dabei als Ausgangsantikörper gewählt, da er mit TA-MUC1 ein für Antikörper ausschließlich auf Tumoren zugängliches Kohlenhydrat-Protein-Epitop bindet und in einer klinischen Phase I bereits ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil gezeigt werden konnte (65; 71). So sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich zum einen TA-MUC1 als tumorspezifisches Antigen zur Rekrutierung von T-Zellen eignet und zum anderen ob sich die GlycoExpress[®]-Plattform der Glycotope GmbH eignet, um in den humanen Zelllinien bispezifische Antikörper zu produzieren.

6.1 Auswahl geeigneter anti-CD3 Antikörper zur scFv-Domänen Generierung

Als Ausgangspunkt für die Generierung der bispezifischen T-Zell-rekrutierenden PankoMab-Konstrukte wurden zunächst vier anti-CD3 Antikörper hinsichtlich ihrer CD3-Bindung, der T-Zell-Aktivierung und der antikörperabhängigen Zytokinfreisetzung untersucht. Bei den ausgewählten Antikörpern handelt es sich dabei um Varianten des TR66 sowie des UCHT1, zwei Antikörper, für die bereits ein T-Zell stimulierender Effekt gezeigt wurde (74; 76). Da der Isotyp der Antikörper einen großen Einfluss auf die anti-CD3 Antikörper vermittelte Aktivierung von T-Zellen hat (77), wurden alle vier Antikörper als humane IgG1 Isotypen exprimiert.

Der bei der Glycotope GmbH intern als Okt3.1 bezeichnete Antikörper enthielt dabei die VH- und VL-Domäne des murinen anti-CD3 Antikörpers TR66 (78), der auch in dem 2014 von der FDA zugelassenen BiTE Antikörper Blinatumomab verwendet wird. Auf Grundlage einer Publikation von Kipriyanov und Kollegen (72), wurde eine zusätzliche Variante des Okt3.1, die intern als Okt3.2 bezeichnet wurde, mit der Mutation C100AA in VH-Domäne exprimiert. So beschreiben Kipriyanov et al. für die Mutation C100AS in der VH-Domäne eines von dem anti-CD3 Antikörper Okt3 abgeleiteten scFv einen positiven Effekt auf die Stabilität und die bakterielle Expression. Obwohl diese Mutation in der CDR3 Region der VH-Domäne liegt, scheint sie keinen Einfluss auf die Affinität des Antikörpers zu haben. So konnte gezeigt werden, dass Okt3.1 und Okt3.2 eine vergleichbare Bindung an CD3-positive Jurkat-Zellen zeigen. Auch für die chimäre Variante des UCHT1 Antikörpers (76) konnte eine zu Okt3.1 und Okt3.2 vergleichbare CD3-Bindung gezeigt werden. Lediglich die humanisierte Variante des UCHT1 Antikörpers, die 1992 von Shalaby und Kollegen beschrieben wurde (73), zeigte eine verringerte Affinität zu CD3 (Abbildung 5). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Publikation von Shalaby et al., die ebenfalls für die humanisierte Variante in einem BsF(ab')₂-Format eine verringerte CD3-Bindung beschreiben.

Trotz der vergleichbaren CD3-Bindung von Okt3.1, Okt3.2 und cUCHT1, zeigten sich in der T-Zell-Aktivierung deutliche Unterschiede. So waren bei Okt3.1 und Okt3.2 bereits Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 1 ng/ml ausreichend, um eine maximale CD69- und CD25-Expression zu erreichen, wohingegen cUCHT1 in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt werden musste, um eine vergleichbare CD69- und CD25-Expression zu induzieren. Ebenfalls konnte für hUCHT1, trotz der etwas geringeren Affinität zu

CD3, eine zu cUCHT1 vergleichbare T-Zell-Aktivierung gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für diesen unterschiedlichen Grad der T-Zell-Aktivierung könnte das jeweilige Epitop der unterschiedlichen Antikörper liefern. So beschreiben Tunnacliffe und Kollegen unterschiedliche Epitope für beide Antikörper, zeigen jedoch auch eine durch die murinen UCHT1 und TR66 vergleichbare Stimulation der T-Zell-Proliferation (74). Dass Tunnacliffe et al. einen vergleichbaren stimulatorischen Effekt der beiden Antikörper beschreiben, könnte daran liegen, dass sie mit den parentalen murinen mIgG1 Varianten der Antikörper gearbeitet haben, wohingegen in dieser Arbeit humane IgG1 Sequenzen für die konstanten Domänen eingesetzt wurden, was einen unterschiedlichen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung der beiden Antikörper haben könnte. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse, die von Tunnacliffe postuliert wurden und denen, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, ist die Verwendung von unterschiedlichen Versuchsbedingungen. So wurde in dieser Arbeit die T-Zell-Aktivierung anhand der Expression der Oberflächenmarker CD69 und CD25 nach 24h und 48h bestimmt, wohingegen Tunnacliffe et al. die T-Zell-Proliferation nach 4 Tagen als Maß für die T-Zell Stimulation verwendet haben. Auch traten die Unterschiede in der T-Zell-Aktivierung in dieser Arbeit in einem Konzentrationsbereich von 0,1 ng/ml bis 10 ng/ml auf, wohingegen Tunnacliffe et al. 100 ng/ml verwendet haben. Im Einklang damit induzieren beide Antikörper auch in dieser Arbeit bei einer Konzentration von 100 ng/ml eine vergleichbare Expression von CD69 und CD25. Die bei der T-Zell-Aktivierung beobachteten Unterschiede zwischen den vier getesteten Antikörpern konnten durch die Analyse der induzierten Zytokinfreisetzung bestätigt werden. So zeigten Okt3.1 und Okt3.2 neben der verstärkten T-Zell-Aktivierung auch eine höhere Zytokinfreisetzung im Vergleich zu cUCHT1 und hUCHT1 (Abbildung 7).

6.2 Rationale für PankoMab als Antikörper für die Konstruktion T-Zell-rekrutierender Moleküle

Ein Problem der meisten T-Zell-rekrutierenden Therapien ist ihr geringes therapeutisches Fenster, was maßgeblich durch die hohe Zytotoxizität der T-Zellen und die in der Regel nicht tumorexklusive Expression des Zielantigens bestimmt wird. Zwar wird im Bereich der hämatologischen Tumore durch die zumindest auf hämatologische Zellen beschränkte Expression des Zielantigens ein mögliches Nebenwirkungsprofil eingrenzt, zeigen doch vor allem gegen solide Tumore gerichtete T-Zell-abhängige

Therapien starke Nebenwirkungen durch die breite Expression des Zielantigens und damit verbundener *on-target off-tumor* Toxizität. Ein Beispiel sind die letalen Nebenwirkungen, die in einer klinischen Studie mit gegen Her2 gerichtete CAR-T-Zellen beobachtet wurden und vermutlich vor allem durch die Bindung an niedrig Her2 exprimierenden Lungenepithelzellen verursacht wurden (79). Ein weiteres Beispiel aus dem Bereich der T-Zell-rekrutierenden Antikörper liefert die *first in human* Studie des gegen EpCAM und CD3 gerichteten BiTE Antikörpers Solitomab (AMG 110). In dieser Studie traten Dosis-limitierende Toxizitäten in Form von erhöhten Leberenzymen und Diarrhoe auf, welche vermutlich durch die Bindung von Solitomab an EpCAM-positives Normalgewebe der Darmepithelien und Gallengänge verursacht wurden (80). Um die für andere Antigene beschriebenen *on-target off-tumor* Effekte auszuschließen, wurde in dieser Arbeit PankoMab-GEX[®] als Ausgangsantikörper gewählt um zu untersuchen, ob TA-MUC1, das ausschließlich auf Tumorgeweben für therapeutische Antikörper zugänglich ist (65), ein geeignetes Antigen für die Rekrutierung von T-Zellen darstellt.

Um eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen zu vermeiden, wurden in den letzten Jahren zunehmend Konstrukte entwickelt, die ausschließlich in Abhängigkeit der Antigenbindung eine T-Zell-Aktivierung auslösen. Dabei wurde zum einen darauf geachtet nur eine monovalente CD3-Bindung zu nutzen und zum anderen wurde darauf verzichtet einen funktionellen Fc-Teil zu integrieren (31; 35; 81). Grundlage dieser Entscheidung war die Annahme, dass durch eine bivalente CD3-Bindung beziehungsweise durch die Vernetzung der T-Zellen mit weiteren Immunzellen über einen funktionellen Fc-Teil eine T-Zell-Aktivierung ausgelöst werden kann. In der Tat konnte für Dimere des EpCAMxCD3 BiTE-Antikörpers in sehr hohen Konzentrationen eine EpCAM unabhängige T-Zell-Aktivierung gezeigt werden (35). Allerdings ist die Ursache für diese Beobachtung vermutlich die sehr hohe Konzentration der eingesetzten Dimere. So ist es denkbar, dass bei niedrigeren Konzentrationen bivalent CD3 bindende Antikörper bevorzugt zwei CD3-Moleküle auf der selben T-Zelle binden und erst bei Konzentrationen, die zu einer Sättigung führen, beide Bindestellen eines Antikörpers an zwei verschiedene T-Zellen binden und so eine Vernetzung von zwei T-Zellen herstellen. Im Einklang mit dieser Hypothese konnte für einen gegen CD19 und CD3 gerichteten TandAb (AFM11), der bivalent CD3 bindet, gezeigt werden, dass in therapeutisch relevanten Konzentrationen keine antigenunabhängige T-Zell-Aktivierung ausgelöst wird (31). Gleiches beobachteten Reusch und Kollegen auch für den

bivalenten anti-CD3 ϵ IgG OKT3, der als Kontrolle in ihren Untersuchungen benutzt wurde. Auch OKT3 induzierte eine T-Zell Stimulation nur, wenn eine Vernetzung mit weiteren Immunzellen möglich war. Wurde OKT3 alleine mit isolierten T-Zellen inkubiert, wurde keine T-Zell-Proliferation oder Freisetzung von Zytokinen beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Publikationen, in denen für verschiedene anti-CD3 IgG Antikörper eine Abhängigkeit der T-Zell Stimulation von verschiedenen Rezeptoren beschrieben wurden. So beschrieben Tax et al. einen Fc-Rezeptor auf Monozyten, der für die Vernetzung von anti-CD3 Antikörpern des mIgG1 Isotyps notwendig ist (82) und Ceuppens et al. einen Fc-Rezeptor auf Monozyten, der für die Vernetzung von OKT3, einem mIgG2a, notwendig ist (83). Dass abhängig vom Isotyp muriner, aber auch humaner Antikörper, die Vernetzung mit spezifischen Fc-Rezeptoren ausreicht um eine anti-CD3 Antikörper vermittelte T-Zell Stimulation zu erreichen, wurde nachfolgend sowohl für Maus Fc-Rezeptoren (84) als auch für humane Fc-Rezeptoren bestätigt (85).

Obwohl es daher als gesichert gilt, dass ein funktioneller Fc-Teil zu einer antigenunabhängigen Aktivierung durch bispezifische Antikörper beiträgt, wurde 2009 von der EMA mit Catumaxomab ein gegen EpCAM und CD3 gerichteter T-Zell-rekrutierender Antikörper zugelassen, der einen funktionellen Fc-Teil besitzt. Ein Vorteil dieses trifunktionellen Antikörpers liegt darin, dass neben T-Zellen auch weitere Fc γ -Rezeptor exprimierende Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und NK-Zellen über den funktionellen Fc-Teil rekrutiert und aktiviert werden können (29). Durch diese gleichzeitige Aktivierung verschiedener Immunzellen soll eine solche physiologische Immunantwort induziert werden, während bei anderen Konstrukten nur eine spezifische Art der Immunzellen rekrutiert wird. So konnte gezeigt werden, dass Catumaxomab sowohl anti-Tumor Effekte alleine mit Fc γ -Rezeptor-positiven Zellen, als auch alleine mit T-Zellen vermittelt. Die Kombination aus Fc γ -Rezeptor-positiven Zellen und T-Zellen führt aber zu einer verbesserten anti-Tumor Wirkung (28). Dabei kommt es neben der durch die CD3-Bindung vermittelten T-Zell-Aktivierung durch die gleichzeitige Rekrutierung weiterer Immunzellen zur Ausschüttung von costimulatorischen Zytokinen und der Wechselwirkung von costimulatorischen Molekülen auf den T- und Fc γ -Rezeptor-positiven Zellen, welche eine T-Zell Anergie verhindert (29). Weiterhin vermittelt Catumaxomab die Phagozytose der Tumorzellen durch CD14-positive Zellen, was zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von weiteren Tumorantigenen und damit zu einer weiteren T-Zell und humoralen

Immunantwort gegen den Tumor führen kann. Dies konnte bereits für den Maus-Surrogat-Antikörper BiLu, der gegen murines EpCAM und murines CD3 gerichtet ist, gezeigt werden (86).

