

Entwicklung und funktionelle Analyse eines zellbasierten Bioaktivitätstests für das Immunzytokin L19-IL2

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jonas P. Winter
aus Berlin
2010

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von November 2007 bis September 2010 unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. Thomas Bunte in der Analytischen Entwicklung, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Freie Universität Berlin
Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Thomas Bunte
Bayer Schering Pharma AG, Berlin
Analytische Entwicklung

Disputation am: 12.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Biopharmazeutische Arzneimittel	1
1.2. Therapeutische Antikörper	1
1.3. Das Immunzytokin L19-IL2	3
1.4. Bestimmung der biologischen Aktivität von Immunzytokinen.....	4
1.5. Zielstellung der Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1. Reagenzien	7
2.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)	7
2.2.1. Immobilisierung von 7B89	7
2.2.2. Bestimmung der Avidität von L19-IL2.....	8
2.3. Zellbasierte Tests.....	8
2.3.1. Zellen und Zellkultur	8
2.3.2. IL2 Bioaktivitätstest.....	9
2.3.3. L19-IL2 Bioaktivitätstest	9
2.3.4. Kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest.....	11
2.3.5. Kombination des IL2 Bioaktivitätstests mit dem L19-IL2 Bioaktivitätstest	11
2.3.6. Datenanalyse und Bestimmung der relativen Aktivität.....	11
2.4. Kompetitiver L19-IL2 time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA).....	12
2.5. Herstellen von Zelllysaten und Gesamtproteinbestimmung	13
2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot	13
2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Coomassifärbung von L19-IL2 Stabilitätsproben	15
2.8. Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)	15
2.8.1. Vorbereitung der Mikrotiterplatte	15
2.8.2. Methode zur Untersuchung der Internalisierung von L19-IL2.....	15
2.8.3. Färbung	16

2.8.4. Mikroskopische Analyse und Auswertung	17
3. Ergebnisse	18
3.1. Bestimmung der Avidität von L19-IL2	18
3.2. Bioaktivität von IL2 und L19-IL2 im IL2 Bioaktivitätstest	20
3.3. L19-IL2 Bioaktivitätstest	23
3.3.1. Testentwicklung und Optimierung der Testparameter	23
3.3.2. Vergleich verschiedener Modelle für die L19-IL2 Dosis-Wirkungskurve..	27
3.3.3. Validierung	28
3.4. Vergleich des IL2 Bioaktivitätstests mit dem L19-IL2 Bioaktivitätstest	37
3.5. Konkurrenz von gebundenem L19-IL2 mit AP39	39
3.6. Kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest	40
3.7. Internalisierung von L19-IL2	42
3.7.1. Optimierung der Beschichtung der Mikrotiterplatten	42
3.7.2. Untersuchung der Internalisierung von L19-IL2 mittels CLSM	43
3.7.3. Kinetik der L19-IL2 Internalisierung	45
3.8. L19-IL2 vermittelte Signalübertragung in CTLL-2 Zellen	47
4. Diskussion	50
4.1. Evaluation der Bindungseigenschaften von L19-IL2	50
4.2. Bestimmung der biologischen Aktivität von L19-IL2	51
4.2.1. Entwicklung und Validierung des L19-IL2 Bioaktivitätstest	52
4.3. Immobilisierung von L19-IL2	54
5. Zusammenfassung	59
6. Abstract	61
7. Literatur	63
8. Danksagung	69
9. Publikationen	70
10. Lebenslauf	71
11. Eidesstattliche Erklärung	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Struktur einer Untereinheit von menschlichem Fibronectin.....	4
Abbildung 3-1: Avidität von L19-IL2.....	19
Abbildung 3-2: IL2 Bioaktivitätstest mit IL2 verschiedener Hersteller.	20
Abbildung 3-3: Format des IL2 Bioaktivitätstests.....	21
Abbildung 3-4: IL2 Bioaktivitätstest mit IL2 und L19-IL2.....	22
Abbildung 3-5: Format des L19-IL2 Bioaktivitätstests.....	23
Abbildung 3-6: Evaluierung verschiedener Versuchsparameter des L19-IL2 Bioaktivitätstests.....	25
Abbildung 3-7: L19-IL2 Bioaktivitätstest mit unterschiedlichen Zellpassagen.....	26
Abbildung 3-8: Vergleich verschiedener Modelle für die L19-IL2 Dosis- Wirkungskurve.....	27
Abbildung 3-9: Spezifität des L19-IL2 Bioaktivitätstests.	28
Abbildung 3-10: Dosis-Wirkungskurven des L19-IL2 Bioaktivitätstests.	30
Abbildung 3-11: Linearität des L19-IL2 Bioaktivitätstests.	33
Abbildung 3-12: Stabilität des L19-IL2 Standards bei 4 °C.....	36
Abbildung 3-13: Vergleichende Untersuchung des IL2 Bioaktivitätstests mit dem L19-IL2 Bioaktivitätstest.	38
Abbildung 3-14: Konkurrenz von gebundenem L19-IL2 mit AP39.	40
Abbildung 3-15: Kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest.....	41
Abbildung 3-16: Bildanalyse von CTLL-2 Zellen mittels MetaXpress- Software.	44
Abbildung 3-17: Bindung und Internalisierung von L19-IL2.	45
Abbildung 3-18: Untersuchung der Lokalisation von L19-IL2 und des IL2 Rezeptors mittels CLSM.....	46
Abbildung 3-19: Kinetik der Internalisierung von L19-IL2.	47
Abbildung 3-20: Western Blot zum Nachweis des JAK-STAT Signalweges in CTLL-2 Zellen.	48
Abbildung 3-21: Aktivierung des JAK-STAT Signalweges durch L19-IL2.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Ergebnisse der L19-IL2 Bioaktivitätstests mit unterschiedlich alten Zellpassagen.....	26
Tabelle 3-2: Intra-Assay und Inter-Assay Präzision sowie Richtigkeit des L19-IL2 Bioaktivitätstests.	31
Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Intra-Assay und Inter-Assay Präzision und Richtigkeit.....	32
Tabelle 3-4: Ergebnisse der parallel-curve Analyse (PCA) und parallel-line Analyse (PLA).....	34

Abkürzungsverzeichnis

AAPS	<i>American Association of Pharmaceutical Scientists</i>
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	Varianzanalyse
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cps	<i>counts per second</i>
CTLL-2	IL2 abhängige zytotoxische T-Zelllinie
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDB	Extra Domäne B
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Eu	Europium
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>fluoroimmunoassay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
Hoe	Hoechst
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i>
HSA	Human Serum Albumin
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
Ig	Immunglobulin
IL2	Interleukin 2
IL2-R	IL2-Rezeptor
IMAC	stillgestellte Metallionenaffinitätschromatographie
JAK	Janus Kinase
KD	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LBA	<i>ligand binding assay</i>

mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>parallel-curve-analysis</i>
PE	Phycoerythrin
PLA	<i>parallel-line-analysis</i>
pM	Pikomolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
p-Wert	Signifikanzniveau
R ²	Determinationskoeffizienten
RE	relativer Fehler
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i>
scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
SD	Standardabweichung
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
s	Sekunde
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TR-FIA	time-resolved fluoroimmunoassay
VK	Variationskoeffizient
µl	Mikroliter
4 PL	4-Parameter logistisches Modell
5 PL	5-Parameter logistisches Modell
7B89	Fibronectinfragment aus EDB und den Domänen 7, 8 und 9

1. Einleitung

1.1. Biopharmazeutische Arzneimittel

Arzneimittel sind ein bedeutender Bestandteil der modernen Medizin, wobei es sich bei den meisten Wirkstoffen um niedermolekulare, chemische Verbindungen handelt. Obwohl einige dieser Substanzen ursprünglich aus Organismen isoliert wurden, werden sie heute überwiegend direkt chemisch synthetisiert.

Neben diesen Arzneimitteln gewinnen seit den 1980iger Jahren biopharmazeutische Arzneimittel (sog. Biologicals oder Biopharmazeutika) mit einem Molekulargewicht von über 15 kDa immer mehr an Bedeutung, so dass heute bereits jedes vierte neue Medikament ein Biological ist [1]. Im Gegensatz zu niedermolekularen chemischen Verbindungen werden diese hochmolekularen Arzneimittel mit Hilfe von, lebenden, biologischen Systemen produziert. Beispiele für biopharmazeutische Arzneimittel sind etwa Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Vakzine, Nukleinsäuren sowie eine Vielzahl von therapeutischen Antikörpern und Antikörperderivaten [2].

1.2. Therapeutische Antikörper

1975 gelang es Milstein und Köhler die ersten monoklonalen Antikörper (mAk) mittels Hybridom-Technologie zu entwickeln [3]. Damit konnten spezifische Antikörper mit definierter Aminosäuresequenz in großen Mengen reproduzierbar hergestellt werden. Monoklonale Antikörper werden nunmehr seit über drei Jahrzehnten in der Klinik untersucht und in der Forschung kontinuierlich weiterentwickelt, so dass es heute möglich ist vollständig humane Antikörper mittels Phage Display mit rekombinanten Antikörperfragmentbibliotheken herzustellen [4,5]. Damit konnte die Immunogenität der therapeutischen Antikörper deutlich verringert werden. Darüber hinaus werden heute neben kompletten mAk auch Antikörperfragmente wie beispielsweise einkettige Fv-Fragmente (*single chain Fv*, scFv) hergestellt, die nur aus den variablen Domänen einer schweren und leichten Kette eines Antikörpers bestehen, welche über eine kurze Aminosäuresequenz miteinander verbunden sind.

Die Onkologie ist eines der größten Forschungs- und Anwendungsgebiete für therapeutische Antikörper, da es durch die Spezifität von Antikörpern möglich ist Tumor-assoziierte Antigene selektiv zu binden und somit als Zielstrukturen für eine Krebstherapie zu verwenden [6,7]. Gegenwärtig sind zehn mAk für die Krebstherapie

zugelassen, wobei vier davon zu den zehn therapeutisch und wirtschaftlich erfolgreichsten Krebsmedikamenten zählen [8]. Neben unmodifizierten mAk gewinnen modifizierte mAk wie Immunkonjugate zunehmend an Bedeutung. Immunkonjugate sind bifunktionale Proteine, die aus einem mAk oder Antikörperfragment sowie einem konjugierten Effektormolekül bestehen. Sie vereinen somit die Spezifität des mAk mit der Wirksamkeit eines konjugierten Effektormoleküls. Die Wirkmechanismen von Immunkonjugaten sind vielfältig und abhängig vom Antikörperanteil und den konjugierten Molekülen wie beispielsweise Radioisotope, Toxine oder Zytokine. Durch Radio-Immunkonjugate werden letale Dosen radioaktiver Strahlung lokal an Tumorzellen angereichert, was zur Zerstörung der DNS und letztendlich der Tumorzelle führt. Zwei radioaktiv markierte anti-CD20-Antikörper, das Radio-Immunkonjugat ^{90}Y -Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin[®]) und I^{131} -Tositumomab (Bexxar[®]), sind bereits für die Behandlung von Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) zugelassen [9].

Die Wirkungsweise von Immuntoxinen ähnelt den Radio-Immunkonjugaten, da auch hier die Tumorzellen gezielt gebunden und zerstört werden. Im Gegensatz zu Radio-Immunkonjugaten basiert die Wirkung jedoch darauf, dass das Immuntoxin nach Bindung an die Tumorzelle, internalisiert wird. In Lysosomen erfolgt dann die Abspaltung der Toxine vom Antikörperteil und die Freisetzung ins Zytoplasma, wodurch ein zytotoxischen Effekt eintritt. Schon 1908 sprach Ehrlich in seiner Nobelpreisrede von der Vision Antikörper mit Toxinen zu koppeln und als sogenannte „*magic bullets*“ zu verwenden. Es dauerte jedoch fast 100 Jahre bis das erste Immuntoxin, das Calicheamicin-Immuntoxin Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg[®]) für die Therapie von akuter myeloischer Leukämie (AML) bei Patienten mit CD33-positiven Tumorzellen zugelassen wurde [10]. Neben Calicheamicin werden auch Auristatin, Doxorubicin, Maytansinderivate und Pseudomonas exotoxin A als Effektormoleküle von Immuntoxinen verwendet [11].

Im Gegensatz zu Radio-Immunkonjugaten und Immuntoxinen haben Immunzytokine keinen direkten zytotoxischen Effekt auf maligne Zellen. Ihre Wirkung beruht darauf, dass ihre Bindung an Tumor-assoziierte Antigene zu einer lokalen Erhöhung der Zytokinkonzentration in unmittelbarer Umgebung des Tumors führt, wodurch das körpereigene Immunsystem in der Tumorumgebung stimuliert wird [12-14]. Bislang wurden sechs verschiedene Immunzytokine in klinischen Studien getestet [15], wobei vier davon Interleukin 2 (IL2) als Zytokinanteil aufweisen. IL2 ist ein monomeres,

sekretorisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 15kDa, das eine Vielzahl von stimulierenden Effekten auf T-, B- und Natürliche Killerzellen aufweist [16-18]. Als erstes IL2-Immunzytokin, wurde das anti-GD2-Gangliosid Hu14.18-IL2 in einer klinischen Phase I an Melanompatienten [19] und einer Phase I und II an Patienten mit Neuroblastomen [20] getestet. Das anti-EpCam Immunzytokin HuKS-IL2 wurde bislang in einer Phase I an Patienten mit Prostatakarzinomen [21] bzw. Lungenkarzinomen getestet. Das kürzlich in der Klinik zur Behandlung von NHL getestete anti-CD20 Immunzytokin DI-Leu16-IL2 sowie Hu14.18-IL2 und HuKS-IL2 binden an Antigene, welche auf der Oberfläche von Tumorzellen verstärkt exprimiert werden. Eine andere Strategie um IL2 in der Tumorumgebung anzureichern ist die Bindung von Immunzytokinen an Tumor-assoziierte Antigene, die sich in unmittelbarer Nähe des Tumors befinden. Mit dem Immunzytokin L19-IL2, welches bereits in einer klinischen Phase I zur Behandlung von soliden Tumoren erfolgreich getestet wurde und sich gegenwärtig in zwei klinischen Phasen II zur Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs und malignen Melanomen befindet, wird diese Strategie verfolgt [22].

1.3. Das Immunzytokin L19-IL2

Das Immunzytokin L19-IL2 besteht aus dem scFv Antikörperfragment L19, welches mit einem Linker aus 17 Aminosäuren mit dem Zytokin IL2 gekoppelt ist und als nicht-kovalent gebundenes Dimer aufgereinigt wird. Der humane scFv L19 ist spezifisch für die Extra Domäne B (EDB) von Fibronectin (FN) [23] (Abbildung 1-1). Fibronektine sind große zelladhäsive Glykoproteine in der Extrazellulären Matrix und sind unter anderem essentiell für die embryonale Entwicklung. Sie spielen außerdem eine Rolle bei der Anheftung, Wanderung, Ausdifferenzierung und Proliferation von Zellen sowie bei der Wundheilung. Bei EDB handelt es sich um eine zusätzliche Typ 3 homologe Domäne des Fibronektins aus 91 Aminosäuren, die durch alternatives Spleißen der FN prä-mRNA entsteht [24]. Diese Isoform des Fibronektins (B-Fibronectin) ist ein Marker für Angiogenese und häuft sich daher um neovaskuläre Strukturen in aggressiven Tumoren [25-27], die durch Angiogenese ein Blutgefäßsystem für ihre Nährstoffversorgung bilden. In gesunden Geweben findet Angiogenese nur während der Embryogenese statt. In normalen, adulten Gewebe ist B-Fibronectin daher mit Ausnahme der Wundheilung, dem Haarwuchs und des

weiblichen Zyklus nicht mehr nachweisbar. EDB stellt somit eine ideale Zielstruktur für therapeutische Antikörper da.

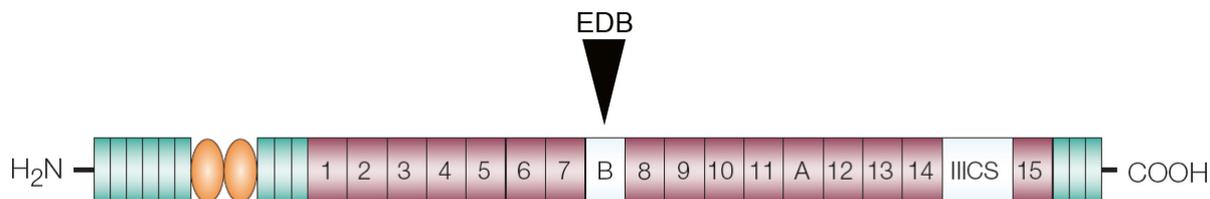


Abbildung 1-1: Struktur einer Untereinheit von menschlichem Fibronectin.

Dargestellt ist B-Fibronectin, eine Isoform des Glykoproteins Fibronectin (FN), die ausschließlich im Blutgefäßsystem von soliden Tumoren vorkommt. Durch alternatives Spleißen der FN prä-mRNA enthält sie eine zusätzliche Typ 3 homologe Domäne, die Extra Domäne B (EDB), an welche das Antikörperfragment L19 spezifisch bindet. Typ 1 Domänen: grün, Typ 2 Domänen: orange, Typ 3 Domänen: violett

Studien mit athymischen Nacktmäusen mit einem embryonalen Teratokarzinom (F8) zeigten, dass durch die Behandlung mit dem Immunzytokin L19-IL2, das Effektormolekül IL2 im Tumorgewebe angereichert wurde, was zu einer deutlichen Steigerung der IL2 vermittelten Effekte verglichen zu unkonjugiertem IL2 führte [28]. In den Tumoren der Versuchstiere wurde eine deutlich gesteigerte Akkumulation von CD8⁺ exprimierenden zytotoxischen T Lymphozyten und CD4⁺ exprimierenden T Lymphozyten beobachtet. Darüber hinaus führte die Behandlung mit L19-IL2 zu einer Rekrutierung von Makrophagen und Natürlichen Killerzellen ins Tumorgewebe von athymischen NMRI Nacktmäusen [29]. Diese Effekte führten zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgroße verglichen mit Tieren, die nur mit IL2 behandelt worden waren. Durch die L19 vermittelte lokale Akkumulation von IL2 wurden darüber hinaus toxische Nebenwirkungen von IL2 im Vergleich zur systemischen Administration deutlich reduziert.

1.4. Bestimmung der biologischen Aktivität von Immunzytokinen

An die Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit von biopharmazeutischen Arzneimitteln werden seitens der Zulassungsbehörden hohe Ansprüche gestellt. Von der pharmazeutischen Industrie müssen daher schon während der Entwicklung eines neuen Produktes eine Vielzahl von Qualitätstests etabliert werden, welche die Eigenschaften eines Arzneimittels genau charakterisieren. Eine der wichtigsten Eigenschaften ist dabei die biologische Aktivität eines Produktes, welche die

Fähigkeit beschreibt, einen bestimmten, biologischen Effekt hervorzurufen. Die biologische Aktivität wird in Aktivitätstests, so genannten *potency assays* ermittelt, die auf dem spezifischen, aktiven Prinzip eines Wirkstoffes beruhen und daher für jedes biopharmazeutische Arzneimittel produktspezifisch entwickelt werden müssen [30]. Ein tiefes Verständnis über die Wirkmechanismen eines Medikamentes ist daher unbedingte Voraussetzung für die Entwicklung eines aussagekräftigen Tests.

Da die biologische Aktivität von L19-IL2 auf der Funktionalität des Antikörperanteils L19 sowie des konjugierten Effektormoleküls IL2 basiert, ist es für die Charakterisierung und Bestimmung der biologischen Aktivität von L19-IL2 wichtig sowohl die Bindungseigenschaften von L19 als auch die IL2 vermittelte Stimulation von Effektorzellen zu untersuchen.

Die Fähigkeit von Antikörpern ihr Antigen spezifisch zu binden und die Affinität von Antikörpern zu ihrem Antigen wird gewöhnlich in Ligand-Bindungstests (*ligand binding assays*, LBA) bestimmt, wie etwa dem Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), dem Fluoroimmunoassay (FIA), dem Radioimmunoassay (RIA) oder mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz Technologien (SPR). Da diese Tests auf die Evaluation des Antikörperanteils eines Immunzytokins beschränkt sind, eignen sie sich nur eingeschränkt als Aktivitätstests für Immunzytokine, deren biologischen Effekte durch das konjugierte Zytokin vermittelt werden.

Die biologische Aktivität von Zytokinen wird in zellbasierten Aktivitätstests, den so genannten *bioassays* gemessen, wobei verschiedene Zytokin vermittelte Effekte bestimmt werden, wie zum Beispiel Stimulation der Zellproliferation, Induktion von Apoptose, antivirale Aktivität oder die Hochregulierung bestimmter Membranproteine [31]. Für die Bestimmung der biologischen Aktivität von IL2 wurden bereits verschiedene zellbasierte Tests beschrieben. In allen diesen Aktivitätstests wird eine IL2 abhängige Zellproliferation gemessen, wobei unter anderem die Zelllinien HAT-2 (murine T-Helferzelle) [32], Kit-225 (humane T-Zelle) [33], NKC3 (murine Natürliche Killerzelle) [34] oder oftmals CTLL-2 (murine T-Zelle) [35-37] verwendet werden.

Diese klassischen, zellbasierten Aktivitätstests eignen sich jedoch ebenfalls nur bedingt für die Bestimmung der biologischen Aktivität von Immunzytokinen, da sie auf die Analyse von IL2 beschränkt sind und nicht berücksichtigen, dass die Funktion des Immunzytokins ebenfalls von der Bindung des Antikörperanteils an sein Antigen

abhängt. Alle bestehenden Testformate für Zytokine differenzieren folglich nicht, ob die Zelleffekte von IL2 allein oder dem intakten Immunzytokin vermittelt werden und eignen sich daher nicht für eine Bestimmung der biologischen Aktivität des Immunzytokins L19-IL2. Um dieses Problem zu überwinden und die tatsächliche Aktivität von L19-IL2 zu messen, ist es daher notwendig einen Test zu entwickeln, der die Bifunktionalität des Immunzytokins berücksichtigt.

1.5. Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Bestimmung der biologischen Aktivität des Immunzytokins L19-IL2 anhand bestehender und neuer Methoden.

Dabei sollte ein neuer zellbasierter L19-IL2 Bioaktivitätstest entwickelt werden, der gleichzeitig die Bindung von L19 an sein Antigen sowie die IL2 abhängige Stimulation der Zellproliferation misst. Im Rahmen der Validierung des neuen Tests sollte überprüft werden, ob er allen Anforderungen genügt, die seitens der Arzneimittelzulassungsbehörden gestellt werden.

Darüber hinaus sollte das neue Testformat mit bestehenden, klassischen IL2 Bioaktivitätstests verglichen werden, um zu untersuchen, ob sich hinsichtlich der Aktivität des L19-IL2 Gesamtproteins funktionelle Unterschiede in Abhängigkeit des Testformats ergeben.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

Das Immunzytokin L19-IL2 besteht zum einen aus dem scFv L19, der spezifisch für die EDB Domäne von Fibronectin ist und zum anderen aus humanem IL2. Für alle Experimente wurde ein hauseigener L19-IL2 Standard verwendet, der von Philogen S.p.A. (Siena, Italien) hergestellt wurde. Für alle IL2 Bioaktivitätstests (2.3.2) wurden der internationale Standard für humanes IL2 (code: 86/564, NIBSC, Potters Bar, UK) und humanes IL2 von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA, Kat. 202-IL) verwendet. Zum Nachweis der Spezifität des L19-IL2 Bioaktivitätstests (2.3.3.1) und in Kompetitiven Experimenten (2.3.4, 2.4) wurden L19-SIP und AP39 verwendet. L19-SIP ist ein Dimer eines L19 scFvs mit C-terminaler fusionierter CH4 Domäne eines humanen IgE Antikörpers [38,39]. Der scFv AP39 ist ein leicht modifiziertes Derivat des L19-IL2 scFvs L19, welches am C-terminalen Ende eine (Gly)₃-Cys-Ala Sequenz enthält [40]. Sowohl L19-SIP als auch AP39 binden wie L19-IL2 spezifisch an EDB. Für alle scFv Konstrukte wurde 7B89 als Antigen verwendet. Dieses enthält EDB und die angrenzenden Domänen 7, 8 und 9 und wurde im *E. coli* Stamm M15 exprimiert (vergleiche Abbildung 1-1). Die Aufreinigung des 7B89 Proteins aus Zelllysaten erfolgte über den C-terminalen hexahistidine tag mittels stillgestellter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC). Die anschließende Biotinylierung von 7B89 erfolgte nach Herstellerangaben mit biotin- ϵ Aminokapron Ester (La Roche AG, Basel, Schweiz).

2.2. Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)

2.2.1. Immobilisierung von 7B89

Zunächst wurde 7B89 in Acetatpuffer (10 nM, pH4, GE Healthcare, Kat. BR-1003-49) auf 3,78 μ g/ml verdünnt und auf der Oberfläche einer Flusszelle eines Series S CM5 Sensor Chips (GE Healthcare, Kat. BR-1005-30) mit Hilfe eines Amine Coupling Kits (GE Healthcare, Kat. BR-1000-50) immobilisiert. Die Injektion von 7B89 für 45 s mit einer Flussrate von 10 μ l/min führte zur Immobilisierung von 205 Response Units (RU) 7B89. Zusätzlich wurde die Oberfläche einer weiteren Flusszelle des Chips als Negativkontrolle inaktiviert.

2.2.2. Bestimmung der Avidität von L19-IL2

Durch serielle 1:3 Verdünnung in HBS Laufpuffer (GE Healthcare, Kat. BR-1006-69) wurden zwei unabhängige L19-IL2 Konzentrationsreihen zwischen 0,005 nM und 90 nM hergestellt. Zur Durchführung des Experiments wurde der Kinetik-Wizard der Steuerungssoftware des Biacore T100 folgendermaßen angepasst: Nach vier Start-Zyklen mit Laufpuffer, folgten zwei Injektionen mit Laufpuffer als Negativkontrolle (*blank*). Anschließend wurden, beginnend mit der höchsten Verdünnung, die L19-IL2 Duplikate für 180 s mit einer Flussrate von 30 µl/min injiziert und für die Dissoziation 60 min mit Laufpuffer bei gleicher Flussrate gespült. Zwischen jedem Injektionszyklus wurde die Chipoberfläche mit Glycine-HCL (10 nM, pH2, GE Healthcare, Kat. BR-1003-55) regeneriert, wobei die Kontaktzeit 60s, die Flussrate 30 µl/min und die Stabilitätszeit 10 s betrug. Die Avidität von L19-IL2 wurde dann mit Hilfe der T100 Evaluation Software bestimmt.

2.3. Zellbasierte Tests

2.3.1. Zellen und Zellkultur

Für alle zellbasierten Tests wurde die IL2 abhängige, zytotoxische T-Zelllinie CTLL-2 von ATCC verwendet.

