

Christof Schweizer  
Dr. med.

## **Herstellung und Charakterisierung von drei neuen bispezifischen Antikörpern gegen das Tumor-assoziierte Antigen Egp34**

Geboren am 01.08.1973 in Würzburg  
Reifeprüfung am 09.07.1993 in Erlangen  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis SS 2002  
Physikum am 10.09.1996 an der Universität Freiburg  
1. Staatsexamen am 18.09.1997 an der Universität Freiburg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
2. Staatsexamen am 28.03.2001 in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg und New York, USA  
3. Staatsexamen am 28.03.2001 in Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Haas

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene bispezifische Antikörper (bsAk) gegen das epitheliale Tumor-assoziierte Antigen Egp34 hergestellt. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Für die Zellfusion und die nachfolgenden Reinigungsschritte des produzierten bispezifischen Antikörpers wurden Hybridome benötigt, die Antikörper mit unterschiedlichen Isotypen produzieren. Aus diesem Grund wurden zwei Immunglobulin-Varianten des Hybridoms HEA125 (IgG1) hergestellt, HEA125/2a mit dem Isotyp IgG2a und HEA125/2b mit IgG2b-Isotyp.

Bei der Verschmelzung von Zellen hat sich die HAT-Sensitivität als geeigneter Selektionsmarker bewährt. HAT-sensitive Zellen besitzen einen Enzymdefekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und können in HAT-Medium nicht wachsen. Als mögliche Fusionspartner wurden HAT-sensitive Mutanten von den Hybridomzelllinien HEA125, HEA125/2a, HEA125/2b und 17A2 selektioniert.

Die Hybridome HEA125 und 197 wurden zur Hybrid-Hybridomzelllinie (Quadrom) HEA125x197 fusioniert. Das Quadrom HEA125/2bxA9 wurde aus den Hybridomen HEA125/2b und A9 erhalten; aus HEA125/2a und 17A2 entstand das Quadrom HEA125/2ax17A2. Alle Quadrome wurden subkloniert, und die Zellkultur-Überstände der Subklone im ELISA und durchflußzytometrisch auf bispezifische Antikörpermoleküle untersucht.

Die bispezifischen Antikörper wurden in MiniPerm-Modulen produziert und danach in zwei Schritten über Protein A-Sepharose CL-4B- und Bakerbond ABx HPLC-Säulen aufgereinigt. Die Reinigung wurde mittels Gelelektrophorese und im Durchflußzytometer überprüft. Die Messung im Durchflußzytometer zeigte, dass alle bispezifischen Antikörper an das Tumor-assoziierte Antigen Egp34 binden konnten. Die bsAk HEA125x197 und HEA125/2ax17A2 erkannten auch die jeweiligen Antigene auf ihren Effektorzellen (CD64 auf humanen Monozyten/Makrophagen bzw. murines CD3 auf der Zelllinie 1934.4). Der Antikörper HEA125/2bxA9 konnte allerdings mit seinem A9-Arm nicht an das humane CD16-Antigen auf NK-Zellen binden.

Die beiden bispezifischen Antikörper HEA125x197 und HEA125/2ax17A2, die sowohl mit den jeweiligen Effektorzellen als auch mit den Egp34-positiven Zielzellen reagierten, wurden anschließend im Chromfreisetzungstest untersucht. Dabei wurden Zielzellen mit <sup>51</sup>Chrom radioaktiv markiert. Die durch den bispezifischen Antikörper vermittelte spezifische Lyse der Zielzellen wurde durch Messung der freigesetzten Radioaktivität im Zellkultur-Überstand bestimmt. Der bsAk HEA125x197 konnte mit Hilfe der humanen Monozyten/Makrophagen, die 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert worden waren, eine deutlich höhere Lyse der Zielzellen HT-29 erreichen als die verschiedenen Kontrollantikörper. Mit dem bsAk HEA125/2ax17A2 wurden zwei Zytotoxizitätsversuche durchgeführt, die sich in den Stimulationsbedingungen der Effektorzellen und der Zielzellart unterschieden. Dabei zeigte sich, dass bei beiden Versuchen die spezifische Lyse durch den bispezifischen Antikörper höher lag als die Lyse durch die Kontrollantikörper. Die beiden Tests ergaben allerdings verschieden hohe Werte für die maximale Lyse durch den bispezifischen Antikörper.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die neu hergestellten bispezifischen Antikörper HEA125x197 und HEA125/2ax17A2 gegen das Tumor-assoziierte Antigen Egp34 in der Lage sind, jeweils ihre beiden verschiedenen Antigene zu binden und die Lyse von Tumorzellen zu vermitteln. Beide Antikörper stehen für weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Versuche zur Verfügung.