Ein Nachteil der sehr breiten Aktivierung des Immunsystems durch trifunktionale Antikörper ist, bedingt durch eine starke Zytokinfreisetzung, ein erhöhtes Maß an Nebenwirkungen in der therapeutischen Anwendung, welche eine sorgfältige Anpassung des Applikationsschemas und der Dosierung erfordern. So wird Catumaxomab zur Behandlung von maligner Aszites vier Mal intraperitoneal in einer steigenden Dosis von 10 bis 150 µg gegeben, wobei regelmäßig Catumaxomab-abhängige Nebenwirkungen auftreten. Diese sind in der Regel zwar kontrollierbar und reversibel, führen dennoch in ungefähr 15% der Fälle zum Abbruch der Therapie (87; 88). Diese durch den Wirkmechanismus bedingte erhöhte Toxizität wurde in zwei Phase I Studien zur intravenösen Applikation von Catumaxomab, der eigentlichen Standard Applikationsroute für Antikörper, noch deutlicher. In diesen Studien lag die maximale tolerierbare Dosis bei 5 µg beziehungsweise 7 µg (33; 34). Ursache für diese im Vergleich zur intraperitonealen Applikation niedrigeren Dosis, waren erhöhte Werte von Leberenzymen und es wurde angenommen, dass diese durch *on-target off-tumor* Effekte, wie sie auch bei dem EpCAMxCD3 BiTE beobachtet wurden, ausgelöst wurden (80). Um diese Nebenwirkungen zu verringern, wurden in den letzten Jahren zahlreiche weitere Versuche unternommen und dabei auch Fortschritte erzielt. So konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass Prednisolon die Zytokinfreisetzung reduziert, ohne aber die Effektivität von Catumaxomab zu beeinflussen (89). Leider konnte dieses Ergebnis in der klinischen Testung nicht bestätigt werden, da durch die Prednisolon Gabe keine reduzierten Nebenwirkungen gezeigt werden konnten (88). Dennoch ist es denkbar, dass durch eine Anpassung der Prednisolon Konzentration die *in-vitro* gezeigten Effekte auf die therapeutische Anwendung übertragbar sind. Weitere vielversprechende Methoden sind die *ex-vivo* Beladung der Immunzellen mit den Antikörpern oder eine subkutane Applikation (90; 91).

Eine weitere Nebenwirkung T-Zell-rekrutierender Antikörper ist eine Umverteilung der T-Zellen. So wird sowohl für tri- als auch für bifunktionale Antikörper eine Umverteilung der T-Zellen nach Therapiestart beschrieben (92; 93). Dabei wird die durch Blinatumomab ausgelöste T-Zell Umverteilung mit den hohen Nebenwirkungen auf das zentrale Nervensystem in Verbindung gebracht (94), wohingegen die durch

Catumaxomab ausgelöste T-Zell Umverteilung eher als mild, vollständig reversibel und mit keinen weiteren Nebenwirkungen assoziiert beschrieben wird (92).

Auf Grundlage dieser vielschichtigen Vor- und Nachteile der jeweiligen T-Zell-rekrutierenden Konstrukte sollten bedingt durch die hohe Tumorspezifität von TA-MUC1 und dem sehr niedrigen Nebenwirkungsprofil von PankoMab-GEX[®] in dieser Arbeit T-Zell-rekrutierende Konstrukte untersucht werden, die eine bivalente CD3-Bindung sowie einen funktionellen Fc-Teil besitzen und eine zusätzliche Glykooptimierung ermöglichen. So wurde davon ausgegangen, dass durch die sehr niedrigen therapeutischen Dosen von T-Zell-rekrutierenden Antikörpern durch eine bivalente CD3-Bindung keine erhöhten Nebenwirkungen zu erwarten sind. Weiterhin bietet die bivalente CD3-Bindung den Vorteil, dass die bispezifischen Konstrukte aus Homodimeren bestehen, was die Expression und Aufreinigung der Konstrukte deutlich vereinfacht und zu einer deutlichen Kostenersparnis führt. Obwohl durch die Wahl eines funktionellen Fc-Teils, der die zusätzliche Bindung von Fcγ-Rezeptor-positiven Immunzellen ermöglicht, zwar davon ausgegangen werden muss, dass eine erhöhte Zytokinfreisetzung und antigenunabhängige T-Zell Stimulation induziert wird, wurde dieses Konstrukt gewählt. Damit sollte eine starke und physiologische T-Zell Stimulation für diese erste *proof-of-concept* Studie zur Eignung von TA-MUC1 als wertvolles Antigen für die Rekrutierung von T-Zellen ausgenutzt werden. Auch wurde davon ausgegangen, dass durch eine Weiterentwicklung der therapeutischen Anwendung, zum Beispiel durch die subkutane Applikation oder eine passendere Vorbehandlung mit Steroiden, die hohen initialen Nebenwirkungen in Zukunft besser kontrolliert werden können. Es soll an dieser Stelle jedoch angemerkt werden, dass neuste Erkenntnisse zu Catumaxomab eine weitere sicherheitsrelevante Fragestellung aufwerfen. So wurde die zweite Studie zur intravenösen Applikation von Catumaxomab aufgrund eines Falles tödlichen Leberversagens abgebrochen und durch weitere Analysen konnte gezeigt werden, dass die hohe Nebenwirkung in der Leber keine gegen EpCAM gerichtete *on-target off-tumor* Nebeneffekte sind. Vielmehr scheinen die hohen Nebenwirkungen unabhängig von der Expression von EpCAM durch die Vernetzung von T-Zellen mit Kupffer-Zellen zu entstehen (32). Aufgrund der Aktualität dieser Ergebnisse wurden ähnliche Effekte in dieser Arbeit zwar nicht untersucht, müssen für eine weitere Entwicklung aber berücksichtigt werden.

6.3 Entwicklung von PankoMab-GEX[®] T-Zell-rekrutierenden Konstrukten

Basierend auf den Ergebnissen der CD3-Bindung, T-Zell-Aktivierung und der Zytokinfreisetzung wurden die Antikörper cUCHT1, Okt3.1 und Okt3.2 zur Generierung der scFv-Domänen ausgewählt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass zum einen Konstrukte mit möglichst hoher T-Zell Stimulation (Okt3.1 und Okt3.2), als auch Konstrukte mit einer geringeren T-Zell Stimulation (cUCHT1) verglichen werden konnten. Zudem sollte durch die Auswahl von Okt3.1 und Okt3.2 auch der Einfluss der zusätzlichen Mutation, die diese zwei unterscheidet, genauer untersucht werden. Zur Produktion der T-Zell-rekrutierenden Konstrukte wurden Plasmide hergestellt, die ausgehend vom PankoMab IgG1 jeweils an der CH3-Domäne oder der Cκ-Domäne über einen vierfachen GGGGS (G₄S)₄ Linker die VH-Domäne der anti-CD3 Antikörper gefolgt von einem dreifachen G₄S Linker und der VL-Domäne der anti-CD3 Antikörper enthielten (Abbildung 8). Als zusätzliche Kontrolle wurden die gleichen Konstrukte basierend auf Trastuzumab, einem gegen Her2 gerichteten IgG1, hergestellt. Die Transfektion erfolgte in der GEX[®]-Fuc⁻ Zelllinie der GlycoExpress[®]-Plattform der Glycotope GmbH. Diese Zelllinie bietet die Möglichkeit durch eine reduzierte Fucosylierung, eine erhöhte Galactosylierung sowie der Ausbildung von *bisecting* N-Acetylglucosamin zusätzlich eine Verbesserung der NK-Zell vermittelten ADCC im Vergleich zum PankoMab-GEX[®] zu erreichen (95). Alle transfizierten Zellpools zeigten eine gute Expression der bispezifischen Konstrukte (Abbildung 9 und Abbildung 10). Um eine Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen und zusätzlich eine Produktivitätssteigerung zu ermöglichen, wurden für die Transfektion der schweren und leichten Antikörperketten Plasmide verwendet, die auf Methotrexat und Puromycin als Selektionsmarker beruhen. Methotrexat inhibiert als Folsäure-Analog die Dihydrofolatreduktase, welche die Umwandlung von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure katalysiert, die für die Biosynthese von Glycin aus Serin, von Thymidin-Monophosphat aus Deoxyuridin sowie für die Purin Biosynthese verantwortlich ist. So führt die Inhibierung der Dihydrofolatreduktase mit Methotrexat zum Tod der Zelle. Dieser Mechanismus wird zur Produktionssteigerung genutzt, indem man neben dem eigentlichen Zielgen zusätzlich ein Dihydrofolatreduktase Gen transfiziert. Erhöht man anschließend Schrittweise die Methotrexatkonzentration, kommt es zu einer Amplifikation des Dihydrofolatreduktase Gens und damit einhergehend zu einer Amplifikation des eigentlichen Zielgens, was zu einer Produktivitätssteigerung führt (96). Puromycin hingegen dient als Analog für die

Aminoacyl-tRNA und führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation in Säugetierzellen (97). Um Puromycin als Selektionsmarker nutzen zu können, wurde auf dem Plasmid, das für die Sequenz der schweren Kette eingesetzt wurde, zusätzlich noch das Gen für die Puromycin-N-Acetyltransferase, die eine Puromycin Resistenz vermittelt, eingebaut. Vergleichbar zu herkömmlichen IgG1 Antikörpern zeigten alle Ck-Konstrukte bei steigendem Selektionsdruck die erwartete steigende spezifische Produktivitätsrate. Im Gegensatz dazu konnte durch steigenden Selektionsdruck bei den TM-CH3-Konstrukten nahezu keine Steigerung der spezifischen Produktivitätsrate erzielt werden und bei den PM-CH3-Konstrukten nur während den ersten Druckstufen. Dies könnte an der Größe der einzelnen zu exprimierenden Antikörperketten liegen. So werden im Fall der Ck-Konstrukte mit der schweren Kette (~50 kDa) und der leichten Kette mit scFv (~50 kDa) zwei von der Größe vergleichbare Ketten in den Zellen exprimiert. Bei den CH3-Konstrukten werden jedoch zwei sehr unterschiedlich große Ketten, die schwere Kette mit scFv (~75 kDa) und die leichte Kette (~25 kDa), exprimiert. Weiterhin ist bekannt, dass auch die Größe des Plasmids einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat. Da für die Transfektion der bispezifischen Konstrukte Plasmide genutzt wurden, die für die Transfektion von herkömmlichen IgG1 Antikörpern optimiert wurden, könnte die erhöhte Plasmidgröße für eine schlechtere Transfektionseffizienz und damit einhergehend für eine verringerte Expression des bispezifischen Antikörpers verantwortlich sein. Neben der Reduktion der Plasmidgröße könnte eine spezifische Optimierung des Plasmids die Produktivität steigern. Obwohl die gesamten Plasmide schon für die Verwendung in einer humanen Zelllinie codonoptimiert wurden, könnte eventuell eine weitere Produktivitätssteigerung durch Berücksichtigung des GC-Gehaltes des gesamten Plasmides oder der Entstehung von intramolekularen Basenpaarungen innerhalb der Linkersequenzen erreicht werden. So konnten Trinh et al. durch den Austausch eines Nukleotids in einem dreifachen G₄S-Linker die Produktivität nach transienter Transfektion um das bis zu 30-fache erhöhen (98). Auch wenn weitere Optimierungen möglich wären um die Expression der bispezifischen Antikörper zu erhöhen, waren doch die erreichten Titer ausreichend, um genügend Material für die funktionelle Charakterisierung zu produzieren.