Die Zellen wurden in Vollmedium kultiviert, bestehend aus RPMI 1640 + L-Glutamine-NaHCO₃ (GIBCO, Grand Island, NY, USA), angereichert mit L-Glutamine (2 nM, GIBCO, Grand Island, NY, USA), Natriumpyruvate (2 nM, GIBCO, Grand Island, NY, USA), Natriumbicarbonate (0.15 %, GIBCO, Grand Island, NY, USA), HEPES (pH 7.4, 10 nM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und D-Glucose (0.25 %, GIBCO, Grand Island, NY, USA). Das Medium wurde auf eine Endkonzentration von 10 % fötalem Rinderserum (Hyclone, Logan, UT, USA) und 4 ng/ml IL2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) eingestellt. Die Zellen wurden bei einer Dichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml bis $1,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml in T-25 Flaschen (Corning, NY, USA) ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dreimal in der Woche wurden die Zellen bei einer Dichte von ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml passagiert.

2.3.2. IL2 Bioaktivitätstest

Die Durchführung des Tests erfolgte in einer 96-Loch Mikrotiterplatte, wobei die Randkavitäten zur Vermeidung von Randeffekten ausgespart und stattdessen mit 150 µl PBS gefüllt. Das verwendete Vollmedium enthielt kein IL2.

Zunächst wurde die Stammlösung des internationalen Standards für humanes IL2 (code: 86/564, NIBSC, Potters Bar, UK) mit Vollmedium auf 1000 pM verdünnt. Die Stammlösung des IL2 Standards (R&D Systems, Kat. 202-IL) wurde auf eine finale Konzentration von 1200 pM verdünnt und die Stammlösung des L19-IL2 Standards wurde auf 1600 pM verdünnt. Anschließend wurden alle drei Lösungen siebenmal 1:2 und einmal 1:6 verdünnt, um jeweils eine Verdünnungsreihe mit neun Konzentrationen zu erhalten. Je 50 µl jeder Konzentration wurde in Duplikaten auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Costar; Kat. 3595) überführt. Als Negativkontrolle (*blank*) dienten drei Kavitäten, die nur Vollmedium ohne eine L19-IL2 Verdünnung enthielten. Die CTLL-2 Zellen wurden dreimal in Vollmedium gewaschen und auf eine Zellzahl von $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml bis $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 50 µl dieser Zellsuspension in jede Kavität gegeben, die Platte wurde vorsichtig geschüttelt und anschließend im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ für 20 h inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl CellTiter 96[®] Aqueous One Solution (Promega, Madison, USA) in jede Kavität wurde die Platte vorsichtig geschüttelt und für weitere 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Platte intensiv geschüttelt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem Multispektrometer KC4 Power Wave X Select (BIO-TEK Instruments Inc, Winooski, VT, USA) gemessen. Zur weiteren Analyse wurden die Messwerte in Microsoft Excel 2003 und PLA 2.0 (Stegmann Systems GmbH, Rodgau, Germany) übertragen.

2.3.3. L19-IL2 Bioaktivitätstest

Der L19-IL2 Bioaktivitätstest wurde in einer 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt. Um Randeffekte zu vermeiden, wurden nur die inneren 60 Kavitäten der Platte verwendet und die Randkavitäten mit 150 µl PBS gefüllt. Zunächst wurde das biotinylierte Antigen 7B89 mit PBS; 0,05 % Tween 20 (PBST) auf eine Konzentration von 1000 ng/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden 50 µl in jede Bohrung einer Streptavidin-beschichteten 96-Loch Mikrotiterplatte (Immobilizer F96 Micro Well Plate, Nunc, Langenselbold, Germany) überführt. Der L19-IL2 Standard wurde

ebenfalls in PBST verdünnt, um eine Standardreihe mit neun Standardkonzentrationen zu erhalten. Dafür wurde eine L19-IL2 Arbeitslösung mit einer Konzentration von 170 ng/ml (2000 pM) hergestellt, welche seriell, siebenmal 1:2 und anschließend 1:6 verdünnt wurde. Von jeder der neun Standardkonzentrationen wurden 50 µl in Duplikaten auf die Platte überführt und gemeinsam mit der 7B89 Verdünnung für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler (900 rpm) inkubiert. Als Negativkontrolle (*blank*) dienten drei Kavitäten, die nur 7B89, jedoch kein L19-IL2 enthielten. Während dieser Zeit wurden die CTLL-2 Zellen dreimal in Vollmedium ohne IL2 gewaschen und auf eine Zellzahl von $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml bis $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Nach der Inkubationszeit von zwei Stunden wurde die Platte je zweimal mit 280 µl PBST und Vollmedium ohne IL2 gewaschen. Anschließend wurden 50 µl Vollmedium ohne IL2 und ebenfalls 50 µl Zellsuspension in jede Kavität pipettiert und vorsichtig gemischt. Dies führte zu einer finalen Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ Zellen/Kavität bis $4 \cdot 10^4$ Zellen/Kavität. Als Positivkontrolle für die maximale Proliferation der Indikatorzellen dienten drei Kavitäten, die neben den 50 µl Zellsuspension noch 50 µl Vollmedium mit 8 ng/ml IL2 enthielten. Die Platte wurde für 20 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden 20 µl CellTiter 96[®] AQueous One Solution (Promega, Madison, USA) in jede Kavität gegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Um die Zellen und die Reaktionslösung in den Kavitäten gleichmäßig zu verteilen, wurde die Platte unmittelbar vor der Messung intensiv geschüttelt. Die Absorption wurde dann bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem Multispektrometer KC4 Power Wave X Select (BIO-TEK Instruments Inc, Winooski, VT, USA) gemessen und die Messwerte zur weiteren Analyse in Microsoft Excel 2003 und PLA 2.0 (Stegmann Systems GmbH, Rodgau, Germany) übertragen.

2.3.3.1. Spezifität des L19-IL2 Bioaktivitätstests

Im Test wurden neben L19-IL2 und unkonjugiertem IL2 die L19 Derivate L19-SIP und AP39 untersucht, welche im Gegensatz zu L19-IL2 kein konjugiertes IL2 aufweisen. Alle Proteine wurden in PBST auf 4000 pM verdünnt und entsprechend des L19-IL2 Bioaktivitätstest Protokolls (2.3.3) in sechs Replikaten auf einer Platte analysiert. Die Messwerte der Ansätze, die nur unkonjugiertes IL2, L19-SIP oder AP39 enthielten, wurden ebenso wie die Negativkontrolle (*blank*) mit den Messwerten von L19-IL2 mit einem t-Test auf signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) untersucht.

2.3.4. Kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest

Eine Streptavidin-beschichtete Platte wurde entsprechend des L19-IL2 Bioaktivitätstest Protokolls (2.3.3) mit 7B89 beschichtet und mit L19-IL2 Standardverdünnungen inkubiert. Nach dem sich anschließenden Waschschritt wurden 50 µl Medium mit 500 µg/ml AP39 hinzugefügt. Als Positivkontrollen dienten jeweils zwei Kavitäten, die entweder 50 µl Medium mit 8 ng/ml IL2 oder 8 ng/ml IL2 und 500 µg/ml AP39 enthielten. Als Negativkontrollen (*blank*) dienten zwei Kavitäten, die nur 7B89 oder 7B89 und 500 µg/ml AP39 enthielten. Die Platte wurde für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert und anschließend, wie unter 2.3.3 beschrieben, mit Zellen inkubiert und entwickelt.

2.3.5. Kombination des IL2 Bioaktivitätstests mit dem L19-IL2 Bioaktivitätstest

Eine Hälfte einer Streptavidin-beschichteten Platte wurde entsprechend des unter 2.3.3 beschriebenen Protokolls mit 7B89 beschichtet und mit verschiedenen L19-IL2 Verdünnungen in PBST für 2 h inkubiert bevor die Platte gewaschen wurde. Die zweite Plattenhälfte wurde mit L19-IL2 Verdünnungen in Medium, wie unter 2.3.2 beschrieben, inkubiert. Die Zugabe der Zellen und die Entwicklung mit CellTiter 96[®] AQueous One Solution entsprach den bereits beschriebenen Protokollen (2.3.2, 2.3.3).

2.3.6. Datenanalyse und Bestimmung der relativen Aktivität

Die Rohdaten aller zellbasierter Tests wurden zur weiteren Analyse in Excel 2003 (Microsoft) und PLA 2.0 (Stegmann Systems GmbH, Rodgau, Deutschland) übertragen. Zur Bestimmung des besten Modells für eine Ausgleichskurve durch die Messwerte der neun L19-IL2 Standardkonzentrationen wurden die Absorptionen mit einem vier Parameter logistischen Modell (4 PL) und einem fünf Parameter logistischen Modell (5 PL) vergleichend evaluiert.

Die relative Aktivität wurde immer zwischen einem Standard und einer Probe ermittelt, die beide je nach Test variieren konnten. Dazu wurden die Dosis-Wirkungskurven der Standard- und Probenverdünnungsreihen mit einem 5 PL gefittet

und anschließend in PLA 2.0 einer „*parallel-curve-analysis*“ unterzogen. Das Ergebnis wurde nur dann akzeptiert, wenn die errechneten p-Werte für verschiedene Varianzanalyse (F-Tests) folgende Kriterien erfüllte: Test auf Steigung ($p < 0,02$), Test auf nicht- Linearität ($p > 0,02$) und Test auf nicht- Parallelität ($p > 0,02$).

2.4. Kompetitiver L19-IL2 time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA)

Biotinyliertes Antigen 7B89 wurde in Delfia Assaypuffer (Perkin Elmer, Kat. 4002-0010) auf 1000 ng/ml verdünnt und anschließend 50 µl dieser Lösung auf eine Streptavidin-beschichteten 96-Loch Mikrotiterplatte (Delfia Streptavidin Microtitration Strips, Perkin Elmer, Kat. 4009-0010) übertragen. Die Platte wurde bei 600 rpm für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert und danach mit Hilfe eines Delfia Plattenwascher (Perkin Elmer, Kat. 1296-026) dreimal mit 200 µl Delfia Waschlösung (Perkin Elmer, Kat. 4010-0010) gewaschen. L19-IL2 Standard wurde mit Assaypuffer auf 10 ng/ml und 170 ng/ml verdünnt. Von jeder der beiden Konzentrationen wurden 50 µl in die Kavitäten jeweils einer Plattenhälfte überführt, für 90 min auf dem Wippschüttler (600 rpm) inkubiert und anschließend dreimal mit 200 µl Delfia Waschlösung gewaschen. AP39 wurde in einem ersten Verdünnungsschritt mit Vollmedium oder Assaypuffer auf 900 ng/ml verdünnt und anschließend 10 mal 1:6 verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 50 µl in drei bis vier Replikaten auf die Platte übertragen. Als Positivkontrolle dienten Ansätze, die neben 7B89 nur L19-IL2 und kein AP39 enthielten. Die Negativkontrolle enthielten entweder nur 7B89 oder 7B89 und AP39. Die Platte wurde für 120 min bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend erneut dreimal mit 200 µl Delfia Waschlösung gewaschen. Ein mit Europium (Eu) markierter anti-IL2 monoklonaler Antikörper (Perkin Elmer, Kat. 202) wurde auf 8 µg/ml verdünnt und 50 µl dieser Verdünnung in jede Kavität gegeben und für 120 min bei 450 rpm und Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 200 µl Delfia Enhancement Lösung (Perkin Elmer, Kat. 4001-0010) mit einem Delfia Plate Dispenser (Perkin Elmer, Kat. 1296-041) in jede Kavität abgegeben und die Platte nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 min auf einem Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Kat. 1420-012) im Programm

Europium gemessen. Zur weiteren Analyse wurden die Messwerte in SigmaPlot 8.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) übertragen.

2.5. Herstellen von Zelllysaten und Gesamtproteinbestimmung

Der verwendete Lysepuffer bestand aus 10 ml M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo, Kat. 78501), einer Tablette Complete Mini Proteinase Inhibitor (Roche, Kat. 11836170001) und jeweils 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma Aldrich, Kat P5726 und P2850). Pro Versuchsansatz wurden $1 \cdot 10^6$ behandelte Zellen aus den Kavitäten einer 96-Loch Mikrotiterplatte in 2 ml Eppendorf Reagenzgefäße überführt, mit 10000 rpm für 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet mit 150 µl Lysepuffer versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gesamtproteinbestimmung der Proben nach Lowry. Hierzu wurde ein Albumin Standard (Thermo Fischer, Kat. 23209) seriell 1:2 mit DPBS (Gibco, Kat. 14190) auf 2 mg/ml bis 0,125 mg/ml verdünnt und auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Costar, Kat. 3370) in Duplikaten aufgetragen. Die Probenaufarbeitung der Zelllysate erfolgte unter Verwendung des DC Protein Assay Kits (Bio-Rad, Kat. 500-0112) nach dem Mikrotiterplatten Assayprotokoll des Herstellers. Für die Messung der Farbreaktion wurde ein SpectraMax[®] Multi-Mode Microplate Readers (Methode: Lowry, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verwendet.

2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

Zelllysate für die Western-Blots wurden mit NuPAGE LDS Sample Buffer (4x, Invitrogen, Kat. NP0007), Sample Reducing Agent (10x, Invitrogen, Kat. NP0009) und deionisiertem Wasser auf einen Proteingehalt von 16 µg pro 30 µl Probe verdünnt. Je 25 µl Probe wurden mit Hilfe eines 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen, Kat. NP0321) aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 µl Mark 12 (Invitrogen, Kat. LC6060) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit einer mini XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Kat. EI0001) und Mops SDS Laufpuffer (Invitrogen, Kat. NP0001) für 60-120 min mit 140 V , 45 mA, 6 W.

Die Proteine wurden mit Hilfe eines X-Cell Blot Moduls (Invitrogen, Kat. EI0002), einer mini XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Kat. EI0001) unter Verwendung eines Transferpuffers (Invitrogen, Kat. NP0006-1) nach Herstellerangaben auf eine Invitrolon 0,45 µm PVDF Membran (Invitrogen, Kat. LC2005) transferiert. Der Transfer erfolgte in 1 h bei 35 Volt, 377 mA, 13 Watt.

Die Membran wurde zusammengerollt, in ein verschließbares 50 ml Reagenzgefäß (Falcon) überführt und anschließend mit 10 ml TBS (Fluka, Kat. 93312) 0,05 % Tween 20 (Fluka 93773) (TBST) gewaschen und danach für 5 min mit 10 ml Blockierungspuffer (TBST, 10 % Milchpulver (Fluka, Kat. 70166)) inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des primären Antikörpers hinzugegeben und über Nacht auf einem Rollschüttler inkubiert. Als Primärantikörper wurden ein anti-STAT5 (Cell Signaling, Kat. 9358), ein anti-Phospho-STAT5 (Cell Signaling, Kat. 9314) oder ein anti-GAPDH (Cell Signaling, Kat. 2118) Antikörper verwendet. Danach wurde die Membran zweimal mit je 10 ml TBST gewaschen und erneut für 10 min mit Blockierungspuffer inkubiert. Daraufhin wurden 2 µl des sekundären Antikörpers (anti-rabbit IgG, HRP-linked, Cell Signaling, Kat. 7074) zugefügt, für 1 h auf dem Rollschüttler bei RT inkubiert und die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Die mit Antikörpern inkubierte Membran wurde in eine Folientasche gelegt und für 2 min mit PS3 Solution (Lumigen, Kat PS3-100) benetzt. Die anschließende Belichtung des Films (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Kat. 28-9068-36) erfolgte in der Dunkelkammer in einer Hypercassette (18x24cm, Amersham Biosciences, Kat. RPN 13642). Zur Entwicklung und Fixierung des Films wurde ein automatischer Entwickler (Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgium) mit entsprechender Entwickler- (Agfa, Kat G153A und G135B) und Fixierlösung (Agfa, Kat. G354) verwendet.

Um mehrere Proteine auf einer Membran nacheinander anfärben zu können, mussten zunächst die alten Antikörper der vorherigen Detektion entfernt werden. Hierzu wurde die Membran in einem 50 ml Reagenzgefäß für 15 min mit 10 ml Re-BlotPlus Strong Solution (Milipore, Kat. 2504) inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Das erneute Anfärben und Entwickeln erfolgte dann wieder nach dem Standardprotokoll.

2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Coomassifärbung von L19-IL2 Stabilitätsproben

L19-IL2 Standard wurde aufgetaut und für fünf bis sechs Monate bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Von jeder Probe wurden 13 µl entnommen und mit jeweils 5 µl NuPAGE LDS Sample Buffer (4x, Invitrogen, Kat. NP0007) und 2 µl Sample Reducing Agent (10x, Invitrogen, Kat. NP0009) verdünnt. Jede Tasche eines 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen, Kat. NP0322) wurde mit 8 µl Probe bzw. 10 µl Mark 12 (Invitrogen, Kat. LC6060) befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Verwendung von MES SDS Laufpuffer (Invitrogen, Kat. NP0005) in 60 min mit 120 V, 120 mA, 25 W. Die Gele wurden anschließend mit Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, Kat. LC6060) gefärbt und mit einer GelDoc Universal Hood 2 (Bio-Rad, Segrate, Italien) fotografiert.

2.8. Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

2.8.1. Vorbereitung der Mikrotiterplatte

Eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Greiner bio-one, Kat. 655090) wurde vor dem Versuch mit Poly-L-Lysine (Sigma; Kat. P4707) beschichtet. Dazu wurde Poly-L-Lysine mit PBS (Gibco, Kat. 21600-051) auf 0,005 % verdünnt und jede Kavität mit 40 µl für 120 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Platte zweimal mit 100 µl PBS gewaschen und für 60 min getrocknet. Anschließend wurde die Platte mit Streptavidin (Fluka; Kat. 85878) beschichtet. Hierzu wurde Streptavidin auf 10 µg/ml mit PBS verdünnt, die entsprechenden Kavitäten mit 100 µl für 12 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und die Platte abschließend viermal mit PBS gewaschen.

2.8.2. Methode zur Untersuchung der Internalisierung von L19-IL2

Beim Internalisierungstest handelt es sich um eine Kombination aus dem IL2 Bioaktivitätstest und dem L19-IL2 Bioaktivitätstest (2.3.5). In Hinblick auf die Vorbereitung der Platten und der Zellen entsprach das Protokoll weitestgehend dem IL2 Bioaktivitätstest (2.3.2) und dem L19-IL2 Bioaktivitätstest (2.3.3). Abweichend von den Protokollen wurden die Zellen nach dem Waschen auf $1-2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Medium ohne IL2 verdünnt, für 2 h im Brutschrank inkubiert, anschließend auf $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Medium ohne IL2 verdünnt und für mindestens 20 min auf Eis

gestellt. Darüber hinaus wurde nur eine Verdünnung von 4 nM L19-IL2 im Versuch eingesetzt.

Nachdem eine Plattenhälfte mit 7B89 und L19-IL2 (L19-IL2 Bioaktivitätstest) und die andere Hälfte mit L19-IL2 (IL2 Bioaktivitätstest) behandelt worden war, wurde die Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 170 min, 180 min wurden 50 µl Zellsuspension in die jeweilige Kavität gegeben und die Platte weiterhin im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze, die kein L19-IL2 enthielten. In diese Kavitäten wurden Zellen nach 120 min hinzugefügt und für die folgenden 60 min inkubiert. Nach Zugabe der letzten Zellen (t=180 min) wurde die Platte bei 1000 rpm (200 g) und 4 °C abzentrifugiert. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte für 60 min durch die Zugabe von 100 µl auf Raumtemperatur (RT) temperiertem Paraformaldehyd (Sigma, Kat. P6148) in jede Kavität. Abschließend wurde die Platte zweimal mit je 100 µl PBS pro Kavität gewaschen. Dieser und jeder weitere Waschschrift wurden besonders behutsam mit einer automatischen 12-Kanal Pipette (Matrix Technologies, Kat. 6014) durchgeführt, um ein unbeabsichtigtes Absaugen der Zellen zu vermeiden. Falls sich die Färbung nicht unmittelbar anschloss, wurde jede Kavität mit 100 µl PBS überschichtet und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.8.3. Färbung

Zunächst wurden die Zellen mit 100 µl Permeabilisierungspuffer (PBS / 0,5 % TritonX-100) überschichtet und für 10min bei RT inkubiert. Nach dem Absaugen des Permeabilisierungspuffers wurde 100 µl Blockierungspuffer (PBS / 0,5 % Triton X-100 / 1 % BSA) in jede Kavität gegeben, für 20 min inkubiert und anschließend ebenfalls abgesaugt. Danach wurden in jede Kavität jeweils 100 µl eines FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markierten anti-IL2 Antikörpers (Sigma, Kat. F5900) und eines Phycoerythrin (PE) markierten anti-IL2- α -Rezeptor Antikörpers (Santa Cruz, Kat. sc-18872 PE) hinzugefügt, die zuvor 1:50 in Blockierungspuffer (PBS / 0,5 % Triton X-100 / 1 % BSA) verdünnt worden waren. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei RT im Dunkeln folgten zwei behutsame Waschschriffe mit je 100 µl PBS. Für die Kernfärbung wurde Hoechst 33342 (Invitrogen, Kat. H1399) in PBS auf 4µg/ml verdünnt und jede Kavität mit 100 µl dieser Lösung für 20min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Platte einmal mit PBS gewaschen und mit 50 µl PBS überschichtet.

2.8.4. Mikroskopische Analyse und Auswertung

Von jeder Kavität wurden mit einem hochdurchsatzfähigem konfokalem Laserscanmikroskop (Opera System, PerkinElmer; Caliper Life Sciences, Hopkinton, USA) mit einem 40iger Wasserobjektiv für jeden Farbkanal (FITC, PE, Hoe) 12 mikroskopischen Aufnahmen gemacht und anschließend mit der MetaXpress-Software (Molecular Devices, Downingtown, USA) analysiert und ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Avidität von L19-IL2

Für die Wirkung des Immunzytokin L19-IL2, welches als Dimer aufgereinigt wird, ist die Bindung an sein Antigen 7B89 essentiell. In der Literatur wurde aber bisher nur die Affinität des scFv L19 berichtet. Deshalb wurde die Avidität von L19-IL2 zu 7B89 mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Technologie bestimmt, womit Protein-Proteininteraktionen gemessen werden können. Die Messungen wurden dabei auf einem Biacore T100 durchgeführt.

Bei der Analyse wurden zwei Flusszellen eines CM5 Chips verwendet. Auf der Oberfläche der ersten als Messzelle verwendeten Flusszelle wurde das Antigen 7B89 immobilisiert, während die zweite als Referenzflusszelle diente und dafür lediglich durch die Reaktion mit EDC/NHS und Ethanolamin inaktiviert wurde. Nach Immobilisierung des Antigens 7B89 bzw. Inaktivierung der Referenzflusszelle wurden 205 RU für die Messzelle und 170 RU für die Referenzzelle gemessen. Die daraus resultierende Differenz von 35 RU konnte damit dem immobilisierten 7B89 zugeordnet werden und entsprach einer Proteinmenge von 35 pg/mm^2 . Für eine genaue Aviditätsbestimmung ist es sehr wichtig nur eine geringe Menge Protein (max. 100 RU) zu koppeln. Daher waren mit 35RU gute Voraussetzungen für die anschließenden Untersuchungen geschaffen.

Insgesamt sieben L19-IL2 Konzentrationen im Bereich von 0,1 nM bis 90 nM wurden sukzessive jeweils zweimal injiziert. Mit andauernder Injektionszeit wurde für alle Konzentrationen ein Ansteigen der Signale beobachtet, da immer mehr L19-IL2 an 7B89 band. Ein Plateau, das den Gleichgewichtszustand während der Injektionsphase kennzeichnet, in dem eine konstante Menge L19-IL2 an 7B89 gebunden hat, wurde in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Injektion erreicht. Für Konzentrationen von 90 nM L19-IL2 wurde dieser Zustand bereits nach 20 s erreicht, wohingegen mit Konzentrationen unter 3,3 nM L19-IL2 innerhalb der Injektionszeit von 180 s das Plateau nur annähernd erreicht wurde. Darüber hinaus stiegen die Messwerte im Gleichgewicht der Bindung mit zunehmender Konzentration L19-IL2 an (Abbildung 3-1A). Im Anschluss an diese Assoziationsphase wurde in jedem Injektionszyklus mit Laufpuffer gespült, was zum Abfall der Signale aufgrund der Dissoziation von L19-IL2 von 7B89 führte.

Zur Bestimmung der Avidität des L19-IL2 Dimers wurden die Messwerte kurz vor Ende der Injektionszeit im Gleichgewicht der Bindung (siehe Kreuze in Abbildung 3-1A) gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe der geräteeigenen Auswertesoftware wurde eine Ausgleichskurve durch diese Messwerte gelegt und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) berechnet (Abbildung 3-1B). Der ermittelte K_D -Wert für die bivalente Bindung zwischen dem L19-IL2 Dimer und 7B89 betrug $3,25 \cdot 10^{-9} \text{M}$.

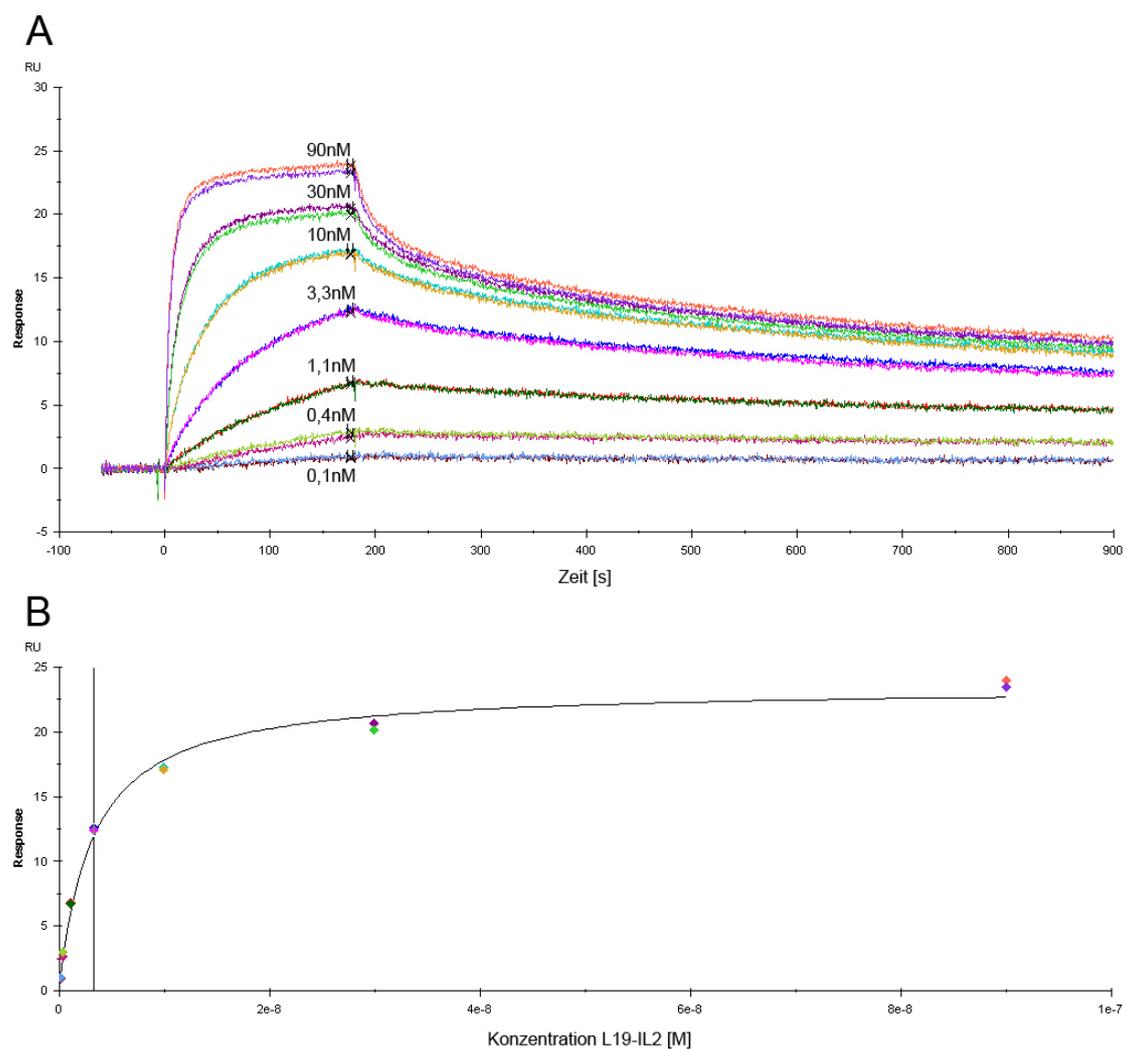


Abbildung 3-1: Avidität von L19-IL2.

