

Christiane Roth
Dr. med.

Untersuchungen zur Verbesserung der Bindungseigenschaften und funktionellen Aktivität einer Tumorzellvakzine mit bispezifischen Antikörpern

Geboren am 24.02.1971 in Karlsruhe
Staatsexamen am 22.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. B. Kyewski

In dieser Arbeit wurden zwei bereits etablierte NDV-bindende bsAK (bsCD3 und bsCD28) in größerer Menge, als bisher üblich, kontinuierlich mittels der Quadromtechnik hergestellt und bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit an NDV-modifizierte bzw. infizierte Tumorzellen und bezüglich ihrer Funktion untersucht. Dazu mussten Quadrome kontinuierlich aus tiefgefrorenen Aliquoten aufgetaut und expandiert werden. Um optimale Bindungsverhältnisse für die bsAK auf der Virus-modifizierten Tumorzelloberfläche zu schaffen, wurden vorab eingehende Untersuchungen zur NDV-Modifikation von Tumorzellen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war, optimale Dichte der HN-Moleküle auf der Tumorzelloberfläche zu erreichen. Dies wurde zum einen durch die Beladung der Zellen mit einer höheren Viruskonzentration mittels UV-inaktiviertem NDV oder durch die Infektion der Tumorzellen mit NDV erzielt. Nach Etablierung optimaler Bedingungen zur Bindung der AK auf Virus-modifizierten Tumorzellen wurden die Bindungseigenschaften sowie die funktionelle Aktivität der bsAK mit denen der parentalen monospezifischen Antikörper verglichen. Zwei unterschiedliche NDV-Modifikationen der Tumorzellen, eine UV-inaktivierte NDV-Modifikation mit 400 HU(UV) und eine NDV-Infektion mit 100 HU NDV wurden gegenübergestellt. Zur Untersuchung des HN-Anteils wurden NDV-modifizierte bzw. infizierte Tumorzellen, zur Untersuchung der CD3- und CD28-Bindungsstelle CD3- bzw. CD28-positive Jurkatzellen einer Lymphomzelllinie verwendet. Untersuchungen zur Bindungseigenschaften beider Anteile der bsAK zeigten, dass alle monospezifischen Antikörper die besten Bindungseigenschaften aufwiesen. Dies zeigte sich auch in Untersuchungen hinsichtlich der Affinität der einzelnen Antikörper zu ihrem jeweiligen Antigen auf der Tumorzelloberfläche. Im Gegensatz zu seiner stimulatorischen Komponente wies der bsAK HNxCD28 jedoch keine niedrigere Affinität hinsichtlich seiner HN-Komponente auf als der bsAK HNxCD3 Antikörper. Die optimalsten Bedingungen hinsichtlich der Bindungseigenschaften, Affinität und Funktionalität der Antikörper konnten bei der Infektion der Tumorzellen mit NDV, unabhängig vom eingesetzten Antikörper, erreicht werden. Experimente zur Untersuchung der Funktionalität beider msAK, bsAK alleine und in Kombination, entweder ohne oder mit Kopplung an NDV-modifizierte Tumorzellen, erfolgten mittels Thymidin-Einbau oder durch den Nachweis von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten am Durchflusszytometer nach Stimulation mit dem jeweiligen Antikörper. Auch in der Proliferationskultur spiegelten sich die getesteten Bindungsaffinitäten wieder. Beide bsAK waren in geringerem Maße, d.h. erst ab einer höheren Antikörperkonzentration fähig Lymphozyten zur Proliferation zu aktivieren. Der Einsatz löslicher bispezifischer Antikörper in der Proliferationskultur ergab einen Zuwachs des Einbaus Tritium-markierten Thymidins in PBMCs, wobei der bsCD3 dazu besser im Stande war als der bsCD28. Nach dreitägiger Proliferationskultur zeigten die bispezifischer Antikörper zusammen einen synergistischen Stimulationseffekt auf PBMCs.

Die eintägige Kultivierung der PBMCs mit löslichem bsAK ergab eine signifikant erhöhte IL-2 Produktion im Überstand.

Hier übertraf die IL-2-Produktion der Kultur mit bsCD3 die der Kultur mit bsCD28. Die Inkubation mit beiden bsAK zusammen zeigte diesbezüglich nur einen geringen synergistischen Effekt. Wurden NDV-modifizierte Tumorzellen (UV-NDV und infizierte) gekoppelt mit bsAK in einem Thymidineinbau-Assay eingesetzt, zeigte die Kultur der NDV-infizierten Tumorzellen in Kombination beider bsAK in einem Proliferationsansatz nach 7 Tagen einen synergistischen Stimulationseffekt. Abschließende Experimente zur Untersuchung der Hochregulation spezifischer Aktivierungsmarker (CD25 und CD69) auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten nach Stimulation mit NDV-modifizierten, antikörpergekoppelten Tumorzellen zeigten, dass weder für CD4+ noch für CD8+ T-Zellen eine signifikante Erhöhung von CD25 festzustellen war. Lediglich der bsCD3, gekoppelt an NDV-infizierte Tumorzellen erreichte eine Hochregulation des CD69-Markers auf CD8+ T-Zellen. Ein synergistischer Effekt beider bsAK blieb hingegen aus. Der bsCD28 vermochte zu keinem Zeitpunkt Aktivierungsmarker hochzuregulieren. Die Kultur von PBMCs mit bispezifischen Antikörpern alleine oder in Kombination mit UV-NDV modifizierten Tumorzellen zeigte ebenfalls zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Hochregulation der Aktivierungsmarker auf Lymphozyten.