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass zum Beispiel die Bindung eines Antigens weitreichende Konformationsänderungen bei einigen Antikörpern auslösen kann (99), welche sich unter anderem auch auf die Bindung an Protein A auswirken können (100).

Da auch für die Kopplung von Peptiden an Antikörper ein ähnlicher Effekt auf die Konformation von Antikörpern beschrieben wurde, ist es durchaus denkbar, dass auch die Fusion einer scFv-Domäne bei einigen Antikörpern eine Konformationsänderung verursacht, die Einfluss auf die Protein A-Bindung nimmt (101). Daher sollten bei der Reinigung von bispezifischen Antikörpern wichtige Parameter, wie der pH Wert der Elutionspuffer optimiert werden, um eine maximale Ausbeute zu ermöglichen. Um die Anwendbarkeit der für PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] etablierten Reinigungsschritte zu überprüfen, wurden die in Spinnerflaschen produzierten bispezifischen Antikörper über Affinitätschromatographie mit Protein A gereinigt. Dazu wurde zunächst ein pH-Screening der Elutionsbedingungen durchgeführt, bei dem sich zeigte, dass die unterschiedlichen scFv-Domänen keinen Einfluss auf die Protein A Reinigung der PM-Konstrukte zeigen, wohl aber auf die Elution der TM-Konstrukte.

Für den Vergleich des Aggregationsverhaltens der verschiedenen Konstrukte wurden die bei identischem pH eluierten Fraktionen mittels analytischer Größenausschlusschromatographie analysiert. Dabei wurde deutlich, dass alle bispezifischen Antikörper einen höheren Grad an Aggregation zeigen als die parentalen Antikörper. Erstaunlicherweise wurden erneut Unterschiede zwischen den TM-Ck- und PM-Ck-Konstrukten deutlich. So enthielt PM-Ck-scFvUCHT1 mit ~78% Monomeren den niedrigsten Monomergehalt der PM-Ck-Konstrukte. TM-Ck-scFvUCHT1 enthielt jedoch mit ~87% den höchsten Monomergehalt der TM-Ck-Konstrukte. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussage, dass bei der Herstellung von bispezifischen Antikörpern die fusionierte scFv-Domäne abhängig vom gewählten Ausgangsantikörper einen großen Einfluss haben kann, der sorgfältig evaluiert werden muss. Erfreulicherweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die in Anlehnung an Kipriyanov et al. (72) eingefügte Mutation C100AA in der VH-Domäne des scFvOkt3.2, mit einer Erhöhung des Monomergehaltes von ~4% im Vergleich von PM-Ck-scFvOkt3.2 zu PM-Ck-scFvOkt3.1 sowie ~12% im Vergleich von TM-Ck-scFvOkt3.2 zu TM-Ck-scFvOkt3.1 den gewünschten stabilisierenden Effekt zeigt. Berücksichtigt man, dass scFv-Domänen häufig eine geringe Stabilität und damit hohe Tendenz zur Aggregation aufweisen (102), scheint vor allem das PM-Ck-scFvOkt3.2-Konstrukt mit 92% Monomeren eine günstige Stabilität zu besitzen. Um den Monomergehalt durch Stabilisierung der scFv-Domänen weiter zu erhöhen, finden sich zahlreiche Anregungen in der Literatur. Dabei wäre zum einen das Einfügen einer stabilisierenden Disulfidbrücke denkbar, aber auch eine

Framework Optimierung oder die Verlängerung des G₄S-Linkers zwischen der VH- und VL- Domäne des scFvs (102; 103; 104).

Um trotz der unterschiedlichen Aggregatgehalte eine Vergleichbarkeit der Konstrukte in den funktionellen Untersuchungen zu gewährleisten, wurden von jedem Konstrukt Monomerpräparationen mittels präparativer Größenausschlusschromatographie hergestellt. So konnte für alle Konstrukte ein Monomergehalt von 95-100% erzielt werden. Ein weiterer wichtiger Faktor, um immunologische Analysen sicher deuten zu können, ist das Verhindern von Endotoxinverunreinigungen. Endotoxine haben einen starken stimulatorischen Effekt auf CD14-positive Monozyten, dendritische Zellen und Makrophagen, der zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12 führen kann (105; 106). Durch die so freigesetzten Zytokine können wiederum unterschiedlichste Effekte auf weitere Immunzellen ausgelöst werden. Auch ein direkter Zellkontakt-abhängiger Effekt wurde für Endotoxin aktivierte Monozyten auf T-Zellen bereits beschrieben (107; 108; 109; 110). Um auszuschließen, dass Einflüsse, die auf Endotoxine zurückzuführen sind, den Antikörper-vermittelten Effekt überlagern, wurde im Anschluss an die präparative Größenausschluss-chromatographie für alle Konstrukte gezeigt, dass die Präparationen nicht durch Endotoxine verunreinigt sind.

6.4 Charakterisierung der Wirkmechanismen der PM-Ck- und TM-Ck-Konstrukte

Die Fusion der scFv-Domänen an die Ck-Domäne von PankoMab-GEX[®] hat keinen Einfluss auf die TA-MUC1-Bindung. Alle getesteten Konstrukte zeigten eine zu PankoMab-GEX[®] vergleichbare TA-MUC1-Bindung (Abbildung 14). Im Gegensatz dazu vermitteln die scFv-Domänen zwar eine untereinander vergleichbare, im Vergleich zu den Ausgangsantikörpern aber bei einer Konzentration von 1 μ g/ml ca. 10% geringere CD3-Bindung (Abbildung 15). Dieses Ergebnis steht teilweise in Widerspruch mit anderen Publikationen, in denen für vergleichbare Konstrukte kein Verlust der Antigenbindung sowohl für den parentalen IgG als auch für die fusionierte scFv-Domäne beschrieben wurde (104; 111). Eine mögliche Ursache für die verringerte Antigenbindung der scFv-Domänen könnte in der Anordnung der variablen Domänen liegen. So wurde bereits gezeigt, dass die Anordnung der Domänen einen deutlichen Einfluss auf

die Bindung eines scFvs haben kann, der sowohl abhängig vom jeweiligen scFv, aber auch abhängig davon ist, woran die scFv-Domäne fusioniert wird. Bühler und Kollegen beschreiben zum Beispiel für ein gegen PSMA gerichtetes scFv eine bevorzugte Domänenorientierung von VH-Linker-VL. Durch die zusätzliche Fusion eines Immunotoxins zeigten jedoch die Konstrukte mit einer VL-Linker-VH-Immunotoxin Orientierung die beste Zellbindung (112). Vergleichbar beschreiben Lu et al. für ein gegen IGF-1R gerichtetes scFv eine fünffach bessere Antigenbindung für die VL-Linker-VH Orientierung, für ein gegen EGFR gerichtetes scFv jedoch keinen Einfluss der Domänenorientierung auf die Antigenbindung (113). Auch für ein von UCHT1 abgeleitetes scFv finden sich bereits Studien hinsichtlich der Domänenorientierung, in denen gezeigt wurde, dass die Antigenbindung in einer VL-Linker-VH-Immunotoxin Orientierung, die der in den PM- und TM-Konstrukten verwendeten VL-Linker-VH-Ck Orientierung gleicht, stärker ist als in der VH-Linker-VL-Immunotoxin Orientierung (114). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Änderung der Domänenorientierung in den hergestellten scFv-Domänen zu einer Verbesserung der Antigenbindung beitragen könnte. Ein weiterer Faktor der dafür bekannt ist einen Einfluss auf die Antigenbindung zu haben, ist die Länge des Linkers zwischen der VH- und VL-Domäne. So beschreiben Wang und Kollegen für ein anti-Deoxynivalenol scFv die stärkste Antigenbindung wenn entweder kein Linker zwischen VH und VL verwendet wird oder wenn der Linker länger als 12 Aminosäuren ist (115). Vergleichbar beschreiben auch Shan und Kollegen für ein scFv-Ig-Konstrukt eine schrittweise Reduktion der Antigenbindung mit zunehmender Linkerlänge zwischen 5 und 15 Aminosäuren (116). Dabei muss beachtet werden, dass in der Studie von Shan et al. sowie von Wang et al. verschieden lange Varianten des (G₄S)-Linkers (117) verwendet wurden, der auch in den getesteten PM- und TM-Konstrukten verwendet wurde. Eine Reduktion der Linkerlänge könnte daher zu einer verbesserten Antigenaffinität führen. Eine weitere Möglichkeit die Antigenbindung zu verbessern könnte auch in dem Austausch des Linkers mit einer gänzlich anderen Aminosäuresequenz oder der Generierung speziell für die verwendeten scFvs optimierten Linkern liegen wie von Tang und Kollegen beschrieben (118). Da in dieser Arbeit bereits mit einer Vielzahl von verschiedenen Konstrukten gearbeitet wurde und die Antigenbindung im Vergleich zum parentalen Antikörper nur leicht reduziert war, wurde von einer weiteren Optimierung der Konstrukte abgesehen.

Um die Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung der verschiedenen Konstrukte zu untersuchen, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD69 und CD25 nach 24h Inkubation von PBMCs untersucht (Abbildung 16). Dabei zeigten die bispezifischen Konstrukte eine geringere T-Zell-Aktivierung als die parentalen Antikörper, welche wahrscheinlich durch die verringerte Bindung der scFv an CD3 verursacht wird. Auch in der Literatur wurden einige Fälle beschrieben, in denen eine verringerte Affinität, bedingt durch die Expression als scFv oder das gewählte Format, zu einer verringerten Stimulation der T-Zellen führt (119). Gänzlich unerwartet zeigte dabei das PM-Ck-scFvUCHT1-Konstrukt sowohl bei den prozentual positiven CD69- und CD25-Zellen als auch bei der medianen Fluoreszenzintensität der beiden Marker (Daten nicht gezeigt) eine deutlich höhere Expression als PM-Ck-scFvOkt3.1 und PM-Ck-scFvOkt3.2. Dieses Ergebnis war unerwartet, da in der Literatur zwar bereits beschrieben wurde, dass verschiedene gegen CD3 gerichtete monoklonale Antikörper oder Konstrukte abhängig von der Affinität, dem gebundenen Epitop oder dem Antikörper Isotyp eine unterschiedlich starke T-Zell Stimulation auslösen können. Jedoch waren die in dieser Arbeit verglichenen Antikörper Okt3.1, Okt3.2 und cUCHT1 in ihrer Affinität ähnlich und wurden zudem alle als IgG1 exprimiert. Sie unterschieden sich daher nur in ihrem jeweiligen Epitop, was darauf schließen lässt, dass der beschriebene Unterschied in der T-Zell Aktivierung alleine auf das Epitop zurückzuführen ist. Da auch die Konstrukte alle im IgG1 Format exprimiert wurden und die Affinität der scFv-Domänen scFvOkt3.1, scFvOkt3.2 und scFvUCHT1 vergleichbar war, wurde erwartet, dass die Konstrukte bedingt durch die unterschiedlichen Epitope eine zu den Ausgangsantikörpern vergleichbare Abstufung in Bezug auf die T-Zell-Aktivierung zeigen. Dennoch vermittelte unerwartet PM-Ck-scFvUCHT1 die stärkste T-Zell Aktivierung. Dieses Ergebnis konnte durch die Untersuchung von PBMCs verschiedener Spender bestätigt werden sowie durch die von den TM-Ck-Konstrukten induzierte T-Zell-Aktivierung, in der auch eine stärkere T-Zell-Aktivierung durch TM-Ck-scFvUCHT1 gemessen wurde (Abbildung 17). Dabei zeigte die Wahl des Spenders zwar einen Einfluss auf den durch die verschiedenen Konstrukte erzielten Grad der T-Zell-Aktivierung, die scFvUcht1-Konstrukte vermittelten aber jeweils eine stärkere T-Zell-Aktivierung als die anderen Konstrukte. Eine weitere Bekräftigung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse findet sich in einer Arbeit zu gegen CLDN18.2 gerichteten T-Zell-rekrutierenden Antikörpern. Zwar werden dort die parentalen Antikörper nicht verglichen, dennoch findet sich aber ein Vergleich zwischen verschiedenen Varianten von TR66 und

cUCHT1 abgeleiteten scFvs, für die bei vergleichbarer CD3-Bindung eine höhere stimulatorische Aktivität für die cUCHT1 Variante gegenüber den TR66 scFvs gezeigt wird (120).