Die Avidität des L19-IL2 Dimers wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) auf einem Biacore T100 mit einem 7B89 beschichteten CM5 Chip bestimmt. Dabei wurden L19-IL2 Konzentrationen von 0,1 nM bis 90 nM in Duplikaten nacheinander in die Flusszelle des beschichteten Chips injiziert, was zur Bindung des scFv L19 an sein Antigen 7B89 führte. Anschließend wurde Laufpuffer injiziert, was zur Dissoziation von L19-IL2 führte. (A) Assoziations- und Dissoziationsprofile des Immuncytokins L19-IL2. Die Kreuze markieren den Bereich in dem ein annäherndes Gleichgewicht an gebundenem L19-IL2 erreicht wurde. (B) Messwerte aus dem Gleichgewicht wurden gegen die entsprechende Konzentration des L19-IL2 Dimers aufgetragen. Anhand der resultierenden Dosis-Wirkungskurve wurde die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) berechnet.

3.2. Bioaktivität von IL2 und L19-IL2 im IL2 Bioaktivitätstest

Um einen eigenen IL2 Standard für weitere Versuche zu etablieren, wurden mehrere zellbasierte Tests durchgeführt, in denen die Aktivität von IL2 (R&D Systems) vergleichend zu dem internationalen IL2 Standard (*National Institute for Biological Standards and Control*; (NIBSC)) analysiert wurde. Im IL2 Bioaktivitätstest (2.3.2) wurden CTLL-2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen IL2 von 1-800 pM beider Hersteller für 20 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4h mit dem Farbstoff CellTiter 96[®] AQueous One Solution versetzt, der nur von lebenden Zellen umgesetzt werden kann und sich dabei von gelb nach braun verfärbt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte dann durch eine Absorptionsmessung bei 490 nm.

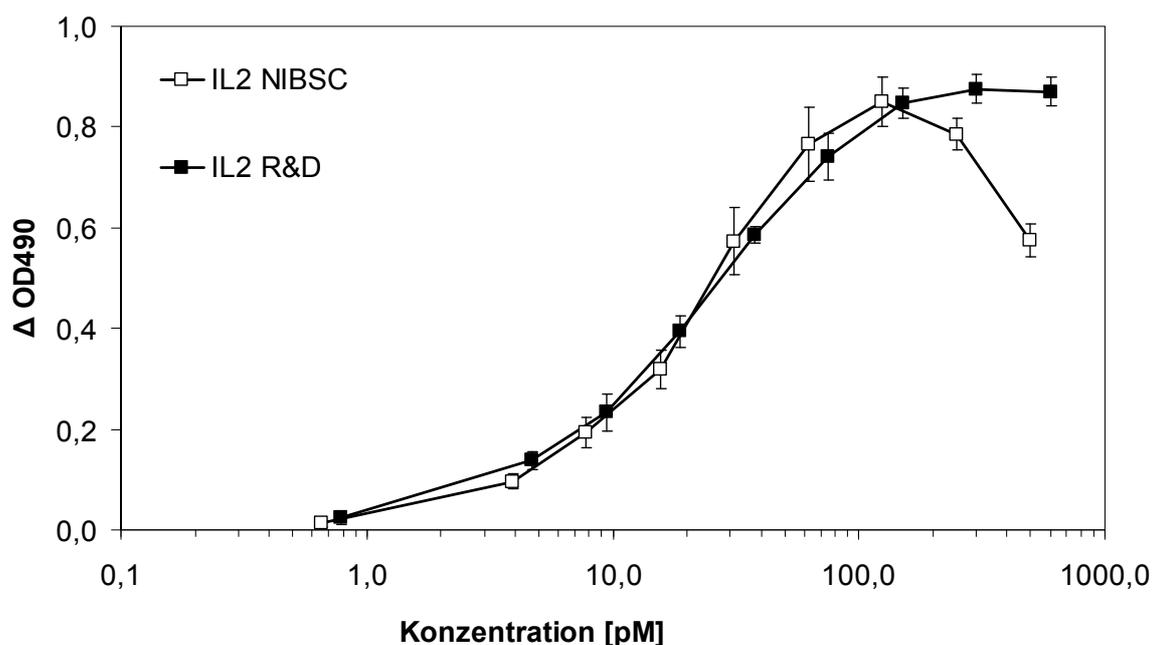


Abbildung 3-2: IL2 Bioaktivitätstest mit IL2 verschiedener Hersteller.

Die IL2 abhängige Zelllinie CTLL-2 wurde mit verschiedenen Konzentrationen IL2 des NIBSC (□) und von R&D Systems (■) versetzt. Nach insgesamt 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %CO₂ wurde dann die Lebendzellzahl bestimmt. Die resultierenden Dosis-Wirkungskurven verliefen im Konzentrationsbereich von 0,6 pM bis 120 pM annähernd deckungsgleich, was auf die gleiche biologische Aktivität beider Substanzen schließen lässt. Im Konzentrationsbereich über 120 pM zeigte die Dosis-Wirkungskurve des IL2 Standards vom NIBSC im Gegensatz zu IL2 von R&D jedoch einen deutlichen „Haken-Effekt“. Dargestellt sind repräsentative Kurven aus einem von insgesamt drei unabhängigen Versuchen. Die Messwerte (Δ OD490) repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus einem Versuch.

Für IL2 von R&D Systems ergab sich eine sigmoide Dosis-Wirkungskurve mit einer linearen Steigung im Konzentrationsbereich von 10-120 pM (Abbildung 3-2). Die IL2 Standardkurve von NIBSC zeigte ebenfalls einen annähernd sigmoiden Verlauf. Im Gegensatz zu dem IL2 von R&D zeigte sie jedoch im Konzentrationsbereich von über 120 pM einen deutlichen „Hakeneffekt“ (*hook effect*) mit abnehmenden Messwerten (Abbildung 3-2). Die verminderte Zellviabilität bei diesen Konzentrationen ist vermutlich auf die hohe Konzentration von Hilfsstoffen im Formulierungspuffer des NIBSC zurückzuführen, der für eine 1 nM IL2 Lösung, 2,5 mg Trehalose und 5 mg HSA enthält. Abgesehen von dem höheren Konzentrationsbereich verliefen die beiden Kurven annähernd deckungsgleich, was auf eine identische biologische Aktivität der eingesetzten Substanzen schließen lässt, daher wurde für alle folgenden Versuche IL2 von R&D Systems als IL2 Standard verwendet.

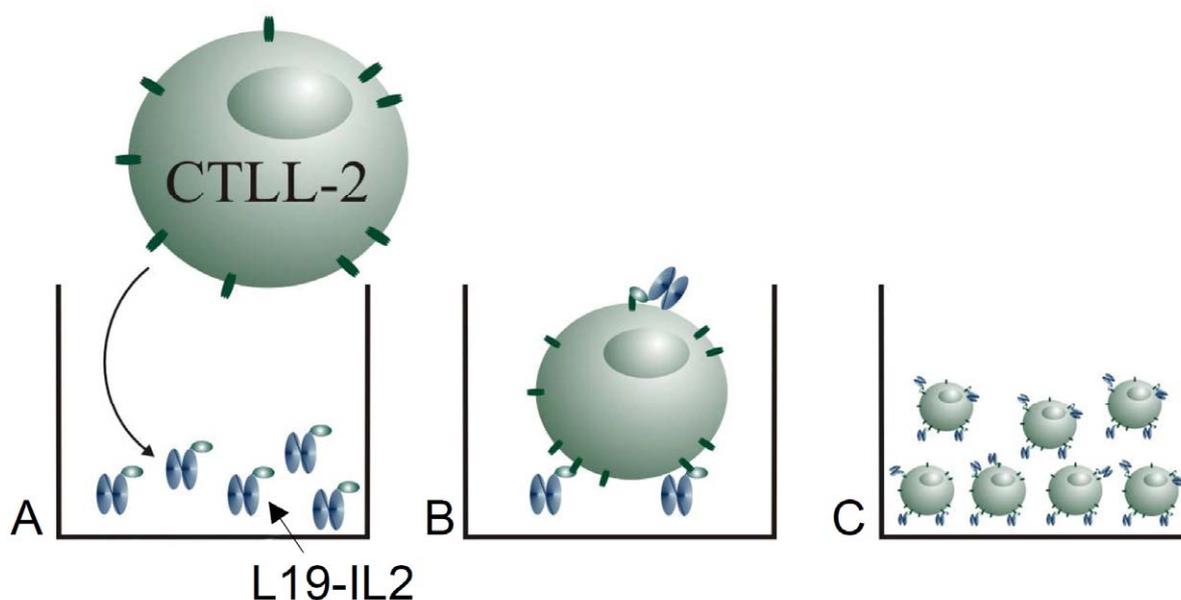


Abbildung 3-3: Format des IL2 Bioaktivitätstests.

Der Test bestand aus drei Schritten. (A) IL2 abhängige CTLL-2 Zellen wurden zu freiem L19-IL2 oder IL2 hinzugefügt. (B) Es folgte eine Inkubation für 20 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %CO₂. (C) Die Anzahl der vitalen Zellen wurde dann mit CellTiter 96® Aqueous One Solution nach einer Inkubationszeit von 4 h bestimmt.

Die biologische Aktivität von L19-IL2 in Bezug auf das konjugierte IL2 wurde ebenfalls im IL2 Bioaktivitätstest (2.3.2) untersucht. Die Bindungsaktivität des scFv L19 wurde dabei nicht berücksichtigt, da L19-IL2 in diesem Testformat frei in Lösung vorliegt und keinerlei Bindung von L19 stattfindet (Abbildung 3-3). Für den Test wurden IL2 und L19-IL2 Verdünnungen hergestellt und auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden CTLL-2 Zellen hinzugefügt und die

proliferationsinduzierende Wirkung von IL2 und L19-IL2 auf die Zellen nach insgesamt 24 h Inkubationszeit im Brutschrank gemessen sowie die relative Aktivität von L19-IL2 im Vergleich zu dem IL2 Standard durch eine „parallel-curve-analysis“ ermittelt (2.3.6).

Die Dosis-Wirkungskurven von L19-IL2 und IL2 wiesen in allen Bereichen einen sehr ähnlichen Verlauf bezüglich ihrer Minima, Maxima und Steigungen auf, was bedeutet, dass beide Substanzen auf dem selben biologische Wirkungsprinzip beruhten (Abbildung 3-4). Der etwas nach rechts verschobene Verlauf der L19-IL2 Kurven, im Vergleich zu den IL2 Standardkurven, lässt jedoch auf eine verminderte Aktivität des L19-IL2 schließen. In insgesamt 14 Tests die mit einer „parallel-curve-analysis“ (vergleiche 2.3.6) ausgewertet wurden, wurde eine relative Aktivität von L19-IL2 im Vergleich zu IL2 von $82 \pm 16 \%$ ermittelt.

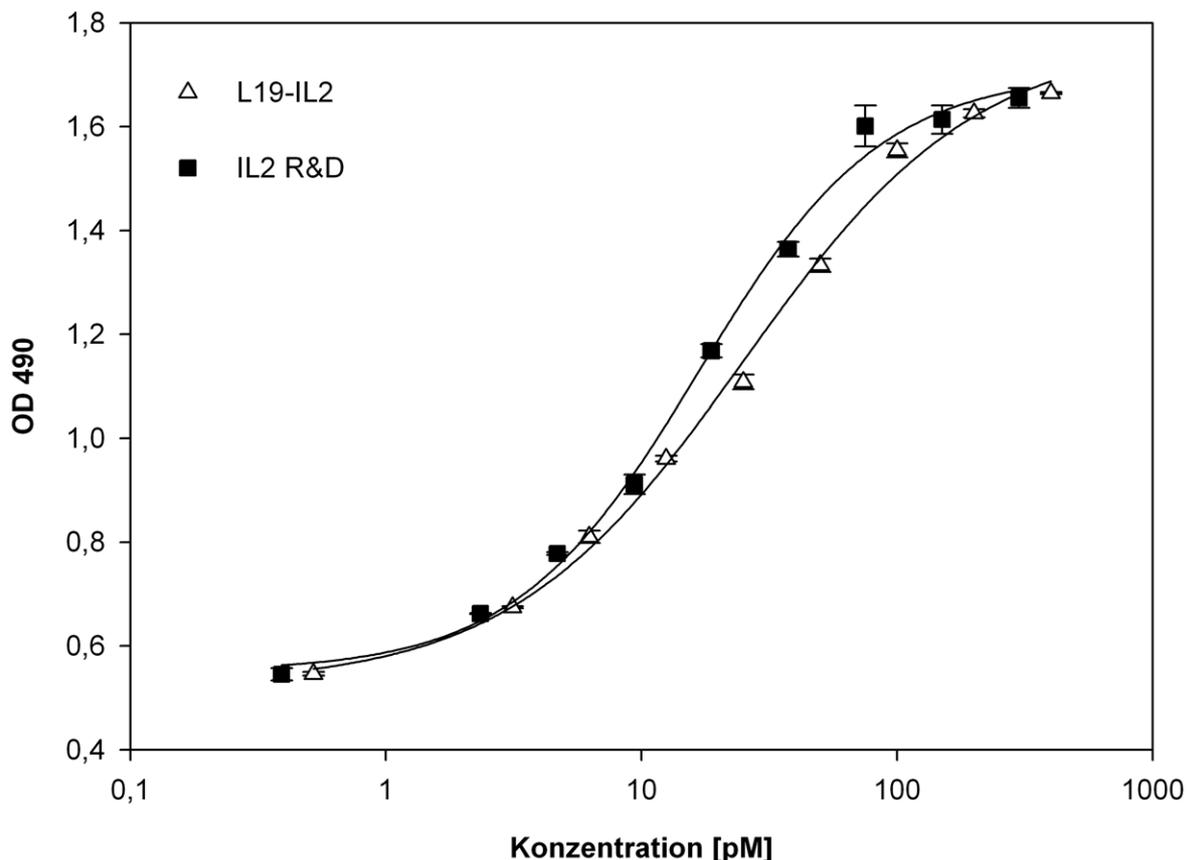


Abbildung 3-4: IL2 Bioaktivitätstest mit IL2 und L19-IL2.

Die IL2 abhängige Zelllinie CTLL-2 wurde mit verschiedenen Konzentrationen L19-IL2 (Δ) und IL2 von R&D Systems (\blacksquare) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 24 h im Brutschrank bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Die resultierenden Dosis-Wirkungskurven zeigten einen ähnlichen Verlauf. Die L19-IL2 Dosis-Wirkungskurve war jedoch etwas nach rechts verschoben und wies somit eine verminderte Aktivität im Vergleich zu IL2 auf. Dargestellt sind repräsentative Kurven aus einem von insgesamt 14 unabhängigen Versuchen. Die Messwerte (OD490) repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten aus einem Versuch.

3.3. L19-IL2 Bioaktivitätstest

3.3.1. Testentwicklung und Optimierung der Testparameter

Für L19-IL2 wurde ein neuer zellbasierter Aktivitätstest mit dem Ziel entwickelt sowohl die Bindung des scFv L19 als auch die biologische Aktivität des konjugierten IL2 zu evaluieren. Das neue Testformat bestand im Wesentlichen aus vier Schritten (Abbildung 3-5). Im ersten Schritt wurde eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte mit 7B89biotin beschichtet und mit L19-IL2 Verdünnungen inkubiert, was zur Bindung des scFv L19 an sein Antigen 7B89 führte. Im darauf folgenden Waschschrift wurden alle ungebundenen, funktionell inaktiven Antikörperfragmente entfernt. Bis zu diesem Schritt glich das Format einem gewöhnlichen Bindungstest für das L19 Antikörperfragment. Im dritten und vierten Schritt wurde jedoch darüber hinaus die Aktivität des konjugierten IL2 bestimmt, indem IL2 abhängige CTLL-2 Zellen in die Kavitäten der Platte hinzugegeben wurden und ihre Viabilität nach einer Inkubationszeit für mehrere Stunden im Brutschrank durch die Zugabe von CellTiter 96® AQueous One Solution bestimmt wurde.

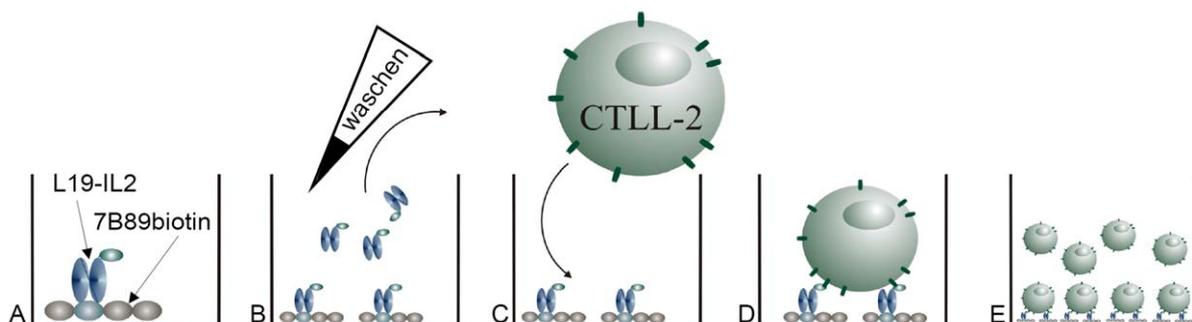


Abbildung 3-5: Format des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

Der Test bestand aus vier Schritten. (A) Im ersten Schritt wurde eine Mikrotiterplatte mit 7B89biotin beschichtet und L19-IL2 Verdünnungen hinzugefügt. (B) Es folgte ein Waschschrift. (C) Danach wurden IL2 abhängige CTLL-2 Zellen dazugegeben. (D) Es folgte eine Inkubation für 20 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %CO₂. (E) Die Anzahl der lebenden Zellen wurde dann mit CellTiter 96® AQueous One Solution nach einer Inkubationszeit von 4 h bestimmt.

Während der Testentwicklung wurden verschiedene Parameter aller genannten Schritte des Testsystems untersucht und optimiert.

Zunächst wurde die Konzentration 7B89biotin für die Plattenbeschichtung optimiert. Hierzu wurde ein Versuch mit verschiedenen Konzentrationen 7B89biotin und einer konstanten Konzentration L19-IL2 (2000 pM) mit 40000 Zellen/Kavität durchgeführt.

Bei den genannten Bedingungen war eine Beschichtung der Platte mit 1000 ng/ml 7B89biotin ausreichend um eine Sättigung der Zellproliferation zu erreichen (Abbildung 3-6A). Folglich wurde eine Konzentration von 1000 ng/ml 7B89biotin für das optimierte Versuchsprotokoll festgelegt. Mit dieser 7B89biotin Konzentration und neun L19-IL2 Konzentrationen im Bereich von 2,6 pM bis 2000 pM wurden gut balancierte L19-IL2 Standardkurven erzeugt.

Neben der sukzessiven Inkubation von 7B89biotin und L19-IL2 wurde während der Methodenentwicklung auch eine zeitgleiche Inkubation der Mikrotiterplatte mit 7B89biotin und L19-IL2 untersucht. Es zeigte sich in mehreren Versuchen, dass es für die resultierenden Standardkurven unerheblich war, ob die L19-IL2 Verdünnungen nach der Plattenbeschichtung mit 7B89biotin oder zeitgleich mit 7B89biotin inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die zeitgleiche Inkubation der Platte mit 1000 ng/ml 7B89biotin und den L19-IL2 Verdünnungen für 2 h als Standardverfahren festgelegt.

Als ein weiterer Methodenparameter wurde die verwendete Konzentration CTLL-2 Zellen optimiert. Dazu wurde der Test mit 20000 Zellen/Kavität und 40000 Zellen/Kavität durchgeführt. Wie erwartet führte der Einsatz der höheren Zellkonzentration zu höheren Absorptionwerten (Abbildung 3-6B). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich, wenn 40000 Zellen/Kavität für 48 h anstatt für 24 h inkubiert wurden (Abbildung 3-6C). In weiterführenden Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine verlängerte Inkubationszeit von 48 h mit 40000 Zellen/Kavität aufgrund der hohen Zelldichte zu einer Zunahme der Verdopplungszeit der Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Um sicherzustellen, dass die Proliferation der Zellen während der gesamten Versuchszeit nicht aufgrund einer zu hohen Zelldichte limitiert wird, und darüber hinaus den zeitlichen Aufwand für den Test auf ein Minimum zu beschränken, wurden eine maximale Zellzahl von 30000 Zellen/Kavität bis 40000 Zellen/Kavität und eine maximale Inkubationszeit von 24 h als Standardparameter festgelegt.

Die Entwicklungszeit mit dem kommerziell erhältlichen Viabilitätsfarbstoff CellTiter 96[®] AQueous One Solution wurde ebenfalls optimiert. Mit steigender Inkubationszeit zwischen 3 h und 5 h stiegen erwartungsgemäß auch die Absorptionwerte der Dosis-Wirkungskurven stetig an (Abbildung 3-6D). Um eine hinreichend hohe Signalstärke zu erreichen und gleichzeitig die Entwicklungszeit möglichst kurz zu halten, wurde eine Inkubationszeit von 4 h für die Standardbedingungen festgelegt.

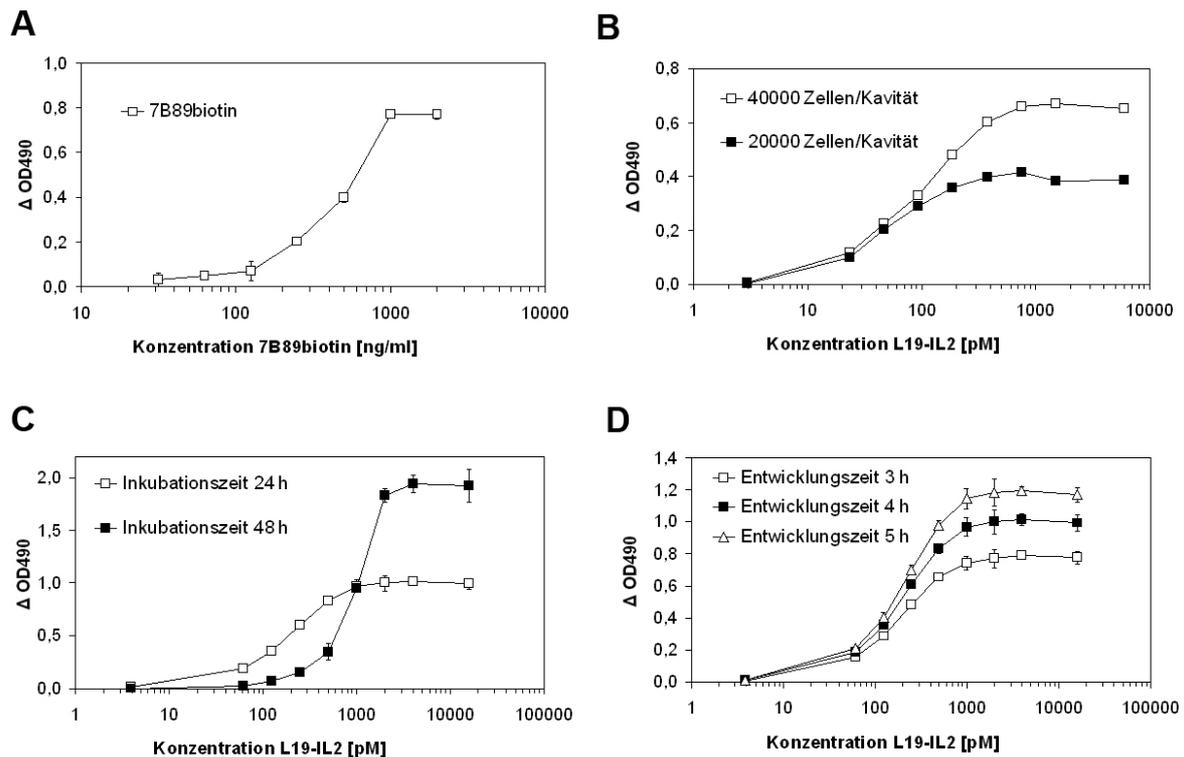


Abbildung 3-6: Evaluierung verschiedener Versuchsparameter des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

(A) Eine Plattenbeschichtung mit 1000 ng/ml 7B89biotin (\square) war ausreichend um bei einer L19-IL2 Konzentration von 2000 pM und 40000 Zellen/Kavität eine Sättigung zu erreichen. (B) Mit 40000 Zellen/Kavität (\square) wurden höhere Absorptionswerte erreicht als mit 20000 Zellen/Kavität (\blacksquare). (C) Bei einer Inkubationszeit mit CTLL-2 Zellen von 48 h (\blacksquare) wurden deutlich höhere Absorptionswerte erreicht als mit einer Inkubationszeit von 24 h (\square). (D) Während der Entwicklungszeit mit CellTiter 96® AQueous One Solution für 3 h (\square), 4 h (\blacksquare) und 5 h (\triangle) stiegen die Absorptionswerte stetig an. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus jeweils einem Versuch.

Der Einfluss des Alters der Zellpassagen auf den L19-IL2 Bioaktivitätstest wurde ebenfalls getestet. An zwei unterschiedlichen Tagen wurden Proben mit einer nominalen, relativen Aktivität von 100 % analysiert, wobei unterschiedlich alte Zellpassagen im Test verwendet wurden. In Abhängigkeit der Passagenzahl der Zellen unterschieden sich die Standardkurven in ihrem Verlauf deutlich voneinander (Abbildung 3-7). Sie wiesen unterschiedliche Maxima und Steigungen auf und die entsprechenden EC_{50} -Werte schwankten von 79 pM bis 221 pM (Tabelle 3-1). Die jeweiligen Standard- und Probenkurven, die auf der gleichen Zellpassage basierten, verliefen jedoch nahezu deckungsgleich (Abbildung 3-7). Dies führte zu ermittelten, relativen Aktivitätswerten der Proben von 95,6 % bis 104,7 % (Tabelle 3-1), wobei keine Abnahme der Richtigkeit des Tests mit steigender Zellpassagennummer festgestellt werden konnte. Somit wurde gezeigt, dass auch noch sehr hohe Zellpassagen im Test verwendet werden konnten.

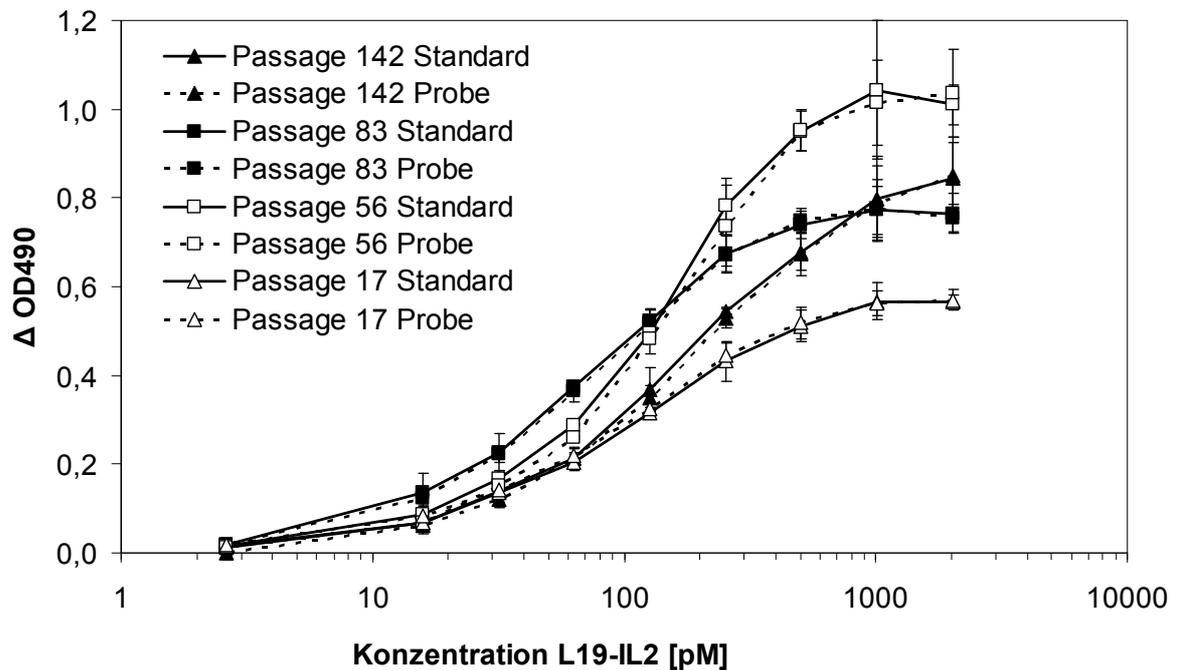


Abbildung 3-7: L19-IL2 Bioaktivitätstest mit unterschiedlichen Zellpassagen.

Der L19-IL2 Bioaktivitätstest wurde mit Proben einer nominellen, relativen Aktivität von 100 % und Zellen der Passage 142 (▲), 83 (■), 56 (□) und 17 (Δ) durchgeführt. Die Standardkurven (durchgezogene Linien) unterschieden sich in Abhängigkeit von der Passagennummer deutlich voneinander. Die Standard- und Probenkurve (gestrichelte Linien) der jeweiligen Passagennummer verliefen jedoch stets deckungsgleich. Dargestellt sind Kurven aus einem von insgesamt zwei Versuchen. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten aus einem Versuch.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der L19-IL2 Bioaktivitätstests mit unterschiedlich alten Zellpassagen.

Der L19-IL2 Bioaktivitätstest mit unterschiedlichen Zellpassagen wurde jeweils zweimal mit Proben einer nominellen, relativen Aktivität von 100 % durchgeführt. Auch wenn die EC_{50} -Werte der jeweiligen Standardkurven in Abhängigkeit von der Passage schwankten, wurden die relativen Aktivitäten der Proben stets mit hoher Genauigkeit bestimmt. Ergebnisreplikate repräsentieren ermittelte, relative Aktivitäten von zwei unabhängigen Versuchen. SD: Standardabweichung

Probe	Ergebnisreplikate		Mittelwert	SD	EC_{50} Mittelwert [pM]
	1	2			
Passage 142/149	94.7	96.4	95.6	1.20	221
Passage 83/90	97.1	102.9	100.0	4.10	79
Passage 56/63	91.8	100.6	96.2	6.22	155
Passage 17/24	109.0	100.4	104.7	6.08	117

3.3.2. Vergleich verschiedener Modelle für die L19-IL2 Dosis-Wirkungskurve

Die Durchführung des L19-IL2 Bioaktivitätstests unter optimierten Assaybedingungen mit L19-IL2 Konzentrationen von 2,6 pM bis 2000 pM resultierte in einer gut balancierten, sigmoiden Dosis-Wirkungskurve. Um das beste Modell für eine Ausgleichskurve zu bestimmen, wurden sowohl ein vier Parameter logistisches Modell (4 PL) als auch ein fünf Parameter logistisches Modell (5 PL) evaluiert. Für alle Dosis-Wirkungskurven aus 16 unabhängigen Versuchen ergaben sich für beide Modelle Determinationskoeffizienten (R^2) von über 0,99. Trotz sehr guter R^2 -Werte für beide Modelle wichen die Ausgleichskurven, die auf dem 4 PL beruhten etwas von den gemessenen Absorptionwerten ab (Abbildung 3-8A). Dies bestätigt, dass der Determinationskoeffizient nicht immer ein aussagekräftiges Maß für die Güte der Ausgleichskurve ist [41,42]. Daher wurden zusätzlich die Residuen zwischen den gemessenen Absorptionwerten und den errechneten Werten ermittelt, die sich aus dem jeweiligen Modell ergaben.

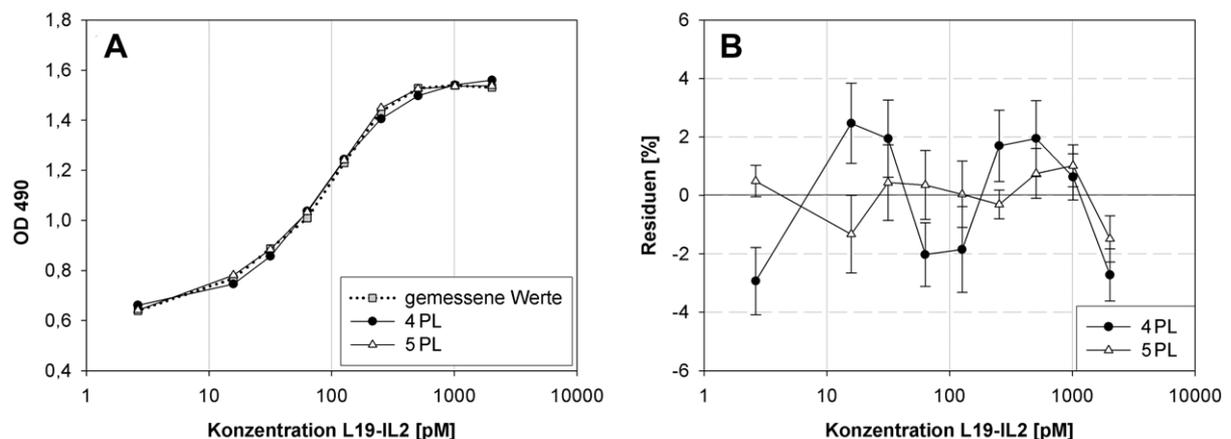


Abbildung 3-8: Vergleich verschiedener Modelle für die L19-IL2 Dosis-Wirkungskurve.

(A) Eine repräsentative von insgesamt 16 Dosis-Wirkungskurven. Neben den gemessenen Absorptionwerten sind die Ausgleichskurven für ein vier Parameter logistisches Modell (4 PL) und ein fünf Parameter logistisches Modell (5 PL) dargestellt. (B) Die prozentualen Abweichungen (Residuen) zwischen den gemessenen Absorptionwerten und den errechneten Werten für das jeweilige Modell waren für das 4 PL im Vergleich zum 5 PL deutlich höher und zeigten darüber hinaus einen wellenförmigen Verlauf über den L19-IL2 Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von 16 Dosis-Wirkungskurven.

In Abhängigkeit des jeweiligen Modells wiesen die Residuen deutliche Unterschiede auf. Die Residuen des 4 PL lagen für alle L19-IL2 Konzentrationen zwischen -3 % und 3 %, wohingegen sie für das 5 PL nur zwischen -1 % und 1 % schwankten

(Abbildung 3-8B). Darüber hinaus zeigten die Residuen des 4 PL im Gegensatz zum 5 PL über den L19-IL2 Konzentrationsbereich einen wellenförmigen Verlauf, was zusätzlich auf einen systematischen Fehler im Ausgleichsmodell hindeutete [43]. Diese Ergebnisse zeigen, dass das 5 PL die tatsächlichen Messwerte besser abbildete als das 4 PL und somit das bessere Modell war. Folglich wurde für alle weiteren Versuche und die Validierung das 5 PL verwendet.

3.3.3. Validierung

3.3.3.1. Spezifität

Die Spezifität des L19-IL2 Bioaktivitätstests wurde mit Hilfe von verschiedenen Derivaten des L19 scFvs sowie unkonjugiertem IL2 gezeigt. Sowohl L19-SIP als auch AP39 besitzen denselben scFv wie L19-IL2 und binden folglich an dasselbe Antigen (7B89). Im Gegensatz zu L19-IL2 fehlt ihnen jedoch das konjugierte IL2.

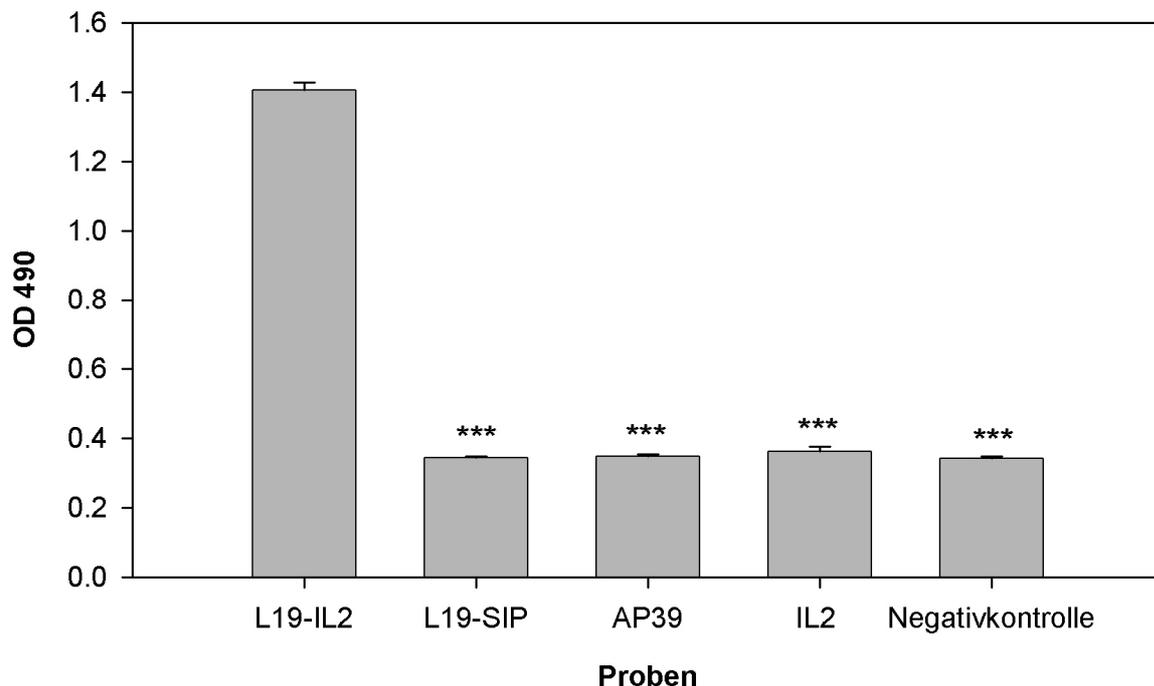


Abbildung 3-9: Spezifität des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

Überlebensfähigkeit von CTLL-2 Zellen nach 24 h Stimulation im Brutschrank bei 37 °C, 5 %CO₂ mit 4000 pM L19-IL2, equimolaren Mengen L19-SIP, AP39, IL2 oder Medium ohne IL2 (Negativkontrolle). Die Zellüberlebensfähigkeit nach Behandlung mit L19-SIP, AP39 und IL2 war vergleichbar mit der Negativkontrolle und signifikant niedriger verglichen mit L19-IL2. Sterne (***) kennzeichnen signifikante Unterschiede der Absorptionswerte verglichen mit L19-IL2 im t-Test ($p < 0,001$). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs Replikaten aus einem Versuch.

Im L19-IL2 Bioaktivitätstest wurden 4000 pM L19-IL2, L19-SIP, AP39 und IL2 eingesetzt. Die Überlebensfähigkeit der mit L19-SIP und AP39 behandelten Zellen war vergleichbar mit den Negativkontrollen, welche ohne Wirkstoff inkubiert wurden. Ebenso wurde bei CTLL-2 Zellen, die mit unkonjugiertem IL2 behandelt wurden kein proliferativer Effekt beobachtet (Abbildung 3-9). Verglichen mit L19-IL2 waren die Signale für L19-SIP, AP39 und IL2 signifikant niedriger ($p < 0,001$ vs. L19-IL2; t-Test). Diese Ergebnisse zeigen, dass der neu entwickelte L19-IL2 Bioaktivitätstest spezifisch die Aktivität beider funktionellen Einheiten des L19-IL2 Immuncytokins misst. Dies ist ein deutlicher Vorteil verglichen zum bereits vorher beschriebenen IL2 Bioaktivitätstest (3.2) und anderen Tests für IL2, die lediglich die Aktivität des konjugierten IL2 messen und daher keine Aussage darüber ermöglichen, ob die IL2 Aktivität vom integren L19-IL2 vermittelt wird oder lediglich durch unkonjugiertes IL2.

3.3.3.2. Präzision, Richtigkeit und Linearität

Um die Richtigkeit und Präzision des L19-IL2 Bioaktivitätstests zu bestimmen, wurde L19-IL2 Standard mit Puffer auf Probenkonzentrationen verdünnt, die nominellen, relativen Aktivitäten von 60 %, 80 %, 100 %, 120 % und 140 % entsprachen. Diese Proben wurden in Validierungsversuchen so behandelt, als enthielten sie die gleiche Konzentration L19-IL2 wie der Standard. Jede dieser fünf Proben wurde in jeweils fünf Versuchen an unterschiedlichen Tagen analysiert. In jedem Versuch wurde die jeweilige Probe dabei auf zwei unabhängigen Mikrotiterplatten analysiert. Dieses experimentelle Design führte zu 10 unabhängigen Aktivitätsbestimmungen für jede der fünf Proben. Typische Dosis-Wirkungskurven für Standard und Proben aus Einzelbestimmungen sind in Abbildung 3-10 dargestellt. In Abhängigkeit der nominellen, relativen Aktivität der eingesetzten Proben waren die beiden Dosis-Wirkungskurven auf der y-Achse gegeneinander verschoben. Die Bestimmung der relativen Aktivität ist in Kapitel 2.3.6 beschrieben.

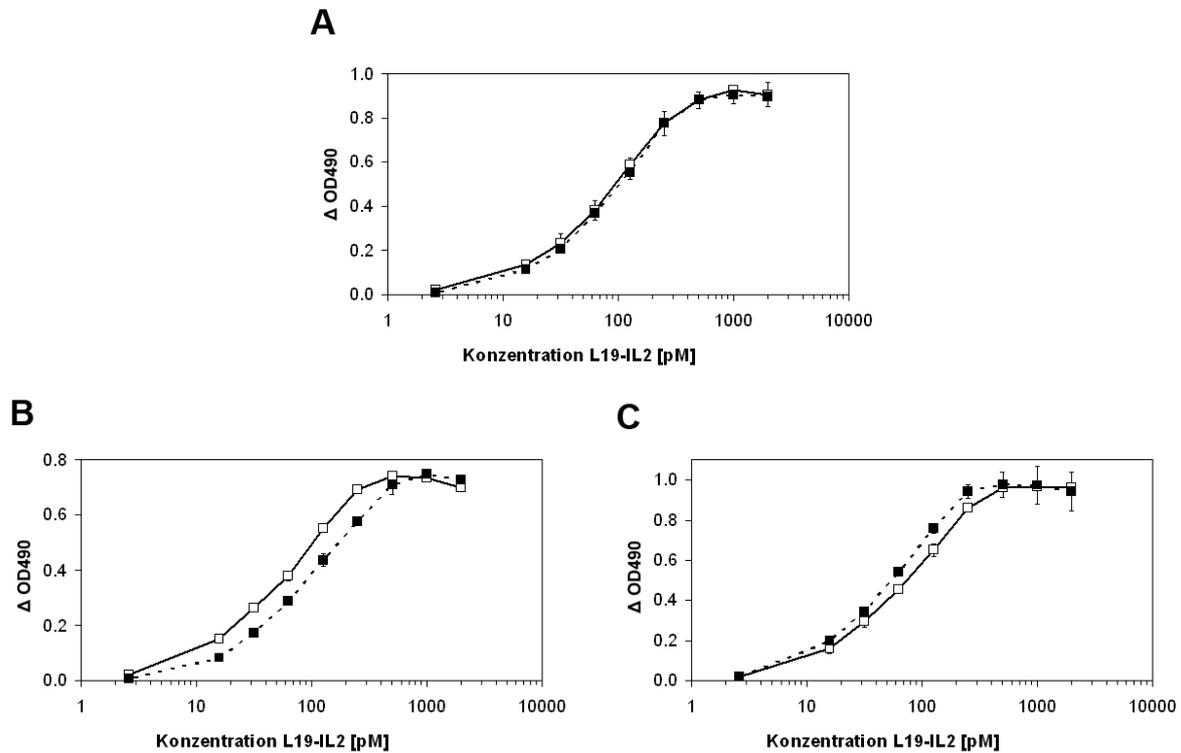


Abbildung 3-10: Dosis-Wirkungskurven des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

L19-IL2 Standard wurde auf Probenkonzentrationen verdünnt, die nominellen, relativen Aktivitäten von (A) 100 %, (B) 60 %, (C) 140 % entsprachen und im L19-IL2 Bioaktivitätstest vergleichend zu einem Standard analysiert. In Abhängigkeit der relativen Aktivität der Proben waren die Dosis-Wirkungskurven von Standard (durchgezogene Linien) und Probe (gestrichelte Linien) deckungsgleich oder gegeneinander verschoben. Dargestellt sind jeweils eine repräsentative Dosis-Wirkungskurven von Standard und Probe von insgesamt 10 Mikrotiterplatten, die für jede Probe verwendet wurden. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten.

Für die Berechnung der Intra-Assay Präzision für jede der fünf Proben mit unterschiedlichen, nominellen, relativen Aktivitäten (z.B. 100 %) wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Intra-Assay Standardabweichung wurde dabei aus der Wurzel der Intra-Assay Varianzkomponente berechnet, die sich aus der ANOVA ergab.

Die Inter-Assay Präzision wurde anhand der Standardabweichung aller 10 Einzelergebnisse vom totalen Mittelwert aller fünf Versuchsdurchgänge mit der gleichen nominellen, relativen Aktivität (z.B. 100 %) bestimmt. In beiden Fällen wurde die Präzision als prozentualer Variationskoeffizient (%VK) angegeben, indem die entsprechende Standardabweichung durch die nominelle, relative Aktivität geteilt wurde und der resultierende Quotient anschließend mit 100 multipliziert wurde. Als Beispiel für die Berechnung der Präzision sind die Ergebnisse für die Proben mit

einer nominellen, relativen Aktivität von 100 % in Tabelle 3-2 dargestellt. Für diese fünf Versuche betrug die mittlere Intra-Assay Standardabweichung 5,8 und die Inter-Assay Standardabweichung aller Einzelergebnisse 7,0, was zu einem Varianzkoeffizient (VK) von 5,8 % für die Intra-Assay Präzision und 7,0 % für die Inter-Assay Präzision führte (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Intra-Assay und Inter-Assay Präzision sowie Richtigkeit des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

Bestimmung der Intra- und Inter-Assay Präzision, ausgedrückt als prozentualer Variationskoeffizient (%VK) sowie der Richtigkeit, ausgedrückt als prozentualer relativer Fehler (%RE). Ausgewertet wurden jeweils fünf Versuche mit L19-IL2 Proben mit einer nominellen, relativen Aktivität von 100 %. In jedem Versuch wurden zwei unabhängige Platten verwendet (Ergebnisreplikate).

Versuch	Ergebnisreplikate		Intra-Assay Statistik			
	1	2	Mittelwert	SD	%VK	%RE
1	91,8	95,3	93,6	2,5	2,5	-6,5
2	84,2	87,3	85,8	2,2	2,2	-14,3
3	91,2	96,8	94,0	4,0	4,0	-6,0
4	108,0	93,9	101,0	10,0	10,0	1,0
5	94,1	103,2	98,7	6,4	6,4	-1,3
Intra-Assay (ANOVA)			94,6	5,8	5,8	
Inter-Assay			94,6	7,0	7,0	-5,4

Alle Ergebnisse zur Präzision sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. In Abhängigkeit von der eingesetzten nominellen Aktivität variierte die Intra-Assay Präzision zwischen 1,0 %VK und 8,6 %VK und die Inter-Assay Präzision zwischen 6,1 %VK und 10,6 %VK. Alle ermittelten Werte lagen unter dem generell akzeptierten Grenzwert für bioanalytische Methoden von 20 %VK [44-46]. Der Test war sogar so präzise, dass der deutlich niedrigere Grenzwert der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) von 15 %VK unterschritten wurde [47]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der L19-IL2 Bioaktivitätstest über den gesamten Bereich von 60 % bis 140 % Aktivität sehr präzise Ergebnisse lieferte.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Intra-Assay und Inter-Assay Präzision und Richtigkeit.

Intra- und Inter-Assay Präzision sind ausgedrückt als prozentualer Variationskoeffizient (%VK). Richtigkeit sowie der totale Fehler sind ausgedrückt als prozentualer relativer Fehler (%RE). Jede der fünf Proben mit nominellen, relativen Aktivitäten von 60 % bis 100 % wurde in fünf unabhängigen Versuchen analysiert.

Parameter	Statistik	nominelle Aktivität in [%]				
		60	80	100	120	140
Richtigkeit	mittlerer systematischer Fehler (%RE)	-6,4	-5,1	-5,4	-6,9	-3,4
Präzision	Intra-Assay (%VK)	1,0	7,5	5,8	8,6	6,1
	Inter-Assay (%VK)	6,1	10,4	7,0	10,6	9,4
totaler Fehler	Richtigkeit + Inter-Assay (%RE)	12,5	15,6	12,4	17,5	12,8

Als Maß für die Richtigkeit des Tests wurde die Differenz zwischen dem totalen Mittelwert der gemessenen, relativen Aktivitäten aus jeweils fünf Versuchen mit der gleichen nominellen, relativen Aktivität (z.B. 100 %) und der nominellen relativen Aktivität bestimmt. Die Richtigkeit wurde als prozentualer, relativer Fehler (%RE) angegeben und berechnet, indem die nominelle Aktivität vom Mittelwert der gemessenen Aktivitäten abgezogen und anschließend mit 100 multipliziert wurde. Über den gesamten Testbereich von 60 % bis 100 % waren die %RE-Werte sehr niedrig und variierten zwischen -3,4 und -6,9 (Tabelle 3-3). Obwohl die Testergebnisse einiger Versuche die nominellen Aktivitäten der Proben etwas unterschätzten, lagen alle %RE-Werte unter dem allgemein anerkannten Grenzwert von 20 %RE [41,45,46,48] und verdeutlichen damit, dass der Test sehr genaue Ergebnisse liefert. Ergänzend zu den Ergebnissen für die Richtigkeit und Präzision wurde als Maß für den Gesamtfehler des Tests der totale Fehler berechnet, indem der Betrag des systematischen Fehlers (Richtigkeit) mit dem zufälligen Fehler (Präzision) addiert wurde [48]. Über den gesamten Testbereich variierte der totale Fehler zwischen 12,4 %RE und 17,5 %RE (Tabelle 3-3) und blieb somit deutlich unter dem allgemein, anerkannten Grenzwert von 30 %RE [49,50]. Diese Werte verdeutlichen noch einmal die Richtigkeit und hohe Präzision des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

Um die Linearität des Tests zu bestimmen, wurde der lineare Zusammenhang zwischen den gemessenen, relativen Aktivitäten und den nominellen, relativen Aktivitäten untersucht. Zwischen beiden bestand über den gesamten Testbereich von 60 % bis 140 % ein linearer Zusammenhang. Für die Regressionsgerade ergab sich ein R^2 -Wert von 0,9992 mit einer Steigung von 0,9903 und einem y-Achsenabschnitt von -4,3 (Abbildung 3-11).

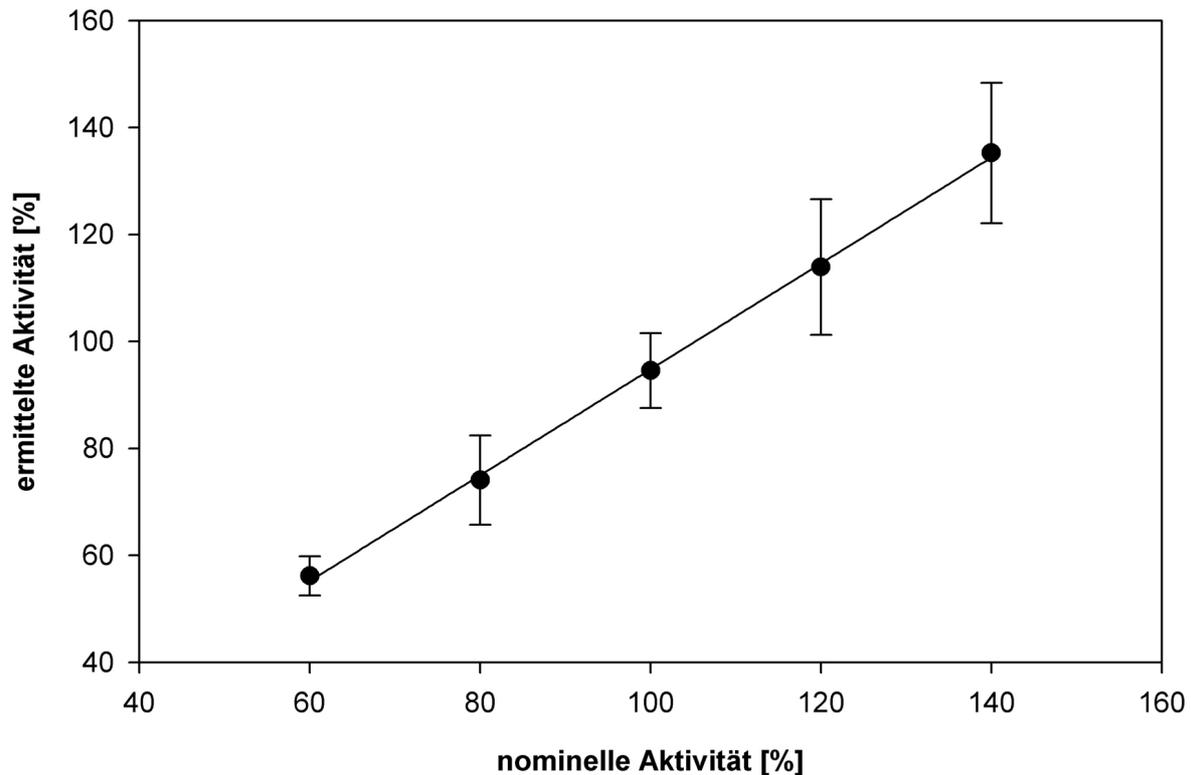


Abbildung 3-11: Linearität des L19-IL2 Bioaktivitätstests.