Neben der Analyse von aktivierungsinduzierten Expressionsmarkern stellt die Analyse der Zytokinfreisetzung eine Möglichkeit dar, sowohl die Aktivierung der T-Zellen, aber auch die der Fc γ -Rezeptor-positiven Zellen zu bestimmen und gleichzeitig eventuelle Risiken für die therapeutische Anwendung zu finden. Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass die Aussagekraft von *in-vitro* Assays zur Zytokinfreisetzung zurzeit stark in Frage gestellt und diskutiert wird. Auslöser dafür war die Phase I Studie des anti-CD28 Antikörpers TGN1412, bei der es in allen sechs freiwilligen gesunden Studienteilnehmern nach einmaliger Antikörpergabe in kürzester Zeit zu einem lebensgefährlichen *Cytokine-Release-Syndrom* kam, welches in präklinischen *in-vivo* und *in-vitro* Untersuchungen nicht vorhergesagt wurde (121). In folgenden Untersuchungen zur Ursachenfindung konnten sowohl für die *in-vivo* als auch für die *in-vitro* Versuche mögliche Ursachen für die schlechte Vorhersage der therapeutischen Nebenwirkungen gefunden werden (122). Dabei konnte gezeigt werden, dass in den präklinischen Untersuchungen zu TGN1412 zum Beispiel die Ausschüttung der falschen Zytokine analysiert wurde. So wurden vor allem TNF- α und IL-8 untersucht, welche zwar dafür bekannt sind bei anderen therapeutisch verwendeten Antikörpern für ein *Cytokine-Release-Syndrom* verantwortlich zu sein, im Fall von TGN1412 aber nicht die Ursache der schweren Nebenwirkungen waren. Vielmehr zeichnete sich das beobachtete *Cytokine-Release-Syndrom* durch eine hohe Ausschüttung von IL-2 und IFN- γ aus (123; 124). Als weitere Ursache für die schlechte Vorhersagekraft der *in-vitro* Untersuchungen zu TGN1412 wurde die Art der Antikörperpräsentation ausgemacht. So wurde die durch TGN1412 induzierte Zytokinfreisetzung getestet, wenn TGN1412 in flüssiger Phase vorlag. Stebbings und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass TGN1412 immobilisiert werden muss, um *in-vitro* eine zur klinischen Anwendung vergleichbare Zytokinfreisetzung zu zeigen (125). Diese Beobachtung wird damit erklärt, dass auch *in-vivo* TGN1412 ein lokales Signal auf die T-Zellen auslöst und dieses durch die Immobilisierung simuliert werden kann. Da bis jetzt keine Konstrukte beschrieben wurden, die vollständig mit den PM-Ck-Konstrukten vergleichbar sind, wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuchsbedingungen getestet. So wurde die Zytokinfreisetzung sowohl mit Vollblut, als auch mit PBMCs untersucht. Der Grund für diese Entscheidung

lag an den verschiedenen Vorteilen, die beide Systeme bieten. Die Antikörper in Vollblut zu untersuchen simuliert dabei zum einen die physiologische Situation wie sie bei einer intravenösen Gabe auftreten würde und zum anderen wurde bereits für den gegen CD3 gerichteten Antikörper OKT3 gezeigt, dass Erythrozyten die Konzentration der freigesetzten Zytokine deutlich erhöhen (126). Im Gegensatz dazu schienen Erythrozyten bei der durch TGN1412 induzierten Zytokinfreisetzung eher eine inhibierende Rolle zu spielen (127). Um in dieser Arbeit die in der Literatur beschriebene Vielzahl von Methoden und unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener T-Zell stimulierender Antikörper möglichst breit untersuchen zu können wurde die Freisetzung von 11 verschiedenen Zytokinen mit unterschiedlichsten Versuchsbedingungen untersucht. So wurde zum einen die Zytokinfreisetzung in PBMCs aber auch in Vollblut untersucht und zum anderen die Antikörper gelöst oder immobilisiert eingesetzt. Um zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen trotzdem eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde jeweils die erhöhte Zytokinfreisetzung der bispezifischen Konstrukte bezogen auf die Ausgangsantikörper TrasGEX[®] und PankoMab-GEX[®] berechnet. Da es leider nicht möglich war TGN1412 als Kontrolle für die Zytokinfreisetzung zu beziehen, wurde in einigen Versuchen neben TrasGEX[®] und PankoMab-GEX[®] auch MabCampath[®] eingesetzt, der bei der klinischen Anwendung bei einigen Patienten ein von hohen IL-8 und TNF- α Konzentrationen geprägtes *Cytokin-Release-Syndrom* induziert. Allgemein war die von den bispezifischen Konstrukten induzierte Zytokinfreisetzung höher, wenn die bispezifischen Antikörper gelöst vorlagen oder über einen längeren Zeitraum inkubiert wurden (Abbildung 18 und Abbildung 19). Einhergehend mit der im Vergleich zu den Ausgangsantikörpern zusätzlichen T-Zell Stimulation zeigten die bispezifischen Konstrukte vor allem eine erhöhte Freisetzung von IFN- γ , IL-2, IL-6 und TNF- α , die in Abhängigkeit der T-Zell Stimulation auch für weitere T-Zell-rekrutierenden Antikörper beschrieben ist (31; 35; 81). Vergleicht man die PM-Ck-Konstrukte untereinander war auffällig, dass PM-Ck-scFvUCHT1 eine im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.1 und PM-Ck-scFvOkt3.2 im Mittel über alle Versuche 5-fach erhöhte Freisetzung von IL-2, 9-fach erhöhte Freisetzung von IFN- γ und 4-fach erhöhte TNF- α Freisetzung induzierte. Auch bei den TM-Ck-Konstrukten induzierte TM-Ck-scFvUCHT1 eine im Vergleich zu TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 4-fach erhöhte IL-2, 3-fach erhöhte IFN- γ und 3-4-fach erhöhte TNF- α Freisetzung. Ferner zeigten die scFvUCHT1-Konstrukte auch bei weiteren Zytokinen tendenziell eine höhere Zytokinfreisetzung. Ein direkter Vergleich zu

MabCampath[®] erscheint hingegen nicht sinnvoll. So zeigte MabCampath[®] immobilisiert eine im Vergleich zur gelösten Antikörpergabe deutlich erhöhte Zytokinfreisetzung und unterscheidet sich dadurch maßgeblich von den bispezifischen Konstrukten. Da besonders die deutlich erhöhte IL-2 und IFN- γ Freisetzung vergleichbar zu dem für TGN1412 beschriebenen Zytokinprofil war (124), wurden basierend auf diesen Ergebnissen und der ebenfalls gezeigten erhöhten Zielzell-unabhängigen T-Zell-Aktivierung die scFvUCHT1-Konstrukte nicht weitergehend charakterisiert. Sowohl PM-Ck-scFvOkt3.1 und PM-Ck-scFvOkt3.2 als auch TM-Ck-scFvOkt3.1 und TM-Ck-scFvOkt3.2 zeigten in den ersten funktionellen Untersuchungen nur geringe Unterschiede. Weil PM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 im Vergleich zu den scFvOkt3.1-Konstrukten eine leicht reduzierte Zielzell-unabhängige T-Zell-Aktivierung und Zytokinfreisetzung zeigten, wurden die scFvOkt3.2-Konstrukte für eine weiterführende Charakterisierung ausgewählt.

6.5 Charakterisierung der Wirkmechanismen der Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte

Neben der weiteren funktionellen Charakterisierung von PM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 sollte zusätzlich untersucht werden, ob eine Fusion der scFv-Domäne an die CH3-Domäne einen Vorteil gegenüber der Fusion an die Ck-Domäne hat. Wie bereits für die Fusion an die Ck-Domäne gezeigt, zeigte auch die Fusion an die CH3-Domäne keinen Einfluss auf die Bindung von TA-MUC1 oder Her2. Sowohl PM-CH3-scFvOkt3.2 als auch TM-CH3-scFvOkt3.2 zeigten eine zu PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] vergleichbare Antigenbindung (Abbildung 20 und Abbildung 21). Im Gegensatz dazu zeigten PM-CH3-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 durch die Fusion der scFvs an die CH3-Domänen eine deutlich verbesserte CD3-Bindung im Vergleich zu PM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-Ck-scFvOkt3.2 (Abbildung 22). Einhergehend mit diesem Ergebnis wurde bereits für andere Konstrukte gezeigt, dass sich das jeweilige Format auf die Antigenbindung auswirken kann (119).

Um die Ck-scFvOkt3.2- und CH3-scFvOkt3.2-Konstrukte funktionell zu charakterisieren, wurde neben der induzierten T-Zell-Aktivierung, T-Zell-Proliferation und Zytokinfreisetzung auch die vermittelte Zytotoxizität untersucht. Dazu wurde die NK-Zell vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität, die T-Zell vermittelte antikörperabhängige

Zytotoxizität mit voraktivierten T-Zellen sowie die PBMC vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität untersucht. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die wichtigsten, Zytotoxizität vermittelnden, Effektorzellpopulationen separat untersucht werden konnten. Außerdem wurde durch den Einsatz von PBMCs ein Versuchsaufbau verwendet, der neben der eigentlichen Zytotoxizität auch die T-Zell-Aktivierung und Costimulation durch Fcγ-Rezeptor-positive Immunzellen darstellen konnte. In Abwesenheit von Zielzellen induzierten PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 trotz der deutlich geringeren CD3-Bindung von PM-Ck-scFvOkt3.2 eine vergleichbare Expression von CD69 und CD25. Durch Zugabe von TA-MUC1-positiven T-47D-Zellen konnte die durch beide Konstrukte induzierte CD69-Expression noch weiter gesteigert werden (Abbildung 23). Eine gesteigerte CD25-Expression konnte hingegen nur für PM-CH3-scFvOkt3.2 beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch die Untersuchung der T-Zell-Proliferation. So induzierten PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 sowohl in An- als auch in Abwesenheit von TA-MUC1-positiven MCF-7-Zellen eine vergleichbare CD4⁺-T-Zell-Proliferation, wohingegen bei den CD8⁺-T-Zellen PM-CH3-scFvOkt3.2 eine etwas stärkere Proliferation induzierte (Abbildung 29). Im Gegensatz zu den in der Aktivierung eingesetzten T-47D wurde durch die MCF-7-Zellen jedoch eher ein immunsuppressiver Effekt vermittelt und die induzierte T-Zell-Proliferation war geringer als in Abwesenheit der Zielzellen. Immunsuppressive Eigenschaften von immortalisierten Tumorzelllinien sind weitreichend bekannt und auch für MCF-7-Zellen finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf immunsuppressive Eigenschaften (128; 129). Neben einer unterschiedlichen Immunsuppressivität könnte auch die Antigenexpression entscheidend für den unterschiedlichen Einfluss der T-47D und MCF-7-Zellen sein. So exprimieren T-47D-Zellen deutlich mehr TA-MUC1 ($1,6 \times 10^6$ Antigene/Zelle) als MCF-7-Zellen ($8,9 \times 10^4$ Antigene/Zelle). Es konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine allgemein gültige Abhängigkeit von Funktionalität und Antigenexpression beobachtet werden. Neben der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation wurde auch die durch PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 induzierte Zytokinfreisetzung untersucht. Dabei zeigte PM-Ck-scFvOkt3.2 eine im Vergleich zu PM-CH3-scFvOkt3.2 erhöhte Freisetzung von IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6 und TNF-α, wobei besonders die stark erhöhte Freisetzung von IL-1β und IL-6 auffällig war, da sie in früheren Experimenten nicht detektiert wurde (Abbildung 25 und Abbildung 18). Dies könnte auf eine Kontamination hindeuten. So beschreiben Vasilescu und Kollegen für humanes Vollblut eine durch Endotoxine verursachte erhöhte Freisetzung

von IL-1 β und IL-6 (130) und auch für isolierte humane Monozyten wurde bereits beschrieben, dass Lipopolysaccharide von verschiedenen Pathogenen eine erhöhte Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α induzieren (131).