Die Linearität des Tests ist im Bereich einer relativen Aktivität des Referenzstandards von 60 % bis 140 % dargestellt. Der Determinationskoeffizient (R^2) für die lineare Regression zwischen den Werten für die ermittelte Aktivität und der nominellen Aktivität betrug 0,9992 mit einer Steigung von 0,9903 und einem y-Achsenabschnitt von -4,3. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen.

3.3.3.3. Bewertung der Einzelergebnisse durch „parallel-line“ Analyse (PLA) und „parallel-curve“ Analyse (PCA)

Im Rahmen der Validierung des L19-IL2 Bioaktivitätstests wurden insgesamt 50 Mikrotiterplatten verwendet und somit 50 Einzelergebnisse erzielt. Um die Zulässigkeit jedes Ergebnisses zu zeigen, wurden verschiedene Varianzanalysen (F-Tests) durchgeführt um Steigung, Linearität und Parallelität der Dosis-Wirkungskurven von Probe und Standard zu überprüfen. Für alle Kurvenanalysen wurden dabei neben der klassischen „parallel-line“ Analyse (PLA) mit einem linearen Regressionsmodell auch eine „parallel-curve“ Analyse (PCA) verwendet, die auf einem 4 PL oder einem 5 PL basiert.

In allen Versuchsansätzen wurde der Test auf Steigung bestanden, da in allen Bioaktivitätstests ein Dosis-Wirkungszusammenhang zwischen L19-IL2 und den CTLL-2 Zellen bestand.

Wurde das 4 PL für die Kurvenanalyse angewendet, bestanden nur 23 der 50 Ansätze den Test auf nicht- Linearität (Tabelle 3-4). Im Gegensatz dazu bestanden 90 % aller Ansätze den Test (45 von 50), wenn das 5 PL angewendet wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal, dass das 5 PL die tatsächlichen Messwerte besser abbildete als das 4 PL und zeigen wie wichtig es ist das passende Modell zu wählen (vergleiche Kapitel 3.3.2). Wurden nur jeweils drei Konzentrationen der Standard- und Proben- Dosis-Wirkungskurve für die Bestimmung der relativen Aktivität herangezogen und mit einer PLA ausgewertet, bestanden 47 der 50 Ansätze den Test. Im Gegensatz zum 4 PL und 5 PL ist diese Art der Analyse jedoch nur auf den linearen Abschnitt der Dosis-Wirkungskurven beschränkt. Entscheidende Abschnitte der Kurven wie die Asymptoten werden folglich nicht berücksichtigt, so dass diese Analyse mit seinem linearen Regressionsmodell nur eine sehr eingeschränkte Beschreibung des nicht linearen Dosis-Wirkungs-Zusammenhangs des biologischen Tests liefert.

Tabelle 3-4: Ergebnisse der parallel-curve Analyse (PCA) und parallel-line Analyse (PLA).

Dargestellt ist die Anzahl der akzeptierten, validen Testsergebnisse, gemäß des entsprechenden F-Tests auf Steigung, nicht-Linearität oder nicht-Parallelität auf unterschiedlichen Signifikanzniveaus (p-Wert). Zur Datenanalyse wurde entweder eine „parallel-curve-analysis“ mit einem vier Parameter logistischen Modell (4 PL) oder einem fünf Parameter logistischen Modell (5 PL) durchgeführt oder eine „parallel-line-analysis“ (PLA) mit einem linearen Regressionsmodell. Insgesamt wurden 50 Versuchsansätze analysiert. Angegeben ist jeweils die Anzahl und der Prozentsatz der bestandenen Tests.

Modell	p-Wert	F-Test		
		Steigung	nicht-Linearität	nicht-Parallelität
4 PL	0,05	50 (100 %)	23 (46 %)	44 (88 %)
5 PL	0,05	50 (100 %)	45 (90 %)	44 (88 %)
5 PL	0,02	50 (100 %)	49 (98 %)	48 (96 %)
PLA	0,05	50 (100 %)	47 (94 %)	50 (100 %)

Neben der Steigung und Linearität ist die Gleichheit von Probe und Standard ungedingte Voraussetzung für die Zulässigkeit eines biologischen Aktivitätstestergebnisses. Getestet wird diese Gleichheit mit einem F-Test auf nicht-Parallelität [51], da die resultierenden Dosis-Wirkungskurven von Probe und Standard parallel zueinander verlaufen, wenn sie auf demselben biologischen Prinzip beruhen. Bei der Anwendung des 4 PL und des 5 PL für die Kurvenanalyse wurden

gleich viele Tests auf nicht- Parallelität bestanden (44 von 50). Lediglich die Reduktion des Signifikanzniveaus (p -Wert) von $p > 0,05$ auf $p > 0,02$ führte zu einer Erhöhung der zulässigen Testergebnisse von 88 % auf 96 % für das 5 PL (Tabelle 3-4). Wurde mit der PLA ausgewertet, bestanden alle Ansätze den Test, allerdings wurde dabei wieder nur der lineare Abschnitt der Dosis-Wirkungskurven berücksichtigt. Die Ergebnisse sind daher nicht so aussagekräftig wie bei einer PCA mit einem 4 PL oder 5 PL, bei denen die gesamte, sigmoide Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung der Gleichheit von Probe und Standard herangezogen wird.

3.3.3.4. Stabilität der Lösungen

Biologische Aktivitätstests unterliegen einer Vielzahl von Schwankungen. Eine mögliche Ursache dafür besteht in der abnehmenden Stabilität der verwendeten Lösungen. Die im L19-IL2 Bioaktivitätstest eingesetzten Lösungen wurden daher in einer Reihe von Versuchen untersucht, mit dem Ziel zu ermitteln, wie robust der L19-IL2 Standard auf wiederholtes Auftauen und Einfrieren reagierte. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob L19-IL2 und 7B89 über einen längeren Zeitraum bei 4 °C in Kühlschrank gelagert werden konnten.

Zunächst wurde die Aktivität von L19-IL2 nach Gefrier-Auftau-Zyklen in zwei unabhängigen Bioaktivitätstests untersucht. Dazu wurde L19-IL2 Standard auf Probenkonzentrationen verdünnt, die einer nominellen relativen Aktivität von 100 % entsprachen. Diese Proben wurden bei -20 °C oder -80 °C dreimal eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend analysiert. Für Proben, die bei -20 °C eingefroren wurden, ergaben sich relative Aktivitäten von 93,3 % bis 99,7 % verglichen mit einem Standard, der unter Standardbedingungen bei -80 °C gelagert wurde. Für Proben, die bei -80 °C eingefroren wurden, wurden relative Aktivitäten von 91,4 % bis 96,1 % ermittelt. Diese Werte lagen im Bereich des totalen Fehlers der Methode von 12,4 %RE (Tabelle 3-3). Somit wurde gezeigt, dass L19-IL2 trotz drei Gefrier-Auftau-Zyklen seine Aktivität beibehielt. Neben diesem Kurzzeitstresstest wurde die L19-IL2 Stabilität auch über einen längeren Zeitraum analysiert. Dazu wurden L19-IL2 Standard für fünf bis sechs Monate im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und anschließend in drei unabhängigen Bioaktivitätstests vergleichend mit L19-IL2 Standard, der unter Standardbedingungen bei -80 °C gelagert wurde, untersucht. Es zeigte sich, dass die relative Aktivität nach sechs Monaten auf $132,7 \pm 9,8$ % gestiegen war (Abbildung 3-12A). Durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-

Färbung wurde jedoch gezeigt, dass dies mit höheren L19-IL2 Konzentrationen korrelierte, die zu einer Überschätzung der wahren Aktivität im Aktivitätstest führte (Abbildung 3-12B). Eine wahrscheinliche Erklärung dafür sind Verdunstungseffekte, die zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration der Proben führten. Von einer längeren Lagerung des L19-IL2 Standards bei 4 °C ist daher abzusehen. Stattdessen sollte der Standard bei -80 °C gelagert und unmittelbar vor einem Test aufgetaut werden.

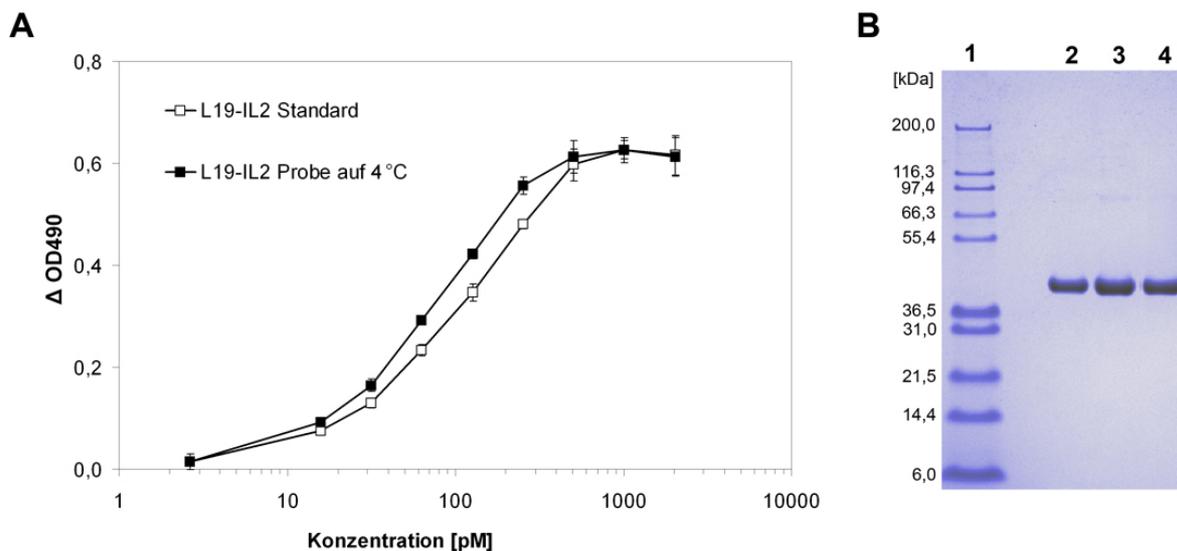


Abbildung 3-12: Stabilität des L19-IL2 Standards bei 4 °C.

(A) Die IL2 abhängige Zelllinie CTLL-2 wurde im L19-IL2 Bioaktivitätstest mit verschiedenen L19-IL2 Proben versetzt für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Dosis-Wirkungskurve, der 6 Monate auf 4 °C gelagerten Proben (■) war im Vergleich zu frisch aufgetautem L19-IL2 Standard (□) nach links verschoben. Dies zeigt eine höhere Aktivität der Proben im Vergleich zum Standard. Dargestellt sind repräsentative Kurven aus einem von insgesamt zwei unabhängigen Versuchen. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten. (B) SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung. Mit andauernder Lagerungszeit der L19-IL2 Proben bei 4 °C zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration. 1: Molekulargewichtsstandard, 2: frisch aufgetauter L19-IL2 Standard, 3: Proben sechs Monate gelagert bei 4 °C, 4: Proben drei Monate gelagert bei 4 °C.

Neben dem L19-IL2 Standard ist auch die Stabilität des Antigens 7B89 von großer Bedeutung für den L19-IL2 Bioaktivitätstest. In zwei Versuchen wurde eine Hälfte einer Mikrotiterplatte mit 7B89 beschichtet, welches zuvor für 11 bzw. 17 Monate im Kühlschrank bei 4 °C gelagert worden war. Die andere Hälfte wurde mit frisch aufgetautem 7B89 besichtet, welches zuvor unter Standardbedingungen bei -20 °C gelagert worden war. Anschließend wurden beide Ansätze parallel mit L19-IL2 inkubiert. Die resultierenden Dosis-Wirkungskurven, die auf altem und frisch

aufgetautem Antigen beruhten, verliefen exakt deckungsgleich (Daten nicht gezeigt). 7B89 konnte folglich bis zu 17 Monate bei 4 °C gelagert werden und ohne Aktivitätsverlust im Test eingesetzt werden.

3.4. Vergleich des IL2 Bioaktivitätstests mit dem L19-IL2 Bioaktivitätstest

Um mögliche Unterschiede zwischen dem IL2 Bioaktivitätstest und dem L19-IL2 Bioaktivitätstest zu untersuchen, wurde L19-IL2 Standard in einem kombinierten Testformat (2.3.5) vergleichend analysiert. Hierzu wurde eine Hälfte einer Streptavidin-beschichteten 96-Loch Mikrotiterplatte entsprechend des Protokolls für den L19-IL2 Bioaktivitätstest mit 7B89 beschichtet und mit L19-IL2 Verdünnungen inkubiert, was zur Bindung des scFv L19 an sein Antigen und somit zur Immobilisierung von L19-IL2 führte. Die zweite Plattenhälfte wurde, entsprechend des Protokolls für den IL2 Bioaktivitätstest, nicht mit Antigen beschichtet, so dass L19-IL2 frei in Medium vorlag. Zu beiden Ansätzen wurden CTLL-2 Zellen hinzugefügt und für 20 h im Brutschrank inkubiert, ehe die Bestimmung der Lebendzellzahl innerhalb weiterer 4 h erfolgte.

Die aus den unterschiedlichen Testformaten resultierenden Dosis-Wirkungskurven unterschieden sich deutlich voneinander. Die aus dem L19-IL2 Bioaktivitätstest resultierenden Dosis-Wirkungskurven waren im Vergleich zu jenen des IL2 Bioaktivitätstests nach rechts verschoben. Folglich waren im L19-IL2 Bioaktivitätstest höhere Konzentration an L19-IL2 notwendig, um die gleiche Proliferation von CTLL-2 hervorzurufen wie im IL2 Bioaktivitätstest. In 17 unabhängigen Versuchen betrug die relative Aktivität von L19-IL2 im L19-IL2 Bioaktivitätstest nur noch $32 \pm 7 \%$ im Vergleich zum IL2 Bioaktivitätstest.

Für diese Aktivitätsunterschiede von L19-IL2 kamen unterschiedliche Ursachen in betracht. Eine mögliche Erklärung könnte in Unterschieden bei der Durchführung der beiden Testformate liegen. Der L19-IL2 Bioaktivitätstest enthielt im Gegensatz zum IL2 Bioaktivitätstest einen zusätzlichen Waschschrift, der dazu diente L19-IL2 Proteine mit unzureichenden Bindungseigenschaften des scFvs L19 zu entfernen (Abbildung 3-5). Die verminderte Aktivität im L19-IL2 Bioaktivitätstest könnte folglich auch auf eine geringere Konzentration L19-IL2 aufgrund dieses Waschschrifts zurückzuführen sein. Eine zweite Hypothese war, dass sich die Immobilisierung von

L19-IL2 im L19-IL2 Bioaktivitätstest im Gegensatz zu dem freien L19-IL2 im IL2 Bioaktivitätstest funktionell auf die Proliferation der Zellen auswirkte.

Um zu untersuchen, ob die Aktivitätsminderung von L19-IL2 auf der Bindung an sein Antigen beruhte oder Wascheffekte eine Rolle spielten, musste der L19-IL2 Bioaktivitätstest modifiziert werden. Das Ziel dabei war die Entwicklung eines kompetitiven Tests, bei dem L19-IL2 nach Bindung an 7B89 wieder in Lösung gebracht werden konnte, um zu untersuchen, ob diese Freisetzung des L19-IL2 ins Medium mit einer entsprechenden Aktivitätssteigerung korrelierte.

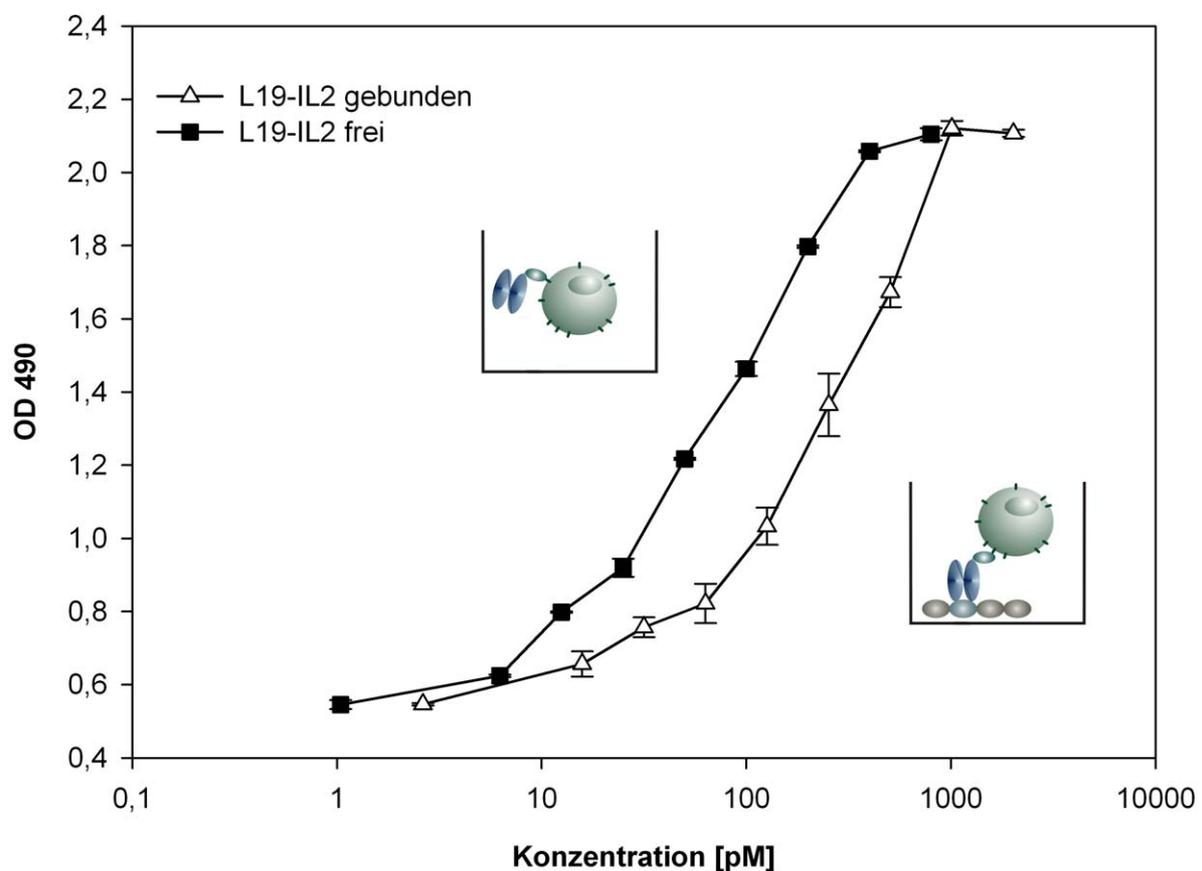


Abbildung 3-13: Vergleichende Untersuchung des IL2 Bioaktivitätstests mit dem L19-IL2 Bioaktivitätstest.

L19-IL2 Standard befand sich auf einer Hälfte einer Streptavidin-beschichteten 96-Loch Mikrotiterplatte frei im Medium (IL2 Bioaktivitätstest (■)). Auf der anderen Plattenhälfte war L19-IL2 an sein Antigen 7B89 gebunden (L19-IL2 Bioaktivitätstest (Δ)). Die Dosis-Wirkungskurve von gebundenem L19-IL2 war, verglichen mit freiem L19-IL2, deutlich nach rechts verschoben und wies nur eine Aktivität von $32 \pm 7\%$ ($n=17$) auf. Die Piktogramme illustrieren freies und gebundenes L19-IL2. Dargestellt sind zwei repräsentative Dosis-Wirkungskurven aus einem von insgesamt 17 Versuchen. Die Messwerte (OD490) repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten aus einem Versuch.

3.5. Konkurrenz von gebundenem L19-IL2 mit AP39

Die geringere Aktivität von L19-IL2 im L19-IL2 Bioaktivitätstest im Vergleich zum IL2 Bioaktivitätstest konnte nicht eindeutig einem Aktivitätsverlust von L19-IL2 durch Bindung an 7B89 zugeschrieben werden, da beide Testformate sich in einem Waschschrift unterschieden und somit nicht vergleichbar waren. Um Aktivitätsunterschiede zwischen freiem und gebundenem L19-IL2 zu untersuchen, musste der L19-IL2 Bioaktivitätstest verändert werden, so dass L19-IL2 nach der Bindung an 7B89 und dem anschließenden Waschschrift wieder ins Medium freigesetzt wurde, indem die Bindung an das Antigen durch Zugabe des scFv AP39 kompetitiert wurde.

Zunächst wurde mittels eines *time-resolved fluoroimmunoassay* (TR-FIA) untersucht, welche Konzentration AP39 nötig war, um L19-IL2 vollständig von 7B89 zu verdrängen. Hierzu wurde eine Streptavidin-beschichtete 96-Loch Mikrotiterplatte entsprechend des Protokolls für den L19-IL2 Bioaktivitätstest mit 7B89 beschichtet und für 2 h mit 125 pM oder 2000 pM L19-IL2 Standard inkubiert. Diese L19-IL2 Konzentrationen entsprachen der mittleren und der höchsten Konzentration, die im L19-IL2 Bioaktivitätstest eingesetzt wurden. Anschließend wurde die Platte gewaschen und unterschiedliche Konzentrationen AP39 hinzugefügt. Die Detektion von gebundenem L19-IL2 erfolgte nach einem Waschschrift über einen Europium markierten anti-IL2 monoklonalen Antikörper.

Mit steigender Konzentration AP39 wurde eine zunehmende Konkurrenz von L19-IL2 beobachtet (Abbildung 3-14). Eine vollständige Konkurrenz wurde mit 5000 nM AP39 erzielt, wobei das Messsignal annähernd der Negativkontrolle ohne L19-IL2 entsprach. Diese Konzentration entsprach einem 2500-fachen molarem Überschuss gegenüber der höchsten L19-IL2 Konzentration. Für den kompetitiven L19-IL2 Bioaktivitätstest wurden folglich 5000 nM AP39 eingesetzt, um bereits gebundenes L19-IL2 wieder in Lösung zu bringen und anschließend den Effekt auf die Proliferation von CTLL-2 Zellen zu messen.

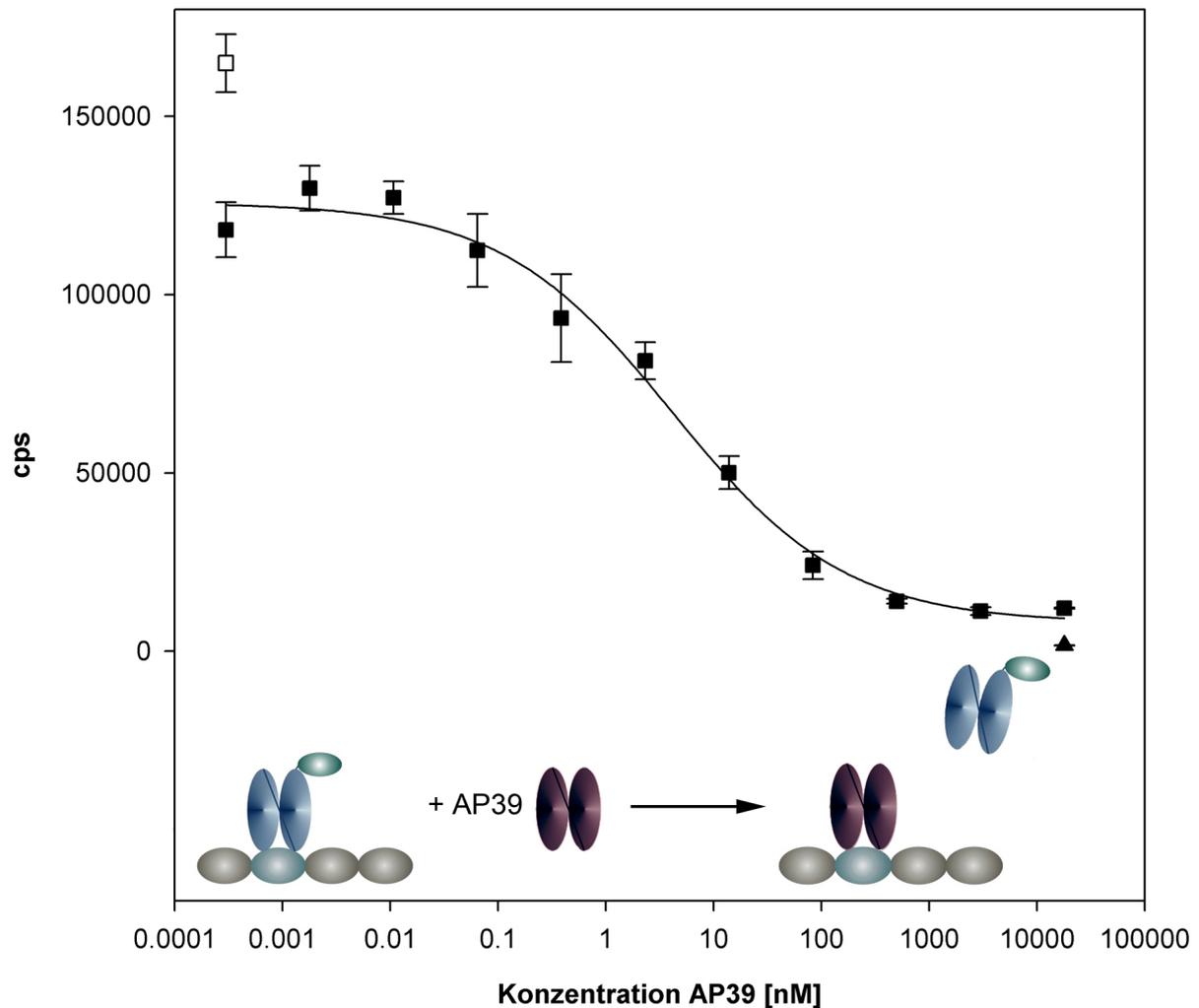


Abbildung 3-14: Kompetitive Bindung von gebundenem L19-IL2 mit AP39.

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 7B89 beschichtet und für 2 h mit 2000 pM L19-IL2 inkubiert. Anschließend wurde gebundenes L19-IL2 durch die Zugabe des Antikörperfragments AP39 wieder in Lösung gebracht, wobei 5000 nM AP39 benötigt wurden, um L19-IL2 vollständig von seinem Antigen zu verdrängen. Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus einem von insgesamt drei unabhängigen Versuchen. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten. Die Piktogramme illustrieren die Verdrängung von L19-IL2 von 7B89 durch AP39. Versuchsansätze mit 2000 pM L19-IL2 und steigenden Konzentrationen AP39 (■), Negativkontrolle ohne L19-IL2 jedoch mit AP39 (▲), Positivkontrolle ohne AP39 jedoch mit L19-IL2 (□). cps: counts per second

3.6. Kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest

Um zu untersuchen, ob die verminderte Aktivität von L19-IL2 im L19-IL2 Bioaktivitätstest auf die Bindung an sein Antigen zurückzuführen war, wurde ein kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest durchgeführt. Hierzu wurde eine Streptavidin-beschichtete 96-Loch Mikrotiterplatte mit 7B89 beschichtet und mit L19-IL2

Verdünnungen inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde zu jeder L19-IL2 Verdünnung 5000 nM AP39 hinzugefügt, um eine vollständige Verdrängung und Freisetzung von L19-IL2 ins Medium zu erreichen. Anschließend wurden CTLL-2 Zellen zu jedem Ansatz hinzugefügt und für 24 h inkubiert. Als Vergleich dienten Ansätze mit gebundenem L19-IL2, die gemäß des L19-IL2 Bioaktivitätstest-Protokolls behandelt wurden sowie Ansätze mit freiem L19-IL2, die gemäß des IL2 Bioaktivitätstest-Protokolls behandelt wurden.

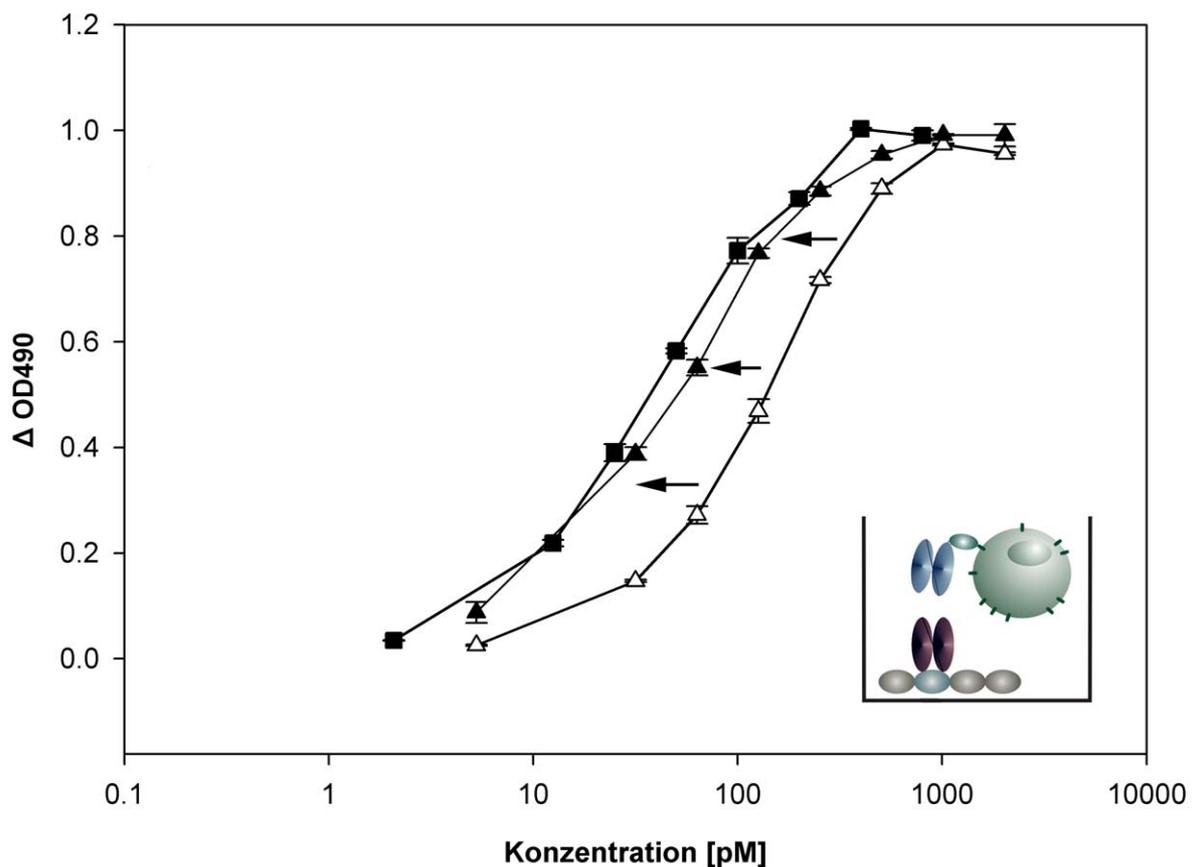


Abbildung 3-15: Kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest.

L19-IL2 Standard befand sich entweder frei im Medium (IL2 Bioaktivitätstest (■)), an sein Antigen 7B89 gebunden (L19-IL2 Bioaktivitätstest (Δ)) oder wurde durch Konkurrenz mit AP39 freigesetzt (kompetitiver L19-IL2 Bioaktivitätstest (▲)). Durch Konkurrenz von gebundenem L19-IL2 mit AP39 wurde die Aktivität um das zwei- bis dreifache gesteigert (Pfeile) und entsprach annähernd der Aktivität von freiem L19-IL2 im IL2-Bioaktivitätstest. Dargestellt sind repräsentative Dosis-Wirkungskurven aus einem von insgesamt drei Versuchen. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten aus einem Versuch. Das Piktogramm illustriert die Konkurrenz von L19-IL2 durch AP39 und die Bindung des freigesetzten L19-IL2 an den IL2 Rezeptor auf CTLL-2 Zellen.

Durch die Freisetzung von L19-IL2 im kompetitiven L19-IL2 Bioaktivitätstest wurde die Aktivität im Vergleich zu gebundenem L19-IL2 im L19-IL2 Bioaktivitätstest in drei unabhängigen Versuchen um das zwei- bis dreifache gesteigert (Abbildung 3-15). Die Aktivität des freigesetzten L19-IL2 entsprach dabei annähernd der Aktivität von freiem L19-IL2, die im IL2 Bioaktivitätstest bestimmt wurde. Somit wurde bestätigt, dass die Bindung von L19-IL2 an 7B89 größtenteils ursächlich für die verminderte Aktivität von L19-IL2 war. Durch das veränderte Testformat wurde hier ausgeschlossen, dass der Aktivitätsunterschied von L19-IL2 lediglich auf Unterschiede in der Durchführung des L19-IL2 Bioaktivitätstests und des IL2 Bioaktivitätstests zurückzuführen war, da der kompetitive L19-IL2 Bioaktivitätstest ebenso wie der L19-IL2 Bioaktivitätstest einen Waschschrift enthielt.

3.7. Internalisierung von L19-IL2

Unterschiede im Bindungs- und Internalisierungsverhalten von freiem und gebundenem L19-IL2 könnten ursächlich für die verminderte Aktivität von gebundenem L19-IL2 im Vergleich zu freiem L19-IL2 sein. Daher wurde mittels konfokaler Laserscanmikroskopie die Bindung des IL2 Anteils von freiem und gebundenem L19-IL2 an den IL2 Rezeptor (IL2-R) der CTLL-2 Zellen und die darauf folgende Internalisierung des IL2 Rezeptorkomplexes vergleichend untersucht.

3.7.1. Optimierung der Beschichtung der Mikrotiterplatten

Da es sich bei IL2 abhängigen CTLL-2 Zellen um Suspensionszellen handelte, musste zunächst ein Protokoll entwickelt werden, um die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte zu fixieren. Dies war notwendig, da für die Färbung mit verschiedenen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Zellen mehreren Waschschriften unterzogen werden mussten. In Vorversuchen wurden daher unterschiedliche Beschichtungen der Platten getestet, um die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte zu fixieren. Die besten Ergebnisse wurden mit 40 µl 0,005 % Poly-L-Lysine pro Kavität für 2 h bei 37 °C erzielt, wobei der überwiegende Teil der Zellen auch nach fünf Waschschriften in den Kavitäten verblieb (Daten nicht gezeigt).

Für den Vergleich der Internalisierung zwischen freiem und gebundenem L19-IL2 mussten die Platten zusätzlich mit Streptavidin beschichtet werden, um die Bindung von 7B89biotin an den Boden der Mikrotiterplatte zu ermöglichen. Die Inkubation der Kavitäten für 12 h bei 4 °C mit 100 µl Streptavidinlösung (10 µg/ml) war ausreichend,

um eine ausreichende Immobilisierung von 7B89biotin zu erreichen (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss der Plattenbeschichtung mit Poly-L-Lysine und Streptavidin auf die L19-IL2 Aktivität und die CTLL-2 Zellen wurde im IL2 Bioaktivitätstest und L19-IL2 Bioaktivitätstest analysiert. Dazu wurden unbeschichtete Platten, Poly-L-Lysine-beschichtete Platten, Streptavidin-beschichtete und mit beiden Komponenten beschichtete Platten miteinander verglichen. Die Poly-L-Lysine und Streptavidin Beschichtung hatte im IL2 Bioaktivitätstest keinen Einfluss auf die Zellen und die Aktivität des freien L19-IL2. Im L19-IL2 Bioaktivitätstest verliefen die resultierenden Dosis-Wirkungskurven von gebundenem L19-IL2 auf der Streptavidin-beschichteten Platten und der mit Poly-L-Lysine und Streptavidin beschichteten Platten deckungsgleich (Daten nicht gezeigt). Die Zellen und die Aktivität wurde also auch hier nicht durch die Beschichtung beeinflusst. Für weitere Versuche mit freiem L19-IL2 und gebundenem L19-IL2 wurden daher Platten verwendet die zunächst für 2 h mit Poly-L-Lysine bei 37 °C und anschließend mit Streptavidin für 12 h bei 4 °C beschichtet wurden.

3.7.2. Untersuchung der Internalisierung von L19-IL2 mittels CLSM

Nachdem die Bedingungen für die Beschichtung der Mikrotiterplatten optimiert worden waren, wurde die Bindung von freiem und gebundenem L19-IL2 an den IL2 Rezeptor (IL2-R) von CTLL-2 Zellen und dessen Internalisierung untersucht.

Der Test wurde auf einer Poly-L-Lysine- und Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte durchgeführt, wobei eine Plattenhälfte entsprechend dem Protokoll für den IL2 Bioaktivitätstest mit 4 nM freiem L19-IL2 behandelt wurde. Auf der zweiten Plattenhälfte, die dem L19-IL2 Bioaktivitätstest-Protokoll entsprechend zusätzlich mit 7B89 beschichtet wurde, wurden 4 nM L19-IL2 durch Bindung an 7B89 immobilisiert. Vor Zugabe der Zellen wurden diese für 2 h ohne IL2 kultiviert. Nach dieser Zeit war kein intrazelluläres oder membranständiges IL2 aus dem Kulturmedium mehr messbar, wie in Vorversuchen mittels CLSM gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und nach und nach auf die Mikrotiterplatte überführt und somit für 0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 170 min, 180 min mit freiem oder gebundenem L19-IL2 im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung des IL2 Anteils von L19-IL2 erfolgte mit einem FITC-markierten

Antikörper. Die α -Untereinheit des IL2-Rezeptors wurde mit einem Phycoerythrin markierten anti-IL2- α -Rezeptor Antikörper gefärbt, um den Rezeptor zusätzlich zu lokalisieren. Zur Anfärbung von Chromatin im Zellkern wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 verwendet. Die gefärbten Zellen wurden mit einem hochdurchsatzfähigen konfokalen Laserscannmikroskop fotografiert und mit der Bildanalysesoftware MetaXpress ausgewertet. Dabei musste eine Methode mit der Software entwickelt werden, mit der die Zellen auf den Originalbildern in ihre Zellmembran und ihr Zytoplasma unterteilt werden konnten, um zwischen membranständigen und intrazellulärem L19-IL2 unterscheiden zu können. Hierzu wurden fertige Module der Software mit eigenen Analyseverfahren kombiniert. Die Gesamtzellzahl wurde anhand der Anzahl der Zellkerne mit dem Modul „*count nuclei*“ ermittelt. Mit dem Algorithmus „*watershed segmentation*“ wurden Objektmasken für das Zytoplasma und die Zellmembran erstellt, wobei das Plasma als die Fläche definiert wurde, die zum einen einem Kern enthält und zum anderen durch eine Membran begrenzt ist. Als Membranmarker diente dabei der membranständige IL2-R. Mit Hilfe der Membran- Objektmaske wurde dann die Intensität des FITC Signals an der Membran ermittelt, welches ein Maß für das membranständige L19-IL2 war. Mit der Objektmaske für das Zytoplasma und dem Modul „*transflour*“ wurden intrazelluläre FITC Signale gemessen, die intrazellulärem L19-IL2 zugeordnet wurden. Mit dieser Auswerteroutine wurden in den Internalisierungsexperimenten über 10000 Zellen auf Einzelzellniveau analysiert.

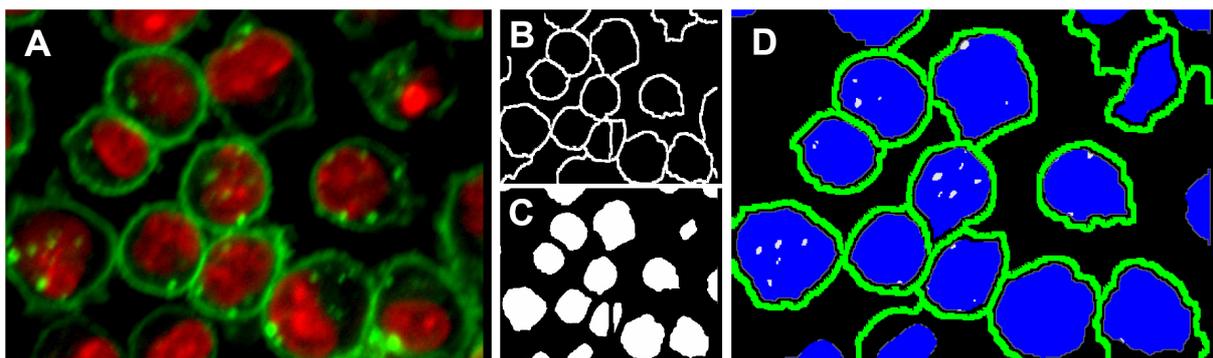


Abbildung 3-16: Bildanalyse von CTLL-2 Zellen mittels MetaXpress-Software.

Vom Originalbild (A) wurden mit der Software MetaXpress mit dem Algorithmus „*watershed segmentation*“ Objektmasken für die Zellmembran (B) und das Zytoplasma (C) erstellt. Anhand dieser Objektmasken wurden die Originalbilder ausgewertet, indem die Intensität des L19-IL2 Signals an der Membran sowie lokal begrenzte L19-IL2 Signale im Inneren der Zellen gemessen wurden (D). Auf dem Bild mit den kombinierten Objektmasken (D) sind die Membranobjektmaske grün, die Plasmaobjektmaske blau und intrazelluläre L19-IL2 Signale weiß dargestellt. Auf dem Originalbild (A) sind die Zellkerne rot und L19-IL2 grün dargestellt.

3.7.3. Kinetik der L19-IL2 Internalisierung

Unmittelbar nach Beginn der Inkubation der Zellen mit L19-IL2 wurde an der Zellmembran eine gleichmäßige Grünfärbung durch FITC-markierte Antikörper gemessen und zeigte somit die Bindung von L19-IL2 an die Zellmembranen der Zellen (weiße Pfeilköpfe in Abbildung 3-17A). Die L19-IL2 Signale traten dabei stets gekoppelt mit IL2-R Signalen auf (Abbildung 3-18A). Die Anlagerung von L19-IL2 an die Zellmembran beruhte also folglich auf einer spezifischen Bindung des konjugierten IL2 von L19-IL2 an den membranständigen IL2-Rezeptor. Gemessen wurde diese Korrelation beider Farbsignale entlang einer Linie durch einzelne Zellen.

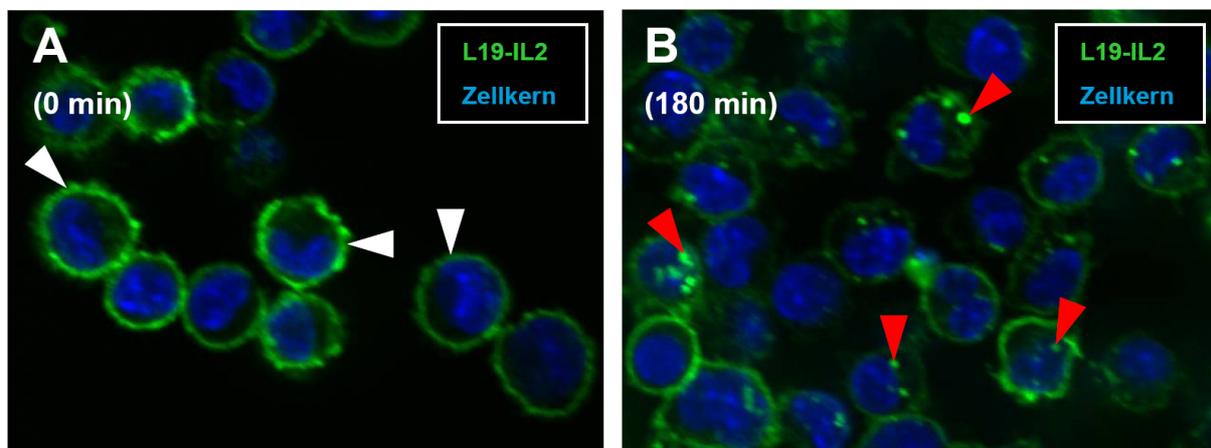


Abbildung 3-17: Bindung und Internalisierung von L19-IL2.

CTLL-2 Zellen wurden unterschiedlich lange mit 4 nM L19-IL2 inkubiert, anschließend fixiert und mit FITC-markierten anti-IL2 Antikörpern gefärbt. (A) Bereits unmittelbar nach dem Beginn der Inkubation lagerte sich L19-IL2 an die Zellmembran an (weiße Pfeilspitzen). (B) Nach 180 min hatte das Signal an der Zellmembran stark abgenommen, stattdessen wurde L19-IL2 im Zellplasma detektiert (rote Pfeilspitzen). Dargestellt sind zwei Bilder von Zellen, die mit freiem IL2 inkubiert wurden.

Das L19-IL2 Signal an der Membran nahm innerhalb weniger Minuten rasch zu (Abbildung 3-19A). Bei Zellen, die mit freiem L19-IL2 inkubiert wurden, wurde die maximale Bindung von L19-IL2 an die membranständigen IL2-R bereits innerhalb von 10 min erreicht. Bei der Inkubation mit L19-IL2, welches an sein Antigen gebunden und dadurch immobilisiert war, wurde das Maximum der Membranintensität hingegen erst nach 30 min erreicht. Mit fortschreitender Inkubationszeit nahmen die Signale an der Zelloberfläche kontinuierlich ab. Gleichzeitig wurde zunehmend L19-IL2 intrazellulär als lokal begrenzte FITC Signale in Zellplasma detektiert (rote Pfeilköpfe in Abbildung 3-17B). Diese intrazellulären L19-IL2 Signale traten auch hier gepaart mit den IL2-R Signalen auf, was durch die

Analyse der Verteilung der Farbsignale entlang einer Linie durch einzelne Zellen gezeigt wurde (Abbildung 3-18B). Daraus wurde geschlossen, dass L19-IL2 nach Bindung an den IL2-R in einem Komplex mit dem IL2-Rezeptor internalisiert wurde. Dieser Prozess lief sehr schnell ab. Schon nach 30 min bis 60 min stellte sich eine konstante Menge von internalisiertem L19-IL2 ein, wobei zwischen freiem und gebundenem L19-IL2 Unterschiede zu erkennen waren (Abbildung 3-19B). Wurden die Zellen mit freiem L19-IL2 inkubiert, befanden sich in jeder Zelle durchschnittlich ca. 1,5 Signale pro Zelle. Lag das L19-IL2 jedoch an sein Antigen gebunden vor, befand sich durchschnittlich nur etwa ein Signal in jeder Zelle. Im Zeitintervall von 150 min bis 180 min fielen die Signale in beiden Fällen wieder etwas ab.

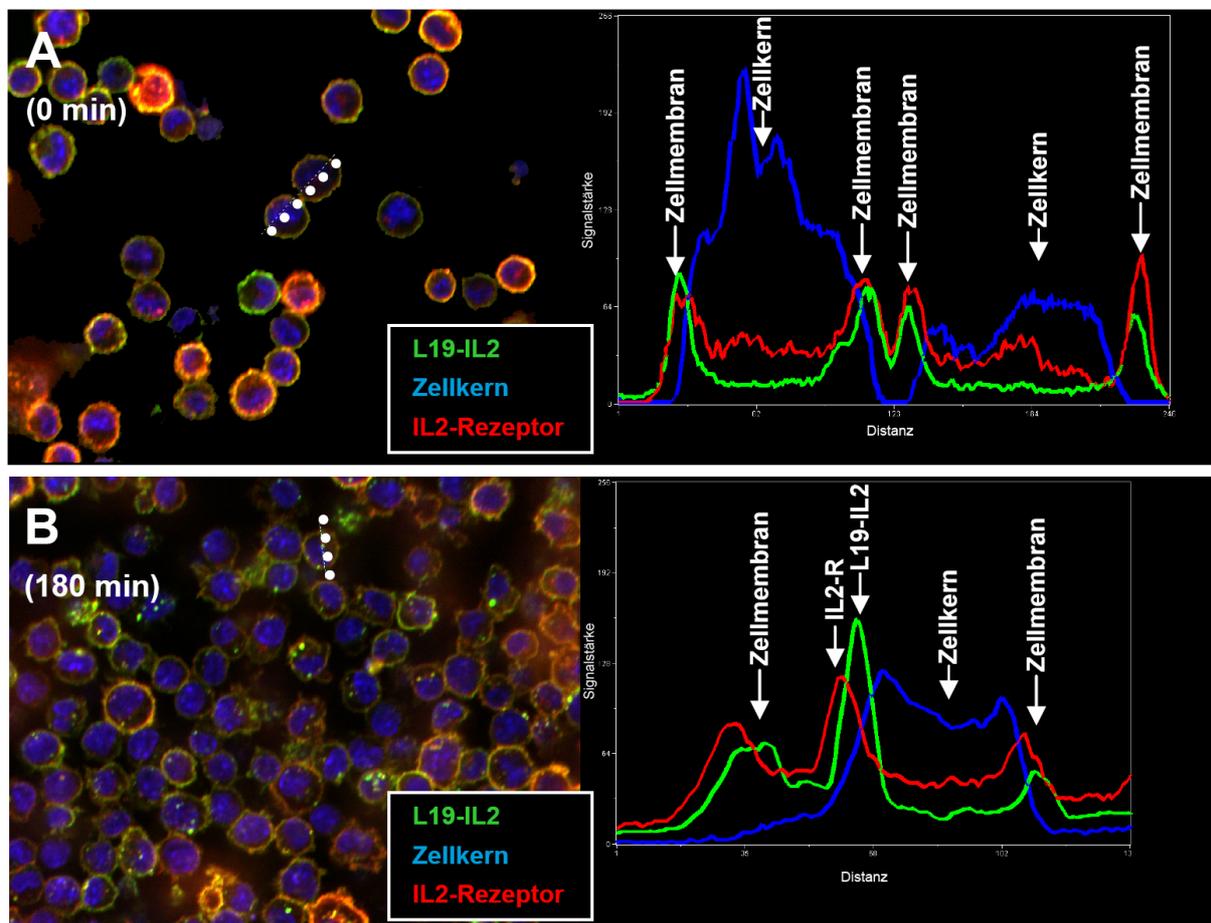


Abbildung 3-18: Untersuchung der Lokalisation von L19-IL2 und des IL2 Rezeptors mittels CLSM.

CTLL-2 Zellen wurden unterschiedlich lange mit 4 nM L19-IL2 inkubiert, anschließend fixiert und mit FITC-markierten anti-IL2 Antikörpern (grün) und PE-markierten anti-IL2- α -Rezeptor Antikörpern (rot) gefärbt. Chromatin im Zellkern wurde mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die Verteilung der Farbsignale wurde entlang einer Linie durch einzelne Zellen analysiert (gepunktete Linien). (A) Erhöhte Signale von L19-IL2 und dem IL2-R traten gepaart bereits unmittelbar nach der Inkubation mit L19-IL2 an den Zellmembranen auf. (B) Intrazelluläre L19-IL2 Signale traten ebenfalls gepaart mit dem IL2-Rezeptorsignal auf.

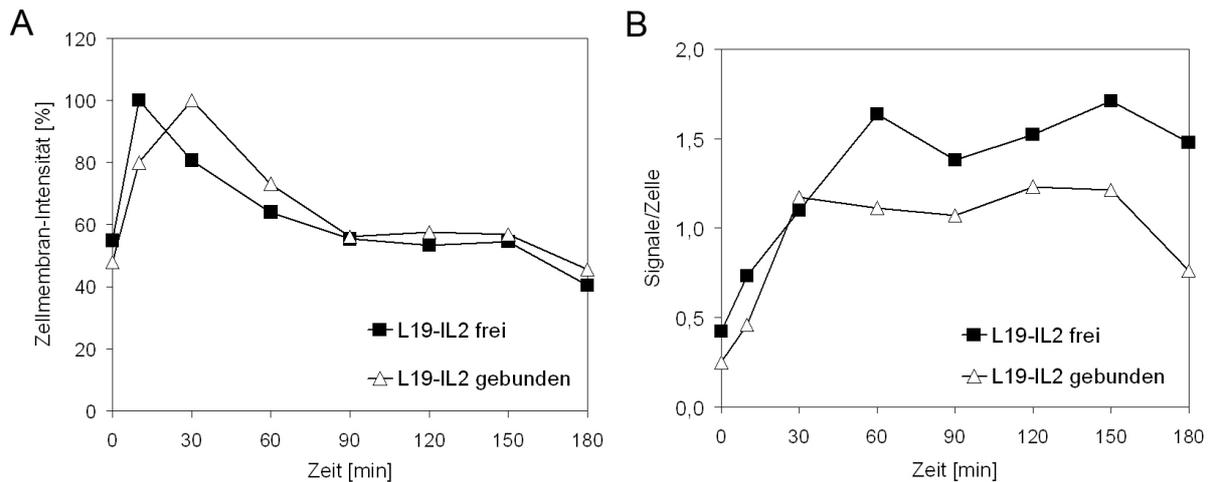


Abbildung 3-19: Kinetik der Internalisierung von L19-IL2.

CTLL-2 Zellen wurden für 0 min bis 180 min mit 4 nM freiem oder an 7B89 gebundenem L19-IL2 inkubiert, anschließend fixiert und mit FITC-markierten anti-IL2 Antikörpern gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit der Software MetaXpress. (A) Dargestellt ist die Membranintensität des FITC Signals, wobei das jeweils höchste Signal als 100 %-Wert aufgetragen wurde. Freies L19-IL2 lagerte sich innerhalb von 10 min und gebundenes L19-IL2 innerhalb von 30 min an die Membran an. Danach nahmen die Signale kontinuierlich ab. (B) Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der intrazellulären L19-IL2 Signale pro Zelle. Nach 30 min bis 60 min stellte sich ein Maximum ein, wobei in Zellen, die mit freiem L19-IL2 behandelt wurden durchschnittlich 1,5 Signale pro Zelle detektiert wurden. In Zellen, die mit gebundenem L19-IL2 inkubiert wurden, wurde etwa ein Signal pro Zelle nachgewiesen. Nach 150 min nahmen die Signale etwas ab. Die Ergebniswerte zu jedem Zeitpunkt repräsentieren Mittelwerte von 300 bis 1000 auf Einzelzellniveau analysierten Zellen.