Dennoch zeigte auch beim Vergleich von TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2 jeweils TM-Ck-scFvOkt3.2 eine erhöhte Freisetzung von IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α ohne jedoch vergleichbar auffällig stark erhöhte IL-1 β und IL-6 Werte wie sie für PM-Ck-scFvOkt3.2 bestimmt wurden. Der vorangige anti-Tumor Mechanismus der bispezifischen Antikörperkonstrukte ist die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. So zeigten PM-Ck-scFvOkt3.2 und PM-CH3-scFvOkt3.2 mit CD16aV transfizierten KHyG1-Zellen, die als NK-Zell Modell verwendet wurden, einen vergleichbaren ADCC-Effekt gegen TA-MUC1-positive T-47D-Zellen und bestätigten so funktionell die bereits gezeigte vergleichbare Bindung beider Konstrukte an TA-MUC1 (Abbildung 20 und Abbildung 26). Aufgrund der erfolgten Glykooptimierung durch Produktion der bispezifischen Konstrukte in der der GEX[®]-Fuc⁻ Zelllinie zeigten beide Konstrukte zudem einen verbesserten NK-Zell ADCC Effekt als PankoMab-GEX[®]. Durch die Verringerung des Fucose-Gehaltes in der Glykosylierung des Fc-Teils der bispezifischen Antikörper kann ein verbesserter ADCC Effekt erzielt werden. Dieser Effekt wird durch eine erhöhte Affinität von Fucose-reduzierten Antikörpern zum Fc γ -Rezeptor IIIa auf NK-Zellen verursacht (95; 132). Um neben der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität auch die durch aktivierte T-Zellen vermittelte Zytotoxizität separat betrachten zu können, wurden T-Zellen isoliert und durch Kultivierung mit CD3/CD28 beschichteten Microbeads und IL-2 voraktiviert. In dem mit voraktivierten T-Zellen durchgeführten ADCC Assay induzierte PM-CH3-scFvOkt3.2 eine stärkere spezifische Lyse der T-47D-Zellen als PM-Ck-scFvOkt3.2 (Abbildung 27). Die Verwendung von voraktivierten T-Zellen ermöglicht es unabhängig von Unterschieden in der T-Zell-Aktivierung, die separat untersucht wurden, zu beurteilen ob die verschiedenen Konstrukte bei der gleichzeitigen Bindung von TA-MUC1-positiven Tumorzellen und T-Zellen zu einer unterschiedlichen Freisetzung von Granzymen und Perforin und damit unterschiedlichen spezifischen Lysen der Tumorzellen führen. Dabei zeigte sich im Falle der PM-Konstrukte, dass die höhere Affinität von PM-CH3-scFvOkt3.2 gegenüber CD3 auch zu einer stärkeren spezifischen Lyse mit voraktivierten T-Zellen führt. Auch in dem PBMC ADCC Versuch, der neben der Tumorzell- und T-Zell-Bindung auch die Bindung von Fc γ -Rezeptor-positiven Immunzellen und die T-Zell-Aktivierung

widerspiegelt, induzierte PM-CH3-scFvOkt3.2 eine höhere spezifische Lyse als PM-Ck-scFvOkt3.2 (Abbildung 28).

Bei den zur Kontrolle hergestellten TM-Konstrukten induzierten TM-Ck-scFvOkt3.2 und TM-CH3-scFvOkt3.2, wie bereits für die PM-Konstrukte gezeigt, eine vergleichbare T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von Her2-positiven T-47D-Zellen (Abbildung 24). Durch Zugabe der T-47D-Zellen konnte vergleichbar zu den PM-Konstrukten für beide TM-Konstrukte eine gesteigerte CD69-Expression gezeigt werden. Im Gegensatz zu den PM-Konstrukten induzierte allerdings nur die Ck-Variante eine höhere CD25-Expression und auch bei der Untersuchung der T-Zell-Proliferation induzierte TM-Ck-scFvOkt3.2 sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von MCF-7-Zellen eine erhöhte CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Proliferation im Vergleich zu TM-CH3-scFvOkt3.2. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation vermittelte TM-Ck-scFvOkt3.2 auch einen stärkeren ADCC Effekt mit voraktivierten T-Zellen und PBMCs. Lediglich bei der Untersuchung der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität induzierte TM-CH3-scFvOkt3.2 eine höhere spezifische Lyse als TM-Ck-scFvOkt3.2. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse des NK-Zell ADCCs könnte in einer unterschiedlichen Fucosylierung beider Antikörper liegen, die in dieser Arbeit nicht spezifisch analysiert wurde. So zeigen bereits kleine Unterschiede in der Fucosylierung einen starken Effekt auf die NK-Zell vermittelte Zytotoxizität (95; 132). Auch induzierten beide Konstrukte trotz vergleichbarer Her2-Bindung eine verringerte spezifische Lyse als TrasGEX[®], der ebenfalls in GEX[®]-Fuc⁻-Zellen produziert wird, was wiederum auf eine erhöhte Fucosylierung zurückzuführen sein könnte. Das interessanteste Ergebnis der Konstruktvergleiche ist jedoch, dass, obwohl alle Konstrukte eine zu PankoMab-GEX[®] und TrasGEX[®] vergleichbare Antigenbindung zeigen und jeweils die CH3-Konstrukte eine verstärkte CD3-Bindung, bei den PM-Konstrukten PM-CH3-scFvOkt3.2 und bei den TM-Konstrukten jedoch TM-Ck-scFvOkt3.2 die stärkste T-Zell Funktionalität zeigten. Ursache dafür könnten zwei separate Einflüsse sein. Zum einen deuten die Ergebnisse der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation in Abwesenheit von Zielzellen darauf hin, dass durch die Fusion der scFvOkt3.2-Domäne an die Ck-Domänen eine verstärkte Aktivierung und Costimulation der T-Zellen vermittelt wird. So induziert PM-Ck-scFvOkt3.2 trotz deutlich geringerer CD3-Bindung eine zu PM-CH3-scFvOkt3.2 vergleichbare T-Zell-Aktivierung und Proliferation der CD4⁺-T-Zellen und auch TM-Ck-scFvOkt3.2 induziert trotz geringerer CD3-Bindung eine vergleichbare Aktivierung und

sogar stärkere Proliferation als TM-CH3-scFvOkt3.2. Alle bispezifischen Antikörper wurden in der GEX[®]-Fuc⁻ Zelllinie produziert, wodurch nur geringe Unterschiede in der Glykosylierung erwartet werden, welche lediglich einen geringen Effekt auf die Bindung von Fcγ-Rezeptor IIIa-positiven Immunzellen haben. Somit können die starken Unterschiede in der Aktivierung, trotz geringerer CD3-Bindung der Cκ-Konstrukte nur mit einer erhöhten Costimulation des Cκ-Formats begründet werden. Eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zur CH3-Variante sogar verstärkte Aktivierung durch TM-Cκ-scFvOkt3.2 könnte sein, dass im Fall der TM-Konstrukte der CD3-Bindungsunterschied geringer war als bei den PM-Konstrukten. So war die CD3-Bindung von PM-Cκ-scFvOkt3.2 um den Faktor 7 geringer als von PM-CH3-scFvOkt3.2, wohingegen die CD3-Bindung für TM-Cκ-scFvOkt3.2 nur um den Faktor 4 geringer als von TM-CH3-scFvOkt3.2 war.

Dass TM-Cκ-scFvOkt3.2 auch in dem ADCC Assay mit voraktivierten T-Zellen, in dem weder die Bindung von Fcγ-Rezeptor-positiven Immunzellen noch die antikörperabhängige Aktivierung der T-Zellen einen Einfluss hat, eine höhere spezifische Lyse vermittelt als TM-CH3-scFvOkt3.2, lässt darauf schließen, dass bei den TM-Konstrukten noch ein weiterer Mechanismus für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich ist. So wurde bereits für verschiedenen T-Zell-rekrutierende Konstrukte beschrieben, dass die erreichte Zytotoxizität maßgeblich von einer möglichst großen Nähe zwischen T-Zelle und Tumorzelle beeinflusst wird. Dabei ist sowohl eine erhöhte Zytotoxizität für Konstrukte beschrieben, in denen die Tumorantigen-Bindedomäne und die CD3-Bindedomäne in großer Nähe zueinander exprimiert werden, (81; 119; 133) als auch für Tumorantigen-Epitope, die möglichst dicht an der Zellmembran der Tumorzellen exprimiert werden (134). Zudem zeigte bei gleichbleibender Entfernung des Epitopes zur Zellmembran die allgemeine Größe des Antigens einen negativen Effekt auf die vermittelte Zytotoxizität (134). Dass dieser Effekt bei TM-Cκ-scFvOkt3.2 scheinbar stärker zum Tragen kommt als bei PM-Cκ-scFvOkt3.2, könnte an den ganz unterschiedlichen Antigenen liegen. So bindet Trastuzumab ein Epitop innerhalb der ersten 100 Aminosäuren der juxtamembranen Domäne IV der extrazellulären Domäne von Her2, wohingegen PankoMab-GEX[®] innerhalb der VNTR Region von MUC1 bindet (65; 135). Im Gegensatz zu dem Epitop von Trastuzumab ist das Epitop von PankoMab-GEX[®] zum einen durch die 227 Aminosäuren große extrazelluläre Domäne sowie zum anderen durch die variable Anzahl an Tandem Repeats deutlich weiter von

der Zellmembran der Tumorzellen entfernt. So beschreiben Gendler et al. für MUC1 ein gehäuftes Vorkommen von 41 bis 85 Tandem Repeats bei Nordeuropäern, was bedeutet, dass PankoMab-GEX[®] in einem Bereich von ~250 bis 2000 Aminosäuren von der Zellmembran entfernt binden kann (45). Da auch Bluemel et al. bereits einen dramatischen Einfluss von ~600 Aminosäuren auf die vermittelte Zytotoxizität sehen, ist es wahrscheinlich, dass auch bei den gegen TA-MUC1 gerichteten Konstrukten die Anzahl der Tandem Repeats einen deutlichen Einfluss auf die vermittelte T-Zell-Funktionalität hat. Dies könnte erklären, warum die durch die Fusion an die CH3-Domäne erzielte verbesserte CD3-Bindung in diesen Konstrukten einen größeren Einfluss hat als die etwas nähere Bindung von Tumorantigen und T-Zelle, die die Cκ-Konstrukte ermöglichen (134).

6.6 Fazit und Ausblick

Monospezifische Antikörper sind eine der erfolgreichsten Therapiemöglichkeiten der letzten Jahre für verschiedenste Tumorerkrankungen (136). Ein großer Nachteil, den herkömmliche Antikörper haben, ist, dass sie nicht direkt in der Lage sind T-Zellen zu rekrutieren und für die erfolgreiche Tumorthherapie zu nutzen. Da T-Zellen zahlreiche wertvolle Eigenschaften besitzen, versucht man diesen Nachteil durch die Entwicklung von bispezifischen Antikörpern, die zusätzlich zum Tumorantigen auch CD3 auf T-Zellen binden, zu umgehen. Die Wirksamkeit von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern ist durch die Zulassung von Catumaxomab und Blinatumomab mittlerweile klinisch bestätigt worden, wird jedoch von starken Nebenwirkungen begleitet. Da die meisten heutzutage in der Tumorthherapie verwendeten Tumorantigene nicht ausschließlich auf Tumoren exprimiert werden, sondern auch in geringeren Dichten auf zahlreichen Normalgeweben, sind hoch potente Therapien wie T-Zell-rekrutierende Antikörper häufig durch eine hohe *on-target off-tumor* Toxizität gekennzeichnet (33; 34; 41; 42). Um diese Nebenwirkungen zu verhindern, gilt eines der Hauptinteressen der aktuellen Forschung der Identifizierung neuer, spezifischerer Tumorantigene. Ein Antigen, das diese Anforderungen erfüllt, ist TA-MUC1, ein Kohlenhydrat/Protein-Kombinationsepitop, das auf Tumorzellen durch eine veränderte O-Glykosylierung von MUC1 entsteht und auf Normalgeweben nicht exprimiert wird, oder für therapeutische Antikörper nicht zugänglich ist (65). In dieser Arbeit sollte daher die Eignung von TA-MUC1 als Tumorantigen für einen T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörper

untersucht werden. Um eine möglichst breite T-Zell-Antwort zu induzieren, wurden für diese erste *proof of concept* Studie Konstrukte gewählt, die auf PankoMab-GEX[®], einem gegen TA-MUC1 gerichteten IgG1 beruhen, und neben den T-Zellen auch Fcγ-Rezeptor-positive Immunzellen binden können und so eine Costimulation der T-Zellen ermöglichen. Da dieser Ansatz aber gleichzeitig auch eine Aktivierung der T-Zellen unabhängig von der Tumorzellbindung ermöglicht, wurden zunächst ausgehend von vier anti-CD3 Antikörpern verschiedene gegen CD3 gerichtet scFvs verglichen und das scFv ausgewählt, das die geringste Tumorzell-unabhängige Aktivierung und Zytokinfreisetzung induziert, gleichzeitig aber eine starke CD3-Bindung vermittelt. Basierend auf diesem scFv wurden anschließend zwei verschiedene Formate ausführlich funktionell charakterisiert. Dabei führte die Fusion des anti-CD3 scFvs an die CH3-Domäne von PankoMab zu den besten funktionellen Ergebnissen. So vermittelte dieses Konstrukt eine im Vergleich verbesserte CD3-Bindung, was zu einer starken Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führte. Auch konnte mit diesem Konstrukt eine starke zytotoxische Wirkung von voraktivierten T-Zellen, von PBMCs und von NK-Zellen gegen TA-MUC1-positive Tumorzellen gezeigt werden. Überraschend war jedoch das Ergebnis, dass eine verbesserte Aktivierung und Costimulation durch Fcγ-Rezeptor-positive Immunzellen vermittelt wurde, wenn die scFv-Domäne an die Cκ-Domäne des IgG1 fusioniert wurde und nicht an die CH3-Domäne. Dies zeigte sich auch bei den zur Kontrolle hergestellten und gegen Her2 gerichteten Konstrukten. Im Fall der gegen TA-MUC1 gerichteten Konstrukte konnte die verbesserte Aktivierung und Costimulation jedoch nicht die deutlich geringere CD3-Bindung des Cκ-Konstruktes aufheben. Um eine klinische Anwendbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte zu ermöglichen, sind allerdings noch weiterführende Untersuchungen nötig. So wurden kürzlich neuere Ergebnisse zu Catumaxomab, einem gegen EpCAM und CD3 gerichteten vergleichbaren Konstrukt, veröffentlicht. Dabei konnte bei einem in einer klinischen Phase I aufgetretenem Fall tödlichen Leberversagens durch weitere Analysen gezeigt werden, dass die starken Nebenwirkungen in der Leber keine gegen EpCAM gerichtete *on-target off-tumor* Nebeneffekte sind. Vielmehr scheint ein Teil dieser Nebenwirkungen unabhängig von der Expression von EpCAM durch die Vernetzung von T-Zellen mit Fcγ-Rezeptor-positiven Kupffer-Zellen zu entstehen (32). Dieser Nebeneffekt könnte auch durch die in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte vermittelt werden und auch wenn hier zwar eine scFv-Domäne und ein Format ausgewählt wurden, die eine möglichst geringe Tumorantigen-unabhängige Aktivierung

und Zytokinfreisetzung vermitteln, muss weiterführend das Sicherheitsprofil detaillierter charakterisiert werden. Da sowohl die TA-MUC1 wie auch die CD3-Bindung humanspezifisch sind, sind für eine *in vivo* Toxizitätsstudie keine relevanten Spezies verfügbar, sodass die weitere Charakterisierung *in vitro* erfolgen muss. Neben der von Borlak et al. beschriebenen Aktivierung von Kupffer-Zellen kommen noch weitere Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung in Frage. Dabei wurden im Zuge der Aufklärung der TGN1412 vermittelten Zytokinfreisetzung zwei, zu den in dieser Arbeit verwendeten, alternative Formate beschrieben, die sich besonders eignen eine T-Zell vermittelte Zytokinfreisetzung *in vitro* zu untersuchen. Der von Römer und Kollegen beschriebene Versuchsaufbau beruht dabei auf einer Vorkultur von PBMCs bei einer erhöhten Zelldichte wodurch die Bedingungen simuliert werden sollen, die im Gewebe vorliegen (137). Dies erhöht die funktionelle Aktivität von Monozyten und T-Zellen und ermöglicht es so die für TGN412 beobachtete Zytokinfreisetzung darzustellen. Eine weitere Alternative ist das von Findlay und Kollegen beschriebene Kokultur-System mit HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) (138). In diesem Kokultur-System wurde bereits für verschiedene Antikörper eine gute Vergleichbarkeit der Zytokinfreisetzung mit der therapeutischen Anwendung beschrieben (139). Da beide Systeme mit einer flüssigen Antikörpergabe arbeiten und die PM-CD3-Konstrukte bei flüssiger Antikörpergabe eine höhere Zytokinfreisetzung zeigten, stellen beide Systeme eine vielversprechende Alternative dar um die Zytokinfreisetzung weiter zu charakterisieren. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Eignung von TA-MUC1 als vielversprechendes Tumorantigen für T-Zell-rekrutierenden Antikörper gezeigt werden. Die untersuchten PM-CD3-Konstrukte vermittelten *in vitro* alle für einen T-Zell-rekrutierenden Antikörper wichtigen Funktionsweisen, wie Aktivierung und Proliferation von T-Zellen sowie Zytotoxizität. Für eine klinische Anwendung sind allerdings noch weiterführende sicherheitsrelevante Untersuchungen, wie der Einfluss auf Kupffer-Zellen oder die Zytokinfreisetzung in den alternativen Formaten, nötig.

7. Literaturverzeichnis

1. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Berlin : Robert Koch-Institut (Hrsg), 2016.
2. **Imai K, Takaoka A**. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2006, Bd. 6(9), S. 714-727.
3. **Zhang J, Yang PL, Gray NS**. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*. 2009, Bd. 9(1), S. 28-39.
4. **Baudino TA**. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug. Discov. Technol*. 2015, Bd. 12(1), S. 3-20.
5. **Reichert JM**. Antibodies to watch in 2016. *MAbs*. 2016, Bd. 8(2), S. 197-204.
6. **Köhler G, Milstein C**. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, Bd. 256, S. 495-497.
7. **Weiner LM, Surana R, Wang S**. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 2010, Bd. 10(5), S. 317-327.
8. **Kontermann RE, Brinkmann U**. Bispecific antibodies. *Drug. Discov. Today*. 2015, Bd. 20(7), S. 838-847.
9. **Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, Thierfelder S**. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol*. 1995, Bd. 1;155(1), S. 219-25.
10. **Chelius D, Ruf P, Gruber P, Plösch M, Liedtke R, Gansberger E, Hess J, Wasiliu M, Lindhofer H**. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *MAbs*. 2010, Bd. 2(3), S. 309-319.
11. **Ridgway JBB, Presta LG, Carter P**. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*. 1996, Bd. 9(7), S. 617-621.
12. **Schaefer W, Regula JT, Böhner M, Schanzer J, Croasdale R, Dürr H, Gassner C, Georges G, Kettenberger H, Imhof-Jung S, Schwaiger M, Stubenrauch KG, Sustmann C, Thomas M, Scheuer W, Klein C**. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011, Bd. 108(27), S. 11187-11192.
13. **Ghetie V, Ward ES**. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*. 2000, Bd. 18, S. 739-66.
14. **Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG**. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol*. 2000, Bd. 164(8), S. 4178-84.
15. **Portell CA, Wenzell CM, Advani AS**. Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol*. 2013, Bd. 5, S. 5-11.

16. **Reusch U, Burkhardt C, Fucek I, Le Gall F, Le Gall M, Hoffmann K, Knackmuss SH, Kiprijanov S, Little M, Zhukovsky EA.** A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells. *MAbs*. 2014, Bd. 6(3), S. 728-739.
17. **Mack M, Riethmüller G, Kufer P.** A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, Bd. 18; 92(15), S. 7021–7025.
18. **Johnson S, Burke S, Huang L, Gorlatov S, Li H, Wang W, Zhang W, Tuailon N, Rainey J, Barat B, Yang Y, Jin L, Ciccarone V, Moore PA, Koenig S, Bonvini E.** Effector cell recruitment with novel Fv-based dual-affinity re-targeting protein leads to potent tumor cytolysis and in vivo B-cell depletion. *J. Mol. Biol.* 2010, Bd. 399(3), S. 436-449.
19. **Müller D, Karle A, Meissburger B, Höfig I, Stork R, Kontermann RE.** Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 2007, Bd. 282(17), S. 12650-12660.
20. **Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT, Harari PM.** Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*. 2008, Bd. 27(28), S. 3944-56.
21. **Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, Arteaga CL.** Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res*. 2007, Bd. 13(16), S. 4909-19.
22. **Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L.** Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010, Bd. 28(7), S. 1138-44.
23. **Wheler JJ, Tsimberidou AM, Falchook GS, Zinner RG, Hong DS, Fok JY, Fu S, Piha-Paul SA, Naing A, Razelle Kurzrock R.** Combining Erlotinib and Cetuximab is Associated with Activity in Patients with Non Small Cell Lung Cancer (including Squamous Cell Carcinomas) and Wild-Type EGFR or Resistant Mutations. *Mol Cancer Ther*. 2013, Bd. 12(10), S. 2167-75.
24. **Kim ES, Moon J, Herbst RS, Redman MW, Dakhil SR, Velasco MR Jr, Hirsch FR, Mack PC, Kelly K, Heymach JV, Gandara DR.** Phase II trial of carboplatin, paclitaxel, cetuximab, and bevacizumab followed by cetuximab and bevacizumab in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: SWOG S0536. *J Thorac Oncol*. 2013, Bd. 8(12), S. 1519-28.
25. **Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL.** Bispecific T cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2015, Bd. 93(3), S. 290-6.
26. **Satta A, Mezzanzanica D, Turatti F, Canevari S, Figini M.** Redirection of T-cell effector functions for cancer therapy: bispecific antibodies and chimeric antigen receptors. *Future Oncol*. 2013, Bd. 9(4), S. 527-39.

27. **Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP.** Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014, Bd. 14(1), S. 24-35.
28. **Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, Lindhofer H.** Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J. Immunol.* 1999, Bd. 163(3), S. 1246-1252.
29. **Zeidler R, Mysliwietz J, Csánady M, Walz A, Ziegler I, Schmitt B, Wollenberg B, Lindhofer H.** The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br. J. Cancer.* 2000, Bd. 83(2), S. 261-266.
30. **Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W.** Efficacy of catumaxomab in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010, Bd. 59(11), S. 1675-1684.
31. **Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenthin V, Gall FL, Topp M, Little M, Zhukovsky EA.** A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19(+) tumor cells. *MABs.* 2015, Bd. 7(3), S. 584-604.
32. **Borlak J, Länger F, Spanel R, Schöndorfer G, Dittrich C.** Immune-mediated liver injury of the cancer therapeutic antibody catumaxomab targeting EpCAM, CD3 and Fcγ receptors. *Oncotarget.* 2016, Bd. 7(19), S. 28059-28074.
33. **Sebastian M, Passlick B, Friccius-Quecke H, Jäger M, Lindhofer H, Kannies F, Wiewrodt R, Thiel E, Buhl R, Schmittel A.** Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007, Bd. 56(10), S. 1637-1644.
34. **Mau-Sørensen M, Dittrich C, Dienstmann R, Lassen U, Büchler W, Martinius H, Tabernero J.** A phase I trial of intravenous catumaxomab: a bispecific monoclonal antibody targeting EpCAM and the T cell coreceptor CD3. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2015, Bd. 75(5), S. 1065-1073.
35. **Brischwein K, Parr L, Pflanz S, Volkland J, Lumsden J, Klinger M, Locher M, Hammond SA, Kiener P, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA.** Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. *J. Immunother.* 2007, Bd. 30(8), S. 798-807.
36. **Wong R, Pepper C, Brennan P, Nagorsen D, Man S, Fegan C.** Blinatumomab induces autologous T-cell killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2013, Bd. 98(12), S. 1930–1938.
37. **Arndt C, Feldmann A, von Bonin M, Cartellieri M, Ewen E-M, Koristka S, Michalk I, Stamova S, Berndt N, Gocht A, Bornhäuser M, Ehninger G, Schmitz M, Bachmann M.** Costimulation improves the killing capability of T cells redirected to tumor cells expressing low levels of CD33: description of a novel modular targeting system. *Leukemia.* 2014, Bd. 28, S. 59-69.
38. **Laszlo GS, Gudgeon CJ, Harrington KH, Walter RB.** T-cell ligands modulate the cytolytic activity of the CD33/CD3 BiTE antibody construct, AMG 330. *Blood Cancer J.* 2015, Bd. 5(8), S. e340.