3.8. L19-IL2 vermittelte Signalübertragung in CTLL-2 Zellen

Die Bindung von IL2 an den hoch affinen IL2 Rezeptor führt zur Aktivierung der Janus Kinase 1 (JAK1) und Janus Kinase 3 (JAK3). Als Konsequenz daraus werden drei intrazelluläre Signalwege induziert: der Ras/Raf/MAPK Signalweg, der PI3K/Akt Signalweg und der JAK-STAT Signalweg. Letzterer löst durch STAT5 ein Programm aus, welches Zellen in ihrem Zellzyklus aus der G₁-Phase in die S-Phase übertreten lässt und in Folge zur mitotischen Teilung der Zellen führt [52]. Um zu untersuchen, ob die Bindung des IL2 Anteils von gebundenem und freiem L19-IL2 an den IL2-R diese intrazelluläre Signalübertragung induziert, wurde die IL2 induzierte STAT5 Signaltransduktion in CTLL-2 Zellen mit freiem und gebundenem L19-IL2 mittels Western Blots vergleichend untersucht.

Da unter normalen Kulturbedingungen der JAK-STAT Signalweg aufgrund des Vorhandenseins von IL2 im Kulturmedium permanent aktiv ist, wurde in einem ersten Versuch zunächst ermittelt wie lange die Zellen ohne IL2 kultiviert werden mussten, um den Signalweg vollständig zu unterbinden. Hierzu wurden CTLL-2 Zellen in drei

Ansätze entweder für 4 h bzw. 20 h in Medium ohne IL2 oder für 20 h in Medium mit IL2 kultiviert und anschließend lysiert. Die Zellysate wurde daraufhin elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine 0,45 µm PVDF Membran transferiert. Der Nachweis des JAK-STAT Signalweges erfolgte über die Detektion mit folgenden Antikörpern: anti-STAT5, anti-Phospho-STAT5 und anti-GAPDH. Im Gegensatz zu Zellen, die in Medium mit IL2 kultiviert worden waren, wurden in den Ansätzen ohne IL2 Stimulation nach 4 h und 20 h nur noch in sehr geringen Mengen aktiviertes, phosphoryliertes STAT5 detektiert (Abbildung 3-20). Der STAT5 Signalweg war folglich bereits nach 4 h annähernd inaktiv. Zur Kontrolle wurde das inaktive, unphosphorylierte STAT5 detektiert, welches auch nach 20 h Kultivierung ohne IL2 noch nachgewiesen wurde. Durch Nachweis des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches in allen drei Ansätzen vergleichbar stark exprimiert wurde, wurde gezeigt, dass sich in allen drei Ansätzen annähernd die gleiche Menge Gesamtprotein befand.

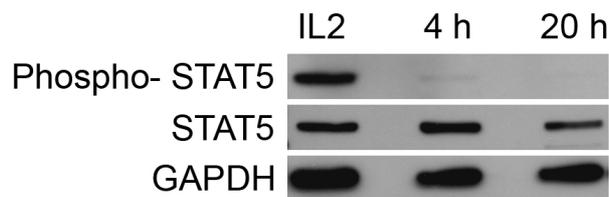


Abbildung 3-20: Western Blot zum Nachweis des JAK-STAT Signalweges in CTLL-2 Zellen.

CTLL-2 Zellen wurden entweder für 4 h bzw. 20 h in Medium ohne IL2 oder für 20 h in Medium mit IL2 kultiviert, anschließend lysiert, elektrophoretisch getrennt und auf eine 0,45 µm PVDF Membran transferiert. Mit einem anti-STAT5 Antikörper wurde in allen drei Ansätzen das Protein STAT5 nachgewiesen. Im Gegensatz zur Kontrolle (IL2) wurde es bei Zellen ohne IL2 Stimulation bereits nach 4 h nur in sehr geringer Menge in seiner aktiven, phosphorylierten Form nachgewiesen. Anhand der Detektion von GAPDH wurde gezeigt, dass sich in allen drei Ansätzen annähernd gleiche Mengen an Gesamtprotein befanden.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob sich der JAK-STAT Signalweg durch freies und gebundenes L19-IL2 aktivieren ließ. Hierzu wurden CTLL-2 Zellen aus der Zellkultur zunächst für 4 h in Medium ohne IL2 kultiviert, um den Signalweg zu unterbinden. Anschließend wurden die Zellen für 30 min entsprechend den Protokollen für den IL2 Bioaktivitätstest (2.3.2) und den L19-IL2 Bioaktivitätstest (2.3.3) mit 2 nM freiem L19-IL2 und 2 nM gebundenem L19-IL2 inkubiert. Als Positivkontrollen dienten Zellen, die mit 2 nM IL2 inkubiert wurden. Als Negativkontrollen wurden Zellen verwendet, die über die gesamte Versuchszeit ohne

IL2 kultiviert wurden. Aus den Zellen wurden anschließend Zelllysate hergestellt und wie bereits beschrieben analysiert.

In den Ansätzen mit IL2, freiem L19-IL2 und gebundenem L19-IL2 konnte phosphoryliertes STAT5 detektiert werden. In allen drei Ansätzen wurde folglich der JAK-STAT Signalweg innerhalb von 30 min aktiviert. In der Negativkontrolle ohne IL2 wurde nur die unphosphorylierte Form von STAT5 nachgewiesen (Abbildung 3-21). Folglich war der Signalweg nicht aktiv. Durch den Nachweis von GAPDH wurde gezeigt, dass sich in allen Ansätzen annähernd die gleiche Menge Gesamtprotein befand.

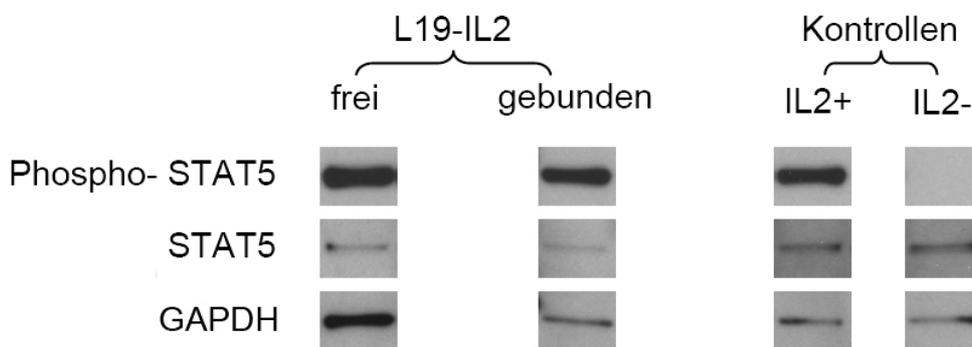


Abbildung 3-21: Aktivierung des JAK-STAT Signalweges durch L19-IL2.

CTLL-2 Zellen wurden für 4 h in Medium ohne IL2 kultiviert und anschließend für 30 min mit freiem L19-IL2, gebundenem L19-IL2, IL2 oder ohne IL2 inkubiert, anschließend lysiert, elektrophoretisch getrennt und auf eine 0,45 µm PVDF Membran transferiert. In Zellen, die mit freiem L19-IL2, gebundenem L19-IL2 oder IL2 stimuliert wurden, wurde der aktivierte Signalweg anhand von phosphoryliertem STAT5 nachgewiesen. STAT5 wurde in allen vier Ansätzen detektiert. Anhand der Detektion von GAPDH wurde gezeigt, dass sich in allen Ansätzen annähernd die gleiche Menge Gesamtprotein befand.

4. Diskussion

Monoklonale Antikörper und Immunkonjugate wie beispielsweise Immunzytokine werden seit über 30 Jahren als potentielle Therapeutika erforscht und klinisch getestet. Immunzytokine sind bifunktionale Proteine, die aus einem monoklonalen Antikörper oder Antikörperderivat und einem konjugierten Zytokin bestehen. Aufgrund der Eigenschaft des Antikörperanteils Krankheits-assoziierte Antigene zu binden, können Zytokine in der unmittelbaren Umgebung des Krankheitsherdes angereichert werden, wodurch es zu einer lokal begrenzten Aktivierung des körpereigenen Immunsystems kommt [53].

Gegenwärtig befinden sich sechs Immunzytokine zur Krebstherapie in klinischen Phasen und viele weitere sind in der Entwicklung der pharmazeutischen Industrie [14]. Um die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Medikamente zu garantieren, bedarf es einer genauen Charakterisierung der Wirkmechanismen und der Bestimmung der biologischen Aktivität dieser Produkte. Die Entwicklung geeigneter analytischer Methoden zur Charakterisierung und Aktivitätsbestimmung des Immunzytokins L19-IL2 war daher zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit, wobei besonders die Bifunktionalität des Immunzytokins im Fokus stand.

4.1. Evaluation der Bindungseigenschaften von L19-IL2

Für die Wirkung des Immunzytokins L19-IL2 ist die Fähigkeit sein Antigen spezifisch zu binden essentiell. Daher wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz Technologie die Avidität zwischen dem L19-IL2 Dimer und 7B89 bestimmt. Die verwendete Methode erwies sich als spezifisch und geeignet, wobei die Avidität des L19-IL2 Dimers $3,25 \cdot 10^{-9} \text{M}$ betrug. Im Vergleich dazu wurde für den monovalenten scFv L19 eine deutlich höhere Affinität von $5,4 \cdot 10^{-11} \text{M}$ publiziert [23]. Die etwa 100fach schwächere Bindungsstärke des bivalenten L19-IL2 lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die Kopplung von IL2 an den scFv L19 und die Dimerisierung zu einem Verlust der Bindungsstärke führte. Untersuchungen an athymischen Nacktmäusen mit einem embryonalen Teratokarzinom (F8), die mit ^{131}I -markierten Dimeren des scFv L19 behandelt worden waren, zeigten jedoch, dass die Dimere effektiv an das Blutgefäßsystem des Tumors banden. Die Dimere akkumulierten aufgrund wiederholter Bindungen (*rebinding effects*) sogar besser in

der Tumorumgebung als die Monomere [54]. Diese hervorragenden Bindeeigenschaften wurden mit ^{125}I -markierten L19 Dimeren in 20 Patienten mit Lungenkarzinomen, Gehirnkarcinomen oder kolorektalen Tumoren bestätigt [27]. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen, die ebenfalls mit athymischen Nacktmäusen durchgeführt wurden, dass auch L19 Dimere, die mit IL2 konjugiert wurden, selektiv an ihr Tumor-assoziiertes Antigen banden und somit IL2 in der Tumorumgebung anreicherten [28]. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz reduzierter Bindungsstärke des L19-IL2 Dimers, dieses Protein hervorragend in 7B89 exprimierendem Tumorgewebe akkumuliert.

4.2. Bestimmung der biologischen Aktivität von L19-IL2

Neben der Bestimmung der Bindungseigenschaften von L19-IL2 war auch die Bestimmung der biologische Aktivität des konjugierten IL2 von L19-IL2 für die Charakterisierung des Immunzytokins nötig. L19-IL2 wurde daher vergleichend zu IL2 in einem IL2 Bioaktivitätstest analysiert, wobei sich das Testformat an klassischen IL2 Tests orientierte [36]. Die biologische Aktivität von L19-IL2 war vergleichbar mit der Aktivität eines IL2 Referenzstandards, jedoch berücksichtigte das klassische Testformat nicht die Bindeeigenschaften des Antikörperanteils L19.

Von der internationalen Konferenz für Harmonisierung (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), einem Zusammenschluss der regulatorischen Behörden der Europäischen Union, Japans und der USA, wird allerdings gefordert, dass ein Aktivitätstest (*potency assay*), zur Bestimmung der biologischen Aktivität eines Produktes, sämtliche Eigenschaften des Produktes berücksichtigen muss, die letztendlich den biologischen, therapeutischen Effekt vermitteln. Der Test sollte folglich das Wirkungsprinzip eines Medikamentes widerspiegeln. Im Falle des bifunktionalen Immunzytokin L19-IL2 bedeutet dies, dass ein Bioaktivitätstest sowohl die Bindeeigenschaften des scFv L19 als auch die stimulierenden Effekte des konjugierten IL2 berücksichtigen muss. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein L19-IL2 Bioaktivitätstest entwickelt, der diesen Anforderungen gerecht wird. Das neue Testformat ist eine Kombination aus einem Ligand-Bindungstest (*ligand binding assays*, LBA) für den Antikörperanteil L19 und einem zellbasierten Aktivitätstest für das konjugierte Zytokin IL2. Das neue Format erlaubt somit die gleichzeitige

Evaluation beider funktioneller Einheiten des Immunzytokins und stellt folglich eine deutliche Verbesserung verglichen zu Ligand-Bindungstests oder klassischen IL2 Bioaktivitätstests dar, die auf jeweils eine funktionelle Einheit des Immunzytokins beschränkt sind.

4.2.1. Entwicklung und Validierung des L19-IL2 Bioaktivitätstest

Bioanalytische Methoden, wie auch der L19-IL2 Bioaktivitätstest unterliegen einer Vielzahl von Schwankungen [55]. Die Messergebnisse können beispielsweise von unterschiedlichen Medienchargen, Inkubationszeiten, der Geschwindigkeit der Reagenzienzugabe, Unterschieden bei der Zugabe der Zellen, vom Alter oder der Menge der verwendeten Zellen beeinflusst werden. Um einen validen und robusten Test zu erhalten, wurden daher während der Methodenentwicklung alle wesentlichen Parameter und Testschritte optimiert. Darüber hinaus wurde mit der Stabilitätsprüfung des im Test eingesetzten L19-IL2 und 7B89 Antigens gezeigt, dass L19-IL2 auch nach wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen seine gesamte Aktivität beibehält und 7B89 ohne Aktivitätsverlust bis zu 17 Monate bei 4 °C gelagert werden kann.

Im Rahmen der Validierung des neuen L19-IL2 Bioaktivitätstests sollte gezeigt werden, dass das Format für die Aktivitätsbestimmung von L19-IL2 geeignet ist. Eine solche Methodvalidierung wird im Rahmen des Zulassungsverfahrens eines neuen Medikamentes von internationalen Behörden wie beispielsweise der Europäischen Arzneimittelagentur (*European Medicines Agency, EMA*) oder der US-amerikanischen Zulassungsbehörde für Lebensmittel und Medikamente (*Food and Drug Administration, FDA*) gefordert, wobei die Validität einer Methode anhand verschiedener Parameter beurteilt wird. Für biologische Aktivitätstests sind dies neben der Spezifität auch die Präzision, Richtigkeit und Linearität einer Methode [56]. Der L19-IL2 Bioaktivitätstest erwies sich als spezifisch für L19-IL2, da weder der scFv L19 noch freies IL2 allein in Test die Proliferation der Indikatorzelllinie CTLL-2 induzierten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der neue Test nur die Aktivität des integren Immunzytokin misst, welches sowohl über einen intakten Antikörperanteil als auch über ein konjugiertes IL2 verfügt. Ein Einfluss auf das Testergebnis von L19-IL2 Proteinen mit unzureichenden Bindungseigenschaften des Antikörperanteils L19, aber funktionell aktivem IL2 wurde somit im Gegensatz zum klassischen IL2 Bioaktivitätstest ausgeschlossen.

Für die Bestimmung der Präzision, Richtigkeit und Linearität einer Methode muss ein umfangreicher Datensatz erhoben werden, auf dessen Grundlage statistisch signifikante Aussagen getroffen werden können. Seit dem ersten und zweiten Workshop der amerikanischen Gesellschaft pharmazeutischer Wissenschaftler (*American Association of Pharmaceutical Scientists, AAPS*) und der FDA im Dezember 1990 und Januar 2000 existieren detaillierte Vorgaben für den Umfang der Datenerhebung für die Validierung bioanalytischer Methoden [44,57,58]. Diese Vorgaben beziehen sich allerdings in erster Linie auf LBA und mussten daher für die Validierung des zellbasierten L19-IL2 Bioaktivitätstests übertragen und erweitert werden. Für die Validierung wurden daher 25 Versuche durchgeführt, wobei insgesamt 50 Einzelergebnisse mittels „parallel-line“ Analyse (PLA) mit einem linearen Regressionsmodell oder einer „parallel-curve“ Analyse (PCA) erhoben wurden. Sowohl in der europäischen als auch amerikanischen Pharmakopoe ist vorgeschrieben, dass jedes dieser Einzelergebnisse auf seine Zulässigkeit durch Varianzanalysen (F-Tests) der Steigung, Linearität und Parallelität der zugrunde liegenden Dosis-Wirkungskurven von Standard und Probe überprüft werden muss. Obwohl mit der PLA alle vorgeschriebenen F-Tests bestanden wurden, ist diese Art der Analyse für die Auswertung von bioanalytischen Verfahren mittlerweile umstritten, da das zugrunde liegende lineare Regressionsmodell auf den linearen Teil der Dosis-Wirkungskurve beschränkt ist und folglich den sigmoiden Verlauf der Kurven nur unzureichend abbildet [59]. Ein vielversprechender Ansatz ist daher die PCA, die auf einem nicht-linearen 4 PL oder einem 5 PL basiert. Im Falle des L19-IL2 Bioaktivitätstest spiegelte das 5 PL den Verlauf der Dosis-Wirkungskurven noch besser als das 4 PL wider, wodurch deutlich mehr Tests auf Linearität bestanden wurden (90 %). Dies liegt daran, dass durch den fünften Parameter Asymmetrien im Kurvenverlauf besser abgebildet werden [60]. Neben der Linearität der einzelnen Dosis-Wirkungskurven, ist die Parallelität zwischen Standard- und Probenkurven unbedingte Voraussetzung für die Zulässigkeit eines Ergebnisses, da dadurch die Gleichheit von Probe und Standard gezeigt wird [61]. Für den Test auf Parallelität ergaben sich für das 4 PL und das 5 PL keine Unterschiede, wobei ein geringer Prozentsatz der 50 Einzelergebnisse den Test nicht bestand, obwohl die Kurven augenscheinlich parallel verliefen. Die Ursache dafür könnte die geringe Schwankung zwischen den Messwerten der Dosis-Wirkungskurven sein, welche in Duplikaten aufgenommen wurden. Die Tatsache, dass an sich akzeptable Versuche

aufgrund der hohen Präzision der Messwerte durch den F-Test fallen, wohingegen offensichtlich nicht parallele Kurven den F-Test aufgrund einer hohen Schwankung bestehen, wurde kürzlich auch vom Komitee, das gegenwärtig das Kapitel 111 der amerikanischen Pharmakopoe zur Auswertung bioanalytischer Verfahren überarbeitet, festgestellt [62]. Ein alternatives statistisches Verfahren, um dieses Problem zu überwinden, welches momentan heftig debattiert wird, nennt sich Äquivalenzprüfung (*equivalence testing*). Im Gegensatz zum F-Test erlaubt diese Methode minimale Abweichungen von der Parallelität. Der Grund dafür liegt in den unterschiedlichen statistischen Hypothesen. Anstelle der Nullhypothese der Parallelität und der alternativen Hypothese der nicht-Parallelität, wie sie im F-Test verwendet werden, ist beim *equivalence testing* nicht-Parallelität die Nullhypothese und „ausreichend parallel“ die alternative statistische Hypothese. Dieser Ansatz berücksichtigt dadurch, dass sich die Standard und Proben Dosis-Wirkungskurve etwas voneinander unterscheiden können. Sofern diese Unterschiede aber sehr gering sind, werden die Standard- und Probenkurven trotzdem als parallel bzw. gleich betrachtet.

Für die 50 Einzelergebnisse, die im Rahmen der Validierung des L19-IL2 Bioaktivitätstests erhoben wurden, ergab die Auswertung mittels PCA mit einem 5 PL auf einem Signifikanzniveau von $p > 0,02$ die Zulässigkeit von 47 Ergebnissen. Diese Ergebnisse wurden anschließend für die Bestimmung der Präzision, Richtigkeit und Linearität verwendet. Alle dabei ermittelten Parameter lagen unter den akzeptierten Grenzwerten für bioanalytische Methoden [41,44-46,48-50] und zeigten somit, dass der Test präzise und verlässliche Ergebnisse für die Aktivität von L19-IL2 liefert.

4.3. Immobilisierung von L19-IL2

L19-IL2 wurde vergleichend im L19-IL2 Bioaktivitätstest und im klassischen IL2 Bioaktivitätstest analysiert. Dabei wurde im Vergleich zum IL2 Bioaktivitätstest im L19-IL2 Bioaktivitätstest nur etwa ein Drittel der Aktivität von L19-IL2 gemessen. Durch die Entwicklung eines kompetitiven L19-IL2 Bioaktivitätstests, in dem bereits an 7B89 gebundenes L19-IL2 durch das kompetitive Antikörperfragment AP39 wieder in Lösung gebracht wurde, wurde gezeigt, dass die Bindung von L19-IL2 an sein Antigen 7B89 und die daraus resultierende Immobilisierung von L19-IL2 ursächlich für den beobachteten Aktivitätsverlust war. Der Einfluss der

Immobilisierung auf die Aktivität von IL2 wurde in der Literatur bereits ausführlich beschrieben. Als mögliche Ursache für das unterschiedlich hohe Potential von freiem und immobilisiertem IL2 die Proliferation von IL2 abhängigen Zellen zu induzieren, ist ein unterschiedliches Internalisierungspotential des IL2-Rezeptorkomplexes in Erwägung zu ziehen.

Untersuchungen von Kumar et al. legen nahe, dass sowohl die Bindung von IL2 an den IL2-Rezeptor (IL2-R) sowie die anschließende Internalisierung des IL2-Rezeptorkomplexes Voraussetzung für die Induktion der Zellproliferation von T-Lymphozyten sind [63]. In ihren Experimenten verhinderten sie die Internalisierung des IL2-R in den T-Helferzelllinien L-14 und HAT-12 durch einen IL2-R spezifischen Antikörper, wobei die Bindung von IL2 an den Rezeptor durch diesen Antikörper nicht behindert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindung von IL2 an den IL2-R allein nicht ausreichte, um in den Zellen Proliferation zu induzieren. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen von Duprez et al. an humanen T-Zellklonen (IARC 301) bestätigt [64]. Die Autoren verwendeten einen für die α -Untereinheit des IL2-R spezifischen Antikörper und einen zusätzlichen, sekundären Antikörper zur Quervernetzung, wodurch die Internalisierung des Rezeptors und die Proliferation der T-Zellen verhindert wurden. Auch in diesen Experimenten wurde die IL2 Bindestelle durch die Antikörper nicht behindert, so dass IL2 ungehindert an seinen Rezeptor binden konnte. Von beiden Autoren wird folglich der Schluss gezogen, dass die Internalisierung des IL2-Rezeptorkomplexes die notwendige Voraussetzung zur Induktion der Zellproliferation ist.

Ein direkter experimenteller Ansatz zur Klärung der Frage, ob Internalisierung für das Wachstum von T-Lymphozyten nötig ist, wurde von Horwitz et al. verfolgt. IL2 wurde in diesen Experimenten kovalent an eine Glutaraldehydmatrix gebunden, wodurch die laterale Diffusion des Zytokins sowie die Internalisierung des IL2-R verhindert wurden. Im Gegensatz zu den Versuchen von Kumar et al. und Duprez et al. wurde eine geringe Proliferation der verwendeten CTLL-2 Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse legen demnach nahe, dass ein Teil der IL2 Aktivität und der IL2 vermittelten Effekte trotz der Immobilisierung von IL2 erhalten bleibt.

Um die Auswirkungen der Immobilisierung von L19-IL2 auf die Internalisierung des IL2-Rezeptorkomplexes zu untersuchen, wurde die Bindung von freiem und gebundenem L19-IL2 an den IL2-Rezeptor von CTLL-2 Zellen und die darauf folgende Internalisierung des Rezeptorkomplexes mittels CLSM vergleichend

untersucht. Die Analysen zeigten, dass sowohl der IL2-Anteil von freiem als auch von gebundenem L19-IL2 an den IL2-R bindet und dieser Komplex anschließend internalisiert wird. Internalisiertes L19-IL2 wurde dabei in Form von intrazellulären, lokal begrenzten Signalen gemeinsam mit der α -Untereinheit des IL2-R detektiert. Bereits ältere elektronenmikroskopische Arbeiten mit Gold-markierten IL-2 Rezeptoren [65], Gold-markiertem IL2 [66] oder radioaktiv-markiertem IL2 [67], legen nahe, dass es sich bei den lokal begrenzten, intrazellulären Signalen um IL2-Rezeptorkomplexe handelt, die in Endosomen akkumulieren. Diese Ergebnisse wurden durch konfokale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Hemar et al. bestätigt, die in ihren Experimenten mit humanen T-Zellklonen (IARC 301,5) zeigten, dass es sich bei diesen Endosomen um Transferrin-positive Kompartimente und somit um frühe Endosomen handelt, die die α -Untereinheit des IL2-R zurück an die Plasmamembran transportieren, wo sie für einen weiteren endozytotischen Vorgang zur Verfügung stehen [68].

Die Kinetik der Internalisierung von freiem und gebundenem L19-IL2 war annähernd gleich, wobei nach 30 min bis 60 min eine konstante Anzahl an L19-IL2-haltigen Endosomen im Zytoplasma detektiert wurde. Die Geschwindigkeit mit der L19-IL2 internalisiert wurde, war dabei vergleichbar mit der von IL2, die bei humanen T-Zellklonen (IARC 301)[64], den T-Zelllinien ILT-Yan, TL-Mor [69] und humanen YT Zellen [70] ebenfalls zwischen 30 min und 60 min lag.

Der Nachweis von L19-IL2 im Komplex mit dem IL2-R im Zytoplasma von CTLL-2 Zellen, die mit gebundenem L19-IL2 behandelt worden waren, war unerwartet, da dies bedeutete, dass L19-IL2 oder Fragmente dieses Proteins trotz vorheriger Immobilisierung internalisiert wurden. Für diesen Befund kommen unterschiedliche Erklärungen in Frage. Zum einen könnte eine ineffiziente Immobilisierung des L19-IL2 Dimers zu einer partiellen Dissoziation vom Antigen und zu einer anschließenden Internalisierung geführt haben. Des Weiteren könnte der Zerfall des Dimers in zwei L19-IL2 Monomere dazu geführt haben, dass Monomere mit funktionell aktivem IL2 internalisiert wurden. Als dritte Möglichkeit käme eine proteolytische Abspaltung von IL2 aus dem immobilisierten Dimer mit anschließender IL2-R abhängiger Internalisierung in Frage.

Obwohl gebundenes L19-IL2 oder L19-IL2 Fragmente mit funktionell aktiver IL2-Domäne internalisiert wurden, ergaben sich Unterschiede zwischen Zellen, die mit gebundenem oder freiem L19-IL2 behandelt worden waren. So wurde deutlich

weniger L19-IL2 von Zellen internalisiert, die mit gebundenem L19-IL2 behandelt worden waren, was mit einer verminderten Proliferation dieser Zellen korrelierte.