39. **Stieglmaier J, Benjamin J, Nagorsen D.** Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015, Bd. 15(8), S. 1093-1099.
40. **Ribera JM, Ferrer A, Ribera J, Genescà E.** Profile of blinatumomab and its potential in the treatment of relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Onco. Targets Ther.* 2015, Bd. 8, S. 1567-1574.
41. **HE., Heslop.** Safer CARs. *Mol. Ther.* 2010, Bd. 18(4), S. 661-662.
42. **Fiedler WM, Wolf M, Kebenko M, Goebeler M-E, Ritter B, Quaas A, Vieser E, Hijazi Y, Patzak I, Friedrich M, Kufer P, Frankel S, Seggewiss-Bernhardt R, Kaubitsch S.** A phase I study of EpCAM/CD3-bispecific antibody (MT110) in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2012, Bd. 30 (suppl; abstr 2504).
43. **Choi BD, Kuan C-T, Cai M, Archer GE, Mitchell DA, Gedeon PC, Sanchez-Perez L, Pastan I, Bigner DD, Sampson JH.** Systemic administration of a bispecific antibody targeting EGFRvIII successfully treats intracerebral glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, Bd. 110(1), S. 270–275.
44. **Hatstrup CL, Gendler SJ.** Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 2008, Bd. 70, S. 431-457.
45. **Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D.** Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 1990, Bd. 265(25), S. 15286-15293.
46. **Nath S, Mukherjee P.** MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 2014, Bd. 20(6), S. 332-342.
47. **Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J.** Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev.* 1988, Bd. 11/12, S. 55-101.
48. **Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM.** Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res.* 1998, Bd. 58(18), S. 4079-4081.
49. **Treon SP, Mollick JA, Urashima M, Teoh G, Chauhan D, Ogata A, Raje N, Hilgers JH, Nadler L, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC.** Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood.* 1999, Bd. 93(4), S. 1287-1298.
50. **Brugger W, Bühring HJ, Grünebach F, Vogel W, Kaul S, Müller R, Brümmendorf TH, Ziegler BL, Rappold I, Brossart P, Scheduling S, Kanz L.** Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J. Clin. Oncol.* 1999, Bd. 17(5), S. 1535-1544.
51. **Parmley RR, Gendler SJ.** Cystic fibrosis mice lacking Muc1 have reduced amounts of intestinal mucus. *J. Clin. Invest.* 1998, Bd. 102(10), S. 1798-1806.
52. **Kardon R, Price RE, Julian J, Lagow E, Tseng SC, Gendler SJ, Carson DD.** Bacterial conjunctivitis in Muc1 null mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999, Bd. 40(7), S. 1328-1335.

53. **Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J.** Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res.* 52(8), 1992, S. 2318-2324.
54. **Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J.** Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* 1995, Bd. 129(1), S. 255-265.
55. **Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG.** MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004, Bd. 41(2), S. 189-231.
56. **Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC.** The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res.* 1996, Bd. 56(18), S. 4244-4249.
57. **Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, Ishida T, Itoh F, Adachi M, Hinoda Y, Imai K.** MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion.* 2001, Bd. 63 Suppl 1, S. 87-92.
58. **Spicer AP, Duhig T, Chilton BS, Gendler SJ.** Analysis of mammalian MUC1 genes reveals potential functionally important domains. *Mamm. Genome.* 1995, Bd. 6, S. 885-888.
59. **Gendler SJ.** MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2001, Bd. 6(3), S. 339-353.
60. **Pandey P, Kharbanda S, Kufe D.** Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res.* 1995, Bd. 55(18), S. 4000-4003.
61. **Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D.** Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 1997, Bd. 272(19), S. 12492-12494.
62. **Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D.** Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* 1998, Bd. 18(12), S. 7216-7224.
63. **Hilkens J, Kroezen V, Bonfrer JM, De Jong-Bakker M, Bruning PF.** MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Res.* 1986, Bd. 46(5), S. 2582-2587.
64. **Karsten U, von Mensdorff-Pouilly S, Goletz S.** What makes MUC1 a tumor antigen? *Tumour Biol.* 2005, Bd. 26(4), S. 217-220.
65. **Danielczyk A, Stahn R, Faulstich D, Löffler A, Märten A, Karsten U, Goletz S.** PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006, Bd. 55(11), S. 1337-1347.
66. **Kuemmel A, Single K, Bittinger F, Faldum A, Schmidt LH, Sebastian M, Micke P, Taube C, Buhl R, Wiewrodt R.** TA-MUC1 epitope in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2008, Bd. 63(1), S. 98-105.
67. **Dian D, Janni W, Kuhn C, Mayr D, Karsten U, Mylonas I, Friese K, Jeschke U.** Evaluation of a novel anti-mucin 1 (MUC1) antibody (PankoMab) as a potential diagnostic tool in human ductal breast cancer; comparison with two established antibodies. *Onkologie.* 2009, Bd. 32(5), S. 238-244.

68. **Fan XN, Karsten U, Goletz S, Cao Y.** Reactivity of a humanized antibody (hPankoMab) towards a tumor-related MUC1 epitope (TA-MUC1) with various human carcinomas. *Pathol. Res. Pract.* 2010, Bd. 206(8), S. 585-589.
69. **Dian D, Lenhard M, Mayr D, Heublein S, Karsten U, Goletz S, Kuhn C, Wiest I, Friese K, Weissenbacher T, Jeschke U.** Staining of MUC1 in ovarian cancer tissues with PankoMab-GEX detecting the tumour-associated epitope, TA-MUC1, as compared to antibodies HMFG-1 and 115D8. *Histol. Histopathol.* 2013, Bd. 28(2), S. 239-244.
70. **Heublein S, Mayr D, Egger M, Karsten U, Goletz S, Angele M, Gallwas J, Jeschke U, Ditsch N.** Immunoreactivity of the fully humanized therapeutic antibody PankoMab-GEX™ is an independent prognostic marker for breast cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2015, Bd. 34:50, S. 1-8.
71. **Fiedler W, DeDosso S, Cresta S, Weidmann J, Tessari A, Salzberg M, Dietrich B, Baumeister H, Goletz S, Gianni L, Sessa C.** A phase I study of PankoMab-GEX, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific MUC1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas. *Eur. J. Cancer.* 2016, Bd. 63, S. 55-63.
72. **Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Martin AC, 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 the affinity. *Protein Eng.* 1997, Bd. 10(4), S. 445-53.
73. **Shalaby MR, Shepard HM, Presta L, Rodrigues ML, Beverley PC, Feldmann M, Carter P.** Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med.* 1992, Bd. 175(1), S. 217-25.
74. **Tunnacliffe A, Olsson C, de la Hera A.** The majority of human CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. *Int Immunol.* 1989, Bd. 1(5), S. 546-50.
75. **Baeuerle PA, Reinhardt C.** Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 2009, Bd. 69(12), S. 4941-4.
76. **Beverley PC, Callard RE.** Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. *Eur J Immunol.* 1981, Bd. 11(4), S. 329-34.
77. **Parren PW, Geerts ME, Boeije LC, Aarden LA.** Induction of T-cell proliferation by recombinant mouse and chimeric mouse/human anti-CD3 monoclonal antibodies. *Res Immunol.* 1991, Bd. 142(9), S. 749-63.
78. **Lanzavecchia A, Scheidegger D.** The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1987, Bd. 17(1), S. 105-11.
79. **Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA.** Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* 2010, Bd. 18(4), S. 843-51.
80. **Klinger M, Benjamin J, Kischel R, Stienen S, Zugmaier G.** Harnessing T cells to fight cancer with BiTE® antibody constructs - past developments and future directions. *Immunol Rev.* 2016, Bd. 270(1), S. 193-208.

81. **Bacac M, Fauti T, Sam J, Colombetti S, Weinzierl T, Ouaret D, Bodmer W, Lehmann S, Hofer T, Hosse RJ, Moessner E, Ast O, Bruenker P, Grau-Richards S, Schaller T, Seidl A, Gerdes C, Perro M, Nicolini V, Steinhoff N, Dudal S, Neumann S, von Hirschheydt T, Jaeger C, Saro J, Karanikas V, Klein C, Umaña P.** A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2016, Bd. 22(13), S. 3286-97.
82. **Tax WJ, Hermes FF, Willems RW, Capel PJ, Koene RA.** Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: polymorphism and role in antibody-induced T cell proliferation. *J Immunol.* 1984, Bd. 133(3), S. 1185-9.
83. **Ceuppens JL, Bloemmen FJ, Van Wauwe JP.** T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of monocyte Fc gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex. *J Immunol.* 1985, Bd. 135(6), S. 3882-6.
84. **Smith KG, Austyn JM, Hariri G, Beverley PC, Morris PJ.** T cell activation by anti-T3 antibodies: comparison of IgG1 and IgG2b switch variants and direct evidence for accessory function of macrophage Fc receptors. *Eur J Immunol.* 1986, Bd. 16(5), S. 478-86.
85. **Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, Capel PJ, van de Winkel JG, Aarden LA.** Characterization of IgG FcR-mediated proliferation of human T cells induced by mouse and human anti-CD3 monoclonal antibodies. Identification of a functional polymorphism to human IgG2 anti-CD3. *J Immunol.* 1992, Bd. 148(3), S. 695-701.
86. **Ruf P, Lindhofer H.** Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood.* 2001, Bd. 98(8), S. 2526-34.
87. **Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M, Ganea-Motan E, Ciuleanu T, Wimberger P, Schmittel A, Schmalfeldt B, Burges A, Bokemeyer C, Lindhofer H, Lahr A, Parsons SL.** The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer.* 2010, Bd. 127(9), S. 2209-21.
88. **Sehouli J, Pietzner K, Wimberger P, Vergote I, Rosenberg P, Schneeweiss A, Bokemeyer C, Salat C, Scambia G, Berton-Rigaud D, Santoro A, Cervantes A, Trédan O, Tournigand C, Colombo N, Dudnichenko AS, Westermann A, Friccius-Quecke H, Lordick F.** Catumaxomab with and without prednisolone premedication for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: results of the randomised phase IIIb CASIMAS study. *Med Oncol.* 2014, Bd. 31(8), S. 76.
89. **Walz A, Andratschke M, Wollenberg B, Lindhofer H, Zeidler R.** Prednisolone reduces TNF-alpha release by PBMCs activated with a trifunctional bispecific antibody but not their anti-tumor activity. *Anticancer Res.* 2005, Bd. 25(6B), S. 4239-43.
90. **Riechelmann H, Wiesneth M, Schauwecker P, Reinhardt P, Gronau S, Schmitt A, Schroen C, Atz J, Schmitt M.** Adoptive therapy of head and neck squamous cell carcinoma with antibody coated immune cells: a pilot clinical trial. *Cancer Immunol Immunother.* 2007, Bd. 56(9), S. 1397-406.
91. **Schlereth B, Lorenczewski G, Friedrich M, Lutterbuese P, Lutterbuese R, Kischel R, Kufer P, Bauerle P, Wolf A.** Feasibility of repeated subcutaneous delivery supports a new route of

administration for treating cancer patients with EpCAM-specific BiTE antibody MT110. *Cancer Res.* 2008, Bd. 68(9), S. 2403.

92. **Dettmar K, Seitz-Merwald I, Lindemann C, Schroeder P, Seimetz D, Atz J.** Transient lymphocyte decrease due to adhesion and migration following catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) treatment in vivo. *Clin Transl Oncol.* 2012, Bd. 14(5), S. 376-81.

93. **Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, Gökbüget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A, Stelljes M, Brüggemann M, Hoelzer D, Degenhard E, Nagorsen D, Baeuerle PA, Wolf A, Kufer P.** Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood.* 2012, Bd. 119(26), S. 6226-33.