Um mögliche Gründe dafür zu analysieren, ist es wichtig zu erörtern, wie die IL2 abhängige Proliferation induziert wird. Nach Bindung von IL2 an den IL2-R, der aus einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht, kommt es zur Interaktion der β - und γ -Untereinheit und in Folge zur Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils der Rezeptorketten durch die aktivierte Janus Tyrosinkinase 1 (JAK1) und Janus Tyrosinkinase 3 (JAK3) [71]. Als Konsequenz daraus werden der Ras/Raf/MAPK Signalweg [72], der PI3K/Akt Signalweg [73] und der JAK-STAT Signalweg [74] induziert, wodurch Zellen in ihrem Zellzyklus aus der G₁-Phase in die S-Phase übertreten und sich letztendlich mitotisch teilen. Die Signalübertragung hält dabei solange an bis der Rezeptor internalisiert wird [75], wobei die β - und γ -Untereinheit des IL2-R anschließend degradiert werden und die α -Untereinheit wieder an die Zelloberfläche gelangt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot Analysen nachgewiesen, dass in CTLL-2 Zellen, die mit immobilisiertem L19-IL2 stimuliert wurden, der JAK-STAT Signalweg induziert wurde. Fraglich ist allerdings, ob die Signaltransduktion durch immobilisiertes L19-IL2 genauso effektiv wie durch freies L19-IL2 induziert wird. Smith et al. beschreiben, dass die IL2 vermittelten Signale im Zellinneren in noch unbekannter Weise akkumulieren, wobei die Zellen erst nach der Überschreitung einer bestimmten Reizschwelle proliferieren [76,77]. Die Autoren stellen fest, dass sequentiell über mehrere Stunden bis zu 33000 IL2-Rezeptoren gereizt werden müssen, damit Zellen die Alles-oder-Nichts-Entscheidung zur Zellteilung treffen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CTLL-2 Zellen exprimieren aber nur maximal 15000 IL2-R zeitgleich auf der Zellmembran [78]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass zum Erreichen der Reizschwelle und für die Proliferationsinduktion eine effektive IL2-Rezeptorbindung, Reizung, Internalisierung und folglich auch das Recycling der α -Untereinheit und die Neusynthese der beiden anderen Untereinheiten des IL2-R notwendig ist. Die Bindung des IL2-Anteils von immobilisiertem L19-IL2 an die IL2-Rezeptoren führt aber mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Inhibition der Internalisierung der besetzten IL2-Rezeptoren. Dies könnte, neben der Tatsache, dass durch die Immobilisierung von L19-IL2 vermutlich weniger freies L19-IL2 zur Rezeptorbindung und Internalisierung zur Verfügung steht, zur Folge haben, dass sich die Dauer zur Erreichung der

Reizschwelle zur Proliferation verlängert. Dies würde die verminderte Aktivität von immobilisiertem L19-IL2 bei der Induktion der Proliferation von IL2 abhängigen Zellen im Vergleich zu freiem L19-IL2 erklären.

5. Zusammenfassung

Gegenwärtig befinden sich viele biopharmazeutische Präparate wie beispielsweise Immunzytokine in der Forschungs- und Entwicklungspipeline pharmazeutischer Unternehmen. Immunzytokine sind bifunktionale Proteine, die aus einem spezifischen Antikörperanteil sowie einem konjugierten Zytokin bestehen.

L19-IL2 stellt ein vielversprechendes Immunzytokin für die Krebstherapie dar und befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung. Dieses Protein besteht aus dem humanen scFv Antikörperfragment L19, das spezifisch einen Tumor-assoziierten Bestandteil der extrazellulären Matrix bindet, und humanem Interleukin 2 (IL2), welches zur Stimulation der Immunabwehr in unmittelbarer Umgebung des Tumors führen soll.

In der vorliegenden Arbeit wurde L19-IL2 mit unterschiedlichen, bioanalytischen Methoden charakterisiert. Das Ziel bestand dabei in der Entwicklung eines neuen zellbasierten Bioaktivitätstests, der beide funktionellen Anteile des Immunzytokins berücksichtigt und die aktuellen Anforderungen internationaler Arzneimittelzulassungsbehörden wie der *European Medicines Agency* (EMA) oder der *US Food and Drug Administration* (FDA) erfüllt.

Die Ausgangsbasis für die neue Methode bildete ein klassischer, zellbasierter IL2 Bioaktivitätstest, mit dem ausschließlich die biologische Aktivität des konjugierten IL2 gemessen werden kann. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde darauf aufbauend ein neuer Bioaktivitätstest für L19-IL2 entwickelt, mit dem gleichzeitig die Aktivität des L19 scFv-Anteils und die Fähigkeit des IL2-Anteils, die Proliferation der IL2 abhängigen, zytotoxischen T-Zelllinie CTLL-2 zu induzieren, bestimmt werden kann. Durch die Validierung des neuen Testformats wurde gezeigt, dass der Test für die Aktivitätsbestimmung von L19-IL2 geeignet ist und eine deutliche Verbesserung verglichen zu anderen Methoden darstellt, die jeweils auf die Analyse einer funktionellen Einheit des Immunzytokins beschränkt sind.

Der Vergleich des neu entwickelten L19-IL2 Bioaktivitätstests mit dem klassischen IL2 Bioaktivitätstest zeigte, dass die Immobilisierung von L19-IL2 durch die Bindung an sein Antigen zu einer verminderten IL2 vermittelten Aktivität im Vergleich zu freiem L19-IL2 führte. Eine Hypothese für die Ursache dafür besteht in der verminderten Induktion der IL2-Signalkaskade aufgrund fehlender oder reduzierter Internalisierung des IL2 Rezeptorkomplexes. Daher wurden die Auswirkungen der

Immobilisierung von L19-IL2 auf die Bindung an den IL2-Rezeptor (IL2-R), die Signaltransduktion und die zeitabhängige Internalisierung des IL2 Rezeptorkomplexes mittels Western Blot und konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Der Nachweis von phosphoryliertem STAT5 zeigte, dass auch immobilisiertes L19-IL2 den JAK-STAT Signalweg induziert. Die CLSM-Studien ergaben jedoch, dass die Immobilisierung von L19-IL2 tatsächlich zu einer verringerten Internalisierung führte und unterstützten damit die Hypothese.

6. Abstract

Immunocytokines represent a remarkable portion of cancer-directed biological medicinal development candidates, which are currently under investigation in the pharmaceutical R&D pipelines. These bifunctional molecules consist of a specific targeting antibody-based portion and a linked cytokine.

The immunocytokine L19-IL2, which is currently under clinical investigation, is a promising candidate in cancer therapy. This protein comprises the human scFv antibody fragment L19, which is specific for an antigen expressed in the extracellular matrix surrounding tumor vasculature and human interleukin 2 (IL2), which stimulates the immune system in the tumor microenvironment.

In this PhD thesis L19-IL2 was characterized by a broad spectrum of bioanalytical methods. The aim was to develop a new cell-based potency assay for L19-IL2, which enables the evaluation of both functional moieties and fulfills the requirements for potency assays requested by regulatory authorities like the European Medicines Agency (EMA) or the US Food and Drug Administration (FDA).

The basis for the new method was a conventional IL2 potency assay format, which measures only the biological activity of the conjugated IL2. This assay format was modified in order to allow the combined analysis of specific L19 binding capacity and the ability of IL2 to induce proliferation of the detector cytotoxic T-cell line CTLL-2.

Validation of the new test format showed that this assay is suitable for potency estimation of the immunocytokine L19-IL2 and represents a major improvement compared to other approaches, which are limited to the evaluation of only one functional moiety of the immunocytokine.

The comparison of the newly designed potency assay for L19-IL2 with the conventional IL2 potency assay format revealed that the immobilization of L19-IL2 via antigen binding led to a lower IL2-mediated activity compared to unbound L19-IL2. One hypothesis for this observation is the reduced induction of the IL2 signaling pathway due to reduced or lack of internalization of the IL2 receptor complex. To check this hypothesis, the influence of L19-IL2 immobilization on IL2-receptor binding, signal transduction and time-dependent internalization of the IL2 receptor complex was investigated by western blot and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The detection of phosphorylated STAT5 via western blot showed that immobilized L19-IL2 as well as unbound L19-IL2 induced the JAK-STAT signaling

pathway. However, the CLSM studies showed that immobilization of L19-IL2 led to a lower internalization, thus supporting the hypothesis.

7. Literatur

- [1] G. Walsh, Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions, *Trends in Biotechnology* 23 (2005) 553-558.
- [2] A. O`Connor, Introduction to biotech drugs, *Regulatory Rapporteur* 6 (2009) 4-7.
- [3] G. Kohler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256 (1975) 495-497.
- [4] J.D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter, By-passing immunization : Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597.
- [5] D.R. Burton, C.F. Barbas, M.A. Persson, S. Koenig, R.M. Chanock, R.A. Lerner, A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A* 88 (1991) 10134-10137.
- [6] J.M. Reichert, V.E. Valge-Archer, Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discovery* 6 (2007) 349-356.
- [7] J.M. Reichert, J.B. Wenger, Development trends for new cancer therapeutics and vaccines, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 30-37.
- [8] M.P. Deonarain, Recombinant antibodies for cancer therapy, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8 (2008) 1123-1141.
- [9] A.J. Davies, Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I131 tositumomab, *Oncogene* 26 (0 AD) 3614-3628.
- [10] E. Stadtmauer, Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia, *Current Oncology Reports* 4 (2002) 375-380.
- [11] B.J. Scallon, L.A. Snyder, G.M. Anderson, Q. Chen, L. Yan, L.M. Weiner, M.T. Nakada, A review of antibody therapeutics and antibody-related technologies for oncology, *J. Immunother.* 29 (2006) 351-364.
- [12] C. Davis, S. Gillies, Immunocytokines: amplification of anti-cancer immunity, *Cancer Immunol Immunother* 52 (2003) 297-308.
- [13] T. Dreier, H.N. Lode, R. Xiang, C.S. Dolman, R.A. Reisfeld, A.S. Kang, Recombinant Immunocytokines Targeting the Mouse Transferrin Receptor: Construction and Biological Activities, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 482-489.
- [14] E. Ortiz-Sanchez, G. Helguera, T.R. Daniels, M.L. Penichet, Antibody-cytokine fusion proteins: applications in cancer therapy, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8 (2008) 609-632.
- [15] S.D. Gillies, Immunocytokines: A Novel Approach to Cancer Immune Therapy, *Book Chapter* (2009) 241-256.

- [16] J.R. Foster, The functions of cytokines and their uses in toxicology, *Int. J Exp. Pathol.* 82 (2001) 171-192.
- [17] S.L. Gaffen, K.D. Liu, Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications, *Cytokine* 28 (2004) 109-123.
- [18] M.J. Smyth, E. Cretney, M.H. Kershaw, Y. Hayakawa, Cytokines in cancer immunity and immunotherapy, *Immunol. Rev.* 202 (2004) 275-293.
- [19] D.M. King, M.R. Albertini, H. Schalch, J.A. Hank, J. Gan, J. Surfus, D. Mahvi, J.H. Schiller, T. Warner, K. Kim, J. Eickhoff, K. Kendra, R. Reisfeld, S.D. Gillies, P. Sondel, Phase I Clinical Trial of the Immunocytokine EMD 273063 in Melanoma Patients, *J Clin Oncol* 22 (2004) 4463-4473.
- [20] K.L. Osenga, J.A. Hank, M.R. Albertini, J. Gan, A.G. Sternberg, J. Eickhoff, R.C. Seeger, K.K. Matthay, C.P. Reynolds, C. Twist, M. Krailo, P.C. Adamson, R.A. Reisfeld, S.D. Gillies, P.M. Sondel, A Phase I Clinical Trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a Treatment for Children with Refractory or Recurrent Neuroblastoma and Melanoma: a Study of the Children's Oncology Group, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 1750-1759.
- [21] Y.J. Ko, G.J. Buble, R. Weber, C. Redfern, D.P. Gold, L. Finke, A. Kovar, T. Dahl, S.D. Gillies, Safety, pharmacokinetics, and biological pharmacodynamics of the immunocytokine EMD 273066 (huKS-IL2): results of a phase I trial in patients with prostate cancer, *J Immunother.* 27 (2004) 232-239.
- [22] G. Curigliano, G. Spitaleri, T. De Pas, C. Noverasco, L. Giovannoni, H. Menssen, L. Zardi, A. Milani, D. Neri, F. de Braud, A dose finding pharmacokinetic study of the tumor-targeting human L19-IL2 monoclonal antibody-cytokine fusion protein in patients with advanced solid tumors, *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 25 (2007) 3057.
- [23] A. Pini, F. Viti, A. Santucci, B. Carnemolla, L. Zardi, P. Neri, D. Neri, Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel, *J Biol. Chem.* 273 (1998) 21769-21776.
- [24] L. Tarli, E. Balza, F. Viti, L. Borsi, P. Castellani, D. Berndorff, L. Dinkelborg, D. Neri, L. Zardi, A High-Affinity Human Antibody That Targets Tumoral Blood Vessels, *Blood* 94 (1999) 192-198.
- [25] L. Borsi, E. Balza, B. Carnemolla, F. Sassi, P. Castellani, A. Berndt, H. Kosmehl, A. Biro, A. Siri, P. Orecchia, J. Grassi, D. Neri, L. Zardi, Selective targeted delivery of TNF α to tumor blood vessels, *Blood* 102 (2003) 4384-4392.
- [26] D. Neri, R. Bicknell, Tumour vascular targeting, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 436-446.
- [27] M. Santimaria, G. Moscatelli, G.L. Viale, L. Giovannoni, G. Neri, F. Viti, A. Leprini, L. Borsi, P. Castellani, L. Zardi, D. Neri, P. Riva, Immunoscintigraphic Detection of the ED-B Domain of Fibronectin, a Marker of Angiogenesis, in Patients with Cancer, *Clin Cancer Res* 9 (2003) 571-579.

- [28] B. Carnemolla, L. Borsi, E. Balza, P. Castellani, R. Meazza, A. Berndt, S. Ferrini, H. Kosmehl, D. Neri, L. Zardi, Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix, *Blood* 99 (2002) 1659-1665.
- [29] K. Wagner, P. Schulz, A. Scholz, B. Wiedenmann, A. Menrad, The Targeted Immunocytokine L19-IL2 Efficiently Inhibits the Growth of Orthotopic Pancreatic Cancer, *Clin Cancer Res* 14 (2008) 4951-4960.
- [30] R. Mire-Sluis, R. Gaines Das, A. Padilla, WHO cytokine standardization: facilitating the development of cytokines in research, diagnosis and as therapeutic agents, *J. Immunol. Methods* 216 (1998) 103-116.
- [31] R.F. John, The functions of cytokines and their uses in toxicology, *Int. J. Exp. Pathol.* 82 (2001) 171-192.
- [32] T.R. Mosmann, H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, R.L. Coffman, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* 136 (1986) 2348-2357.
- [33] T. Hori, T. Uchiyama, M. Tsudo, H. Umadome, H. Ohno, S. Fukuhara, K. Kita, H. Uchino, Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus, *Blood* 70 (1987) 1069-1072.
- [34] H. Tada, O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama, K. Tsukamoto, An improved colorimetric assay for interleukin 2, *J. Immunol. Methods* 93 (1986) 157-165.
- [35] S. Gillis, M.M. Ferm, W. Ou, K.A. Smith, T Cell Growth Factor: Parameters of Production and a Quantitative Microassay for Activity, *J Immunol* 120 (1978) 2027-2032.
- [36] U. Hammerling, A.C. Henningsson, L. Sjödin, Development and validation of a bioassay for Interleukin-2, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 547-553.
- [37] K. Kwack, R.G. Lynch, A new non-radioactive method for IL-2 bioassay, *Mol. Cells* 10 (2000) 575-578.
- [38] B. Laura, B. Enrica, B. Marco, C. Patrizia, C. Barbara, B. Attila, L. Alessandra, S. Jorge, B. Oscar, N. Dario, Z. Luciano, Selective targeting of tumoral vasculature: Comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin, *Int. J. Cancer* 102 (2002) 75-85.
- [39] E. El Emir, J.L.J. Dearling, A. Huhlov, M.P. Robson, G. Boxer, D. Neri, G.A.M.S. van Dongen, E. Trachsel, R.H.J. Begent, R.B. Pedley, Characterisation and radioimmunotherapy of L19-SIP, an anti-angiogenic antibody against the extra domain B of fibronectin, in colorectal tumour models, *Br. J. Cancer* 96 (2007) 1862-1870.
- [40] D. Berndorff, S. Borkowski, D. Moosmayer, F. Viti, B. Muller-Tiemann, S. Sieger, M. Friebe, C.S. Hilger, L. Zardi, D. Neri, L.M. Dinkelborg, Imaging of Tumor Angiogenesis Using ^{99m}Tc-Labeled Human Recombinant Anti-ED-B Fibronectin Antibody Fragments, *J Nucl Med* 47 (2006) 1707-1716.

- [41] K.J. Miller, R.R. Bowsher, A. Celniker, J. Gibbons, S. Gupta, J.W. Lee, S.J. Swanson, W.C. Smith, R.S. Weiner, D.J.A. Crommelin, I. Das, B.S. DeSilva, R.F. Dillard, M. Geier, H. Gunn, M.N. Khan, D.W. Knuth, M. Kunitani, G.D. Nordblom, R.J.A. Paulussen, J.M. Sailstad, R.L. Tacey, A. Watson, Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules: Summary Report, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1373-1383.
- [42] W.C. Smith, G.S. Sittampalam, Conceptual and statistical issues in the validation of analytic dilution assays for pharmaceutical applications, *J. Biopharm. Stat.* 8 (1998) 509-532.
- [43] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, R.D. McDowall, Validation of bioanalytical chromatographic methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 193-218.
- [44] V. Shah, K. Midha, J. Findlay, H. Hill, J. Hulse, I. McGilveray, G. McKay, K. Miller, R. Patnaik, M. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, Bioanalytical Method Validation: A Revisit with a Decade of Progress, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551-1557.
- [45] J. Smolec, B. DeSilva, W. Smith, R. Weiner, M. Kelly, B. Lee, M. Khan, R. Tacey, H. Hill, A. Celniker, V. Shah, R. Bowsher, A. Mire-Sluis, J.W.A. Findlay, M. Saltarelli, V. Quarumby, D. Lansky, R. Dillard, M. Ullmann, S. Keller, H.T. Karnes, Bioanalytical Method Validation for Macromolecules in Support of Pharmacokinetic Studies, *Pharm. Res.* 22 (2005) 1425-1431.
- [46] C. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A. DeStefano, M. Rose, J. Sailstad, V. Shah, J. Skelly, P. Swann, R. Weiner, Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1962-1973.
- [47] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2010. 1-1-2001.
- [48] J.W.A. Findlay, W.C. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. DeSilva, M.N. Khan, R.R. Bowsher, Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249-1273.
- [49] B. DeSilva, W. Smith, R. Weiner, M. Kelley, J. Smolec, B. Lee, M. Khan, R. Tacey, H. Hill, A. Celniker, Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-Binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1885-1900.
- [50] M. Kelley, B. DeSilva, Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules, *AAPS. J.* 9 (2007) E156-E163.
- [51] D.J. Finney, Bioassay and the Practice of Statistical Inference, *International Statistical Review* 47 (1979) 1-12.
- [52] K.A. Smith, The structure of IL2 bound to the three chains of the IL2 receptor and how signaling occurs, *Med. Immunol.* 5 (2006) 3.

- [53] H.N. Lode, R. Xiang, J.C. Becker, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld, Immunocytokines: A Promising Approach to Cancer Immunotherapy, *Pharmacology & Therapeutics* 80 (1998) 277-292.
- [54] F. Viti, L. Tarli, L. Giovannoni, L. Zardi, D. Neri, Increased Binding Affinity and Valence of Recombinant Antibody Fragments Lead to Improved Targeting of Tumoral Angiogenesis, *Cancer Res* 59 (1999) 347-352.
- [55] R. Das, J. Robinson, Assessing Nonparallelism in Bioassays A Discussion for Nonstatisticians, *BioProcess Int.* 6 (2008) 46-56.
- [56] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), ICH Harmonised Tripartite Guideline (2006).
- [57] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies, *Pharm. Res.* 9 (1992) 588-592.
- [58] V.P. Shah, The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation, *AAPS. J.* 9 (2007) 43-47.
- [59] J.W. Findlay, R.F. Dillard, Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays, *AAPS. J.* 9 (2007) E260-E267.
- [60] J.H. Ricketts, G.A. Head, A five-parameter logistic equation for investigating asymmetry of curvature in baroreflex studies, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277 (1999) R441-R454.
- [61] E.C. Wood, The theory of certain analytical procedures, with particular reference to micro-biological assays, *The Analyst* 71 (1949) 1-14.
- [62] W.W. Hauck, R.C. Capen, J.D. Callahan, J.E. De Muth, H. Hsu, D. Lansky, N.C. Sajjadi, S.S. Seaver, R.R. Singer, D. Weisman, Assessing Parallelism Prior to Determining Relative Potency, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 59 (2005) 127-137.
- [63] A. Kumar, J.L. Moreau, M. Gibert, J. Theze, Internalization of interleukin 2 (IL-2) by high affinity IL-2 receptors is required for the growth of IL-2-dependent T cell lines, *J Immunol* 139 (1987) 3680-3684.
- [64] V. Duprez, A. Dautry-Varsat, Receptor-mediated endocytosis of interleukin 2 in a human tumor T cell line. Degradation of interleukin 2 and evidence for the absence of recycling of interleukin receptors, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15450-15454.
- [65] C. McCrae, L. Maxwell, R. Ceredig, Intracellular pathway of interleukin-2 receptors studied using immunogold electron microscopy, *Immunol Cell Biol* 66 (1988) 185-191.
- [66] D.K. Peters, D.H. Norback, Binding and internalization of biotinylated interleukin-2 in human lymphocytes, *Blood* 76 (1990) 97-104.

- [67] J.W. Lowenthal, H.R. MacDonald, B.J. Iacopetta, Intracellular pathway of interleukin 2 following receptor-mediated endocytosis, *Eur. J. Immunol.* 16 (1986) 1461-1463.
- [68] A. Hemar, A. Subtil, M. Lieb, E. Morelon, R. Hellio, A. Dautry-Varsat, Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 55-64.
- [69] M. Fujii, K. Sugamura, K. Sano, M. Nakai, K. Sugita, Y. Hinuma, High-affinity receptor-mediated internalization and degradation of interleukin 2 in human T cells, *J. Exp. Med.* 163 (1986) 550-562.
- [70] R.J. Robb, W.C. Greene, Internalization of interleukin 2 is mediated by the beta chain of the high-affinity interleukin 2 receptor, *J. Exp. Med.* 165 (1987) 1201-1206.
- [71] J.N. Ihle, Cytokine receptor signalling, *Nature* 377 (1995) 591-594.
- [72] A. Zmuidzinas, H.J. Mamon, T.M. Roberts, K.A. Smith, Interleukin-2-triggered Raf-1 expression, phosphorylation, and associated kinase activity increase through G1 and S in CD3-stimulated primary human T cells, *Mol. Cell Biol* 11 (1991) 2794-2803.
- [73] J.J. Moon, E.D. Rubio, A. Martino, A. Krumm, B.H. Nelson, A permissive role for phosphatidylinositol 3-kinase in the Stat5-mediated expression of cyclin D2 by the interleukin-2 receptor, *J Biol Chem.* 279 (2004) 5520-5527.
- [74] R. Moriggl, D.J. Topham, S. Teglund, V. Sexl, C. McKay, D. Wang, A. Hoffmeyer, J. van Deursen, M.Y. Sangster, K.D. Bunting, G.C. Grosveld, J.N. Ihle, Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells, *Immunity.* 10 (1999) 249-259.
- [75] K.A. Smith, The Interleukin 2 Receptor, *Annual Review of Cell Biology* 5 (1989) 397-425.
- [76] K. Smith, The quantal theory of how the immune system discriminates between "self and non-self", *Med. Immunol.* 3 (2004) 3.
- [77] K.A. Smith, The quantal theory of immunity, *Cell Res* 16 (2006) 11-19.
- [78] R.J. Robb, A. Munck, K.A. Smith, T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance, *J. Exp. Med.* 154 (1981) 1455-1474.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Kollegen, Freunden und meiner Familie bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Priv. Doz. Dr. Thomas Bunte für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, seine tatkräftige Unterstützung und die vielen konstruktiven Diskussionen und aufmunternden Worte.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel sei an dieser Stelle ganz herzlich für die Übernahme des Gutachtens dieser Arbeit gedankt.

Ein riesengroßes, ganz besonderes Dankeschön geht an Dr. Karin Barbin, die immer ein offenes Ohr und unzählige gute Tipps für mich hatte. Sie hat mir bei der Planung der Experimente und dem Schreiben dieser Arbeit und des Papers sehr geholfen und mich dabei durch alle Höhen und Tiefen begleitet.

Weiterhin möchte ich mich bei allen meinen Laborkollegen und insbesondere bei Birgit, Annette, Moni, Jutta, Gerlinde und Jürgen bedanken, die mich geduldig beim Erlernen der zellbiologischen Methoden unterstützt haben, mir unzählige Male mit Rat und Tat zu Seite standen und mit Nervennahrung versorgten.

Vielen Dank auch an Dr. Philip Denner für seine große Unterstützung bei den CLSM Analysen.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle anderen Doktoranden und Postdoktoranden, die mir mit Tipps und Tricks sowie Gerätschaften und Labormaterialien geholfen haben. Ich werde die gemeinsamen Laboraktionen, die unzähligen Mittagessen und Stammtische nie vergessen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Frau Anika bedanken, die immer für mich da ist und bei Justus, der mir mit seinem zauberhaften Lächeln beim Schreiben dieser Arbeit viel Kraft gegeben hat.

9. Publikationen

Paper:

Winter, J., Barbin, K., Bacci, C., Bunte, T.. A new bioassay for the immunocytokine L19-IL2 for simultaneous analysis of both functional moieties, J. Pharm. Biomed. Anal. In Press, Corrected Proof.

Poster:

Winter, J., Barbin, K., Denner, P., Bunte, T. (2010). Assessment of the biological properties of the immunocytokine L19-IL2 with special focus on cytokine immobilization. Bayer Schering Pharma- YoungScientist Poster Session 2010

Winter, J., Barbin, K., Denner, P., Bunte, T. (2009). Immobilization of the Immunocytokine L19-IL2 leads to a lower biological activity. Bayer Schering Pharma- YoungScientist Poster Session 2009

Winter, J., Barbin, K., Bunte, T (2009). Analysing both functional portions of an immunoconjugate in a single bioassay. BEBPA- international bioassay conference

Winter, J., Barbin, K., Bunte, T (2008). A new potency assay for the immunocytokine L19-IL2 - development and validation. Bayer Schering Pharma- YoungScientist Poster Session 2008

10. Lebenslauf

gelöscht

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angeführten Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Jonas P. Winter

Berlin, den 27.09.2010