94. **Kufer P, Dirk Nagorsen D, Scheele J, Zugmaier G, Klinger M, Hoffmann P, Naegele V, Dopfer EP.** *Anti-Leukocyte Adhesion for the Mitigation of Potential Adverse Events caused by CD3-Specific Binding Domains.* US20140227272 A1 2013.

95. **Goletz S, Danielczyk A, Stahn R, Karsten U, Stoeckl L, Loeffler A, Hillemann A, Baumeister H.** GlycoOptimization for Fully Human and Largely Improved Biopharmaceutical Antibodies and Proteins. *Glyco-Bioinformatics – Bits ‘n’ Bytes of Sugars.* s.l. : Beilstein-Institut, 2010, S. 87-99.

96. **RJ., Kaufman.** Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 1990, Bd. 185, S. 537-66.

97. **de la Luna S, Soria I, Pulido D, Ortín J, Jiménez A.** Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene.* 1988, Bd. 62(1), S. 121-6.

98. **Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, Seyfzadeh M.** Optimization of codon pair use within the (GGGS)₃ linker sequence results in enhanced protein expression. *Mol Immunol.* 2004, Bd. 40(10), S. 717-22.

99. **Sela-Culang I, Alon S, Ofra Y.** A systematic comparison of free and bound antibodies reveals binding-related conformational changes. *J Immunol.* 2012, Bd. 189(10), S. 4890-9.

100. **Oda M, Kozono H, Morii H, Azuma T.** Evidence of allosteric conformational changes in the antibody constant region upon antigen binding. *Int Immunol.* 2003, Bd. 15(3), S. 417-26.

101. **Tong H, Zhang L, Kaspar A, Rames MJ, Huang L, Woodnutt G, Ren G.** Peptide-conjugation induced conformational changes in human IgG1 observed by optimized negative-staining and individual-particle electron tomography. *Sci Rep.* 2013, Bd. 3(1089), S. 1-9.

102. **Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, Plückthun A.** High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res.* 1999, Bd. 59(22), S. 5758-67.

103. **Reiter Y, Brinkmann U, Webber KO, Jung SH, Lee B, Pastan I.** Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng.* 1994, Bd. 7(5), S. 697-704.

104. **Schanzer J, Jekle A, Nezu J, Lochner A, Croasdale R, Dioszegi M, Zhang J, Hoffmann E, Dormeyer W, Stracke J, Schäfer W, Ji C, Heilek G, Cammack N, Brandt M, Umana P, Brinkmann U.** Development of tetravalent, bispecific CCR5 antibodies with antiviral activity against CCR5 monoclonal antibody-resistant HIV-1 strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, Bd. 55(5), S. 2369-78.
105. **Schwarz H, Schmittner M, Duschl A, Horejs-Hoeck J.** Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One.* 2014, Bd. 9(12), S. 1-15.
106. **Guha M, Mackman N.** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001, Bd. 13(2), S. 85-94.
107. **Mattern T, Thanhäuser A, Reiling N, Toellner KM, Duchrow M, Kusumoto S, Rietschel ET, Ernst M, Brade H, Flad HD.** Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J Immunol.* 1994, Bd. 153(7), S. 2996-3004.
108. **G., Trinchieri.** Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003, Bd. 3(2), S. 133-46.
109. **Couper KN, Blount DG, Riley EM.** IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008, Bd. 180(9), S. 5771-7.
110. **Hunter CA, Jones SA.** IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015, Bd. 16(5), S. 448-57.
111. **Orcutt KD, Ackerman ME, Cieslewicz M, Quiroz E, Slusarczyk AL, Frangioni JV, Wittrup KD.** A modular IgG-scFv bispecific antibody topology. *Protein Eng Des Sel.* 2010, Bd. 23(4), S. 221-8.
112. **Bühler P, Wetterauer D, Gierschner D, Wetterauer U, Beile UE, Wolf P.** Influence of structural variations on biological activity of anti-PSMA scFv and immunotoxins targeting prostate cancer. *Anticancer Res.* 2010, Bd. 30(9), S. 3373-9.
113. **Lu D, Jimenez X, Witte L, Zhu Z.** The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, Bd. 318(2), S. 507-13.
114. **Hexham JM, Dudas D, Hugo R, Thompson J, King V, Dowling C, Neville DM Jr, Digan ME, Lake P.** Influence of relative binding affinity on efficacy in a panel of anti-CD3 scFv immunotoxins. *Mol Immunol.* 2001, Bd. 38(5), S. 397-408.
115. **Wang S, Zheng C, Liu Y, Zheng H, Wang Z.** Construction of multiform scFv antibodies using linker peptide. *J Genet Genomics.* 2008, Bd. 35(5), S. 313-6.
116. **Shan D, Press OW, Tsu TT, Hayden MS, Ledbetter JA.** Characterization of scFv-Ig constructs generated from the anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths. *J Immunol.* 1999, Bd. 162(11), S. 6589-95.
117. **Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R.** Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-

- digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, Bd. 85(16), S. 5879-83.
118. **Tang Y, Jiang N, Parakh C, Hilvert D**. Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem*. 1996, Bd. 271(26), S. 15682-6.
119. **Moore PA, Zhang W, Rainey GJ, Burke S, Li H, Huang L, Gorlatov S, Veri MC, Aggarwal S, Yang Y, Shah K, Jin L, Zhang S, He L, Zhang T, Ciccarone V, Koenig S, Bonvini E, Johnson S**. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *Blood*. 2011, Bd. 117(17), S. 4542-51.
120. **J., Holland**. Development of a highly potent bispecific antibody format targeting the novel tumor-specific antigen CLDN18.2. *Dissertation*. 2014.
121. **Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N**. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006, Bd. 355(10), S. 1018-28.
122. **Eastwood D, Findlay L, Poole S, Bird C, Wadhwa M, Moore M, Burns C, Thorpe R, Stebbings R**. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol*. 2010, Bd. 161(3), S. 512-26.
123. **Stebbing R, Eastwood D, Poole S, Thorpe R**. After TGN1412: recent developments in cytokine release assays. *J Immunotoxicol*. 2013, Bd. 10(1), S. 75-82.
124. **Eastwood D, Bird C, Dilger P, Hockley J, Findlay L, Poole S, Thorpe SJ, Wadhwa M, Thorpe R, Stebbings R**. Severity of the TGN1412 trial disaster cytokine storm correlated with IL-2 release. *Br J Clin Pharmacol*. 2013, Bd. 76(2), S. 299-315.
125. **Stebbing R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, Mistry Y, Dilger P, Liefoghe E, Cludts I, Fox B, Tarrant G, Robinson J, Meager T, Dolman C, Thorpe SJ, Bristow A, Wadhwa M, Thorpe R, Poole S**. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol*. 2007, Bd. 179(5), S. 3325-31.
126. **Song S, Goodwin J, Zhang J, Babbitt B, Lathey JL**. Effect of contaminating red blood cells on OKT3-mediated polyclonal activation of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002, Bd. 9(3), S. 708-12.
127. **Vessillier S, Eastwood D, Fox B, Sathish J, Sethu S, Dougall T, Thorpe SJ, Thorpe R, Stebbings R**. Cytokine release assays for the prediction of therapeutic mAb safety in first-in man trials--Whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm. *J Immunol Methods*. 2015, Bd. 424, S. 43-52.
128. **Moroz C, Traub L, Maymon R, Zahalka MA**. PLIF, a novel human ferritin subunit from placenta with immunosuppressive activity. *J Biol Chem*. 2002, Bd. 277(15), S. 12901-5.

129. **Tsai YC, Huang JR, Cheng JY, Lin JJ, Hung JT, Wu YY, Yeh KT, Yu AL.** A prevalent cancer associated glycan, Globo H ceramide, induces immunosuppression by reducing Notch1 signaling. *J. Cancer Sci. Ther.* 2013, Bd. 5, S. 264–270.
130. **Vasilescu C, Berger D, Buttenschön K, Seidelmann M, Beger HG.** Endotoxin-Induced Release of Interleukin 6 and Interleukin 1 β in Human Blood Is Independent of Tumor Necrosis Factor Alpha. *Eur. Surg. Res.* 1996, Bd. 28, S. 55–62.
131. **Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE.** Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res.* 1995, Bd. 74(4), S. 1057-65.
132. **Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG.** Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem.* 2002, Bd. 277(30), S. 26733-40.
133. **Chames P, Baty D.** Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs.* 2009, Bd. 1(6), S. 539-47.
134. **Bluemel C, Hausmann S, Fluhr P, Sriskandarajah M, Stallcup WB, Baeuerle PA, Kufer P.** Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 2010, Bd. 59(8), S. 1197-209.
135. **Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ.** Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* 2003, Bd. 421(6924), S. 756-60.
136. **Scott AM, Allison JP, Wolchok JD.** Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* 2012, Bd. 12:14, S. 1-8.
137. **Römer PS, Berr S, Avota E, Na SY, Battaglia M, ten Berge I, Einsele H, Hünig T.** Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood.* 2011, Bd. 118(26), S. 6772-82.
138. **Findlay L, Eastwood D, Ball C, Robinson CJ, Bird C, Wadhwa M, Thorpe SJ, Thorpe R, Stebbings R, Poole S.** Comparison of novel methods for predicting the risk of pro-inflammatory clinical infusion reactions during monoclonal antibody therapy. *J Immunol Methods.* 2011, Bde. 371(1-2), S. 134-42.
139. **Grimaldi C, Finco D, Fort MM, Gliddon D, Harper K, Helms WS, Mitchell JA, O'Lone R, Parish ST, Piche MS, Reed DM, Reichmann G, Ryan PC, Stebbings R, Walker M.** Cytokine release: A workshop proceedings on the state-of-the-science, current challenges and future directions. *Cytokine.* 2016, Bd. 85, S. 101-8.

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	<i>antibody dependent cellular phagocytosis</i> Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
Ang-2	Angiopoetin-2
BiTE	<i>Bispecific T cell Engager</i>
C _k	konstante Domäne einer leichten kappa Antikörperkette
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDX	<i>cluster of differentiation X</i>
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i> komplementabhängige Zytotoxizität
CH3	konstante 3. Domäne der schweren Antikörperkette
CML	chronische myeloische Leukämie
c-src	Tyrosinkinase Src
CTV	<i>CellTrace™ Violet</i>
DART	<i>Dual-Affinity Re-Targeting</i>
DVD-Ig,	<i>dual variable domain immunoglobulin</i>
E:T	Effektor zu Zielzell-Verhältnis
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
F	Phenylalanin
Fab	<i>antigen-binding fragment</i>
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	Fetales Kälberserum
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GEX [®]	GlycoExpress [®]
Grb2/SOS	<i>growth factor receptor-bound protein 2/son of sevenless</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
h	Stunde/n
HC	<i>heavy chain</i>

Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
Her3	<i>human epidermal growth factor receptor 3</i>
HSA	humanes Serumalbumin
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-X	Interleukin-X
kih	<i>knob-into-hole</i>
LC	<i>light chain</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LLL	Linolsäure, Linolensäure, Liponsäure
mAbs	monoklonale Antikörper
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition factor</i>
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
MUC-1	Mucin 1
MUC1-C	C-terminale Untereinheit von MUC-1
MUC1-N	N-terminale Untereinheit von MUC-1
n	Anzahl der Replikate
N-CAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
O.D.	optische Dichte
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
pcd	<i>picogram per cell per day</i> Pikogramm pro Zelle pro Tag
pg	Pikogramm
pM	Pikomolar
PM	PankoMab
PST	Prolin, Serin, Threonin
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SD	Standardabweichung

SEA	<i>sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SPR	spezifische Produktivitätsrate
tandAb	<i>tandem diabody</i>
TF	Thomsen-Friedenreich Antigen
TM	Trastuzumab
Tn	T-nouvelle Antigen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V	Valin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V _H	Vektor mit schwerer Antikörperkette
VH	variable schwere Domäne
V _L	Vektor mit leichter Antikörperkette
VL	variable leichte Domäne
VNTR	<i>variable number tandem repeat</i>
vZ	vitale Zellen
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
μ s	Mikrosekunden

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Patrik Kehler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung und Charakterisierung verschiedener neuartiger bispezifischer Antikörper basierend auf PankoMab-GEX™ zur Verbesserung der Tumorthherapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Keine Publikation erfolgt.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht