INAUGURAL DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl. Biotech. Dorothée Astrid Deppe

aus Saarbrücken

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Bispezifische Antikörper für die Krebstherapie

Gutachter: PD. Dr. Frank Breitling
Prof. Dr. Günter J. Hämmerling

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2006 bis August 2009 in der Arbeitsgruppe für "Translationale Immunologie" des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) und in Kooperationen mit den Abteilungen "Molekulare Immunologie" und "Chipbasierte Peptidbibliotheken".

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. Frank Breitling und Dr. Gerhard Moldenhauer für die Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und für den Gestaltungsspielraum, der es mir ermöglichte, eigene Ideen in diese Arbeit einfließen zu lassen. Insbesondere danke ich ihnen für das mir entgegengebrachte Vertrauen in Zeiten, die nicht sonderlich von Erfolg gekrönt waren. Besonders hilfreich war auch ihr Engagement für die kritische Begutachtung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Günter Hämmerling, Leiter der Abteilung für Molekulare Immunologie, danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Begutachtung der Dissertationsarbeit und die kritische Auseinandersetzung mit meinem Thema in Seminaren.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Kollegin Dr. Sandra Lüttgau für ihre stete Diskussionsbereitschaft und die Einweisung in die Antikörpergenetik. Sie war in der gesamten Zeit eine sehr zuverlässige Stütze und hat die Basis für mein Projekt geschaffen.

Miriam Soehindrijo danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor, für die zahlreichen guten Ratschläge und die gute Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren. Das gleiche gilt auch für meinen Labornachbarn Jürgen Kretschmer, der seine jahrelange Erfahrung in der Proteinbiochemie und der Handhabung der HPLC Anlage breitwillig an mich weitergegeben hat.
Jessica Kientz danke ich für die Bereitstellung ihrer Protokolle und für die Vielzahl kleiner Dienste, die sie mir im Labor erwiesen hat.

Den Mitarbeitern der FACS-Core Facility, Klaus Hexel und Dr. Steffen Schmitt, danke ich für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie.

Günter Küblbeck und Gorana Hollmann verdanke ich die schnelle Einführung in das Expressionssystem der HEK-Zellen.

Die vergangenen Jahre wären ohne die Mitarbeiter der Laboratorien und meine Büronachbarn, bei weitem nicht so abwechslungsreich gewesen. Ihnen allen verdanke ich die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Buselmaier, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, 28. Juli 2009

Dorothée Deppe

INHALTSVERZEICHNIS

SUMMARY **1**
ZUSAMMENFASSUNG **2**

1 EINLEITUNG **5**

1.1 ANTIKÖRPER 6
1.1.1 Antikörperstruktur *6*
1.1.2 Antikörperfunktion *9*
1.1.3 Antikörpergenetik *11*

1.2 HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN EINER BESTIMMTEN SPEZIFITÄT 15
1.2.1 Monoklonale Antikörper *15*
1.2.2 Humane Antikörper *15*
1.2.3 Rekombinante Antikörper *16*

1.3 PRODUKTIONSSYSTEME FÜR ANTIKÖRPER UND DEREN DERIVATE 16
1.3.1 Eukaryontische Expressionssysteme *16*
1.3.2 Prokaryontische Expressionssysteme *18*
1.3.3 Weitere Produktionssysteme *19*

1.4 BISPEZIFISCHE ANTIKÖRPER 20
1.4.1 Wirkungsmechanismen von bsAk *20*
1.4.2 Bispezifische Antikörperformate *22*
1.4.3 Herstellung bispezifischer Antikörper *23*
1.4.3.1 Chemische Vernetzung zweier Antikörper 23
1.4.3.2 Antikörper aus Hybrid-Hybridomen – Quadromtechnologie 24
1.4.3.3 Rekombinante BsAk durch Gentechnik 25

1.5 ANTIKÖRPER ALS IMMUNTHERAPEUTIKA 25
1.5.1 Antikörper-basierte Strategien in der Krebstherapie *25*
1.5.2 Limitierungen und Anforderungen therapeutischer Antikörper *29*

1.6 ZIELSTRUKTUREN AUF TUMORZELLEN 30
1.6.1 Allgemeine Anforderungen für Zielantigene auf Tumorzellen *30*
1.6.2 Das Tumorantigen EpCAM *31*
1.6.3 Das Tumorantigen L1CAM *33*

1.7 ZIELSTRUKTUREN AUF EFFEKTORZELLEN 36
1.7.1 Steuermoleküle auf Effektorzellpopulationen *36*
1.7.2 Der CD3/TCR-Komplex auf T-Lymphozyten *37*

1.8 ZIELSETZUNG 38

2 MATERIAL UND METHODEN **40**

2.1 MATERIAL 40
2.1.1 Laborgeräte *40*
2.1.2 Allgemeine Chemikalien *40*
2.1.3 Standardlösungen *42*
2.1.4 Molekularbiologische Reagenzien *43*
2.1.5 Reaktions-Kits *43*
2.1.6 Oligonukleotide *44*
2.1.7 Proteine, Antikörper und Färbereagenzien *44*
2.1.8 Proteinbiochemische Reagenzien *45*
2.1.9 Kultivierungsmedien für Bakterien *46*
2.1.10 Kultivierungsmedien und Reagenzien für Zellkulturen *47*

2.1.11 Bakterienstämme ... *48*
2.1.12 Zelllinien ... *48*
2.1.13 Software und Datenbanken ... *49*

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN ... 49
2.2.1 Kultivierung von E. Coli ... *49*
2.2.2 Transformation von E. Coli ... *49*
2.2.3 DNA-Isolierung aus E. Coli Kulturen ... *50*
2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ... *50*
2.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten ... *50*
2.2.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen ... *51*
2.2.7 Ligation von DNA-Enden ... *51*
2.2.8 Enzymatischer Restriktionsverdau von Nukleinsäuren ... *51*
2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR) ... *51*
2.2.10 Mutagenese von Nukleinsäuren ... *53*
2.2.11 Phenol-Chlorophorm-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen ... *53*
2.2.12 Präzipitation von Nukleinsäuren ... *54*
2.2.13 cDNA Synthese und Reverse Transkription ... *54*
2.2.14 Sequenzierung von DNA ... *55*
2.2.15 Computerbasierte Sequenzanalyse ... *55*

2.3 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN ... 55
2.3.1 Lagerung eukaryontischer Zellen ... *55*
2.3.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen ... *56*
2.3.3 Kultivierung von Hybridomzellen in MiniPerm Bioreaktoren ... *57*
2.3.4 Anreicherung klonaler Zelllinien ... *57*
2.3.5 Herstellung von Zelllysaten für genomische PCR ... *58*
2.3.6 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen ... *58*
2.3.7 Transfektion eukaryontischer Zellen ... *58*
2.3.8 Austausch von Genkassetten im Genom ... *60*
2.3.8.1 Homologe Rekombination (HR) ... 60
2.3.8.2 Spezifische Rekombination (SSR) ... 61
2.3.8.3 Cre-vermittelte Deletion im Genom ... 61

2.4 ALLGEMEINE PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN ... 63
2.4.1 SDS-PAGE und Western-Transfer Experimente ... *63*
2.4.2 Reinigung von Proteinen ... *63*
2.4.2.1 Aufreinigung von Proteinen aus Kulturüberständen durch Säulenchromatographie ... 63
2.4.2.2 Umpufferung und Entsalzung der Proteine nach Aufreinigung ... 64
2.4.2.3 Gelfiltration ... 65
2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen ... *65*

2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE ... 66

2.6 EXPERIMENTE ZUR ANALYSE DER ANTIKÖRPERSPEZIFITÄT ... 67
2.6.1 Quantitative Bestimmung antikörperhaltiger Kulturüberstände im ELISA ... *67*
2.6.2 Bindungsexperimente an Zielzellen ... *68*
2.6.3 Affinitätsvergleich ... *68*

3 ERGEBNISSE ... 69

3.1 FUSION AN DIE LEICHTE ANTIKÖRPERKETTE ... 73
3.1.1 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels Homologer Rekombination ... *73*
3.1.1.1 Methodischer Hintergrund zur Homologen Rekombination ... 73
3.1.1.2 Klonierung von Plasmiden zur HR im Kappa Lokus von Hybridomen ... 74
3.1.1.3 Durchführung der Homologen Rekombination ... 75
3.1.2 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels spezifischer Rekombination ... *78*
3.1.2.1 Methodischer Hintergrund zur PhiC31-vermittelten Integration ... 78
3.1.2.2 Herstellung einer Empfängerlinie mit Erkennungssequenzen für die φC31-Integrase ... 78
3.1.2.3 Klonierung eines Vektors für die Expression der φC31 Integrase in Säugetierzellen ... 86
3.1.2.4 Optimierung der φC31 vermittelten Rekombination mit Hilfe eines Reportersystems ... 87
3.1.2.5 φC31 Integrase-vermittelte Fusion an die leichte Antikörperkette ... 90

3.2 FUSION AN DIE SCHWERE ANTIKÖRPERKETTE 95
3.2.1 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels spezifischer Rekombination 95
3.2.1.1 Herstellung einer Empfängerlinie mit Erkennungssequenzen für die φC31 Integrase im Lokus der schweren Kette 95
3.2.1.2 φC31-vermittelte Fusion an die CH1 Domäne der schweren Antikörperkette 99
3.2.1.3 Das $_{Fab}$L1-Tags Fragment 102
3.2.1.4 Der bispezifische Antikörper $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR 104
3.2.2 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels Homologer Rekombination 106
3.2.2.1 Klonierung eines Austauschvektors für die schwere Antikörperkette 106
3.2.2.2 Herstellung von bispezifischen Antikörpern 107
3.2.3 Herstellung bispezifischer Antikörper in HEK 293T Zellen 112
3.2.4 Proteinbiochemische Analyse der bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 115
3.2.5 Stabilisierung bispezifischer Antikörper 121

4 DISKUSSION 125

4.1 BISPEZIFISCHE ANTIKÖRPER ALS WIRKSTOFFE IN DER KREBSTHERAPIE 125
4.1.1 Das Molekulargewicht als kritischer Parameter für bispezifische Antikörper 126
4.1.2 Erhöhung der thermischen Stabilität bispezifischer Antikörper durch Einführung von Disulfidbrücken 128

4.2 EXPRESSION BISPEZIFISCHER ANTIKÖRPER IN HYBRIDOMEN 129
4.2.1 HybLib - eine Bibliothek komplett humaner Antikörper 130
4.2.2 Herstellung unterschiedlicher Antikörperformate in Hybridomen 132
4.2.2.1 Die bispezifischen IgG1 Antikörper $_{(Fab)2}$L1x$_{dsFv}$OKT3_(SSR) und $_{(Fab)2}$L1xTags_SSR 133
4.2.2.2 Kleine bispezifische Antikörper im Fab x dsFv Format 135
4.2.3 Stabilisierung der bispezifischen Antikörper 139
4.2.4 Vergleich der Produktivität von Hybridomen und HEK 293T Zellen 139
4.2.5 Positivselektion und Rekombinationseffizienzen - HR versus SSR 142
4.2.5.1 Anreicherung positiver Klone nach HR durch Verlust der Oberflächenexpression 143
4.2.5.2 φC31-vermittelte Rekombination (SSR) 145
4.2.5.3 Der Einfluss des Antikörperpromotors und die neo^R(-) Resistenzkassette 147
4.2.6 Zusammenfassung und Ausblick 148

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 153

6 LITERATURANGABEN 157

7 ANHANG I

SUMMARY

Bispecific antibodies are excellent activators of the immune system and have been generated against different combinations of tumor antigens and trigger molecules on effector cells. Their relevance was shown recently with market approval of the bispecific compound Catumaxomab (Removab®). However, clinical use of bispecific antibodies is hampered for technical reasons, namely lengthy purification, expensive production engendered by the low yield, mouse origin of conventional antibodies, and their large molecular weight that hinders diffusion into solid tumors.

To address those problems we used B cell hybridomas trained by the immune system as host cells for the production of high amounts of antibodies. Secondly, genetic engineering was performed to reduce immunogenicity (human constant domains) and to generate small fusion proteins with improved tissue penetration (80kDa for bsAb compared to 150kDa for IgG). The aim was a prototypic format, in which a Fab-fragment was fused to a disulfide-stabilized single-chain antibody (dsFv) as secondary specificity. In this study several methods are described to redesign the active antibody gene locus of the anti-EpCAM or anti-L1CAM producing hybridoma lines HEA125 and HuL1-9.3 using a combination of homologous recombination (HR) and site-specific integration (SSR). A gene cassette encoding an anti-CD3 antibody (dsFvOKT3) fused to the human CH1 domain of the IgG1 heavy chain was cloned. The cassette was flanked by regions homologous to the endogenous antibody locus of the heavy chain, where the sequences overlap with the 5' end of the CH1 domain and with the 3' end of the CH3 domain. After homologous recombination, murine constant domains (CH1 to CH3) were entirely replaced by the CH1-dsFvOKT3 fusion. This resulted in hybridoma cell lines secreting small bispecific antibodies rather than the original full-size monoclonal antibodies. The antibodies $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 and $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 were shown by flow cytometry to bind both EpCAM and CD3 or L1CAM and CD3 antigens, respectively, on target cells. Furthermore, both antibodies were shown to be fully assembled and pure in subsequent protein analysis. In future experiments the compounds will be tested *in vitro* for their potency to prime T-cells for lysis of EpCAM- or L1CAM-expressing tumor cells. Thereby the Fab-fragment derived from the parental antibodies HEA125 and HuL1-9.3 assumes tumor-targeting, while the dsFvOKT3-fragment should enable targeting and activation of $CD3^+$ cytotoxic T-cells. If the antibodies meet these expectations, they could be considered as candidates for further evaluation towards preclinical studies and possibly open out into the development of new drugs against cancer.

In our department we are currently developing the HybLib Library of fully human antibodies by exploiting the efficient antibody expression apparatus of B-cell hybridomas. Aside facilitated screening of the library using mammalian display and BCR signalling, the system also benefits from the somatic hypermutation machinery for affinity maturation. The method for the production of small bispecific antibodies described above was intended to complement the library with a tool to individually adapt the mechanism of cytotoxicity of the drug to the therapeutic requirements (**Fig. 4.2**). The genomic switch from the conventional to the bispecific format could be put into practice successfully. The bispecific antibody framework can now easily be adapted to other specificities.

ZUSAMMENFASSUNG

Bispezifische Antikörper (bsAk) eröffnen für die Immuntherapie von Krebserkrankungen neue Möglichkeiten und wurden bereits mit einer Vielzahl unterschiedlicher Kombinationen an Tumorantigenen und Effektorfunktionen ausgestattet. Die Relevanz dieser Wirkstoffklasse wurde erst kürzlich durch die Zulassung des bispezifischen Präparates Catumaxomab (Removab®) unter Beweis gestellt. Die breite Anwendung konventioneller bispezifischer Antikörper ist jedoch aus technischen Gründen begrenzt. Zu den meist zitierten Engpässen zählen aufwändige Reinigungsprozesse, geringe Ausbeuten und damit einhergehende hohe Produktionskosten, die meist murine Herkunft und das große Molekulargewicht, dass die Penetration in solide Tumoren erschwert.

Um die angeführten Problemstellungen anzugehen, haben wir die Herstellung der bsAk in B-Zell Hybridomen vorgenommen, um möglichst auf einen professionellen Antikörperproduzenten zurückzugreifen. Der Grundgedanke hierbei war, den bispezifischen Antikörpern eine Struktur und ein genetisches Umfeld zu sichern, das konventionellen Antikörpern möglichst nahe kommt. Durch genetische Manipulation wurden bsAk synthetisiert, die aus einem Fab-Fragment bestehen, an den ein disulfidbrückenstabilisierter *single-chain* Antikörper (dsFv) fusioniert wurde und die somit ein deutlich kleineres Molekulargewicht aufweisen (80kDa bsAk gegenüber 150kDa IgG). Durch die Einführung humaner konstanter Domänen wurden Anstrengungen unternommen, die Immunogenität zu minimieren.

Am Beispiel der bsAk $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 werden in dieser Arbeit verschiedene Wege aufgezeigt, um den aktiven Antikörperlokus der anti-EpCAM bzw. anti-L1CAM produzierenden Hybridomlinien HEA125 und HuL1-9.3 neu zu gestalten. Grundlage hierfür war eine Kombination aus homologer Rekombination (HR) und ortsspezifischer Integration (SSR). Die eingefügte Transfektionskassette kodierte für einen disulfidbrückenstabilisierten anti-CD3 scFv-Antikörper (dsFvOKT3), der an die humane CH1-Domäne der schweren IgG1-Kette fusioniert wurde. Die Kassette wurde von Homologieregionen flankiert, die sich spezifisch an den endogenen Antikörperlokus der Maus anlagern und sich dabei am 5’ Ende mit der CH1 Domäne und am 3’ Ende mit der CH3 Domäne überlagern. Nach erfolgter Rekombination, wurde die Gesamtheit der murinen konstanten Domänen (CH1-CH3) durch die CH1-dsFvOKT3 Fusion ersetzt. Hieraus ergaben sich Hybridomlinien, die anstelle des konventionellen Parentalantikörpers, kleine bispezifische Antikörper sezernieren. Es konnte über Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 an ihre zellulären Zielantigene EpCAM und CD3 bzw. L1CAM und CD3 binden. Beide bsAk erweisen sich in der proteinbiochemischen Analyse zudem als korrekt assembliert und rein. In weiterführenden Experimenten wird nun getestet, ob die bsAk die Fähigkeit besitzen, die T-Zell-vermittelte Tumorzelllyse *in vitro* einzuleiten. Dabei erfolgt die Tumor-Erkennung über das Fab-Fragment, welches sich von den Parentalantikörpern ableitet, während der dsFvOKT3-Anteil CD3$^+$ T-Zellen aktiviert und an die Tumorzellen bindet. Sollten diese Erwartungen erfüllt werden, können beide

Antikörper als Kandidaten für weiterführende präklinsche Studien verwendet werden und möglicherweise in die Entwicklung zweier neuer Krebsmedikamente einmünden.

Eine weitere Anwendung findet die hier entwickelte Methode in der `HybLib´ Bibliothek, die gegenwärtig in unserer Abteilung hergestellt wird (Abb. 4.2). Hierbei handelt es sich um eine Hybridombibliothek komplett humaner Antikörper, welche die natürliche Antikörpermaschinerie von B-Zellen, die Signalgebung durch Oberflächenpräsentierte Antikörper (B-Zell Rezeptor) und die Affinitätsreifung durch die zelleigene somatische Hypermutation nutzt. Das Verfahren, das in dieser Dissertation zur Expression bispezifischer Antikörper in Hybridomen beschrieben wird, ist dazu konzipiert worden, diese Bibliothek zu ergänzen und ermöglicht es fortan den Wirkungsmechanismus des Antikörpers sehr leicht an die therapeutischen Anforderungen anzupassen. Die Methodik versteht sich als genomischer Schalter zwischen konventionellem und bispezifischem Format und wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich in die Praxis umgesetzt. Das bispezifische Gerüst kann nun ohne großen Aufwand auf neue Spezifitäten angepasst werden.

1 EINLEITUNG

Vielfältige Versuche, das Immunsystem so zu modulieren, dass eine gegen den Tumor gerichtete Antwort erzielt wird, sind nicht neu und sind ausgiebig in der Geschichte der Immuntherapie dokumentiert. Erste Erfolge wurden bereits um die Jahrhundertwende verzeichnet, als der Chirurg William Coley beobachtete, dass eine postoperative Wundentzündung die Regression eines Sarkoms einleitete (Coley 1991). Der Effekt beruhte auf einem Mechanismus der unspezifischen Immunstimulation. Etwa zeitgleich formulierten Emil von Behring die Serumtherapie und Paul Ehrlich seinerseits die „Seitenkettentheorie" und beschrieben damit aus heutiger Sicht erstmals die Grundlagen der humorale Immunabwehr. Die Verwendung von bakteriellen Extrakten (Coley Toxine) gehört nicht mehr zur klinischen Praxis, aber viele unspezifische Therapien wurden seither entwickelt. In dem Maße wie unser Verständnis des Immunsystems und der Tumorimmunologie zunimmt, wachsen auch die verschiedenen Ansätze zur Behandlung von Tumoren. Eine Reihe therapeutischer Anwendungen, die auf Erkenntnissen und Prinzipien der Immunologie beruhen, lassen sich unter dem Begriff Immuntherapie zusammenfassen. Dies betrifft alle Behandlungsformen, bei denen Komponenten des Immunsystems gezielt beeinflusst werden. Monoklonale und rekombinante Antikörper haben die therapeutischen Möglichkeiten zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen im Laufe der letzten 10 Jahre entscheidend verbessert. Die ersten Tumortherapieversuche mit einem monoklonalen Antikörper wurden vor etwa 30 Jahren von Nadler *et al.* am Dana-Farber Cancer Institut in Boston durchgeführt, waren allerdings nicht sehr erfolgreich (Nadler *et al.* 1980). Heute weiß man, dass Antikörper, die aus der Maus oder der Ratte stammen, das menschliche Immunsystem weit schlechter aktivieren als die humanen Äquivalente. Zudem wurden die Antikörper der ersten Generation vom körpereigenen Immunsystem als fremd erkannt und über die HAMA (*human anti-mouse antibodies*) Antwort rasch neutralisiert. Seither haben sich therapeutische Antikörper zu einer wichtigen und bewährten Wirkstoffklasse entwickelt. 25-29% der chimären und humanisierten Antikörper in der Entwicklung haben zurzeit eine Erfolgsaussicht auf Marktzulassung und haben somit die "*small-molecules*" mit einer Erfolgswahrscheinlichkeit von nur 11% eingeholt (Kola und Landis 2004, Reichert *et al.* 2005).
Trotz der beachtlichen therapeutischen Erfolge, die mit Antikörpern erzielt werden, ist die Behandlung mit konventionellen Antikörpern auch mit Nachteilen verbunden (Kapitel 1.5.2). Sämtliche Antikörper die derzeit zur Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden, binden an Oberflächenmoleküle, oder seltener auch an lösliche Liganden. Mit regulären Antikörpern wird oft nur eine unzureichende Penetration des großen Moleküls in wenig vaskularisierte Tumoren mit hohem interstitiellen Binnendruck erreicht. Der klinische Erfolg hängt von den Eigenschaften des Zielantigens (Kapitel 1.6.2), den Eigenschaften des Antikörpers, des Wirkungsmechanismus (Kapitel 1.1.2, 1.4.1) und des

gewählten Formats ab (Kapitel 1.4.2). Gegenwärtig werden Antikörper in Säugetierzellen produziert, deren Kultivierung aufwändig und teuer zugleich ist (Kapitel 1.3). Aufgrund der steigenden Nachfrage nach therapeutischen Antikörpern wird es daher schwierig sein, den Produktionsbedarf zu decken und die zunehmenden Anforderungen an die etablierten Expressionstechnologien zu befriedigen. Es besteht daher ein dringender Bedarf, alternative Herstellungsverfahren zu entwickeln. Zudem steigt auch die Nachfrage nach humanen Antikörpern. Die Gentechnik ermöglicht es, den Anteil an Sequenzen aus fremden Organismen zu reduzieren und so die Bildung neutralisierender Antikörper zu vermeiden.
Für viele therapeutische *in vivo* Anwendungen, bei denen Antikörper spezifisch an Tumor-assoziierte Antigene binden, reicht die alleinige Bindung des Antikörpers an die Tumorzelle nicht aus, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Aus diesem Grund richten sich viele Hoffnungen auf die Entwicklung bispezifischer Antikörper (bsAk), welche zwei unterschiedliche Bindungsspezifitäten aufweisen und somit in der Lage, sind zwei Zielmoleküle miteinander zu verbinden (Kapitel 1.4). Bispezifische Antikörper kommen in der Natur nicht vor, sondern sind ein künstliches Produkt des Menschen. Zu den wesentlichen Verfahren, um bispezifische Antikörper herzustellen, zählen die chemische Quervernetzung zweier Antikörper, die Fusion zweier Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wie auch der Einsatz von Gentechnik (Kapitel 1.4.3).

In dieser Arbeit sollte ein Weg aufgezeigt werden, der es ermöglicht, Hybridomzellen durch genetische Verfahren routinemäßig so zu manipulieren, dass sie bispezifische Antikörper produzieren. Damit sollten die Vorteile der Hybridomtechnologie (gute Antikörperproduktion) mit denen der Gentechnik (einfache Manipulation von Genen) verbunden werden.

1.1 Antikörper

1.1.1 Antikörperstruktur

Die kristallographischen Untersuchungen der letzten 30 Jahre haben über 350 detaillierte, dreidimensionale Darstellungen von Antikörpern und ihren Fragmenten geliefert (Edelman 1971, 1973, 1991, Porter 1991, Ramsland und Farrugia 2002). Strukturell gesehen sind Antikörper symmetrische Tetramere mit jeweils zwei Antigenbindungsstellen und werden schematisch oftmals als Y-förmige Moleküle dargestellt. Sie bestehen aus zwei jeweils identischen schweren und leichten Polypeptidketten, die über kovalente (Disulfidbrücken) und nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden (**s. Abb. 1.2**).

Durch eine Behandlung mit Enzymen (Porter 1959, Yamaguchi *et al.* 1995) und chemischen Reagenzien können Antikörper in Fragmente zerteilt werden (**Abb. 1.1**). Reduzierende Reagenzien spalten Disulfidbrücken und generieren zwei schwere Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa sowie zwei leichte Ketten von ca. 25 kDa (Nisonoff *et al.* 1960). Das Enzym Papain spaltet das basische Molekül in drei 45 kDa große Fragmente. Jeweils zwei dieser Fragmente behalten die Fähigkeit des Antikörpers Antigene zu binden bei und werden daher als Fab-Fragmente bezeichnet (*fragment antigen binding*). Dabei enthält jedes Fab-Fragment nur eine Erkennungsstelle und kann somit das entsprechende Antigen binden, jedoch nicht präzipitieren. Das dritte Produkt des Papainverdaus kann aus einer Lösung herauskristallisiert werden und erhält demnach die Bezeichnung Fc (*fragment crystalline*). Das Fab-Fragment ist die antigenbindende Komponente, während der Fc-Teil ein Ankerpunkt für Proteine des Komplementsystems und für Rezeptoren diverser Effektorzellen ist. Eine Behandlung mit dem Enzym Pepsin ergibt neben einer Vielzahl kleinerer Fragmente auch ein 90 kDa großes $F(ab')_2$-Fragment, welches Antigene binden, und im Gegensatz zu Fab-Fragmenten aber auch fällen kann.

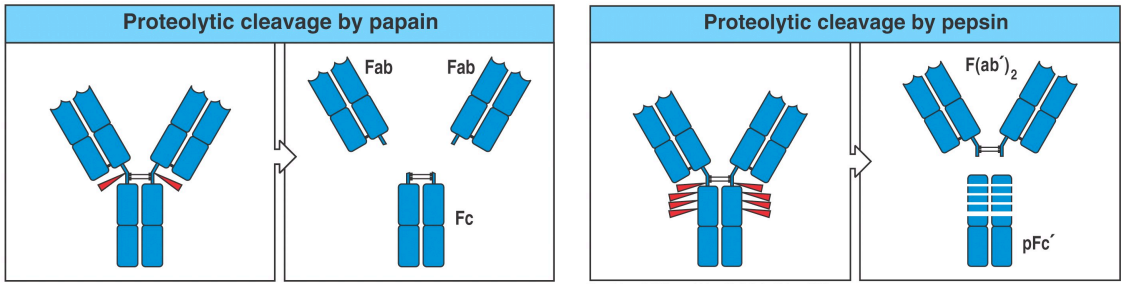


Abb. 1.2: Spaltprodukte der Proteasen Pepsin und Papain. Papain spaltet Immunglobuline in drei Teile, zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Das Enzym Pepsin generiert ein großes $F(ab')_2$-Fragment sowie eine Vielzahl kleinerer Spaltprodukte, darunter das pFc'-Fragment. (Janeway *et al.* 2005)

Beim Menschen unterscheidet man zwei gleichlange (250 Aminosäuren) leichte Ketten, *kappa* (κ) und *lambda* (λ). Im Gegensatz hierzu variieren die schweren Ketten je nach Isotyp stark in ihrer Länge (ca. 450 bis 550 AS) (**Abb. 1.1 A, B**). Humane Antikörper lassen sich in fünf Klassen einteilen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die Klassifizierung ergibt sich aus der Zusammenstellung ihrer Gene, die mit α, δ, ε, γ und μ bezeichnet werden. Jede Antikörperkette wird modular aus einer konstanten und einer variablen Region aufgebaut (**Abb. 1.1 C**). Aus Sequenzvergleichen wurde ersichtlich, dass es innerhalb dieser Regionen stark homologe Domänen gibt. Diese sog. Ig-Domänen sind jeweils ca. 110 AS lang und werden über Disulfidbrücken (*intrachain disulfide bond*) miteinander verknüpft, was den Domänen Stabilität und ihre globuläre Struktur verleiht.

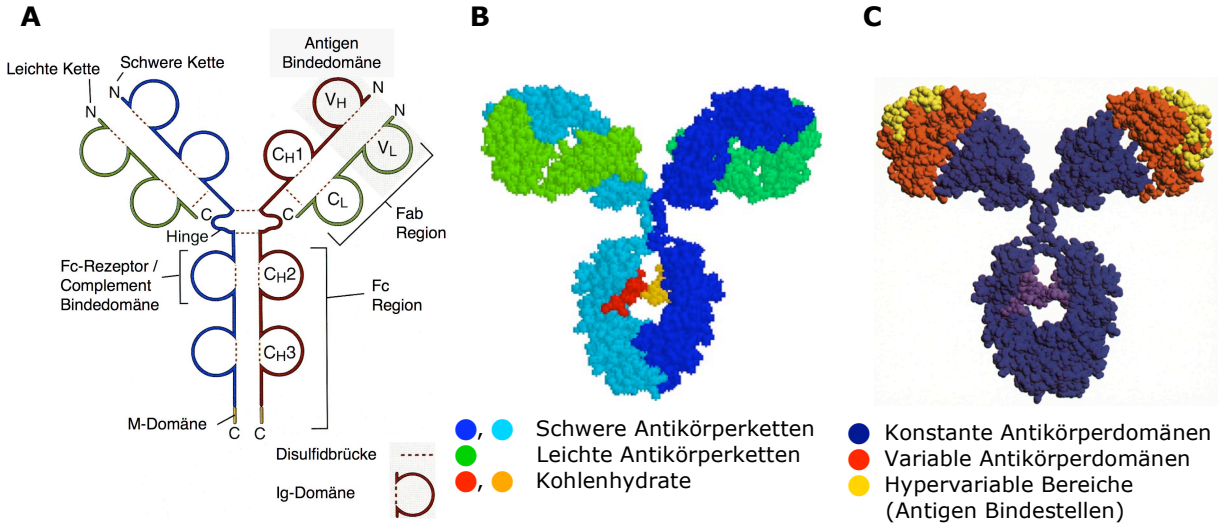


Abb. 1.1: Dreidimensionales Computermodell eines humanen IgG1 Antikörpers. Diese Modelle wurde von Mike Clark, PhD. (Cambridge University, UK) bereitgestellt.

Eine leichte Kette besteht aus einer variablen Domäne (V_L, *variable light*) und einer konstanten Domäne (C_L, *constant light*). Schwere Ketten besitzen ebenfalls eine variable Domäne (V_H, *variable heavy*). Die Isotypen α, γ, δ sind jeweils mit drei konstanten Domänen ausgestattet (CH1 bis CH3, *constant heavy* 1 bis 3), die Isotypen μ und ε mit jeweils einer vierten Domäne (CH4). Die Verbindung zwischen Fab- und Fc-Teil wird als *Hinge* bezeichnet. Diese Prolin- und Cysteinreiche Sequenz ermöglicht einerseits eine für die Antigenbindung relevante Flexibilität der Fab- und Fc-Segmente untereinander, andererseits stabilisiert sie durch die Ausbildung von Disulfidbrücken die beiden schweren Ketten (*interchain disulfide bond*). Die *Hinge* entfällt bei IgM und IgE, die eine zusätzliche CH4 Domäne enthalten. Abgesehen von den Disulfidbrücken der *Hinge*, beinhalten alle Antikörper eine solche Brücke zwischen der CH1 Domäne der schweren Kette und der konstanten Domäne der leichten Kette (C_L). Die Anzahl der Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Ketten variiert je nach Isotyp. Ebenso variabel ist die Anzahl und Beschaffenheit der Kohlenhydratketten, welche am Fc-Teil positioniert sind. Schwere Ketten sind im Gegensatz zu den leichten Ketten in der Regel glykosyliert.

Die enorme Vielfalt der Antikörper beruht auf drei hypervariablen Bereichen innerhalb der variablen Antikörperdomänen der schweren und leichten Ketten (**Abb. 1.1.C**). Solche Regionen sind circa 5-15 AS lang und werden auch CDRs (*complementarity determining regions*) genannt, da sie mittels gegenseitiger Komplementarität mit den Aminosäuren der Antigene interagieren (Kabat *et al.* 1991). Die variablen Domänen sind mit sog. *framework* Zonen durchsetzt (**Abb. 1.3**). Diese repräsentieren ca. 80% der variablen Region und sind stärker konserviert als die CDRs. CDRs bilden auf Proteinebene Schleifen aus. In der gefalteten Struktur des Antikörpers lagern sich jeweils die drei Schleifen der V_H Domäne mit den drei Schleifen der V_L Domäne zusammen und bilden eine Bindungsspalte aus, die als Paratop bezeichnet wird und der eigentliche Ort der Antikörper-Antigen Interaktion ist.

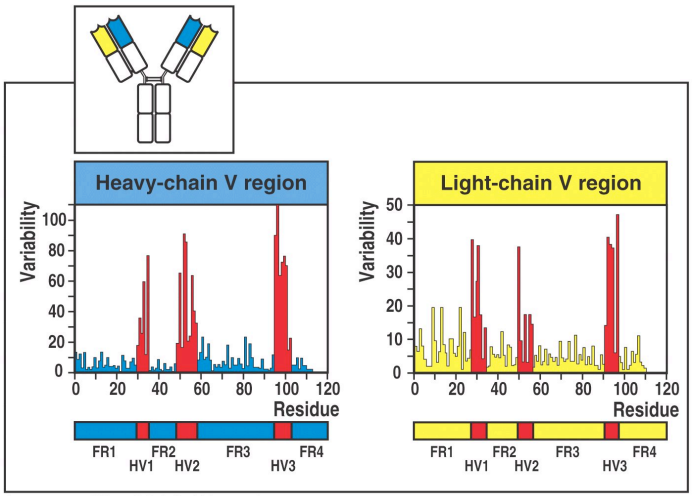


Abb. 1.3: Hypervariable Regionen der V-Domänen von schwerer und leichter Antikörperkette. Die drei hypervariablen Regionen (HV1-3) sind auch als CDR1-3 (*complementarity determining region*) bekannt und sind rot dargestellt. Die sie flankierenden Gerüstregionen (FR1-4, *framework region*) sind blau bzw. gelb hinterlegt. Die Variabilität der einzelnen Aminosäuren (AS) wird ausgedrückt als das Verhältnis aus der Anzahl unterschiedlicher AS zur häufigsten AS an einer definierten Position. (Janeway *et al.* 2005)

1.1.2 Antikörperfunktion

Für das Immunsystem spielen membranständige Antikörper auf B-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion ins Zytoplasma und zu nuklearen Effektoren. B-Lymphozyten befördern die an Antikörpern gebundenen Antigene in das Zellinnere, wo sie abgebaut, prozessiert und schließlich auf MHC Klasse II Molekülen geladen zur Interaktion mit T-Lymphozyten auf der Membran bereit stehen. T-Zellen setzen ihrerseits Signale frei, welche die Vermehrung und die Differenzierung von B-Lymphozyten anregen. Sezernierte Antikörper sind im Körper zuständig für die humorale Immunantwort die einen wichtigen Schutzmechanismus gegen extrazelluläre Pathogene, die Ausbreitung von Infektionen im Körper und die Neutralisierung von Toxinen darstellt. Die beiden strukturellen Einheiten der Antikörper, das variable Fab-Fragment sowie das konstante Fc-Fragment übernehmen funktionell distinkte Aufgaben.

Zu den Fab-vermittelten Aufgaben gehören:

- die spezifische *Antigenerkennung*. Das Immunsystem generiert ein immenses Repertoire an unterschiedlichen Paratopen, welche nahezu alle Antigene aus der Umwelt als auch Antigene von Pathogenen und deren Produkte erkennen.
- die *Neutralisierung von Pathogenen und Toxinen*. Antikörper binden an Strukturen auf der Oberfläche von Viren, Bakterien oder auch Toxinen und verhindern auf diese Weise deren Eindringen in die Zielzelle.

Ihre volle Wirkung erzielen Antikörper im Zusammenspiel mit den zellulären Komponenten des Immunsystems. Die konstanten Domänen von Antikörpern (Fc-Anteil) aktivieren akzessorische Effektorzellen, zu denen phagozytische Zellen (Makrophagen

und Neutrophile), natürliche Killerzellen, Mastzellen und Eosinophile zählen. Zur Eliminierung von infektiösem Material hat das Immunsystem verschiedene Mechanismen entwickelt:

- *Komplementabhängige Zytotoxizität,* CDC (*complement dependant cytotoxicity*): Das Komplementsystem ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems und wirkt weitgehend unspezifisch. Antikörper (IgM, IgG1, IgG3) bilden mit Antigenen Immunkomplexe, die löslich sein können. Darüberhinaus werden Pathogene, infizierte Zellen oder Gewebe an ihrer Oberfläche mit Antikörpern markiert. Mit Antikörpern beladene Zellen werden vom Komplementsystem erkannt, und leiten über die Quervernetzung der Fc-Teile eine Kaskade ein, die mit der Assemblierung eines MAC Komplexes (*membrane attack complex*) einhergeht. Zu den Folgen einer Komplementaktivierung zählen neben der direkten osmotischen Zelllyse, die Phagozytose durch chemotaktisch angezogene Immunzellen, als auch die Degranulierung von Mastzellen.
- *Opsonisierung*: Akzessorische Effektorzellen tragen isotypspezifische Fc-Rezeptoren, die mit den konstanten Antikörperdomänen interagieren. Makrophagen und Neutrophile werden auf diese Weise dazu angeregt, die von Antikörpern markierten Pathogene zu internalisieren und abzubauen. Der FcγRI Rezeptor (CD64) erweist sich beispielsweise als hochaffin für humanes, monomerisches IgG1 und IgG3.
- *Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, ADCC* (*antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity*): Antikörper tragen zur Eliminierung von unerwünschten Zellen durch die Rekrutierung von natürlichen Killerzellen (NK) bei. NK Zellen exprimieren FcγRIII Rezeptoren (CD16), die ihnen die Erkennung von IgG1 und IgG3 Subklassen ermöglicht. Die Aktivierung von NK Zellen bewirkt die Ausschüttung toxischer Substanzen, darunter proteolytische und DNA abbauende Enzyme sowie Poren-formende Proteine.

Bei diesen Abläufen spielen die unterschiedlichen Isotypen eine wichtige Rolle. IgM Antikörper binden oft schwach affin an ihr Antigen. Aufgrund ihrer pentameren Struktur binden sie diese Antigene jedoch multivalent (10 Antigene pro Molekül) und erhöhen so die effektive Bindung. Zudem sind sie effiziente Aktivatoren des Komplementsystems. IgG Antikörper hingegen binden meist mit hoher Affinität, da sie einen Reifungsprozess durchlaufen. Im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten sind IgGs der dominante Antikörper Isotyp, außerdem sind sie gewebegängig. IgG Antikörper spielen eine wichtige Rolle bei der Opsonisierung und der Aktivierung des Komplementsystems. IgA Antikörper bilden in Sekreten den mehrheitlichen Isotyp. Sie schützen vor allem das Epithel im Verdauungstrakt und in den Atemwegen vor Infektionserregern. Sezernierte IgA befinden sich ebenfalls in der Kolostralmilch der Mutter und gewähren dem Neugeborenen Schutz vor Infektionen. Da die Funktion von Antikörpern weitgehend von den Zellen des Immunsystems unterstützt wird, ist bei einer therapeutischen Anwendung auf die

Kompatibilität der Spezies zu achten. Murine Antikörper aktivieren die Effektorfunktionen des menschlichen Immunsystems sehr viel schlechter als humane Antikörper, obwohl sie den menschlichen Äquivalenten strukturell sehr ähnlich sind. Zudem werden sie im menschlichen Organismus durch die sog. HAMA Antwort (*human anti-mouse antibodies*) meist sehr schnell inaktiviert. Aus diesem Grund dominieren heute humanisierte bzw. humane Antikörper in der klinischen Anwendung.

1.1.3 Antikörpergenetik

Um gegen alle erdenklichen Krankheiten gewappnet zu sein, wird ein riesiges Arsenal von Antikörpern bereitgestellt. Die Anzahl unterschiedlicher Antikörper wird auf mindestens 10^{11} geschätzt und kann somit nicht durch eigenständige Gene entstehen (Tonegawa *et al.* 1974). Erklärt wird diese Vielfalt stattdessen durch das Prinzip der genetischen Kombinatorik (Brack *et al.* 1978, Weigert *et al.* 1980, Tonegawa 1983). Aus einem eingeschränkten Satz von Genen, welche bei der Reifung von B-Zellen individuell zusammengesetzt werden, können Antikörper unterschiedlicher Spezifität hergestellt werden. Dieser Prozess wird als somatisches *gene rearrangement* bezeichnet und erfolgt im Knochenmark. Die Antikörpergene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen als Cluster im Genom vor und weisen einen ähnlichen modulareren Aufbau auf (Brack et al. 1978, Lefranc und Lefranc 2001a)

Die variable Region besteht aus V (*variable*), D (*diversity*) und J (*junctional*) Segmenten, wobei jedes dieser Segmente in mehrfacher Ausführung vorliegt (**Abb. 1.4**) (Early *et al.* 1980). In der Keimbahn von B-Zellen werden diese Segmente zu einem funktionellen Exon assembliert. Man spricht hier von der V(D)J-Rekombination. Die Genkomplexe der leichten Ketten bestehen aus V und J Segmenten, während im Exon der schweren Kette ein D Segment zwischengeschaltet ist. Immunglobuline sind extrazelluläre Proteine. Daher geht jedem V Segment ein L (*leader*) Segment voraus, welches das Protein in die sekretorische Bahn der Zelle leitet und anschließend abgespalten wird.

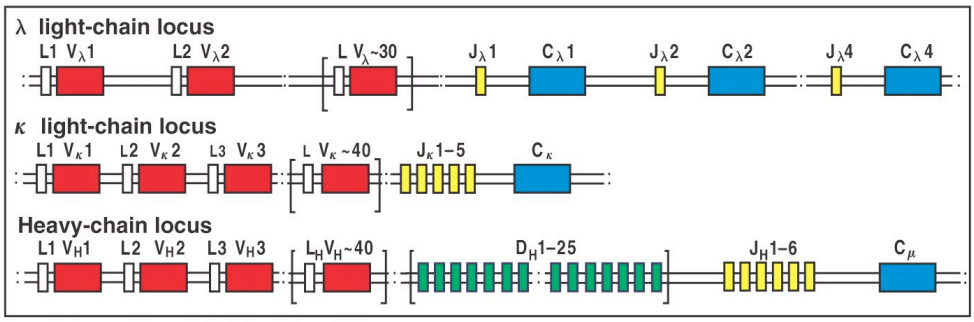


Abb. 1.4: Organisation der Keimbahn Loci der variablen Regionen von schwerer und leichter Antiköperkette im humanen Genom. Die Gen-Cluster der variablen Antikörpergene setzen sich aus einer unterschiedlichen Anzahl V-, J-, und D-Segmenten zusammen. (Janeway *et al.* 2005)

Die Auswahl der Segmente, die miteinander rekombiniert werden erfolgt zufällig. Dennoch ist die Abfolge in der schweren Kette mit VDJ bzw. in der leichten Kette mit VJ stets konstant. Die Regulierung erfolgt über sog. RSS Sequenzen (*recombination signal sequence*), welche die unterschiedlichen Segmente flankieren und von speziellen Rekombinasen erkannt werden (Sakano *et al.* 1979, Early *et al.* 1980). Die Rekombinasen werden durch die RAG Gene (*recombination activating gene*) kodiert. Bei der eigentlichen Reaktion werden Brüche in der genomischen DNA erzeugt, wobei die Enden der kodierenden Segmente unpräzise wieder zusammengeführt werden. Bis zu 20 zusätzliche Nukleotide können von Exonukleasen entfernt oder dem Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) angehängt werden. Diese junktionale Vielfalt ist eine der Hauptursachen für die CDR3 Variabilität.
Durch den Vorgang der Nukleotidaddition und –beseitigung, können Verschiebungen im Leseraster entstehen die nicht-funktionale Antikörpervarianten kodieren. Das diploide Genom des Menschen verfügt aber über zwei rekombinationsfähige Allele für jeden Lokus. Die B-Zelle unterdrückt die genetische Umlagerung des zweiten Allels, sobald das erste Allel erfolgreich umgelagert wurde (*allelic exclusion*) (Early und Hood 1981). Die Assemblierung der Gensegmente zur Produktion eines vollständigen Antikörpers erfordert drei Rekombinationsereignisse, die sukzessiv zu unterschiedlichen Zeitpunkten der B-Zell Entwicklung folgendermaßen durchgeführt werden: Zur Erzeugung der schweren Kette werden zunächst D und J_H zusammengefügt (*early Pro-B cell*), gefolgt von V_H zu VDJ_H (*large Pre-B cell*). Scheitert dieser Vorgang auf beiden Allelen, folgt ein programmierter Zelltod (ca. 45% der Zellen). Pre-B-Zellen können sich bereits vermehren und liefern so eine erhöhte Anzahl Klone zur Rekombination der leichten Ketten. Bei erfolgreicher Assemblierung fährt die Zelle mit der Verknüpfung von V_L mit J_L des *kappa* Lokusses fort (*immature B cell*). Scheitert diese im zweiten Anlauf, verfährt die Zelle mit dem *lambda* Lokus nach dem gleichen Prinzip. Der *kappa*-Lokus weist zudem die Besonderheit auf, dass innerhalb eines Allels mehrere V_LJ_L Verknüpfungen generiert werden können, falls es zuvor zu misslungenen Umlagerungen gekommen ist. So wird die Fehlerrate gering gehalten, so dass Pre-B-Zellen selten als apoptotisch ausgemustert werden. Der *kappa* Lokus wird beim Menschen bevorzugt rekombiniert (*isotypic exclusion*) und führt beim Erwachsenen zu einem κ:λ Verhältnis von 65%:35%.
Die V(D)J-Umlagerung der Gene erfolgt in B-Lymphozyten einmalig. Sie findet im Knochenmark statt und ergibt nach erfolgreicher Vollendung eine reife B-Zelle (*mature B cell*) die in die Peripherie entlassen werden kann.

Die <u>konstanten Regionen</u> (C) von schweren und leichten Ketten werden von einer separaten Exongruppe kodiert. Der *lambda* bzw. *kappa* Lokus enthält vier bzw. ein einzelnes C-Segment ($C\lambda_{1-4}$ bzw. $C\kappa$). Der Lokus der schweren Kette umfasst ca. 200 kb und enthält eine Abfolge mehrerer C-Segmente, die den unterschiedlichen Isotypen

entsprechen (**Abb. 1.5**, humaner Lokus: Cμ, Cδ, Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cε, Cα, ψCε). Dabei ist jedes C-Segment wiederum ein einzelne Exons unterteilt, die den unterschiedlichen konstanten Domänen eines Isotyps entsprechen. So enthält das Segment Cγ1 beispielsweise Exons für die CH1, *Hinge*, CH2 und CH3 Domänen eines IgG1 Antikörpers.

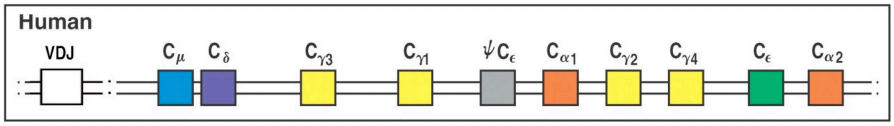


Abb. 1.5: Anordnung der Gensegmente für konstante Domänen in der Keimbahn humaner B-Zellen. C Segmente entsprechen den unterschiedlichen Antikörperisotypen Cμ, Cδ, Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cε, Cα, ψCε und werden im Prozess des *isotype switching* über sog. S-Regionen an die rekombinierte VDJ-Region angehängt werden. Adaptiert aus Janeway *et al.* 2005.

Die umgelagerten Exons der variablen Domänen von schwerer und leichter Kette (VJ_L bzw. VDJ_H) und werden über alternatives Spleißen mit den konstanten Domänen verbunden (**Abb. 1.6**). Zu Beginn exprimieren B-Zellen gleichzeitig IgM und IgD Isotypen, da die Cμ und Cδ Segmente in der Abfolge an erster Position stehen. Sie sind somit für den Transkriptionsapparat gut erreichbar.

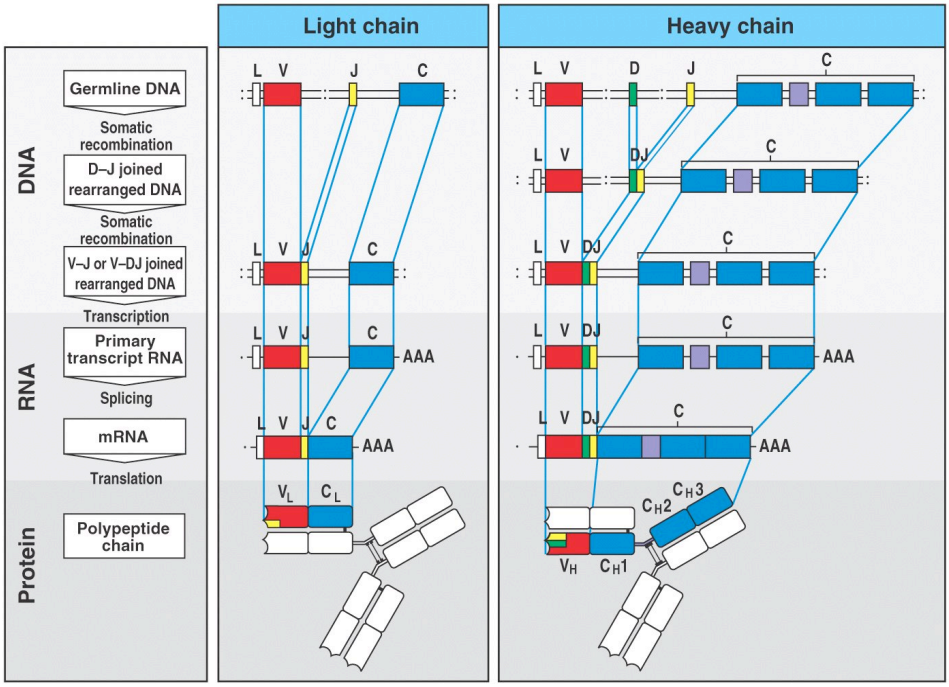


Abb. 1.6: Antikörpergene werden aus V, D, J und C Segmenten zusammengesetzt. V-Regionen der leichten Antikörperketten werden aus einem variablen (V) und einem *joining* (J) Segment zusammengesetzt und durch eine konstante (C) Domäne ergänzt. Zur Erzeugung von V-Regionen der schweren Antikörperkette wird ein *diversity* (D) Segment zwischengeschaltet. Die konstante Region richtet sich nach dem jeweiligen Antikörper Isotyp und besteht aus einer Aneinanderreihung von Genblöcken. (Janeway *et al.* 2005)

B-Zellen können Antikörper sowohl in sezernierter Form als auch als transmembrane Rezeptoren produzieren und die Antigen Spezifität dabei beibehalten. Die membranständige Ausprägung aller Isotypen enthält eine 25 Aminosäuren lange, hydrophobe Sequenz am carboxy-terminalen Ende der Polypeptidkette, welche auf genomischer Ebene durch das MC (*membrane-coding*) Segment kodiert wird. Dagegen

schließt die Proteinsequenz eines sezernierten Antikörpers mit einer hydrophilen Kette ab, welche auf das SC (*secretion-coding*) Segment zurückzuführen ist. MC und SC Segmente sind hinter sämtlichen C_H Segmenten lokalisiert, wobei entweder die eine oder die andere Form durch alternatives Spleißen angefügt wird.
Membranständige Antikörper assoziieren mit den zwei unveränderlichen akzessorischen Polypeptidketten Igα und Igβ und bilden den sog. B-Zell Rezeptor Komplex (BCR), der eine wichtige Stellung in der Signalgebung einnimmt.

Die bislang erläuterten Mechanismen zur Generierung der Antikörpervielfalt finden während der Entwicklung einer B-Zelle in den zentralen Lymphorganen statt und sind Antigen unabhängig. Reife B-Zellen durchlaufen bei Antigenkontakt weitere beträchtliche Veränderungen, die ebenfalls die variablen Domänen zum Ziel haben und in den peripheren Lymphorganen stattfinden. Bei der **somatischen Hypermutation** führt die Zelle gezielt Mutationen in den umgelagerten Lokus der variablen Domänen von schwerer und leichter Antikörperkette ein (Kim *et al.* 1981, French *et al.* 1989). Dies erfolgt mit einer sehr hohen Rate und ermöglicht eine Erhöhung der Antikörperaffinität zum entsprechenden Antigen.
Des Weiteren sind B-Zellen nach einem Antigenstimulus in der Lage, ihre Fc-vermittelte Funktionalität über den Isotyp an die vorherrschenden Anforderungen der Immunreaktion anzupassen. Bei der als ***isotype switching*** bekannten Reaktion werden die Segmente Cμ und Cδ durch die nachfolgenden Segmente Cγ3, Cγ1, ψCε, Cα1, Cγ2, Cγ4, Cε und Cα2 ersetzt und in Reichweite des Transkriptionsapparates gebracht (Kataoka *et al.* 1980, Maki *et al.* 1980, Sakano *et al.* 1980). Ermöglicht wird der Vorgang durch GC-reiche *switch* Regionen, die allen C Segmenten der schweren Kette vorangehen. Das *isotype switching* führt zur Expression der restlichen Antikörperklassen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 und IgA2 und zum Verlust der Isotypen IgM und IgD.

<u>Die Antikörper Überproduktion</u>. Die Bindung eines Antigens an den B-Zell Rezeptor in Kombination mit einem durch T-Zellen vermittelten Signal versetzt B-Zellen in die Lage, sich in Plasmazellen zu differenzieren. Plasmazellen sezernieren bis zu 3000 Antikörper pro Sekunde, so dass Pathogene binnen kürzester Zeit neutralisiert werden. Derartige Ausbeuten sind einmalig und sollten für die therapeutische Antikörperproduktion nutzbar sein. Zwei Elemente tragen maßgeblich zu diesen hohen Raten bei: *enhancer* befinden sich im Lokus der schweren Ketten zwischen VDJ- und C-Segmenten (Gillies *et al.* 1983) und interagieren mit dem Antikörperpromotor am 5' Ende der variablen Domänen.

Wird das durch V(D)J entstehende, kombinatorische Antikörperrepertoire auf $1{,}9 \cdot 10^6$ angesetzt (kombinatorische Vielfalt), so erhöhen die junktionale Vielfalt und die somatische Hypermutation die Antikörperdiversität auf mindestens 10^{11}.

1.2 Herstellung von Antikörpern einer bestimmten Spezifität

1.2.1 Monoklonale Antikörper

Trotz der immensen Vielfalt an Antikörpern erzeugt eine individuelle B-Zelle lediglich EINEN ganz bestimmten Antikörper. Diese Erkenntnis war 1975 die Grundlage für die Entwicklung einer bahnbrechenden Technologie, für die *Georges Köhler* und *César Milstein* mit dem Nobelpreis honoriert wurden (Koehler und Milstein 1975). Durch ein spezielles Selektionsverfahren gelang es den Forschern gezielt und zuverlässig jene B-Zellen zu isolieren, die den Antikörper von Interesse in großen Mengen produzieren und sich zudem unbegrenzt in Kultur vermehren lassen. Bei der klassischen Herstellung monoklonaler Antikörper werden B-Lymphozyten aus der Milz einer im Vorfeld immunisierten Maus entnommen, und durch Zugabe von Fusionsvermittlern *in vitro* mit speziellen Myelomzellen verschmolzen. Myelome sind B-Zell Tumore, die neben der Eigenschaft gute Antikörperproduzenten zu sein, auch eine hohe Teilungsrate haben. Dagegen sind gesunde Milzzellen in Kultur nur begrenzt lebensfähig. Fusions-kompetente Myelomzellen sind HGPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*) defizient, und somit zum Überleben in HAT Medium (*Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin*) auf ein funktionelles Gen des B-Zell Fusionspartners angewiesen. In erfolgreich vereinigten Hybridomen, steuert die Myelomzelle die Unsterblichkeit und die hohe Produktionsrate bei, während die B-Zelle den HGPRT Gendefekt kompensiert und die Antikörperspezifität festlegt. Nach der Selektion durch das Antigen werden Hybridomklone vereinzelt und auf Antikörperspezifität und Produktion hin analysiert. Die ursprünglich von *Köhler* und *Milstein* entwickelte Prozedur wurde bis heute weitgehend beibehalten.
Die Hybridomtechnologie hat bereits wenige Jahre nach ihrer Einführung die Analytik und medizinischen Diagnostik revolutioniert, und führte u.a. zur Identifikation von vielen Oberflächenmolekülen auf weißen Blutzellen (CD-Antigene) und Tumorzellen.

1.2.2 Humane Antikörper

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendbarkeit wird angestrebt, murine Antikörper mehr und mehr durch humane Proteinsequenzen zu ersetzen. Bemühungen, die Technologie zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern mit den therapeutischen Anforderungen abzugleichen, werden dadurch erschwert, dass bislang keine adäquate humane Myelom Zellline zur Fusion existiert. Auch die Nutzung von so genannten Heteromyelomen (Mensch-Maus Chimären) hat sich nicht durchsetzen können.
Ein Durchbruch gelang durch die Erzeugung von transgenen Mäusen, deren endogener Antikörperlokus weitgehend durch den humanen ersetzt wurde (Green *et al.* 1994, Jakobovits 1995, Mendez *et al.* 1997). Die Immunisierung solcher Mäuse induziert somit die Produktion komplett humaner Antikörper. Die zugehörigen B-Zellen können nun

mittels bewährter, traditioneller Hybridomtechnologie durch Fusion immortalisiert werden. Der Antikörper Adalimumab/ Humira® ist ein derart hergestellter Antikörper und befindet sich in der klinischen Routine (Croom und McCormack 2009).

1.2.3 Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper sind gentechnologisch hergestellte Antikörper, welche in der Regel *in vitro* aus Bakterien gewonnen werden. Durch moderne Klonierungsverfahren werden hierzu die Sequenzen der spezifischen variablen Domänen entweder aus dem B-Zell Repertoire kopiert oder aus Phagen Bibliotheken gewonnen und in das gewünschte Antikörperformat konvertiert. Durch Methoden zur *in vitro* Selektion, also zur Gewinnung spezifischer Binder außerhalb eines lebenden Immunsystems, ist es erstmals gelungen, eine Vielzahl klinisch nutzbarer Antikörper herzustellen und somit Antikörper zu schaffen, welche die Natur nicht bereitzustellen vermag.

1.3 Produktionssysteme für Antikörper und deren Derivate

Zurzeit stammen alle zugelassenen therapeutischen Antikörper aus Säugetierzellen. Dieses Expressionssystem ist jedoch sehr teuer. Diese Erkenntnis hat in den letzten 20 Jahren die Entwicklung verschiedenster transgener Technologien vorangetrieben. Diese Technologien schließen die Verwendung von transgenen Hefestämmen, Bakterien, Insekten, Tieren und Pflanzen ein. Jede dieser Methoden bringt Vorteile in der Vergrößerung des Produktionsmaßstabes und der Kostenersparnis mit sich. Die alternativen Expressionssysteme weisen aber alle Defizite auf, die ihrer Akzeptanz in der wissenschaftlichen Gemeinschaft im Wege stehen. Zu diesen Defiziten gehören die Unterschiede im Glykosylierungsmuster, das Vorkommen viraler Pathogene, die komplexe Genetik mancher Systeme, die Instabilität und fehlerhafte Faltung der Antikörper, sowie ökologische Bedenken und die Länge der Produktionszeiträume.

1.3.1 Eukaryontische Expressionssysteme

Bei der Herstellung von Antikörpern in Säugetierzellen müssen die Proteine die sekretorische Bahn der Zelle durchlaufen, um ihren Bestimmungsort außerhalb der Zelle zu erreichen. Schwere und leichte Antikörperketten werden hierbei gesondert in das endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust. Dort werden sie assembliert, posttranslational modifiziert und erlangen ihre endgültige räumliche Konformation. Die Modifikationen, die an Antikörpern während ihrer Entstehung vorgenommen, werden tragen zur Funktionalisierung der Immunglobuline bei, regulieren jedoch gleichzeitig ihren Transport durch die Zelle. Neu synthetisierte, unvollständig gefaltete, schwere

Antikörperketten werden im ER zurückgehalten (Hurtley *et al.* 1989, Hammond und Helenius 1995) und erst nach Assoziation mit einer leichten Antikörperkette entlassen. Sie interagieren mit Matrixproteinen des ER oder binden nicht-kovalent an BiP, ein molekulares Chaperon, welches im ER residiert (Knittler und Haas 1992, Kaloff und Haas 1995). Leichte Antikörperketten spielen bei der Faltung von Immunglobulinen eine wichtige Rolle. Sie enthalten fünf Cysteine, von denen vier in Disulfidbrücken eingebunden sind und zur Stabilisierung der Ketten dienen. Das fünfte, carboxyterminale Cystein dagegen ist für die Ausbildung der intermolekularen Brücke mit der schweren Kette zuständig. Leichte Ketten können im Gegensatz zu schweren Ketten als freie Moleküle sezerniert werden und sind sowohl als Monomere als auch als Dimere vorzufinden (Shapiro *et al.* 1966, Skvortsov und Gurvich 1968, Morrison und Scharff 1975, Hannam-Harris und Smith 1981, Hopper und Papagiannes 1986, Dul *et al.* 1996). Diese molekularen Charakteristika von Antikörpern machen deutlich, weshalb es sehr schwer ist diese Moleküle rekombinant herzustellen und das geeignete Expressionssystem zu finden.
Die Zellen des Immunsystems, insbesondere Plasmazellen, sind die natürlichen Produktionsstätten von Antikörpern und sollten daher zur Produktion rekombinanter Antikörper besonders geeignet sein. Allerdings lassen sich Plasmazellen nicht beliebig in Kultur halten. Zur Produktion rekombinanter Antikörper nutzt man daher deren Vorläufer, die B-Zellen, oder auch Abkömmlinge von Plasmazellen, die zu Tumorzellen immortalisiert werden. Dieser Mechanismus liegt auch der Produktion von monoklonalen Antikörpern in Hybridomzellen zugrunde (Kapitel 1.2.1).

Zur Produktion eignen sich auch andere Säugetierzellen. COS-Zellen wurden ursprünglich aus der Niere von Affen gewonnen. Sie enthalten den Replikationsstart des SV40 Virus und exprimieren das dazugehörige große T-Antigen. COS-Zellen werden bevorzugt zur transienten Expression rekombinanter Proteine eingesetzt und ermöglichen Ausbeuten im mg/mL Bereich. Ganz ähnliche Eigenschaften sprechen auch für humane HEK 293T Zellen, die anfänglich aus Nieren humaner Embryonen (*human embryonic kidney*) isoliert wurden (Zur Hausen 1967). Im Gegensatz zu COS-Zellen eignen sich HEK 293T Zellen aber auch zur Erzeugung stabiler Zelllinien durch die Integration des Transgens in das Genom der Wirtszelle. Dies erfolgt meist durch Ko-Selektion eines Resistenzgens. CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) werden ebenfalls verbreitet zur Produktion rekombinanter Antikörper eingesetzt und sind der industrielle Standard. Sie sind stabil mit dem T7-RNA-Polymerase Gen des Bakteriophagen T7 transfiziert und steuern die Überexpression des Transgens über den effizienten T7 Promotor. Auch in CHO-Zellen können im Labormaßstab Ausbeuten im mg/mL Bereich erzielt werden. Im industriellen Maßstab sollen sogar Ausbeuten von 7 g/L erreicht worden sein.

Generell sollte bei allen Säugetierzellen beachtet werden, dass die Proteinexpressionsrate in Abhängigkeit des Integrationsortes im Genom der Zellen sehr stark variiert (Positionseffekt). Das Verpackungsmuster des Chromatins bestimmt, welche Gene in einer sich teilenden Zelle aktiv sind (Orphanides und Reinberg 2002). Für alle Expressionszelllinien gilt folglich, dass häufige Kontrollen der Antikörperproduktion und aufwendige Subklonierungsschritte erforderlich sind, um transkriptionsaktive Klone zu isolieren und zu propagieren.

1.3.2 Prokaryontische Expressionssysteme

E. Coli ist in der modernen Molekularbiologie ein etabliertes Produktionssystem für rekombinante Proteine. Die Gründe dafür sind die einfache Handhabung, das schnelle Wachstum und die Expertise im Umgang mit *E. Coli*. Dennoch lassen sich Antikörper nicht beliebig in prokaryontischen Expressionssystemen produzieren. Die Ausbeute variiert stark in Abhängigkeit von der Zusammenstellung der Codons und zu produzierender Antikörpervariante. Außerdem werden viele Antikörper in *E. Coli* durch endogene Proteasen abgebaut. Wie bereits beschrieben, erfordert die Herstellung von Antikörpern diverse Modifikationen bis zur Funktionalisierung. Maßgeblich ist vor allem die korrekte Faltung zur Tertiärstruktur, die von *E. Coli* nur eingeschränkt bewerkstelligt werden kann. Dementsprechend eignet sich *E. Coli* nicht für die Herstellung kompletter Antikörper. Zudem erschwert das reduzierende Milieu des Zytoplasmas die Ausbildung der stabilisierenden intermolekularen Disulfidbrücken. Man geht heute vermehrt dazu über, scFv-Fragmente mit künstlichen Disulfidbrücken zu stabilisieren, um die Ausbildung hochmolekularer Aggregate zu vermeiden (Brinkmann *et al.* 1993). Daher kann die Expression kleiner Antikörperderivate in *E. Coli* zu Komplikationen führen. Kleine scFv-Fragmente tendieren dazu, bei hohen Konzentrationen (1-5 mg/mL) zu unlöslichen Oligomeren zu aggregieren. Bei Gram$^-$ Bakterien können die Proteine bei geringer Konzentration in löslicher Form aus dem Zytoplasma gereinigt werden, aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern, oder aus dem periplasmatischen Raum gewonnen werden. Eine intrazelluläre Expression erfordert meistens eine *in vitro* Renaturierung, die mit hohen Verlusten einhergeht. Antikörper, die in den periplasmatischen Raum sezerniert werden, können sich zu funktionalen Molekülen falten. Im Periplasma herrscht darüber hinaus ein oxidierendes Milieu, das die Ausbildung der Disulfidbrücken in den Antikörperketten ermöglicht. Gram$^+$ Bakterien wie *Bacillus subtilis* bilden keine Lipopolysaccharidschicht aus und bieten daher den Vorteil, dass rekombinante Proteine direkt durch die Zytoplasmamembran ins umgebende Medium sezerniert werden. Aufgrund der besonderen Anforderungen an die Funktionalisierung rekombinanter Antikörper haben sich Bakterien trotz der hohen Ausbeuten und der theoretischen Vorteile nicht gegen etablierte Systeme wie Säugetierzellen durchgesetzt.

1.3.3 Weitere Produktionssysteme

- *Insektenzellen*: Das Baculovirus Expressionssystem ermöglicht innerhalb kurzer Zeit (48 h) die Herstellung großer Mengen (bis zu 1 g/mL) posttranslational modifizierter und biologisch aktiver, rekombinanter Proteine (O'Reilly 1997). Dennoch gibt es nur wenige publizierte Antikörper aus dem Baculovirus-System. Das System beruht auf der Herstellung rekombinanter Baculoviren (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*) und der nachfolgenden Infektion von Insektenzellen. Der verbreiteste Baculovirus ist der *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis Virus (*Ac*MNPV) und ist zur Vermehrung von den Schmetterlingsarten *Spodoptera frugiperda* (Sf-9 und Sf-21 Zellen) und *Trichoplusia ni* abhängig. *Ac*MNPV Partikel sind von einer schützenden Matrix umgeben, die überwiegend aus dem Protein Polyhedrin besteht und für die Vervielfältigung des Virus in der Natur essentiell ist. Polyhedrin steht unter Kontrolle des pPolh Promotors und stellt bis zu 50% des Gesamtproteins dar. Es ist *in vitro* nicht erforderlich, so dass es durch das Transgen ersetzt werden kann.
- *Pflanzenzellen*: Das System basiert auf der Infiltration des natürlichen Pflanzenpathogens *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzenzellen, wo es über das bakterieneigene Ti-Plasmid (*tumor inducing*) eine Wurzelgallen- (Tumor-) Bildung hervorruft und welches gentechnisch durch Fremd-DNA ersetzt werden kann. Die stabile Integration des Transgens in das Genom der Pflanze erfordert die Mitwirkung von „entschärften" Virluenzgenen des Bodenbakteriums. Das Verfahren ermöglicht die Herstellung großer Mengen (bis zu 1000 mg/mL) posttranslational modifizierter und biologisch aktiver, rekombinanter Proteine. Zudem besteht kein Risiko einer Verunreinigung mit säugerpathogenen Viren. In der Regel wird Benthams Tabak (*Nicotiana benthamiana*) verwendet, aber auch Flüssigkulturen des Mooses *Physcomitrella patens* oder anderer pflanzlicher Suspensionskulturen (Plasson *et al.* 2009) finden immer mehr Anwendung. Da Pflanzen keine speziellen Nährmedien benötigen, sind sie zweifellos das billigste Produktionssystem zur Herstellung großer Mengen Antikörper (Stoger *et al.* 2002).
- *Hefen und Pilze*: Einzellige Hefen können ähnlich kultiviert werden wie Bakterien und bieten die Vorteile des eukaryontischen Produktions- und Sekretionsapparates. Aufgrund der gut untersuchten Genetik wird die Bäckerhefe *Saccaromyces cerevisiae* am häufigsten zur heterologen Expression verwendet, aber auch in *Schizosaccaromyces pombe* oder *Picia pastoris* konnten im Labormaßstab Antikörper und deren Derivate im mg/mL Bereich produziert werden. Trotz allem ist nur ein kleiner Teil der gewonnenen Antikörper funktional und weist eine vollständige Glykosylierung auf. Relativ hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein konnten mit dem Kulturüberstand des filamentösen Pilzes *Trichoderma reesei* gewonnen werden. Generelle Aussagen über die Verwendbarkeit des Systems können aufgrund der seltenen Anwendung jedoch nicht gemacht werden.

1.4 Bispezifische Antikörper

Für viele therapeutische *in vivo* Anwendungen bei denen Antikörper spezifisch an Tumor-assoziierte Antigene binden, reicht die alleinige Bindung des Antikörpers an die Tumorzelle nicht aus, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Aus diesem Grund richten sich viele Hoffnungen auf die Entwicklung bispezifischer Antikörper (bsAk), welche zwei unterschiedliche Spezifitäten in sich vereinigen. Derartige Antikörper enthalten zwei unterschiedliche Bindungsspezifitäten innerhalb eines Moleküls und sind in der Lage zwei Zielmoleküle miteinander zu verbinden. Dadurch haben bsAk etliche klinische und experimentelle Vorzüge. Sie sind in der Lage, normale zelluläre oder zytotoxische Abwehrmechanismen an Tumoren heranzuführen oder können dazu eingesetzt werden, unterschiedlichste Arzneimittel im Tumor freizusetzen. Im Prinzip können bsAk immer dort eingesetzt werden, wo zwei Moleküle nicht-kovalent auf einer Distanz von 10-20nM verbunden werden sollen. Wichtig ist an diesem Punkt die Unterscheidung zwischen "bivalenten", "bispezifischen" und "bifunktionalen" Antikörpern. Der Begriff **bivalent** bezeichnet Antikörper, die in der Lage sind gleichzeitig zwei Antigene zu binden. Sind diese Antigene zudem unterschiedlich, so bezeichnet man den Antikörper als **bispezifisch**. Bispezifische Antikörper sind Antikörper-Antikörper Fusionen und werden vollkommen künstlich hergestellt. Konventionelle Antikörper z.B. sind monospezifisch, binden ihr Antigen jedoch bivalent. **Bifunktionale** Antikörper bestehen aus einem Antikörperfragment zur Bindung an die Zielzelle, wohingegen ein heterologer Anteil die jeweilige Effektorfunktion beisteuert. Es gibt zahreiche Beispiele für bifunktionelle Antikörper. Als Fusionspartner kommen hier sowohl Effektormoleküle wie Cytokine oder Wachstumsfaktoren in Frage (z.B. IL-2, IL-12 und GM-CFS), als auch Enzyme, die Vorstufen einer Wirksubstanz ortsgebunden umsetzten und so die umgebenden Zellen abtöten (ADEPT, *antibody-directed enzyme pro-drug therapy*). Schließlich können Tumoren oder andere Zielstrukturen durch die Fusion von Radionukliden an Antikörper, im Körper lokalisiert werden (Immunszintigraphie).

1.4.1 Wirkungsmechanismen von bsAk

Der Schlüssel zum Verständnis der Wirkungsweise von bsAk liegt in ihrer dualen Spezifität. In der Krebstherapie erkennen sie zum einen Tumor-assoziierte Antigene, die auf Tumoren verstärkt exprimiert werden. Zum anderen aktivieren sie gezielt Immuneffektorzellen des körpereigenen Abwehrsystems und induzieren so die Zytolyse der malignen Zellen. Bispezifische Antikörper, die zur Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems eingesetzt werden, kombinieren eine Bindestelle für ein Zielantigen auf den erkrankten Zellen mit einer zweiten Bindestelle für ein aktivierendes Steuermolekül auf den Effektorzellen, die dann die Zielzellen beseitigen. Dazu können entweder

zytotoxische T-Lymphozyten, NK-Zellen oder auch aktivierte Granulozyten und Monozyten über aktivierende Oberflächenrezeptoren rekrutiert werden (**Abb. 1.7**) (van Spriel *et al.* 2000). Der Mechanismus der T-Zell Zytotoxizität umfasst die Freisetzung zytotoxischer Granula (Granzym-Perforin System), den Fas-vermittelten programmierten Zelltod und die zielgerichtete Cytokinausschüttung (Renner et al. 1997a).

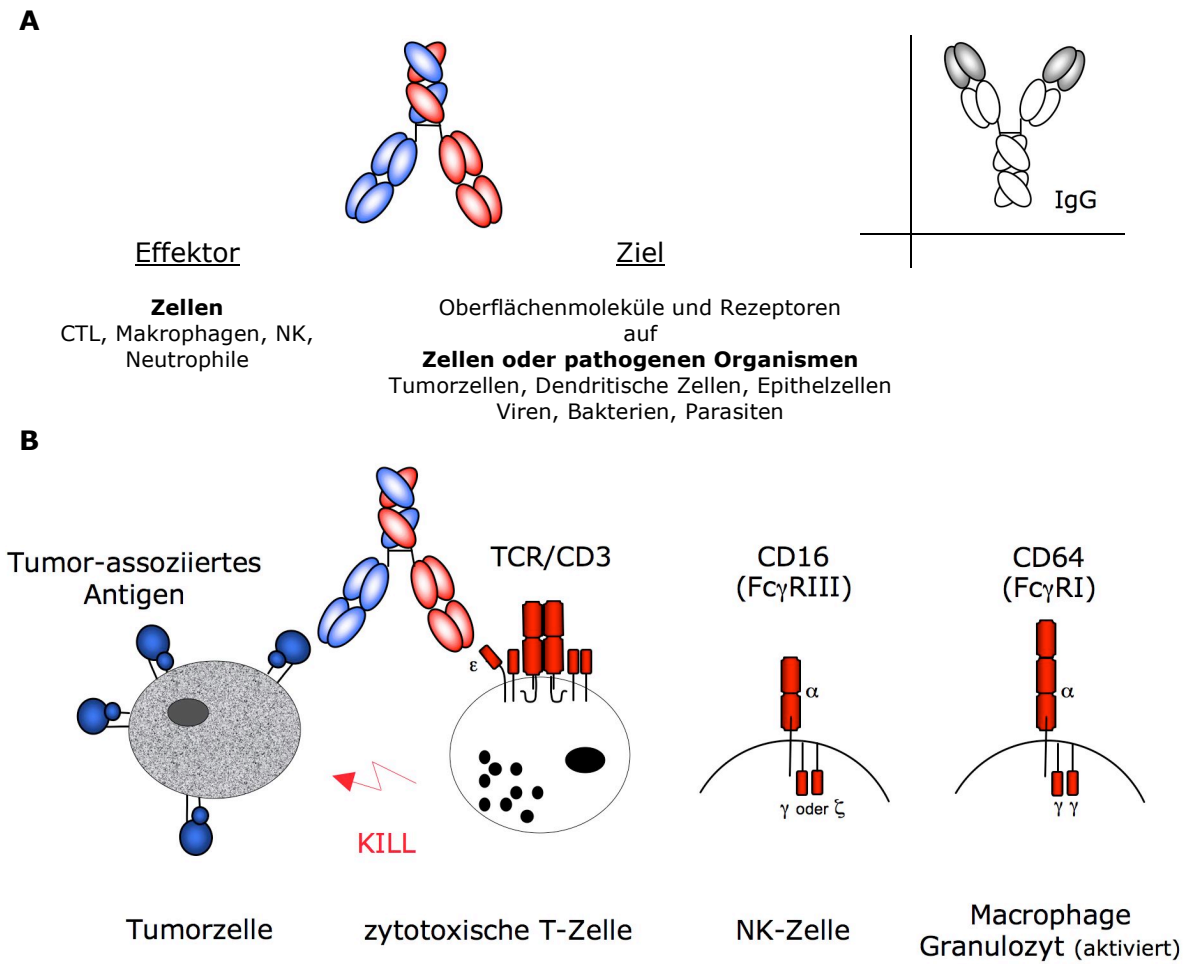


Abb. 1.7: Wirkungsmechanismen bispezifischer Antikörper.
A: Bispezifische Antikörper verbinden ein Zielmolekül mit einem Effektormechanismus. Die Herkunft beider Bindungspartner kann hierbei sehr vielfältig sein.
B: Induktion der Zytolyse von Tumorzellen durch Immuneffektorzellen. In der Onkologie können bsAk dazu eingesetzt werden, Immuneffektorzellen zum Ort des Tumors zu dirigieren und diese durch Kreuzvernetzung mit Tumor-assoziierten Antigenen lokal zu aktivieren. Immunzellen können z.B. über den TCR/CD3 Komplex auf T-Lymphozyten, den FcγRIII (CD16) auf NK-Zellen oder den FcγRI (CD64) auf Macrophagen und aktivierten Granulozyten anvisiert werden und wirken u.a. durch Cytokinausschüttung, Freisetzung toxischer Granula oder Fas-vermitteltem Zelltod.

Mit Hilfe von bispezifischen Antikörpern können verschiedene Limitierungen monoklonaler Antikörper teilweise überwunden, oder deren Anwendungsbereich zumindest erweitert werden. Bispezifische Antikörper bieten die Möglichkeit, gezielt und selektiv bestimmte Effektorzellpopulationen zu rekrutieren. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern, die über ihren Fc-Teil die Effektorfunktionen steuern, können bsAk auch solche Immunzellen rekrutieren, die keine Fc-Rezeptoren tragen, wie z.B. zytotoxische T-Lymphozyten (Peipp und Valerius 2002). Im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern wirken bsAk schon

bei einer niedrigeren Expression des Zielantigens und weisen ein höheres zytotoxisches Potential auf (Weiner *et al.* 1993, Peipp und Valerius 2002). Weiterhin wird die Wirksamkeit bispezifischer Antikörper nicht von Polymorphismen der Fc-Rezeptoren beeinträchtigt. Auch können zur Herstellung bispezifischer Antikörper Bindedomänen gewählt werden, die den Fc-Rezeptor außerhalb der IgG Bindetasche binden. Dies erlaubt es, einer Kompetition mit endogenen Immunglobulinen zu entgehen, mit denen monoklonale Antikörper konkurrieren müssen (Guyre *et al.* 1989). BsAk stellen somit eine Plattform dar, die es potentiell ermöglicht jedes denkbare Tumor-assoziierte Antigen zum Ziel für das körpereigene Abwehrsystem zu machen.

1.4.2 Bispezifische Antikörperformate

Traditionel wurden bsAk durch chemische Quervernetzung zweier Antikörper (Kapitel 1.4.3.1) oder Generierung sog. Quadrome (Kapitel 1.4.3.2) hergestellt. Diese Formen sind sehr groß und daher für die Therapie ungeeignet. Die Gentechnik hat zur Entwicklung vielfältiger Antikörperformate geführt mit dem Ziel, ihre Struktur und Größe zu optimieren und ihre Toxizität zu verringern (**Abb. 1.8**).

Fv-Fragmente sind minimale Antikörperderivate bestehend aus V_H und V_L und werden als die kleinste antigenbindende Einheit betrachtet. Die Bindungskräfte zwischen beiden Domänen sind jedoch weit schwächer als bei Fab-Fragmenten, welche von den zusätzlichen Verbindungen zwischen CH1 und C_L profitieren. Daher wurden beide Domänen von Fv-Fragmenten künstlich mit Peptidlinkern (scFv, *single-chain Fv*), über Disulfidbrücken (dsFv, *disulfide stabilized Fv*) oder durch *knobs into holes* Mutationen stabilisi(Glockshuber et al. 1990, Brinkmann et al. 1993). All diese Formate binden Antigene monovalent.

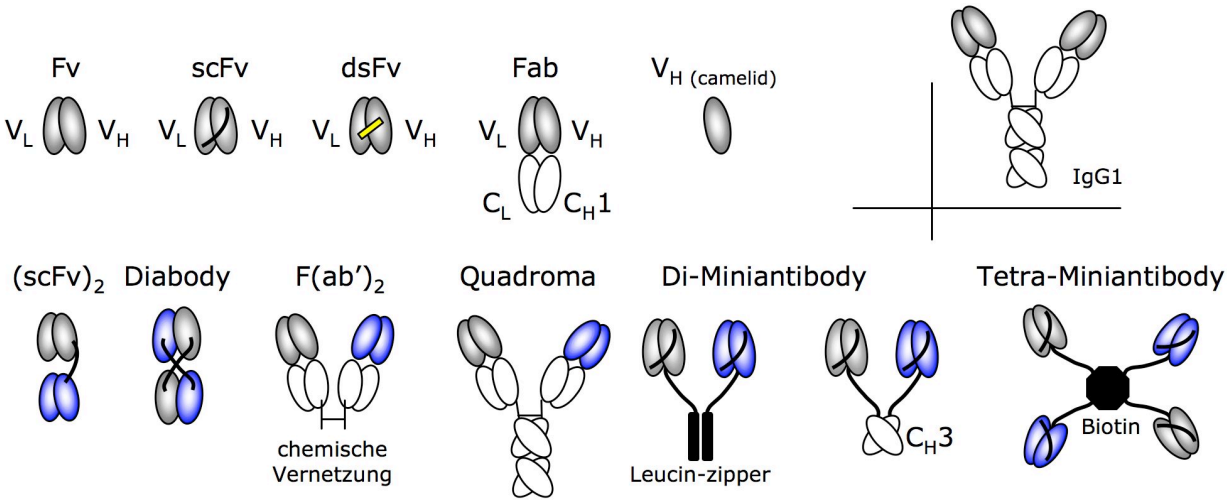


Abb. 1.8: Rekombinante Antikörperformate. Fv, variables Fragment; scFv, *single chain variable fragment*; scFv, *single-chain* Antikörper; dsFv, disulfidbrückenstabilisiertes scFv; Fab, *antigen binding fragment*; V_H, variables Fragment der schweren Antikörperkette; V_L, variables Fragment der leichten Antikörperkette; C_L, konstantes Fragment der leichten Antikörperkette; CH1, konstantes Fragment der schweren Antikörperkette.

Die Kombination zweier scFv-Fragmente unterschiedlicher Spezifität resultiert in bispezifischen $(scFv)_2$-Molekülen von ca. 60 kDa. Wird die Länge des Peptidlinkers von ursprünglich >12 Aminosäuren in scFv weiter reduziert, kommt es aufgrund der sterischen Hinderung nicht zu einer Zusammenlagerung der V_H und V_L Domänen zu einem Fv-Fragment. Stattdessen assoziieren diese mit benachbarten Domänen und bilden sog. *Diabodies*. Alternativ können scFv auch an amphiphile Helices, CH3 Domänen von IgGs oder über Biotin das homotetramerische Streptavidin fusioniert werden. Obgleich durch kleine Moleküle eine gute Gewebedurchlässigkeit erzielt werden kann, ist ihre Interaktion mit dem Immunsystem schwach und ihre *in vivo* Halbwertszeit im Blut gering.

1.4.3 Herstellung bispezifischer Antikörper

1.4.3.1 Chemische Vernetzung zweier Antikörper

N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP) ist ein herterobifunktionales Reagenz, welches sich zum kovalenten Vernetzen zweier Proteine, wie beispielsweise Antikörpern, eignet (Carlsson *et al.* 1978). Hierbei bindet das Reagenz zufällig an exponierte ε-amino Gruppen von Lysinresten und bildet Disulfidbrücken zwischen Antikörpern aus. Um die Bildung von Homoaggregaten zu vermeiden, wird von beiden SPDP-gekoppelten Antikörpern nur jeweils eine Variante reduziert und mit dem nicht reduzierten gemischt. Reduzierbare Disulfidbrücken können unter bestimmten Bedingungen instabil sein. Eine mögliche Alternative besteht darin, jeweils einen der Antikörper im Vorfeld mit einer maleinide-enthaltenden Verbindung (z.B. Succinimidyl-4-(p-Maleimidophenyl)butyrate) reagieren zu lassen, und diesen anschließend mit einem zweiten reduzierten, SPDP-Gruppen enthaltenden Antikörper zu versetzen. Die bei dieser Reaktion entstehenden Thioetherverbindungen sind nicht reduzierbar.

In Abhängigkeit von der Zugänglichkeit der Amiogruppen können SPDP Proteine jeglicher Art verbinden. Die Methode kann folglich für Antikörper oder Fab-Fragmente eingesetzt werden, ganz unabhängig von der Immunglobulinklasse. Das chemische Quervernetzen von sämtlichen Maus IgG Isotypen sowie gereinigten Ratten IgG und IgG2b wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Auch ist es theoretisch möglich, einen IgG Antikörper mit einem IgM oder IgA Isotyp zu verbinden, doch aufgrund der Größe bzw. polymeren Struktur dieser Antikörpervarianten ist die Reinigung der freien IgM und IgA von an IgG-gekoppelten ein schwieriger Prozess.

Die Methode erfordert hoch reine Antikörper, da auch Verunreinigungen mit SPDP reagieren können. Zudem sollte die eingesetzte SPDP-Menge möglichst gering gehalten werden, um eine Inaktivierung der Antikörper durch zu starke Lysin-Modifikationen zu vermeiden. Der zeitliche Rahmen für die chemische Vernetzung von Antikörpern beträgt

je nach Reinigungsmethode zwischen 8 Stunden und 16 Stunden und ist somit weitaus schneller als die nachstehend erläuterte Quadromtechnologie. Eine klinische Anwendung chemisch hergestellter bispezifischer Antikörper ist fraglich, da Aggregate unterschiedlichster Art entstehen und die Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet ist. Daneben reduziert die heterogene Größenverteilung und die chemische Zusammensetzung solcher bsAk, die Chancen einer Anwendung in der Krebstherapie. Derartige Komplexe aus zwei kompletten Antikörpern sind meist zu groß (300 kDa), um eine effektive Tumorpenetration zu ermöglichen.

1.4.3.2 Antikörper aus Hybrid-Hybridomen – Quadromtechnologie

Bispezifische Antikörper können auch durch die Fusion zweier antikörperproduzierender Hybridomzellen hergestellt werden. Die PEG-Fusion wird nach dem Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper durchgeführt und nutzt zur Selektion die in Kapitel 1.2.1 erläuterte Methode. Hierzu muss im Vorfeld in einener der Hybridomzellen der HGPRT Gendefekt durch Behandlung mit 6-Thioguanin erneut induziert werden. Die zweite Zelle wird durch Zugabe von Jodacetamid teilungsunfähig gemacht.
Stabile Hybrid-Hybridomzellen, auch Quadrome genannt, sind Träger der genetischen Information von zwei unterschiedlichen leichten Antikörperketten und zwei unterschiedlichen schweren Ketten, die kodominant exprimiert werden. In der Regel sind diese unterschiedlichen Isotyps. Der bispezifische Antikörper muss aufwändig von den beiden parentalen Varianten als auch von anderen Antikörpervarianten, die durch Misspaarung von schweren und leichten Ketten entstehen, isoliert werden. Eine besonders hohe Ausbeute würde man erhalten, wenn sich zwei heterologe schwere Ketten und zwei homologe leichte Ketten jeweils präferentiell assemblieren würden. Diese optimale Kombination ist jedoch selten. In der Regel assoziieren schwere und leichte Ketten nach dem Zufallsprinzip und generieren so bis zu zehn unterschiedliche Kombinationen von Immunglobulinen in jeweils ähnlichen Mengen (**Abb. 1.9**). Neben dem bispezifischen Antikörper bilden sich ebenfalls die beiden parentalen Antikörper, sowie vier Mischformen derselben aus. Drei weitere Kombinationen ergeben vermutlich nicht-funktionale Formen.
Aufgrund dieser Vielfalt gibt es keine standardisierte Aufreinigungsmethode für bsAk aus Quadromen. Jeder bsAk erfordert eine Optimierung der Reinigungsbedingungen, was zum einen zeitintensiv ist und sich zudem auf die Produktionskosten niederschlägt. Liegt das Zielantigen in gereinigter Form vor, können bsAk mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Für membrangebundene Antigene ist das oft nicht möglich und man ist auf feine Unterschiede in der Mobilität auf Ionenaustausch-Säulen angewiesen. Es ist demnach hilfreich, Fusionen zwischen Hybridomen durchzuführen, deren Antikörper sich in ihren Isotypen unterscheiden. Die Generierung einer gut produzierenden Quadromlinie

und die Aufreinigung des von ihr sezernierten bsAk sind im Vergleich zur chemischen Kopplung sehr zeitaufwändig. Die Methode ist aber zuverlässig und die sich aus der Fusion ergebenden Produkte sind bekannt und reproduzierbar.

Als alternative Prozedur können Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. das FITC-TRICT-Fluorochrompaar) zur differenziellen Markierung der jeweiligen Fusionspartner verwendet werden und korrekt fusionierte Hybridomzellen (Quadrome), die beide Farbstoffe enthalten, mittels FACS *(fluorescence-activated cell sorting)* identifiziert werden. Mit diesem Verfahren wird der Zeitaufwand zwar reduziert, es erfordert jedoch den Zugang zu einem Zellsorter. Zudem ist eine Kontamination mit parentalen Hybridomlinien größer als nach biochemischer Behandlung mit Selektionsmarkern.

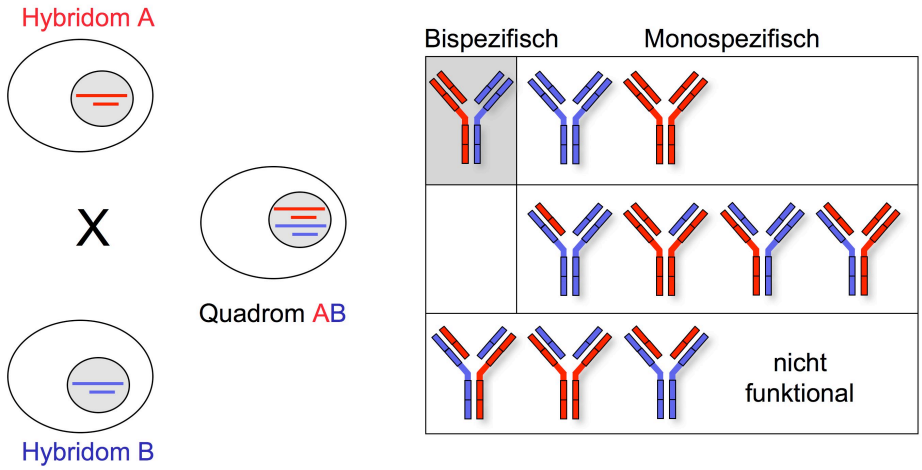


Abb. 1.9: Hybrid-Hybridoma-Technologie. Auch als Quadrom-Technologie bekannt, basiert diese Methode auf der Fusion zweier antikörperproduzierender Hybridomzellen. Das resultierende Quadrom exprimiert schwere und leichte Antikörperketten beider Parentalantikörper ko-dominant. Neben den Parentalantikörpern, entstehen ein bispezifischer Antikörper, vier Mischformen und drei vermutlich nicht-funktional assemblierte Antikörper.

1.4.3.3 Rekombinante BsAk durch Gentechnik

BsAk können als rekombinante Antikörper auch gentechnologisch hergestellt werden (Kapitel 1.2.3). Durch moderne Klonierungsverfahren werden hierzu die Sequenzen der spezifischen variablen Domänen mit Linkern oder sonstigen Gerüstdomänen verbunden und in das gewünschte Antikörperformat konvertiert.

1.5 Antikörper als Immuntherapeutika

1.5.1 Antikörper-basierte Strategien in der Krebstherapie

Die Entwicklung der Hybridom-Technologie ermöglichte es, monoklonale Antikörper in größeren Mengen herzustellen und klinisch zu erproben (Koehler und Milstein 1975). Mit Muromonab-CD3 (OKT3), der gegen Transplantatabstoßung eingesetzt wird, wurde 1987 der erste Maus Antikörper von der FDA zugelassen. Die ersten klinischen Versuche mit

Antikörpern wurden Anfang der 80er Jahre mit der Behandlung von Lymphom-Patienten durchgeführt (Nadler *et al.* 1980, Miller *et al.* 1982, Meeker *et al.* 1984). Einige dieser Antikörper waren anti-Idiotyp-Antikörper und boten somit ein Höchstmaß an Spezifität für die Tumorzellen. Mit diesem Ansatz konnten erste Erfolge verzeichnet werden und bei einem Patienten wurde eine komplette Remission erzielt (Miller *et al.* 1982).

Bislang wurden 21 Antikörper-basierte Therapeutika von der FDA (*Food and Drug Administration*) für den klinischen Einsatz zugelassen und ca. 150 weitere befinden sich derzeit in der klinischen Erprobung. Neun dieser Antikörper werden in der Krebstherapie eingesetzt (**Tabelle 1.1**), die restlichen Anwendungsgebiete umfassen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungskrankheiten, sowie Transplantationen und kardiovaskuläre Indikationen. Unter den zugelassenen Antikörpern sind unterschiedliche Formate und Isotypen vertreten. Der häufigste Isotyp ist der humane IgG1 (14/21). Dies ist darauf zurückzuführen, dass humane IgG1 Antikörper sowohl ADCC als auch CDC effizient vermitteln können (Kapitel 1.1.2) und zudem eine lange *in vivo* Plasma-Halbwertszeit von über 21 Tagen haben. Mehr als 50% der Antikörper sind humanisiert, alle weiteren sind komplett human, chimär oder noch murinen Ursprungs.

Tabelle 1.1: Therapeutische Antikörper mit Marktzulassung in der Onkologie

Therapeutikum	Handelsname	Isotyp	Typ	Indikation	Antigen	Zulassung
Alemtuzumab	Campath® MabCampath®	IgG1	Humanisiert	Chronische lymphatische Leukämie	CD52	2001 USA, EU
Bevacizumab	Avastin®	IgG1	Humanisiert	Kolonkarzinom	VEGF	2004 USA 2005 EU
Cetuximab	Erbitux®	IgG1	Chimär	Kolonkarzinom	EGFR	2004 USA, EU
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	IgG1	Murin	Non-Hodgkin Lymphom (Radioimmuntherapie)	CD20	2002 USA 2004 EU
Capromab pendetide	Prostascint®	IgG1	Murin	Prostatakarzinom (Diagnose) (Radioimmuntherapie)	PSA	1996 USA
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	IgG4	Humanisiert	Akute myeloische Leukämie	CD33	2000 USA
Panitumumab	Vectibix®	IgG2	Human	Kolonkarzinom	EGFR	2006 USA 2007 EU
Rituximab	Rituxan® Mabthera®	IgG1	Chimär	Non-Hodgkin Lymphom	CD20	1997 USA 1998 EU
Tositumomab iodine I131	Bexxar®	IgG2a	Murin	Non-Hodgkin Lymphom (Radioimmuntherapie)	CD20	2003 USA
Trastuzumab	Herceptin®	IgG1	Humanisiert	Brustkrebs	Her-2/neu	1998 USA 2000 EU
Catumaxomab	Removab®	IgG2a	Chimär Maus/Ratte	Maligne Aszites Ovarialkarzinom	EpCAMxCD3	2009 EU

VEGF *vascular endothelial growth factor*; EGFR *epidermal growth factor receptor*; PSA *prostate specific antigen*.
EU, Zulassung in Europa durch die EMEA; USA, Zulassung in den USA durch die FDA.

Therapeutische Antikörper für die Behandlung von Tumorerkrankungen können auf unterschiedliche Art wirksam sein. Einige wirken direkt, das heißt, dass die alleinige Bindung des Antikörpers an das Zielantigen bereits ausreicht, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Dies erreichen sie, indem sie aktivierende, anti-proliferative oder pro-apoptotische Signale in den Tumorzellen auslösen (Carter 2006).
Durch Kreuzvernetzung des Zielantigens auf den Tumorzellen können z.B. intrazelluläre Signale ausgelöst werden, die den Zellzyklus beeinflussen, anti-proliferativ wirken oder direkt zur Apoptose führen (**Signal Transduktion**). Dies ist einer der Wirkmechanismen des Antikörpers Rituximab (Rituxan®/MabThera®), der durch Kreuzvernetzung von CD20 Apoptose in den Zielzellen induziert (Shan *et al.* 1998). Andere Antikörper können die Bindung von Liganden, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine, an ihre natürlichen Rezeptoren verhindern (**Blockierung**). Auf diese Weise unterbindet der zur Therapie von Brustkrebs eingesetzte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) vermutlich die Interaktion des Rezeptors Her2/neu mit seinem Liganden (bisher nicht bekannt). Als Folge wird die Vermittlung proliferationsfördernder Signale blockiert und dadurch das Wachstum des Tumors verlangsamt (Harries und Smith 2002). Ganz ähnlich wirken auch Cetuximab/Erbitux® und Panitumumab/Vectibix®, die den EGFR Rezeptor binden (*epithelial growth factor receptor*, EGFR). Durch ihre Bindung an EGFR unterbinden sie die proliferationsfördernde Signalgebung. Beide Antikörper sind zur Behandlung von Darmkrebs zugelassen. Der Angiogenese Inhibitor Bevacizumab/Avastin® verhindert die Wirkung des Liganden VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der die Bildung neuer Blutgefäße stimuliert und somit das Tumorwachstum fördert. Er wird somit vorrangig zur Therapie metastasierender Tumore eingesetzt.
Die direkte Wirkungsweise therapeutischer Antikörper wird allerdings durch die Grundaktivität des Immunsystems unterstützt, indem der konservierte Fc-Teil die natürlichen Mechanismen von ADCC und CDC auslöst. Der gegen CD52 gerichtete Antikörper Alemtuzumab/Campath® wirkt z.B. nur durch ADCC und CDC (Reff *et al.* 1994, Cragg und Glennie 2004, Alinari *et al.* 2007). Es ist nicht genau definiert, inwiefern die unterschiedlichen Mechanismen zur therapeutischen Wirksamkeit beitragen. Den Fc-vermittelten Effektorfunktionen werden aber die größte Bedeutung zugeschrieben (Carter 2006). Die klinische Bedeutung der CDC wird kontrovers diskutiert (Weng und Levy 2001, Manches *et al.* 2003). Dahingegen stellt die Rekrutierung von Immunzellen und die Induktion der ADCC einen klinisch relevanten Mechanismus *in vitro* und *in vivo* dar (Cartron *et al.* 2002, Weng und Levy 2003). Die Notwendigkeit von ADCC für die effektive Wirkung vieler therapeutischer Antikörper wurde inzwischen für Rituximab, Alemtuzumab, Trastuzumab und Cetuximab gezeigt (Hale et al. 1985, Crowe et al. 1992, Naramura et al. 1993, Reff et al. 1994, Cooley et al. 1999, Carter 2001a, b, Kimura et al. 2007). Rituximab bietet daher ein gutes Beispiel für einen Antikörper, der sowohl direkt durch Auslösen der Apoptose, als auch indirekt über CDC oder ADCC wirken kann.

Antikörper können auch als Vehikel eingesetzt werden, um Zellgifte, wie Zytostatika, Toxine oder Radionuklide, gezielt an das Gewebe abzugeben (Allen 2002). Mit Ibritumomab Tiuxetan/Zevalin® und Tositumomab/Bexxar® sind zwei gegen CD20 gerichtete Radioimmunkonjugate zur Therapie des Non-Hodgkin Lymphoms zugelassen, die in der Behandlung Chemotherapie-refraktärer Patienten hohe Ansprechraten erzielten (Witzig *et al.* 1999). Durch chemische Kopplung können Antikörper auch mit Zytostatika (Doxorubicin, Calicheamycin) beladen werden. Mit Gemtuzumab Ozogamicin/Mylotarg® ist ein Zytostatika-Immunkonjugat auf dem Markt, mit dem chemorefraktäre Patienten mit CD33 positiver Leukämie therapiert werden können.

Der vorherrschende Mechanismus bispezifischer Antikörper beruht auf der Rekrutierung von T-Zellen über CD3. Das Paradebeispiel für die Effizienz bispezifischer Antikörper ist Catumaxomab/ Removab® (Shen und Zhu 2008), der als erster bispezifischer Antikörper 2009 zugelassen wurde. Catumaxomab richtet sich gegen das Tumor-assoziierte Antigen EpCAM und wurde ursprünglich zur Behandlung des malignen Aszites bei Ovarialkazinomen entwickelt. In weiteren klinischen Studien wird nun seine Wirkung auf maligne Aszites bei Darmkrebs, sowie pleura Ergüsse bei Brustkrebs untersucht (Sebastian *et al.* 2009). Der bsAk kombiniert zwei reguläre Antikörper, einen Tumor-assoziierten Antikörper murinen Ursprungs (Maus IgG2a) und einen T-Zell spezifischen Antikörper gegen CD3 aus der Ratte (Ratte IgG2b). Der resultierende Antikörper bindet somit an Tumorzellen, rekrutiert T-Zellen und entfaltet seine Wirkung durch die Induktion zellulärer Zytotoxizität (Kapitel 1.4.1). Simultan bindet der chimäre Antikörper (Maus IgG2a x Ratte IgG2b) über den besonderen Fc-Teil an akzessorische Immunzellen und aktiviert somit ADCC und CDC. Die Kombination zweier Spezies ermöglicht eine bevorzugte Bindung an FcγRI und FcγRIII. Die Interaktion mit dem inhibitorischen FcγRIIb (auf B-Zellen) ist minimal. Catumaxomab kann daher auch als trispezifischer Antikörper betrachtet werden. Aufgrund seiner starken Wirkung erfolgt die Applikation stets lokal. Nach dem gleichen Prinzip funktioniert auch der Ratte/Maus chimäre, bispezifische Antikörper Ertumaxomab/ Rexomun® (Kiewe und Thiel 2008), der sich gegen den HER-2/neu Rezeptor richtet. Der Antikörper wird zurzeit in einer Phase II Studie zur Behandlung von metastasiertem Brustkrebs getestet. Das Präparat Lymphomun/FBTA05 gehört ebenfalls zu dieser Antikörperklasse. Lymphomun bindet an CD20 und soll zukünftig bei Patienten mit B-Zell Lymphom eingesetzt werden (Stanglmaier *et al.* 2008).

Eine weitere Kategorie bispezifischer Antikörper, deren Entwicklung zurzeit stark vorangetrieben wird, setzt sich aus zwei scFv-Fragmenten zusammen $(scFv)_2$ (Baeuerle *et al.* 2009). Blinatumomab/ MT103 richtet sich gegen das Differenzierungsantigen CD19, welches auf den meisten B-Zellen und B-Zell-Lymphomen exprimiert wird. Er bewirkt durch die gleichzeitige Bindung an CD3 die Relokalisierung körpereigener T-Zellen zum

Tumor. Der Antikörper wird zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) klinisch getestet. Es konnten hohe Ansprechraten erzielt werden bis hin zu mehreren vollständigen Remissionen (Bargou *et al.* 2008) . MT110 ist ein $(scFv)_2$ Antikörper gegen EpCAM und CD3 und hat somit einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Catumaxomab/ Removab®, aktiviert jedoch kein ADCC bzw. CDC. Laut Angaben des Herstellers (www.micromed.de) wird die Wirkung von MT110 in einer Phase I Studie an Patienten mit Bronchialkarzinom und gastrointestinalen Karzinom untersucht (Haas *et al.* 2009).

1.5.2 Limitierungen und Anforderungen therapeutischer Antikörper

Trotz der beachtlichen therapeutischen Erfolge, die mit Antikörpern erzielt werden, ist die Behandlung mit konventionellen Antikörpern auch mit Nachteilen verbunden. Die relativ große Molekülmasse von ca. 150 kDa kann die Gewebegängigkeit beeinträchtigen und somit die therapeutische Wirksamkeit bei soliden Tumoren reduzieren (Jain und Baxter 1988, Yokota *et al.* 1992). Insbesondere bei der Verabreichung von Antikörpern muriner, chimärer, humanisierter, aber manchmal auch humaner Herkunft, besteht die Gefahr, dass das Immunsystem des Patienten mit der Bildung neutralisierender Antikörper reagiert, so dass eine repetitive Verabreichung des Antikörpers wirkungslos bleibt (Carter 2006). Antikörper entfalten ihre Wirkung durch die Wechselwirkung ihres Fc-Teils mit spezifischen Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen. Dabei muss der verabreichte therapeutische Antikörper mit den natürlichen Antikörpern im Plasma des Patienten um die Bindungsstellen konkurrieren. Da diese in weit größeren Mengen vorkommen, kann die Rekrutierung der Effektorzellen beeinträchtigt werden. Limitierend ist auch die Kreuzreaktion mit Fc-Rezeptoren auf nicht-zytotoxischen Zellen (z.B. FcγRII auf Blutplättchen), mit nicht-aktivierenden Fc-Rezeptoren (z.B. FcγRIIIb auf Granulozyten) oder inhibitorischen Fc-Rezeptoren (FcγRIIb auf Monozyten oder Makrophagen). Manche der hier dargestellten Nachteile konnten durch die Verwendung rekombinanter bispezifischer Antikörperderivate überwunden werden, da diese meist keine Fc-Fragmente mehr besitzen. Die moderne Gentechnik ermöglicht es, den Anteil an Sequenzen aus fremden Organismen zu reduzieren und so die Bildung neutralisierender Antikörper zu vermeiden. In Kapitel 1.4.2 (*Bispezifische Antikörperformate*) wurde dargestellt, dass die Molekülgröße problemlos an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden kann.

Kritische Parameter, die den therapeutischen Nutzen bispezifischer Antikörper beeinträchtigen, sind die Stabilität, die Größe und die Affinität bzw. Avidität. Diese limitieren insbesondere die Wirksamkeit kleiner, aus scFv-Komponenten bestehenden Molekülen. Molekulargewichte unter 70 kDa, ermöglichen zwar eine gute Gewebegängigkeit, liegen aber unterhalb der Rückresorptionsgrenze der Niere und

werden daher sehr schnell eliminert. Diese verringerte Halbwertszeit wird dadurch verschärft, dass rekombinante Antikörperformate ohne Fc-Teil im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern nicht an den neonatalen FcRn Rezeptor binden können, und es somit nicht zur Rezirkulierung des Antikörpers kommt (Raghavan *et al.* 1994). Bei der Konvertierung zum scFv-Format kommt es meist zu einem Affinitätsverlust gegenüber dem parentalen Antikörper (Huston *et al.* 1988). Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass scFv-Fragmente monovalent sind. Der Affinitäts/Aviditätsverlust spiegelt sich auch in einer verringerten Tumorretentionszeit wider. Zur Überwindung dieser Probleme wurden unterschiedliche Verbesserungen vorgenommen. Zum einen werden scFv Derivate durch künstliche Disulfidbrücken stabilisiert (Brinkmann *et al.* 1993), zum anderen können kleine Antikörperformate durch PEGylierung, oder dem Anfügen weiterer Proteindomänen erhöht werden (Lee *et al.* 1999a, Müller und Kontermann 2007b). Diese Modifikationen führen zu einer verlängerten Plasmaverweildauer *in vivo*.

1.6 Zielstrukturen auf Tumorzellen

1.6.1 Allgemeine Anforderungen für Zielantigene auf Tumorzellen

Bei der Verwendung des Wortes Antigen sollte beachtet werden, dass kaum ein Antigen spezifisch für einen Tumor ist, sondern vielmehr von Tumor-assoziierten Antigenen die Rede ist. Dieser Begriff impliziert, dass die Zielantigene auch in gesundem Gewebe vorzufinden sind und somit das Ausmaß der Nebenwirkungen, die mit Antikörper-basierten Therapien einhergehen, bestimmen. Daher müssen die molekularen und physiologischen Eigenschaften des Antigens genau analysiert werden. So ist z.B. für eine erfolgsversprechende Anwendung von Immuntoxinen eine stark internalisierende Zielstruktur notwendig. Diese Eigenschaft sollte jedoch dann vermieden werden, wenn der Antikörper Effektorfunktionen vermitteln soll. Damit eine Immuntherapie anschlägt, sollte das Zielantigen auf der gesamten Tumormasse exprimiert werden. Viele Krebserkrankungen sind auf Tumorstammzellen zurückzuführen, die sich im Expressionsprofil von soliden Tumoren abheben können (Hoelzer *et al.* 2002, Taussig *et al.* 2005, Hosen *et al.* 2007). Um ein Rezidiv zu vermeiden ist es von Vorteil, wenn das Antigen auch auf solchen Vorläuferzellen exprimiert wird. Weiterhin sollte das Antigen nicht in löslicher Form z.B. durch proteolytische Abspaltung (*shedding*) ins Blut abgegeben werden, da dies zu einer Neutralisation der Antikörper führen und die therapeutische Wirkung beeinflussen könnte.
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zelladhäsionsmoleküle EpCAM und L1CAM als Zielmoleküle auf der Oberfläche von Tumoren betrachtet.

1.6.2 Das Tumorantigen EpCAM

EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*, auch CD326, 17-1A, HEA125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP34, KSA, TROP-1, ESA, oder KS1/4) ist das erste Tumor-assoziierte Antigen, welches mit monoklonalen Antikörpern identifiziert wurde (Herlyn *et al.* 1979). Das Antigen zählt heute zu den am besten beschriebenen Markern, nicht zuletzt weil es auf einer beeindruckenden Vielzahl humaner Karzinome überexprimiert wird (Baeuerle und Gires 2007).

EpCAM ist ein membranständiges Glykoprotein und besteht aus einer großen extrazellulären Domäne (265 AS), einer einzigen transmembranen Domäne und einem kurzen 24 AS langen zytoplasmatischen Teil. Die Extrazelluläre Domäne beinhaltet eine EGF ähnliche Domäne (*epidermal growth factor*) sowie eine Abfolge des humanen Thyroglobulins. EpCAM wird als 34 kDa großes Protein synthetisiert und wird an bis zu drei Stellen zu einem 40 kDa großen Protein glykosyliert.

Die genaue Funktion von EpCAM ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Wie viele bereits beschriebene Transmembranmoleküle mit EGF ähnlichen Domänen, fungiert auch EpCAM als Ca^{2+}-unabhängiges epitheliales Zelladhäsionsmolekül und reguliert die Cadherin-vermittelte, homotypische Zell-Zell Interaktion (Litvinov *et al.* 1994). Thyroglobuline inhibieren Cathepsine, eine Art von Cystein Proteasen, die häufig von Tumoren produziert werden und eine Rolle in der Metastasierung spielen (Nomura und Katunuma 2005). Es ist daher anzunehmen, dass humanes EpCAM auch eine Rolle als membranständiger Proteaseinhibitor spielt und den Tumor vor eigenen Proteasen schützt. EpCAM wird in vielen Karzinomen über einen noch unbekannten Mechanismus überexprimiert. Es induziert in den Zellen die Expression des proto-Onkogens c-*myc* und der Zykline A und E und ist somit verantwortlich für den onkogenen Phänotyp der Zellen (Munz *et al.* 2004). Auffallend ist hierbei die Korrelation zwischen der EpCAM Expression und dem Grad der Karcinogenese, die durch eine unkontrollierte Zellproliferation und eine Dedifferenzierung der Zellen gekennzeichnet ist. Erst kürzlich ist es gelungen, den durch EpCAM eingeleiteten Signalweg zu entschlüsseln (Maetzel *et al.* 2009). Demnach wird die Kaskade vermutlich durch lösliches EpCAM oder einen Zell-Zell Kontakt eingeleitet und fördert die Zusammenlagerung von membranständigen EpCAM Molekülen zu Tetrameren. Das hierdurch vermittelte Signal verursacht die proteolytische Spaltung des Komplexes und die Freisetzung der kurzen intrazellulären Domänen (EpICD) in den zytoplasmatischen Raum. EpICD und das ihm zugeordnete Signalosom bestehend aus Komponenten des Wnt Signalwegs, relokalisiert im Nukleus, wo es spezifisch mit dem Chromatin assoziiert und Zielgene induziert. Interessant hierbei ist, dass EpICD bereits für sich *in vivo* eine onkogene Wirkung hat.

EpCAM ist, wenn auch in geringerer Dichte, auf der Oberfläche von gesunden Epithelen ausgeprägt. Die Regulierung von EpCAM in normalen gegenüber malignen Geweben erfolgt aller Vermutung nach durch die differentielle N-Glykosylierung der drei

Konsensussequenzen der extrazellulären Domänen (Munz *et al.* 2008). EpCAM ist gegenüber normalen Epithelen in Karzinomen hyperglykosyliert, wobei die Glykosylierung des Asparagin 198 für die Proteinstabilität ausschlaggebend ist.
Immunohistochemische Analysen haben gezeigt, dass EpCAM in humanen Geweben ausschließlich auf epithelialen Geweben exprimiert wird (Momburg *et al.* 1987, Balzar *et al.* 1999). Das Expressionslevel variiert je nach Gewebe, ist jedoch innerhalb einer Gewebeprobe sehr homogen. Die Liste der therapierbaren Krebserkrankungen wurde erst kürzlich durch umfassende immunhistochemische Studien an Patienten mit Brust-, Prostata-, Ovarial-, Lungen-, Colon-, Nieren- und Magenkarzinom erweitert (Spizzo *et al.* 2004, Went *et al.* 2005, Spizzo *et al.* 2006, Went *et al.* 2006).
Seit einigen Jahren wird EpCAM auch mit Krebsstammzellen in Verbindung gebracht. EpCAM ist auf Tumor-induzierenden Zellen bei Brustkrebs, Kolorektal- und Pankreaskarzinom exprimiert (Al-Hajj *et al.* 2003, Dalerba *et al.* 2007, Li *et al.* 2007). Dies zeigt, dass der Nutzen von EpCAM als immuntherapeutisches Zielantigen noch unterschätzt wird.

Gegen EpCAM gerichtete Immuntherapien

Heute befinden sich mindestens 8 immuntherapeutische Ansätze in der klinischen Erprobung, die den Tumormarker EpCAM zum Ziel haben (**Tabelle 1.2**). Der erste EpCAM-spezifische monoklonale Antikörper, der zur Therapie einer Krebserkrankung eingesetzt wurde, war der murine IgG2a Antikörper Edrecolomab/Panorex® (Sears *et al.* 1982, Sears *et al.* 1984). 1994 erreichte man in einer ersten klinischen Studie mit Edrecolomab in Verbindung mit einer Chemotherapie eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von Patienten mit Kolonkarzinom (Riethmüller *et al.* 1994). Aufgrund der schnellen Neutralisation des Antikörpers durch die HAMA Antwort (*human anti-mouse antibodies*) der Patienten wird Edrecolomab nicht mehr verwendet. Als ING-101 wird Edrecolomab jedoch als Vakzin zur Induktion von Anti-Idiotypischen Antikörpern weiterentwickelt. Der Ansatz wurde für verschiedene Adenokarzinome in klinischen Studien verfolgt. Erfolgsversprechend ist vor allem eine Phase II/III Studie in *non-small-cell* Lungenkrebs (NSCLC). Der vollständig humane Antikörper Adecatumumab (MT201) (Naundorf *et al.* 2002) wird zurzeit in Phase II Studien zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs und Prostatakarzinom getestet und liefert bereits heute viel versprechende Ergebnisse. Während Adecatumumab vorwiegend über ADCC und CDC agiert, ermöglicht eine bispezifische Variante des Antikörpers MT110 der BiTE® Klasse die Rekrutierung CD3-positiver Effektorzellen (Brischwein *et al.* 2006). Der bispezifische Antikörper EpCAMxCD3 war nach *i.v.* Injektion in der Lage, im Tumor residierende humane T-Zellen eines Ovarialkarinom-Xenografts in immunodefizienten Mäusen zu reaktivieren und das metastasierende Gewebe effizient zu eliminieren. Catumaxomab (Removab®) richtet sich gegen EpCAM und CD3 und wurde bereits in

Kapitel 1.5.1 beschrieben. Er ist der erste bsAk der 2009 die Zulassung erhielt. Zuvor war im Jahr 1999 bereits die Wirksamkeit eines ähnlichen Antikörpers - HEA125 x OKT3 - *in vitro* nachgewiesen worden (Strauss *et al.* 1999). Erste klinische Studien bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom haben gezeigt, dass maligner Aszites durch die intraperitoneale Injektion des bispezifischen Antikörperpräparats HEA125xOKT3 zum Verschwinden gebracht und die Lebensqualität erhöht werden konnte (Marmé et al. 2002). Ein EpCAM-spezifisches Immuntoxin - Proxinium (4D5MOC31-ETA) - befindet sich derzeit in einer entscheidenden Phase II/III Studie zur Therapie von Kopf- und Halskarzinomen. Es besteht aus einem stabilisierten, humanisierten anti-EpCAM scFv-Antikörper, der über einen Furin-Linker an eine Untereinheit des bakteriellen *Pseudomonas* Exotoxin fusioniert ist. Nach Endozytose, blokiert das Toxin im Zellinneren die Proteinbiosynthese. Der gleiche Antikörper Proxinium (hier Vicinium®) wird ebenfalls zur Behandlung von Blasenkarzinomen entwickelt. Der Antikörper ING-1 ist ein hochaffiner, he-humanisierter (*human-engineered*™) anti-EpCAM Antikörper der seine Wirkung durch ADCC oder CDC erzielt und in klinischen studien zur Behandlung von Adenokyrzinomen getestet wird (de Bono *et al.* 2004).

Tabelle 1.2: EpCAM-spezifische Immuntherapeutische Ansätze in der klinischen Erprobung

Therapeutikum	Handelsname	Klasse/Isotyp	Klinische Studie	Firma
Edrecolomab	Panorex®	Monoklonaler Antikörper; IgG2a; Maus	Zugelassen, nicht mehr verwendet	GlaxoSmithKline/ Centocor
Edrecolomab (IGN-101)		Monoklonaler Antikörper; IgG2a; Maus	Phase II Adenokarzinome Phase II/III NSCLC	Aphton
Catumaxomab	Removab®	Trispezifischer Antikörper; IgG2a; Maus/Ratte	Zugelassen Maligne Aszites, Ovarialkarzinom	Trion Pharma/ Fresenius Biotech
Adecatumumab (MT201)		Monoklonaler Antikörper; IgG1; komplett human	Phase II/III Brustkrebs Phase II/III Prostatakarzinom	Micromet Inc./ Serono
EpCAMxCD3 (MT110)		(scFv)2	Phase I Lungenkrebs Phase I Magen-Darm-Karzinom	Micromet Inc./ Serono
Proxinum	Proxinum® Vivendium®	scFv; Immunotoxin; Pseudomonas Exotoxin Fusion	Phase II/III Head/Neck Cancer Phase I/II Blasenkarzinom	Viventia
HEAxOKT3		Quadrom; IgG1xIgG2a; Maus	Phase I Aszites/ Ovarialkarzinom	Öffentliche Forschung
IGN-1		Monoklonaler Antikörper; IgG1; human-engineered	Phase I Adenokarzinome	Aduro Biotech.

Abgewandelt nach Baeuerle and Gires, 2007

1.6.3 Das Tumorantigen L1CAM

L1CAM (CD171) ist ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin Superfamilie, welches ursprünglich als Protein des Nervensystems identifiziert worden ist (Rathjen und Schachner 1984, Moos *et al.* 1988, Novak-Hofer 2007, Raveh *et al.* 2009). Der extrazelluläre Teil von L1CAM besteht aus sechs Immunglobulinschleifen (Ig6), gefolgt von fünf Fibronektin TypIII Einheiten. Die extrazelluläre Domäne ist durch eine Transmembrandomäne mit einem hoch konservierten zytoplasmatischen Teil verbunden.

Im humanen L1CAM ist zudem ein RGD-Motiv vorhanden, das die Funktion von L1CAM als Bindungspartner von Integrinen vermittelt. L1CAM liegt in zwei Spleißvarianten vor, die maßgeblich für die Biodistribution sind. Beide Formen unterscheiden sich in zwei kurzen Exons. Die neuronale Form enthält gegenüber der nicht-neuronalen Form in der extrazellulären Domäne das Aminosäuremotiv YEGHH (Jouet *et al.* 1995) des Exon 2 und im zytoplasmatischen Teil das Motiv RSLE des Exon 27 (Miura *et al.* 1991, Takeda *et al.* 1996). Die verkürzte Version ist also in nicht-neuronalen Geweben vorherrschend.
Im Nervensystem wird L1CAM in erster Linie auf Axonen sich entwickelnder und ausdifferenzierter Neuronen exprimiert. Das neuronale L1CAM ist an der Migration, der Adhäsion, am Auswachsen von Neuriten, sowie an der Bündelung (Faszikulierung) und Myelinisierung von Neuriten beteiligt (Brummendorf und Rathjen 1995). Im peripheren Nervensystem wirkt es an der Interaktion von Schwann-Zellen mit. Es spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns und Nervensystems. Zu den Interaktionspartnern von L1CAM, die das Auswachsen von Neuriten stimulieren, zählen Integrine, Proteoglykane und Neuropilin. Die zytoplasmatische Domäne von L1CAM enthält hoch konservierte Sequenzen, welche die Bindung an Ankyrin und damit eine Assoziation mit dem Zytoskelett ermöglicht (Nagaraj und Hortsch 2006). Überdies konnte gezeigt werden, dass die RSLE Sequenz des Exon 27 die Endozytose von L1CAM begünstigt und dieser Prozess mit der Aktivierung des ERK-Kinase Pathways gekoppelt ist (Schaefer *et al.* 1999, Long *et al.* 2001). L1CAM wird auch eine Funktion in der Entwicklung der Niere zugesprochen (Debiec *et al.* 1998).
Wie viele Zelladhäsionsmoleküle liegt L1CAM nicht nur als membranständige Form vor, sondern kann durch proteolytische Spaltung im membranproximalen Bereich in eine lösliche Form überführt werden, die funktionell aktiv ist (*ectodomain shedding)*. Dies erfolgt unter Beteiligung verschiedener Metalloproteinasen (ADAM10 und ADAM17). Es ist noch nicht geklärt, ob die oncogenen Vorgänge (Migration, Invasion und Wachstumsförderung in Tumoren) einer autokrinen/parakrinen Wirkung von löslichem L1CAM zuzuschreiben sind oder vielmehr auf Wechselwirkungen von Liganden mit membranständigem L1CAM beruhen. Melanomzellen z.B. spalten L1CAM von der Zelloberfläche ab und integrieren es in die benachbarte extrazelluläre Matrix (Montgomery *et al.* 1996). Lösliches L1CAM wurde auch in malignem Aszites und im Serum von Ovarialkarzinom Patientinnen nachgewiesen (Fogel *et al.* 2003). Sicher scheint jedoch, dass apoptotische Stimuli die Freisetzung von L1-Vesikeln verstärken und somit erhöhte Level löslichen L1CAM bewirken (Gutwein *et al.* 2005).
Abgesehen vom Nervensystem wurden geringe Mengen L1CAM auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, wie peripheren B-Lymphozyten, T-Lymphozyten ($CD4^+$) und Monozyten nachgewiesen (Ebeling *et al.* 1996, Pancook *et al.* 1997). Eine umfassende Studie der L1CAM Expression in Geweben gesunder Erwachsener beschränkt das

Vorkommen von L1CAM auf periphere Nervenbündel und den Sammelrohren der Niere (Huszar *et al.* 2006).
Die klinische Bedeutung von L1CAM zeigt sich in den über 100 Mutationen im X-chromosomal vererbten L1-Gen und die zu schweren neurologischen Krankheitsbildern, wie z.B. dem CRASH Syndrom, führen. Meist hängen diese Krankheiten mit einer beeinträchtigten Ligandeninteraktion und fehlerhaften Oberflächenexpression zusammen (Fransen *et al.* 1995, Kenwrick *et al.* 2000, De Angelis *et al.* 2002). L1CAM hat sich als wichtiger diagnostischer Marker verschiedenartiger Karzinome erwiesen. Sein Auftreten beim Ovarial- und Endometriumkarzinom kennzeichnet ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium und korreliert mit einer schlechten Prognose. Unter den L1CAM positiven Tumoren sind häufig auftretende Neoplasien wie das Bronchial-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom, aber auch das Melanom und das Glioblastom zu finden.
Über die Bedeutung von L1CAM in Bezug auf die Tumorentstehung ist noch wenig bekannt. Bisher publizierte Daten lassen vermuten, dass die L1CAM Überexpression vor allem die Invasivität und Motilität der Tumorzellen erhöht und somit die Metastasierung begünstigt (Silletti *et al.* 2004, Zecchini *et al.* 2008). Eine Erklärung hierfür liefern auch immunhistochemische Analysen von Kolon- und Ovarialkarzinomen, die deutlich machen, dass L1CAM an der invasiven Front des Tumors vorzufinden ist, während die innere Tumorzellmasse weitgehend negativ für L1CAM ist (Gast *et al.* 2005, Gavert *et al.* 2005).
Neben den wachstumsfördernden Eigenschaften wird L1CAM auch eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine starke Expression von L1CAM in Pankreas- und Ovarialkarinomen den Zellen einen Schutz vor Apoptose verleiht und sie somit resistent gegen Chemotherapie macht (Muerköster *et al.* 2006, Stoeck *et al.* 2007). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass L1CAM eine dauerhafte Aktivierung des Erk-MAP-Kinase Pathways induziert und zu einer Erk-abhängigen Genregulation führt (Stoeck *et al.* 2006). In Kolonkarzinomzellen scheint L1CAM das Ziel eines hyperaktiven ß-Catenin/TCF Signalwegs zu sein (Gavert *et al.* 2005).

Gegen L1CAM gerichtete Immuntherapien

Bisher gibt es keinen Antikörper gegen L1CAM der zur Krebstherapie zugelassen ist. Aufgrund der Verteilung von L1CAM in humanen Geweben und seiner proliferationsfördernden Wirkung in Tumoren kann L1CAM als potentieller Kandidat zur therapeutischen Intervention in Betracht gezogen werden. Mehrere Ansätze kommen hierbei in Frage: zum einen kann die direkte Assoziation von L1CAM mit benachbarten Oberflächenmolekülen unterbunden werden, zum anderen kann die durch L1CAM aktivierte Signalgebung inhibiert werden.
Mehrere monoklonale Antikörper werden in präklinischen Studien untersucht. Die beobachteten biologischen Wirkungen umfassen eine Minderung der Zellproliferation *in vitro*, ein reduziertes Tumorwachstum *in vivo*, sowie eine erhöhte Überlebensrate von

Tumor-tragenden Mäusen, die mit einer Reduktion der Bildung von malignem Aszites einherging. Der monoklonale Antikörper L1-11A inhibiert *in vitro* die Proliferation von L1CAM positiven Ovarialkarzinom Zellen (SKOV3ip), zweier Nierenzellkarzinomlinien, sowie zweier Neuroblastomlinien und der HCT116 Kolonkarzinomline (Arlt *et al.* 2006). Der Antikörper wirkt über die Kreuzvernetzung von membranständigem L1CAM, wobei die Wirkung durch Zugabe eines sekundären anti-Isotyp Antikörpers verstärkt wird. Anti-Tumor Effekte *in vivo* konnten an Mäusen beobachtet werden, denen humane Ovarialkarzinom Zellen (SKOV3ip) implantiert wurden und die nachfolgend mit L1-11A behandelt wurden. Diese Behandlung unterdrückte die intra-peritoneale Verbreitung des Ovarialkarzinoms und die Entstehung von flüssigem Aszites. L1-11A sowie weitere anti-L1 Antikörper (L1-14.10 und HuL1-9.3) gegen die extrazelluläre Domäne von L1CAM blockierten *in vitro* Src und Erk und verhinderten folglich die Expression Erk-induzierter Gene, die Tumorentstehung sowie die Tumorinvasion (Gast et al. 2008). Die Gruppe um Novak-Hofer hat gezeigt, dass der anti-L1-Antikörper chCE7 verstärkt von Zielzellen internalisiert wird (Novak-Hofer *et al.* 1994), und beschrieb somit die Voraussetzung für den Einsatz des Antikörpers in der Radioimmuntherapie und in der Bildgebung.

1.7 Zielstrukturen auf Effektorzellen

1.7.1 Steuermoleküle auf Effektorzellpopulationen

Zytotoxische T-Zellen (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*) gelten als die Zellen mit dem höchsten zytotoxischen Potential des Immunsystems, können aber mit konventionellen Antikörpern nicht aktiviert werden, da sie keine Fc-Rezeptoren tragen (Müller und Kontermann 2007b). Am häufigsten wurden bisher bsAk entwickelt, die CTL über das CD3 Molekül aktivieren (Renner et al. 1997b). BsAk, die mit dem CD3/TCR-Komplex interagieren, sind befähigt sämtliche T-Zellen unabhängig von ihrer MHC-Restriktion zu induzieren. Jedoch wurden inzwischen auch andere Antigene, wie CD2 oder CD28 als Steuermoleküle erfolgreich erprobt (**Tabelle 1.3**). Zur effizienten Aktivierung der CTL sind in der Regel zusätzliche Signale nötig: das erste Signal stellt sich durch die Bindung des Antigens an den T-Zell Rezeptor dar und ist somit hoch spezifisch. Das zweite, unspezifische Signal wird erst nach gleichzeitiger Bindung eines ko-stimulatorischen Moleküls vermittelt (z.B. CD28) und spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Effektorzelle. Allerdings können die Bindungsdomänen mancher Antikörper gegen CD3 oder CD28 auch unkontrolliert eine potente Aktivierung bewirken und einen Zytokinsturm auslösen, der zu massiven Nebenwirkungen führt (Daniel *et al.* 1998, Huenig und Dennehy 2005, Suntharalingam *et al.* 2006). Aus diesem Grund muss der Antikörper gegen die Zielstruktur und das bispezifische Format sorgsam ausgewählt werden.

NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten können effizient über Fc-Rezeptoren rekrutiert werden. Die effektivsten Steuermoleküle auf NK-Zellen und Monozyten/Macrophagen sind die aktivierenden Receptoren FcγRIII (CD16) und FcγRI (CD64) und wurden bereits in zahlreichen Kombinationen und mit unterschiedlichen Tumor-assoziierten Antigenen als bsAk getestet (Renner et al. 1994, Curnow 1997, Deo et al. 1997). Aufgrund ihrer Häufigkeit im peripheren Blut stellen neutrophile Granulozyten eine attraktive Effektorzellpopulation dar. Eine aktivierende Zielstruktur für bsAk auf diesen Zellen ist der Fc-Rezeptor für IgA (CD89) (Valerius *et al.* 1997).

Tabelle 1.3: Steuermoleküle auf Effektorzellen

Effektorzellen	Steuermolekül	Aktivierende Zytokine	Zellzahl/ µL*
T-Zellen	CD2, CD3, CD28	IL-2	600-2000
NK-Zellen	CD16	IL-2	120-350
Monozyten/Makrophagen	CD64	GM-CSF, IFN-γ	80-320
PMN	CD89, CD64#	G-CSF, GM-CSF, IFN-γ	2000-7000

* Konzentration im peripheren Blut gesunder Spender; # nach Stimulation.
Abgewandelt nach Peipp and Valerius, 2002

1.7.2 Der CD3/TCR-Komplex auf T-Lymphozyten

Der T-Zell Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR) ist ein Proteinkomplex, der auf der Oberfläche von T-Lymphozyten verankert ist und für die Erkennung von Antigenen auf MHC-Molekülen zuständig ist. Der TCR-Komplex besteht aus zwei variablen Polypeptidketten (meist α:β oder seltener γ:δ), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Dieser heterodimere Antigenrezeptor assoziiert mit dem CD3 Proteinkomplex, welcher für die Signaltransduktion, nicht aber für die Antigen/MHC-Erkennung verantwortlich ist. CD3 besteht aus sechs weiteren invarianten Ketten, γ:ε, δ:ε sowie einem ζ:ζ Dimer, wobei die Phosphorylierung der ζ Untereinheit bei der Signaltransduktion von Bedeutung ist. Strukturell sieht der TCR dem Fab-Fragemt eines Antikörpers sehr ähnlich. Neben der Struktur ist auch die Genetik der T-Zell Rezeptoren jener der Antikörper der B-Zellen ähnlich. Um eine möglichst große Diversität zu gewährleisten, entstehen beide Untereinheiten ebenfalls kombinatorisch durch V(D)J-Rekombination.
Zur Unterscheidung zwischen körpereigenem und fremdem Material wird das Antigen durch den Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert. Die TCR-MHCI Bindung wird durch die simultane Interaktion mit Ko-Rezeptoren (CD4 und CD8) auf T-Zellen verstärkt. Die Ko-Rezeptoren verstärken die Bindung zwischen der antigenpräsentierenden Zelle und der T-Zelle.
In der vorliegenden Arbeit wird der Antikörper OKT3 verwendet. OKT3 bindet an die ε-Kette des TCR/CD3 Komplexes.

1.8 Zielsetzung

Bispezifische Antikörper sind attraktive Wirkstoffe für die Krebstherapie und haben mit der Marktzulasssung des Antikörpers Catumaxomab (Removab®) eine besondere Bedeutung erlangt. Die breite Anwendung bispezifischer Antikörper ist aus technischen Gründen begrenzt. Aufwändige Aufreinigungsprozesse, geringe Ausbeuten und hohe Produktionskosten sind limitierende Faktoren. Weitere Hindernisse in der therapeutischen Anwendung bispezifischer Antikörper sind die murine Herkunft vieler Antikörper und deren großes Molekulargewicht, welches eine effiziente Diffusion in solides Tumorgewebe verhindert.

In der Doktorarbeit wird eine Umgehung der oben genannten Engpässe angestrebt. Für die Umsetzung bedeutet dies einerseits, dass zur Antikörperproduktion die Vorzüge des leistungsfähigen Syntheseapparates von Hybridomen genutzt wird. Andererseits wird ein neues bispezifisches Antikörperformat entwickelt, welches ein reduziertes Molekulargewicht hat und zudem in weiten Teilen humanisiert ist. Dies kann durch genetische Manipulation des endogenen Antikörperlokus der Hybridomzellen bewerkstelligt werden. Folgende spezifische Ziele wurden in dieser Arbeit verfolgt:

Entwicklung von Hybridomen als Expressionsplattform für bispezifische Antikörper

B-Zellen bzw. davon abgeleitete Hybridome, können aufgrund ihrer natürlichen Funktion im Immunsystem des Menschen, der humoralen Immunabwehr, für die Herstellung rekombinanter Antikörper gewinnbringend eingesetzt werden.

Daher soll der aktive Antikörperlokus einer Hybridomzelle so umgestaltet werden, dass konventionelle Antikörper möglichst leicht in ein kleines bispezifisches Format konvertiert werden können. Dabei soll der genomische Kontext, der in Hybridomen zu hohen Antikörperproduktionsraten führt, weitgehend erhalten bleiben.

Die Methodik zur Produktion dieser Antikörper soll an zwei Konstrukten demonstriert werden, die zur Behandlung von Karzinomen entwickelt werden sollen:

anti-EpCAM x anti-CD3 und **anti-L1CAM x anti-CD3**

Eine weitere Anwendung soll die hier entwickelte Methode in der `HybLib´ Bibliothek finden, die gegenwärtig in unserer Abteilung hergestellt wird (**Abb. 4.2**). Hierbei handelt es sich um eine Hybridombibliothek komplett humaner Antikörper. Sie präsentiert sich als *Drei-Komponenten-System*, in dem die Antikörper auf der Zelloberfläche präsentiert werden (*mammalian display*) und mit Hilfe des assoziierten B-Zell Rezeptor Signalkomplexes ausgelesen werden kann. Als weitere Besonderheit nutzt die Bibliothek

die zelleigene Maschinerie der somatischen Hypermutation, mit der die Affinität selektierter Antikörper maturiert werden kann. Diese Hybridombibliothek wird zurzeit aus bereits hergestellten Einzelkomponenten zusammengefügt. Da bispezifische Antikörper aufgrund ihres hohen zytotoxischen Potentials eine Vielzahl neuer Möglichkeiten für die Immuntherapie eröffnen, soll die Bibliothek nach dem Prinzip eines Baukastensystems um die Komponente der bispezifischen Antikörper erweitert werden. Um das System der Hybridombibliothek möglichst effizient zu komplettieren, sollen die eingesetzten Methoden mit der bestehenden Bibliothek kompatibel sein.

Entwicklung und Charakterisierung bispezifischer Fusionsproteine zur Tumortherapie

In dieser Arbeit soll ein neuartiges bispezifisches Antikörperformat entwickelt und erprobt werden. Dabei wird ein disulfidbrückenstabilisierter *single-chain* Antikörper (dsFv) einer bestimmten Spezifität an das Fab-Fragment eines zweiten Antikörpers fusioniert (**Abb. 3.1**). Das Fab-Fragment ermöglicht hierbei die Bindung an ein Tumor-assoziiertes Antigen. Die Spezifität des Fab-Fragmentes wird von den humanisierten, monoklonalen Antikörpern chiHEA125 (anti-EpCAM) bzw. chiL1-9.3 (anti-L1CAM) abgeleitet, indem das Genom der entsprechenden Hybridomlinien manipuliert wird. Der zweite Arm des bispezifischen Antikörpers soll ein disulfidbrückenstabilisierter anti-CD3 Antikörper sein (dsFvOKT3), der allein durch die Bindung an den TCR/CD3 Komplex zytotoxische T-Zellen aktivieren kann. Die resultierenden bispezifischen Antikörper besitzen keine konstanten CH2 und CH3-Domänen mehr, und sind mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa deutlich kleiner als die von Quadromen produzierten bispezifischen Antikörper (150 kDa). Es wird daher erwartet, eine bessere Eindringtiefe in Tumoren und folglich eine größere Wirksamkeit zu erreichen. Zudem wird durch die Humanisierung der konstanten Antikörperdomänen eine verringerte Immunogenität angestrebt.

Die resultierenden bispezifischen Antikörper $_{Fab}$**HEAx**$_{dsFv}$**OKT3** und $_{Fab}$**L1x**$_{dsFv}$**OKT3** sollen gereinigt und in präklinischen Tests charakterisiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Die verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität eingesetzt. Sie wurden von den folgenden Unternehmen bezogen: *Sigma-Aldrich Chemie* mit den Marken *Sigma*, *Aldrich*, *Fluka* bzw. *Riedel-de Haën* (Steinheim/Deutschland), *Merck Biosciences* mit den Marken *Calbiochem* und *Novabiochem* (Bad Soden/Deutschland), *VWR International* (Darmstadt/Deutschland), *Neolab (Heidelberg/Deutschland), New England Biolabs* (Frankfurt/Deutschland), *Invitrogen* mit der Marke *Gibco* (Karlsruhe/Deutschland), *Acros Organics* (Geel/Belgien), *Fisher Scientific* (Schwerte/Deutschland), *Carl Roth* (Karlsruhe/Deutschland), *GE Healthcare* mit den Marken *Whatman* und *Amersham Biosciences* (München/Deutschland), *Roche Diagnostics GmbH* (Mannheim/Deutschland), *Peqlab GmbH* (Erlangen/Deutschland), *Qiagen GmbH* (Hilden/Deutschland), *Biozym Scientific GmbH* (Oldendorf/Deutschland), *Becton Dickinson GmbH* als BD Bioscience mit der Marke *Falcon* (Heidelberg/Deutschland), *Fermentas Life Sciences* (St. Leon-Rot/Deutschland), *AppliChem GmbH* (Darmstadt/Deutschland), *Eppendorf* (Hamburg / Deutschland).

2.1.1 Laborgeräte

BD FACScan	BD Biosciences
CO_2-Inkubator Modell 3196	Forma Scientific
Elektroporationsystem Electrosquare Porator T 820 BTX	AGS
HPLC-Anlage ÄKTApurifier Pharmacia	GE Healthcare /Amersham
Spektrophotometer	
Nonodrop ND-1000	Peqlab
SmartSpec™Plus	Biorad
Thermocycler DNA Engine PCT-200	BioRad
Titertek Multiscan Plus MKII Photometer	Labsystems, Finnland
Universal Turning Device für MiniPERM Module	Greiner Bio-One

2.1.2 Allgemeine Chemikalien

Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$, 99 % p.a.	Roth
Amoniumpersulfat min. 98% (APS)	Applichem
Ampicillin	Gerbu
Aqua ad iniectabila (Braun)	B. Braun Melsungen
2-Mercaptoethanol min 98 %	Sigma
Bromophenolblau	Serva

Chlorophorm	VWR
Coomassie Brillant Blue R-250	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Essigsäure	Sigma
Eisessig p.a. 100 %	Merck
Ethonol p.a.	VWR
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat p.a. (EDTA)	Roth
Gelatine	Acros Organics
Glycerol	Sigma-Aldrich /Fluka
Glycine	Gerbu
Imidazol für Synthese	Merck
Isopropanol puriss p.a.	Sigma
Isoamylalkohol Rotipuran® 98,5 % p.a.	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), >99 % p.a.	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Kalziumacetat	Sigma
Kalziumchlorid (KCl) p.a.	Merck
Kanamycin	Gerbu
Magnesiumacetat puriss p.a.	Riedel-de Haen
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat	Fluka
Methanol puriss p.a.	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Biomol
Natriumhydroxid p.a.	Merck
Natriumacetat	Applichem
Natriumchlorid puriss p.a.	Riedel-de-Haen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) p.a.	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) p.a.	Fluka
Nonidet P40 (NP40)	Fluka
Orthophenylendiamin	Sigma
Phenol	Roth
Phosphorsäure 85 % p.a.	Applichem
Schwefelsäure 95 % p.a.	Roth
Tetramethylethylendiamid (TEMED) 99% p.a.	Roth
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris-Base)	Sigma
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid 30%ig, Perhydrol	Merck

2.1.3 Standardlösungen

Die aufgeführten Lösungen wurden mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt. Für Lösungen die in der Proteinbiochemie Anwendung fanden wurde doppelt deionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage bevorzugt (insbesondere bei HPLC-Läufe beachten). Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, sind die Lagerungsbedingungen angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Gewicht pro Volumeneinheit (w/v).

Blocklösung (Western)	5 % Milchpulver; 1x PBS; 0,1% (v/v) Tween; immer frisch ansetzen
Coomassie-Lösung (SDS-PAGE)	200 mL Methanol; 100 mL Essigsäure; 200 mL H_2O, 1 g Coomassie Brilliant Blau R-250
Carbonatpuffer (ELISA)	0,05M Na_2CO_3/ 0,05M $NaHCO_3$ pH 9,6; bei 4°C lagern
DPBS	1x PBS mit pH-Indikator Phenolrot
DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerol; 0,25 % Xylenol Orange; auf 50mL H_2O
Gelatinepuffer (ELISA)	0,2 % Gelatine durch erwärmen auf 80°C lösen; 0,1% NaN_3
Laemmli-Probenpuffer, 10x (nicht reduzierend)	400mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % Bromophenolblau; 8 % SDS; 50 % (v/v) Glycerol; auf 10ml H_2O; bei -20°C lagern
Laemmli-Probenpuffer, 10x (reduzierend)	400mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % Bromophenolblau; 8 % SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 1,5 % (v/v) ß-Mercaptoethanol; auf 10ml H_2O; bei -20°C lagern
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05M Tris-Base; 0,38M Glycine; 1 % SDS; auf 2 L H_2O
NID-Puffer	1,85 g KCl; 0,5 g Gelatine; 10mM Tris-HCl pH 8,3; 10mM $MgCl_2$; 10 mL H2O; sterilfiltrieren 2,25 mL NP40; 2,25 mL Tween 20; auf 500 mL H_2O
Ni-NTA Grundpuffer (GP)	50mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,8; 300mM NaCl; bei 4°C lagern
Ni-NTA Waschpuffer (WP)	50mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,8; 300mM NaCl; 10mM Imidazol; bei 4°C lagern
Ni-NTA Vorelutionspuffer (VP)	50mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,8; 300mM NaCl; 20mM Imidazol; bei 4°C lagern
Ni-NTA Elutionspuffer (EP)	50mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,8; 300mM NaCl; 250mM Imidazol; bei 4°C lagern
Ni-NTA Mediumspuffer (MP), 10x	500mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,8; 1,5M NaCl; 100mM Imidazol; bei 4°C lagern
PBS Puffer, 10x, pH 7,4	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na_2HPO_4; 2,4 g KH_2PO_4; 800ml H_2O; mit HCl auf pH 7,4 einstellen; auf 1 L H_2O
PBS/T 0,1 % 1x (0,05 %)	1x PBS; Tween 0,1 % oder auch 0,05 % (v/v).
Ponseau S Lösung (Western)	0,1 % Ponseau S; 5 % (v/v) Eisessig

PCR-Puffer	500mM Tris-HCl pH 9,2; 160mM $(NH_4)_2SO_4$; 17,5mM $MgCl_2$; auf 10 mL H_2O; bei -20°C lagern
Stop-Puffer (ELISA)	1M H_2SO_4 (2N Lösung)
Substratlösung (ELISA)	0,1M KH_2PO_4; 0,1M K_2HPO_4; pH 6,0; 1 mg/mL OPD; 0,1 % H_2O_2; lichtgeschützt; immer frisch
Superentfärbelösung (SDS-PAGE)	400 mL Methanol; 200 mL Essigsäure; 400 mL H_2O
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,75M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	3M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS
TAE Puffer, 50x	242 g Tris-Base; 57,1 mL Eisessig; 100 mL 0,5M EDTA pH 8,0; auf 1 L H_2O
Transferpuffer pH 8,2 (Western)	24mM Tris; 190mM Glycine; auf 1 L H_2O

2.1.4 Molekularbiologische Reagenzien

DNAse (RNase-frei)	Qiagen
DNA-Größenstandard, GeneRuler™ Ladder Mix	Fermentas
DNA-Polymerasen	
Taq-DNA-Polymerase (SAWADY, Hot)	Peqlab
Pfu-DNA-Polymerase (peqGOLD, Pure)	Peqlab
PfuTurbo®-DNA-Polymerase	Stratagene
Phusion™ Hot Start HF-DNA-Polymerase	Finnzymes
Hexamere ($pd(N)_6$ random)	GE Healthcare
Nukleotide, peqGOLD dNTP Set	Peqlab
Proteinase K (500U/ mL)	Sigma / Fluka
Reverse Transkriptase (SuperScript™ II)	Invitrogen
RNase Inhibitor	Applied Biosystems
T4 DNA Ligase	Promega Inc.
UltraPure™ Agarose	Invitrogen

2.1.5 Reaktions-Kits

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAshredder Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

2.1.6 Oligonukleotide

Die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im **Anhang I** aufgeführt und von der Firma MWG (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) gemäß eigener Vorgaben synthetisiert und mittels FPLC gereinigt worden. In Anhang I ist weiterhin angegeben, ob die Primer Überhänge für Restriktionsenzyme einführen.

2.1.7 Proteine, Antikörper und Färbereagenzien

Proteine:

Streptavidin (SA) wurde ebenfalls in den Varianten SA-POX, SA-FITC und SA-PE eingesetzt und wurde von der Firma Dianova bezogen.

Albumin, Hen egg white (Ovalbumin); 44,3 kDa	Sigma
Albumin, Bovine Serum (BSA); 66 kDa	Sigma
Alkohol Dehydrogenase, Yeast; 150 kDa	Sigma
Carboanhydrase, Bovine Erythrocytes; 29 kDa	Sigma
Blau Dextran; >2000 kDa	Sigma

Fluorochrome:

7-Amino-Actinomycin D (7-AAD), Via-Probe™	BD Bioscience
Propidium Iodid (PI),Stammlösung 1,5mM = 1000x, 4°C	Sigma

Antikörper:

Antikörper der Marke *Southern Biotech* wurden von der Firma *Biozol* (Eching, Deutschland) bezogen. Weitere Antikörper stammen von den Firmen *Dianova* (Hamburg, Deutschland), *Sigma-Aldrich*, *Roche*, *Novartis* (Basel, Schweiz) oder stammen aus eigener Herstellung. Sie liegen entweder unmarkiert, oder als Konjugat mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC (Fluorescein isothiocyanate) und PE (R-phycoerythrin) beziehungsweise mit dem Enzym Peroxidase (POX) vor. Alle verwendeten Antikörper sind absorbiert (abs.) gegen Immunglobuline der Maus bzw. des Menschen. Die Antikörper stammen entweder aus der Ziege (*goat*) oder aus der Maus (*mouse*) und sind entweder komplette Antikörper oder $F(ab')_2$ Fragmente. Murine Antikörper bei denen die konstanten Antikörperdomänen durch die entsprechenden humanen Sequenzen ersetzt wurden bezeichnet man als chimär (c*himerized*). Chimäre Antikörper bei denen zusätzlich die Gerüstregionen (*frameworks*) in den variablen Domänen ersetzt wurden sind humanisiert (*humanized*). Die eingesetzte Antikörpermenge ist in den jeweiligen Methodenteilen angegeben. Die Antikörper wurden bei 4°C gelagert.

Polyklonale Antikörper:

GAHu-IgG	Goat F(ab')2 Anti-Human IgG (γ chain specific), abs., Southern
GAHu-kappa	Goat F(ab')2 Anti-Human kappa, abs., Southern
GAM-IgG	Goat F(ab')2 Anti-Mouse IgG1 (γ chain specific), abs., Southern
GAM-IgG	Goat F(ab')2 Anti-Mouse kappa, abs., Southern
GAHu-IgG (H+L)	Goat F(ab')2 Anti-Human IgG (heavy, light chain specific), Dianova
GAHu-$(Fab')_2$	Goat F(ab')2 Anti-Human $(Fab')_2$-Fragment, abs., Dianova

Monoklonale Antikörper:

HD20	Mouse IgG1 Anti-Idiotyp (G. Moldenhauer, nicht publiziert)
OKT3	Mouse IgG2a Anti-CD3 (Kung *et al.* 1979)
9E10	Mouse IgG1 Anti-myc (Evan *et al.* 1985)
13.45.31.a	Mouse IgG2a Anti-His (Zentgraf *et al.* 1995)
M1 (4E11-18)	Mouse IgG1 Anti-FLAG, Sigma
M2	Mouse IgG1 Anti-FLAG, Sigma
W6/32	Mouse IgG1 Anti-MHC Klasse I (Barnstable *et al.* 1978)
HEA125	Mouse IgG1 Anti-EpCAM (Moldenhauer *et al.* 1987)
chiHEA125	Chimerized IgG1 Anti-EpCAM (Lüttgau 2004)
HuL1-9.3	Mouse IgG1 Anti-human L1CAM (Gast *et al.* 2008)
chiL1-9.3	Chimerized IgG1 Anti-huL1 (Lüttgau 2004)

2.1.8 Proteinbiochemische Reagenzien

Chemilumineszenz Reagenz (SuperSignal West Pico)	Thermo Scientific
Complete Protease Inhibitor, Stammlösung 25x	Roche
Sepharosen und Säulen	
Ni-NTA Superflow	Qiagen
Superdex 200 HR 10/30	Amersham / Pharmacia
NAP™-5 bzw. NAP™-25 Säulen	Amersham / Pharmacia
NuPAGE® Novex® Bis-Tris precast Gels, 4-12 %	Invitrogen
Nitrocellulose-Membran Protran BA85 0,45 µm	Schleicher und Schuell
Ponseau S	Serva
Protein-Größenstandard 10-250kDa	New England Biolabs
Röntgenfilme (Kodak Biomax XAR-5-165 1454)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid/ Bisacrylamidlösung	Roth
Rotiphorese® Gel A Lösung Acrylamidlösung	Roth
Whatman 1mm Filterpapier	GE Healthcare / Whatman

2.1.9 Kultivierungsmedien für Bakterien

Reagenzien:

Casein/Peptone high quality	Gerbu
Hefeextrakt, standard grade	Gerbu
Agar für Mikrobiologie	Roth

Medien für die Kultivierung von Bakterien:

Einfriermedium	LB-Medium; 50 % Glycerin; (OD_{600}=1); 1x Antibiotikum
LB (Luria Bertani)-Medium	10 g Casein/ Peptone; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; Auf 1 L H_2O; pH mit NaOH auf 7,5 einstellen
LB-Agar-Platten	1 L LB-Medium; 15 g Agar; autoklavieren; Auf 60°C herunterkühlen mit Antibiotika versetzen und in Petrischalen gießen
SOC-Medium	20 g Casein/ Peptone; 5 g Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM $MgCl_2$; 10mM $MgSO_4$; 20mM Glucose; auf 1 L H_2O
Zusätze	Ampicillin - Stammlösung 100 mg/mL (1000x) Kanamycin - Stammlösung 30 mg/mL (1000x)

LB-Medium wurde als Standardmedium für die Bakterienkultur und wurde mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 3M NaOH eingestellt. Die Medien wurden vor Gebraucht autoklaviert (25 min, 121°C) und konnten so mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert werden. Dem Flüssigmedium wurde bei Bedarf kurz vor Gebrauch ein Antibiotikum zugesetzt. Diese wurden als Konzentrate (1000x) in deonisiertem H2O gelöst, sterilfiltriert und als 1 mL Aliquots bei -20°C gelagert. Zum Gießen von Agarplatten wurde das LB-Medium mit 1,5% Agar versetzt. Nach dem Abkühlen auf unter 60 °C wurden dem LB-Agar-Gemisch gegebenenfalls Antibiotika zugefügt und dieser anschließend in 10 cm Petrischalen gefüllt (ca. 15-20 mL/Schale). Das warme Medium polymerisiert beim erkalten in den Schalen aus. Damit zum Zeitpunkt der Anwendung die aufgetragene Flüssigkeit gut auf den Platten einzieht, wurden diese zum trocknen für ca. 40 Minuten mit offenem Deckel unter der sterilen Werkbank ausgelegt. Platten können bis zu drei Monate bei 4°C, durch Plastikverpackung vor dem Austrocknen geschützt, gelagert werden.

2.1.10 Kultivierungsmedien und Reagenzien für Zellkulturen

Reagenzien:

DMEM	Invitrogen / Gibco
DMSO für Zellkultur	Fluka
Fetales Rinderserum (FCS)	Biochrom
Ficoll-Paque®-Plus	GE/Pharmacia
Fungizone: AmphotericinB	Invitrogen
Geneticin (G-418 Sulfat) Stammlösung 100 mg/mL	Invitrogen
Gentamycin	Biochrom
L-Glutamine	Invitrogen / Gibco
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Natrium Pyruvat	Invitrogen
Natriumazid (NaN_3)	Merck
OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen / Gibco
Penicillin-Streptomycin Stammlösung 100x	Invitrogen / Gibco
RPMI-1640	Invitrogen / Gibco
Zeocin™ Stammlösung 100 mg/mL	Invitrogen / Gibco
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Invitrogen / Gibco

Medien für die Kultivierung eukaryontischer Zellen:

DMEM komplett	500 mL DMEM; 10 % FCS (hitzeinaktiviert); 2mM L-Glutamin; 1x Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	RPMI-1640 (ohne Zusätze); 10 % DMSO, 2mM L-Glutamin; 20 % FCS (hitzeinaktiviert, hi) Besonderheit HEK 293T Zellen: 80 % FCShi; 20 % DMSO
Elektroporationsmedium	500 mL DPBS; 0,5mM MgAc, 0,1mM CaAc
FACS-Medium	500 mL DPBS; 2 % FCS (hitzeinaktiviert); 0,1% NaN_3
Konditioniertes Medium	80 % RPMI-1640 komplett; 20 % Sterilfiltrierter Überstand einer dichten Kultur
miniPERM-Medium	RPMI-1640; 10% FCS (hitzeinaktiviert); 2 mM L-Glutamin; 1mM Na-Pyruvat; 0,225% Glucose; 1x Penicillin/Streptomycin; 0,5% (v/v) Amphotericin B
Post-SORT-Medium	Konditioniertes Medium; 1x Gentamycin
RPMI komplett	500 mL RPMI-1640; 10 % FCS (hitzeinaktiviert); 2mM L-Glutamin; 1mM Na-Pyruvat
Zusätze	Gentamycin: 100 µg/ml (100x), bei 4°C lagern Geneticin/G418: 100 mg/ml, bei -20°C lagern Zeocin: 100 mg/ml, bei -20°C lichtgeschützt lagern

Die hier aufgeführten Medien wurden wenn nicht anders vermerkt bei 4°C gelagert. Das FCS wurde vor Gebrauch für eine Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Nach dem Ansetzen wurden die Medien (DMEM komplett, RPMI komplett und das miniPERM-Medium) zur Sterilkontrolle für 5 Tage bei 37°C zwischengelagert und waren bei 4°C mehrere Monate haltbar. L-Glutamin wurde erst kurz vor Gebrauch dem jeweiligen Medium zugesetzt. Die erforderlichen G418 bzw. Zeocin Endkonzentrationen wurden für jede Charge und jede Zelllinie erneut bestimmt.

2.1.11 Bakterienstämme

NEB Turbo Competent *E. Coli*	*F' proA$^+$B$^+$ lacI^q ΔlacZM15/fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV zgb-210::Tn10 (Tet^R) endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5* New England Biolabs
NEB 5-alpha Competent *E. Coli*	*F' proA$^+$B$^+$ lacI^q (ΔlacZ)M15 zzf::Tn10 (Tet^R)/fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 (φ80 Δ(lacZ)M15) glnV44 gyrA96 (Nal^R) recA1 endA1 thi-1 hsdR17* New England Biolabs
XL1-Blue *E. Coli*	*F' ::Tn10 proA$^+$B$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi1 hsdR17* ($r_k^-m_k^+$) *glnV44 relA1 lac* Statagene
ER2925 (dam$^-$/dcm$^-$) *E. Coli*	*ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2* New England Biolabs
XL1-Blue *E. Coli*	*F' ::Tn10 proA$^+$B$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi1 hsdR17* ($r_k^-m_k^+$) *glnV44 relA1 lac* Statagene

2.1.12 Zelllinien

Colo 205	Humane Kolon Adenokarzinom Zell-Linie (Semple *et al.* 1978)
HEK 293T	Humane embryonale Nieren Zell-Linie (mit T Antigen) (Shein und Enders 1962)
Jurkat	Humane Akute Lymphozytische Leukämie (ALL) Zell-Linie (Weiss *et al.* 1984)
SKOV-3	Humane Ovar Adenokarzinom Zell-Linie (Fogh *et al.* 1977)

Diese Zell-Linien können bei Cell Lines Service (Eppelheim, Deutschland) bestellt werden.

2.1.13 Software und Datenbanken

CellQuest ™ Pro	BD Biosciences
FlowJo 8.8.4	Tree Star Inc. (USA)
Gene Construction Kit™	Textco Inc. (USA)
Sequencher 4.7	Genes Code Inc. (USA)
IMGT	http://www.imgt.cines.fr
VBASE2	http://www.vbase2.org

2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1 Kultivierung von E. Coli

E. Coli wurden entweder als Flüssigkultur in LB-Medium oder auf festen LB-Agar-Platten angezogen, wobei dem Kulturmedium zur Selektion gegebenenfalls ein Antibiotikum zugesetzt wurde. Optimale Wachstumsbedingungen für Flüssigkulturen herrschen bei einer Temperatur von 37°C, einer guten Durchmischung auf einem Schüttler (200 rpm) und einem guten Sauerstoffeintrag. Bakterien sind auf Agar-Platten generell mehrere Wochen bei 4°C haltbar. Zur langfristigen Lagerung wurden sie als Stocks in 20% Glycerol bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Transformation von E. Coli

Bakterien erkennen spezifische Sequenzen auf Plasmiden und replizieren diese naturgetreu. Um Plasmide zu vermehren werden sie demnach in Bakterien eingeschleust. Diesen Vorgang nennt man Transformation.

Transformation elektrokompetenter Zellen

Die Elektroporation erfordert eine spezielle Apparatur. 40 µL Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Ligationsansatz oder 1 µL Plasmid DNA (1 ng – 1 µg) gemischt und in vorgekühlte 2 mm-Küvetten pipettiert. An den Küvetten wurde eine Spannung von 1700V angelegt, so dass die DNA durch die geöffneten Membranporen der Bakterien eindringen konnte. Die Zellen wurden zügig in 500 µL SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen auf selektivem LB-Agar ausplattiert.

Elektrokompetente *E. Coli* Stämme waren ER2925 (dam^-/dcm^-) und XL1-Blue. ER2925 (dam^-/dcm^-) hat einen defizienten Methylierungsapparat und wurde immer dann eingesetzt wenn die verwendeten Restriktionsendonukleasen durch methylierte DNA gehemmt wurden. XL1-Blue wurde bei Mutagenesen verwendet (siehe Abschnitt 2.2.10).

Transformation chemokompetenter Zellen

50 µl chemokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µL Ligationsansatz oder 1 µL Plasmid DNA (1 ng – 1 µg) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten ein Hitzeschock von 30 s bei 42°C und eine weitere Inkubation von 2 min auf Eis. Die Zellen wurden in 200 µL SOC-Medium aufgenommen und 1h bei 37°C wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen auf selektivem LB-Agar ausplattiert.
Chemokompetente *E. Coli* Stämme waren: NEB Turbo und NEB 5-alpha. NEB Turbo und NEB 5-alpha waren die Standardstämme für Klonierungen, wobei sie sich lediglich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit unterschieden.

2.2.3 DNA-Isolierung aus E. Coli Kulturen

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterienkulturen wurden das QIAprep Spin Miniprep Kit (bis zu 20 µg DNA) bzw. das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (bis zu 2mg DNA) der Firma *Qiagen* verwendet und gemäß der Arbeitsanleitung des Herstellers vorgegangen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA- und DNA-Proben erfolgte nach Abgleich eines Leerwertes bei einer optischen Dichte von 260 nm bzw. 280 nm mit dem NanoDrop Spektrophotometer. Für doppelsträngige DNA entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm (OD_{260}) einer Konzentration von 50 µg/mL, für RNA von 40 µg/mL. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung durch Proteine. Bei reinen Nukleinsäuren liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten

Die präparative und analytische Auftrennung von DNA Fragmenten oder zirkulären Plasmiden erfolgt in Agarosegelen. Als Gel- und Elektrohphorese- Puffer wurde TAE 1x verwendet. Das DNA Material wurde vor dem Auftragen mit einem 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Dieser enthielt einerseits Glycerin und gewährleistet das Absacken der DNA in die Taschen, als auch Referenzfarbstoffe die es ermöglichen die Migration der DNA in dem Agarosegel zu verfolgen. Agarosegele wurden 15 min in einem Ethidiumbromidbad (120 µL EtBr; 400 mL 1x TAE) gefärbt und in einem Wasserbad wiederum 15 min entfärbt. Zur korrekten Analyse des DNA Bandenmusters wurde zusätzlich zu den DNA Proben auch ein Größenstandard (Marker) mit auf das Gel aufgetragen. Der Marker GeneRuler™ Ladder Mix von der Firma *Fermentas* ergibt folgende Referenzen in bp: 100, 200 ,300 ,400 ,500 ,600 ,700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000.

2.2.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Für Klonierungsansätze wurden die gewünschten DNA Fragmente unter langwelligem UV-Licht (320 nm) aus dem Gelblock ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma *Qiagen* nach Arbeitsanleitung des Herstellers gereinigt. Die Konzentration der isolierten DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

2.2.7 Ligation von DNA-Enden

Bei einer Ligationsreaktion mit überhängenden Enden wurde das Insertfragment in einem 3-fachen molaren Überschuss zum Vektorfragment eingesetzt, bei Ligationen mit stumpfen DNA Enden jedoch äquimolar. Der Reaktionsansatz für die Ligation enthielt in einem Gesamtvolumen von 10 µl, 30 fmol Insert, 10 fmol Vektor, 5 U T4 DNA Ligase sowie den entsprechenden Reaktionspuffer. Die Reaktion erfolgte ü.N. bei 16°C im Thermocycler.

2.2.8 Enzymatischer Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Zum Ansetzten von Restriktionsverdaus wurden die Angaben des Herstellers (*New England Biolabs*) zu den jeweiligen Restriktionsendonukleasen berücksichtigt. Wichtige Kriterien hierbei sind das Temperaturoptimum der unterschiedlichen Enzyme, die Zusammensetzung des Reaktionspuffers, die einzusetzende Konzentration, sowie mögliche Limitierungen des Enzyms z.B. durch die Methylierung der DNA. Diese Eigenschaften sind den Datenblättern der Enzyme zu entnehmen. Prinzipiell können mehrere Enzyme gleichzeitig in einer Reaktion eingesetzt werden insofern ihre Kriterien erfüllt sind. Die Menge des Enzyms wurde der Menge an eingesetzter DNA angeglichen, wobei 2-10 U Enzym/ µg DNA verwendet wurden. Bei Analytischen Restriktionsverdaus wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µL eingesetzt und meist bei 37°C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 1 h. Bei Restriktionsverdaus mit anschließender Gelextraktion wurden 5-10 µg Plasmid-DNA in einem entsprechenden Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 2-3 h bei 37°C um einen vollständigen Verdau sicherzustellen.

2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Sie wird für das Klonieren von DNA-Konstrukten, oder auch für die Expressionaanalyse von Transgenen in Zelllinien eingesetzt. PCR-Produkte, die bei einer Klonierung Anwendung fanden oder sequenziert werden sollten, wurden nach der PCR-Reaktion aufgereinigt, um die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Gemisch zu entfernen, bzw. um eine Umpufferung vorzunehmen. Hierzu wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma *Qiagen*

eingesetzt und gemäß der Vorschrift des Herstellers angewendet. PCR-Produkte zu analytischen Zwecken wurden direkt ein Agarosegel aufgetragen und visualisiert. PCR-Produkte die als Inserts in einer Klonierung verwendet werden sollten mussten mit den notwendigen Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen flankiert werden. Die notwendigen Überhänge brachte hierbei der jeweilige Primer ein.

PCR zu Klonierungszwecken

Reaktionsansatz:	1-100 ng	DNA Template
	1,5 µL	Primer forward (10 pM/µL Stock)
	1,5 µL	Primer reverse (10 pM/µL Stock)
	1 µL	dNTPs (10mM Stock)
	5 µL	HF-Puffer 5x (mitgeliefert)
	0,25 µL	*Phusion* (2 U/µL)
	x µL	H_2O
	25 µL	Reaktionsvolumen

PCR-Programm:

Die optimalen Bedingungen für die verschiedenen Reaktionen lagen alle im Rahmen des folgenden Programms:

	Denaturierung		Annealing		Elongation
Zyklus 1-2	2 min 98°C	→	30 s 60°C	→	1 min 30 s 68°C
Zyklus 3-27	30 s 98°C	→	30 s 65°C	→	1 min 30 s 68°C
Zyklus 28	2 min 68°C				
Ende	∞ 4°C				

Analytische PCR

Reaktionsansatz:	1-100 ng	DNA Template
	1,5 µL	Primer forward (10 pM/µL Stock)
	1,5 µL	Primer reverse (10 pM/µL Stock)
	1 µL	dNTPs (10mM Stock)
	2,5 µL	PCR-Puffer 10x
	0,5 µL	*Taq/Pfu* Gemisch (5:1) (5 U/ /µL)
	x µL	H_2O
	25 µL	Reaktionsvolumen

Die optimalen Bedingungen für die verschiedenen Reaktionen lagen alle im Rahmen des folgenden Programms:

	Denaturierung		Annealing		Elongation*
Zyklus 1	60 s 95°C				
Zyklus 2-12	30 s 95°C	→	60 s 65°C	→	4 min 68°C
Zyklus 13-17	30 s 95°C	→	60 s 65°C	→	5 min 40 s 68°C
Zyklus 18-22	30 s 95°C	→	60 s 65°C	→	7 min 20 s 68°C
Zyklus 23-27	30 s 95°C	→	60 s 65°C	→	9 min 68°C
Zyklus 28-32	30 s 95°C	→	60 s 65°C	→	10 min 40 s 68°C
Zyklus 33-37	30 s 95°C	→	60 s 65°C	→	12 min 20 s 68°C
Zyklus 38	15 min 68°C				
Ende	∞ 4°C				

* Elongationszeit wurde jeweils um 1 min 40 s inkretmentiert

2.2.10 Mutagenese von Nukleinsäuren

Die Mutagenese ermöglicht das gezielte Einführen von Punktmutationen in eine Zielsequenz. Hierbei verfolgt man z.B. das Ziel eine bisher nicht existente Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuklease zu generieren, oder auch ein Stop-Codon einzubringen. Die Mutagenese ist eine modifizierte PCR-Reaktion und basiert auf dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von *Stratagene*.

Reaktionsansatz:	5-50 ng	dsDNA Template
	1,5 µL	Primer forward (10 pM/µL Stock)
	1,5 µL	Primer reverse (10 pM/µL Stock)
	1 µL	dNTPs (10mM Stock)
	5 µL	*Turbo*-Puffer 5x (mitgeliefert)
	0,25 µL	*PfuTurbo*® (2,5 U/µL)
	x µL	H_2O
	50 µL	Reaktionsvolumen

PCR-Programm:		Denaturierung		Annealing		Elongation
Zyklus	1	30 s 95°C				
Zyklus	2-12*	30 s 95°C	→	60 s 55°C	→	9 min 68°C
Ende		∞ 4°C				

*Punktmutation: 12 Zyklen
Aminosäureaustausch: 16 Zyklen
Mehrfache Aminosäure- Deletionen oder Insertionen: 18 Zyklen

Nach Beendigung der Reaktion wurde der komplette Ansatz 1h bei 37°C mit 10 U/50 µL Ansatz dem Restriktionsenzym DpnI verdaut und das Enzym anschließend für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Mutagenisierte Plasmide wurden unter Zugabe von 0,8 µL ß-Mercaptoethanol in den *E. Coli*-Stamm XL1-Blue transformiert.

2.2.11 Phenol-Chlorophorm-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen

Diese Methode dient der Abtrennung von verunreinigenden Proteinen aus einer nukleinsäurehaltigen Lösung. Zur DNA-Lösung wurde 1 Volumen eines Phenol : Chloroform Gemischs (1:1) gegeben, 10-30 s auf dem Vortexer gemischt bis sich eine Emulsion bildete und bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert (Raumtemperatur, 10 min, 13.000 rpm). Die Zentrifugation bewirkt eine Phasentrennung, wobei die oberste wässrige Phase die DNA enthält, während die Interphase proteinhaltig und die Unterphase Phenol-Chloroform-haltig ist. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt. Um Spuren des Phenols in der Probe zu entfernen, wurde die Probe mit 1 Volumen eines Chloroform : Isoamylalkohol Gemischs (24:1) versetzt, 10-30 s auf dem Vortexer gemischt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert (Raumtemperatur, 1 min, 13.000 rpm).

Hierbei entstehen zwei Phasen, wobei die Oberphase abermals die DNA enthält und abgenommen wurde.
Zur Bei Verwendung der DNA zur Transfektion von Säugetierzellen, wurde an die Phenol-Chlorophorm-Extraktion direkt eine Ethanol-Fällung angeknüpft (siehe Abschnitt 2.2.12) um die DNA zu sterilisieren.

2.2.12 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur nukleinsäurehaltigen Lösung wurden 1/10 Volumen 3M NaAc-Lösung pH 6,0 und 2 Volumen 100 % Ethanol gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde das Gemisch weitere 15-60 min bei -20°C inkubiert. Alternativ erfolgte diese Inkubation auch für 10 min bei -80°C. Die Probe wurde nun in einer vorgekühlten Tischzentrifuge bei 4°C für 15-60 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das gewonnene DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (4°C, 10 min, 13.000 rpm), luftgetrocknet und im gewünschten Volumen H_2O aufgenommen. Die Inkubations- und Zentrifugations-Zeiten richten sich nach der DNA Konzentration im Ausgangsmaterial, wobei große DNA Mengen leichter präzipitieren als geringere.
Wurde die DNA anschließend für eine Transfektion in Säugetier Zell-Linien verwendet, wurde das Pellet unter der sterilen Werkbank luftgetrocknet und in sterilem Wasser (Aqua ad iniectabila, Braun Melsungen) aufgenommen.

2.2.13 cDNA Synthese und Reverse Transkription

Die Synthese von Einzelstrang cDNA für nachfolgende PCR-Experimente und den Nachweise von Gentranskripten erfolgte aus Gesamt-RNA aus Zell-Linien (siehe Abschnitt 2.3.6). 0,5 µg RNA wurden in DEPC-H_2O, mit 1 µL Hexamere (50 µM) und 1 µL dNTPs (10mM) zu einem Gesamtvolumen von 12 µL aufgefüllt und für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt. Dem Gemisch wurden anschließend 0,5 µL RNasin (40 U/µL), 4 µL First Strand Puffer 5x (mit Transkriptase mitgeliefert), 2 µL DTT (0,1 M) und 1 µL SuperScript II RT Transkriptase (200 U/µL) zugegeben und auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Der Ansatz wurde schließlich 50 min bei 42°C inkubiert, gefolgt von einer 15 minütigen Inkubation bei 70°C, dann wieder auf 4°C heruntergekühlt und mit DEPC-H_2O auf ein Gesamtvolumen von 100 µL aufgefüllt. Zum Nachweis eines spezifischen Gentranskriptes wurden 1 µL des Ansatzes nachfolgend für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Bei der gesamten Prozedur ist darauf zu achten, dass RNAse freie Reagenzien und Röhrchen verwendet werden.

2.2.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden oder von Produkten aus einer PCR-Reaktion, wurde bei der Firma *Eurofins MWG Operon* in Auftrag gegeben. Die erforderlichen Primer wurden der Firma zur Verfügung gestellt. Universelle Primer M13 uni (-21) und M13 rev (-29) wurden von der Firma bereitgestellt. Sequenziert wurden jeweils die Endkonstrukte einer Klonierung, oder ggf. Plasmide aus Zwischenschritten.

2.2.15 Computerbasierte Sequenzanalyse

Alle DNA-Konstrukte wurden mit Hilfe des Programms Gene Construction Kit (*Textco BioSoftware*, USA) entworfen und dargestellt. Das Programm ermöglichte zudem die Prognostizierung von Produktlängen aus Restriktionsanalysen. Die Sequenzierungsdaten wurden mit Hilfe des Programms Sequencher 4.7 (*Genes Code Inc.*) analysiert. Multiple Alignments wurden mit dem Standardalgorithmus CLUSTAL errechnet.
Die Gene der humanen und murinen Anikörpergene finden sich in den online Datenbanken V-Base 3, sowie in der Kabat *"Database of Sequences of Proteins of Immunological Interes".*

2.3 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.3.1 Lagerung eukaryontischer Zellen

<u>Einfrieren von Zellen</u>
Zum Einfrieren wurden die Zellen geerntet, in 2 mL 4°C kaltem Einfriermedium resuspendiert und in speziellen Cryo-Röhrchen bei -80°C in einer Styroporschachtel eingefroren. Optimal sollte eine Temperaturreduzierung von 10°C/h sein. DMSO diffundiert in das Zelleinnere und verhindert dort die Kristallbildung und einhergehende Zerstörung der Zellmembran. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt, konnten aber bis zu 6 Monaten bei -80°C gelagert werden.

<u>Auftauen von Zellen</u>
Zum Auftauen von Zellen wurden die Cryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff leicht geöffnet um eingedrungenen Stickstoff entweichen zu lassen und anschließend zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden möglichst schnell in 10 mL vorgewärmtes Medium überführt und abzentrifugiert (3 min, 2000 rpm, RT) um DMSO-Spuren zu beseitigen. Je nach Zellzahl wurde das Pellet so in frischem Medium aufgenommen, dass die Kultur möglichst schnell dicht war, um ein optimales Anwachsen der Zellen zu gewährleisten.

2.3.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kulturen wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO_2 und gesättigtem Wasserdampf gehalten und in den in Tabelle 2.1 angegebenen optimalen Medien kultiviert.

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien und entsprechende Kultivierungsmedien

Linie	Typ	Medium
Hybridome	suspension	RPMI komplett (RPMI-1640; 10% FCS; 2mM L-Glutamin; 1mM Na-Pyruvat
Jurkat	suspension	RPMI komplett (RPMI-1640; 10% FCS; 2mM L-Glutamin; 1mM Na-Pyruvat
Colo 205	adherent	RPMI komplett (RPMI-1640; 10% FCS; 2mM L-Glutamin; 1mM Na-Pyruvat
SKOV-3	adherent	RPMI komplett (RPMI-1640; 10% FCS; 2mM L-Glutamin; 1mM Na-Pyruvat
HEK 293T	adherent	DMEM komplett (DMEM; 10 % FCS; 2mM L-Glutamin; 1x Pen-Strep)

Suspensionszellen wurden je nach Verdopplungszeit alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt, wobei sie in der Regel eine Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen /mL erreichten. Adherente Zellen wurden so lange in Kultur gehalten bis sie konfluent waren und wurden dann ebenfalls im Verhältnis 1:10 verdünnt. Hierzu wurde der Mediumsüberstand abgenommen, die Zellen dann mit PBS 1x gewaschen, und durch Zugabe von 0,25 % Trypsin/EDTA (1-5 min bei 37°C) vom Flaschenboden gelöst, rasch in frischem Medium aufgenommen und abzentrifugiert (3 min, 2000 rpm, RT). Pelletierte Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und schließlich als Suspension verdünnt und erneut in Kultur genommen.
Die genaue Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Die Färbung mit 0.5%iger Trypanblaulösung ermöglichte dabei die Unterscheidung zwischen toten (blauen) und lebenden Zellen.

<u>G418 Selektion</u>

Zur Positivselektion von erfolgreich transfizierten Zielzellen unter Miteinführung des NPTII Gens (hier auch als neo^R(-) bezeichnet) wurden die Zellen in Medium kultiviert, dem abhängig von der Zelllinie und der G418-Charge zwischen 100 bis 1000 µg/mL G418 (Geneticin) zugesetzt wurde, kultiviert. G418 wurde als Stammlösung (100 mg/mL in H_2O) angesetzt. Die Wirksamkeit der Charge und die Sensitivität der Zelllinie auf G418 wurde immer wieder neu bestimmt. In eine 24-Loch-Platte wurden hierzu pro Loch $5 \cdot 10^4$ Zellen ausgesät und in 1 mL Zellkulturmedium kultiviert, dem eine ansteigende Verdünnungsreihe G418 zugegeben wurde (200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL G418). Die Zellen wurden zwei Wochen lang beobachtet und das Verhältnis von Toten zu Lebenden Zellen dokumentiert. Die G418 Konzentration, bei der nach 5-6 Tagen keine lebenden Zellen mehr vorzufinden waren, wurde für die Selektion verwendet.

2.3.3 Kultivierung von Hybridomzellen in MiniPerm Bioreaktoren

Antikörperproduzierende B-Zell Hybridome wachsen in stationären Zellkulturflaschen zu Dichten von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL an und sezernieren dabei Antikörper, die aus dem Kulturüberstand gereinigt werden können. Da die Zellen immer wieder mit frischem Medium versorgt werden müssen, fallen hierbei allerdings sehr große Volumina an. Dieses Problem besteht bei der Produktion in sog. miniPERM Bioreaktoren nicht, da hier das Zellkompartiment (Produktionsmodul) durch eine semipermeable Membran von dem Mediumreservoir getrennt ist. Die Antikörper können die semipermeable Membran nicht durchqueren und werden somit im Produktionsmodul angereichert. Hybridome erreichen im Produktionsmodul Dichten von bis zu $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL.
Zur Kultivierung der Hybridome in MiniPerm Reaktoren, wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen aus einer Suspensionskultur geerntet, in 40 mL MiniPerm-Medium aufgenommen und mit Hilfe einer 50 mL Spritze luftblasenfrei in das Produktionsmodul eingeführt. Das Versorgungsmodul wurde mit 400 mL vorgewärmtem miniPERM-Medium befüllt und das Modul druckfrei verschlossen. Die Bioreaktoren wurden auf eine Drehvorrichtung im Inkubator gelegt. Diese rotierte in der ersten Woche bei 2,5 rpm und wurde anschließend auf 5 rpm beschleunigt. Das Medium im Versorgungsmodul wurde alle 3-4 Tage (spätestens jedoch nach dem Farbumschlag des pH-Indikators) abgegossen und durch frisches Medium ersetzt. Unter guten Wachstumsbedingungen erfolgte die erste Antikörperernte nach der 3. Kultivierungswoche und anschließend alle 10 Tage bis die Produktivität der Hybridomzellen nachließ. Dem Produktionsmodul wurden mit Hilfe einer Spritze 20 mL Kultur zur Lagerung entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Bei der letzten Ernte wurde die Gesamtheit der Kultur, sprich 40 mL abgenommen. Die geerntete Zellsuspension wurde in 50 mL Röhrchen zentrifugiert (10 min, 3000 rpm, RT), der antikörperreiche Überstand in neue Röhrchen überführt, nochmals zentrifugiert um Zellschutt abzutrennen (10 min, 5000 rpm), sterilfiltriert (0.22 µm-Filter) und bis zur Aufreinigung der Antikörper bei -20°C gelagert.

2.3.4 Anreicherung klonaler Zelllinien

Mischkulturen wurden durch limitierte Verdünnung zu Einzelzellklonen kloniert. Die absolute Zellzahl wurde zunächst mit der Neubauer Zählkammer ermittelt und die Zellen im entsprechenden Medium auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^3$ Zellen /mL verdünnt (1 Zelle/µL). Die Zellen wurden in 96-Loch-Platten so ausgesät, dass sich durchschnittlich je 50 Zellen pro Platte in 200 µL Volumen pro Loch befanden (50 µL Zellsuspension in 20mL Medium). Da Einzelzellen in Kultur in der Regel schlecht anwachsen, wurden sie hier in konditioniertem Medium kultiviert. Nach 2 bis 3 Wochen waren die Löcher der 96-Loch-Platten dicht, so dass die Klone expandiert werden konnten.

2.3.5 Herstellung von Zelllysaten für genomische PCR

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden 50 µL - 1 mL Zellmaterial ($1 \cdot 10^6$ Zellen /mL) durch Zentrifugation (5min, 2000 rpm, RT) geerntet und das Pellet in 100 µL NID-Puffer aufgenommen. Dem Gemisch wurde 1 µL Proteinase K (0,5 U/µL) zugegeben und ü.N. bei 56°C im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde die Probe 10 min lang auf 96°C erhitzt. Die heruntergekühlten Lysate wurden direkt in einer PCR-Reaktion eingesetzt und waren maximal eine Woche lang bei 4°C haltbar.

2.3.6 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Zellkulturen erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits und des QIAshredder Kits der Firma *Qiagen* und wurde gemäß der Arbeitsanleitung des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt. Die eluierte RNA wurde entweder bei 4°C aufbewahrt oder zur langfristigen Lagerung bei -80°C eingefroren. Nach spektrophotometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Integrität der RNA durch Elektrophorese in einem 0,8 % Agarosegel überprüft. Die Elektrophoresekammer wurde zuvor mit einer hochmolaren NaOH-Lösung von RNAsen gereinigt.

2.3.7 Transfektion eukaryontischer Zellen

Den Plasmidtransfer in eukaryontische Zellen nennt man Transfektion. In dieser Arbeit wurde neben der Elektroporation auch die Lipofektion angewendet. Diese Wahl beruht auf Daten, die in der Dissertation von S. Lüttgau (2004) publiziert wurden. Demnach konnten für die Elektroportation in B-Zell Hybridome Transfektionseffizienten von über 70% erzielt werden. Die Lipofektion fand lediglich für die Transfektion von HEK 293T Zellen Anwendung. Bei Transfektionen, die der transienten Expression der DNA dienen, wurde zirkuläre DNA verwendet. Zum Zweck der homologen Rekombination wurden die Plasmide zuvor linearisiert.
Durch Miteinführung von Selektionsmarkern (Zeo^R bzw. neo^R) konnte nach der Transfektion auf die Zellen selektiert werden, welche die Ziel-DNA tatsächlich aufgenommen hatten. Mit der Selektion wurde frühestens 48 h nach der Transfektion begonnen um die Expression der Resistenzvermittelnden Gene zu gewährleisten.

<u>Elektroporation von Hybridomen</u> (Potter *et al.* 1984, Baum *et al.* 1994)
Ähnlich der bakteriellen Transformation wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls kurzfristig permeabilisiert, so dass die DNA diese passieren kann. Zur Elektroporation wurden 18 µg DNA in vorgekühlte 4 mm-Küvetten gegeben. Pro Küvette wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen geerntet, 2x in Elektroporationspuffer gewaschen, dann in 400 µL

aufgenommen und in die Küvette gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Küvetten 10 min auf Eis inkubiert und dann im Elektrosquare Porator T 820 im LV Modus (*low voltage*) für 3 ms mit 1 Puls von 500 V elektroporiert. Danach wurden die Zellen möglichst schnell in 37°C warmes, konditioniertes Medium (10 mL/$1 \cdot 10^7$ Zellen) überführt. Die Kulturflaschen wurden die ersten 12 h stehend im Inkubator gelagert und anschließend flach hingelegt. Nach zwei Tagen konnten die Zellen im FACS-Analyser oder im FACS-Sorter analysiert werden. Bei Experimenten zur homologen Rekombination wurden standardmäßig $1 \cdot 10^9$ Zellen elektroporiert. Die Zellen wurden auf 50 Küvetten verteilt und der Versuch in zwei Durchläufen durchgeführt.

Lipofektion

Für Lipofektionen wurde das Reagenz Lipofectamine™ 2000 verwendet. HEK 293T Zellen wurden zu einer Konfluenz von 60 % in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 mL DMEM komplett-Medium ausgesät und einen Tag wachsen gelassen. Für die Transfektion wurden 7 µg sterile DNA des Zielplasmides mit 3 µg steriler DNA des Plasmides pZeo^R gemischt und zu einem Gesamtvolumen von 800 µL mit OPTI-MEM®-Medium aufgefüllt, gut vermischt und 5 min bei Raumtemperatur gelöst. pZeo^R verleiht der zu transfizierenden Zellline eine Zeocinresistenz und dient später der Positivselektion der Klone. Es wurde angenommen, dass die Zellen die beiden Plasmide gleichwahrscheinlich aufnehmen. Parallel wurden 30 µL Lipofectamine™ 2000 in 750 µL mit OPTI-MEM® Medium verdünnt und ebenfalls 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lipofectamin-Lösung Tröpfchenweise zur DNA-Lösung pipettiert, vorsichtig gemischt damit sich Komplexe bilden können und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reagenz wurde schließlich in die Zellkulturschale pipettiert und durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf den HEK 293T Zellen verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 4-5 h wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, durch 10 mL frisches DMEM komplett-Medium ersetzt und die Kulturschale zwei Tage im Inkubator wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann abtrypsiniert und auf 10 frische Kulturschalen verteilt. Sobald die HEK 293T Zellen an den Schalenboden adheriert waren, wurde in die Schalen eine ansteigende Verdünnungsreihe Zeocin zugegeben gegeben (Duplikate: 2x 50 µL, 2x 60 µL, 2x 70 µL, 2x 80 µL, 2x 90 µL, 2x 100 µL; 100 µg/mL Zeocin Stammlösung) um nicht-transfizierte Zellen abzutöten. Nach 2-3 Wochen hoben sich erste resistente Kolonien vom Zellrasen an toten Zellen ab. Diese wurden nach einer weiteren Woche als Einzelklone gepickt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und um die Kolonien ein kleiner Metallring gelegt, der mit Vaseline abgedichtet wurde. In die Ringe wurden 100 µL Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und nach einer kurzen Einwirkzeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Klone in eine 24-Loch-Platte mit warmem Medium umgesetzt und expandiert. Die Expression des Zielplasmides wurde durch einen ELISA Test bzw. eine RT-PCR nachgewiesen.

2.3.8 Austausch von Genkassetten im Genom

2.3.8.1 Homologe Rekombination (HR)

Als homologe Rekombination bezeichnet man einen Vorgang, bei dem ein exogenes DNA-Fragment ortspezifisch in das Genom einer eukaryontischen Zielzelle integriert wird. Hiervon unterscheidet man die unspezifische, nicht-homologe Integration die weitgehend zufällig geschieht. Das Verhältnis von homologer Rekombination (HR) zu nicht-homologer Rekombination kann in verschiedenen Spezies um mehrere Größenordnungen variieren. Bei Säugetierzellen wird die Häufigkeit der unspezifischen Integration auf 1 Zelle aus 10^2 bis 10^4 Zellen geschätzt und übertrifft somit das Ereignis der HR mit nur 1 Zelle aus 10^5 bis 10^7 Zellen (Vasquez *et al.* 2001) um ein Vielfaches. Die homologe Rekombination beruht auf der Paarung ausgedehnter $_{ds}$DNA-Sequenzen die sich durch ihre große Ähnlichkeit (Homologie) mit dem Zielgenom auszeichnen und über welche der auszutauschende Insertionslokus vorherbestimmt wird. Die eigentliche Rekombination wird durch DNA Reparaturenzyme der Zielzelle vermittelt und läuft meist nach folgendem Schema ab: Homologe DNA-Moleküle nähern sich parallel an, so dass die auszutauschenden Nukleotidsequenzen auf gleicher Höhe liegen. In einem komplexen Vorgang kommt es anschließend zur Kreuzung (*crossing-over*) und Neuverknüpfung der DNA-Stränge, wobei der Bruch und die Widerverbindung der DNA-Moleküle so präzise erfolgen, dass kein Nukleotid verloren geht. Die Rekombinationsfrequenz ist von der Länge der Homologiebereiche (Thomas und Capecchi 1987, Shulman *et al.* 1990) und der transkriptionellen Aktivität am Insertionsort, dem sog. Positionseffekt, (Nickoloff 1992) abhängig. Auch die Beschaffenheit der eingebrachten DNA beeinflusst die Rekombinationsrate. Lineare DNA begünstigt das Auftreten von homologer Rekombination gegenüber zirkulärer Plasmid-DNA. Letztere hingegen fördert vermehrt das Auftreten der unspezifischen Integrationen.

In dieser Arbeit wurde die homologe Rekombination dazu eingesetzt den endogenen Antikörperlokus von B-Zell Hybridomen zu modifizieren. Dazu wurde die einzubringende DNA mit Restriktionsendonukleasen linearisiert und jeweils 50x 18 µg sterile DNA mittels Elektroporation in die Zielzelle eingebracht (siehe Abschnitt 2.3.7). Positive Transfektanten wurden aufgrund ihrer Seltenheit mittels FACS Sortierung isoliert (siehe Abschnitt 2.5).

2.3.8.2 Spezifische Rekombination (SSR)

Der Gentransfer kann auch mittels Orts-Spezifischer Rekombination (*site specific recombination,* SSR) erfolgen. Bei Rekombinationsereignissen dieses Typs kommt es ähnlich wie bei der HR, zu einer Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Abschnitten über die Bildung einer transienten Holliday-Struktur. Rekombinationsereignisse dieses Typs verlaufen im Gegensatz zur HR über sehr kurze Erkennungsstellen, wie sie bei Hefen oder Phagen vorkommen und erfordern die Mitwirkung speziell adaptierter Enzyme, die allgemein als Rekombinasen bezeichnet werden. Wird der enzymatische Apparat auf Säugetierzellen übertragen, steht der Zelle ein äußerst effizientes System zur genetischen Modifikation zur Verfügung, welches der Homologen Rekombination in der Rekombinationseffizienz weit überlegen ist.
Zwei häufig verwendete Systeme dieser Klasse basieren auf dem Wirkungsmechanismus der Enzyme Cre und φC31. Cre wird aus dem Bakteriophagen P1 gewonnen, gehört zur Klasse der Tyrosin-Rekombinasen und rekombiniert DNA Moleküle an zwei identischen LoxP511 Sequenzen (Buchholz und Bishop 2001, Ghosh und Van Duyne 2002). Die φC31-Integrase des Phagen Streptomyces φC31 gehört zur Familie der Serin-Rekombinasen. Sie ermöglicht die Rekombination zwischen zwei nicht-identischen *attachment* Sequenzen, attP und attB, wobei chimäre Sequenzen erzeugt werden, attR und attL, die wiederum kein Substrat mehr für die φC31 Integrase sind. Daher ermöglicht dieses System eine gerichtete Integration (Thorpe und Smith 1998, Groth *et al.* 2000, Belteki *et al.* 2003, Ginsburg und Calos 2005).
Die Einführung der spezifischen Rekombinationsstellen ins Genom der Zielzellen erfolgte über homologe Rekombination. Bei der Positionierung der spezifischen Rekombinations-stellen ist darauf zu achten, dass keine Verschiebung im Leseraster entsteht. Die Rekombinasen können als Protein in die Zielzellen eingebracht werden oder als eukaryontische Expressionsplasmide transient in die Zielzellen eingeschleust werden. Die **Abb. 2.1** illustriert Möglichkeiten, die aus diesen Systemen resultieren.

2.3.8.3 Cre-vermittelte Deletion im Genom

Wie bereits im Abschnitt 2.3.2 erläutert, wurde zur Positivselektion von erfolgreich transfizierten Zielzellen das NPTII Gen (hier auch als neoR(-) bezeichnet) mitgeführt und im Genom der Zielzelle integriert. Die neo^R(-) Kassette wurde hierbei mit LoxP511 Erkennungsstellen für die Cre Rekombinase flankiert. Wenn zwei LoxP Stellen in gleicher Ausrichtung angeordnet sind, generiert die Cre Rekombinase aus der Sequenz zwischen den LoxP Stellen zirkuläre Episome. Dies bedeutet in Hinblick auf die behandelte Zelllinie, dass die Resistenz gegen Geneticin (G418) verloren geht.

Um neomycin Resistente Zelllinien zu behandeln, wurden die Zellen zuvor in Medium ohne G418 passagiert um Spuren der Chemikalie zu reduzieren. 5 mL Zellsuspension wurden dann mittels Elektroporation mit 21 µg des Plasmids piCre transfiziert (Abschnitt 2.3.7). piCre ist ein eukaryontischer Expressionsvektor für die Cre Rekombinase. Nach 1-2 Passagen in Medium ohne G418 Zusatz, wurden die Zellen kloniert (siehe Abschnitt 2.3.4). Von dichten Einzelklonen wurden 50 µL Zellsuspension zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Die korrekte Entfernung der neo^R-Kassette wurde per PCR auf genomischer DNA nachgewiesen. Klone, die mittels PCR als positiv identifiziert wurden, wurden expandiert und auf ihre Sensitivität auf G418 geprüft. Hierzu wurden die Zellen in G418-haltigem Medium kultiviert.

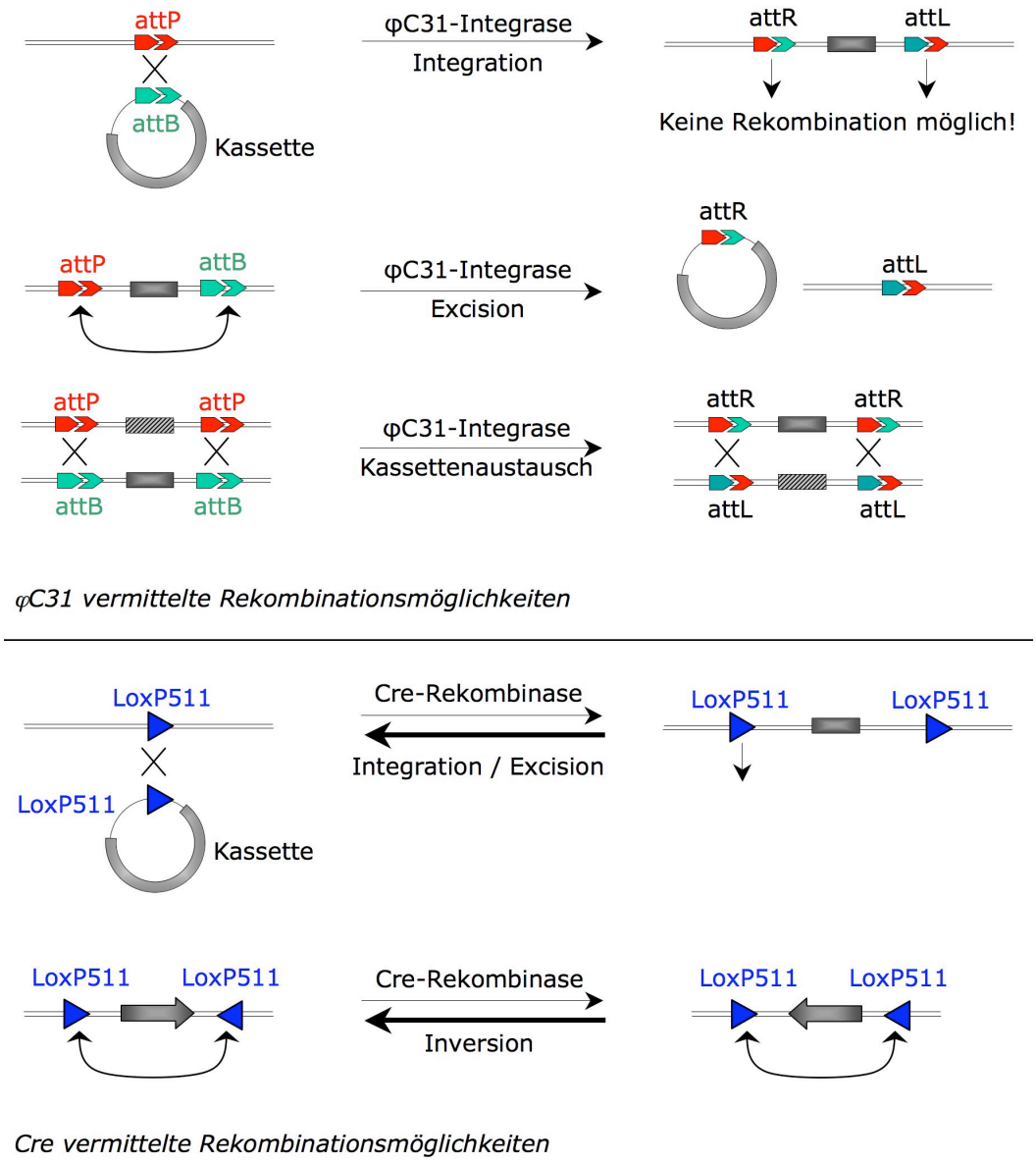


Abb. 2.1: Einsatzmöglichkeiten der φC31-Integrase bzw. Cre-Rekombinase vermittelten spezifischen Rekombination. *Attachment* Sequenzen *attP* und *attB* sind Erkennungsstellen der φC31-Integrase. Chimäre *attR* und *attL* Stellen sind Produkte der φC31-vermittelten Rekombination, sind aber kein Substrat mehr für die Reverse Reaktion. LoxP511 Sequenzen sind Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase und bleiben bei der Reaktion erhalten. Sie stehen der Cre Rekombinase somit für die Rückreaktion zur Verfügung.

2.4 Allgemeine Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-PAGE und Western-Transfer Experimente

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen sowie eine Analyse ihres Reinheitsgrades nach einer Aufreinigung. Die SDS-PAGE wurde nach Standardprotokollen unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Thomas und Kornberg 1975).
Der Größenstandard 10-250kDa Ladder Mix der Firma *New England Biolabs* ergab folgende Referenzen in kDa: 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 250.
Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau R250.
In Western-Transfer Experimenten wurden Proteine (bispezifische Antikörper) per Elektrotransfer im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitocellulosemembran wurden durch eine Behandlung der Membran mit Block-Puffer gesättigt. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen anti-His-Biotin bzw. GAHu-kappa-Biotin Antikörper (oder einer Kombination beider Antikörper) und einem sekundären Streptavidin-Peroxidase Konjugat. Sämtliche Antikörper wurden nach den Protokollen der Hersteller eingesetzt. Die Darstellung erfolgte auf einem Röntgenfilm nach Entwicklung mit ECL-Reagenz (*enhanced chemoluminescence*, SuperSignal West Pico).

2.4.2 Reinigung von Proteinen

2.4.2.1 Aufreinigung von Proteinen aus Kulturüberständen durch Säulenchromatographie

Im Zuge dieser Arbeit wurden ausschließlich Proteine aufgereinigt, die eine Poly-Histidin-Markierung von 8-10 Histidinen trugen. Dieser sog. Histidin-Tag ist sehr klein, interferiert kaum mit der Aktivität des Proteins und hat bei einem neutralen pH-Wert keine Ladung. Zur Reinigung bot sich die *Ni-NTA Superflow* Sepharose der Firma *Qiagen* an. Die Bindung von His-markierten Proteinen an Metallionenchelat-Matrices beruht auf zweierlei Wechselwirkungen. Zum einen bindet Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) Nickelionen über die vier chelatbildenden Stellen von NTA, zum anderen interagieren Histidinionen mit den Nickelionen (Na^{2+}). Immidazol ist eine aromatische Verbindung die Bestandteil der Aminosäure Histidin ist. Zur Elution wird sie im Überschuss zugegeben und verdrängt somit die zurückgehaltenen Proteine von der Säule.

Die Reinigung der Proteine erfolgte an der HPLC-Anlage ÄKTApurifier der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Die Anlage war mit folgenden Modulen ausgestattet: Box900, pH/C-900, UV-900, P-900, Frac-900. Zur Bedienung der Anlage stand die Software UNICORN zur Verfügung. Für die Aufreinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen wurden je nach gewünschtem Bettvolumen, entweder Superformance Säulen oder Pharmacia-Säulen (bei Volumina ≤ 1ml Sepharose) mit *Ni-NTA Superformance* Sepharose (Qiagen) gegossen. Sämtliche Pufferlösungen wurden hierzu mit doppelt deionisiertem Wasser angesetzt, filtriert (0,45 µm) und Entgast um den Einschluss von Luft im Säulenmaterial zu minimieren.
Die Reinigung erfolgte bei 16°C. Die Pumpen und sämtliche Leitungen wurden mit Ni-NTA Grundpuffer (GP) gefüllt und die oben genannten Säulen mit 5-10 Säulenvolumen äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen, wobei Zellkulturüberstände aus MiniPerm Reaktoren zuvor mit 1x Ni-NTA Mediumspuffer (MP) versetzt wurden um die Probe an die Pufferung der Säule anzugleichen. Um die unspezifische Bindung histidinhaltiger Mediumskomponenten an die Nickelmatrix zu vermeiden enthielt der Mediumspuffer 10 mM Imidazol zur Absättigung freier Histidine. Der Verlauf des Proteinflusses konnte über die Entwicklung der optischen Dichte bei 280nm verfolgt werden. Das ungebundene Protein (Gesamtprotein der Zelle) wurde als Durchfluss abgetrennt. Nachdem der OD_{280}-Wert wieder auf das Basislevel nach der Äquilibrierung gefallen war, erfolgte eine Vorelution mit 20mM Imidazol haltigem Ni-NTA Vorelutionspuffer (VP). Die schwache Imidazolkonzentration bewirkte die Elution von nur schwach bindenden, kontaminierenden Proteinen. Diese Proteine wurden ebenfalls über den Franktionssammler aufgefangen und später ggf. analysiert. Die Elution des eigentlichen Zielproteins erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von 250mM im Elutionspuffer (EP).

2.4.2.2 Umpufferung und Entsalzung der Proteine nach Aufreinigung

Die Umpufferung der gereinigten Proteine und die Beseitigung des Imidazols aus der Probe erfolgte über NAP™-5 bzw. NAP™-25 Säulen der Firma *Pharmacia Biotech* und wurde strikt nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Säulen beinhalten eine Sephadex®G-25 Matix. Die relevanten Fraktionen aus der Proteinreinigung wurden kombiniert. In einem ersten Schritt wurden die Säulen mit dem gewünschten Puffer äquilibiriert. Volumina bis zu 2,5 mL wurden auf NAP™-25 Säulen, Volumina bis 0,5 mL auf NAP™-5 Säulen aufgetragen, wobei Probenvolumina ggf. an diese Werte angeglichen wurden. Die Proteine wurden durch Zugabe von 3,5 mL bzw. 1 mL Zielpuffer eluiert.

2.4.2.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe und diente hier ausschließlich zu analytischen Zwecken. Das Säulenmaterial *Superdex 200* wird durch die kovalente Bindung von Dextran an hochgradig vernetzte, poröse Agarose-Beads hergestellt. Die Zusammensetzung dieser Matrix ermöglicht eine hohe Auflösung von Proteinen mit Molekulargewichten in der Größenordnung 10.000-600.000 Da.
Gelfiltrationsexperimente wurden an der HPLC Anlage ÄKTApurifier der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Vorgaben des mitgelieferten Datenblattes zur Beschaffenheit der Säule wurden berücksichtigt. Die Reinigung erfolgte bei 16°C. Die Pumpen und sämtliche Leitungen wurden mit Gelfiltrationspuffer (GF) gefüllt und die *Superdex 200 HR 10/30* Säule mit 5 Säulenvolumen äquilibriert. Als Gelfiltrationspuffer wurde ein 1x PBS Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt. Ausschlaggebend bei der Wahl des Puffers war die Pufferung der Proteinprobe. 100 µL Proteinlösung wurden auf die Säule aufgetragen, wobei die Probe zuvor filtriert wurde (0,45 µm Filter). Die unterschiedlichen Proteine oder Proteinfragmente wurden als 1 mL-Teilproben über den Fraktionssammler entnommen und die relevanten Fraktionen später mittels SDS-PAGE analysiert. Bei der Gelfiltration wurde die Ausgangsprobe mindestens um ein dreifaches verdünnt. Das Molekulargewicht der rückgewonnenen Proteine wurde anhand einer Standardreihe rechnerisch ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Referenzproteine Ovalbumin (43 kDa), BSA (67 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa) und Carboanhydrase (44,3 kDa) mit jeweils 2 mg/mL. Das Ausschlussvolumen V_A der Säule wurde durch Zugabe von 1mg/mL Blau Dextran ermittelt. Zur grafischen Darstellung der Standartreihe wurde das Molekulargewicht (logarithmische Skalierung) gegenüber dem Quotienten V_E/V_A (lineare Skalierung) aufgetragen, wobei V_E das Elutionsvolumen des Proteins V_E wiedergibt.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Der Proteingehalt wurde nach Abgleich eines Leerwertes am SmartSpec™ Plus bei einer Wellenlänge von 280 nm spektrophotometrisch bestimmt. Die Absorption bei 280 nm (OD_{280}) lässt sich nicht wie bei nukleinhaltigen Lösungen mittels eines Umrechnungsfaktors auf eine Konzentration umlegen. Sowohl die Größe als auch die Aminosäuresequenz des Proteins werden hier mit einbezogen und durch den sog. Extinktionskoeffizienten (K_{ex}) ausgedrückt. Bei einem K_{ex} von 1 entspricht eine OD_{280} von 1 ca. 1 mg/mL. Ansonsten gilt: Proteinkonzentration [mg/mL] = OD_{280} / K_{ex}. Die genauen K_{ex} von Proteinen wurden in dieser Arbeit über den web-basierten Service von Biology Workbench 3.2 ermittelt. IgG Antikörper haben meist einen K_{ex} um 1,35 während der Wert bei den bispezifischen Antikörperfragmenten zwischen 1,5 und 1,6 lag.

2.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen (auch FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) wurden an einem FACScan Gerät mit der Software CellQuest Pro (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert und ermöglicht die Analyse von Zelloberflächenmolekülen. Durch entsprechende *scatter gates* auf lebende Zellen wurden tote Zellen, Zellaggregate und zellulärer Debris ausgeschlossen. Durch Kombination geeigneter Färbereagenzien konnen gleichzeitig mehrere Moleküle auf der Oberfläche einer Zelle analysiert werden, vorausgesetzt die Farbstoffe unterschieden sich in ihren Emissionsspektren.

FACS-Analyse

$5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden geerntet, 1x in FACS-Puffer gewaschen, anschließend in 50-100 µL FACS-Medium mit den entsprechenden Erstantikörpern resuspendiert und 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Hierbei wurden FITC, PE, und Biotin-Konjugate jeweils mit einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Nach einem erneuten Waschgang mit FACS-Puffer wurde entweder ein weiterer Färbeschritt mit einem Zweitantikörper (bei Biotin-Konjugaten mit SA-POX 1:1000) eingeschoben, oder die Proben wurden in 100 µL PI-Medium (FACS-Medium; 1:1000 PI) aufgenommen und zur Analyse am FACScan Durchflußzytometer in FACS-Röhrchen überführt.

FACS-Sortierung

Zum Sortieren von Zellen erfolgten alle Färbeschritte unter sterilen Bedingungen. Auch die Antikörper enthaltenden Färbemedien wurden steril filtriert (0,45 µm-Filter). Die eingesetzte Zellzahl war hier sehr variabel und reichte bis zu $5 \cdot 10^9$ Zellen z.B. bei Transfektionen für die homologe Rekombination. In diesem Fall war das eingesetzte Volumen an Färbemedium 3 mL, die Zellen wurden zur Sortierung am FACSvantage Turbosorter in ca. 5 mL PI-Medium aufgenommen und mussten mit Hilfe eines Filterröhrchens filtriert werden um ein Verstopfen der Geräte-Düse zu verhindern. Die Sortierung erfolgte je nach gewünschtem Reinheitsgrad im *single-cell*, *purity*, oder *yield* Modus. Letzterer war bei Experimenten zur homologen Rekombination erforderlich. Sortierte Zellen wurden in FACS-Röhrchen mit 37°C warmem, konditioniertem Medium mit Gentamycin (1:100 µg/mL) sortiert und anschließend der Zellzahl entsprechend in Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturplatten überführt. Flaschen mit Suspensionszellen wurden die ersten 12 h stehend im Inkubator gelagert und dann flach hingelegt.

Eine Besonderheit der Sortierung von Proben aus einem Experiment für die homologe Rekombination war, dass die Zellen aufgrund der seltenen Ereignisse zu 100 Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Platte sortiert wurden damit sie besser anwachsen.

2.6 Experimente zur Analyse der Antikörperspezifität

2.6.1 Quantitative Bestimmung antikörperhaltiger Kulturüberstände im ELISA

Der ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein biochemisches Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in einer Probe. Hier wurde er zur Detektion von rekombinanten Antikörpern in den Überständen von Zellkulturen eingesetzt. Der ELISA-Test ermöglichte auch den Vergleich der Antikörper-Produktivitätsraten unterschiedlicher Klone.

Zur Durchführung des ELISA-Tests wurde zunächst die Oberfläche einer 96-Loch-Platte mit einem Erstantikörper beschichtet. Testplatten wurden mit 100 µL/Loch Antikörper (3 µg/mL) in Carbonatpuffer, ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden dann 3x gewaschen indem sie wiederholt dekantiert und mit 200 µL /Loch PBS/T 0,05 % gefüllt wurden. Die Platten wurden mit 200 µL/Loch Gelatinelösung gefüllt und entweder direkt für den Nachweis geblockt (1 h, 37°C) oder vor dem austrocknen geschützt und in Klarsichtfolie verpackt bei 4°C gelagert. Zum Probenauftrag wurde die Blockierungslösung dekantiert, die Löcher jeweils mit 100 µL des zu testenden Zellkulturüberstandes bzw. gereinigten Antikörpers (100 ng/mL) als Positiv- und Negativkontrollen befüllt und 1 h bei RT inkubiert. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurden 2 Löcher mit PBST 0,05 % versehen. Nach erneuten dreimaligen Waschen wurden 100 µL/Loch eines biotinylierten Zweitantikörpers (1:5000) zugegeben und die Platte erneut 1 h bei RT inkubiert. Der letzte Schritt wurde mit Zugabe von 100 µL/Loch eines mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (SA-POX, 1:10000) wiederholt (30 min, RT) und mit 3 Waschgängen abgeschlossen. Zur Substratreaktion wurde die Substratlösung zu 100 µL/Loch auf der Platte verteilt. Die Substratreaktion erfolgte unter Lichtausschluss und wurde je nach Fortschritt der Farbentwicklung nach 1-20 min durch Zugabe von 50 µL/Loch 2N H_2SO_4 (Stop-Lösung) gestoppt. Die Auswertung der biochemischen Reaktion erfolgte photometrisch am Titertek Multiscan Plus MKII Photometer durch Messung der Absorption bei 492 nm.

2.6.2 Bindungsexperimente an Zielzellen

Zur Untersuchung der spezifischen Bindefähigkeit wurden Zielzellen mit bispezifischen Antikörpern oder Kontrollantikörpern zusammengeführt. Analysiert wurde je nach Art des Antikörpers die Bindungsfähigkeit an die Zelllinien SKOV-3 (L1CAM$^+$, EpCAM$^+$), Colo205 (EpCAM$^+$) und Jurkat (CD3$^+$). Das Vorgehen entsprach einer normalen FACS-Färbung (siehe Abschnitt 2.5) mit der Besonderheit, dass die zu untersuchenden bispezifischen Antikörper hier als Erstantikörper eingesetzt wurden. Die Detektion erfolgte über einen FITC-markierten Sekundärantikörper (GAHu-kappa-FITC) im FACScan Durchflußzytometer. Die parentalen Antikörper HEA125, HuL1-9.3 bzw. chiHEA, chiL1-9.3 und OKT3 wurden gleichermaßen behandelt und zum Vergleich hinzugezogen. Über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) konnte eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die Bindungseigenschaften der bispezifischen Antikörper von denen der parentalen Antikörper abweichen.

2.6.3 Affinitätsvergleich

Anhand eines kompetitiven Bindungsexperimentes können die Affinitäten zweier Antikörper, die für dasselbe Antigen spezifisch sind, unmittelbar miteinander verglichen werden. Das Vorgehen entsprach einer normalen FACS-Färbung (siehe Abschnitt 2.5), mit dem Unterschied, dass hier unmarkierte und fluoreszenzmarkierte Antikörper als Kombination mit den Zielzellen gemischt werden. Von den beiden in ihrer Affinität zu vergleichenden Antikörpern (bispezifischer vs. parentaler Antikörper) wird jeweils eine Verdünnungsreihe von 100 µL/Loch in einer 96-Loch-Platte vorgelegt (geometrische Verdünnungsreihe; 200 µg/mL bei bsAk; 400 µg/mL bei Parentalantikörpern). Mit diesen Antikörpern wurde der kompetitierende, fluoreszenzmarkierte Antikörper gemischt. Es wurden jeweils 50 µl FITC-markierter Parentalantikörper mit einer konstanten Konzentration eingesetzt. Die Zielzellen wurden in FACS-Medium resuspendiert, je 50 µl zu der Antikörpermischung gegeben und alles 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2x wie oben beschrieben mit FACS-Medium gewaschen, in 100 µL PI-Medium (FACS-Medium; 1:1000 PI) aufgenommen und zur Analyse am FACScan Durchflußzytometer in FACS-Röhrchen überführt. Relevant war hierbei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FITC-positiven Zellen in den unterschiedlichen Antikörperverdünnungen.

3 ERGEBNISSE

Die monoklonalen Maushybridomantikörper HuL1-9.3 und HEA125 binden mit hoher Affinität an ihre jeweiligen Zielantigene L1CAM und EpCAM. Da diese auf humanen Karzinomen gegenüber gesundem Gewebe stark überexprimiert werden, sind beide Antikörper ggf. als Therapeutikum geeignet. Um die klinische Wirksamkeit von HuL1-9.3 und HEA125 zu verbessern und die Immunogenität der Antikörper zu verringern, sollen die beiden Antikörper zum einen in ein bispezifisches Format konvertiert werden und zum anderen in weiten Teilen humanisiert werden.
Zur Chimärisierung eines Antikörpers murinen Ursprungs, werden die konstanten Domänen von schwerer und leichter Kette gentechnologisch durch äquivalente humane Sequenzen ersetzt. Hierbei bleiben die variablen Antikörperdomänen und somit auch die Bindungseigenschaften des parentalen murinen Antikörpers erhalten (Lüttgau 2004).
Zur Herstellung bispezifischer Antikörper kommen diverse Antikörperformate in Frage (Kapitel 1.4.2). Die Größe von bispezifischen Antikörpern ist für ihre therapeutische Wirkung maßgeblich. Herkömmliche bispezifische Antikörper, die über chemische Kreuzvernetzung oder Quadrom-Technologie hergestellt werden sind meistens zu groß (>150 kDa), während kleinere Formate, wie z.B. $(scFv)_2$ eine geringe Halbwertszeit haben. In der vorliegenden Arbeit wird ein Antikörperformat erprobt, bei dem ein scFv-Antikörper an das Fab-Fragment eines weiteren Antikörpers fusioniert wird (Fab x scFv; **Abb. 3.1**). Das Molekulargewicht solcher Fusionsproteine liegt mit 75-80 kDa über der Ausschlussgrenze der Niere. Es kann daher eine bessere Eindringtiefe in Tumore, und folglich eine größere Wirksamkeit gegen Karzinome erwartet werden.
Das Endziel der Dissertation ist die Etablierung eines standardisierten Produktionsverfahrens für bispezifische Antikörper in Hybridomen. Dies soll an der Herstellung zweier kleiner bispezifischer Antikörper - anti-EpCAM x anti-CD3 bzw. anti-L1CAM x anti-CD3 gezeigt werden. Als Tumor-spezifischer Arm soll analog zu **Abb. 3.1**, das Fab-Fragment eines chimärisierten anti-EpCAM bzw. anti-L1CAM Antikörpers dienen, während der andere Arm ein disulfidbrückenstabilisierter anti-CD3 Antikörper sein soll, der allein durch die Bindung an CD3 zytotoxische T-Zellen aktivieren kann (Kapitel 1.4.1). Der resultierende bispezifische Antikörper besitzt keine konstanten CH2 und CH3-Domänen mehr, und ist somit deutlich kleiner als die von Quadromen produzierten bispezifischen Antikörper.

Ausgehend von einem chimärisierten anti-EpCAM (chiHEA125) bzw. anti-L1CAM (chiL1-9.3) Antikörper und einem synthetisch hergestellten dsFv-Fragment (disulfidbrückenstablisierter scFv-Antikörper) eines anti-CD3 Antikörpers (OKT3) sollen ein $_{Fab}HEAx_{dsFv}OKT3$ bzw. $_{Fab}L1x_{dsFv}OKT3$ bispezifischer Antikörper generiert werden.

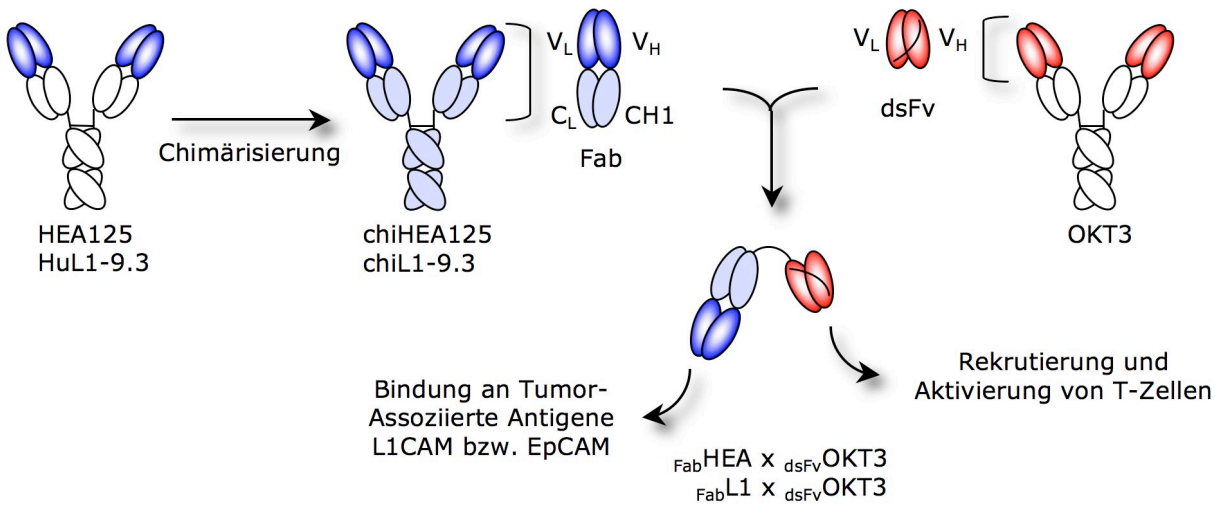


Abb. 3.1: Herstellung bispezifischer Antikörper in Hybridomen. Monoklonale Antikörper murinen Ursprungs werden mittels homologer Rekombination in ihren konstanten Domänen humanisiert (Lüttgau 2004). Der resultierende chimäre Mensch/Maus Antikörper dient als Ausgangspunkt für die Generierung bispezifischer Antikörper. Der chimärisierte monoklonale Antikörper liefert als Fab-Fragment den Tumor-spezifischen Anteil. Der dsFv-Antikörper basiert auf der Sequenz des monoklonalen anti-CD3 Antikörpers OKT3 und wird mittels Gensynthese hergestellt. VL, Variable Domäne der leichten Kette; VH, Variable Domäne der schweren Kette; CL, konstante Domäne der leichten Kette; CH1, Erste konstante Domäne der schweren Kette; dsFv, disulfidbrückenstabilisierter *single-chain* Antikörper; Fab, Antigenbindendes Fragment; HEA125, monoklonaler Antikörper (murin) gegen EpCAM; HuL1-9.3, monoklonaler Antikörper (murin) gegen L1CAM; OKT3, monoklonaler Antikörper (murin) gegen CD3; chiHEA125 und chiL1-9.3, chimäre Mensch/Maus Varianten von HEA125 und L1-9.3.

Hybridome eignen sich aufgrund ihrer hohen Antikörperproduktionsraten als Produktionssystem. Ihr Nutzen zur Produktion rekombinanter Antikörper wurde in unserer Abteilung bereits beschrieben (Lüttgau 2004) und wird in der vorliegenden Arbeit für die Expression bispezifischer Antikörper untersucht.

Zur Synthese der bispezifischen Fusionsproteine in Hybridomen wird der aktive Antikörperlokus der Hybridomzelllinien HuL1-9.3 und HEA125 neu gestaltet. Dadurch bleibt der genomische Kontext, der in Hybridomen zu hohen Antikörperproduktionsraten führt, erhalten. Der genetische Umbau der Hybridomlinien erfordert ein zielgerichtetes Transfektionsverfahren. Es werden daher zwei grundlegende Strategien verfolgt: die **homologe Rekombination** (**HR**) und die **enzymvermittelte spezifische Rekombination** (**SSR,** *site specific recombination*). Beide Verfahren beruhen auf der Eigenschaft von Hybridomzellen, Antikörper in Form des B-Zell Rezeptors auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dieses *mammalian display* dient in unserem System zur Selektion positiv transfizierter Zellen. Die Entfernung der konstanten Domänen (CH2 und CH3) bei der Herstellung der bispezifischen Antikörper (Fab x dsFv) unterbindet das alternative Splicen, welches zur membranständigen Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche führt. Bispezifische Antikörper würden in diesem Fall nicht mehr auf der Oberfläche der Hybridomzellen präsentiert, so dass der gewünschte bispezifische Antikörper nicht direkt als Konsequenz der Rekombinationsereignisse isoliert werden kann. Aus diesem Grund soll das Endziel der Dissertation über mehrere Teilschritte, wie

in **Abb. 3.2** dargestellt, erreicht werden.

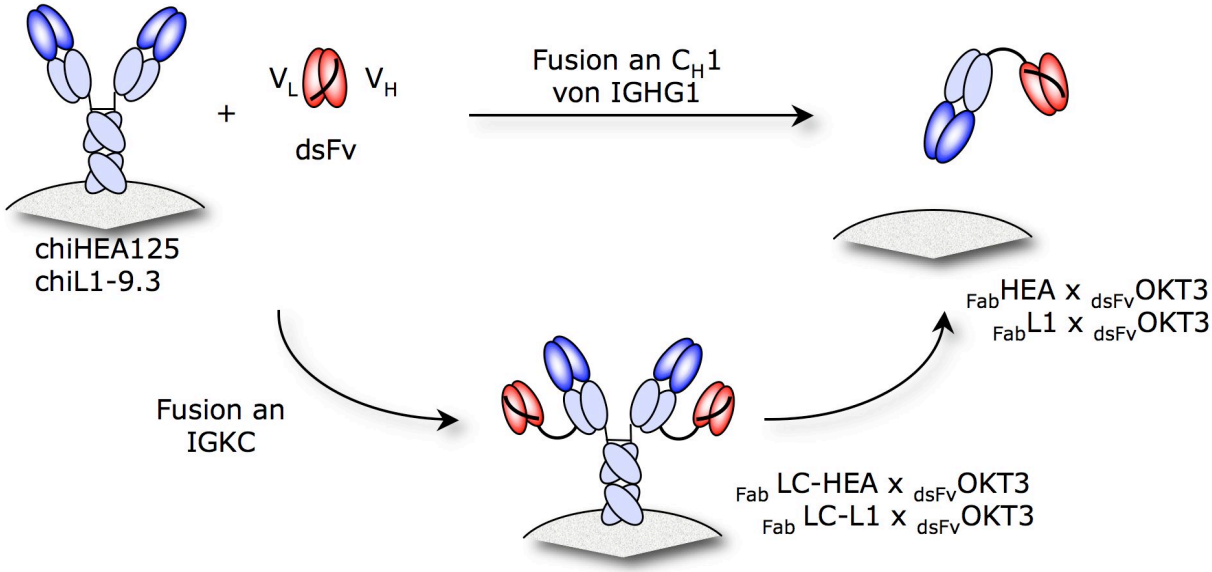


Abb. 3.2: Verlust der Oberflächenexpression auf Hybridomen. Antikörper murinen Ursprungs werden als B-Zell Rezeptor auf der Oberfläche von Hybridomen präsentiert. Bei der Herstellung bispezifischer Antikörper durch Fusion von dsFv-Fragmenten an die CH1 Domäne der schweren Kette geht die Oberflächenexpression verloren. Der Zwischenschritt über die Fusion von dsFv-Fragmenten an die konstante Domäne der leichten Kette (IGKC) ermöglicht die Optimierung des Screening-Verfahrens und die Evaluierung des dsFv Fusionspartners. dsFv, disulfidbrückenstabilisierter single-chain Antikörper; Fab, Antigenbindendes Fragment; chiHEA125 und chiL1-9.3, chimere Mensch/Maus Varianten von HEA125 und L1-9.3; IGKC, konstante Domäne der leichten Kette; IGHG1, schwere Kette des IgG1 Isotyps.

Im ersten Teil der Dissertation wird ein Verfahren beschrieben, bei dem der anti-CD3-Anteil an die konstante Domäne der leichten Kette fusioniert wird, wobei die schwere Antikörperkette unverändert vorliegt. Das resultierende bispezifische Antikörperformat entspricht nicht dem Endziel der Dissertation, sondern dient vielmehr der Etablierung der Transfektionsverfahren und der Evaluierung der synthetischen dsFv-Anteile.
Basierend auf den Erkenntnissen dieser Studien, soll anschließend die Fusion an die CH1 Domäne der schweren Kette vollzogen werden, die in dem sezernierten Fab x dsFv Antikörper resultiert. Die Methoden der homologen (HR) und spezifischen Rekombination (SSR) werden sowohl für die Fusion an die leichte Antikörperkette, als auch für die Fusion an die schwere Antikörperkette etabliert.

Die in dieser Arbeit erprobten Produktionswege und bispezifischen Antikörperformate sind in **Abb. 3.3** zusammenfassend dargestellt.

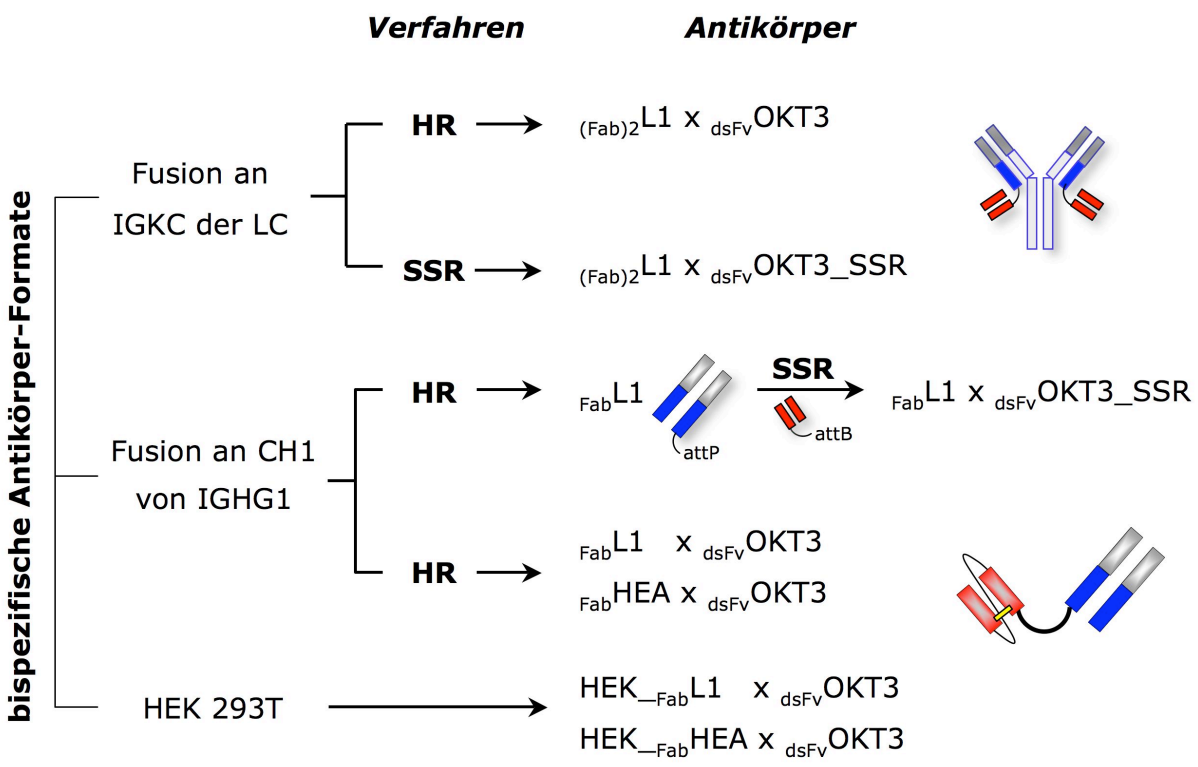


Abb. 3.3: In dieser Arbeit erprobte Produktionswege und Transfektionsverfahren für bispezifische Antikörper. Bispezifische Antikörper werden per SSR und HR produziert. Der single-chain Antikörper kann dabei entweder an die konstante Domäne der leichten Kette (IGKC) fusioniert werden wobei eine hochmolekulare Antikörpervariante entsteht, oder direkt an die CH1 Domäne der schweren Kette (IGHG1) fusioniert werden. SSR, enzymvermittelte spezifische Rekombination (*site specific recombination*); HR, homologe Rekombination.

3.1 Fusion an die leichte Antikörperkette

Bispezifische Antikörper wurden hier durch die Fusion von CD3-spezifischen dsFv-Antikörpern ($_{dsFv}$OKT3) an die leichte Antikörperkette hergestellt. Zeitgleich wurde die konstante Domäne der leichten Kette humanisiert.

3.1.1 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels Homologer Rekombination

3.1.1.1 Methodischer Hintergrund zur Homologen Rekombination

Hybridomlinien präsentieren monoklonale Antikörper murinen Ursprungs auf ihrer Oberfläche. Grund dafür ist das alternative Splicen, das bei der Proteinbiosynthese zwei Antikörpervarianten hervorruft; eine sezernierte sowie eine membranständige Form. Die Zellen sezernieren einen Großteil der produzierten Antikörper ins umgebende Medium, der Rest wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Der Nachweis der Antikörper kann also sowohl über die sezernierten als auch über die membrangebundenen Antikörper geführt werden.

In unserer Abteilung wurde ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht den aktiven Antikörperlokus von Hybridomzellen gezielt zu verändern. Grundlage hierfür ist die homologe Rekombination und die Fähigkeit von Hybridomzellen, Antikörper membrangebunden zu exprimieren (Selektion der gewünschten Mutation mittels FACS).

Die homologe Rekombination tritt bei allen Organismen auf, ihre Frequenz variiert jedoch sehr stark. Bei Säugetierzellen ist dieses Ereignis allerdings sehr selten. Die Technik der homologen Rekombination konnte in unserer Abteilung auf Hybridomzelllinien angewendet werden. Sie wurde ursprünglich zur Chimärisierung von Hybridomzellen eingesetzt. Als erste Linie wurde das Hybridom HEA125 in seinen konstanten Antikörperdomänen humanisiert, die einen monoklonalen anti-EpCAM Antikörper produziert. Das sehr seltene homologe Rekombinationsereignis - *ca. 1 Zelle aus 10^7 bis 10^8 Zellen* - wurde im FACS durch Anfärbung der chimärisierten Antikörper auf der Zelloberfläche (chiHEA125) mit anti-humanen Antikörpern nachgewiesen und im Zellsorter isoliert. Die homologe Rekombination geschieht zwischen definierten Homologiearmen, die mit identischen Sequenzen im murinen Zielgenom paaren und die dazwischen liegende Transfektionskassette mit der Originalsequenz im Genom austauschen. Bei der Chimärisierung beinhaltet die Transfektionskassette die Gene der humanen konstanten Domänen der schweren (*Hinge*, CH1, CH2, CH3, kurz **IGHG1**) oder leichten Antikörperketten (C_{kappa}, kurz **IGKC**) inklusive ihrer Introns. Da die HR ein so seltenes Ereignis ist, ist es unwahrscheinlich, dass in einer Zelle gleichzeitig schwere und leichte Kette ausgetauscht werden. Aus diesem Grund erfolgen die Reaktionen nacheinander. Als Standard wurde festgelegt, dass zuerst die leichte Kette und in einem

zweiten Durchgang die schwere Kette chimärisiert wird. Das Prinzip der Chimärisierung durch HR und die eingesetzten Plasmide sind von S. Lüttgau (2004) ausführlich dokumentiert worden und wurden im **ANHANG III** zusammengefasst. Dieses Verfahren soll nun für die Herstellung bispezifischer Antikörper in Hybridomen optimiert werden.

3.1.1.2 Klonierung von Plasmiden zur HR im Kappa Lokus von Hybridomen

Der Antikörper dsFvOKT3

Immuneffektorzellen sollen über das CD3 Molekül des T-Zell Rezeptors zum Tumor rekrutiert werden und nach erfolgter Bindung an den Tumor aktiviert werden. OKT3 ist ein monoklonaler anti-CD3 Antikörper murinen Ursprungs, der die ε-Untereinheit des CD3 Komplexes erkennt. Die Sequenzen des Antikörpers sind bekannt und wurden zur Gestaltung des *single-chain* Antikörpers dsFvOKT3 zugrunde gelegt. Da uns kein eigenes rekombinantes anti-CD3 Konstrukt zur Verfügung stand, wurde die entsprechende dsFv-Sequenz zur Synthese an die Firma GeneArt in Auftrag gegeben. Der dsFvOKT3 Antikörper besteht aus den variablen Domänen der schweren (IGVH OKT3) und leichten Antikörperkette (IGVL OKT3) von OKT3. Diese sind über einen myc-Linker (PAGGSGGEQKLISEEDL) wie folgt miteinander verknüpft:

IGVH OKT3 - Linker - IGVL OKT3

Die Stabilität des dsFvOKT3 Antikörpers wurde durch den Einbau einer künstlichen Disulfidbrücke zwischen beiden variablen Domänen erhöht (Brinkmann *et al.* 1993). Dazu wurde in IGHV OKT3 die Aminosäure Glycin (G) an der Position 44 durch ein Cystein ersetzt. Analog wurde in IGVL OKT3 die Aminosäure Serin (S) an der Position 99 durch ein Cystein ersetzt.

Plasmide zur Fusion von dsFv-Fragmenten an die leichte Kette per HR

Die Sequenz von dsFvOKT3 wurde im Plasmid pHuKappa (P1, Anhang III) hinter die konstante Domäne der humanen leichten Kette (IGKC) kloniert (**Abb. 3.4**). Um bei der Klonierung möglichst wenig in der IGKC Sequenz zu verändern, wurde zusätzlich eine Teilsequenz von IGKC (Basen 216-321) bei der Synthese durch die Firma Geneart eingefügt. Hierbei wurde das 5′ Ende der dsFvOKT3 Sequenz über einen Linker direkt an das 3′ Ende von IGKC fusioniert. Der *attP*-Linker zwischen IGKC und dsFvOKT3 (*DPTPPTERTQRLPQLG*HHHHHHTS) enthält ein Histidin-Tag (unterstrichen) und kodiert zudem auf DNA-Ebene für die *attachment P* (*attP*) Stelle, deren Nutzen im Abschnitt 3.1.2 erläutert wird. Aus klonierungstechnischen Gründen wurde an das 3′ Ende der dsFvOKT3 Sequenz per Gensynthese auch ein Stück der Maus flankierenden Region angefügt. In diese Region wurde die für Abschnitt 3.1.2 relevante *attP* Stelle erneut eingebaut. Die dsFvOKT3 Sequenz wurde über die Restriktionsenzyme *Blp*I und *Not*I aus dem Plasmid pDsFvOKT3 (Plasmid der Firma Geneart) in das Plasmid pHuKappa kloniert.

Der entstehende Vektor **p(Fab)$_2$-dsFvOKT3** (P3) enthält nun den vollständigen Satz an Genen, um die Fusion von dsFvOKT3 an IGKC über homologe Rekombination zu ermöglichen. D.h. die Genkassette IGKC-dsFvOKT3 wird flankiert von ca. 3000 bp Maus flankierenden Sequenzen, die homolog zum endogenen Antikörperlokus sind.

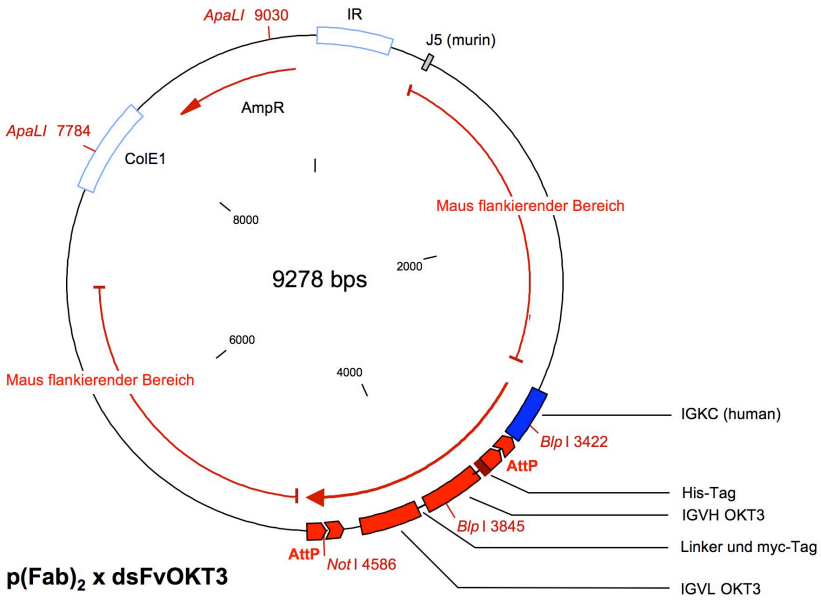


Abb. 3.4: Plasmidkarte des Plasmides p(Fab)$_2$xdsFvOKT3 (P3). Das Plasmid ist von Plasmid pHuKappa (Anhang III) abgeleitet. Es enthält die humane IGKC Domäne, an die der disulfidbrückenstabilisierte dsFvOKT3 Antikörper fusioniert wurde (IGVH OKT3 – Linker – IGVLOKT3). AttP, *attachment* P Stellen für die spezifische Rekombinase PhiC31; IR, *intergenic region*; ColE1, *origin or replication*; AmpR, Ampicillin Resistenzgen.

3.1.1.3 Durchführung der Homologen Rekombination

Da linearisierte DNA häufiger zu einem Austausch von DNA durch homologe Rekombination führt, wurde das Plasmid p(Fab)$_2$xdsFvOKT3 mit dem Enzym *ApaL*1 verdaut, welches im pBS II SK (+) basierten Plasmid zweimal außerhalb der Maus flankierenden Regionen schneidet. Das Einschleusen der linearisierten, doppelsträngigen DNA erfolgte durch Elektroporation. Die Transfektionsbedingungen wurden wie in S. Lüttgau (2004) beschrieben übernommen. Die bei der Optimierung ermittelte Transfektionseffizienz lag bei ca. 70% der lebenden Zellen. Die genaue Vorgehensweise wurde in Abschnitt 2.3.7 beschrieben.

Insgesamt $5 \cdot 10^8$ HuL1-9.3 Zellen wurden mit 900 µg linearisierter p(Fab)$_2$xdsFvOKT3 Plasmid-DNA transfiziert. Diese Zellzahl entspricht einem Volumen von ca. 500 mL Suspensionskultur. Pro Elektroporationsküvette wurden 10^7 Zellen (aus 10 mL Kultur) mit 18 µg DNA eingesetzt. Der Gesamtansatz betrug 50 Elektroporationen. Bei einer Transfektionseffizienz von ca. 70% und einer homologen Rekombinationsfrequenz von 1 zu 10^8 Zellen waren bei der Transfektion nur ca. 4-5 positive Zellen zu erwarten. Um das Überleben der positiven Zellen nach dem Sortieren im FACS zu gewährleisten, wurden

die Zellen in Pools von 100 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte sortiert und ca. eine Woche kultiviert. Da beim Heranwachsen nie alle Zellen gleichmäßig proliferieren und einige absterben, kann das Verhältnis von positiven zu negativen Zellen in einem Pool unterschiedlich ausfallen. Eine Vielzahl von Pools erwies sich hierbei als komplett negativ. Der Screen nach positiven Pools erfolgte mittels ELISA. ELISA-Platten wurden hierzu mit einem polyklonalen GAHu-IgG (H+L) Antikörper beschichtet. 50-100 µL Kulturüberstände aus dichten Pools wurden in die Platte gegeben. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten, polyklonalen GAHu-kappa Antikörper (GAHu-kappa-POX) und anschließender Zugabe der Substratlösung.
Eine Übersicht über den Versuchsablauf auf genomischer Ebene ist in **Abb. 3.5** dargestellt.
Der erste Transfektionsschritt mit dem Plasmid p(Fab)$_2$xdsFvOKT3 wurde dreimal unter Standardbedingungen wiederholt. Es konnten nach der FACS-Sortierung und anschließendem ELISA jedoch keine positiven Zellen identifiziert werden.
Mehrere Schlussfolgerungen können aus diesen Ergebnissen gezogen werden. Der *single-chain* Antikörper wird hier zum ersten Mal eingesetzt und verhält sich in den Zellen unter Umständen toxisch, was zum Zelltod führen kann. Da die homologe Rekombination jedoch ein sehr seltenes Ereignis ist, erfolgt die Detektion positiver Klone ausschließlich mittels Zellsortierung. Daher ist diese Hypothese nicht verifizierbar. Eine zweite mögliche Erklärung ist die Proteingröße. Das Anfügen eines *single-chain* Antikörpers an die leichte Antikörperkette des Hybridoms HuL1-9.3 bewirkt eine Erhöhung des Molekulargewichtes von ca. 154 kDa auf 210 kDa. Ein Antikörper dieser Größe ist möglicherweise nicht auf konventionellem Weg sezernierbar und verweilt eventuell im Zytosol oder in der Zellembran. Da Hybridome sehr hohe Antikörperexpressionsraten haben, würde der bispezifische Antikörper zu toxischen Konzentrationen akkumulieren und ebenfalls zum Zelltod führen.
Die in diesem Ansatz angestrebte Zelllinie und der Antikörper, der hieraus resultieren sollte erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie	chiL1-9.3 K-dsFvOKT3
Antikörper	$_{(Fab)2}$L1x$_{dsFv}$OKT3

In einem neuen Ansatz wurde daher getestet, ob der bispezifische Antikörper (Fab)$_2$x$_{dsFv}$OKT3 mittels spezifischer Rekombination hergestellt werden kann.

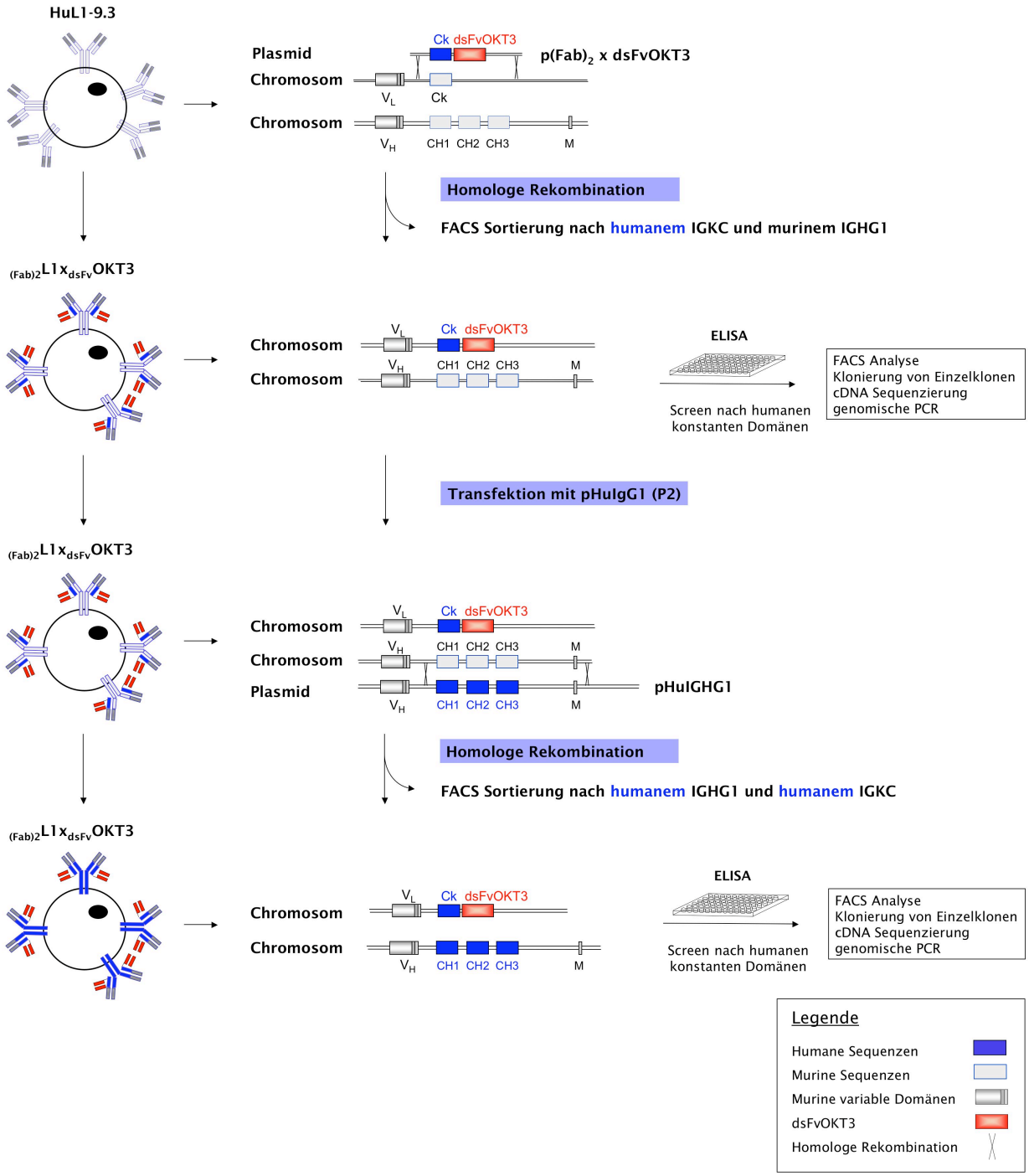


Abb. 3.5: Reorganisation des Antikörperlokus der leichten Kette durch homologe Rekombination (HR). Die Gene für schwere und leichte Antikörperketten sind auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Gene der Maus sind als graue Boxen dargestellt, humane Gene als blaue Boxen. In einer ersten Transfektion mit dem Plasmid p(Fab)2 x dsFvOKT3 (P3) wird der Lokus der leichten Kette verändert. Dabei wird das murine IGKC Gen (kurz Ck) durch das Fusionsprodukt aus humanem IGKC und dem *single-chain* Antikörper (kurz Ck-dsFvOKT3) ersetzt. Zellen werden nach der homologen Rekombination im FACS-Sorter durch differentielles Anfärben mit anti-human-Kappa Antikörpern (GAHu-kappa-FITC) bzw. anti-Maus-IgG1 Antikörpern (GAM-IgG1-PE) in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert. Positive Zellen durchlaufen einen zweiten Transfektionsschritt mit dem Plasmid pHuIgG1 (P2). Hierbei werden im Lokus der schweren Antikörperkette die murinen Gene für CH1, *Hinge*, CH2 und CH3 durch die entsprechenden humanen Gene ersetzt. Positive Zellen werden nach erfolgter homologer Rekombination erneut durch differentielles Anfärben mit anti-human-Kappa Antikörpern (GAHu-kappa-FITC) bzw. anti-human-IgG1 Antikörpern (GAHu-IgG1-PE) in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert.

3.1.2 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels spezifischer Rekombination

3.1.2.1 Methodischer Hintergrund zur PhiC31-vermittelten Integration

Bei der spezifischen Rekombination erfolgt der Austausch von DNA-Sequenzen zwischen kurzen Erkennungsstellen und erfordert im Gegensatz zur HR die katalytische Aktivität von speziellen Rekombinasen. Die φC31-Integrase des Phagen Streptomyces φC31 gehört zur Familie der Serin-Rekombinasen. Sie ermöglicht die Rekombination zwischen zwei nicht-identischen *attachment* Sequenzen, *attP* und *attB*, wobei die chimären Sequenzen *attR* und *attL* erzeugt werden, die ihrerseits kein Substrat mehr für die φC31 Integrase sind. Daher ermöglicht dieses System eine gerichtete Integration. Der allgemeine Mechanismus ist in **Abb. 2.1** dargestellt und wurde im Kapitel 2.3.8 genauer beschrieben.
Das System der SSR wurde verwendet, um dsFv-Fragmente in den endogenen Antikörperlokus von Hybridomzellen einzubringen. Die Integration erfolgte über *attP* und *attB* Sequenzen, wobei sich die *attP* Stellen im Genom des Hybridoms und die *attB* Stellen auf den einzubringenden Plasmiden befanden.

Um mittels SSR bispezifische Antikörper zu erhalten, mussten folgende Vorarbeiten geleistet werden:

- Herstellung einer Empfängerlinie, deren Antikörperlokus mit den Erkennungsstellen für die φC31 Integrase ausgestattet ist
- Klonierung von Plasmiden die über spezifische Rekombination in die Empfängerlinie eingebracht werden.
- Klonierung eines Vektors für die Expression der φC31 in Säugetierzellen
- Optimierung der φC31 Effizienz mit Hilfe eines Reportersystems

3.1.2.2 Herstellung einer Empfängerlinie mit Erkennungssequenzen für die φC31-Integrase

Um dsFvOKT3 Fragmente über spezifische Rekombination gezielt in den Antikörperlokus der leichten Kette einzubringen, muss das Genom der Hybridomlinien zuvor mit den erforderlichen Erkennungsstellen der φC31 Integrase ausgestattet werden. Als Konsens für die SSR wurde festgelegt, dass *attP* Stellen in das Genom eingebracht werden und die Plasmide für die φC31-vermittelte Integration als Gegenstück *attB*-Sequenzen tragen. Die Integration der *attP*-Sequenzen in das Genom der Hybridomzellen erfolgte mittels homologer Rekombination analog zu der in Abschnitt 3.1.1.3 beschriebenen Vorgehensweise.

Zunächst wurde ein Austauschvektor kloniert, in dem die *attP*-Sequenz an die konstante Domäne der leichten Kette (IGKC) fusioniert wurde. Als Grundvektor wurde das Plasmid pHuKappa (P1, Anhang III) mit den Restriktionsenzymen *Blp*I und *Not*I linearisiert. Die Sequenz der *attP* Stelle wurde mittels PCR mit den Primern O1 und O2 aus dem Plasmid p(Fab)$_2$ x dsFvOKT3 (P3) amplifiziert und dabei mit den Erkennungsstellen für *Blp*I und *Not*I flankiert. Das PCR Produkt wurde in den linearisierten Grundvektor ligiert und resultierte in dem in **Abb. 3.6** dargestellten Plasmid **pHuKappa-*attP*** (P4).

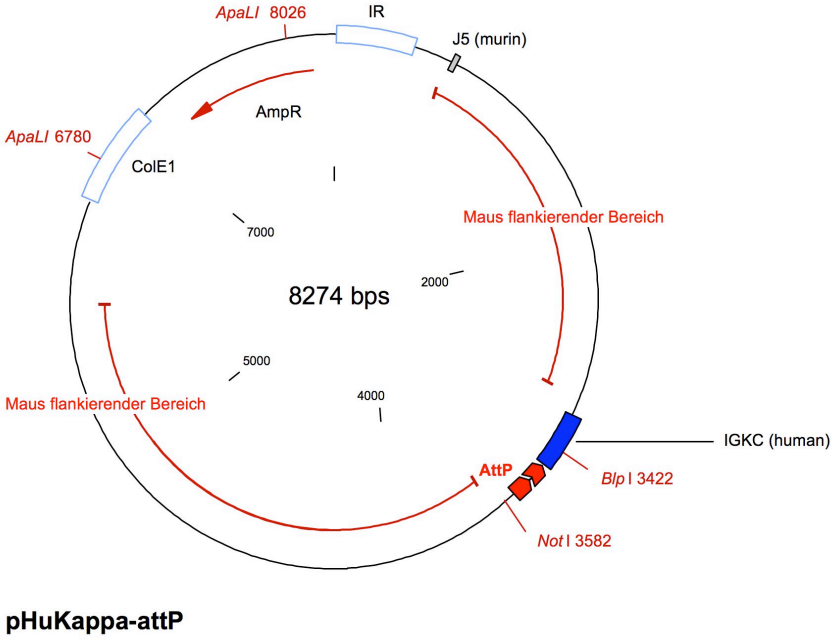


Abb. 3.6: Plasmidkarte des Plasmides pHuKappa-*attP* (P4). Das Plasmid dient zur homologen Rekombination im Lokus der leichten kappa-Antikörperkette. Es ist vom Plasmid pHuKappa (Abb. 3.4) abgeleitet, welches zur Chimärisierung von Maushybridomantikörpern eingesetzt wird. Es enthält die humane IGKC Domäne, an die Erkennungssequenz *attP* der φC31 Integrase fusioniert wurde. IR, *intergenic region*; ColE1, *origin or replication*; AmpR, Ampicillin Resistenzgen.

pHuKappa-*attP* wurde wie in **Abb. 3.7** dargestellt zur homologen Rekombination in der Hybridomzellline HuL1-9.3 eingesetzt. 900 µg linearisierter pHuKappa-*attP* DNA wurden mittels Elektroporation in $5 \cdot 10^8$ HuL1-9.3 Zellen transfiziert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination präsentierten die sehr seltenen Transfektanten chimäre Mensch/Maus Antikörpermoleküle auf ihrer Zelloberfläche. Durch Anfärben dieser Zellen mit einer Kombination aus GAHu-Kappa-PE und GAM-IgG-FITC Antikörpern wurden doppelt-positive Zellen mit dem FACS Gerät als 100er Pools in eine 96-Loch Platte sortiert. Zugleich wurde die parentale Zelllinie HuL1-9.3 als einfach-positive (FITC positive) Population automatisch herausselektiert. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumjodid (PI) angefärbt um beim Sortieren ebenfalls eliminiert.

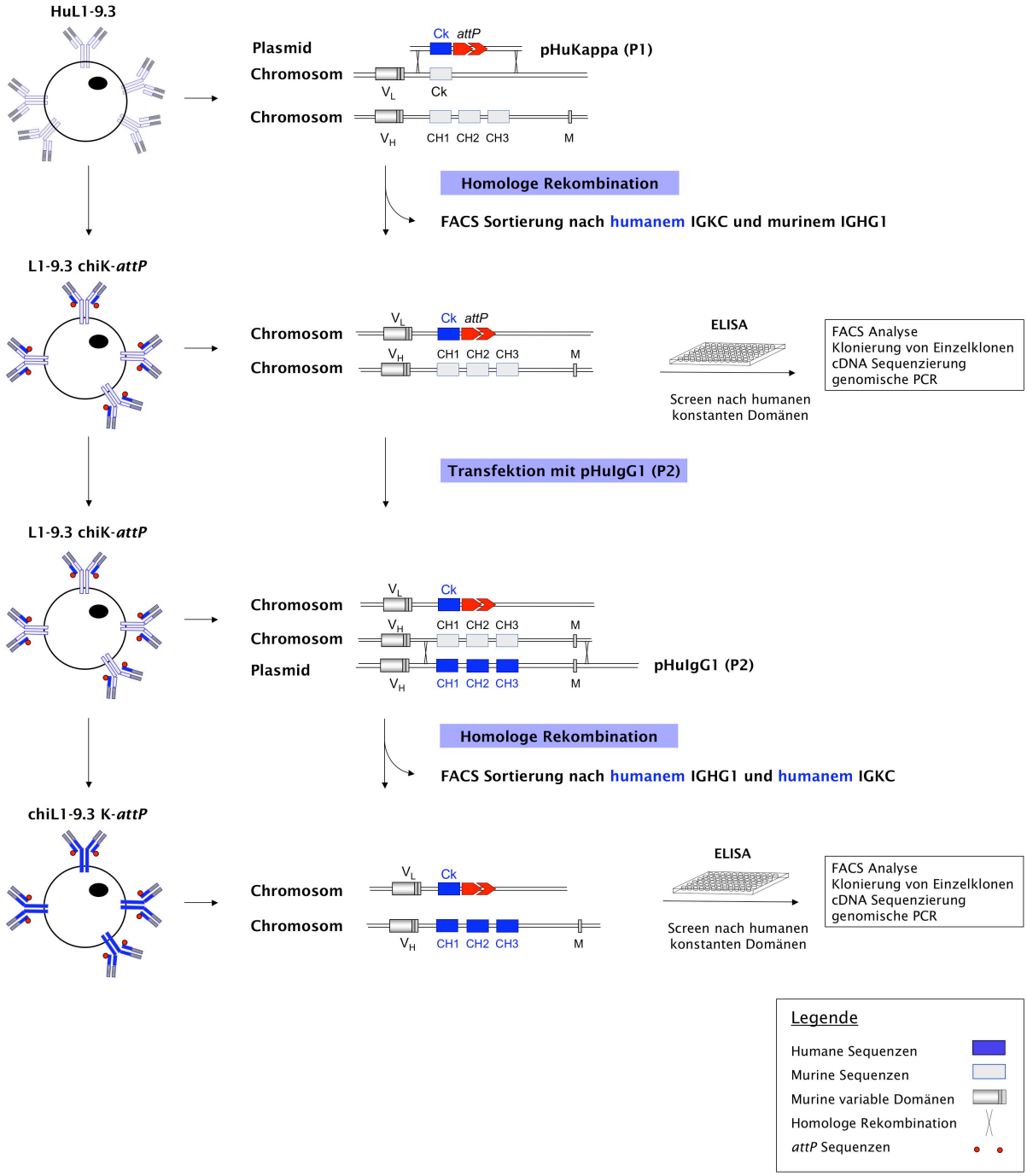


Abb. 3.7: Integration einer *attP* Stelle in den aktiven Antikörperlokus der leichten Kette durch homologe Rekombination (HR). Die Gene für schwere und leichte Antikörperketten sind auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Gene der Maus sind als graue Boxen dargestellt, humane Gene als blaue Boxen. In einer ersten Transfektion mit dem Plasmid pHuKappa-*attP* (P4) wird der Lokus der leichten Kette verändert. Dabei wird eine *attP* Erkennungssequenz der φC31 Integrase an das humane IGKC Gen (kurz Ck) fusioniert. Zellen werden nach der homologen Rekombination im FACS-Sorter durch differentielles Anfärben mit anti-human-Kappa Antikörpern (GAHu-kappa-FITC) bzw. anti-Maus-IgG1 Antikörpern (GAM-IgG1-PE) in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert. Positive Zellen durchlaufen einen zweiten Transfektionsschritt mit dem Plasmid pHuIgG1 (P2, Anhang III). Hierbei werden im Lokus der schweren Antikörperkette die murinen Gene für CH1, *Hinge*, CH2 und CH3 durch die entsprechenden humanen Gene ersetzt. Positive Zellen werden nach erfolgter homologer Rekombination erneut durch differentielles Anfärben mit anti-human-Kappa Antikörpern (GAHu-kappa-FITC) bzw. anti-human-IgG1 Antikörpern (GAHu-IgG1-PE) in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert.

Insgesamt wurden 29 Pools mit je 100 Zellen sortiert. Die Zellen wurden ca. 1 Woche zu einer dichten Kultur angezogen und anschließend 50-100 µL des Kulturüberstandes im ELISA auf Anwesenheit humaner leichter Ketten gescreent. Die Testplatten wurden hierzu mit einem GAHu-IgG(H+L) Antikörper beschichtet, der gegen murine Immunglobuline absorbiert ist, um Kreuzreaktionen mit den parentalen, murinen Antikörpern zu vermeiden. Die Detektion der neuen Antikörpervarianten mit humanem IGKC-*attP* erfolgte über einen biotinylierten GAHu-kappa-Antikörper in Kombination mit Peroxidase gekoppeltem Streptavidin (SA-POX). 2 von 29 Zellpools gaben im ELISA ein positives Signal und sezernieren den HuL1-9.3 chiK-*attP* Antikörper in den Kulturüberstand. Die restlichen Pools waren entweder parentale Zellen (HuL1-9.3) oder sezernierten Antikörpermengen die unter der Detektionsgrenze des ELISAs lagen. Die positiven Klone (1.10 und 3.1) wurden zur weiteren Analyse expandiert.
Zunächst wurde die Zusammensetzung der Pools im FACS analysiert. Da bei der anfänglichen Proliferation nie alle Zellen gleichmäßig wachsen oder absterben bzw. bei der Sortierung der Reinheitsgrad niedrig eingestellt wurde (TurboSort), variierte das Verhältnis von positiven zu negativen Zellen in einem Pool. Die Marge, die hier entstehen kann, zeigt sich bei der Analyse der Zusammensetzung der Zellpools HuL1-9.3 chiK-*attP*_1.10 bzw. 3.1 im FACS (**Abb. 3.8**). 50 µL Zellen beider Klone wurden jeweils mit GAM-kappa-FITC / GAHu-kappa-PE / PI gefärbt, um die Klone von ihrer murinen parentalen Zelllinien (HuL1-9.3) zu unterscheiden. Zur Kontrolle wurden die vollständig chimärisierte Zelllinie chiL1-9.3 (**Abb. 3.8 A**) und die murine Ursprungslinie HuL1-9.3 (**Abb. 3.8 B**) gleichermaßen gefärbt. Die Position der positiven Populationen in den Kontrollen diente als Referenz. Zu beobachten war, dass sich der Klon HuL1-9.3 chiK-*attP*_1.10 zu 100% aus positiven Zellen zusammensetzte (**Abb. 3.8 C**). 68% der Zellen dieses Pools präsentierten Antikörper mit humaner leichter Kette auf ihrer Oberfläche. Die restlichen Zellen hatten die Oberflächenexpression verloren, was bei Hybridomen aber durchaus vorkommen kann. Der Klon HuL1-9.3 chiK-*attP*_3.1 ergab im ELISA zwar ein eindeutig positives Signal, schien aber dennoch kaum Zellen zu beinhalten, die eine humane leichte Kette trugen. Lediglich 1 % der Zellen färbte sich mit dem GAHu-kappa-PE Antikörper positiv, der überwiegende Anteil der Zellen sezernierte weiterhin den ursprünglichen Mausantikörper. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen ELISA und FACS-Analyse könnte sein, dass dieser Klon einen Wachstumsnachteil hatte und die parentale Zelllinie HuL1-9.3 die transfizierten Zellen im Pool überwuchsen. Ist zudem das Verhältnis von positiven zu negativen Zellen im Pool groß, kann dies bereits innerhalb weniger Tage bis zur FACS Analyse der Fall sein.

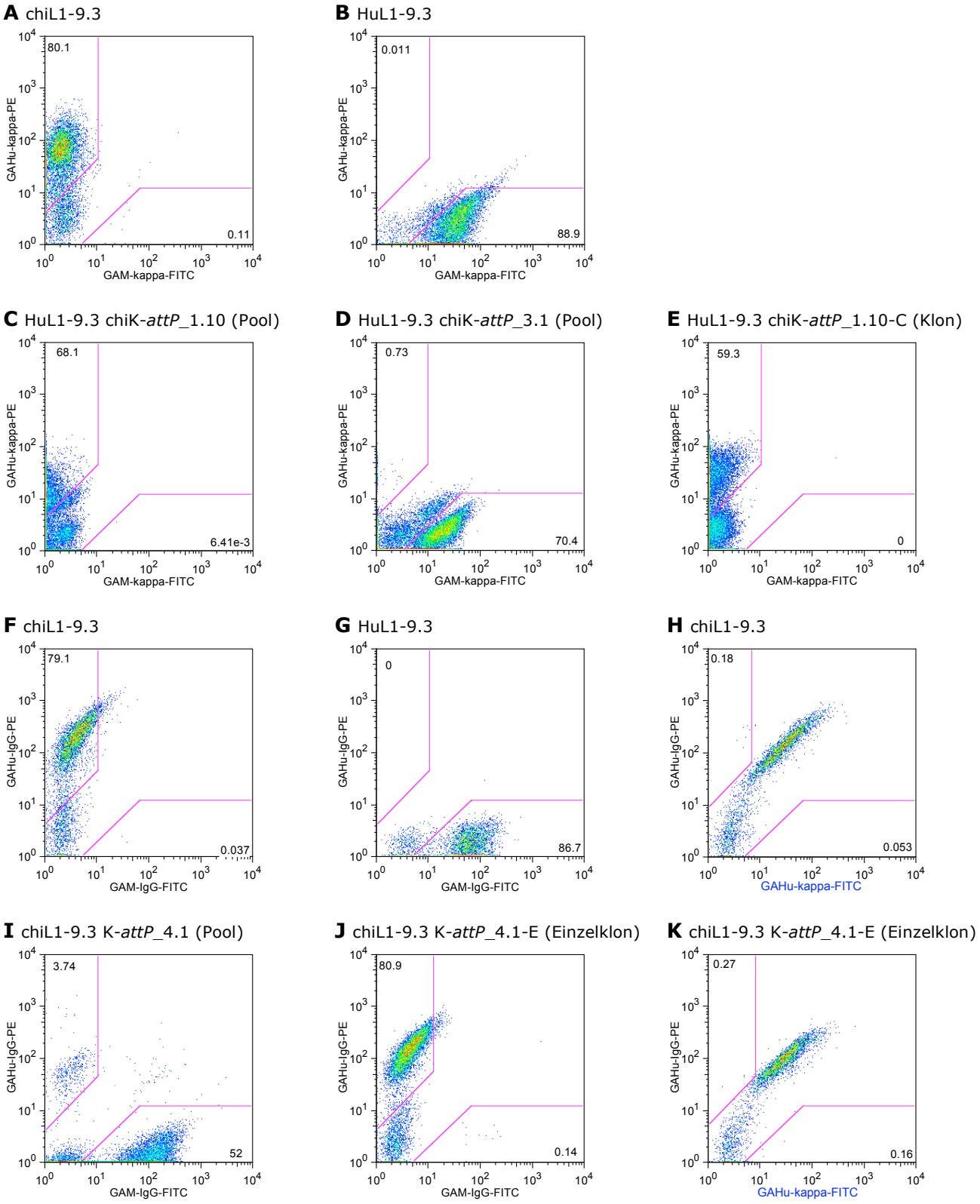


Abb. 3.8: FACS Analyse der Transfektanten nach homologer Rekombination. 50µL - 500µL Zellen wurden geerntet und mit einer Kombination zweier fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt und am FACScan analysiert. GAHu-IgG-Antikörper und GAHu-kappa-Antikörper sind gegen murine Antikörper absorbiert. GAM-IgG-Antikörper und GAM-kappa-Antikörper sind gegen humane Immunglobuline absorbiert.

Der Klon HuL1-9.3 chiK-*attP*_1.10 schien zwar nicht mit parentalen Zellen kontaminiert zu sein, wurde aber zur Sicherheit durch limitierte Verdünnung kloniert. Die Einzelklone wurden erneut im ELISA analysiert und die Reinheit der Population im FACS bestätigt (**Abb. 3.8 E**). Dabei waren alle erhaltenen Klone bezüglich ihrer Signalstärke im ELISA und im FACS so gut wie gleichwertig. Der Einzelklon HuL1-9.3 chiK-*attP*_**1.10-C** wurde zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.
Durch die FACS Analyse (**Abb. 3.8**) konnte die gelungene Integration der humanen konstanten Domäne der leichten Kette (IGKC) nachgewiesen werden, nicht aber die Fusion der *attP* Stelle an IGKC. Zum Nachweis des vollständigen Transkriptes wurde die gesamte RNA der Zelle aufgereinigt, mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und als *Template* für eine PCR Reaktion (Primer O3 und O4) eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt wurde aufgereinigt und sequenziert (Primer O3, O4, O5 und O6). Die Daten bestätigten die korrekte Fusion der *attP*-Sequenz an IGKC. Dies ist jedoch keine Garantie dafür, dass die kurze Sequenz auf Proteinebene nicht proteolytisch abgebaut wird.

In einem zweiten Transfektionsschritt wurde in der Zellline HuL1-9.3 chiK-*attP*_1.10-C die murine schwere Kette chimärisiert. Hierzu wurde die Zellline wie bereits beschrieben mit dem Plasmid pHuIgG1 (P2, Anhang III) transfiziert (**Abb. 3.7**). Nach erfolgreicher homologer Rekombination präsentierten die Transfektanten Antikörpermoleküle auf ihrer Zelloberfläche, die nur noch humane konstante Domänen aufwiesen (chiL1-9.3 K-*attP*). Durch Anfärben dieser Zellen mit GAHu-kappa-PE / GAHu-IgG-FITC /PI, wurden doppelt-positive Zellen mit dem FACS Gerät als 100er Pools in eine 96-Loch Platte sortiert. Zugleich wurde die parentale Zelllinie HuL1-9.3 chiK-*attP*_1.10-C als einfach-positive (PE positive) Population automatisch herausselektiert. Nach ca. 1 Woche wurden die Pools wie oben beschrieben im ELISA getestet. Die erzielte Frequenz der homologen Rekombination war überdurchschnittlich hoch. Von 90 analysierten Pools konnten im ELISA 50 positive Klone identifiziert werden. Alle Klone wurden im FACS durch Anfärben mit GAHu-IgG-PE / GAM-IgG-FITC /PI analysiert, um die Zusammensetzung der Pools zu bestimmen und die Klone von ihrer parentalen Zelllinie (HuL1-9.3 chiK-*attP*) zu unterscheiden. Zur Kontrolle wurden die vollständig chimärisierte Zellline chiL1-9.3 (**Abb. 3.8 F**) und die murine Linie HuL1-9.3 (**Abb. 3.8 G**) gleichermaßen gefärbt. Die Position der positiven Populationen in den Kontrollen diente als Referenz. Bei der Analyse der Klone wurde einerseits die Zusammensetzung des Pools (positive zu negativen Zellen) als auch die Stärke der Oberflächenexpression (durchschnittliche Fluoreszenzintensität der GAHu-IgG-FITC positiven Zellpopulation) zugrunde gelegt. Der Pool chiL1-9.3 K-*attP*_**4.1** (**Abb. 3.8 I**) wurde als Kandidat ausgewählt und zur weiteren Analyse expandiert. Der Pool wies eine für die homologe Rekombination typische Zusammensetzung auf. 3,75% der Zellen in dem Pool waren positiv für die humane schwere Kette. 52 % der Zellen entsprachen der parentalen Linie

HuL1-9.3 chiK-*attP*_1.10-C die eine murine schwere Kette hatte. Somit ergab sich ein Verhältnis von positiven zu negativen Zellen von 1:14. Um eine reine Zellpopulation zu erhalten, wurden die Zellen durch limitierte Verdünnung kloniert. Von ca. 200 Einzelklonen wurden 63 im ELISA positiv getestet. 13 Klone ergaben ein besonders starkes Signal und wurden im FACS auf hohe Oberflächenexpression untersucht. Der Klon chiL1-9.3 K-*attP*_**4.1-E** wurde als Kandidat für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die **Abb. 3.8 J** zeigt, dass die kontaminierende Zellpopulation mit muriner, schwerer Antikörperkette vollständig verschwunden ist. Da beim Screening die hohe Oberflächenexpression ein Auswahlkriterium war, exprimierten 81% der Zellen dieses Klones Antikörper auf der Zelloberfläche. Eine weitere Färbung der Zellen mit GAHu-IgG-PE / GAHu-kappa-FITC / PI zeigte, dass die ausgewählte Zelllinie gemäß **Abb. 3.7** in ihren konstanten Domänen vollständig chimärisiert wurde (**Abb. 3.8 K**) Als Kontrolle hierzu wurde die Linie chiL1-9.3 gefärbt (**Abb. 3.8 H)**.
Der genomische Integrationsort wurde mittels PCR verifiziert (**Abb. 3.9**). Hierbei wurden die Primerpaare so ausgewählt, dass jeweils ein Primer innerhalb der Transfektionskassette und der Gegenprimer im unveränderten Mausgenom außerhalb der Homologieregionen (Maus flankierender Bereich) lagen (**Abb. 3.9 C**). Abbildung **3.9 A** zeigt, dass die Transfektionskassette sowohl im Lokus der leichten Antikörperkette am 5' Ende (Primerkombination 1) und am 3' Ende (Kombination 2) als auch im Lokus der schweren Antikörperkette am 5' Ende (Kombination 4) und am 3' Ende (Kombination 5) korrekt integriert wurde. Humane und Maussequenzen sind in weiten Teilen homolog. Um eine Kreuzreaktion der Primer auszuschließen wurden die PCR Reaktionen zur Kontrolle an den Linen chiL1-9.3 und HuL1-9.3 durchgeführt. Um sicherzustellen, dass das Splicen nicht beeinträchtigt wurde, erfolgte für die Zelllinie chiL1-9.3 K-*attP*_**4.1-E** eine Prüfung des Transkripts durch RT-PCR. **Abb. 3.9** zeigt, dass die schwere Kette sowohl als membranständige Variante (O7-f x O8-r), als auch als sezernierte Form (O7-f x O9-r) vorliegt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden aufgereinigt und mit den Primern O7-O15 sequenziert.

Die für die spezifische Rekombination erforderliche Erkennungsstelle *attP* wurde erfolgreich in den Lokus der leichten kappa Antikörperkette eingebracht. Die Zelllinie chiL1-9.3 K-*attP* (4.1-E) wurde in den folgenden Experimenten als Empfängerlinie für die φC31-vermittelte Integration eingesetzt.
Die resultierende Zelllinie und der entsprechende Antikörper erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie	chiL1-9.3 K-*attP*
Antikörper	chiL1-9.3 K-*attP*

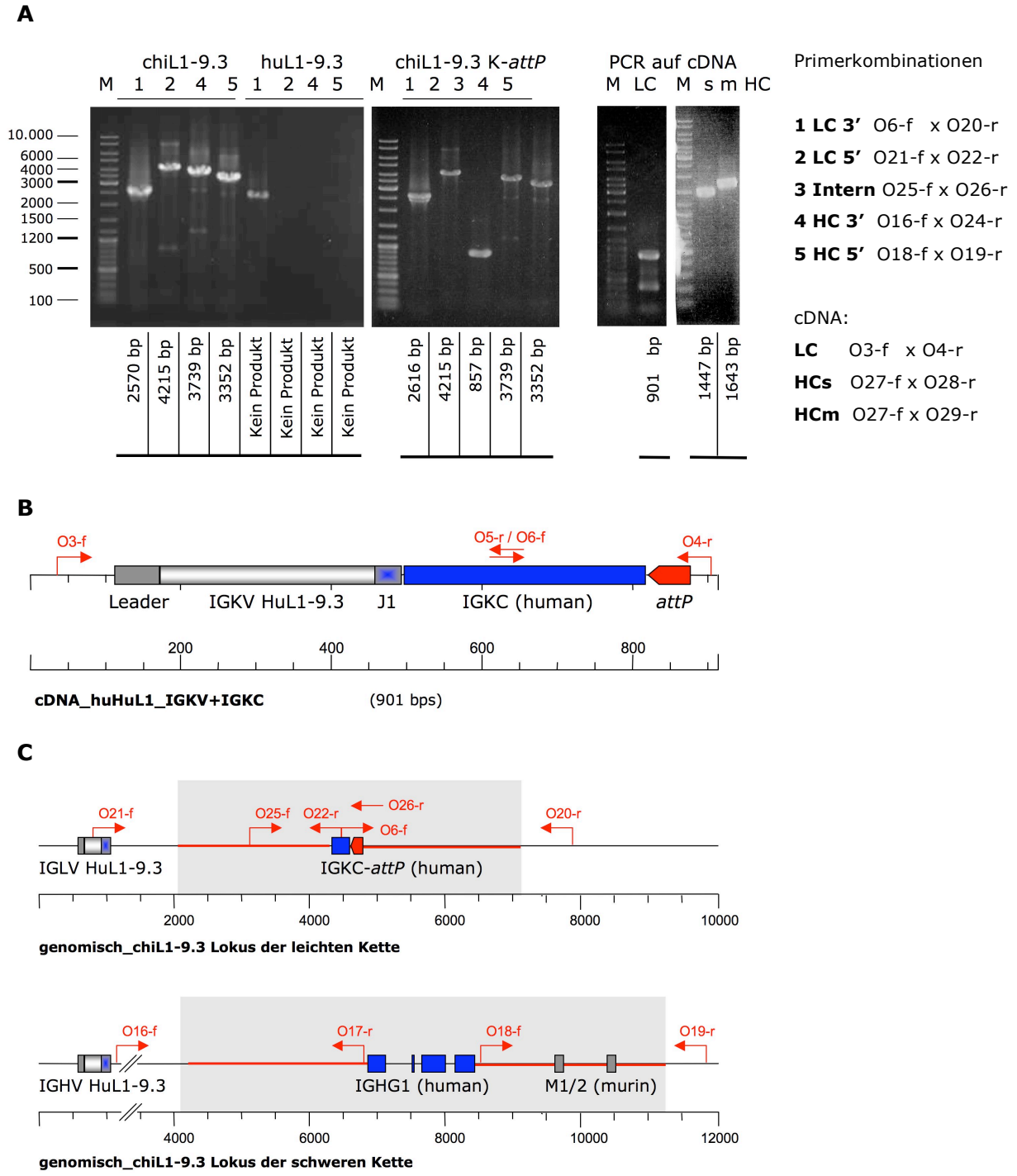


Abb. 3.9: Nachweis des genomischen Integrationsortes und des Transkripts. Der Integrationsort wurde mittels PCR auf genomische DNA verifiziert, wobei Primerpaare so gewählt wurden, dass jeweils ein Primer innerhalb der Transfektionskassette (grau hinterlegt) und der Gegenprimer im Mausgenom bindet. Das Transkript wurde mittels PCR auf cDNA nachgewiesen. **A**, 1% Agarosegel; **B**, cDNA Karte des modifizierten Lokus der leichten kappa Antikörperkette; **C**, genomische DNA Karte des chimärisierten IGKC Lokus der leichten Kette bzw. des chimärisierten IGHG1 Lokus der schweren Kette. LC, *light chain*; HCs, sezernierte Form der schweren IgG1 Kette (*heavy chain*); HCm, membranständige Form der schweren Kette.

3.1.2.3 Klonierung eines Vektors für die Expression der φC31 Integrase in Säugetierzellen

Das Enzym φC31 kann auf zweierlei Arten genutzt werden. Es kann entweder in Form eines Gens in einem eukaryontischen Expressionsvektor in die Säugetierzelle eingebracht werden, oder es kann der Zielzelle direkt als aufgereinigtes Protein zur Verfügung gestellt werden. Da noch kein direkter Vergleich der Systeme gezogen wurde, wurden Plasmide für beide Ansätze kloniert und getestet.

Zur Aufreinigung des φC31 Proteins wurde ein prokaryontischer Expressionsvektor zur Expression in *E. Coli* kloniert. Das Protein konnte zwar gereinigt werden, zeigte jedoch eine hohe Instabilität. Das Enzym wurde zwar *in vitro* zur Rekombination von DNA in einer Testreihe eingesetzt, erwies sich für die Transfektion von Säugetierzellen aufgrund seiner Instabilität jedoch als ungeeignet. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf die genaue Beschreibung der prokaryontischen Expression verzichtet.

Zur Klonierung eines eukaryontischen Expressionsvektors wurde das Gen für die Integrase des Phagen phiC31 (φC31 int) mit einer für Eukaryonten (Maus) optimierten *codon usage* bei der Firma Geneart bestellt. Das 1926 bp lange Gen wurde am 5' Ende mit einer NLS Sequenz (*nuclear localization signal*) versehen, welche das Protein zum Zellkerninneren dirigiert. Die Genkassette wurde mit den Klonierungsstellen *Sac*I und *Kpn*I flankiert und über diese in einen pBS II SK (+) basierten Expressionsvektor kloniert. Das Gen stand unter Kontrolle des konstitutiv exprimierten CMV Promotors und nutzte die Polyadenylierungssequenz des SV40 Virus. Das resultierende Plasmid **pPhiC31** (P5) ist schematisch in **Abb. 3.10** dargestellt.

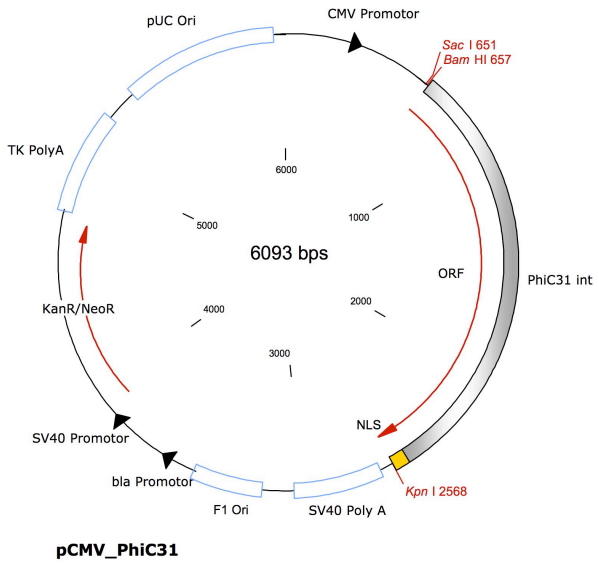


Abb. 3.10: Plasmidkarte des Plasmides pPhiC31 (P5). Das Plasmid kodiert für die φC31 Integrase unter Kontrolle des konstitutiv exprimierten CMV Promotors und der SV40 Polyadenylierungssequenz. Zur Lokalisierung im Nukleus, wurde eine NLS Sequenz an das PhiC31 int Gen fusioniert. IR, *intergenic region*; ColE1, *origin or replication*; AmpR, Ampicillin Resistenzgen; NLS, *nuclear localization signal*.

3.1.2.4 Optimierung der φC31 vermittelten Rekombination mit Hilfe eines Reportersystems

Um die φC31-vermittelte Rekombination testen zu können, wurde ein spezielles Reportersystem kloniert (**Abb. 3.11**). Das Reporterplasmid p*AttP*-DsRed_*attB*-EGFP (P6) kodiert für zwei Fluoreszenzfarbstoffe unter Kontrolle des konstitutiv exprimierten CMV Promotors. Das rot fluoreszierende Protein DsRed befindet sich im Leseraster des CMV Promotors und folgt einer *attP* Stelle im nicht-kodierenden Bereich. Am 3' Ende des DsRed Gens befindet sich das grün fluoreszierende Protein EGFP, dem eine *attB* Stelle vorangeht. EGFP befindet sich außerhalb des Leserasters und wird somit nicht transkribiert. Das Plasmid p*AttP*-DsRed_*attB*-EGFP induziert in den Zielzellen eine rote Fluoreszenz. Bei einer Ko-Transfektion des Plasmides mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pPhiC31 in Säugetierzellen kommt es zur spezifischen Rekombination zwischen *attP* und *attB* Stellen, wobei kleine Episome entstehen. Das Gen für EGFP gerät so unter Kontrolle des CMV Promotors und induziert in der Zielzelle eine Verschiebung der Fluoreszenz von rot nach grün.

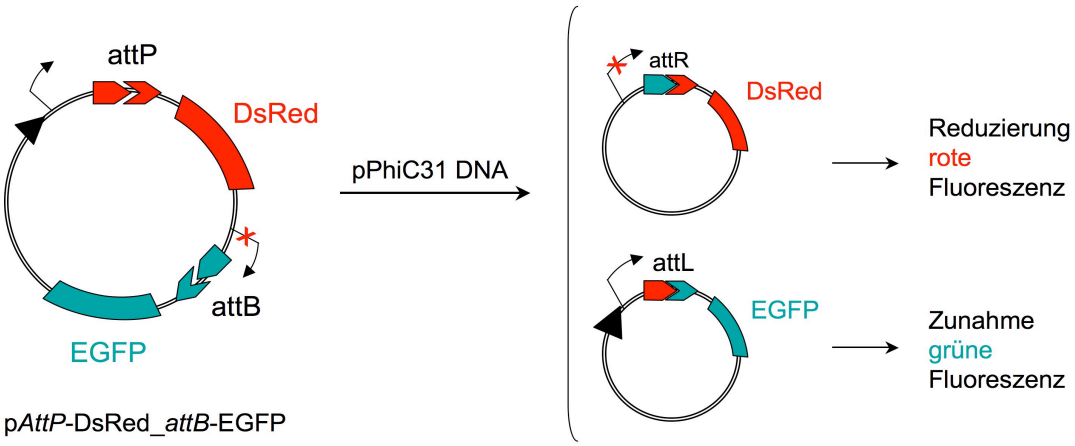


Abb. 3.11: Reportersystem für die Aktivitätsbestimmung der φC31 Integrase in Säugetierzellen mittels FACS. Das Plasmid p*AttP*-DsRed_*attB*-EGFP kodiert für die Fluoreszenzfarbstoffe DsRed und EGFP. In Säugetierzellen wird das DsRed Gen über den CMV Promotor transkribiert, die Zellen emittieren ein rotes Fluoreszenzsignel. In Anwesenheit der φC31 Integrase rekombinieren *attP* und *attB* Stellen unter Bildung zweier Episome. Das EGFP Gen gerät so unter Kontrolle des CMV Promotors und bewirkt in den Zielzellen eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums in den grünen Wellenlängenbereich.

Grundlage des p*AttP*-DsRed_*attB*-EGFP (P6) Plasmides war der Vektor pEGFP N3 (P7, Clontech). Ein DNA Fragment mit den Sequenzen der *attP* und *attB* Stellen und den zur Klonierung erforderlichen Restriktionsstellen wurde von der Firma Geneart synthetisiert. Das Fragment wurde von den Enzymschnittstellen *Hind*III und *Bam*HI flankiert und wurde unter Einführung eines *frameshifts* über diese Stellen in den Vektor pEGFP N3 eingebracht. Das Gen DsRed Monomer stammte aus dem Plasmid pACT (Promega) und wurde über die flankierenden Restriktionsstellen *Age*I und *Eag*I ebenfalls in das Plasmid pEGFP N3 hinter die hierfür vorgesehene *attP* Sequenz eingefügt.

Aktivität der φC31 Integrase durch Kotransfektion eines Expressionsvektors

Mit Hilfe dieses Reportersystems wurde die Funktion des pPhiC31 Expressionsplasmides analysiert. In einer Testreihe wurde die φC31-vermittelte Rekombination *in vitro* in Hybridomzelllinien optimiert. Hierzu wurden die Reporter DNA (P6) und das pPhiC31 (P5) Plasmid in Hybridomzellen kotransfiziert. Nach 48h wurden die Rekombinationereignisse anhand der Zunahme des grünen Fluoreszenzsignals im FACS analysiert. Tote Zellen wurden mit dem Farbstoff 7AAD markiert und bei der Analyse diskriminiert. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.12** dargestellt. Die Zugabe von pPhiC31 allein ergab keine Hintergrundfluoreszenz. Nach der Transfektion der HuL1-9.3 Zelllinie mit dem Plasmid pEGFP N3 (Clontech) exprimierten ca. 70% der lebenden Zellen EGFP. Im Gegensatz hierzu fluoreszierten nach der Transfektion mit pDsRed Monomer (Promega) lediglich 14% der Zielzellen rot. Das Emissionsoptimum der Fluoreszenzfarbestoffe 7AAD und DsRed liegen sehr dicht beieinander, so dass die spektrale Überlappung nur schlecht kompensiert werden konnte. Ein Großteil der Zellen wurde daher mit der Population an toten Zellen bei der Analyse herausfiltriert. Aus diesem Grund konnte lediglich die Zunahme der grünen EGFP Fluoreszenz als Maß für die spezifische Rekombination herangezogen werden (**A-H**). Die optimalen Transfektionsbedingungen für Hybridome wurden in Lüttgau (2004) auf 18 µg DNA / $1 \cdot 10^7$ Hybridomzellen festgelegt. Um diese Rahmenbedingungen einzuhalten, wurde eine Testreihe mit einer konstanten Gesamt-DNA Menge von 18 µg durchgeführt, wobei jeweils die pPhiC31 (P5) und pAttP-DsRed_attB-EGFP (P6) Mengen variiert wurden (**I**). Die maximale Rekombinationsfrequenz lag in der lebendigen Zellpopulation bei ca. 12 %. Dieser Wert wurde bereits bei Zugabe von 5 µg pPhiC31 erreicht. Der Prozentsatz EGFP positiver Zellen variierte nur sehr geringfügig in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Reporterplasmid. Auch eine Erhöhung der Reporterplasmidmenge unter Konstanthaltung der pPhiC31 Menge (6 µg) verursachte keine weitere Steigerung der Rekombinationsfrequenz (**J**).

Die hier ermittelten Werte sind lediglich Richtwerte und dienten der Ermittlung des optimalen Transfektionsverhältnisses. Es wird erwartet, dass die Rekombinationsfrequenz eines Plasmides mit einem klar definierten genomischen Lokus weit unter den errechneten Werten des Testsystems liegt. Die publizierte Rekombinationsfrequenz liegt bei $1/1 \cdot 10^4$ Zellen bei Einsatz von 100 µg Ziel-DNA (Dafhnis-Calas *et al.* 2005).

In den nachfolgenden Experimenten zur Herstellung bispezifischer Antikörper mittels spezifischer Rekombination (SSR) wurden zur Transfektion von Hybridomzellen 6 µg pPhiC31 und 18 µg DNA pro $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt.

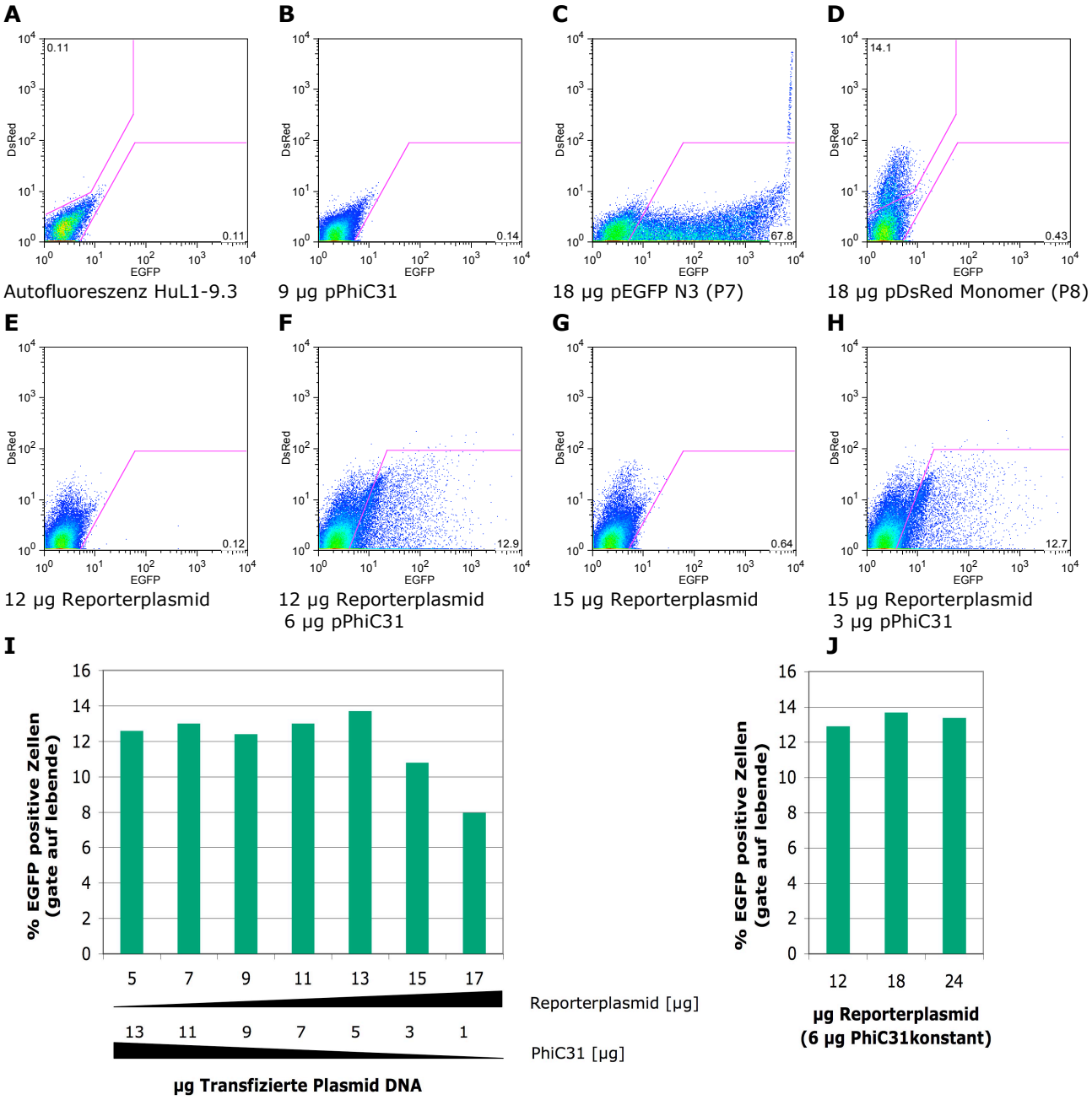


Abb. 3.12: Optimierung der φC31-vermittelten spezifischen Rekombination *in vitro*. $1 \cdot 10^7$ HuL1-9.3 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen Reporterplasmid mit bzw. ohne Zugabe des eukaryontischen Expressionsvektors pPhiC31 gefärbt und im FACS analysiert. Tote Zellen wurden mit 7AAD markiert und herausfiltriert. Die Zunahme der grünen Fluoreszenz wurde als Maß für die Effizienz der spezifischen Rekombination herangezogen. **A-H,** FACS Analyse (Auszug). Grüne Fluoreszenz (FL1, EGFP), Kontrollplasmide: pEGFP N3 (FL1, EGFP), pDsRed Monomer (FL2, DsRed); **I**, Testreihe mit konstanter (18µg) DNA Menge (variable Reporterplasmid- und pPhiC31 Plasmidmenge); **J**, Testreihe mit konstanter Menge pPhiC31 Plasmid (6µg) und steigender Reporterplasmidmenge. Die maximale Rekombinationsfrequenz liegt bei ca. 12% der lebenden Zellen und wird bereits durch Zugabe von 5 µg pPhiC31 erreicht.

3.1.2.5 φC31 Integrase-vermittelte Fusion an die leichte Antikörperkette

In einem letzten Teilschritt erfolgte die Klonierung von sog. Eingangsplasmiden, die, wie in **Abb. 3.13** dargestellt, mittels spezifische Rekombination in die Empfängerlinie chiL1-9.3 K-*attP* (1.10-E) eingebracht werden sollten.

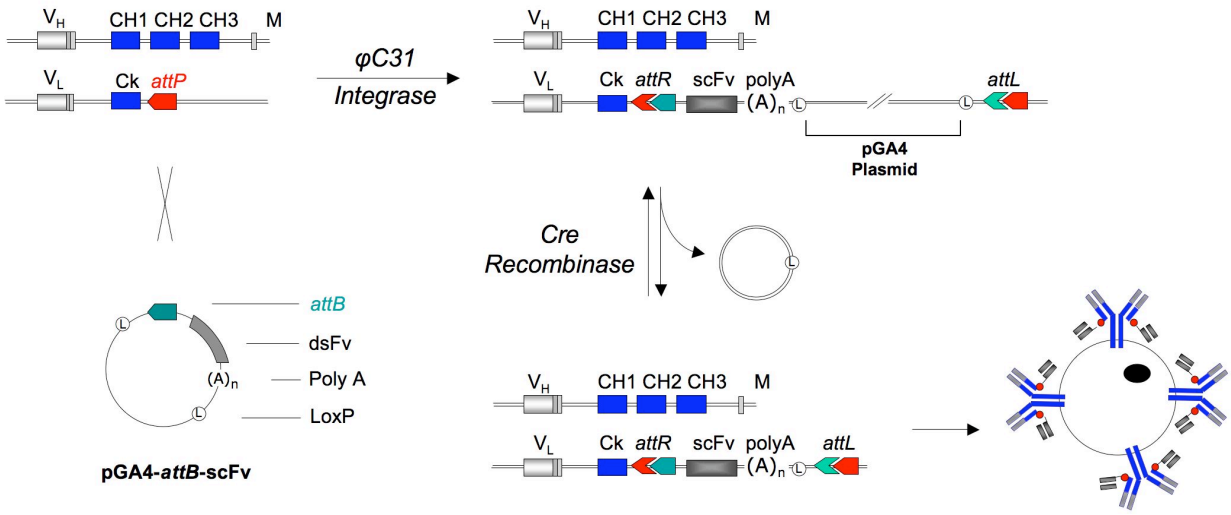


Abb. 3.13: Vorgehensweise zur spezifischen Rekombination von *attB*-Eingangsplasmiden in den Antikörperlokus der leichten Kette von Hybridomen. Die zu integrierenden Plasmide (pGA4-*attB*-dsFv) tragen eine *attB*-Sequenz als Gegenstück zu der im Genom der Empfängerlinie befindlichen *attP*-Sequenz. Spezifische Integration wird durch Cotransfektion der Plasmide mit dem eukaryontischen Expressionsvektor für die φC31 Integrase erreicht. Die Plasmide werden über *attP* und *attB* Stellen und unter Bildung chimärer *attachment* Stellen (*attL* und *attR*) vollständig in die genomische Sequenz eingeschleust. Die pGA4 Vektorsequenz ist flankiert durch LoxP stellen und kann ein einem weiteren Transfektionsschritt mit einem Expressionsplasmid für die Cre Rekombinase (piCre) wieder aus dem Genom entfernt werden. Bei erfolgreicher Integration exprimieren Hybridomzellen bispezifische (Fab)2 bispezifische Antikörper auf der Zelloberfläche.

<u>*attB*-Eingangsplasmide p*AttB*-dsFvOKT3 und p*AttB*-Tags</u>

Die Grundsequenz zur Klonierung der Eingangsplasmide wurde der Firma GeneArt zur Synthese in Auftrag gegeben. Die Sequenz bestand aus einer LoxP-Sequenz, gefolgt von der *attB*-Stelle und einer Abfolge verschiedener Tags (myc, Histidin und FLAG), die jeweils durch einen kurzen $(G_3S)_2$-Linker miteinander verbunden waren. Das FLAG-Epitop schloss dabei mit einem Stop-Codon ab.

- myc-Tag EQKLISEEDL
- His-Tag HHHHHHHHHH
- FLAG-Epitop GSGDYKDDDDK-Stop

Weiterhin beinhaltete die Sequenz die synthetische Polyadenylierungssequenz des Plasmides pACT (Promega) und eine zweite LoxP Sequenz. Die Tag-Kassette wurde von den Enzymerkennungsstellen *BamH*I und *Xho*I flankiert. Die Sequenz wurde über die flankierenden *ApaL*I Stellen in den Vektor pGA4 kloniert. Das resultierende Plasmid **p*attB*-Tags** (P9) diente als Kontrolle für die spezifische Integration in den Lokus der leichten Antikörperkette und zum Test der unterschiedlichen Tags im FACS. Bei der

spezifischen Integration erfolgte die Integration des Gesamtplasmides in das Genom der Zielzelle. Um die überflüssigen Sequenzanteile des pGA4 Vektors aus dem Genom zu beseitigen, wurde die Vektorsequenz mit LoxP-Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase flankiert. Zu beachten war hierbei, dass sich bei der spezifischen Integration die Orientierung der LoxP-Stellen gegenüber der Positionierung auf dem Plasmid ändert und diese sich dann gegenüberliegen.

Zur Klonierung des Plasmids **p*AttB*-dsFvOKT3** (P10) wurde die Sequenz des dsFvOKT3-Fragments mittels PCR (O30-f x O31-r) aus dem Plasmid p(Fab)$_2$xdsFvOKT3 (P3, Kapitel 3.1.1.2) amplifiziert, mit einem Stop-Codon und den Enzymstellen *BamH*I und *Xho*I flankiert und über diese Restriktionsstellen anstelle der Tag-Kassette in p*AttB*-Tags eingebracht (**Abb. 3.14**).

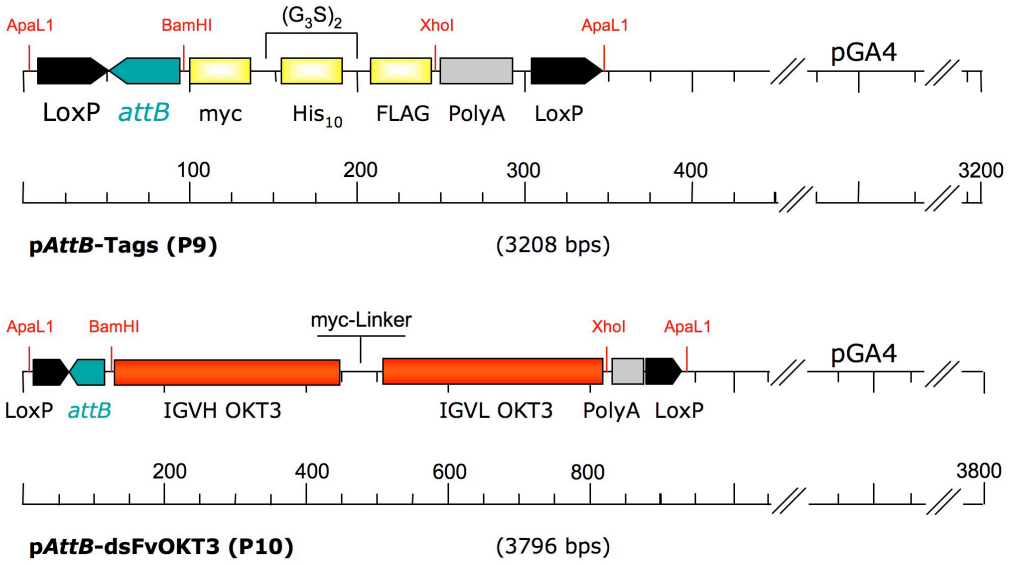


Abb. 3.14: Plasmide zur φC31-vermittelten Fusion an die leichte Antikörperkette. p*AttB*-Tags (P9) ist eine Positivkontrolle zum Nachweis unterschiedlicher Tags bzw. Epitope im FACS. Die Tag-Kassette beinhaltet eine Abfolge des myc-Tags, His-Tags und des FLAG-Epitops, die jeweils durch einen kurzen Glycin-Serin-Linker miteinander verbunden sind. In p*AttB*-dsFvOKT3 (P10) wurde die Tag-Kassette aus p*AttB*-Tags durch den disulfidbrückenstabilisierten single-chain Antikörper dsFvOKT3 aus P3 (p(Fab)$_2$ x dsFvOKT3, Kapitel 3.1.1.2) ersetzt. *AttB*, Erkennungsstelle der φC31 Integrase und Gegenstück zur *attP* Stelle im Mausgenom; LoxP, Erkennungsstelle der Cre Rekombinase, dient der Excision der pGA4 Vektorsequenz; PolyA, synthetisches Polyadenylierungssignal des Plasmides pACT (Promega).

<u>φC31-vermittelte Fusion der Tag-Kassette (myc-His-Flag) an IGKC</u>

$1{,}5 \cdot 10^8$ Zellen der Empfängerlinie chiL1-9.3 K-*attP* wurden mit 180 µg p*AttB*-Tags DNA und 60 µg pPhiC31 DNA kotransfiziert und auf 10 Elektroporationsküvetten verteilt. Nach 48 h wurden die Zellen mit einer Kombination aus GAHu-kappa-FITC und anti-myc-Biot/ SA-PE /PI gefärbt und im Zellsorter als 100er Pools in eine 96-Loch Platte sortiert. 23 Pools wurden etwa eine Woche lang kultiviert und anschließend jeweils 100µL Überstand im ELISA auf Antikörper-Tag Fusionsproteine getestet. ELISA Platten wurden mit dem anti-myc-Antikörper 9E10 beschichtet und mit GAHu-kappa-Biot/ SA-POX detektiert. Alle

23 Pools gaben im ELISA ein positives Signal und wurden daraufhin im FACS auf die Zusammensetzung der Pools und auf hohe Oberflächenexpression hin analysiert. Die FACS Analyse ergab, dass sämtliche Pools nach der Sortierung eine positiv transfizierte Zellpopulation enthielten. Der Pool chiL1-9.3 K-***attR*-Tags_J** wurde als Kandidat ausgewählt. Mit dieser Zelllinie wurde das Vorhandensein der unterschiedlichen Tags im FACS getestet. Die entsprechende FACS Analyse ist in **Abb. 3.15** zusammengefasst. Um eine Hintergrundfärbung auszuschließen, wurde die transfizierte Empfängerlinie chiL1-9.3 K-*attP* äquivalent gefärbt. Der Zellpool enthielt nach der Sortierung im FACS wie zu erwarten eine Zellpopulation, die der Mutterzelllinie entsprach (chiL1-9.3 K-*attP*) und einfach-positiv für die humane leichte Kette war (GAHu-kappa-FITC). Eine Subpopulation hingegen war doppelt-positiv für die humane leichte Kette und jeweils einem der eingebrachten Tags (anti-Tag-Biot /SA-PE). Sowohl das myc-Tag (**A, B**) als auch das His-Tag (**C, D**) konnten in der Subpopulation nachgewiesen werden. Beide Tags eignen sich daher zur Selektion rekombinanter Antikörper in Hybridomen. Das FLAG-Epitop konnte allerdings nicht detektiert werden (**E, F**). Das FLAG-Epitop befand sich am C-terminalen Ende der Polypeptidkette. Der anti-FLAG-Antikörper M1 (Sigma) erkennt lediglich N-terminal lokalisierte Epitope, der M5 Antikörper bindet ausschließlich an die längere Peptidsequenz des FLAG-Epitops und der M3 Antikörper erkennt zwar interne FLAG-Epitope, ergab aber eine Kreuzreaktion auf FLAG-negativen Hybridomzellen.
Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass die doppelt-positive Zellpopulation (chiL1-9.3 K-*attR*-Tags) im Laufe der Zeit zugunsten der kontaminierenden Mutterzelllinie abnahm. Innerhalb von nur ca. 37 Tagen in Kultur nach dem ELISA Screen reduzierte sich die chiL1-9.3 K-*attR*-Tags Population von 15% auf ca. 0,2 % der Gesamtzellen (Vergleich **B** und **G** bzw. **D** und **H**). chiL1-9.3 K-*attR*-Tags_J Klone wurden zu Einzelklonen verdünnt und blieben dann in Kultur stabil. Die Verlängerung der leichten Antikörperkette schien sich nachteilig auf das Zellwachstum auszuwirken.
Die resultierende Zelllinie und der entsprechende Antikörper erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie	chiL1-9.3 K-*attR*-Tags_SSR
Antikörper	$_{(Fab)2}$L1 x Tags_SSR

Der Integrationsort wurde mittels PCR auf genomischer DNA der Linie chiL1-9.3 K-*attR*-Tags überprüft. Abbildung **3.16** zeigt, dass die Transfektionskassette im Lokus der leichten Antikörperkette am 5' Ende (Primerkombinationen 1 und 2) und am 3' Ende (Kombination 3), korrekt integriert wurde. Der Übergang von der humanen IGKC Domäne der Mutterzelllinie zur Tag-Kassette über die chimäre *attR*-Stelle wurde per Sequenzierung verifiziert.

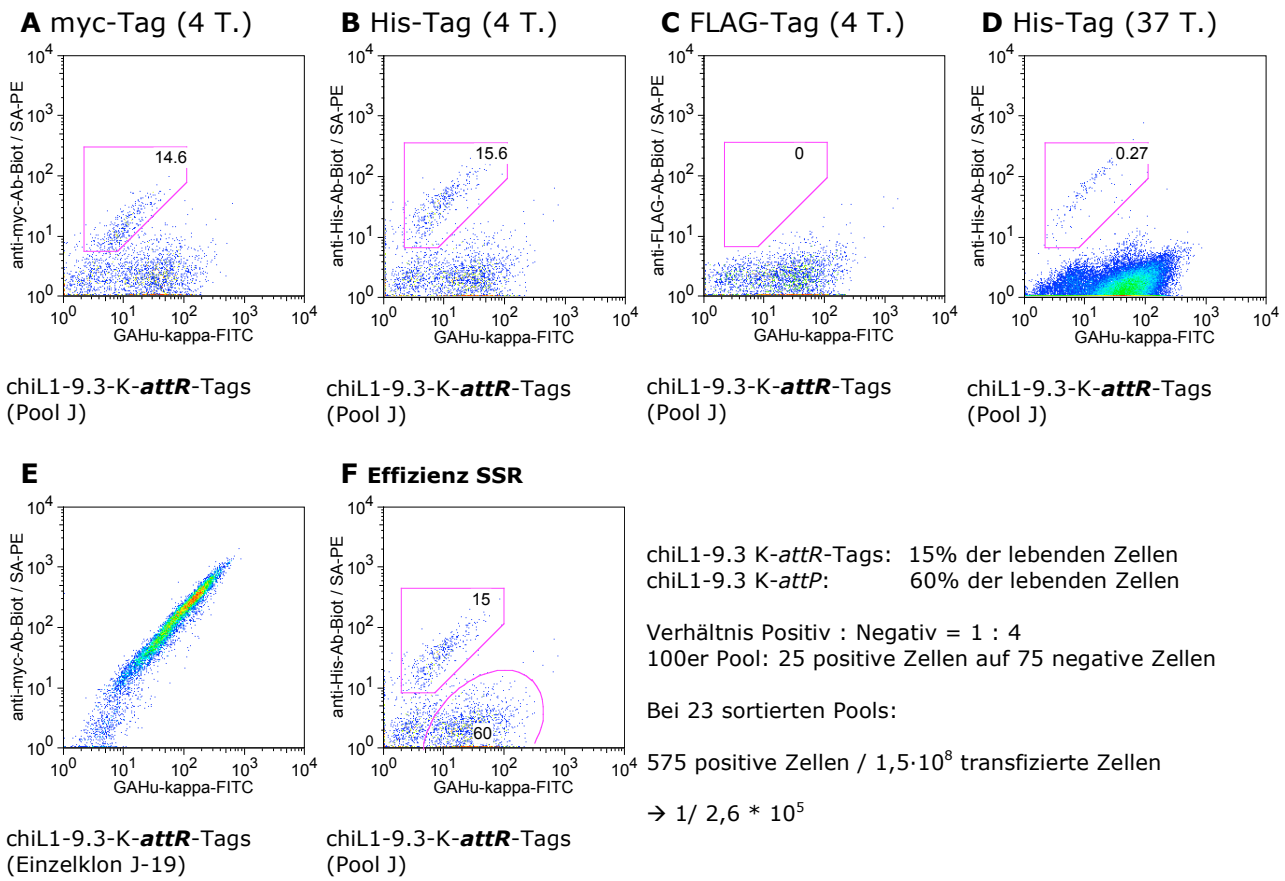


Abb. 3.15: FACS Analyse von Zell-Pools nach φC31-vermittelter Fusion einer Tag-Kassette an IGKC. 4 Tage (4 T.) nach dem ELISA Screen wurden $1{\cdot}10^7$ chiL1-9.3 K-*attP* Zellen mit GAHu-kappa-FITC /anti-myc-Ab-Biot / SA-PE oder GAHu-kappa-FITC /anti-His-Ab-Biot / SA-PE oder GAHu-kappa-FITC /anti-Flag-Ab-Biot / SA-PE gefärbt und im FACS auf doppelt-positive Zellpopulationen und hohe Oberflächenexpression analysiert. Tote Zellen wurden mit PI markiert und herausfiltriert. Als Negativkontrolle wurde die zur Transfektion eingesetzte Zelllinie chiL1-9.3 K-*attP* eingesetzt. Der Zell-Pool chiL1-9.3 K-***attR*-Tags_J** wurde als Kandidat ausgewählt. **A**, Nachweis des myc-Tags; **B**, Nachweis des His-Tags; **C**, Nachweis des Flag-Epitops. **D**, Nachanalyse des Zellpools J nach 5 Wochen in Kultur (37 T.). Klon J hat einen Wachstumsnachteil gegenüber der kontaminierenden Mutterzelllinie chiL1-9.3 K-*attP* (Reduktion der doppelt-positiver Zellen um Faktor 60-70). **E**, Einzelklon chiL1-9.3 K-***attR*-Tags_J-19**; **F**, Effizienz der φC31-vermittelten, spezifischen Rekombination.

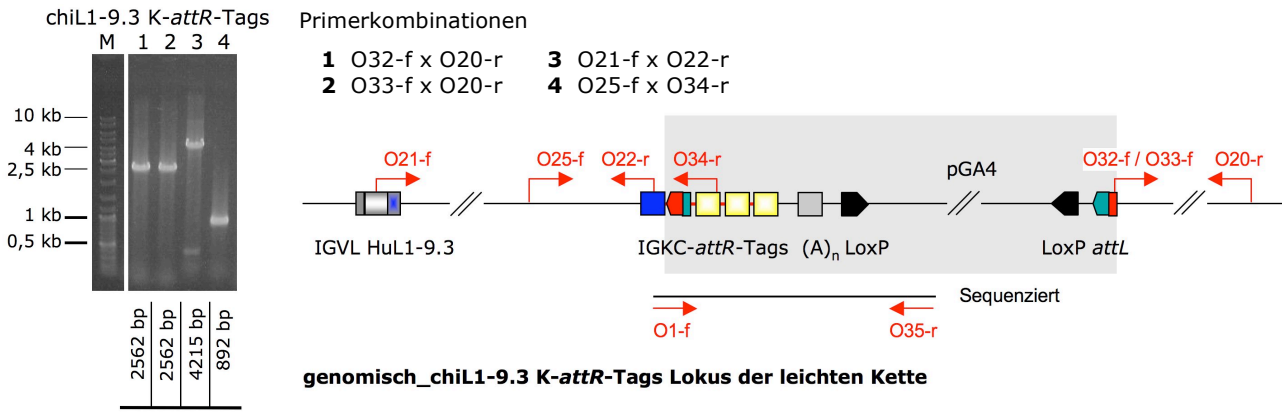


Abb. 3.16: Nachweis des genomischen Integrationsortes. Der Integrationsort wurde mittels PCR auf genomische DNA verifiziert. Primerpaare wurden so gewählt, dass jeweils ein Primer innerhalb der Transfektionskassette (grau hinterlegt) und der Gegenprimer im Mausgenom bindet (s. genomische genomische Genkarte, links). IGVL, Variable Domäne der leichten Antikörperkette; IGKC, konstante Domäne der leichten kappa Antikörperkette; (A)n, synthetische Polyadenylierungssequenz; LoxP, Erkennungsstelle der Cre Rekombinase; *attR* und *attL*, chimäre Erkennungsstellen der φC31 Integrase; pGA4, Vektorsequenz.

Frequenz der φC31-vermittelten spezifischen Rekombination (SSR)

Aus diesem ersten Versuch zur spezifischen Rekombination eines Eingangsplasmides mit genomischer DNA, konnte ein erster Richtwert zur Effizienz der SSR ermittelt werden (**Abb. 3.15 F**). Nach dem Sortieren der Linie chiL1-9.3 K-*attR*-Tags entsprach die positive Zellpopulation in einem Zellpool ca. 15% der Gesamtzellen. Mutterzellen stellten ca. 60% der Gesamtzellen dar. Somit ergab sich ein Verhältnis von positiven zu negativen Zellen von 1:4. Hochgerechnet auf die zur Transfektion eingesetzte Zellzahl von $1{,}5 \cdot 10^8$ und der Anzahl rückgewonnener Pools (23), ergab sich eine Transfektionseffizienz von $1/\ 2{,}6 \cdot 10^5$.

φC31-vermittelte Fusion der dsFvOKT3-Kassette an IGKC

Der single-chain Antikörper dsFvOKT3 wurde basierend auf den Erkenntnissen aus chiL1-9.3 K-*attR*-Tags mit einem myc-Epitop ausgestattet. Das Plasmid p*AttB*-dsFvOKT3 wurde mit dem Plasmid pPhiC31 wie bereits beschrieben in die Empfängerlinie chiL1-9.3 K-*attP* kotransfiziert. Die Zellen wurden durch Färbung mit GAHu-kappa-FITC und anti-myc-Ab-Biot /SA-PE im FACS selektiert und positive Zellpools im ELISA untersucht (Beschichtung anti-myc-Ab; Detektion GAHu-kappa-Biot / SA-POX). Nach zweimaligem Wiederholen des Versuchs konnten im ELISA bzw. per FACS Analyse keine Transfektanten identifiziert werden.

Die in diesem Ansatz angestrebte Zelllinie und der Antikörper, der hieraus resultieren sollte, erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie	chiL1-9.3 K-*attR*-dsFvOKT3_SSR
Antikörper	$_{IgG1}$L1 x $_{dsFv}$OKT3_SSR

In einem weiteren Ansatz wurde nun geprüft, ob sich bispezifische Antikörper auf direktem Weg durch Fusion an das Fab-Fragment des HuL1-9.3 Antikörpers generieren lassen. Diese Strategie ermöglichte eine Reduzierung des Molekulargewichtes auf unter 80 kDa. Damit sollten die Chancen steigen, dass dieses Konstrukt nicht mit der Sekretionsmaschinerie interferiert.

3.2 Fusion an die schwere Antikörperkette

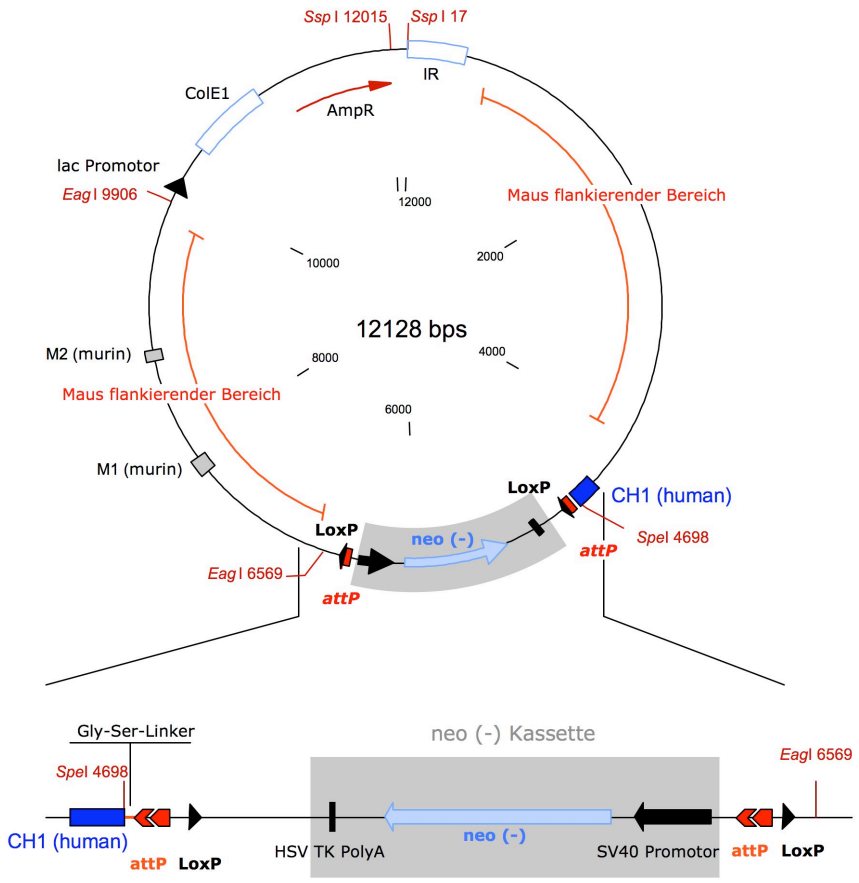
Die in Kapitel 3.1 beschriebene Fusion von dsFVOKT3-Fragmenten an die leichte Antikörperkette erwies sich als nicht realisierbar. Das angestrebte Endziel der Dissertation bleibt jedoch die Herstellung kleiner bispezifischer Antikörper durch Fusion eines dsFv Antikörpers an das Fab-Fragment eines zweiten Antikörpers (**Abb. 3.1**). Analog zu Kapitel 3.1 soll die Fusion der dsFv-Antikörper parallel über SSR als auch über HR etabliert werden.

3.2.1 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels spezifischer Rekombination

3.2.1.1 Herstellung einer Empfängerlinie mit Erkennungssequenzen für die φC31 Integrase im Lokus der schweren Kette

In einem ersten Schritt wurden Erkennungsstellen (*attP*) für die φC31 Integrase in den Lokus der schweren Antikörperkette eingebracht. Diese Umgestaltung des Mausgenoms erfolgte über homologe Rekombination und unter gleichzeitiger Chimärisierung der konstanten CH1 Domäne der schweren Kette.
Zur homologen Rekombination wurde der Austauschvektor pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP (P11, **Abb. 3.17**) kloniert. Diese Klonierung erfolgte in vielen Teilschritten, so dass an dieser Stelle auf eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise verzichtet wird. Ein Ausschnitt der relevanten Proteinsequenz wird im **Anhang V** bereitgestellt.

Die Neomycin Resistenzkassette wurde aus dem Plasmid pEGFP N3 (Clontech) entnommen und enthielt den SV40 Promotor, das Neomycin Resistenzgen und das HSV TK Polyadenylierungssignal. Die Kassette wurde mit *attP* und LoxP Stellen flankiert. Hinter die *attP* Stelle am 5' Ende der Kassette wurde per Mutagenese ein Stop-Codon eingeführt. Das Insert wurde schließlich über die *Spe*I und *Eag*I Restriktionsstellen in invertierter Orientierung in den Austauschvektor pHuIGHG1 (P2, Anhang III) kloniert. pHuIGHG1 diente zur Chimärisierung der konstanten Domänen der schweren IgG1 Antikörperkette. In **pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP** wurden die CH2 und CH3 Domänen entfernt und stattdessen die humane CH1 Domäne über einen kurzen Glycin-Serin-Linker mit der *attP* Stelle fusioniert, die somit als Teil des Linkers betrachtet wurde. Weiter enthält das Plasmid 5' und 3' Maus flankierende Bereiche zur homologen Rekombination mit dem Mausgenom.



pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*]LoxP

Abb. 3.17: Plasmidkarte des Austauschvektors pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP (P11) zur homolgen Rekombination im Lokus der schweren Antikörperkette. Das Plasmid basiert auf pHuIGHG1 zur Chimärisierung der konstanten Domänen der schweren Kette. CH2 und CH3 Domänen wurden entfernt und die CH1 Domäne stattdessen über einen Glycin-Serin-Linker an eine *attP* Stelle fusioniert. Zur Selektion der sezernierten Fab-Fragmente wurde eine neoR Selektionskassette in inverser Orientierung eingebracht, die von LoxP-Stellen flankiert wird. Maus flankierende Bereiche dienen der homologen Rekombination in Hybridomen.

Zur Erzeugung der Empfängerlinie **chiL1-9.3 CH1-*attP*** wurde das Plasmid pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP mit dem Restriktionsenzym *Ssp*I linearisiert und 18 µg DNA /Küvette in $5 \cdot 10^8$ HuL1-9.3 chiKappa Zellen elektroporiert. HuL1-9.3 Zellen waren zuvor mit dem Plasmid pHuKappa wie in der Übersicht in **Abb. 3.18** beschrieben chimärisiert worden. Nach 48 h wurde das Kulturmedium abgenommen und zur Vorselektion durch G418-haltiges Medium (0,2 mg/mL) ersetzt. Nach weiteren 48 h erfolgte ein weiterer Selektionsschub durch G418-Mediumstausch. Am Tag 8 nach der Transfektion wurden die Zellen im FACS auf Verlust der Oberflächenexpression analysiert und als 100er Pools in 96-Loch-Platten sortiert. Der Überschuss an toten Zellen durch die G418-Selektion wurde durch Markierung mit dem Farbstoff PI eliminiert. Membranständige Antikörper auf den überlebenden nicht-transfizierten Mutterzellen (HuL1-9.3 chiKappa) wurden mit GAHu-kappa-PE und GAM-IgG1-FITC Antikörpern gefärbt und bei de Analyse ebenfalls abgetrennt. Die Frequenz an Zellen ohne Oberflächenexpresssion war sehr hoch, so dass insgesamt nur sehr wenige Zellen benötigt wurden.

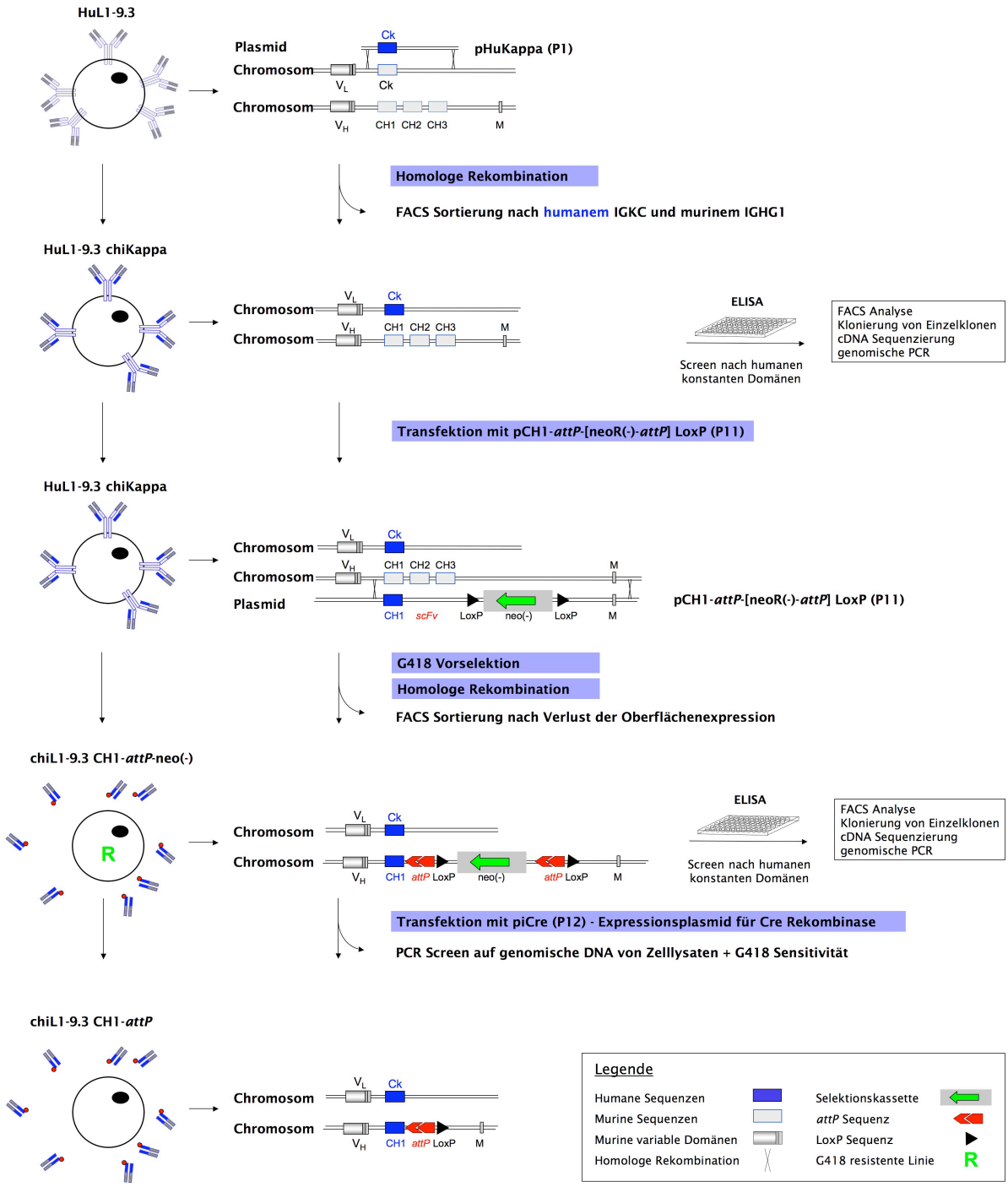


Abb. 3.18: Integration von *attP* Stellen in den Antikörperlokus der schweren Kette durch homologe Rekombination (HR). Die Gene für schwere und leichte Antikörperketten sind auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Gene der Maus sind als graue Boxen dargestellt, humane Gene als blaue Boxen. In einer ersten Transfektion mit dem Plasmid pHuKappa (P1, Anhang III) wird der Lokus der leichten Kette chimärisiert. Zellen werden nach der homologen Rekombination im FACS-Sorter durch differentielles Anfärben mit anti-human-Kappa Antikörpern (GAHu-kappa-FITC) bzw. anti-Maus-IgG1 Antikörpern (GAM-IgG1-PE) in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert. Positive Zellen durchlaufen einen zweiten Transfektionsschritt mit dem Plasmid pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP (P11). Hierbei werden im Lokus der schweren Antikörperkette die murinen Gene für *Hinge*, CH2 und CH3 entfernt und durch die eine humane CH1-*attP*-Fusion inklusive Selektionsmarker ersetzt. Positive Zellen werden nach erfolgter homologer Rekombination und G418 Vorselektion im FACS auf Verlust der Oberflächenexpression in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert. Überflüssige Plasmidsequenzen und Resistenzgene können in einem dritten Schritt mit der Cre Rekombinase aus dem Genom entfernt werden. Zellen sind dann wieder G418 sensitiv.

Die Zellen wurden 11 Tage kultiviert. 150 µL Zellen einer Platte wurden lysiert und als *template* für ein PCR Screening auf genomischer DNA eingesetzt (O16-f x O17-r). Von 90 getesteten Zellpools wiesen 4 Pools die korrekte Insert-Bande auf. Der Insertionslokus am 3' und 5' Ende der Transfektionskassetten wurde analog zu **Abb. 3.9** und mit den gleichen Primern ebenfalls mittels PCR auf Zelllysaten verifiziert und war für die 4 getesteten Klone korrekt. Der Pool chiL1-9.3 CH1-*attP*-neo(-) **G12** wurde als Kandidat zu Einzelklonen limitiert verdünnt und die Einzelklone im ELISA getestet (Beschichtung: GAHu-IgG1-γ *chain specific*; Detektion: GAHu-kappa-Biotin / SA-POX). Alle Klone waren positiv, was dafür sprach, dass der Pool G12 nach dem Sortieren bereits aus einem Einzelklon herangewachsen war. Der Einzelklon chiL1-9.3 CH1-*attP*-neo(-) **G12-1** wurde für weitere Schritte ausgewählt. Die Fusion der *attP* Stelle an die humane CH1 Domäne wurde durch Sequenzierung der cDNA (O27-f x O38-r) bestätigt.
Abschließend konnte die Resistenzkassette in der Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attP*-neo(-) **G12-1** wieder aus dem Genom eliminiert werden. Hierzu wurden 20µg DNA des Expressionsplasmids für die Cre-Rekombinase piCre in $1 \cdot 10^7$ chiL1-9.3 CH1-*attP*-neo(-) Zellen transfiziert und die Kultur nach 48 h zu Einzelklonen verdünnt. Zellen aus dichten Kulturen wurden mittels PCR auf genomischer DNA von Zelllysaten auf die erfolgreiche Deletion der neo^R(-) Kassette getestet. Zum Vergleich wurde die unbehandelte Kultur herangezogen. 50% der behandelten Zellen hatten das Resistenzgen verloren und 20% der Zellen waren wieder G418 sensitiv. Das Plasmid piCre wurde freundlicherweise von *Dr. G. Hämmerling* zur Verfügung gestellt (Molekulare Immunologie, DKFZ, Heidelberg).

Die für die spezifische Rekombination erforderliche Erkennungsstelle *attP*, wurde erfolgreich in den Lokus der schweren Antikörperkette eingebracht. Die ausgewählte Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attP* (G12-1.10) wurde in den folgenden Experimenten als Empfängerlinie für die φC31-vermittelte Integration eingesetzt. Die Zelllinie war wieder G418 sensitiv und produzierte ein chimärisiertes Fab-Fragment des ursprünglichen Maushybridomantikörpers HuL1-9.3.
Die resultierende Zelllinie und der entsprechende Antikörper erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie	chiL1-9.3 CH1-*attP*
Antikörper	Fab chiL1-9.3

3.2.1.2 φC31-vermittelte Fusion an die CH1 Domäne der schweren Antikörperkette

Analog zu Kapitel 3.1.2.5 erfolgte in einem weiteren Teilschritt die Klonierung von sog. Eingangsplasmiden. Die Eingangsplasmide für die Fusion an die schwere Antikörperkette wurden von den Plasmiden für die spezifische Rekombination in der leichten Kette abgeleitet (p*AttB*-Tags, P9 und p*AttB*-dsFvOKT3, P10). Die Plasmide enthielten weiterhin die *attB*-Sequenz als Gegenstück zur genomischen *attP* Sequenz, über welche die Integration in das Zielgenom stattfinden soll. Eingangsplasmide für die spezifische Rekombination in der schweren Kette enthielten jedoch zusätzlich die neo^{R}(-) Selektionskassette. Diese wurde per PCR (O39-f x O40-r) aus dem Plasmid pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP (P11) gewonnen, mit Überhängen für die Enzyme *Sac*I und *Afl*III flankiert und in die Plasmide p*AttB*-Tags bzw. p*AttB*-dsFvOKT3 einkloniert. Das resultierende Plasmid p*AttB*-Tags-neoR(-) (P12, **Abb. 3.19 A**) wurde zur Kontrolle der φC31-vermittelten Rekombination im Lokus der schweren Kette eingesetzt und ermöglichte die Erzeugung eines $_{Fab}$L1xTags_SSR Antikörpers. Das Plasmid p*AttB*-dsFvOKT3-neoR(-) (P13, **Abb. 3.19 B**) diente zur Herstellung des eigentlichen bispezifischen Antikörpers $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR in Hybridomen.

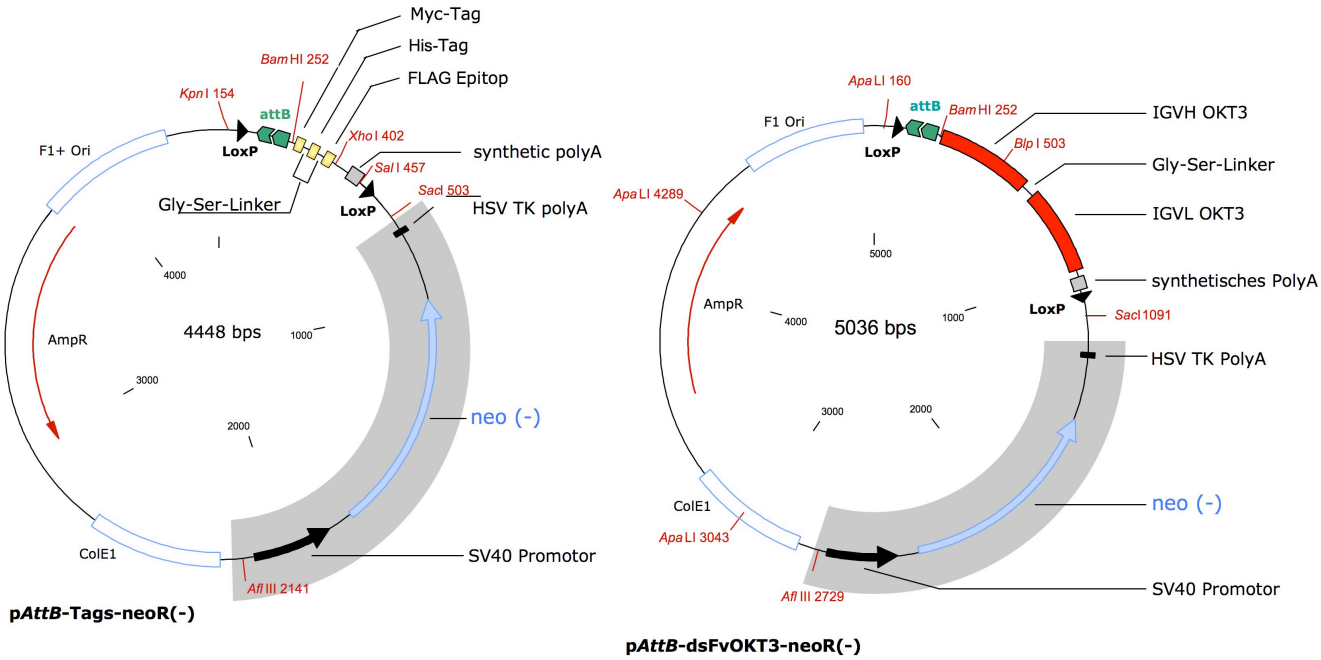


Abb. 3.19: Plasmidkarten der Eingangsplasmide p*AttB*-Tags-neoR(-) (P12) und p*AttB*-dsFvOKT3-neoR(-) (P13). Die Plasmide dienen der spezifischen Integration in den Lokus der schweren Antikörperkette als Fusionsproteine mit der humanen CH1 Domäne (Empfängerzelllinie chiL1-9.3 CH1-*attP*). *attB*, Erkennungsstelle der φC31 Integrase; LoxP, Erkennungsstelle der Cre Rekombinase; neoR(-), G418 Selektionskassette in inverser Orientierung (graue Box).

Die Eingangsplasmide wurden wie in **Abb. 3.20** dargestellt über spezifische Rekombination in die Empfängerlinie chiL1-9.3 CH1-*attP* (G12-1.10) eingebracht. Hierzu wurden 18 µg Ziel-DNA und 6 µg pPhiC31 DNA /Küvette in $1 \cdot 10^8$ Empfängerzellen kotransfiziert, mit G418 vorselektioniert und im FACS sortiert. Die Schwierigkeit dieser Transfektion lag darin, dass die Empfängerzellen chiL1-9.3 CH1-*attP* ein Fab-Fragment sezernierten und somit bereits die Oberflächenexpression verloren hatten. Positiv transzifierte Zellen konnten somit einzig über die Resistenzkassette angereichert werden. Zur Sortierung im FACS wurden die toten Zellen mittels PI gefärbt und ausgeschlossen und die Restzellen in 100er Pools sortiert. Pro Plasmid wurden lediglich $1{,}5 \cdot 10^6$ Zellen zum Füllen einer 96-Loch Platte im FACS benötigt. Die Platten wurden ca. 2 Wochen kultiviert. Die Überstände jeweils einer Kulturplatte wurden im ELISA nach in den Antikörpern enthaltenen Tags gescreent (Beschichtung: anti-myc-Ab; Detektion: GAHu-kappa-Biotin /SA-POX). Für den Antikörper $_{Fab}$L1xTags_neoR(-)_SSR kamen hierzu das myc-Tag und das His-Tag in Frage. Der kleine bispezifische Antikörper $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_neoR(-)_SSR besaß seinerseits einen myc-Linker. Ergänzt wurde das Screening-Verfahren durch PCR auf genomischer DNA von Zelllysaten der jeweiligen Testplatten (O41-f x O37-r). Für $_{Fab}$L1xTags_neoR(-)_SSR konnten so 8 positive Pools isoliert werden, für $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_neoR(-)_SSR sogar 12 positive Zellpools.
Die positiven Zellpools wurden im ELISA titriert und auf hohe Antikörperexpression hin analysiert. Die Zellen der Hybridomzelllinien chiL1-9.3 CH1-*attR*-Tags-neo(-) Pool **E10** und chiL1-9.3 CH1-*attR*-dsFvOKT3-neo(-) Pool **H3** wurden zu Einzelklonen verdünnt, erneut im ELISA gescreent und vielversprechende Kandidaten im ELISA titriert.
Die resultierende Zelllinie und der entsprechende Antikörper erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie	chiL1-9.3 CH1-*attR*-Tags-neo(-)
Antikörper	$_{Fab}$L1xTags_SSR

Zelllinie	chiL1-9.3 CH1-*attR*-dsFvOKT3-neo(-)
Antikörper	$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR

Die Linien wurden mit dem Plasmid piCre transfiziert, um die neo^R(-) Selektionskassette wieder aus dem Genom zu entfernen. Durch die Eliminierung der Resistenzkassette ging zwar der Selektionsdruck verloren, ermöglichte jedoch weitgehend die Wiederherstellung des endogenen Antikörperlokus der Hybridomzelle. Bei diesem Verfahren wurden Cre-vermittelte Rekombinationsraten von ca. 65% erzielt.

Wir waren davon ausgegangen, dass mit der Entfernung der neo^R(-) Kassette eine Erhöhung der Antikörperproduktionsrate auf das Niveau des Parentalantikörpers HuL1-9.3 einhergehenden würde. Eine Titration der Kulturüberstände vor bzw. nach Behandlung mit der Cre-Rekombainase ergab jedoch keinen markanten Unterschied. Beide rekombinanten Zelllinien sind in der Antikörperproduktionsrate der ursprünglichen Hybridomzelllinie HuL1-9.3 weit unterlegen. Aus diesem Grund wurden die Cre-behandelten Einzelklone lediglich eingefroren.

Die resultierende Zelllinie und der entsprechende Antikörper erhielten folgende Bezeichnung:

Zelllinie Antikörper	chiL1-9.3 CH1-*attR*-Tags $_{Fab}$L1xTags_neoR(-)_SSR	chiL1-9.3 CH1-*attR*-dsFvOKT3 $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_neoR(-)_SSR

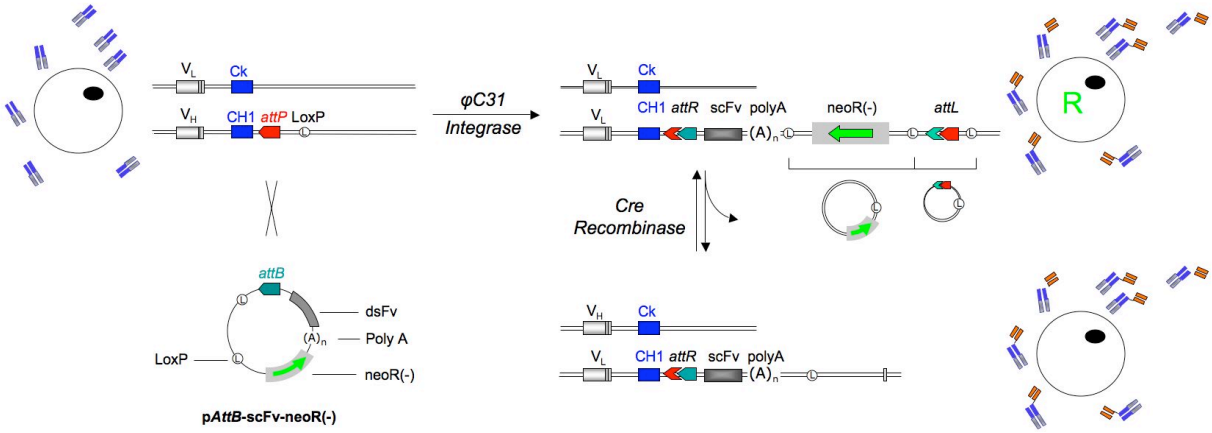


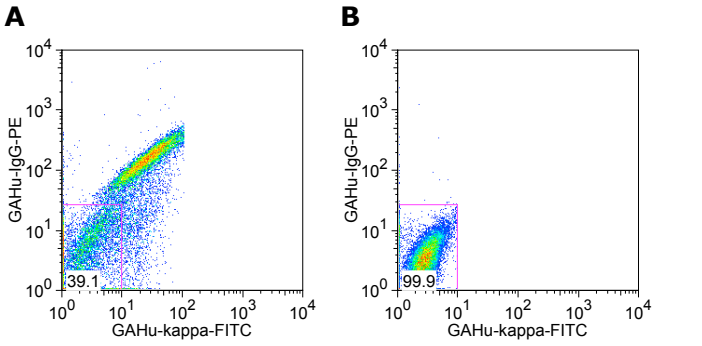
Abb. 3.20: Vorgehensweise zur spezifischen Rekombination von *attB*-Eingangsplasmiden in den Antikörperlokus der schweren Antikörperkette von Hybridomen. Die zu integrierenden Plasmide (p*AttB*-dsFv-neoR(-)) tragen eine *attB*-Sequenz als Gegenstück zu der im Genom der Empfängerlinie befindlichen *attP*-Sequenz. Spezifische Integration wird durch Cotransfektion der Plasmide mit dem eukaryontischen Expressionsvektor für die φC31 Integrase erreicht. Die Plasmide werden über *attP* und *attB* Stellen und unter Bildung chimärer *attachment* Stellen (*attL* und *attR*) vollständig in die genomische Sequenz eingeschleust. Das Neomycinresistenzgen ist flankiert durch LoxP Stellen und kann ein einem weiteren Transfektionsschritt mit einem Expressionsplasmid für die Cre Rekombinase (piCre) wieder aus dem Genom entfernt werden. Bei erfolgreicher Integration sezernieren Hybridomzellen bispezifische bispezifische Antikörper und sind wieder G418 sensitiv.

3.2.1.3 Das $_{Fab}$L1-Tags Fragment

Die Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attR*-Tags-neo(-) produzierte den Antikörper $_{Fab}$L1xTags_SSR. Hierbei handelte es sich um das Fab-Fragment des ursprünglichen Antikörpers HuL1-9.3. Das Fab-Framgent trug zudem am C-terminalen Ende der schweren Antikörperkette eine Aneinanderreihung verschiedener Tags.

Der Verlust der Oberflächenexpression durch die Fusion eines Tags am C-terminalen Ende der humanen CH1 Domäne konnte im FACS dokumentiert werden (**Abb. 3.21**). Konventionelle Hybridomkulturen variieren in ihrem membranständigen Expressionslevel. Der Anteil schwach exprimierender Zellen in einem Kulturgemisch betrug durchschnittlich zwischen 20% und 40% der lebenden Zellen (**A**). Diese Variation beruhte eventuell darauf, dass Zellen ihre Rezeptoren unter Stressbedingungen internalisieren. Um dem vorzubeugen, wurden die Zellen während der FACS Färbung möglichst auf Eis gehalten. Daher galt prinzipiell, dass die genaue Zusammensetzung von Zellkulturen, die den Antikörper vollständig ins Medium sezernierten, nicht im FACS analysiert werden konnten. Der genomische Integrationsort und vor allem der Übergang von der humanen CH1 Domäne zur Tag-Kassette über die Bildung einer chimären *attR*-Stelle wurde mittels PCR auf genomischer DNA und cDNA und Sequenzierung verifiziert (**Abb. 3.22**). Da die Zellen den $_{Fab}$L1xTags_SSR Antikörper vollständig in das Kulturmedium sezernierten, wurde getestet, ob während der Formatänderung in der Hybridomzelle die Bindungsfähigkeit an das Zielantigen L1CAM erhalten blieb. Dazu wurde der Kulturüberstand der chiL1-9.3-*attR*-Tags-neo(-) Zelllinie mit der Tumorzelllinie SKOV-3 inkubiert, die gebundenen Antikörper anschließend mit GAHu-kappa-FITC Antikörpern gefärbt und die Tumorzellen im FACS analysiert (**Abb. 3.23**). Das chimäre Fab-Fragment wurde hierbei mit dem konventionellen, jedoch chimärisierten Parentalantikörper chiL1-9.3 verglichen und band vergleichbar gut an die Zielzellen.

Da die Herstellung des Fab-Fragments lediglich als Kontrolle für die Etablierung des Transfektionsverfahrens dienen sollte, wurde der Antikörper nicht weiter charakterisiert.



chiL1-9.3

chiL1-9.3 CH1-attR-Tags-neoR(-) Einzelklon 13

Abb. 3.21: Verlust der Expression auf der Zelloberfläche bei der Fusionen an die CH1 Domäne der schweren Kette. $1 \cdot 10^7$ HuL1-9.3 Zellen wurden mit GAHu-kappa-FITC und GAHu-IgG-PE Antikörperm gefärbt und im FACS analysiert. Tote Zellen wurden mit PI markiert und herausfiltriert. **A**, chiL1-9.3 präsentiert chimärisierte Antikörper auf der Zelloberfläche; **B**, chiL1-9.3 CH1-attR-Tags-neoR(-) Zellen, die durch Fusion eines Tags an das C-terminale Ende der humanen CH1 Domäne modifiziert wurden, haben die Oberflächenexpression verloren und sezernieren Fab-Fragmente mit parentaler Spezifität.

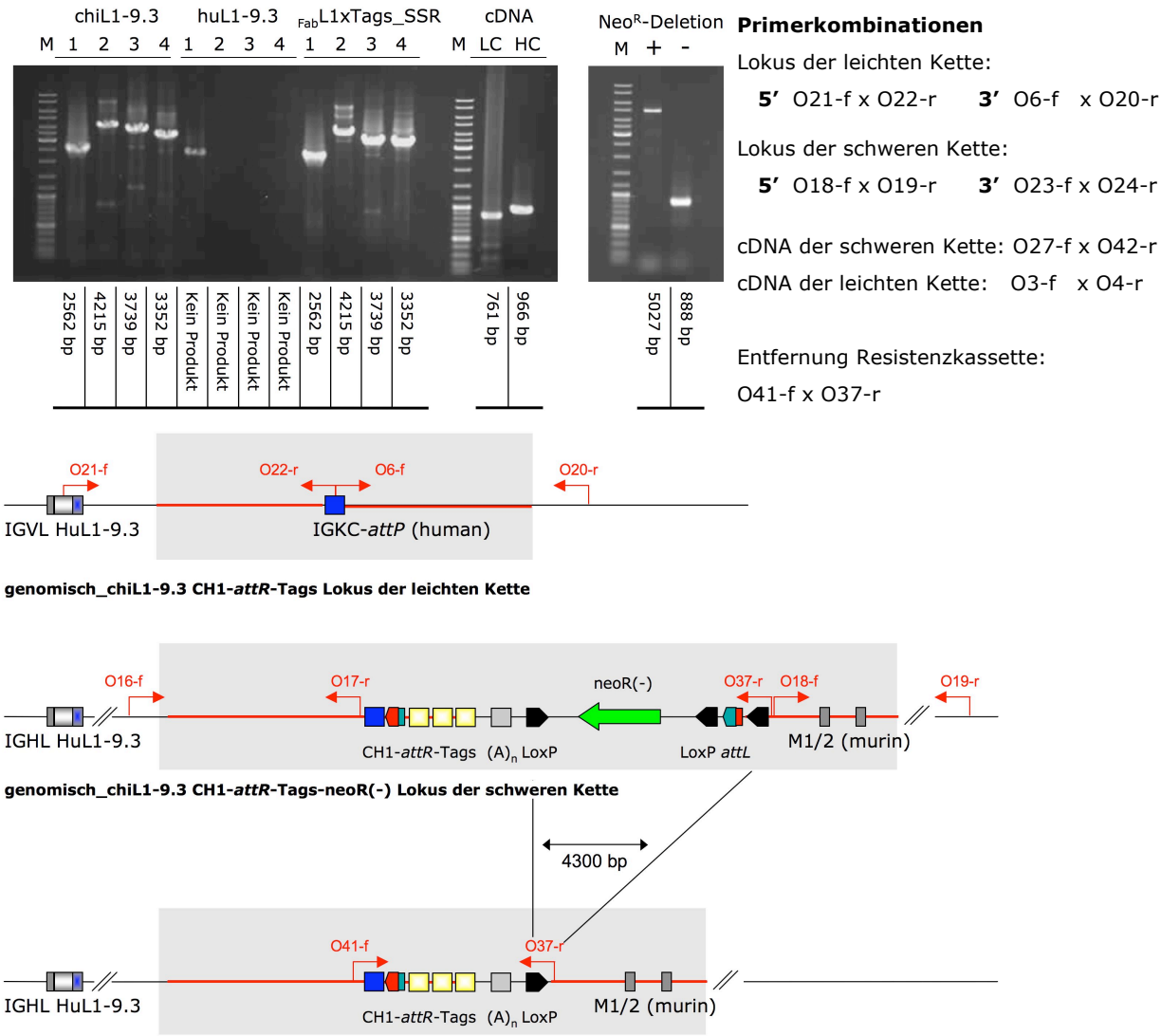
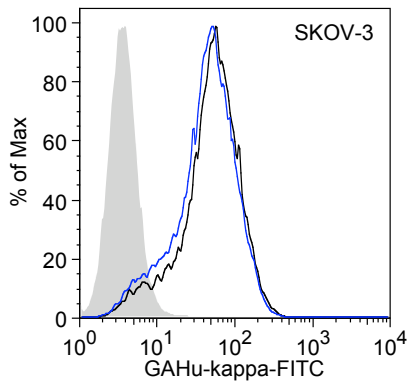


Abb. 3.22: Nachweis des genomischen Integrationsortes. Der Integrationsort wurde mittels PCR auf genomischer DNA verifiziert. Primerpaare liegen so, dass ein Primer innerhalb der Transfektionskassette (grau) und der Gegenprimer im Mausgenom bindet. IGVL, Variable Domäne der leichten Antikörperkette; IGKC, konstante Domäne der leichten kappa Antikörperkette; (A)n, synthetische Polyadenylierungssequenz; LoxP, Erkennungsstelle der Cre Rekombinase; *attR* und *attL*, chimäre Erkennungsstellen der φC31 Integrase; neoR(-), Selektionskassette. Rote Sequenzbereiche entsprechen den Maus flankierenden Bereichen der HR.



chiL1-9.3 CH1-attR-Tags-neoR(-)
Einzelklon 13

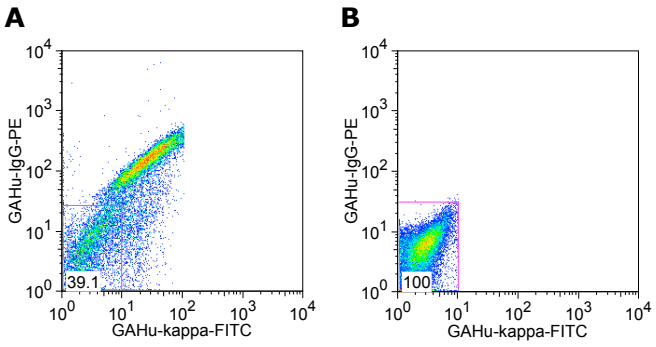
HD20
chiL1-9.3
FabL1xTags_SSR

Abb. 3.23: Bindung des chimärisierten FabL1xTags_SSR Antikörpers an Zielzellen. Das Fab-Fragment FabL1xTags_SSR wurde auf Bindung an die L1CAM positive Tumorzelllinie SKOV-3 getestet. Die Bindung war vergleichbar zur Positivkontrolle.
HD20, irrelevanter Antikörper, Negativkontrolle;
chiL1-9.3, chimärisierter anti-L1CAM Antikörper, Positivkontrolle;
FabL1xTags_SSR chimärisiertes Fab-Fragment. Filter auf PI negative Zellen.

3.2.1.4 Der bispezifische Antikörper $_{Fab}L1x_{dsFv}OKT3_SSR$

Für die Analyse des chimärisierten, bispezifischen Antikörpers $_{Fab}L1x_{dsFv}OKT3_SSR$ wurde wie bei der Analyse des chimären Fab-Fragments vorgegangen. Auch der bispezifische Antikörper wurde vollständig in das umgebende Kulturmedium sezerniert. Die mittels spezifischer Rekombination erzeugte Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attR*-dsFvOKT3-neoR(-) wurde im FACS auf abwesende Oberflächenexpression hin analysiert (**Abb. 3.24**) und der genomische Integrationsort analog zu Kapitel 3.2.1.3 und mit denselben Primerkombinationen überprüft (**Abb. 3.25**). Die genomischen Daten erwiesen sich als korrekt.

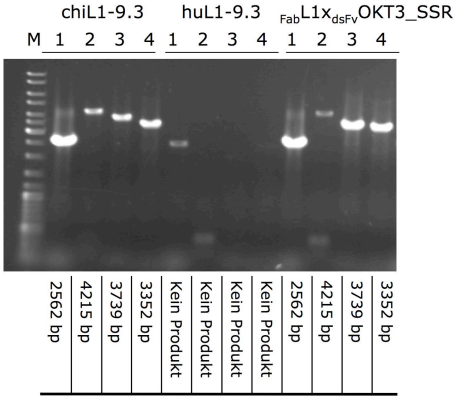
Auch hier wurde die Bindung des bispezifischen Antikörpers an die jeweiligen Zielzellen anhand des Kulturüberstandes der Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attR*-dsFvOKT3-neoR(-) getestet. Der bispezifische Antikörper hatte Spezifitäten für das L1CAM Antigen und den CD3 Komplex des T-Zellrezeptors. Die Bindungen wurden jedoch getrennt voneinander analysiert. Aus Abbildung **3.26** ist zu entnehmen, dass die Bindungseigenschaften des parentalen Antikörpers chiL1-9.3 auf der L1CAM positiven Tumorzelllinie erhalten geblieben sind (**A**). Der Anteil, der durch den neu zusammengesetzten *single-chain* Antikörper dsFvOKT3 eingebracht wurde, erwies sich auf CD3-positiven Jurkat jedoch als sehr schwach affin (**B**). Auch die Analyse weiterer Einzelklone dieses Typs brachte keine Verbesserung mit sich.



chiL1-9.3

chiL1-9.3 CH1-attR-dsFvOKT3-neoR(-) Einzelklon 13

Abb. 3.24: Verlust der Expression auf der Zelloberfläche bei der Fusionen an die CH1 Domäne der schweren Kette. $1 \cdot 10^7$ HuL1-9.3 Zellen wurden mit GAHu-kappa-FITC und GAHu-IgG-PE Antikörperm gefärbt und im FACS analysiert. Tote Zellen wurden mit PI markiert und herausfiltriert. **A**, chiL1-9.3 präsentiert chimärisierte Antikörper auf der Zelloberfläche; **B**, chiL1-9.3 CH1-attR-dsFvOKT3-neoR(-) Zellen, die durch Fusion eines Tags an das C-terminale Ende der humanen CH1 Domäne modifiziert wurden, haben die Oberflächenexpression verloren und sezernieren Fab-Fragmente mit parentaler Spezifität.



Primerkombinationen

Lokus der leichten Kette:

5' O21-f x O22-r **3'** O6-f x O20-r

Lokus der schweren Kette:

5' O18-f x O19-r **3'** O23-f x O24-r

Abb. 3.25: Nachweis des genomischen Integrationsortes. Der Integrationsort wurde mittels PCR auf genomischer DNA verifiziert. Primerpaare wurden so gewählt, dass jeweils ein Primer innerhalb der Transfektionskassette und der Gegenprimer im Mausgenom bindet.

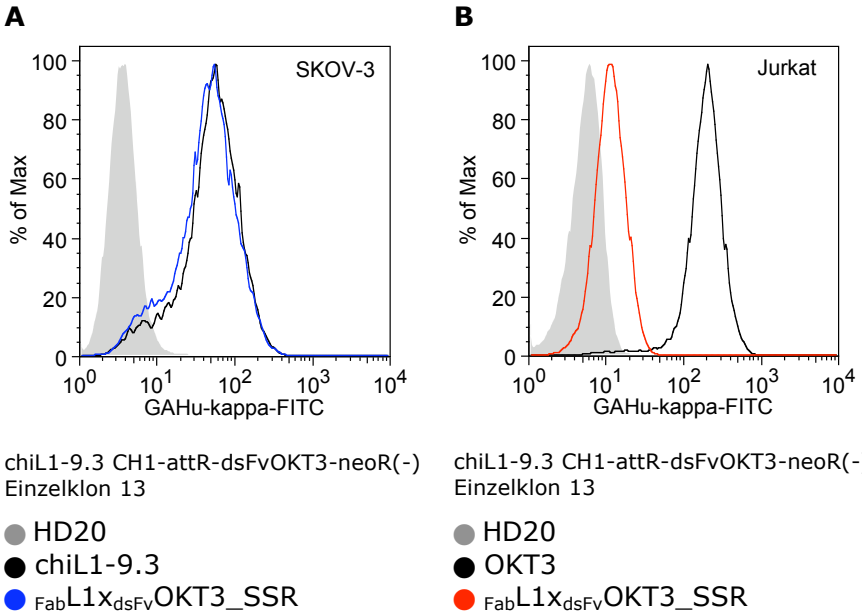


Abb. 3.26: Bindung des bispezifischen FabL1xdsFvOKT3_SSR Antikörpers an Zielzellen. Der chimärisierte bispezifische antikörper FabL1xdsFvOKT3_SSR wurde auf Bindung an die jeweiligen Zielantigene getestet.
A) Bindung an die L1CAM positive Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Bindung war vergleichbar zur Positivkontrolle. HD20, irrelevanter Antikörper, Negativkontrolle; chiL1-9.3, chimärisierter Antikörper.
B) Bindung an die CD3 positive Zelllinie Jurkat. Der bispezifische Antikörper FabL1xdsFvOKT3_SSR bindet im Vergleich zur Positivkontrolle nur sehr schwach an die Zielzellen. HD20, irrelevanter Antikörper, Negativkontrolle; OKT3, muriner anti-CD3-Antikörper, Positivkontrolle.

In diesem Kapitel konnte der genomische Lokus der schweren Antikörperkette durch den Einsatz einer Kombination aus homologer und spezifischer Rekombination erfolgreich neu gestaltet werden. Diese Methode ermöglichte die Fusion von dsFvOKT3-Fragmenten an die CH1 Domäne, welche zuvor humanisiert worden war. Dieses Verfahren setzte die Erzeugung einer Empfängerzelllinie voraus, deren Generierung den zeitaufwendigsten Anteil darstellte. Die spezifische Rekombination erwies sich methodisch jedoch als weit effizienter als die bislang eingesetzte homologe Rekombination. Sollte sich bestätigen, dass die *attR*-Peptidsequenz tatsächlich zum Affinitätsverlust der *single-chain* Antikörper beiträgt, könnte diese Erkennungsstelle für die SSR auch innerhalb eines Intons platziert werden und müsste so nicht zwangsläufig in der Proteinsequenz des Antikörpers enthalten sein.

3.2.2 Herstellung bispezifischer Antikörper mittels Homologer Rekombination

3.2.2.1 Klonierung eines Austauschvektors für die schwere Antikörperkette

Der Antikörper dsFvOKT3.V2

Der dsFvOKT3.V2 Antikörper besteht aus den variablen Domänen der schweren (IGVH OKT3) und leichten Antikörperkette (IGVL OKT3) von OKT3, die nun über einen $(G_3S)_3$-Linker miteinander verknüpft wurden. Anstelle des myc-Tags innerhalb des Linkers, wurde ein $(His)_{10}$-Tag an das C-terminale Ende des *single-chain* Fragments angefügt, der mit dem Stop-Codon abschließt. Der N-terminale *attachment*-Linker aus dsFvOKT3 wurde ebenfalls durch einen leicht verkürzten $(G_3S)_2$-Linker ersetzt. Für den dsFvOKT3.V2 Antikörper wurde die in Kapitel 3.1.1.2 beschriebene Disulfidbrücke beibehalten, durch die die Stabilität des dsFvOKT3.V2 Antikörpers erhöht werden soll.

Plasmide zur Fusion von dsFv-Fragmenten an die leichte Kette per HR

Die neue dsFvOKT3.V2 Kassette wurde mit *Spe*I und *Asu*II Restriktionsstellen flankiert und von der Firma GeneArt für die Expression in murinen Zelllinien Codon-optimiert.

Die dsFvOKT3.V2 Kassette enthält zusätzlich die synthetische Polyadenylierungssequenz des pACT Plasmides (An). Vorexperimente mit ähnlichen Konstrukten hatten gezeigt, dass diese zusätzliche PolyA Stelle für die Expression der Fusionsproteine in unserem System zwingend erforderlich war. Hintergrund hierzu war, dass bei der Rekombination die Insertion der Selektionskassette neo^R(-) eine Verschiebung im Lokus der schweren Kette stattfand. Diese verursachte eine Vergrößerung der Distanz zwischen Stop-Codon und endogenem PolyA-Signal des Antikörperlokus um ca. 4 kbp, so dass die rekombinanten bsAk die endogene Polyadenylierungssequenz des Antikörperlokus der schweren Kette nicht nutzen konnten.

Die dsFvOKT3.V2 Kassette wurde über *Spe*I und *Asu*II Stellen in den Austauschvektor pCH1-*attP*-[neo(-)-*attP*] LoxP (P11) direkt hinter die humane CH1 Domäne kloniert. Die *attP*-[neo(-)-*attP*] LoxP Kassette aus P11 wurde hierbei eliminiert und in einem weiteren Schritt durch eine LoxP-neo^R(-)-LoxP Kassette ersetzt (PCR O43-f x O44-r auf P12, *Sal*I, *Asu*II Überhänge). Das entstandene Plasmid **pCH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) (P14, Abb. 3.27)** enthielt nun den vollständigen Satz an Genen um die Fusion von dsFvOKT3.V2 an die CH1 Domäne über homologe Rekombination zu ermöglichen. D.h. die Genkassette CH1-dsFvOKT3.V2 wurde von ca. 3000 bp Maus flankierenden Bereichen flankiert, die homolog zum endogenen Antikörperlokus waren.

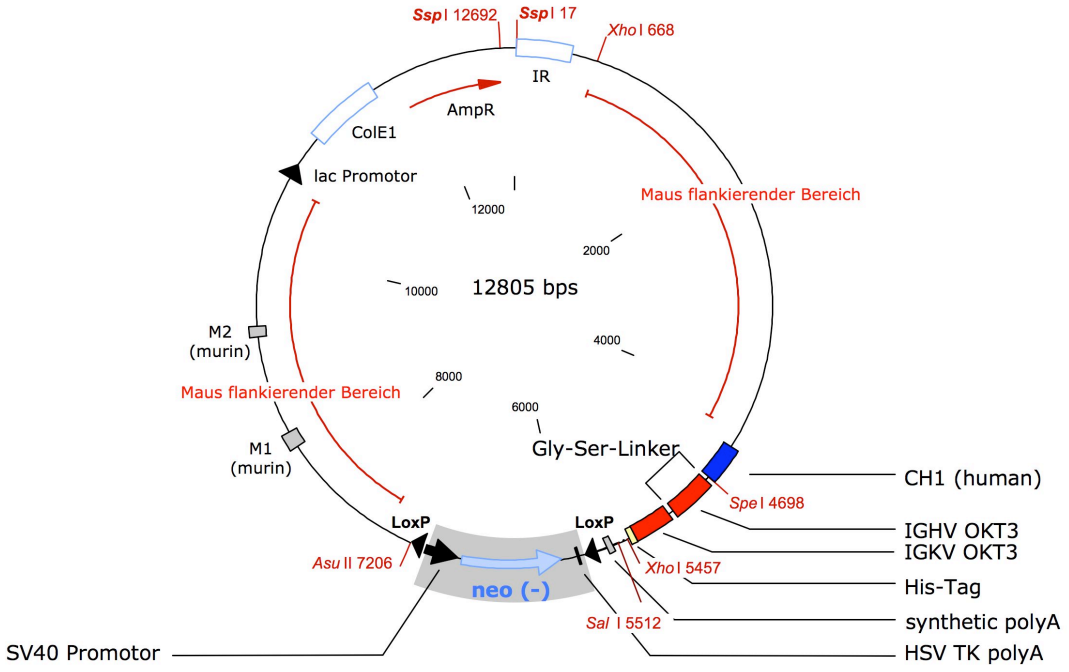


Abb. 3.27: Plasmidkarte des Austauschvektors pCH1-dsFvOKT2.V2-neoR(-) (P14) zur homolgen Rekombination im Lokus der schweren Antikörperkette. Das Plasmid leitet sich von pHuIGHG1 zur Chimärisierung der konstanten Domänen der schweren Kette. CH2 und CH3 Domänen wurden entfernt und die humane CH1 Domäne stattdessen über einen Glycin-Serin-Linker an einen *single-chain* Antikörper gegen CD3 fusioniert. Maus flankierende Bereiche dienen der homologen Rekombination in Hybridomen. neoR(-), Selektionskassette in inverser Orientierung; LoxP, Erkennungsstellen der Cre Rekombinase.

3.2.2.2 Herstellung von bispezifischen Antikörpern

Der Austauschvektor pCH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) (P14) wurde zur Transfektion zweier Hybridomzelllinien eingesetzt. HuL1-9.3 ist bereits aus zuvor beschriebenen Versuchsreihen bekannt. Das Hybridom HEA125 exprimiert einen anti-EpCAM Mausantikörper und lieferte somit analog zu HuL1-9.3 den Tumor bindenden Anteil des bispezifischen Antikörpers. Beide Linien waren zuvor in den konstanten Domänen ihrer leichten Kette chimärisiert worden (HuL1-9.3 chiKappa und HEA125 chiKappa, **s. Abb. 3.28**). Zur homologen Rekombination wurden jeweils 180µg mit *Ssp*I linearisierte Plasmid-DNA in $1 \cdot 10^8$ Zielzellen transfiziert, positive Transfektanten durch G418 Vorselektion angereichert und die Zellen im FACS auf Verlust der Oberflächenexpression sortiert. PI positive, tote Zellen wurden bei der Analyse diskriminiert. HuL1-9.3 chiKappa und HEA125 chiKappa Zellen, die weiterhin in der Kultur vorhanden waren und der G418 Selektion entronnen sind, wurden jeweils mit GAHu-kappa-PE /GAM-IgG-FITC Antikörpern markiert und abgetrennt. Dichte Kulturüberstände von 2-5 Testplatten wurden im ELISA nach sezernierten bsAk getestet (Beschichtung: GAHu-IgG1-γ-specific; Detektion: GAHu-kappa-Biotin / SA-POX).

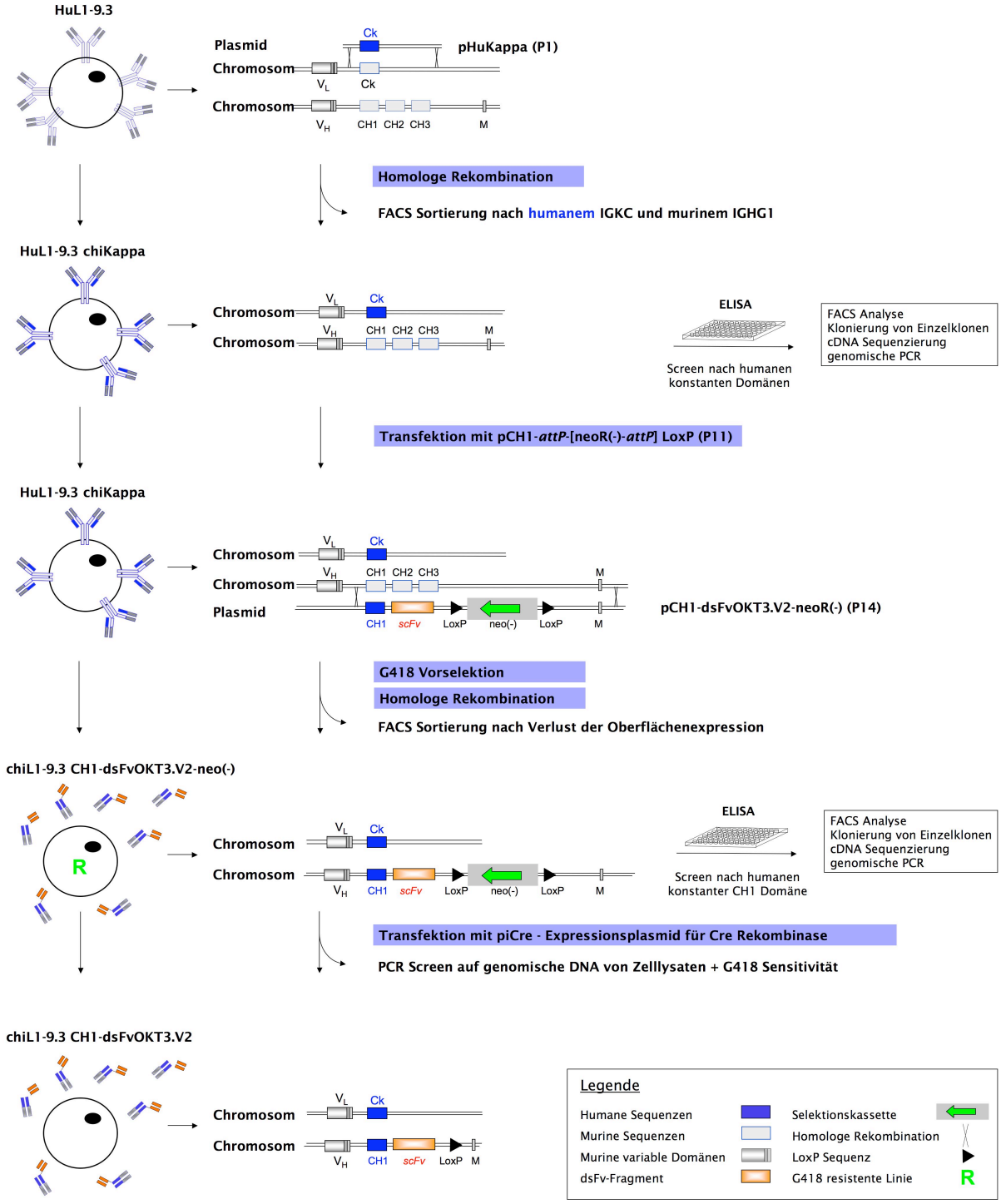


Abb. 3.28: Integration von *single-chain* Fragmenten in den Antikörperlokus der schweren Kette durch homologe Rekombination (HR). Die Gene für schwere und leichte Antikörperketten sind auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Gene der Maus sind als graue Boxen dargestellt, humane Gene als blaue Boxen. In einer ersten Transfektion mit dem Plasmid pHuKappa (P1, Anhang III) wird der Lokus der leichten Kette chimärisiert. Zellen werden nach der homologen Rekombination im FACS durch differentielles Anfärben mit anti-human-Kappa (GAHu-kappa-FITC) bzw. anti-Maus-IgG1 Antikörpern (GAM-IgG1-PE) in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert. Positive Zellen durchlaufen einen zweiten Transfektionsschritt mit dem Plasmid pCH1-dsFvOKT3.V2-neoR(-) (P14). Hierbei werden im Lokus der schweren Antikörperkette die murinen Gene für *Hinge*, CH2 und CH3 entfernt und durch die eine humane CH1-dsFvOKT3.V2-Fusion inklusive Selektionsmarker ersetzt. Positive Zellen werden nach erfolgter homologer Rekombination und G418 Vorselektion im FACS auf Verlust der Oberflächenexpression in 96-Loch Platten sortiert und im ELISA detektiert. Überflüssige Resistenzgene können in einem dritten Schritt mit der Cre Rekombinase aus dem Genom entfernt werden.

Die Analyse der Transfektionen ermöglichte die Identifikation mehrerer Zellpools, in denen die Formatänderung zu bispezifischen Antikörpern vollzogen wurde. Die beiden sich hieraus ergebenen Zelllinien wurden die im Folgenden genauer untersucht.

Zelllinie	chiL1-9.3 CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-)
Antikörper	$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2

Zelllinie	chiHEA125 CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-)
Antikörper	$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2

Die Reinheit der Populationen wurde im FACS durch Färbung der Zellen mit GAM-IgG-FITC /GAHu-kappa-PE analysiert (**Abb. 3.29**). Die ursprünglich transfizierten Mutterzellen (**A**, HEA125 chiK bzw. **D**, HuL1-9.3 chiK) exprimierten membranständige Mensch/Maus hybride Antikörper auf ihrer Zelloberfläche. In positiven Pools (**B** bzw. **E**) hatte ein beträchtlicher Anteil dieser Zellen nach der FACS Sortierung die Oberflächenpräsentation verloren und die Formatänderung zu bispezifischen Antikörpern erfolgreich vollzogen. Kontaminierende Mutterzellen konnten durch limitierte Verdünnung der Pools zu Einzelklonen aus dem Gemisch verdrängt werden (**C** bzw. **F**).

Versuch $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2

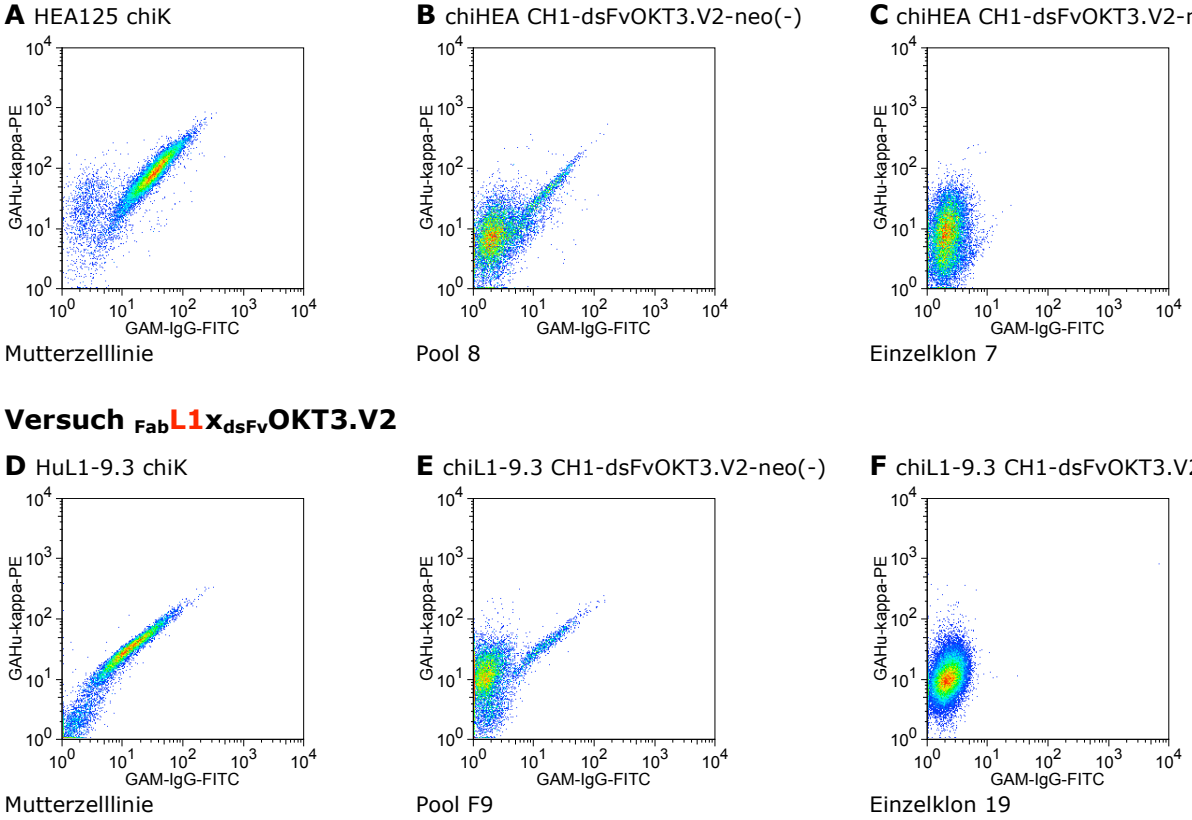


Abb. 3.29: FACS Analyse von Transfektanten nach homologer Rekombination. Zellen wurden mit GAM-IgG-FITC und GAHu-kappa-PE Antikörpern doppelt gefärbt und im FACS analysiert. Der GAHu-kappa-Antikörper ist gegen murine Antikörper absorbiert. Der GAM-IgG-Antikörper ist gegen humane Antikörpervarianten absorbiert. **A-C,** Zelllinien und Transfektanten zur Erzeugung von chiHEA CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-); **D-F,** Zelllinien und Transfektanten zur Erzeugung von chiL1 CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-).

Die korrekte Integration im Genom der Hybridomlinien wurde gemäß den Versuchsprotokollen aus Vorexperimenten geprüft. Zur PCR auf Zelllysaten wurden die in **Abb. 3.30** aufgelisteten Primer aus dem Testpaket für die 3′ und 5′ Enden beider Antikörperketten und der cDNA Synthese eingesetzt. Die Eliminierung der neo^R(-) Selektionskassette mittels Cre wurde ebenfalls mittels genomischer PCR nachgewiesen.

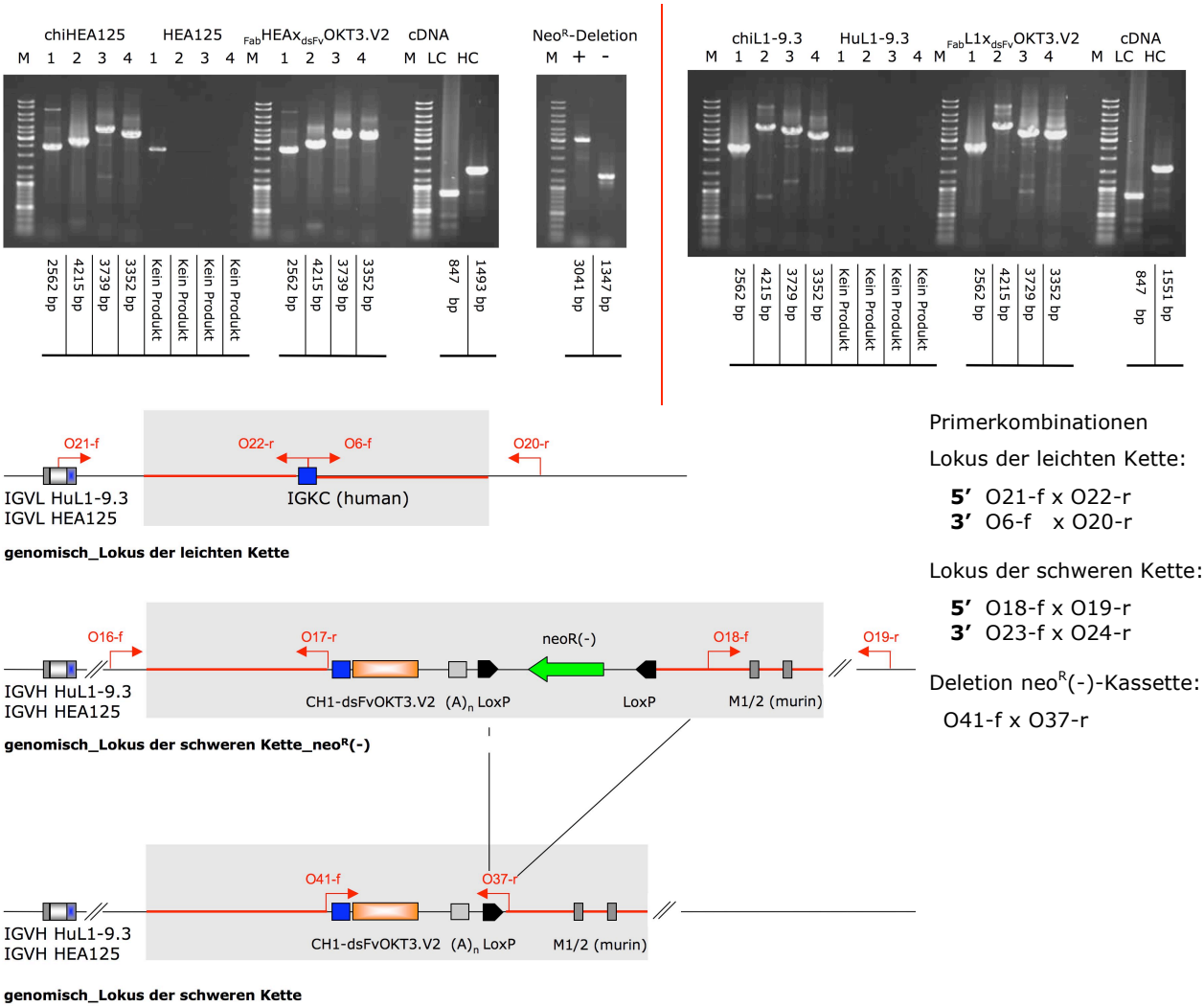


Abb. 3.30: Nachweis des genomischen Integrationsortes. Der Integrationsort wurde mittels PCR auf genomische DNA verifiziert. Primerpaare liegen so, dass ein Primer innerhalb der Transfektionskassette (grau) und der Gegenprimer im Mausgenom bindet. IGVL, Variable Domäne der leichten Antikörperkette; IGVH, Variable Domäne der schweren Antikörperkette; IGKC, konstante Domäne der leichten kappa Antikörperkette; (A)n, synthetische Polyadenylierungssequenz; LoxP, Erkennungsstelle der Cre Rekombinase; neo^R(-), Selektionskassette. Rote Sequenzbereiche entsprechen den Maus flankierenden Bereichen zur HR.

Als wichtiger Anhaltspunkt galt die Untersuchung der Bindungseigenschaften der beiden Antikörper an ihre jeweiligen Zielantigene. Die Zelllinie chiHEA CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-) sezernierte den bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2, der Spezifitäten gegen EpCAM und CD3 in sich vereinte. Der Überstand dieser Kultur wurde entsprechend dazu verwendet, um EpCAM positive Colonkarzinomzellen (Colo205) bzw. CD3 positive Jurkat Zellen zu färben. Die Bindung des Antikörpers wurde durchflusszytometrisch mit dem FITC-markierten GAHu-kappa Antikörper gemessen. Aus Abbildung **3.31 A** ist zu

entnehmen, dass beide Bindungsarme des $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 Antikörpers funktional waren und die Intensität der Signale mit denen der Positivkontrollen vergleichbar ist. Die Zelllinie chiL1 CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-) exprimierte die modifizierte Antikörpervariante $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2, welche die Antigene L1CAM und CD3 zum Ziel hatte. Dementsprechend wurden L1CAM positive Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3) bzw. CD3 positive Jurkat Zellen mit dem bispezifischen Antikörper gefärbt (**Abb. 3.33 B**). Die Bindungseigenschaften erwiesen sich auch für die optimierte Proteinsequenz (dsFvOKT3 *vs.* dsFvOKT3.V2) als problematisch. Während die Spezifität für das L1CAM Antigen auf SKOV-3 Zellen stark reduziert war, schien das CD3 Molekül auf Jurkat Zellen kaum erkannt zu werden.

Der Antikörpergehalt in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA abgeschätzt. Hierbei fiel auf, dass der Kulturüberstand der Zelllinie chiL1 CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-) im direkten Vergleich mit chiHEA CH1-dsFvOKT3.V2-neo(-) weniger Protein enthielt, und eine Verdünnung des Überstandes sehr schnell zu Signalverlusten führte. Die Unterschiede in der Bindung könnten somit daran liegen, dass zur FACS Färbung eine zu geringe Antikörpermenge eingesetzt wurde.

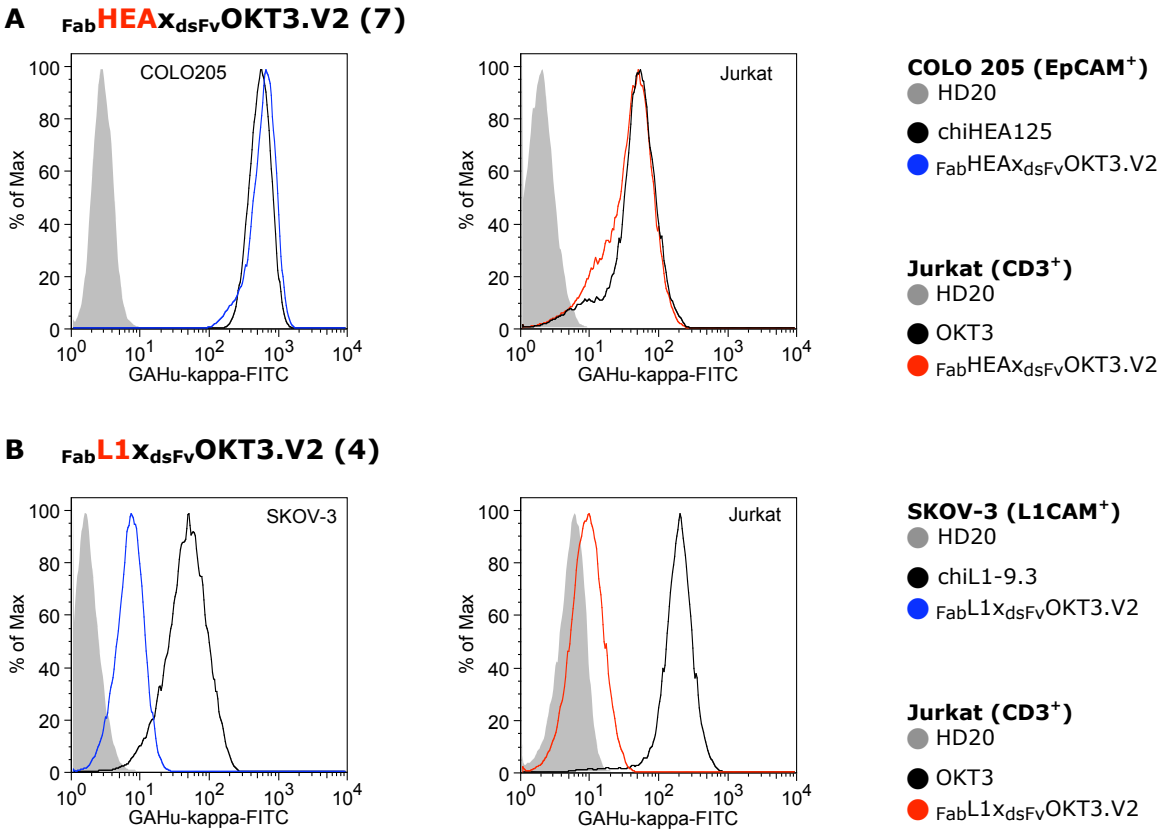


Abb. 3.31: Bindung der bispezifischen Antikörper an Zielzellen. A) Bindung des bispezifischen Antikörpers FabHEAxdsFvOKT3.V2 an Colo 205 bzw. Jurkat. Die Bindung war vergleichbar zu der jeweiligen Positivkontrolle chiHEA125 bzw. OKT3. **B)** Bindung des bispezifischen Antikörpers FabL1xdsFvOKT3.V2 an SKOV-3 bzw. Jurkat. Es sind Einbußen in der Affinität zu beiden Zielantigenen zu beobachten.
HD20, irrelevanter Antikörper, Negativkontrolle; OKT3, muriner anti-CD3-Antikörper, Positivkontrolle; chiL1-9.3, Positivkontrolle; chiHEA125, Positivkontrolle; SKOV-3, L1CAM positive Ovarialkarzinomzelllinie; Colo205, EpCAM positive Colonkarzinomzelllinie; Jurkat, CD3 positive Zelllinie.

3.2.3 Herstellung bispezifischer Antikörper in HEK 293T Zellen

Zur Herstellung rekombinanter Antikörper werden verbreitet HEK 293T Zellen eingesetzt. Die bispezifischen Antikörper $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 und $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 wurden zum besseren Vergleich auch mit diesem etablierten Expressionssystem hergestellt.

Die Sequenzen der Antikörper wurden aus den Vorversuchen abgeleitet und zur Expression in HEK 293T Zellen modifiziert. Die variablen Domänen wurden mittels PCR aus den Hybridomen HEA125 und HuL1-9.3 gewonnen. Die Gensequenzen für schwere und leichte Antikörperkette wurden entsprechend der Abbildung **3.32** hintereinander geschaltet und über das 23 Aminosäuren lange 2A-Peptid miteinander verbunden. Bei der Synthese des Proteins erfolgte an der 2A-Sequenz eine autokatalytische Spaltung, wodurch beide Antikörperketten voneinander getrennt wurden und sich zur Faltung aneinanderlagern können. Die kodierenden Bereiche wurden von der Firma GeneArt für die Expression in humanen HEK 293T Zellen Codon optimiert. Die Genkassetten wurden über die Restriktionsschnittstellen für *Hind*III und *BamH*I/*Bcl*I in einen Standardvektor unter Kontrolle des konstitutiv exprimierten CMV Promotors kloniert. **Abb. 3.32** zeigt einen Ausschnitt aus den Expressionsplasmiden pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2-IGK (P15) und pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V2-IGK (P16).

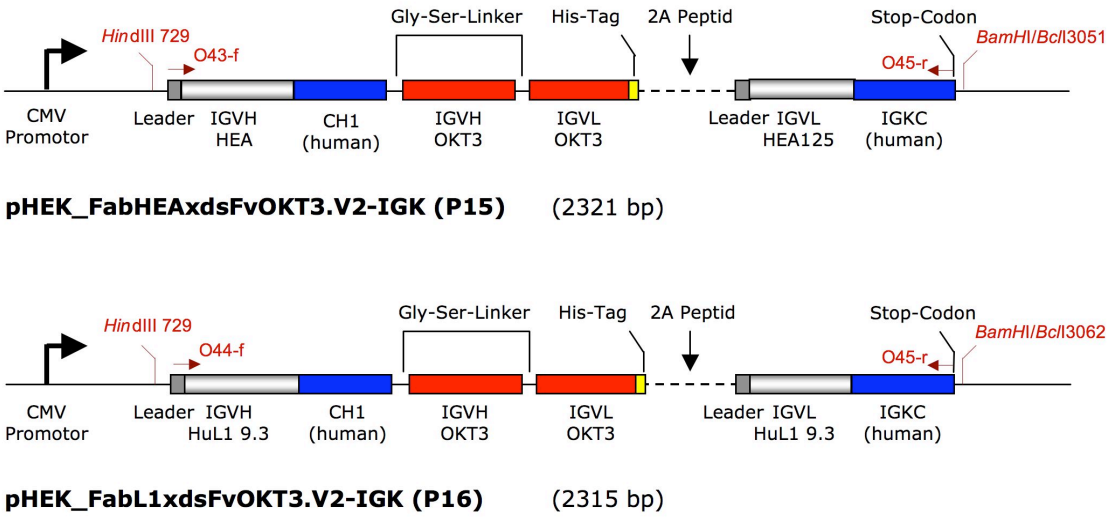


Abb. 3.32: Ausschnitt aus den Plasmidkarten der HEK 293T-Expressionsplasmide pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2-IGK (P15) und pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V2-IGK (P16). Gene für schwere und leichte Antikörperketten wurden ein einem Leseraster hintereinander geschaltet und wurden auf Proteinebene am 2A-Peptids proteolytisch voneinander getrennt. IGVH HEA und IGVL HEA, variable Domänen des Hybridoms HEA125; IGVH HuL1-9.3 und IGVL HuL1-9.3, variable Domänen des Hybridoms HuL1-9.3; IGHV und IGVL OKT3, variable Domänen des Antikörpers OKT3, der in Form eines disulfidbrückenstabilisierten dsFv-Fragment eingesetzt wurde.

Die Plasmide wurden mit dem Plasmid pZeo^R (P20), welches den Zellen eine Zeocinresistenz vermittelt, transfiziert. Zeocin-resistente Zellen wurden nach 3-4 Wochen direkt von der Kulturschale gepickt und als Einzelklone expandiert. In ca. 50% der Zeocin

resistenten HEK-Klone konnte im ELISA der jeweilige bispezifische Antikörper im Kulturmedium nachgewiesen werden und gute Produzenten ausgewählt werden (Beschichtung:GAHu-IgG-γ; Detektion: GAHu-kappa-Biotin/ SA-POX). Von Klonen, die die Genkassette stabil in ihr Genom integriert hatten, wurden Langzeitkulturen angesetzt.
Es wurden zwei stabile, antikörperproduzierende HEK-Zelllinien generiert:

Zelllinie	HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2-zeo^{R}
Antikörper	HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2

Zelllinie	HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2-zeo^{R}
Antikörper	HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2

Die cDNA wurde aus der Gesamt-RNA der HEK Zellen unter Vollverdau der genomischen DNA und anschließender RT-PCR hergestellt. Die Transkripte wurden mittels PCR nachgewiesen (**Abb. 3.33**) und wurden zur Kontrolle sequenziert.

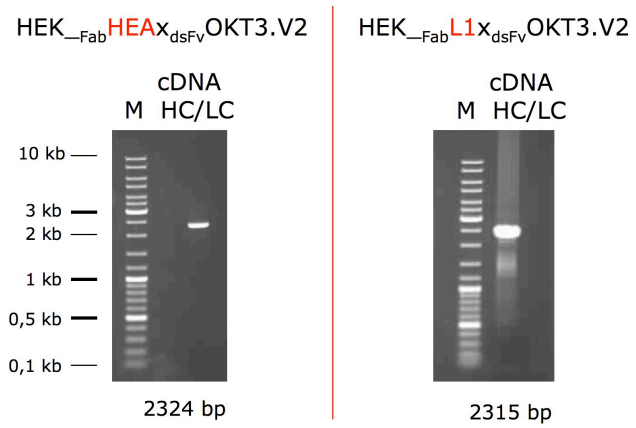


Abb. 3.33: Nachweis von Transkripten durch RT-PCR. Die Expression der Antikörpergene wurde durch PCR auf die gesamt cDNA der Zelle nachgewiesen. Schwere (HC) und leichte (LC) Ketten befanden sich auf einem mRNA Strang. Die Position der Primer ist aus Abb. 3.34 zu entnehmen. Produktgrößen sind im Gel angegeben.

Primerkombinationen:

HEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2: O43-f x O45-r

HEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2: O44-f x O45-r

Die Überprüfung der Bindungseigenschaften der in den Überständen der HEK-Klone enthaltenen Antikörper ergab die in **Abb. 3.34** dargestellten Ergebnisse und wurde analog zu der Analyse der bispezifischen Antikörper in Kapitel 3.2.2.2 durchgeführt.
Der Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 (**B**) erwies sich hier als voll funktionsfähig und band uneingeschränkt an seine Zielantigene L1CAM und CD3 auf den Tumorzelllinien SKOV-3 bzw. Jurkat. Dagegen konnte mit dem bispezifischen Antikörper HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 (**B**) keine vollständige Bindungssättigung auf CD3 positiven Jurkat Zellen erreicht werden. Der anti-EpCAM Anteil dieses Antikörpers band jedoch an Colo205 Zellen (EpCAM^{+}) und dies mit einer Fluoreszenzintensität, die den Positivkontrollen sehr nahe kam.
Wichtig war an dieser Stelle die Feststellung, dass sich die in HEK 293T Zellen exprimierten Antikörper genau umgekehrt zu den in Hybridomen produzierten Äquivalenten verhielten. Dies traf sowohl auf die Produktivität der Zelllinie, als auch auf deren Fähigkeit zu, ihr Zielmolekül zu erkennen. Während der Antikörper aus

Abb. 3.31 B (Hybridom) kaum an Jurkat Zellen band, wich die Signalstärke des Antikörpers aus **Abb. 3.34 B** (HEK) nur sehr geringfügig vom Kontrollantikörper OKT3 ab. Die Proteinsequenz der Antikörper aus Hybridomen und aus HEK 293T Zellen unterschieden sich aber lediglich in den Überresten des 2A-Peptids in den von HEK Zellen produzierten Antikörpern. Ein Sequenzvergleich der zwei bispezifischen Antikörper in Bezug auf ihr Expressionssystem ist dem **Anhang V** zu entnehmen.

Diese Daten sprechen für die Annahme, dass die beiden bispezifischen Antikörper $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 und $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 funktionale Antikörper sind, und zwar unabhängig davon, in welchem Expressionssystem sie produziert wurden. Ausschlaggebend für gute Bindungsfähigkeiten war offensichtlich die Produktivität der Zelllinie und somit die im Kulturüberstand enthaltene Antikörperkonzentration.

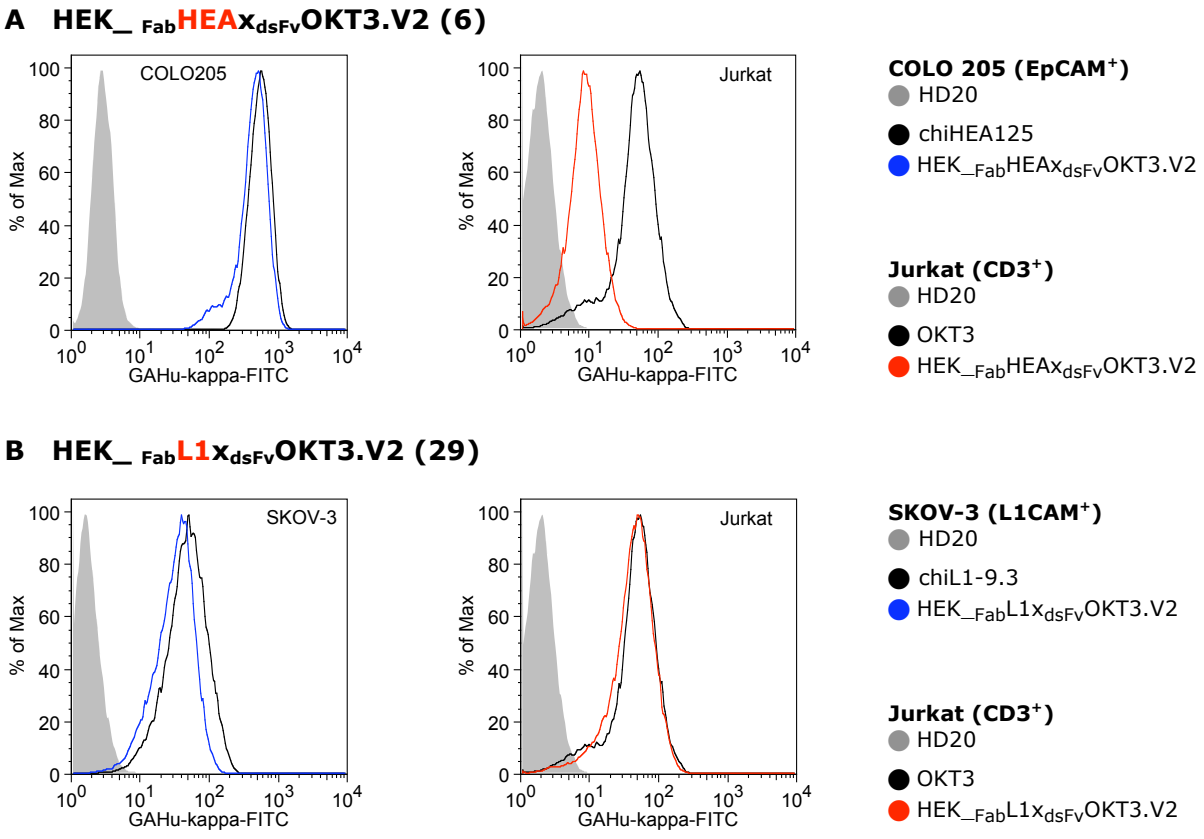


Abb. 3.34: Bindung der bispezifischen Antikörper an Zielzellen. A) Bindung des bispezifischen Antikörpers HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 an Colo205 bzw. Jurkat. Der anti-EpCAM Anteil des Antikörpers band äquivalent zu chiHEA125 an Colo205 Zellen, wohingegen Einbußen in der Bindungsfähigkeit des dsFvOKT3.V2 Anteils an CD3 gemessen wurden. **B)** Bindung des bispezifischen Antikörpers HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 an SKOV-3 bzw. Jurkat. Die Bindung war vergleichbar zu der jeweiligen Positivkontrolle chiL1-9.3 bzw. OKT3.
HD20, irrelevanter Antikörper, Negativkontrolle; OKT3, muriner anti-CD3-Antikörper, Positivkontrolle; chiL1-9.3, Positivkontrolle; chiHEA125, Positivkontrolle; SKOV-3, L1CAM positive Ovarialkarzinomzelllinie; Colo205, EpCAM positive Colonkarzinomzelllinie; Jurkat, CD3 positive Zelllinie.

3.2.4 Proteinbiochemische Analyse der bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2

Die Proteinmengen der Zelllinien reichten nicht aus, um die bispezifischen Antikörper mittels Immunpräzipitation direkt aus den Kulturmedien zu gewinnen und proteinbiochemisch analysieren zu können. Die Zellen mussten daher im großen Maßstab angezogen werden und die Antikörper mittels Säulenchromatographie aus dem Überstand gereinigt werden.

Aufgrund ihrer besseren Produktivität wurden die bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 aus den entsprechenden Zelllinien chiHEA CH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) bzw. HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2-zeo^R aufgereinigt.
Der bispezifische Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 wurde aus einer stabilen HEK 293T Zelllinie aufgereinigt. Die Produktion und Aufreinigung des Antikörpers im großen Maßstab wurde bei der Firma InVivo Biotech in Auftrag gegeben und erfolgte über den Histidin-Tag am C-terminalen Ende der schweren Antikörperkette. Die erzielte Endkonzentration betrug 730 µg/mL. Der Antikörper war nach Abzug der Leadersequenzen von schwerer und leichter Antikörperkette 721 Aminosäuren lang und hatte ein Molekulargewicht von 78 kDa. Der relative Anteil der modifizierten schweren Kette an der Gesamtgröße des Antikörpers betrug 54 kDa, während die leichte Kette mit 24 kDa der leichten Kette des Antikörpers chiL1-9.3 entsprach.
Die Hybridomlinie chiHEA CH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) wurde in einem MiniPerm Bioreaktor angezogen und die angereicherten Kulturüberstände ebenfalls mittels Histidin-Tags über eine Ni-NTA Sepharose Säule an einer HPLC-Anlage aufgereinigt. Die rückgewonnene Antikörperkonzentration betrug 340 µg/mL und fiel somit geringer als den Erwartungen entsprechend aus. Der Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 hatte nach Abzug der Leadersequenzen ein errechnetes Molekulargewicht von 74 kDa. Die leichte Kette entsprach mit 23,4 kDa derjenigen des Antikörpers chiHEA 125. Die schwere Kette war 50,6 kDa groß.

Antikörperkette	**$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2**	**HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2**
Schwere Kette (**HC**)	53,5 kDa	53,9 kDa
Leichte Kette (**LC**)	23,4 kDa	23,6 kDa
Assemblierter bsAK (**HC/LC**)	76,9 kDa	77,5 kDa

Der Reinheit des Proteins wurde Biochemisch analysiert. Die Proteine wurden hierzu auf 4-12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (**Abb. 3.35 A, D**). Auffallend hierbei war, dass bei beiden Antikörpern das gereinigte Protein als Proteingemisch bestehend aus einer 50 kDa und einer 25 kDa Bande auftrat und somit dem Molekulargewicht der einzelnen Antikörperketten entsprach. Nur ein sehr geringer Anteil des Proteins konnte dem assemblierten Antikörper zugeordnet werden. Dieser Anteil variierte in unterschiedlichen SDS-Gelen. Zudem war in manchen Fällen eine hochmolekulare Proteinvariante von ca. 150 kDa sichtbar. Um diese Banden den jeweiligen Antikörperketten eindeutig zuzuordnen und um proteolytische Abbauprodukte auszuschließen, wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit GAHu-kappa-Biotin (leichte Ketten, LC), anti-His-Biotin (schwere Ketten, HC) oder beiden Antikörpern im Western-Blot detektiert (**Abb. 3.35 B, E**). Die Banden entsprachen den erwarteten Antikörperketten. Leichte Ketten treten zudem als leichte Ketten Dimere auf. Die schwere Kette verfügte an ihrem C-terminalen Ende über einen Histidin-Tag bestehend aus 10 Histidin Aminosäuren. Diesen His-Tag machte man sich bei der Ni-NTA Chromatographie zunutze. Aus diesem Grund konnten leichte Antikörperketten nur dann gereinigt werden, wenn sie mit der schweren Kette assoziiert waren. Dies liegt daran, dass beide Antikörperketten nicht kovalent über eine Disulfidbrücke assoziierten und somit in einem SDS-Gel trotz nicht-reduzierender Bedingungen, voneinander getrennt werden. Die 80 kDa Proteinvariante war nur in seltenen Fällen und bei sehr frischen Präparationen vorzufinden.

Um nachzuweisen, dass die bispezifischen Antikörper in gereinigter Form als assemblierte bsAk vorlagen, wurden die Proben mittels Gelfiltration analysiert. Die gereinigten Proteine wurden auf einer Superdex 200HR 10/30 Säule der Firma Pharmacia Biotech in einer HPLC Anlage ihrer Größe nach aufgetrennt. Den Chromatogrammen in **Abb. 3.35 C** ist zu entnehmen, dass bei beiden Antikörpern der überwiegende Anteil des Proteins in einer Fraktion eluiert. Durch Vergleich mit einem Kalibrierungslauf mit einem Gemisch von Standardproteinen ergab sich für die Hauptfraktionen ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa und entsprach somit dem errechneten Molekulargewicht korrekt assemblierter Antikörper. In der Probe war ein sehr kleinerer Anteil an hochmolekularem Aggregat enthalten, welches mit dem Ausschlussvolumen der Säule überlappte. Bei den Aggregaten handelte es sich nicht unbedingt um Multimere des bispezifischen Antikörpers. Aufgrund der Größe (>150 kDa) war vielmehr davon auszugehen, dass es sich um Protein handelte, welches bei der Prozedur ausgefallen war. Eine sehr kleine Fraktion eluierte bei einem Elutionsvolumen von 22 mL. Es handelte sich somit um Moleküle in der Größenordnung eines Peptides. Wenn diese vorhanden wäre, hätte man die leichte Antikörperkette auf Höhe des Standards der Carboanhydrase erwartet, die ein Molekulargewicht von 29 kDa hat.

Die Hauptfraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels kombiniertem Westernblot gegen schwere und leichte Antikörperketten analysiert. Beide Fraktionen zerfielen auf dem SDS-Gel und ergaben das bereits bekannte Bandenmuster. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Dissoziation von schwerer und leichter Antikörperkette erst beim Auftrag auf das SDS-Gel stattfindet.

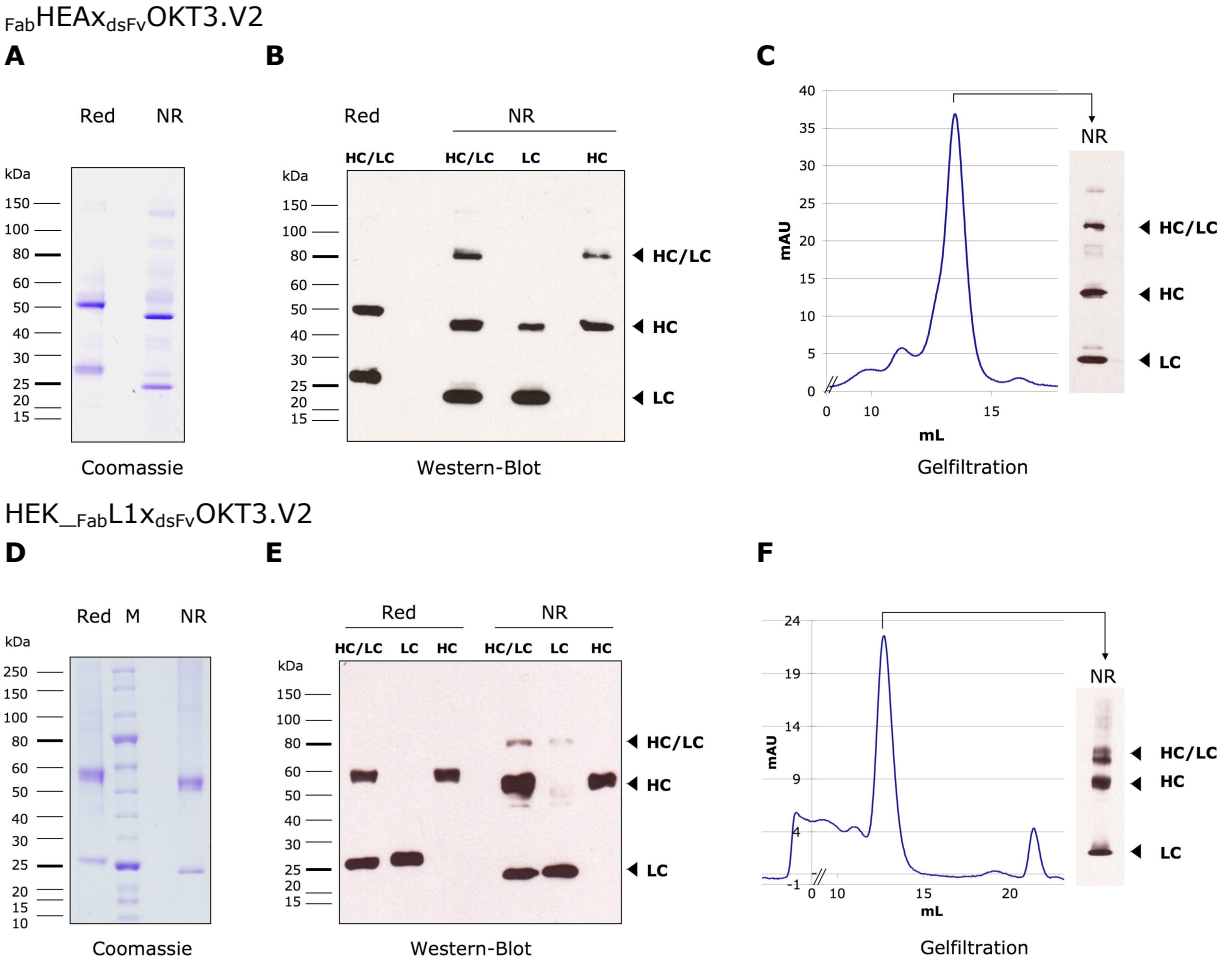


Abb. 3.35: Proteinbiochemische Analyse der bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2. Analyse der bispezifischen Antikörper nach Proteinaufreinigung mittels 4-12% SDS-PAGE unter reduzierenden (Red) und nicht reduzierenden (NR) Bedingungen. Die errechnete Proteingröße korrekt assemblierter Antikörper lag für beide Antikörper um 75 kDa. Das Molekulargewicht der schweren Kette betrug 50 kDa, das der leichten Kette 25 kDa.

$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2: A Coomassie Färbung, 2 µg Protein/Tasche; **B,** Western-Blot Analyse zum Nachweis von schwerer (HC, anti-His-Biot / SA-POX) und leichter (LC, GAHu-kappa-Biot / SA-POX) Antikörperkette, 2,7 µg Protein /Tasche; **C,** Gelfiltration mittels HPLC und Western-Blot Analyse der Hauptfraktion mit kombinierter Detektion von HC und LC.

HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2: D Coomassie Färbung, 2 µg Protein/Tasche; **E,** Western-Blot Analyse zum Nachweis von schwerer (HC, anti-His-Biot / SA-POX) und leichter (LC, GAHu-kappa-Biot / SA-POX) Antikörperkette, 7,2 µg Protein /Tasche; **F,** Gelfiltration mittels HPLC und Western-Blot Analyse der Hauptfraktion mit kombinierter Detektion von HC und LC.

Beide Antikörper sind nur zu einem geringen Anteil assembliert und zerfallen bereits unter nicht-reduzierenden Bediungungen in schwere und leichte Kette. Leichte Ketten treten als LC/LC Dimere auf. Die Gelfiltration zeigt, dass der Antikörper in 1x PBS fast vollständig assembliert war. Die HC/LC Fraktion zerfiel bei nicht reduzierendem SDS-PAGE wieder in einzelne Ketten.

Ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass korrekt assemblierte Antikörper aufgereinigt wurden war auch die Tatsache, dass die Antikörper im FACS an ihre jeweiligen Zielantigene banden. Diese Bindung setzt eine Zusammenlagerung beider Ketten voraus. Die Instabilität der Antikörper könnte allerdings eine Erklärung für die hohe Variabilität in der Intensität der Bindung sein. Um festzustellen, ob die Instabilität der Antikörper durch Verdünnung zunimmt, wurden die bsAk titriert und im FACS auf Bindung an EpCAM, L1CAM und CD3 getestet (**Abb. 3.36**). Der bispezifische Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 geriet bereits auf EpCAM positiven Colo205 Zellen bereits bei einer Konzentration von 20nM in den Sättigungsbereich und ließ sich bis auf den Nullwert verdünnen. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wurde für diesen Antikörper auch auf Jurkat Zellen gemessen, wobei die CD3 Bindungsstellen erst bei einer Konzentration von ca. 300nM abgesättigt wurden. Der Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 beschrieb sowohl auf L1CAM positiven SKOV-3 Zellen, als auch auf Jurkat Zellen den für die Titration charakteristischen Kurvenverlauf mit einem Sättigungswert für beide Antigene um 320nM.

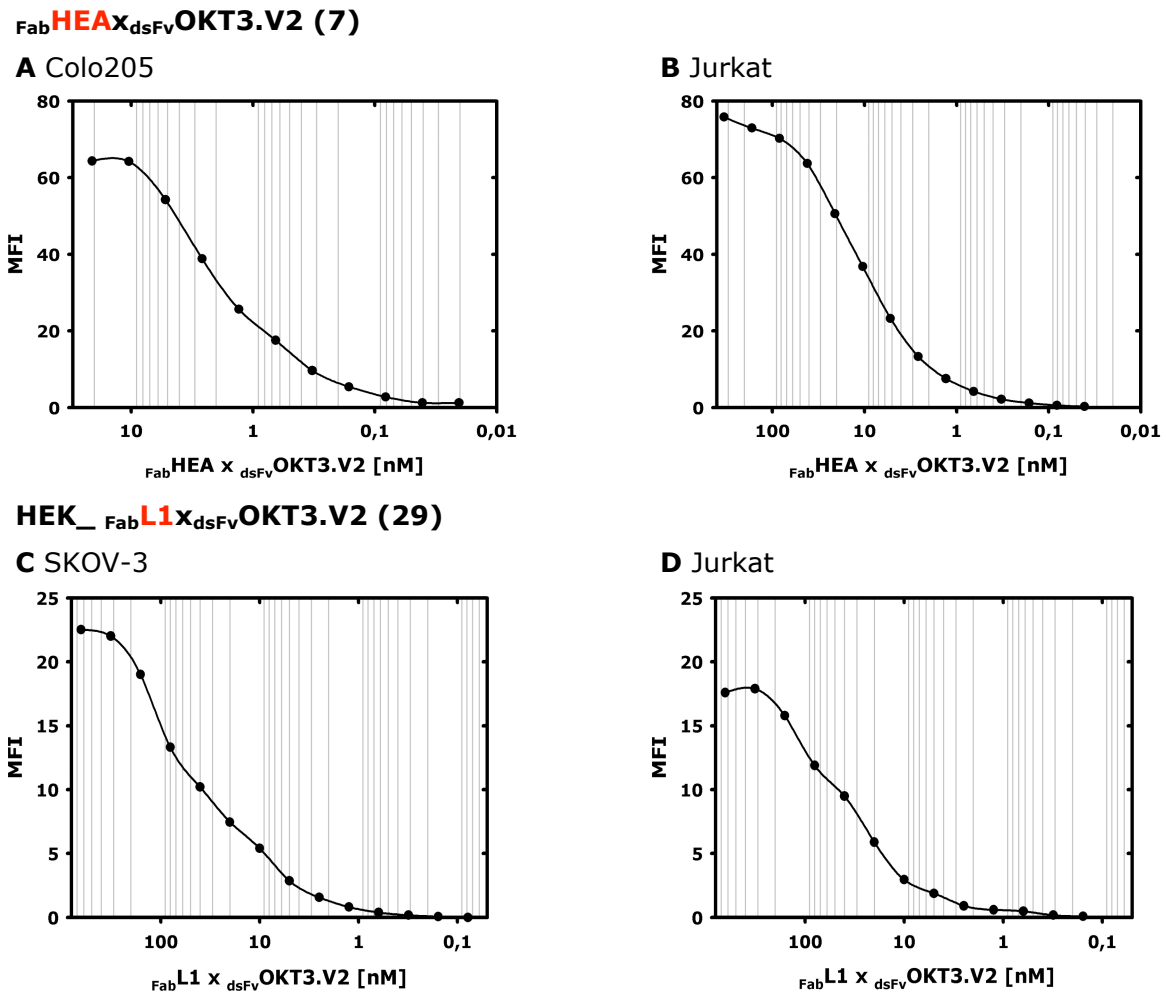


Abb. 3.36: Titration von bispezifischen Antikörpern im FACS. SKOV-3 (L1CAM+), Colo205 (EpCAM+) und Jurkat (CD3+) Zellen wurden mit $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 oder HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 inkubiert, mit GAHu-kappa-FITC Antikörpern gefärbt und die Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration im FACS gemessen. Beide Antikörper lassen sich ohne Stabilitätsverlust bis zum Nullwert verdünnen. Der Sättigungsbereich für SKOV-3 und Jurkat liegt um 320nM, für Colo205 lediglich bei 20nM. Messpunkte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messreihen; Skalierung der X-Achse logarithmisch.

Um eine Aussage über die Affinität der bispezifischen Antikörper treffen zu können, wurde deren Fähigkeit mit der von Parentalantikörpern verglichen, um dieselbe Bindungsstelle auf einem Zielantigen zu kompetieren. Da die Proteinsequenzen der bispezifischen Antikörper von den Antikörpern chiL1-9.3, chiHEA125 und OKT3 (murin) abgeleitet wurden, wurden diese konventionellen Antikörper als Referenz herangezogen. Die parentalen Antikörper wurden hierzu direkt mit FITC fluoreszenzmarkiert und in einer konstanten Konzentration zusammen mit den Zielzellen (SKOV-3, Colo205, Jurkat) vorgegeben. Der zu testende bispezifische Antikörper und der parentale Referenzantikörper wurden als Verdünnugnsreihe ebenfalls zu den Zellen pipettiert und der Verlauf der Mittleren Fluoreszenzintensität im FACS gemessen.

In Abbildung **3.37** sind die inhibitorischen Wirkungen von $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 auf Colo205 und Jurkat als auch von HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 auf SKOV-3 und Jurkat dargestellt. Im Vergleich mit dem Ausgangsantikörper chiHEA125 zeigt sich, dass nach der Formatänderung der schweren Kette, die Affinität des bispezifischen Antikörpers $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 für EpCAM auf Colo205 um den Faktor 4 abgenommen hat. Die halbmaximale Bindung des fluoreszierenden chiHEA125 Antikörpers wird mit nur 10,7 nM chiHEA125 erreicht. Bei der bispezifischen Form sinkt dieser Wert auf ca. 42 nM. Der bispezifische Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 scheint mit seinem parentalen Antikörper chiL1-9.3 überhaupt nicht in Konkurrenz zu treten. Für den dsFv-Anteil gegen OKT3 ist je nach Antikörper der Affinitätsverlust in der Größenordnung 8-140 Fach. Einen Hinweis darauf, dass der Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 nur schlecht an Jurkat Zellen bindet, gab bereits die FACS Analyse zur Bindungsfähigkeit dieses Antikörpers in **Abb. 3.34**. Zu berücksichtigen ist, dass paranetale konvetionelle Antikörper das jeweilige Zielantigen bivalent bindet und somit avider ist als bsAk das Antigen nur monovalent binden.

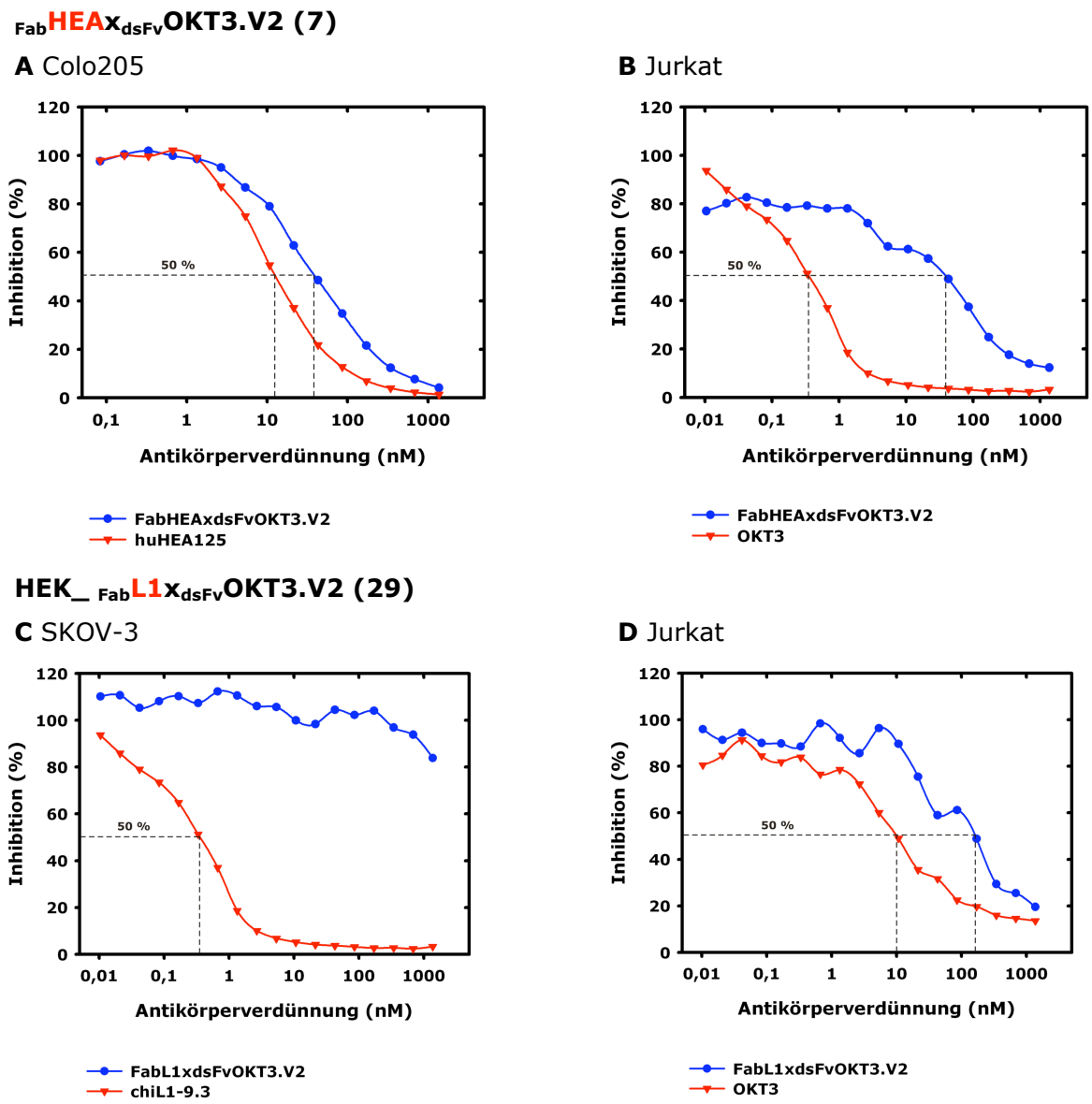


Abb. 3.39: Affinitätsmessung durch Kompetition mit parentalen Antikörpern. Zielzellen wurden in Gegenwart von 25nM FITC gekoppeltem Parentalantikörper und steigender Mengen unmarkierten Parentalantikörpern oder bispezifischen Testantikörpern (0-1300 nM), inkubiert. Nach 60 min wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der Zielzellen im FACS ermittelt. Die maximale Fluoreszenz (in Abwesenheit von nicht markiertem Antikörper), wurde als 100 % Inhibition der Bindung parentaler Antikörper angegeben. 0 % Bindung entsprechen der Autofluoreszenz der Zellen. Messpunkte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messreihen; Die Skalierung der X-Achse ist logarithmisch.

3.2.5 Stabilisierung bispezifischer Antikörper

Es wurde gezeigt, dass die hergestellten bispezifischen Antikörper instabil waren. Es erschien an dieser Stelle fraglich, ob überhaupt eine Disulfidbrücke zwischen der CH1 Domäne der schweren Kette und der konstanten Domäne der kappa Kette (IGKC) ausgebildet wurde. In der letzten Projektphase wurden die oben beschriebenen bispezifischen Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 so modifiziert, dass die ersten fünf Aminosäuren der *Hinge*-Region an die CH1 Domäne von IgG1 angefügt wurden. Das relevante Cystein für die intermolekulare Disulfidbrücke war hierbei die fünfte Aminosäure.

Die Genkassetten wurden, ähnlich wie in **Abb. 3.32** skizziert, für die Expression in HEK 293T Zellen entworfen. Die neue Generation von Antikörpern wurde mit HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 bezeichnet. Ein genauer Sequenzvergleich wird im **Anhang IV** zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V3-IGK (P17) und pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V3-IGK (P18) kodieren für die stabilisierten bispezifischen Antikörper unter Kontrolle des CMV Promotors. Sie wurden unter Hinzunahme des Zeocin Resistenzplasmides pZeo^R stabil in HEK 293T Zellen transfiziert.

Es wurden folgende stabile, antikörperproduzierende HEK-Zelllinien generiert:

Zelllinie	HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3-zeo^R
Antikörper	HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3

Zelllinie	HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3-zeo^R
Antikörper	HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3

Die cDNA wurde aus der Gesamt-RNA der HEK Zellen unter Vollverdau der genomischen DNA und anschließender RT-PCR hergestellt. Die Transkripte wurden mittels PCR nachgewiesen (**Abb. 3.40**) und wurden zur Kontrolle sequenziert.

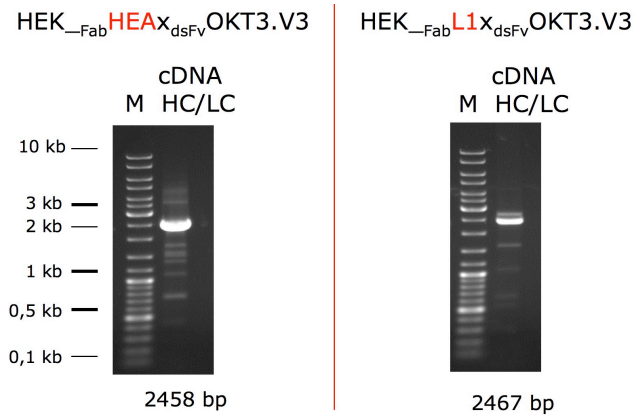


Abb. 3.40: Nachweis von Transkripten durch RT-PCR. Die Expression der Antikörpergene wurde durch PCR auf die gesamt cDNA der Zelle nachgewiesen. Schwere (HC) und leichte (LC) Ketten befanden sich auf einem mRNA Strang. Die Position der Primer ist aus Abb. 3.34 zu entnehmen. Produktgrößen sind im Gel angegeben.

Primerkombinationen:

HEK_FabHEAxdsFvOKT3.V3: O43-f x O45-r

HEK_FabHEAxdsFvOKT3.V3: O44-f x O45-r

Zur Großproduktion der Antikörper wurden die stabilen HEK-Linien an die Firma InVivo Biotech gesendet. Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben über das His-Tag am C-terminalen Ende der schweren Antikörperkette. Das Molekulargewicht der stabilisierten bsAk weicht kaum von den oben angegebenen Werten ab. Beide Antikörper wurden biochemisch untersucht (**Abb. 3.42**). Bereits die Auftrennung der Antikörper auf einem 4-12% SDS-Gel mit Coomassie Färbung macht deutlich, dass schwere und leichte Antikörperketten kovalent assoziieren und die Stabilisierungsmaßnahme erfolgreich war. Schwere (HC) und leichte (LC) Ketten, als auch korrekt assemblierte Antikörpermoleküle (HC/LC) wurden mittels Western-Blot nachgewiesen. Die Färbung erwies sich als sehr spezifisch und deckte keine signifikanten Aggregate auf. Der Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 weist Spuren eines hochmolekularen Proteins von 150 kDa auf. Hierbei könnte es sich um eine tetramere Variante des bsAk handeln (**Abb. 4.1**).

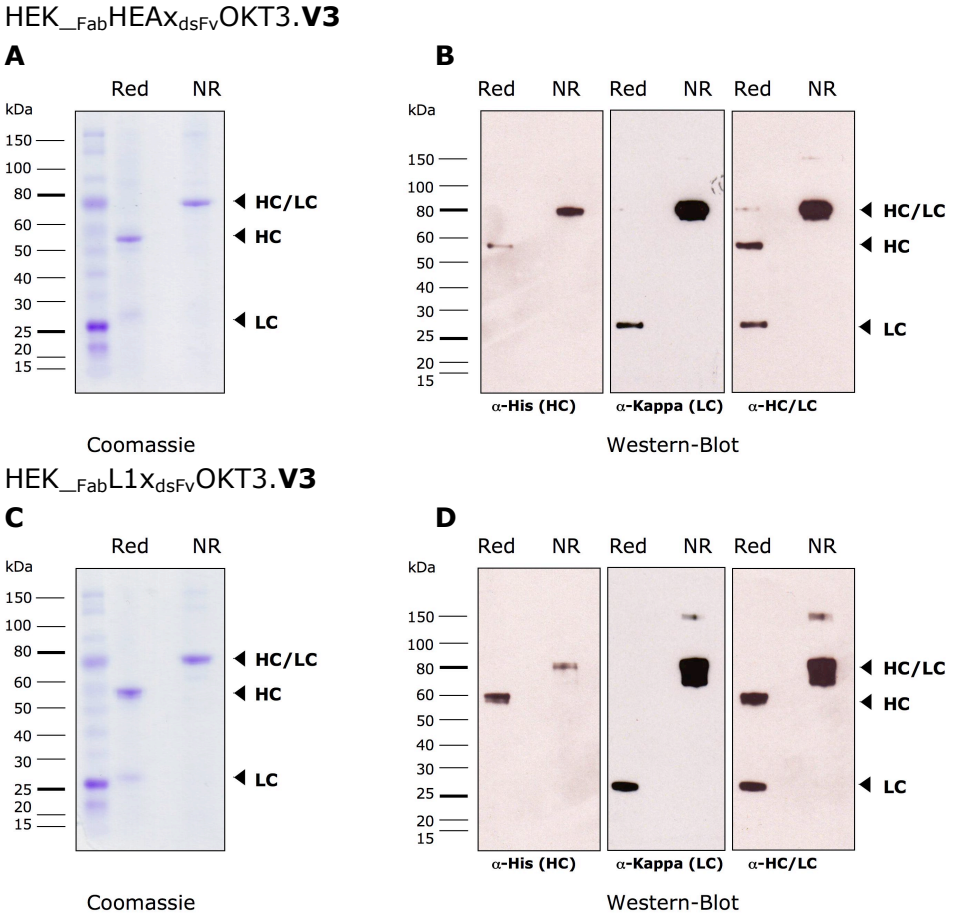


Abb. 3.42: Proteinbiochemische Analyse der bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3. Analyse der bispezifischen Antikörper nach Proteinaufreinigung mittels 4-12% SDS-PAGE unter reduzierenden (Red) und nicht reduzierenden (NR) Bedingungen. Die errechnete Proteingröße korrekt assemblierter Antikörper lag für beide Antikörper um 75 kDa. Das Molekulargewicht der schweren Kette betrug 50 kDa, das der leichten Kette 25 kDa. Beide Antikörper sind vollständig assembliert und weisen keine unspezifisch assoziierte Ketten auf.

$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3: A Coomassie Färbung, 2µg Protein/Tasche; **B,** Western-Blot Analyse zum Nachweis von schwerer (HC, anti-His-Biot / SA-POX) und leichter (LC, GAHu-kappa-Biot / SA-POX) Antikörperkette, bzw. der Kombination beider, 0,5µg Protein/Tasche.

HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3: D Coomassie Färbung, 2µg Protein/Tasche; **B,** Western-Blot Analyse zum Nachweis von schwerer (HC, anti-His-Biot / SA-POX) und leichter (LC, GAHu-kappa-Biot / SA-POX) Antikörperkette, bzw. der Kombination beider, 0,5µg Protein/Tasche.

Die Erkennung der zellulären Zielantigene auf Colo205, SKOV-3 und Jurkat Zellen wurde wie für die vorherigen Antikörpergenerationen durchgeführt. Der Antikörper HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 erkannte EpCAM und CD3 gleichermaßen gut (**Abb. 3.41 A**). Der Antikörper HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 war ebenfalls befähigt beide Zielstrukturen auf SKOV-3 und Jurkat zu binden, wenn auch die Bindung an CD3 etwas schwächer ausfiel als die entsprechende Positivkontrolle. Dies lag vermutlich an der geringeren Produktivität dieser Zelllinie.

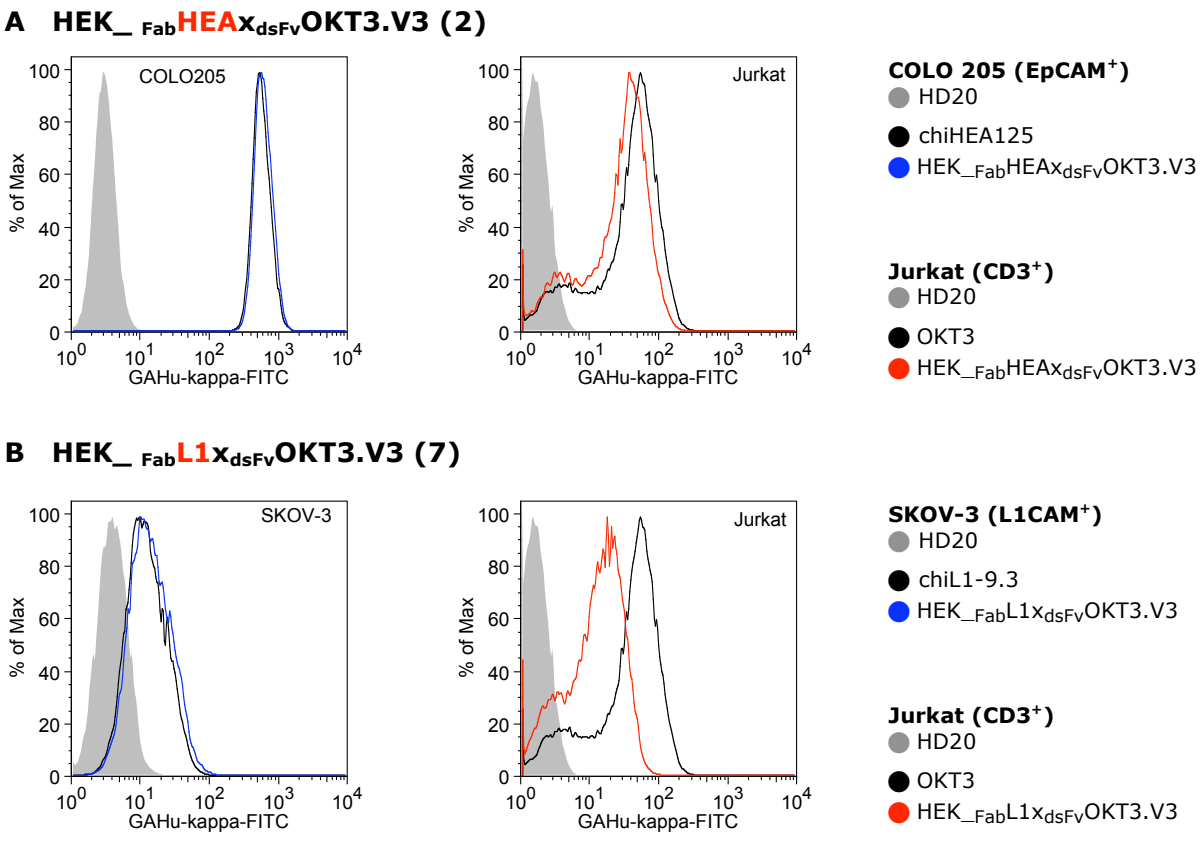


Abb. 3.41: Bindung der bispezifischen Antikörper an Zielzellen.
A) Bindung des bispezifischen Antikörpers HEK_FabHEAxdsFvOKT3.V3 an Colo205 bzw. Jurkat. Der anti-EpCAM Anteil des Antikörpers band äquivalent zu chiHEA125 an Colo205 Zellen und ergab auch für die Bindungsfähigkeit des dsFvOKT3.V3 Anteils an CD3 eine gute Überlappung mit dem Antikörper OKT3.
B) Bindung des bispezifischen Antikörpers HEK_FabL1xdsFvOKT3.V3 an SKOV-3 bzw. Jurkat. Die Bindung war auch auf SKOV-3 vergleichbar zu der Positivkontrolle chiL1-9.3. Der *single-chain* Anteil gegen CD3 erschient etwas schwächer als der murine OKT3.
HD20, irrelevanter Antikörper, Negativkontrolle; OKT3, muriner anti-CD3-Antikörper, Positivkontrolle; chiL1-9.3, Positivkontrolle; chiHEA125, Positivkontrolle; SKOV-3, L1CAM positive Ovarialkarzinomzelllinie; Colo205, EpCAM positive Colonkarzinomzelllinie; Jurkat, CD3 positive Zelllinie.

Zurzeit reichen die gereinigten Antikörpermengen für weiterführende Experimente nicht aus. Diese Generation bispezifischer Antikörper sollte jedoch alle Kriterien zur weiteren Verwendung in präklinischen Studien erfüllen. Ein *in vitro* Test zur Quantifizierung der Zytotoxizität beider bispezifischer Antikörper wurde bereits etabliert und wird in absehbarer Zeit mit den stabilisierten Antikörpern durchgeführt.

4 DISKUSSION

4.1 Bispezifische Antikörper als Wirkstoffe in der Krebstherapie

Bispezifische Antikörper kombinieren die antigenbindenden Domänen zweier Antikörper in einem einzigen Molekül, und können dadurch gleichzeitig zwei unterschiedliche Epitope binden und kreuzvernetzen (Müller und Kontermann, 2007a).

Mit Hilfe von bispezifischen Antikörpern oder Antikörperderivaten können verschiedene Limitierungen monoklonaler Antikörper teilweise überwunden oder deren Anwendungsbereich erweitert werden. Sie bieten die Möglichkeit gezielt und selektiv bestimmte Effektorzellpopulationen zu rekrutieren, die das erkrankte Gewebe über zytotoxische Wirkungsmechanismen beseitigen. Bei entsprechender Wahl bindender Domänen gegen Steuermoleküle auf Immunzellen, können einschließlich solche Effektorpopulationen angeregt werden, die keine oder inhibitorische Fc-Rezeptoren tragenden. Bispezifische Antikörper weisen daher im Allgemeinen eine höhere zytotoxische Potenz auf als konventionelle Antikörper (Peipp und Valerius 2002). Im Vergleich ist die Bindung an das Tumorantigen bei konventionellen monoklonalen Antikörpern zwar genauso spezifisch, die Wahl der Effektorzellen kann jedoch nur begrenzt beeinflusst werden, da konventionelle Antikörper auf die natürlichen Komponenten der humoralen Immunantwort zurückgreifen. Sie sind in ihrer Wirkung von Fc-vermittelten Mechanismen abhängig und treten somit dem hohen Immunglobuin-spiegel im Blut in Konkurrenz, wodurch ihre Wirkung reduziert wird. Bispezifische Antikörper eröffneten für die Immuntherapie neue Möglichkeiten und wurden mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Effektorfunktionen ausgestattet.

Als Bindedomänen finden dabei meist scFv oder Fab Fragmente Anwendung, die im Vergleich zu konventionellen Antikörpern eine reduzierte Immunogenität aufweisen und durch ihre reduzierte Größere eine bessere Dissufion in wenig-vaskularisierte Tumoren ermöglicht.

Die Verwendung bispezifischer Antikörper zur Induktion einer anti-tumoralen Immunantwort durch das körpereigene Immunsystem ist ein erfolgsversprechendes Konzept, da es im Vergleich zur systemisch wirkenden Chemotherapie eine präzise Ansteuerung des erkrankten Gewebes ermöglicht. Nach anfänglichen enttäuschenden Ergebnissen in ersten klinischen Studien wurde das Interesse durch die Entwicklung neuer rekombinanter Formate und der erst kürzlich genehmigten Marktzulassung das bispezifischen Preparates Catumaxomab/ Removab erneut geweckt.

In der Umsetzung erweist sich das Format jedoch als große Herausforderung und bedarf einer konstanten Weiterentwicklung, um den therapeutischen Nutzen zu steigern. Dieser wird durch die Parameter Affinität, Avidität und somit Valenz, Stabilität, molekulare Größe und auch dem zellulären Wirkungsmechanismus bestimmt.

4.1.1 Das Molekulargewicht als kritischer Parameter für bispezifische Antikörper

Das Konzept, hybride Antikörper zu nutzen, um zytotoxische T-Lymphozyten zur Eliminierung maligner Zielzellen einzusetzen wurde bereits 1985 von Staerz *et al.* entwickelt (Staerz *et al.* 1985). Seitdem wurden viele Konstrukte zu diesem Zweck konzipiert, deren Eigenschaften und Limitierungen bereits beschrieben worden sind (Carter 2001a, Müller und Kontermann 2007a). Die ersten bispezifischen Antikörper (Quadrom-Antikörper) waren strukturell ähnlich wie konventionelle Antikörper aufgebaut. Für das Quadrom HEA x OKT3 (Strauss *et al.* 1999) konnte in klinischen Studien bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom gezeigt werden, dass maligner Aszites weitgehend therapiert werden konnten. Dieses Präparat hat ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa und ist muriner Herkunft, zwei Aspekte die in dieser Arbeit optimiert werden sollen. Große Moleküle weisen oft eine unzureichende Penetration in wenig vaskularisierte, solide Tumoren auf. Problematisch ist auch die sehr variable Ausbeute die mit der Herstellung von Quadromen einhergeht und die sehr teuren Produktionskosten der konventionellen Produktion in Säugetierzellen.

Ein Durchbruch in der Weiterentwicklung bsAk kam mit der Gentechnik und der Reduzierung der molekularen Größe von Antikörpern auf die kleinste antigenbindende Einheit, dem Fv-Fragment. Diese wurden später zu bispezifischen Antikörperfragmenten wie z.B. *diabodies, single-chain diabodies* oder *tandem diabodies* weiterentwickelt.

Die molekulare Größe von Antikörpern ist ein kritischer Parameter, denn kleine rekombinante Antikörperderivate:

- ermöglichen aufgrund ihrer geringeren molekularen Masse eine gute Gewebegängigkeit (Peipp und Valerius 2002),
- haben *in vivo* jedoch eine kurze Verweildauer im Blut, so dass die Akkumulation des Wirkstoffes im Tumorgewebe meist unzureichend ist.

Kleine Antikörperderivate besitzen im Vergleich zu konventionellen Antikörpern meist keinen Fc-Teil. Dieser bewirkt jedoch durch die Bindung an den neonatalen FcRn Rezeptor die Rezirkulation der Antikörper und ermöglicht so die sehr lange Halbwertszeit konventioneller Antikörper von gut 30 Tagen (Raghavan *et al.* 1994). Kleine Antikörperderivate, deren Molekulargewicht nahe an der Nieren-Ausschlussgrenze von 60-65 kDa liegt, werden nicht im Kreislauf gehalten und werden stattdessen sehr schnell beseitigt. Die Molekülgröße ist demnach ein wichtiger Parameter beim Entwurf eines neuen immuntherapeutischen Ansatzes und keines dieser kleinen rekombinanten Formate hat in der Onkologie bisher die Marktreife erlangt.

Eine Möglichkeit, die schnelle Ausscheidung durch die Niere zu vermeiden und die Halbwertszeit zu verlängern, besteht darin, das Molekulargewicht über den Schwellenwert der Niere zu erhöhen.

Die bispezifischen Antikörper $_{Fab}HEAx_{dsFv}OKT3$ und $_{Fab}L1x_{dsFv}OKT3$ wurden so konzipiert,

dass ein disulfidbrückenstabilisierter *single-chain* Antikörper mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 25kDa an das Fab-Fragment (ca. 50kDa) eines zweiten Antikörpers fusioniert wurde. Somit ergab sich ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 75 kDa, welches mittels SDS-PAGE und Gelfiltration bestätigt werden konnte (**Abb. 3.42**).
Direkte Vergleiche über die Auswirkung von Größenveränderungen eines Antikörperformates gibt es wenige. Brünke und Kellner *et al.* haben in einer interessanten Studie einen bispezifischen Antikörper zur Immuntherapie CD19-positiver Leukämien und Lymphome erprobt, der NK-Zellen über den FcγRIII (CD16) Rezeptor zu Tumorzellen rekrutiert und *in vitro* den Zelltod durch ADCC auslöst (Bruenke *et al.* 2005, Kellner *et al.* 2008, Kellner 2009). Im Vergleich standen ein kleiner bispezifischer scFv-basierter Antikörper (bsscFv) und der dazugehörige bispezifische *triple body* (sctb), mit dem Ergebnis, dass eine Vergrößerung der molekularen Masse von 60 kDa auf 90 kDa eine Verdopplung der *in vivo* Halbwertszeit in SCID Mäusen von $t_{1/2}$=2h auf $t_{1/2}$=4h mit sich brachte. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung, die für andere Antikörperfragmente vergleichbarer Größe berichtet wurden.
Die Plasmaretentionszeit der $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3 und $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3 Antikörper *in vivo* wurde zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bestimmt, da noch keine ausreichende Proteinmenge gereinigt werden konnte. Sie liegt aber vermutlich ebenfalls in dem Bereich von einigen wenigen Stunden. Ob diese Verweilzeit im Blut ausreichend ist, um eine gute Anreicherung des Therapeutikums am Tumor zu erzielen, bleibt abzuwarten.

Zwischenzeitlich wurden neue Ansätze beschrieben, um die Halbwertszeit kleiner Antikörperderivate zu verlängern (Presta 2008). Die wichtigsten Methoden sind die PEGylierung und die Fusion an Bindeproteine des neonatalen FcRn Rezeptors.
Konventionelle Antikörper binden über ihren Fc-Teil an neonatale FcRn Rezeptoren und können rezirkularisieren. Erreicht werden so *in vivo* Halbwertszeiten von mehreren Wochen. Kleine rekombinante Antikörper besitzen in der Regel keinen Fc-Teil. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass der FcRn Rezeptor auch Albumin vor dem proteolytischen Abbau schützt. Die Recyclingrate von Albumin ist im Menschen sogar 6 Mal höher als die von Antikörpern (Anderson *et al.* 2006). Aus diesem Grund wurde Albumin bereits vereinzelt zur Fusion an kleine Antikörperderivate (Müller *et al.* 2007) eingesetzt.
Eine weitere Herangehensweise ist die PEGylierung von Proteinen, um den hämodynamischen Radius zu erhöhen und somit ein größeres Molekulargewicht zu erzeugen. So soll bereits die Addition eines 40kDa-PEG Moleküls an ein Fab-Fragment ausreichen, um eine Annäherung an die Halbwertszeit eines IgGs zu schaffen (Humphreys *et al.* 2007). Der Antikörper Certolizumab pegol/Cimzia® zur Behandlung von Morbus Crohn und Rheumatoider Arthritis ist das erste derart modifizierte Fab-Fragment mit Marktzulassung.

4.1.2 Erhöhung der thermischen Stabilität bispezifischer Antikörper durch Einführung von Disulfidbrücken

Es ist bereits mehrfach dokumentiert worden, dass eine unzulängliche thermodynamische Stabilität von scFv-Fragmenten deren therapeutische Wirksamkeit einschränkt und sich limitierend auf die Ausbeute und Qualität auswirkt. Die Stabilität von scFv-Fragmenten hängt von vielen Faktoren ab, vor allem aber beeinflusst die inhärente Stabilität der beiden variablen Domänen V_H und V_L die Beständigkeit des Moleküls. Kritische Parameter sind weiterhin die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken, die Länge des verwendeten Peptidlinkers und die Kontaktfläche beider Domänen. Mehrere Herangehensweisen werden in der Praxis zur Verbesserung des Stabilitätszustandes verfolgt (Wörn und Plückthun 2001). Eine solche verbreitete Methode zur Stabilisierung des V_H-V_L *interface* ist die Einführung einer Disulfidbrücke in die Berührungszone beider Domänen. Diese Methode kann auch in Kombination mit einem Peptidlinker eingesetzt werden. Mittels Computer-Modellierung wurden von Reiter *et al.* zwei geeignete Aminosäurepaare in den *framework* Regionen der V_H und V_L-Domänen ausgemacht, deren relative Position zueinander die Einführung einer künstlichen Disulfidbrücke ermöglicht: V_H44 - V_L100 und V_H105 - V_L43 (Reiter *et al.* 1994). Die Kombination V_H44 - V_L100 wurde bislang am häufigsten mit zufrieden stellenden Ergebnissen eingesetzt. Die hieraus resultierenden scFv-Antikörper bildeten weniger Aggregate (Young *et al.* 1995) und wiesen eine höhere Stabilität gegenüber denaturierenden Reagenzien (Rajagopal *et al.* 1997), polaren und nicht-polaren Tensiden und Proteasen auf (Wörn und Plückthun 1999). Vor allem aber bewährte sich die Wirksamkeit disulfidbrückenstabilisierter Antiköper auch in *in vivo* Anwendungen (Reiter *et al.* 1996).

Bei der Entwicklung der bispezifischen Antikörper $_{Fab}HEAx_{dsFv}OKT3$ und $_{Fab}L1x_{dsFv}OKT3$ wurde der *single-chain* Antikörper von dem murinen monoklonalen Antikörper OKT3 abgeleitet und die variablen Domänen analog zu Reiter *et al.* (1994) mit einer Disulfidbrücke versehen (dsFvOKT3). Da in dieser Arbeit lediglich die stabilisierte Variante zum Einsatz kam, kann der Zugewinn an Stabilität nicht quantifiziert werden. Gegenwärtig werden Anstrengungen unternommen, größere Mengen an Protein aufzureinigen, so dass die Halbwertszeiten *in vivo* in SCID-Mäusen und *in vitro* in humanem Serum bei Körpertemperatur bestimmt werden können.
Die Fab-Fragmente entsprechen den Sequenzen der chimärisierten Parentalantikörper chiHEA125 und chiL1-9.3, so dass auch im bispezifischen Antikörperformat von der natürlichen Stabilität konventioneller Antikörper profitiert werden sollte. Von der Halbwertszeit des dsFvOKT3-Anteils im bsAk wird erwartet, dass der $t_{1/2}$ Wert deutlich unter den Werten der Fab-Fragmente liegt.
Das Vorkommen freier Cysteine kann zu Proteinvarianten führen, die in Form hochmolekularer Aggregate in Erscheinung treten. Die Analyse der stabilen bispezifischen

Antikörper HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 mittels SDS-PAGE lässt Spuren eines Aggregats mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa erkennen (**Abb. 3.42**). Dieses könnte durch die Bildung eines Fab x dsFv-Dimers erklärt werden (**Abb. 4.1**). Die V_H und V_L Domänen des dsFvOKT3.V3-Anteils werden über einen 15 Aminosäuren langen Glycin-Serin-Linker verbunden und zusätzlich durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, um ein Auseinanderdriften der Domänen zu verhindern. Bislang ging man davon aus, dass ein solcher Linker dem Komplex ausreichend Flexibilität verleiht. Erst kürzlich wurde durch Computer-Modellierung gezeigt, dass dies erst ab einer Linkerlänge von 20 Aminosäuren gänzlich gewährleistet ist (Michaelson *et al.* 2009). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass der $_{dsFv}$OKT3.V3-Anteil der bispezifischen Antikörper trotz Disulfidbrücke aufbricht und sich zu Dimeren zusammenlagert. Derartige Komplexe wären funktional, könnten in der klinischen Anwendung jedoch zu Komplikationen führen. Als Dimere würden sie das CD3 Antigen bivalent binden und T-Lymphozyten unspezifisch durch Kreuzvernetzung aktivieren. Die Dimere könnten allerdings mittels Gelfiltration leicht von den Monomeren abgetrennt werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass solche Dimere z.B. bei längerer Lagerung gebildet werden. Deshalb sollten solche Präparate nicht systemisch sondern nur lokal am Ort des Tumors appliziert werden.

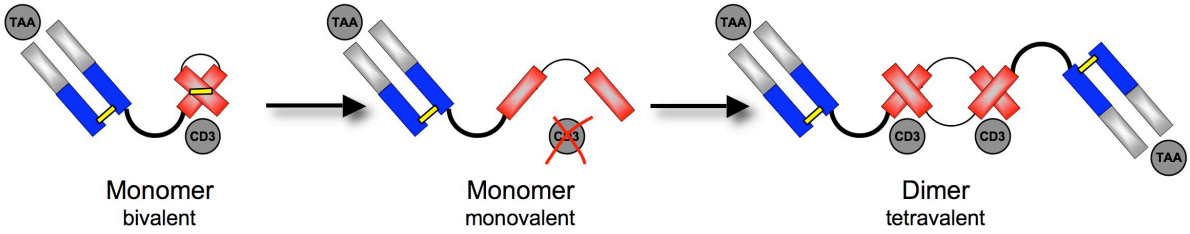


Abb. 4.1: Umlagerung bispezifischer Antikörper zu funktionalen Dimeren. Disulfidbrückenstabilisierte *single-chain* Anteile können sich bei sterischer Hinderung zu sog. *diabodies* zusammenschließen. Bispezifische Antikörper können dann sowohl das Tumor-assoziierte Antigen (TAA) als auch das Steuermolekül CD3 auf T-Lymphozyten bivalent binden.

4.2 Expression bispezifischer Antikörper in Hybridomen

Die Vielfalt der Expressionssysteme für rekombinante Antikörper ist groß und umfasst Hefen, Bakterien, Insekten, Tiere und Pflanzen. Bei weitem am häufigsten werden Antikörper jedoch in Säugetierzellen produziert (siehe Kapitel 1.3). Dieses Produktionssystem ist jedoch teuer. Im Hinblick auf die hohen Kosten bei der industriellen Großproduktion von therapeutischen Antikörpern, sollte daher ein Produktions-system mit möglichst hohen Ausbeuten anvisiert werden.

Die Evolution hat mit dem Immunsystem des Menschen ein erfolgreiches System zur Antikörperproduktion geschaffen, welches aufgrund seiner effizienten Antikörperproduktion in der Lage ist, jeden Erreger mit spezifischen Antikörpern

abzuweisen. Wir haben in unserer Arbeitsgruppe die humorale Immunabwehr zum Vorbild genommen und entwickeln Hybridome zu einem Expressionssystem für rekombinante Antikörperformate, die möglichst einfach durch genetische Verfahren veränderbar sind.

4.2.1 HybLib - eine Bibliothek komplett humaner Antikörper

Die hier beschriebene Arbeit ist Bestandteil eines übergreifenden Projektes, welches die Entwicklung einer technologischen Plattform zur Herstellung von Antikörpern im Hochdurchsatzverfahren zum Ziel hat. In unserer Arbeitsgruppe wird gegenwärtig eine Bibliothek komplett humaner Antikörper hergestellt. Die Besonderheit dieser Bibliothek liegt in der Nutzung von Hybridomen als Expressionssystem für monoklonale Antikörper und in der Verwendung der natürlichen Antikörpermaschinerie von B-Zellen. Die Bibliothek imitiert die drei grundlegenden Prinzipien genetische Vielfalt, klonale Selektion und somatische Hypermutation (**Abb. 4.2**).

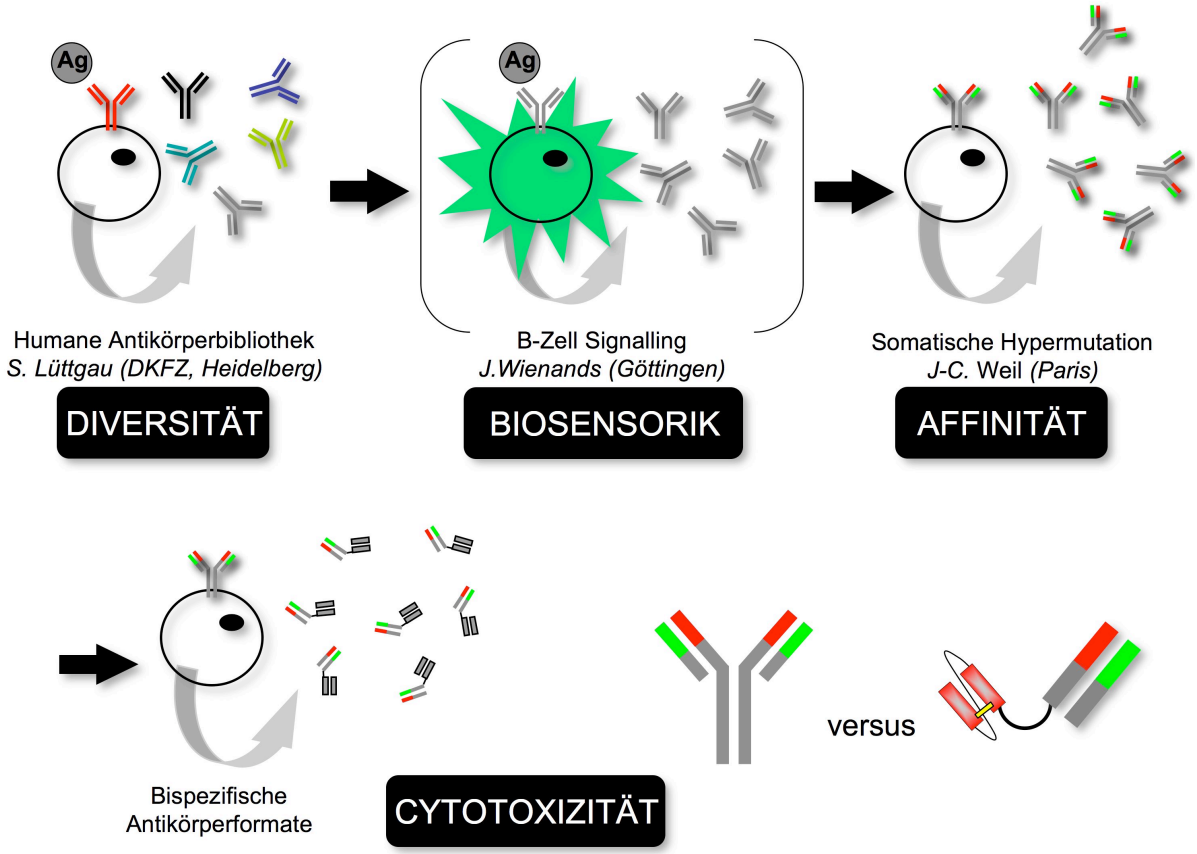


Abb. 4.2: HybLib - Eine Bibliothek vollständig humaner Antikörper. Die Diversität des Repertoires humaner B-Zellen wurde ortsspezifisch in den Antikörperlokus einer Hybridomzelle eingebracht, um eine *mammalian display* Antikörperbibliothek zu erstellen. Antigen-spezifische Antikörper könnten eventuell auch über den an EGPF gekoppelten B-Zell Rezeptor Signalweg identifiziert werden. Isolierte Antikörper können zudem über die B-Zell eigene Maschinerie der somatischen Hypermutation in ihrer Affinität maturiert werden. Durch eine genomische Formatänderung der selektierten Hybridomzelle sollen zukünftig konventionelle Antikörper in zytotoxisch aktive bispezifische Antikörper umfunktioniert werden.

Zur Herstellung der Hybridombibliothek wird das humane B-Zell Repertoire aus variablen Antikörperdomänen gezielt in den aktiven Antikörpergenlokus einer Hybridomzelle eingebracht. Murine variable Domänen wurden hierzu mit Erkennungsstellen für spezifische Rekombinasen flankiert und mittels Kassettenaustausch durch humane variable Sequenzen ersetzt. Das Empfänger-Hybridom für die Bibliothek wurde zuvor in seinen konstanten Domänen der schweren und leichten Antikörperketten humanisiert. Im Hybridom werden rekombinante Antikörper gemäß der natürlichen Eigenschaft von B-Zellen als B-Zell Rezeptor (BCR) auf der Zelloberfläche präsentiert und stehen so zum Durchsuchen der Bibliothek zur Verfügung. Nach erfolgreicher Antigenbindung kann ein spezifisches Hybridom der Bibliothek leicht isoliert werden und der entsprechende Antikörper direkt in großem Maßstab produziert werden. Desweiteren wird eine Vereinfachung des Screening-Verfahrens ausgearbeitet, indem die BCR-Signalkaskade zur EGFP Expression umgeleitet wird (*Prof. J. Wienands, Universität Göttingen*). Neben dem Antikörper-Expressionsapparat steht in der verwendeten Hybridomzelllinie auch die Maschinerie der somatischen Hypermutation von B-Zellen zur Verfügung. Durch die Induktion des Enzyms AID (*activation-induced cytidine deaminase*) kann die Affinität selektierter Hybridome aus der Bibliothek anschließend optimiert werden (*Prof. J-C. Weil und Prof. C-A. Reynaud, Hopital Necker des Enfants Malades, INSERM, Paris*). Das Ergebnis ist die Herstellung hochaffiner monoklonaler Antikörper, wobei das produzierende Hybridom gleich mitgeliefert wird und die aufwändige Transfektion und Selektion von Säugetierzellen entfällt.

Das Produktionssystem wird routinemäßig zur Herstellung monoklonaler Antikörper eingesetzt und hat sich auch zur Chimärisierung muriner monoklonaler Antikörper bewährt (Lüttgau 2004). Diese Gründe sprechen für die Erweiterung des Systems zur Expression bispezifischer Antikörper in Hybridomen.
Um die Vorzüge des Expressionssystems voll auszuschöpfen, wurde der endogene Antikörperlokus gezielt modifiziert und so wenig wie möglich verändert, so dass die regulatorischen Elemente intakt bleiben. Das System der Bibliothek konnte so erweitert werden, dass Hybridome anstelle der konventionellen Antikörperformate nun bispezifische Antikörper sezernieren. Die zukünftige Bibliothek wird die Möglichkeit bieten, den Wirkungsmechanismus eines therapeutischen Antikörpers individuell anzupassen und zwischen ADCC/CDC und der zytotoxischen Wirkungsweise bispezifischer Antikörper zu wählen.

4.2.2 Herstellung unterschiedlicher Antikörperformate in Hybridomen

Das experimentelle Vorgehen führte neben dem gewünschten bispezifischen Format FabxdsFv auch zur anderen Antikörperderivaten. Die Abbildung **4.3** fasst sämtliche in dieser Arbeit generierten Antikörperderivate und die dazu eingesetzten Rekombinationsverfahren zusammen. Zur einfacheren Darstellung werden die in Abbildung **4.3** skizzierten Punkte in getrennten Abschnitten behandelt.

Ein Vergleich beider Rekombinationsverfahren wird in Abschnitt 4.2.5 angestellt. Die Gegenüberstellung der Expressionssysteme Hybridom *vs.* HEK 293T erfolgt in Kapitel 4.2.4.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Eigenschaften der unterschiedlichen Antikörper bereits in den jeweiligen Ergebnisteilen ausführlich kommentiert, so dass hier auf die wichtigsten bispezifischen Konstrukte eingegangen wird.

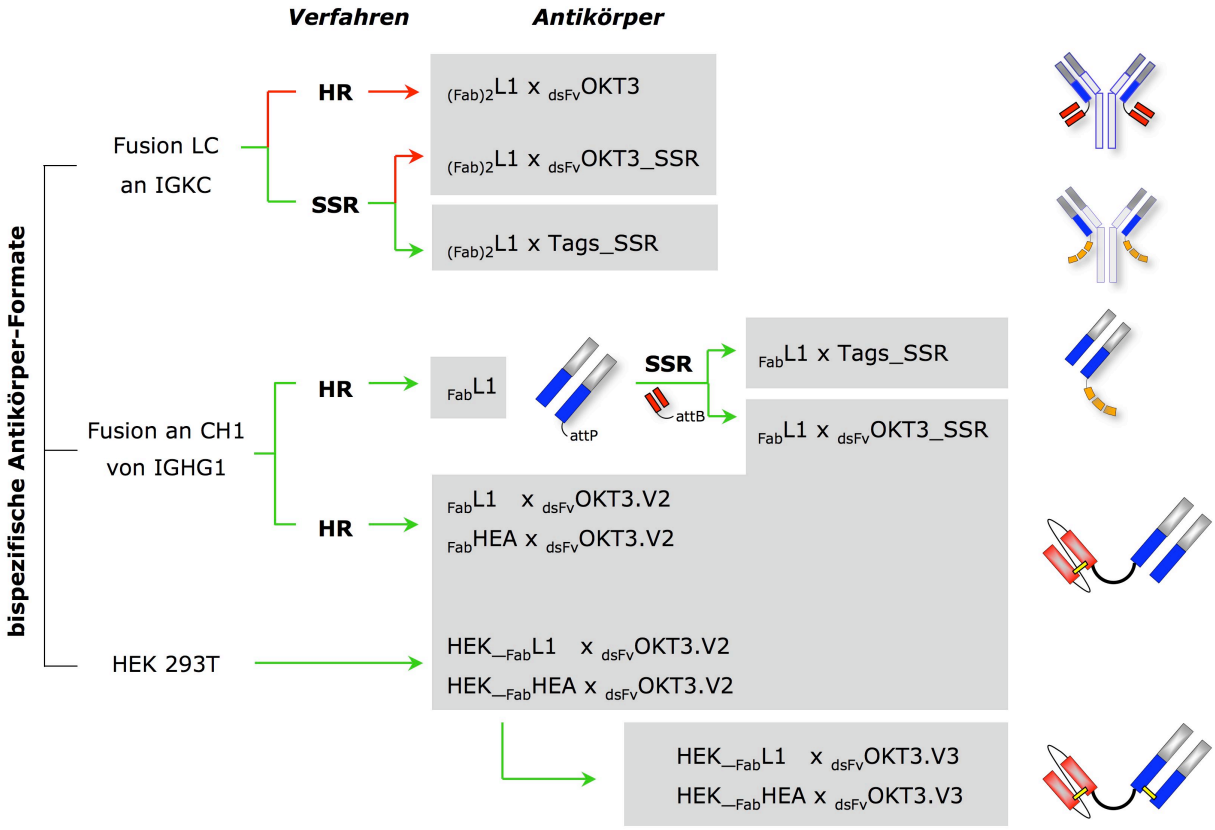


Abb. 4.3: Übersicht über bispezifische Antikörperformate, die in der vorliegenden Arbeit generiert wurden. Rote Pfeile markieren Ansätze, die nicht umgesetzt werden konnten. Grüne Pfeile kennzeichnen Ansätze, aus denen funktionale Antikörper resultierten. Bispezifische Antikörper wurden durch Fusion an die konstante Domäne der leichten Antikörperkette (LC, IGKC) hergestellt, wobei lediglich die Fusion kleiner Tags mittels SSR erfolgreich war. Fusionen an die CH1 Domäne der schweren Kette (HC, IGHG1) über HR ergaben das gewünschte kleine bispezifische Antikörperformat. HC-Fusionen, die über SSR bewerkstelligt wurden, führten zu einem Fab-Fragment als Zwischenprodukt. BsAk wurden zudem in HEK 293T Zellen exprimiert. SSR, φC31-vermittelte, spezifische Rekombination; HR, homologe Rekombination; dsFvOKT3 /V2/V3, unterschiedliche Generationen des disulfidbrückenstabilisierten anti-CD3 *single-chain* Antikörpers. Die Antikörper HEK$_{_Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK$_{_Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 sind die relevanten Endprodukte dieser Arbeit.

4.2.2.1 Die bispezifischen IgG1 Antikörper $_{(Fab)2}$L1x$_{dsFv}$OKT3_(SSR) und $_{(Fab)2}$L1xTags_SSR

In Kapitel 3.1 wurden Versuche beschrieben, in denen der dsFvOKT3 *single-chain* Antikörper an die leichte Antikörperkette fusioniert werden sollte ($_{(Fab)2}$L1x$_{dsFv}$OKT3 bzw. $_{(Fab)2}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR). Gleichzeitig sollte die konstante Domäne der leichten Kette (IGKC) humanisiert werden. Die schwere Antikörperkette blieb vorerst unverändert und sollte erst zu einem späteren Zeitpunkt chimärisiert werden. Diese Fusion gelang weder über homologe Rekombination (HR) noch über die φC31-vermittelte spezifische Rekombination (SSR). Dagegen gelang aber die Fusion einer kleinen Gen-Kassette die eine Abfolge unterschiedlicher Tags (myc, His, Flag) enthält (resultierender Antikörper: $_{(Fab)2}$L1xTags_SSR).

Eine mögliche Erklärung liefert der intrazelluläre Proteintransport der Zelle. B-Zellen besitzen ein Chaperon-basiertes System, welches die Produktion beider Antikörperketten aneinander angleicht und z.B. auch für CHO-Zellen beschrieben wurde (Lee *et al.* 1999b). Demnach werden die schweren Antikörperketten über die CH1-Domäne so lange im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten, bis sich eine korrekt gefaltete leichte Kette mit ihr zusammenlagert. Schwere Ketten bilden bis dahin keine Disulfidbrücken aus und weisen eine fehlerhafte Faltung auf. Auf unsere bispezifischen Antikörper übertragen bedeutet dies, dass die leichte Kette durch die Verlängerung um ca. 280 Aminosäuren (30 kDa) unter Umständen so stark modifiziert wird, dass sie nicht mehr korrekt mit der schweren Antikörperkette assembliert, so dass der Antikörper nicht aus dem ER entlassen wird und bis zu einem toxischen Level akkumuliert. Zudem vergrößert sich durch die Fusion mit einem dsFvOKT3-Antikörper das Molekulargewicht des bispezifischen Antikörpers $_{(Fab)2}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR auf 210 kDa (konventioneller Antikörper 150 kDa). Es wurde in Erwägung gezogen, dass ein derart großer Antikörper nicht über den herkömmlichen Sekretionsapparat an die Zelloberfläche gelangt. Widerlegt wird diese Hypothese durch die erst kürzlich publizierte Arbeit von Michaelson *et al.*, in der große bispezifische Antikörper durch Fusion von scFv-Fragmenten an den C- bzw. N-Terminus der *schweren* Antikörperkette hergestellt werden konnten (Michaelson *et al.* 2009).

Die Betrachtung der dreidimensionalen Struktur eines Antikörpers macht zudem deutlich, dass die Konformation des Antikörpers eine Verlängerung der leichten Kette aufgrund des Platzmangels eventuell nicht zulässt (**Abb. 4.4**). Die Fusion eines *single-chain* an die leichte Antikörperkette könnte eine sterische Hinderung bewirken, so dass der Antikörper nicht korrekt assembliert.

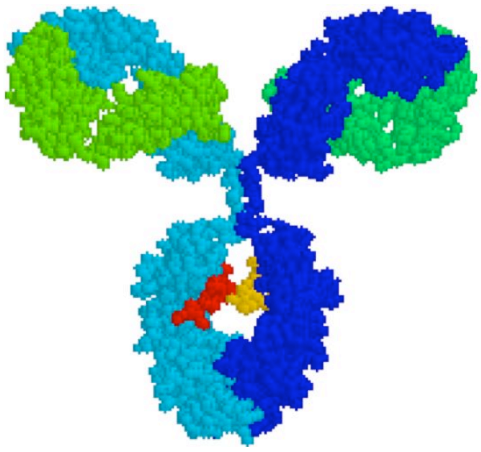


Abb. 4.4: Dreidimensionales Computermodell eines humanen IgG1 Antikörpers. Dieses Modell wurde von Mike Clark, PhD. (Cambridge University, UK) zur Verfügung gestellt.

●, ● Schwere Antikörperketten
● Leichte Antikörperketten
●, ● Kohlenhydrate

Eine starke Toxizität des dsFvOKT3 Antikörper-Moduls kann aufgrund der nachfolgenden Experimente ausgeschlossen werden, in denen dsFvOKT3-Fusionsproteine erfolgreich exprimiert wurden. Bei Fusionsversuchen an die leichte Antikörperkette wurde allerdings beobachtet, dass das Expressionslevel durch den Einbau des dsFvOKT3 Antikörper-Moduls sinkt und dies ist bei der nachstehend beschriebenen kleinen Tag-Kassette nicht der Fall. Das dsFv-Fragment könnte in der Zelle also dennoch mit einem Wachstumsnachteil in Verbindung stehen.

Da keine positiven Transfektanten identifiziert werden konnten, kann keine klare Aussage darüber gemacht werden, welche der hier aufgelisteten möglichen Ursachen letzten Endes für das Misslingen verantwortlich ist. Somit sind diese Überlegungen experimentell nicht unterstützt.

Um dennoch einen Nachweis darüber zu haben, dass das angewandte Verfahren prinzipiell funktioniert, wurde eine Aneinanderreihung von Tags an die leichte Kette angehängt (57 AS bzw. 5,7 kDa). Die so generierte Zelllinie chiL1 K-*attR*-Tags produziert den funktionalen Antikörper $_{(Fab)2}$L1 x Tags_SSR (Kapitel 3.1.2.5) in großen Mengen.

Die in Kapitel 3.1 beschriebene Fusion von dsFVOKT3-Fragmenten an die leichte Antikörperkette erwies sich als nicht realisierbar. Dieser Ansatz sollte dazu dienen, die eingesetzten *single-chain* Antikörper (dsFv) vorab auf Funktionalität zu testen. Die Expression von scFv-Antikörper Fusionsproteinen sollte dadurch vereinfacht werden, indem das Verfahren der homologen Rekombination verwendet wurde, das bereits für die Chimärisierung von Maushybridomantikörpern etabliert worden war (Lüttgau 2004). Die Methode ließ sich jedoch aufgrund der oben beschriebenen strukturellen Probleme nicht auf die Herstellung dieses speziellen bispezifischen Antikörperformats übertragen. Allerdings konnte im Rahmen dieser Versuchsreihe das Werkzeug der spezifischen Rekombination (SSR) optimiert werden (Kapitel 3.1.2.4).

4.2.2.2 Kleine bispezifische Antikörper im Fab x dsFv Format

Das angestrebte Endziel der Dissertation bleibt die Herstellung kleiner bispezifischer Antikörper durch Fusion eines dsFv-Derivates an das Fab-Fragment eines zweiten Antikörpers. Diese Strategie ermöglicht eine Reduzierung des Molekulargewichtes auf unter 80 kDa. Ein weiterer Vorteil ist, dass dieses Antikörperformat in seiner Anordnung der Ig-Domänen einem normalen IgG sehr ähnlich ist und deshalb nicht mit der Sekretionsmaschinerie interferieren sollte. Die Problematik dieses direkten Weges ist jedoch, dass die Deletion der konstanten Domänen (*Hinge*, CH2 und CH3) bei der Herstellung der bispezifischen Antikörper (Fab x dsFv) das alternative Splicen unterbindet, welches zur membranständigen Expression von Antikörpern führt. Der gewünschte bispezifische Antikörper kann daher nicht direkt als Konsequenz der Rekombinationsereignisse isoliert werden. Dieses *mammalian display* dient in unserem System jedoch zur Selektion positiv transfizierter Zellen im FACS.
Daher wurde ein alternatives Selektionsverfahren entwickelt, das auf der Neomycinresistenz beruht. Der Einsatz einer Resistenzkassette zur Anreicherung positiv transfizierter Zellen scheint trivial, erwies sich bei Hybridomzellen jedoch als sehr komplex. Eine der wichtigsten Eigenschaften von Hybridomzellen ist die sehr hohe Antikörperproduktionsrate. Das Einführen eines Resistenzgens in den Antikörperlokus erfordert daher die Einhaltung einer sehr feinen Balance, um die Überexpression des Resistenzgens zu vermeiden (folgt in Abschnitt 4.2.5.3).

Das Fab-Fragment des HuL1-9.3 Antikörpers

Die Fusion des $_{dsFv}$OKT3-Fragmentes an die CH1 Domäne der schweren Kette erfolgte zunächst mittels spezifischer Rekombination. Hierzu musste in einem ersten Ansatz eine Empfängerlinie erzeugt werden, in der die *attP* Erkennungssequenzen für die φC31-Integrase direkt hinter die CH1 Domäne eingebracht wurden (chiL1-9.3 CH1-*attP*, Kapitel 3.2.1.1). Die Erzeugung dieser Hybridomlinie kommt einer Zelllinie gleich, die ein Fab-Fragment des chiL1-9.3 Antikörpers sezerniert ($_{Fab}$L1), da bei der Prozedur die konstanten Antikörpergene des IgG1 ab der *Hinge*-Region entfernt wurden.
An dieses Fab-Fragment konnte dann analog zu Abschnitt 4.2.2.1 eine Tag-Kassette spezifisch fusioniert werden. Das $_{Fab}$L1xTags_SSR Fab-Fragment hat bei der Prozedur die Antigenspezifität des Parentalantikörpers beibehalten und weist im FACS eine gute Bindung an L1CAM positive Zielzellen auf (SKOV-3, **Abb. 3.23**). Die Produktionsraten waren sehr hoch und konnten im ELISA selbst bei einer Verdünnung von 1:10.000 noch nachgewiesen werden. Da in Vorexperimenten das Anfügen des großen dsFv-Anteils problematisch war, erfolgte die Fusion der kleinen Tags an das Fab-Fragment als Nachweis für die Durchführbarkeit der Methode und des Screening-Verfahrens. Aus diesem Grund wurde dieser Antikörper weder aufgereinigt noch biochemisch analysiert.

Drei Generationen des Fab-dsFvOKT3-Antikörpers

1.) $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR

Der erste erfolgreich produzierte bispezifische Antikörper ist $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3_SSR und entstand analog zum oben beschriebenen Fab-Fragment $_{Fab}$L1xTags_SSR durch φC31-Intergase vermittelte Fusion an die Empfängerlinie chiL1-9.3 CH1-*attP* (Kapitel 3.2.1.1). Dieser Antikörper entspricht dem gewünschten Endprodukt der Dissertation.
Während der Antikörper im FACS eine gute Bindung an L1CAM$^+$ Tumorzellen ermöglicht, bindet der dsFvOKT3-Anteil nur schwach an das CD3 Antigen auf Jurkat Zellen (**Abb. 3.26**).

Der dsFvOKT3-Antikörper, der hier zum Einsatz kam, konnte in diesem Ansatz zum ersten Mal auf Funktionalität getestet werden. Die Proteinsequenz wurde von den variablen Domänen des Mausantikörpers OKT3 abgeleitet und mit Linkern und künstlichen Disulfidbrücken stabilisiert. Die Linker, die hier verwendet wurden, entsprachen nicht den üblicherweise in scFv-Fragmenten eingesetzten Peptidsequenzen. So war z.B. die Verbindung zwischen der CH1 Domäne und dem dsFvOKT3-Fragment über die chimäre attR Sequenz bei der φC31-vermittelten Fusion unumgänglich. Der Linker zwischen IGVH OKT3 und IGVL OKT3 enthielt neben einem sehr kurzen Glycin-Serin-Linker auch das myc-Epitop, welches zwar zum Screening der positiven Transfektanten erforderlich war, aber unter Umständen zum Flexibilitätsverlust des gesamten Fragments beitrug. Aus diesem Grund wurde eine neue Variante des disulfidbrückenstabilisierten dsFvOKT3 Antikörpers entworfen: dsFvOKT3.V2. Verändert wurden in erster Linie die Linker zwischen den variablen Domänen des *single-chain* Antikörpers sowie zwischen dem dsFvOKT3-Anteil und der humanen CH1-Domäne.

2.) $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 und $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2

Die dsFvOKT3-Variante dsFvOKT3.V2 wurde zur Transfektion der Zelllinie HuL1-9.3 chikappa eingesetzt (Kapitel 3.2.2.2) und mittels homologer Rekombination in den Lokus der schweren Kette integriert. Dabei kann das Plasmid, welches zur Transfektion eingesetzt wurde, universell für alle Hybridomlinien verwendet werden, die einen murinen IgG1 Antikörper sezernieren. Um dies zu verifizieren, wurde per homologer Rekombination ein zweiter klinisch relevanter Antikörper hergestellt $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2. Modifiziert wurde hier die murine Hybridomlinie HEA125 chiKappa, die in ihrer konstanten Domäne der leichten Kette chimärisiert ist.
Der dsFvOKT3.V2-Anteil konnte in die Ziel-Loci beider Zelllinien integriert werden. Der Integrationsort wurde mittels PCR auf cDNA verifiziert und sequenziert. Beide Bindungsarme des $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 Antikörpers sind funktional und binden analog zu den jeweiligen Positivkontrollen an EpCAM$^+$ Colo205 Zellen bzw. CD3$^+$ Jurkat-Zellen

(**Abb. 3.31 A**). Für den Antikörper $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 wurde die Bindung an L1CAM^{+} SKOV-3 Zellen bestätigt, dagegen erweist sich die Bindung an Jurkat-Zellen auch für die optimierte Proteinsequenz (dsFvOKT3 vs. dsFvOKT3.V2) als sehr schwach, ist aber dennoch nachzuweisen.
Die Unterschiede zwischen beiden Antikörpern sind sehr gering. Die Proteinsequenz des dsFvOKT3.V2-Anteils ist bei beiden bispezifischen Antikörpern identisch (**Anhang V**). Unterschiedlich sind lediglich die variablen Domänen der Fab-Anteile ($_{Fab}$HEA bzw. $_{Fab}$L1), die von der jeweiligen Hybridomzelle vorgegeben wird. Es ist durchaus vorstellbar, dass sich hieraus Strukturunterschiede ergeben, durch die die Gesamtfaltung des Antikörpers und somit auch die Bindungseigenschaften beeinflusst werden.
Als Hauptursache wird allerdings vermutet, dass eine zu geringe Antikörperkonzentration im Kulturüberstand für die Reduzierung der Signalstärke im FACS verantwortlich ist, da eine Titration der Kulturüberstände im ELISA sehr schnell zu Signalverlusten führt. Für die geringe Proteinkonzentration als mögliche Ursache für die Variabilität der Bindungsstärke sprechen auch Ergebnisse von Messungen mit sehr ähnlichen bispezifischen Antikörpern, die zum Vergleich in HEK 293T Zellen produziert wurden (Kapitel 3.2.3): HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2.
Die Proteinsequenzen der bsAk die in Hybridomen bzw. in HEK 293T Zellen exprimiert wurden unterscheiden sich nur minimal im 2A-Peptid am C-Terminus der leichten Antikörperkette (**Anhang V**). Die Analyse der Bindungseigenschaften im FACS ergab aber für den HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 Antikörper eine sehr gute Bindung sowohl an L1CAM als auch an CD3 (**Abb. 3.34**). Dagegen verschlechtern sich die Bindungseigenschaften von HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2, der aber funktionell band, als er in Hybridomen exprimiert wurde. Somit verhalten sich die Antikörper aus dem Expressionssystem der HEK 293T Zellen genau spiegelverkehrt zu den Varianten aus Hybridomen, was durch Unterschiede in der Proteinkonzentration zu erklären ist.

Die besten Produzenten für die bsAk waren HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 (HEK 293T) und $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 (Hybridom). Die Antikörper wurden mittels Säulenchromatographie in kleinem Maßstab aufgereinigt und proteinbiochemisch analysiert (Kapitel 3.2.4). Die wichtigste Erkenntnis aus den biochemischen Untersuchungen ist, dass beide Antikörpervarianten leicht instabil sind. Schwere und leichte Antikörperketten assemblieren nur schwach und dissoziieren auf einem SDS-Gel leicht und ohne Zugabe reduzierender Agenzien (**s. Abb. 3.35**, **Abb. 4.1**). Der Anteil an assemblierten bsAk im Proteingemisch ist laut SDS-PAGE Analyse sehr gering und kann nicht immer im Western-Blot nachgewiesen werden. Anhand von Gelfiltrationsexperimenten wurde jedoch gezeigt, dass die Antikörper nach der Aufreinigung vorwiegend als assemblierte bsAk vorliegen und erst in Anwesenheit von SDS oder durch Hitzeeinwirkung destabilisiert werden. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass sie im FACS an ihre

jeweiligen Zielantigene binden. Diese Bindung setzt eine Zusammenlagerung beider Ketten voraus und spricht auch für eine starke wechselseitige Affinität von schwerer und leichter Kette. Eine Titration der Antikörper im FACS zeigt zudem, dass sie auch stark verdünnt noch funktional sind. Daher bleibt offen, welche Antikörper-Fraktion zu einem gegebenen Zeitpunkt im Proteingemisch für die Bindung verantwortlich ist. Die Instabilität der Antikörper, wenn auch gering, kann allerdings eine weitere Erklärung für die Variabilität in der Intensität der Bindung sein.

Bestimmung der Affinität von $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK-$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2

Aufgrund der kurzen *in vivo* Halbwertszeit kleiner Antikörperderivate, ist die rasche Bindung an die Tumorzellen von entscheidender Bedeutung. Dabei spielt vor allem die Affinität des bsAk für das Tumor-assoziierte Antigen eine wichtige Rolle und sollte somit möglichst hoch sein. Sie beeinflusst *in vivo* die spezifische Anreicherung des Antikörpers im Tumorgewebe und das zytotoxische Potential. Eine zu hohe Affinität kann allerdings auch kontraproduktiv sein, da Antikörpermoleküle dazu tendieren, nur in den Randbereichen des Tumors zu akkumulieren und nicht in das wenig-vaskularisierte Innere zu diffundieren.

Die Affinität des Effektorarms sollte dagegen schwächer sein als die Affinität für das Tumorantigen. Eine zu starke Affinität könnte *in vivo* dazu führen, dass das Therapeutikum von den Effektorzellen absorbiert wird, bevor es den Ort der Läsion erreicht. Dadurch wären die Anreicherung des Moleküls im Tumorgewebe und somit auch die Tumorzelllyse beeinträchtigt. Dies ist insbesondere bei schwach exprimierten Tumor-assoziierten Antigenen zu beachten. Desweiteren kann eine hohe Affinität des Antikörpers für die Effektorzelle eine Überreaktion der Effektorfunktion mit starken Nebenwirkungen einleiten. Das Verhältnis der Affinität für das Effektorzellantigen gegenüber der Affinität für das Tumorantigen ist somit sehr genau zu definieren.

Die Analyse der Affinitäten der beiden Antikörper bsAk $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 hat gezeigt, dass die Konvertierung des monoklonalen Antikörpers OKT3 in das dsFvOKT3-Format bereits einen sehr großen Affinitätsverlust in der Größenordnung 8-140-fach mit sich bringt (**Abb. 3.39**). Ein Affinitätsverlust um den Faktor 4 ist bei der Konvertierung in ein scFv-Format üblich. Die hier ermittelten Werte weichen daher stark von den erwarteten Affinitäten ab. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Affinitätsverlust durch die künstliche Disulfidbrücke hervorgerufen wird. Bei fehlerhafter Ausbildung, könnte diese Disulfidbrücke sterische Hinderungen bewirken, die in einer schwach affinen Konformation des dsFvOKT3-Antikörpers resultiert.

4.2.3 Stabilisierung der bispezifischen Antikörper

3.) HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 (3. Generation)

Fraglich erschien, ob die intramolekulare Disulfidbrücke zwischen schwerer und leichter Kette überhaupt ausgebildet wird. Die Sequenzdaten der bispezifischen Antikörper wurden mit Hilfe der IMGT-Datenbank überarbeitet. Dabei fiel auf, dass die Positionierung der Cysteine in der CH1 Domäne der schweren Kette des IgG1 Isotyps (IGHG1) von sämtlichen andern Antikörperisotypen abweicht. Die CH1 Domäne von IgG1 Antikörpern enthält demnach ausschließlich Cysteine, die in intermolekulare Disulfidbrücken eingebunden sind. Das Cystein, welches für die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke mit der leichten Kappa Kette verantwortlich ist, liegt bei IgG1 in der *Hinge*-Region. Die Sequenz der *Hinge* wurde bei der Planung der bispezifischen Antikörper aber nicht miteinbezogen. Die Abwesenheit des relevanten Cysteins erklärt auch, weshalb die schweren und leichten Antikörperketten der bisher produzierten bispezifischen Antikörper in SDS nicht hinreichend assoziieren.

Dieser Defekt wurde in der dritten dsFvOKT3.V3 Generation behoben, indem die ersten 5 Aminosäuren der *Hinge*-Region an die CH1-Domäne angefügt wurden, wobei die Sequenz mit dem relevanten Cystein abschloss. Aus Zeitgründen wurden die stabilisierten Antikörper HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 ausschließlich in HEK 293T Zellen exprimiert und in kleinem Maßstab aufgereinigt.

Die Bindung an die Zielantigene EpCAM bzw. L1CAM und CD3 wurde mit den gereinigten Proteinen sowie mit Kulturüberständen nachgewiesen und entsprach den Erwartungen. Das Proteinmaterial wurde auch zur Analyse mittels SDS-PAGE und im Western-Blot herangezogen (**Abb. 3.42**) und bestätigte die erfolgreiche Stabilisierung der bispezifischen Antikörper. Unter nicht reduzierenden Bedingungen war für beide Antikörper die 80 kDa Bande sichtbar, die dem vollständig assemblieren Antikörper entspricht. Dieser ließ sich auch in schwere und leichte Ketten reduzieren. Monomere der schweren oder der leichten Antikörperketten wurden ausschließlich unter reduzierenden Bedingungen detektiert.

Die sehr geringe Proteinmenge der bsAk ermöglicht zum derzeitigen Zeitpunkt keine weiterführenden Analysen zur Affinität und zum zytotoxischen Potential.

4.2.4 Vergleich der Produktivität von Hybridomen und HEK 293T Zellen

Bei der Expression von Antikörpern in Säugetierzellen müssen die regulatorischen Elemente sorgfältig ausgesucht werden. Es gibt zahlreiche Studien in denen Expressionsplasmide mit unterschiedlichen Promotoren, Polyadenylierungssequenzen und Anordnungen der Antikörperketten auf dem Plasmid untersucht worden sind (Li 2006). Um rekombinante Antikörper in Säugetierzellen herzustellen, müssen schwere und

leichte Antikörperketten möglichst in gleichen Mengen innerhalb der Zelle synthetisiert werden. Aufgrund der zufälligen Integration der Antikörpergene in das Zielgenom unterscheiden sich Expressionsrate und Stabilität beider Ketten jedoch in den meisten Expressionssystemen erheblich. Dieses Phänomen ist als "*Positionseffekt*" bekannt.

Expression in HEK 293T Zellen

Um eine äquimolare Expression von schwerer und leichter Antikörperkette in HEK 293T Zellen zu erreichen, wurden in dieser Arbeit die Gene für die schwere und die leichte Kette direkt hintereinander geschaltet und lediglich über das so genannte 2A-Peptid voneinander getrennt. Die Expressionsplasmide wurden in HEK 293T Zellen transfiziert und die beiden bispezifischen Antikörper HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 und HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 im Kulturüberstand nachgewiesen. Der SDS-PAGE Analyse ist zu entnehmen, dass beide Ketten exprimiert werden und auf Proteinebene auf Höhe des 2A Peptids voneinander getrennt werden. Da die Antikörper sowohl gereinigt als auch als Kulturüberstände an die Zielantigene gebunden haben, ist davon auszugehen, dass schwere und leichte Kette korrekt assemblierten und die 2A Sequenz die Bindungseigenschaften nicht beeinträchtigt.

Die Expression der Konstrukte in HEK 293T Zellen ist verglichen mit der Transfektion von Hybridomen sehr einfach. Der Zeitrahmen bis zur Identifizierung von positiven Klonen verlängert sich gegenüber der Hybridom-Technik um ca. 3-4 Wochen auf maximal 6 Wochen. Allerdings ist hier von Vorteil, dass direkt Einzelklone von einer Platte gepickt werden können und somit ein optimales Screening nach hoher Produktionsrate möglich wird. Hybridom-Pools sind bereits nach ca. 2 Wochen zu detektieren, müssen dann aber noch zu Einzelklonen vereinzelt werden und erneut expandiert werden.

Expression in Hybridomen

Demgegenüber basierte die Produktion in Hybridomen auf der Expression von zwei unabhängigen Genloci, wobei die Exons durch Splicen zusammengefügt werden. Da die Transgene passgenau in den endogenen Antikörperlokus eingebracht wurden, waren sämtliche transkriptionsrelevanten Elemente bereits von der Hybridomzelle vorgegeben. Wie bereits erwähnt wurde, stellt sich die Problematik der differentiellen Expression von schwerer und leichter Antikörperkette hier nicht, da fehlerhaft assemblierte oder gefaltete schwere Ketten im ER zurückgehalten werden.

Die Produktion von bsAk in Hybridomen basierte auf der Hypothese, dass sich die hohe Antikörpersyntheserate von Hybridomen auch für die Produktion von bispezifischen Antikörpern ausnutzen lässt. Hinsichtlich der Ausbeute zeigen die Daten dieser Arbeit jedoch, dass Hybridome, die bsAk produzieren, ihrer Mutterzelllinie deutlich unterlegen sind, die den parentalen Antikörper sezernieren.

Bei der Projektplanung wurde darauf geachtet, den endogenen Antikörperlokus möglichst wenig zu modifizieren. Dennoch könnte die verminderte Expressionsrate ebentuell auf die Veränderungen im Antikörperlokus zurückzuführen sein. Die neo^R(-)-Selektionskassette, die bei der homologen Rekombination verwendet wird, inseriert etwa 1800 bp in den sehr aktiven Antikörper Genlokus. Da bei der spezifischen Rekombination zusätzlich das Plasmid *backbone* integriert wird, erhöht sich diese Länge auf fast 4300 bp. Die neo^R(-)-Kassette ist von LoxP Stellen flankiert und wurde mit der Cre-Rekombinase wieder aus dem Genom entfernt. Bei Versuchen zur SSR wurde hierbei zusätzlich das Plasmid *backbone* entfernt. Dies änderte jedoch nichts an der im ELISA quantifizierten geringen Antikörpermenge. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass die neo^R(-)-Selektionskassette für die geringe Expression des bsAk verantwortlich ist.

Bei der Transfektion von Hybridomen liegt eine der Schwierigkeiten darin, Klone hinsichtlich ihrer Produktivität zu prüfen. Positive Klone werden nach der Transfektion und anschließender Sortierung im FACS mit Hilfe eines ELISA-Tests identifiziert. Bei den Kulturen handelt es sich hierbei immer um ein Gemisch von positiven und negativen Zellen die in einem variablen Verhältnis zueinander stehen (Zellpools). Die eigentliche Produktivität einer positiven Zelllinie kann jedoch nur anhand von Einzelklonen korrekt ermittelt werden. Somit besteht die Gefahr, bei der Auswahl eines Zellpools bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Fehlentscheidung zu treffen. Dieses Problem stellt sich bei dem von S. Lüttgau (2004) beschriebenen Verfahren zur Chimärisierung muriner Antikörper nicht, da hier von Beginn an positive und negative Transfektanten aufgrund der differentiellen Oberflächenexpression im FACS voneinander unterschieden werden können.

Eine Titration der Kulturüberstände im ELISA ergab für bsAk-sezernierende Zelllinien eine starke Reduktion der Immunglobulinproduktion verglichen mit der Ausgangszelllinie. Eine quantitative Angabe ist schwer, da die im ELISA verwendeten polyklonalen Antikörper in den Kontrollantikörpern, die als Standard verwendet werden, sehr viel mehr Epitope vorliegen und somit bereits das Grundsignal intensiver ist. Die Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern (z.B. anti-Tag-Ak, anti-human-kappa-Ak) ergab dagegen ein zu schwaches Signal.

Es wurde bereits erwähnt, dass bei der Konvertierung eines Hybridomantikörpers in das entsprechende Fab-Fragment weiterhin hohe Produktionsraten erreicht wurden. Im ELISA Test ließ sich der Kulturüberstand der Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attR*-Tags-neo(-), die den Antikörper $_{Fab}$L1xTags_SSR (anti-L1CAM Fab-Antikörper) produziert, bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 titrieren. Durch die Fusion des dsFvOKT3-Moduls reduzierte sich dieser Wert auf 1:1000. Da für Fab-Fragmente gute Ausbeuten erzielt wurden, ist der dsFvOKT3-Anteil eventuell für die verminderte Syntheserate verantwortlich. Es ist nicht auszuschließen, dass die Produktionsrate durch die Verwendung anderer Module wieder hergestellt werden kann.

Eine vergleichende Titration von Kulturüberständen aus HEK- und Hybridomklonen im ELISA ergab, dass beide Expressionssysteme hinsichtlich ihrer Immunglobulinproduktion gleichwertig sind (Daten nicht gezeigt). Für beide Expressionssysteme gilt aber bislang, dass die Ausbeute an Antikörpern nicht vorhersehbar ist.
Im Fall der Hybridome wurde angenommen, dass eine stark produzierende Ausgangszelllinie in eine effiziente bispezifische Zelllinie konvertiert werden kann. Dabei unterscheiden sich die beiden verwendeten Mutterzelllinien HuL1-9.3 und HEA125 deutlich in ihren Produktionsraten. Die Ausgangslinie HuL1-9.3 ist der Linie HEA125 in Wachstumsrate und Produktivität überlegen. Bei den resultierenden bispezifischen Linien chiL1-9.3 CH1-dsFvOKT3.V2 und chiHEA125 CH1-dsFvOKT3.V2 kehrt sich dies jedoch um. Interessant ist, dass die Zelllinie chiL1-9.3 CH1-*attR*-$_{dsFv}$OKT3.V2 den bispezifischen $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 Antikörper nur sehr niedrig exprimiert, insbesondere verglichen mit der Ausgangslinie HuL1-9.3. Die Ausbeute des anti-L1CAM Fab-Fragments (ohne $_{dsFv}$OKT3-Anteil) ist jedoch in Relation zu den bispezifischen Antikörpern sehr hoch. Dies spricht dafür, dass das dsFvOKT3-Modul für die schlechte Produktionsrate verantwortlich ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Ziel, bispezifische Antikörper in Hybridomen herzustellen, erreicht wurde. Eine signifikante Erhöhung der Ausbeute über das Produktionslevel von HEK 293T Zellen konnte aber bislang nicht erzielt werden. Die Verluste gegenüber den parentalen Hybridomlinien sind vermutlich nicht auf die Verwendung einer G418 Selektionskassette zurückzuführen, da sich die spätere Entfernung aus dem Genom nicht auf die Produktionsrate auswirkte. Ebenso ist warscheinlich, dass die leichte Instabilität der Fab-Fragmente nicht mit der Ausbeute zusammenhängt, da gereinigte bsAk in der Gelfiltration größtenteils als assemblierte Monomere in Erscheinung treten. Hybridomlinien, die bsAk mit stabilisiertem Fab-Fragment produzieren, wurden noch nicht zum Vergleich hergestellt. Stabile Antikörper stammen bisher nur aus HEK-Zellen (HEK_$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3, HEK_$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3). Somit ist der Verlust an Produktivität mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das dsFvOKT3-Modul zurückzuführen. Dieses bietet daher einen Ansatzpunkt für weitere Optimierungsmaßnahmen.

4.2.5 Positivselektion und Rekombinationseffizienzen - HR versus SSR

Der Gentransfer in Säugetierzellen ist nicht immer effizient, vor allem wenn es um die Herstellung stabiler Zelllinien geht. Die Integration in das Zielgenom erfolgt weitgehend unspezifisch und mit einer Frequenz von 1 in $1{\cdot}10^3$ bis $1{\cdot}10^4$ und übertrifft somit Methoden zur spezifischen Integration um ein Vielfaches (Vasquez *et al.* 2001). Der Lokus und die Anzahl eingebrachter Genkopien kann nicht vorhergesagt werden und somit variiert das Expressionslevel stark. Es ist demnach von Vorteil, wenn man sich z.B.

konstitutiv exprimierte Loci zunutze machen kann. Für die Lokus-spezifische Integration sind zurzeit zwei Techniken verfügbar, die homologe Rekombination (HR) und die Rekombinase-vermittelte Integration (SSR, *site specific recombination*). Die methodischen Hintergründe wurden bereits im Kapitel 2.3.8 beschrieben.

4.2.5.1 Anreicherung positiver Klone nach HR durch Verlust der Oberflächenexpression

Die homologe Rekombination wurde bereits zur Chimärisierung muriner monoklonaler Antikörper eingesetzt, um den Antikörperlokus von Hybridomen ortsspezifisch zu verändern. Die homologe Rekombination nach dem von S. Lüttgau (2004) publizierten Verfahren fand neben der Chimärisierung von Antikörperketten auch bei der Herstellung von Empfänger Zelllinien für die spezifische Rekombination Anwendung und basierte auf der differentiellen Expression von Antikörpermolekülen auf der Zelloberfläche.
Neu dagegen war in dieser Arbeit die Entwicklung einer Methodik zur Anreicherung positiver Klone nach HR bei Transfektionen, die in Hybridomen mit einem Verlust der Oberflächenexpression einhergehen. Dies war z. B. bei der Fusion des dsFvOKT3-Moduls an die CH1 Domäne der schweren Kette der Fall (**Abb. 4.5**). Aufgrund der niedrigen Effizienz der homologen Rekombination musste hier auf das Neomycin Phosphoryltransferase II Resistenzgen (neo^R-) zur anschließenden Positivselektion mit G418 zurückgegriffen werden, welches in den Antikörperlokus kointegriert wurde.

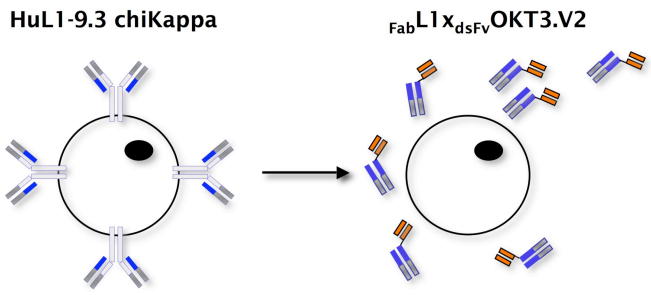


Abb. 4.5: Verlust der Oberflächenexpression nach Homologer Rekombination und G418 Anreicherung. Der dsFvOKT3 *single-chain* Antikörper wurde durch HR hinter die konstante Domäne der schweren Kette integriert, wobei die membranständige Expression der Antikörper verloren ging. Auszug aus den Abbildungen 3. 28.

Die Anreicherung der positiven Klone aus der homologen Rekombination kann wie folgt abgeschätzt werden: Die Effizienz der homologen Rekombination liegt in der Regel zwischen 1 positive Zelle auf $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^8$ Zellen. Dabei wird meistens nicht zwischen einfacher Integration und vollständigem Kassettenaustausch unterschieden. Die von S. Lüttgau (2004) ermittelte Rekombinationsfrequenz belief sich auf 1 in $1 \cdot 10^8$ Zellen und wurde auch in unseren Versuchen reproduziert. Wir betrachten diese Größe demnach als recht zuverlässig. Diese Frequenz basiert ausschließlich auf der Selektion oberflächenpräsentierter Antikörper (keine G418 Selektion) und ermöglicht somit nur die

Detektion des vollständigen Kassettenaustauschs. Rekombinationsereignisse, bei denen lediglich eine einseitige Integration in den Antikörperlokus stattfindet (3' oder 5' Ende) und somit falsch-positive Klone ergeben, werden bei der Berechnung der HR Frequenz nicht erfasst.
Als weitere Größe muss auch die unspezifische Integration von Plasmiden in das Zielgenom berücksichtigt werden. Diese liegt bei Plasmiden, die einen eigenen Promotor trangen bei 1 in $1 \cdot 10^3$ Zellen, was bei der hier verwendeten neo^R(-) Selektionskassette der Fall ist (Plasmide ohne eigenen Promotor: 1 in $1 \cdot 10^4$ Zellen).
Ausgehend von ursprünglich $1 \cdot 10^8$ Zellen nach der HR kann diese Zellzahl durch G418 Anreicherung auf etwa $1 \cdot 10^5$ Klone reduziert werden, wobei unter den G418 resistenten Zellen auch Klone enthalten sind, die durch unspezifische Integration entstanden sind. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass etwa $1 \cdot 10^5$ Zellen analysiert werden müssen, um den EINEN durch HR erhaltenen Klon zu detektieren. Um diesen Klon weiter anzureichern, haben wir uns den Verlust der Oberflächenexpression von Antikörpern zunutze gemacht. Hybridome, die aufgrund von korrekter HR kleine bsAk sezernieren, können im FACS von den nicht-transfizierten Mutterzellen unterschieden werden, die weiterhin Antikörper auf der Zelloberfläche tragen.
Also wurden in den Versuchen nach der Transfektion $5 \cdot 10^4$ Zellen, die keine Antikörper auf der Oberfläche tragen, als 100er Pools in insgesamt 5 96-Loch Platten sortiert und die Pools im ELISA auf seziernierte Antikörper mit humanisiertem Fab-Anteil untersucht.

Bei der Erzeugung der Zelllinie chiHEA CH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) ergab das Screening der Platten mittels ELISA ca. 10 positive Pools pro Platte (10^4 sortierte Zellen). Dies ergäbe bei der Herstellung des kleinen bsAk $_{Fab}$HEAx_{dsFv}OKT3.V3, durch den Verlust der Oberflächenexpression etwa eine Anreicherung um den Faktor 100, was unsere Erwartungen deutlich übertraf. Allerdings stützt sich dieser Wert auf Annahmen zur Effizienz der HR und unspezifischen Rekombination. Zudem muss berücksichtigt werden, dass bei dieser Screening-Prozedur auch Rekombinationsereignisse erfasst werden, bei denen die Integration einseitig am 5' Ende erfolgte. Deshalb wurde der genomische Integrationslokus der identifizierten Klone mittels PCR verifiziert. Dabei ergab sich, dass nur einer von 10 Klonen aufgrund eines Integrationsereignisses entstanden war. Alle anderen Klone sind Produkte eines vollständigen Kassettenaustauschs.

Die Werte, die bei der Herstellung der Zelllinie chiL1 CH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) errechnet wurden, waren mit einem Anreicherungsfaktor von 37 weniger effektiv. Es ist anzunehmen, dass dieser Unterschied auf die Vorselektion mit G418 nach der Transfektion zurückzuführen ist. Die Abkömmlinge der HEA125 Linie ließen sich sehr viel schneller selektieren als solche der HuL1-9.3 Linie. Diese höhere Stringenz der Selektion könnte auch erklären, weshalb die Zelllinien, die in dieser Arbeit von HEA125 abgeleitet

wurden, meistens höhere Expressionsraten für bispezifische Antikörper hatten. Dass HEA125 empflindlicher auf G418 reagiert, lässt sich anhand der Eigenschaften der Mutterzelllinien gut erklären. HuL1-9.3 ist eine sehr robuste, schnell wachsende Hybridomlinie, während HEA125 in der Handhabung viel sensitiver ist und eher langsam wächst. Dies wird vor allem bei der Erzeugung von Einzelklonen von HEA125 offensichtlich, die nach limitierter Verdünnung ca. 1 Woche später heranwachsen als Einzelklone aus HuL1-9.3. Bei der Erzeugung des bispezifischen Antikörpers $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3 in der Mutterlinie HuL1-9.3 hätte vermutlich eine höhere G418 Dosis eingesetzt werden müssen.

Insgesamt wurden sieben unabhängige Experimente dieser Art durchgeführt, bei denen unterschiedliche Zelllinien (HEA125, HuL1-9.3) und unterschiedliche Fusionen ($_{dsFv}$OKT3.V1, $_{dsFv}$OKT3.V2, dsFvCD16) getestet wurden.

4.2.5.2 φC31-vermittelte Rekombination (SSR)

Bei der Integration des Eingangsplasmides p*AttB*-Tags in die Empfänger Zelllinie chiL1-9.3 K-*attP* über φC31-vermittelte Rekombination wurde die Tag-Kassette an die konstante Domäne der leichten Kette fusioniert (**Abb. 4.6**). Das Screening konnte somit über die modifizierten Oberflächenpräsentierten Antikörper erfolgen, z.B. über das His-Tag oder das myc-Tag.
Die sich hieraus ergebende Rekombinationseffizienz lag bei 1 in $2{,}6 \cdot 10^5$ (Rechnung in **Abb. 3.15**). Verglichen mit der Effizienz der homologen Rekombination bei der Chimärisierung von Antikörpern (1 in $1 \cdot 10^8$ mit einem ähnlichen Screening-Verfahren) ist die SSR somit um ein 300 bis 500-faches effizienter. Beide Systeme sind miteinander vergleichbar, da beide Screening-Verfahren ausschließlich auf der differentiellen Oberflächenexpression basieren und keine G418 Vorselektion erfolgte. Es wurde bei diesen Experimenten beobachtet, dass die selektierten Klone gegenüber den Mutterzellen einen leichten Wachstumsnachteil aufweisen. Als gereinigte Population stellt dies jedoch kein schwerwiegendes Problem dar.

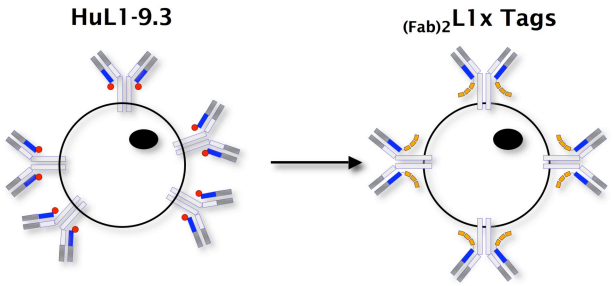


Abb. 4.6: Screen nach modifizierter Oberflächenexpression nach SSR ohne G418 Anreicherung. Eine Aneinanderreihung verschiedener Tags wurde durch die φC31-Integrase spezifisch hinter die konstante Domäne der leichten Kette integriert, so dass modifizierte Antikörper auf der Zelloberfläche detektiert werden können. Auszug aus den Abbildungen 3.7 und 3.13 .

Die Herstellung kleiner bispezifischer Antikörper mittels SSR erfordert ebenfalls die Entwicklung einer Prozedur zur Anreicherung positiver Zellen. Die Anreicherung über die differentielle Oberflächenexpression (s. oben) oder den Verlust der Oberflächenexpression (Abschnitt 4.2.5.1) ist hier nicht mehr möglich. Die Schwierigkeit dieser Transfektion liegt darin, dass die Empfängerzellen chiL1-9.3 CH1-*attP* bereits ein Fab-Fragment sezernierten und somit die Oberflächenexpression schon verloren haben (**Abb. 4.7**). Positiv transfizierte Zellen können somit einzig über die Resistenzkassette angereichert werden.

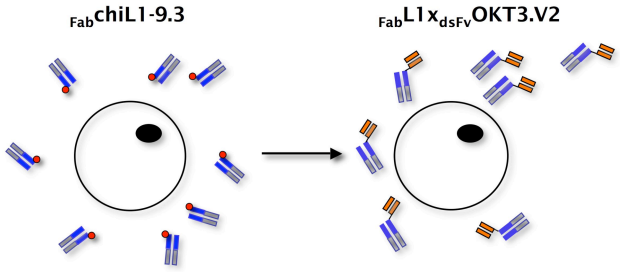


Abb. 4.7: Screen nach modifizierter Oberflächenexpression nach SSR mit G418 Anreicherung. Eine Aneinanderreihung verschiedener Tags wurde durch die φC31-Integrase spezifisch an das Fab-Fragment der schweren Kette fusioniert. Modifizierte Antikörper werden weiterhin sezerniert und werden über das His-Tags detektiert. Auszug aus den Abbildungen 3. 18 und 3. 20.

Auch hier konnten kleine bsAk erfolgreich isoliert werden, wenngleich die Effizienz der SSR geringer ausfiel als berechnet.

Da wir erwarten können, dass bei der SSR ca. eine von $2{,}6 \cdot 10^5$ Zellen das gewünschte Rekombinationsereignis aufweist, muss auch hier der gewünschte Klon durch G418 Selektion angereichert werden. Die G418 Selektion ermöglicht eine Anreicherung um etwa den Faktor 1000. Auch hier muss beachtet werden, dass unter den G418 resistenten Zellen auch Klone enthalten sind, die nicht durch SSR, sondern durch unspezifische Integration entstanden sind. Dies bedeutet rechnerisch, dass anstelle von einer von $2{,}6 \cdot 10^5$ Zellen nur noch 260 Zellklone getestet werden müssten, um das gewünschte Ereignis zu identifizieren. $1 \cdot 10^4$ Zellen wurden als 100er Pools in 96-Loch Platten sortiert. Durchschnittlich konnten 10 positive Klone pro Platte identifiziert

werden, so dass sich die tatsächliche Effizienz auf eine von $1 \cdot 10^3$ Zellen beläuft und nicht wie theoretisch angenommen 1 aus 260. Die hier ermittelten Werte sind Richtwerte und basieren auf nur zwei unabhängigen Experimenten.

Bei der homologen Rekombination ermöglichte der Verlust des Oberflächendisplays vermutlich eine Anreicherung um den Faktor 30-100. Dieser Screen ist hier nicht möglich, wird jedoch durch die ca. 300-500-fach höhere Effizienz der spezifischen Rekombination kompensiert. Somit konnten die gewünschten Klone, die mit SSR hergestellt wurden, allein durch die Anreicherung mit G418 erfolgreich an die Werte mit Oberflächenscreening angeglichen werden.
Die Herstellung kleiner sezernierter bsAk durch SSR, war etwas weniger effizient als theoretisch erwartet. Eine mögliche Ursache könnte der genomischer Kontext der schweren Kette sein, der vielleicht nicht so zugänglich ist wie der Lokus der leichten Kette, der auch bei der Abschätzung des Anreicherungsfaktors von 1/ $2{,}6 \cdot 10^5$ Zellen zugrunde lag (**Abb. 4.6**). Als weitere Ursache könnte auch ein Wachstumsnachteil der Hybridomzellen in Betracht gezogen werden.

Trotz geringer Rekombinationseffizienzen konnten also zwei Wege aufgezeigt werden, den aktiven Antikörperlokus einer Hybridomzelle gentechnologischen Manipulationen zugänglich zu machen. Wir konnten kleine sezernierte bsAk isolieren, die spezifisch im aktiven Antikörperlokus exprimiert werden. Zum einen konnte die Anreicherung über den Verlust der Oberflächenexpression so optimiert werden, dass ein praktikables Selektionssystem erzeugt wurde. Zum anderen konnte auch die SSR aufgrund der hohen Effizienz (1/ $2{,}6 \cdot 10^5$) eingesetzt werden. Dieses System ist jedoch aufwändiger und zudem stellt die *attP*-Sequenz einen Linker dar, der auf Proteinebene eventuell nicht optimal ist.

4.2.5.3 Der Einfluss des Antikörperpromotors und die neo^R(-) Resistenzkassette

Die Antikörperproduktionsrate von Plasmazellen und Hybridomen ist bemerkenswert hoch. Dabei werden die Antikörper entweder in das umgebende Kulturmedium sezerniert oder als Oberflächen-Immunglobulin auf der Zellmembran präsentiert. 10% der synthetisierten Proteine dieser Zellen sind Antikörper. Bei der Integration von Selektionsmarkern in den Antikörperlokus, kann es somit sehr schnell zu einer Überexpression des Resistenzgens kommen. Die von der neo^R-Kassette kodierte Phosphoryltransferase könnte so innerhalb der Zelle zu toxischen Konzentrationen akkumulieren.

In dieser Arbeit wurden daher verschiedene Designs von neo^R-Genkassetten getestet:

- In einem ersten Ansatz, wurde das Resistenzgen unter Kontrolle der IRES Sequenz (*internal ribosome entry site*) des Encephalomyocarditis Virus (ECMV) gesetzt. Um eine Überexpression des Resistenzgens zu vermeiden, wurde die Sequenz gemäß den Vorschlägen von Rees *et al.* abgeschwächt (Rees *et al.* 1996). Die IRES-neo^R Kassette wurde hinter das STOP-Codon des Antikörpergens der schweren Kette eingeführt. Die Transfektion mit diesem Konstrukt führte aber zu keinem Ergebnis. Entweder war die Abschwächung der Expression des Resistenzgens nicht stark genug für eine Anwendung im Antikörperlokus, oder das genaue Gegenteil bewirkte eine zu schwache Ausprägung der Resistenz, so dass die Transfektanten bei der G418 Selektion ebenfalls abstarben. Für die erste Hypothese sprechen die Versuche mit den Resistenzkassetten neo^R(+) und neo^R(-).
- In einem weiteren Ansatz wurden die Selektionskassetten neo^R(+) und neo^R(-) eingesetzt. Diese Kassetten sind nicht abgeschwächt und beinhalten einen eigenen Promotor (SV40) und Terminator (HSV TK). Sie wurden entweder in der Leserichtung (+) oder gegen das Leseraster (-) der Antikörpergene in das Genom integriert. Die Transfektion mit diesen Konstrukten führten zu dem Ergebnis, dass nur für die (-) Orientierung positiv transfizierte Zellen isoliert werden konnten, nicht aber für die (+) Orientierung. Dies spricht dafür, dass sich der endogene Antikörperpromotor positiv auf den Promotor der neo^R(+) Kassette auswirkt und die Expression des Resistenzgens antreibt. Bei der Positionierung der neo^R(-) Kassette in invertierter Orientierung scheint diese Auswirkung unwesentlich zu sein, so dass das Resistenzgen hier nicht überexprimiert wird.

Aufgrund der Tatsache, dass für die neo^R(+) bzw. IRES-neo^R Kassetten keine Transfektanten gefunden wurden, konnten die Hypothesen experimentell nicht verifiziert werden. Die neo^R(-) Kassette konnte in verschiedenen Versuchsanordnungen erfolgreich zur Selektion eingesetzt werden, und konnte auch in parallel laufenden Projekten unserer Arbeitsgruppe für unterschiedliche Positionierungen im Antikörperlokus eingesetzt werden.

4.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die zentralen Aufgaben dieser Arbeit waren (a) die Entwicklung zweier kleiner bispezifischer Antikörper mit Spezifität für Karzinom-relevante Antigene und (b) die Etablierung von Hybridomen als Expressionssystem für rekombinante bispezifische Antikörper-Formate als Erweiterung zu der bereits bestehenden Bibliothek vollständig humaner Antikörper.

Zur Herstellung bispezifischer Antikörper wurden im Wesentlichen zwei Ansätze verfolgt:

- Die Fusion eines *single-chain* Antikörpers an den C-Terminus der leichten Kette eines Zweitantikörpers zur Erzeugung großer tetravalenter Antikörpermoleküle. Die Daten dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass dieser Ansatz vermutlich aufgrund von sterischer Hinderung nicht realisierbar ist. Erst kürzlich wurde von Michaelson et. al ein bispezifisches Antikörperformat publiziert, in dem ein disulfidbrückenstabilisierter single-chain Antikörper an das N-terminale Ende der schweren Antikörperkette fusioniert wurde (Michaelson *et al.* 2009). Diese Alternative wird nun auch zur Expression tetravalenter bsAk in Hybridomen in Betracht gezogen (**Abb. 4.8**). Diese können dann bei Bedarf mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden leicht in ein Fab-basiertes Format konvertiert werden.

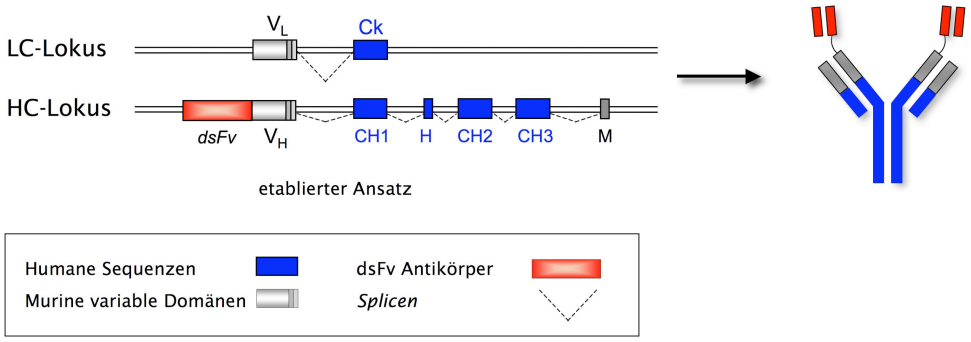


Abb. 4.8: Tetravalenter bsAk durch Fusion eines dsFv-Moduls an den N-Terminus der schweren Antikörperkette.

- Die Fusion eines *single-chain* Antikörpers an den C-Terminus der CH1 Domäne der schweren Kette zur Erzeugung kleiner bivalenter Antikörpermoleküle. Das Grundgerüst der Fusionsproteine ist hier das Fab-Fragment des jeweiligen Hybridoms, an das ein disulfidbrückenstabilisierter single-chain Antikörper fusioniert wird. Das Fab-Fragment bietet die Möglichkeit die molekulare Größe des bispezifischen Antikörpers zu reduzieren und verhindert zudem das Einwirken unerwünschter Fc-vermittelter Effektorfunktionen. Dieser Ansatz hat funktioniert und konnte zur Herstellung verschiedener bsAk reproduziert werden. Die rekombinanten bispezifischen Antikörper wurden eukaryontisch exprimiert, aufgereinigt und auf die Eigenschaften Stabilität und Bindungsstärke untersucht.

Dieses bsAk Format wurde in den aktiven Antikörper Genlokus von Hybridomzellen eingebracht und somit in einem genomischen Kontext exprimiert, der dem monoklonalen Antikörper sehr ähnlich ist. Dabei verlieren die manipulierten Hybridomzellen die Fähigkeit, Antikörper auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Um diesen Ansatz umzusetzen, wurde eigens ein Screening-Verfahren entwickelt, bei dem eben dieser Verlust der Oberflächenexpression zur Positivselektion genutzt wird.

Diese Methode wurde zudem erfolgreich dazu eingesetzt, konventionelle Antikörper in das entsprechende Fab-Fragment zu konvertieren.

Im Verlauf dieser Arbeit konnten zwei bispezifische Antikörper hergestellt werden, die sich zu viel versprechenden Tumortherapeutika entwickeln können:

- Der bispezifische Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3 richtet sich gegen das Tumor-assoziierte Antigen EpCAM, welches auf der Oberfläche vieler Karzinome überexprimiert wird. Der dsFvOKT3-Anteil des Antikörpers soll die Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten über den TCR/CD3 Komplex zum Ort der Läsion vermitteln. Die Integrität des Antikörpers und seine Fähigkeit, an die EpCAM$^+$ Kolonkarzinomzelllinie Colo205 bzw. CD3$^+$ Jurkat Zelllinie zu binden wurden bewiesen.
- Der Antikörper $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3 erkennt das Tumorantigen L1CAM, welches ursprünglich als ein Protein des Nervensystems beschrieben worden ist und auf vielen epithelialen Neoplasien wie Ovarial-, Endometrium-, Pankreas- und Kolonkarzinom ausgebildet ist. Der Wirkungsmechanismus verläuft analog zu $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3 über die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. Auch dieser bsAk ist korrekt assembliert und bindet an die zellulären Antigene L1CAM (SKOV-3, Ovarialkarzinomzelllinie) und an CD3 auf Jurkat.

Derzeit werden Anstrengungen unternommen die bispezifischen Antikörper in größeren Mengen herzustellen, so dass weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden können. Hierzu zählt in erster Linie die Ermittlung des zytotxischen Potentials *in vitro*. Als Schlüsselgröße werden auch die Affinitätskonstanten (K_D) der bispezifischen Antikörper im Vergleich zu den parentalen Vergleichsantikörpern quantifiziert und ihre Halbwertszeit *in vivo* im Maussystem gemessen.

Ein weiterer Erfolg der Arbeit war die Etablierung von Hybridomen als Expressionssystem für bispezifische Antikörper. Diese von den B-Lymphozyten abgeleiteten Säugetierzellen sind aufgrund ihres leistungsstarken Antikörper-Expressionsapparates hierzu bestens geeignet. Die Expression in diesem System eröffnet jetzt die Möglichkeit das FabxdsFv Antikörpergerüst flexibel auf weitere Kombinationen verschiedener Tumor- oder Effektorzellantigene zu übertragen. In erster Linie soll dieses Werkzeug jedoch die HybLib-Bibliothek humaner Antikörper ergänzen, um in einer Art Baukastensystem zusätzliche, therapeutisch interessante Antikörperformate individuell zu generieren. Die Konvertierung in ein bispezifisches Format erfordert zukünftig einen einzigen Transfektionsschritt in Hybridomlinien der Bibliothek, die einen vollständig humanen Antikörper exprimieren. Dabei kann ein standardisiertes Plasmid eingesetzt werden, das für einen *single-chain* Antikörper kodiert, hier z.B. gegen das Oberflächenantigen CD3 auf Immuneffektorzellen (dsFvOKT3), wodurch der Klonierungsaufwand minimiert wird. Das Transfektionsverfahren konnte etabliert werden und ist reproduzierbar. Allerdings müssen die Ausbeuten noch optimiert werden. Hinsichtlich der Antikörperproduktionsrate bietet das Expressionssystem der Hybridome gegenwärtig keine Vorteile gegenüber HEK 293T Zellen. Beide Systeme ermöglichen bisher keine überzeugenden Produktionsraten. Das Verbesserungspotential für Hybridome erscheint jedoch sehr groß.

Es konnte gezeigt werden, dass die Konvertierung eines Hybridoms in das entsprechende Fab-Fragment nicht zu Einbußen in der Produktionsrate des Hybridoms führte. Die Paarung der leichten Kette mit der schweren Kette ist demnach auch nach Entfernung der CH2 und CH3 Domänen nicht beeinträchtigt. Insbesondere die gute Expression des Fab-Fragments ohne dsFv-Anteil weist darauf hin, dass das verwendete dsFvOKT3-Modul für die schlechte Produktionsrate verantwortlich ist. Eine Mutagenese des dsFvOKT3-Moduls könnte eine verbesserte Expression und Ausbeute an bsAk mit sich bringen. Diese Mutagenese ließe sich sehr einfach durch die Induktion der somatischen Hypermutation umsetzen.
In Abschnitt 4.2.1 wurde die HybLib Antikörperbibliothek vorgestellt. Eine Schlüsselfunktion kommt dabei der somatischen Hypermutation zu, um einerseits die Diversität der Bibliothek zu erhöhen und andererseits gezielt die Affinität selektierter Antikörper zu verbessern. Die Methode wurde von Prof. J-C. Weil und Prof. C-A. Reynaud (Hopital Necker des Enfants Malades, INSERM, Paris) für die HybLib Bibliothek etabliert und basiert auf der Induktion des Enzyms AID (*activation-induced cytidine deaminase*). Da bispezifische Antikörper analog zu den Antikörpern der Bibliothek in Hybridomen exprimiert werden, könnten Versuche unternommen werden auch die bsAk durch die Induktion der AID zu mutagenisieren.
Zudem werden in Zukunft weitere dsFv-Antikörper ausprobiert, z.B. gegen das Steuermolekül CD5 auf Effektorzellen. Ein Vergleich mit dem bisher verwendeten *single-chain* Antikörper gegen CD3 wird Aufschluss darüber geben, inwiefern die Sequenz des dsFvOKT3-Moduls die Expression beeinflusst.

Die funktionell aktiven Konstrukte dieser Arbeit basieren auf einer Fusion des dsFvOKT3-Fragments an die humane CH1 Domäne der schweren Kette. Die bisher generierten Hybridomlinien, die bsAk sezernieren, bilden keine Disulfidbrücke zwischen schwerer und leichter Antikörperkette aus. Dennoch assemblieren die Fab-Frgamente und ermöglichen die Bildung funktionaler bispezifischer Antikörper. In HEK 293T Zellen konnte gezeigt werden, dass die Einbeziehung der *Hinge*-Region zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen schwerer und leichter Kette führt und das Fab-Fragment zusätzlich stabilisiert. Dies eröffnet auf genomischer Ebene für Hybridomzellen die Möglichkeit, das Intron zwischen CH1-Domäne und *Hinge* zu rekonstruieren (**Abb. 4.9**). Damit würden auch der endogene Antikörperlokus und die polycystronische Genexpression weitgehend wiederhergestellt. Unsere Erwartung ist, dass sich diese Maßnahme in einer erhöhten Antikörperausbeute widerspiegelt.

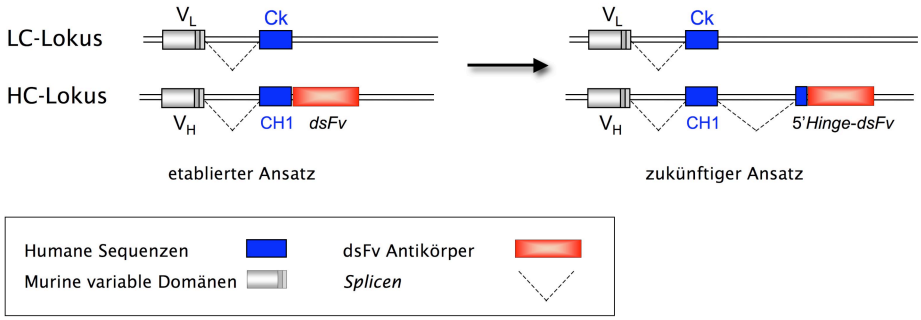


Abb. 4.9: Neue Ansatzmöglichkeit zur Steigerung der Antikörperproduktionsrate bispezifischer Antiköper in Hybridomen. LC leichte Kette; HC schwere Kette; VL Variable Domäne der leichten Kette; VH Variable Domäne der schweren Kette; Ck, humane konstante Domäne der leichten Kette; CH1, erste humane konstante Domäne der schweren Kette.

Das Verfahren der SSR erwies sich zwar als effizient, war aber insgesamt mit einem sehr großen Arbeitsaufwand verbunden. Dieser Weg sollte aber für Hochdurchsatzverfahren weiterhin in Erwägung gezogen werden, z.B. zur Erzeugung bispezifischer Antikörperbibliotheken. Für die Herstellung bispezifischer Antikörper unterschiedlicher Spezifitäten in Hybridomen sollte die homologe Rekombination weiterhin die bequemere Vorgehensweise sein.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die notwendigen Manipulationen im Antikörpergenlokus der Hybridomzelle durchgeführt werden können und die veränderten Zielzellen anschließend funktionale bispezifische Antikörper sezernieren. Dieses Projekt konnte erfolgreich abgeschlossen werden und ermöglichte zudem die Herstellung zweier Antikörper, die zu Wirksubstanzen zur Behandlung von Karzinomen weiterentwickelt werden können.

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amp	Ampicillin
ADCC	Antikörperabhängige Zelltoxizität (*antibody dependant cellular cytotoxicity*)
attP/B/R/L	Erkennungssptellen der φC31 integrase (*attachment)*
Ak (Ab)	Antikörper (*antibody*)
bsAk (bsAb)	bispezifischer Antikörper (*bispecific antibody*)
bp	Basenpaare
C_H	konstante Domäne der schweren Kette (*Constant Heavy*)
C_L	konstante Domäne der leichten Kette (*Constant Light*)
C_K	konstante Domäne der leichten Kappa Kette (*Constant Kappa*)
CD	Differenzierungscluster
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität (*complement dependant cell cytotoxicity*)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (*complementarity determining region*)
CH1-3	konstante Domänen 1-3 der schweren Immunglobulinkette (*Constant Heavy*)
CMV	Cytomegalovirus (meist mit Bezug auf den konstitutiven Promotor)
Cre	Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (*cytotoxic T-Cell*)
dsFv	disulfidbrückenstabilisiertes scFv-Fragment
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRed	Rot fluoreszierendes Protein
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EGFP	verstärktes (*enhanced*) grün fluoreszierendes Protein
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	antigenbindendes Fragment
$F(ab')_2$	dimeres antigenbindendes Fragment
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FCS	fötales Kälberserum
Fc	kristallisierbares Fragment (*fragment crystalline*)
FcγRIII	Rezeptor für das Fc-Fragment bestimmter Antikörperisotypen
FcRn	neonataler Rezeptor für das Fc-Fragment
FDA	Amerikanische Zulassungsbehörde (*Food and Drug Administration*)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FL-1/2/3	Fluoreszenzkanal 1 /2/ 3 des FACS Gerätes
Fv	variables Fragment (*variable fragment*)
$(G_3S)_3$	Glycin-Serin-Linker
GAM	Ziege anti Maus Antikörper (*Goat Anti Mouse*)
GAHu	Ziege anti Mensch Antikörper (*Goat Anti Human*)
HAMA	Immunantwort des Menschen gegen Mausantigene (*human anti-mouse Ab*)
HC	schwere Antikörperkette (*heavy chain*)
$(His)_{10}$	Peptid bestehend aus einer Abfolge von 10 Histidin-Aminosäuren
HPLC	*High performance liquid chromatography*
HR	Homologe Rekombination
Ig	Immunglobulin
IgA,D,E,G,M	Immunglobulin Isotypen mit schwerer $\alpha,\delta,\varepsilon,\gamma,\mu$ Kette
IGVH	Immunglobulingen der variablen Domäne der schweren Kette
IGVL	Immunglobulingen der variablen Domäne der Lambda Kette
IGHC	Immunglobulingen der konstanten Domäne der schweren Kette
IGKC	Immunglobulingen der konstanten Domäne der Kappa Kette
IGKV	Immunglobulingen der variablen Domäne der Kappa Kette
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L1CAM	L1 Zelladhäsionsmolekül
LB	Luria Bertani Medium
LC	leichte Antikörperkette (*light chain*)
LoxP	Erkennungsstelle der Cre-Rekombinase
M	DNA oder Protein Größenstandard (Marker)
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*)
Neo^R	Neomycin (G418, Geneticin) Resistenzgen
NK	Natürliche Killerzelle
NR	Nicht-reduzierter Zustand eines Proteins
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (*open reading frame*)
φC31	Integrase des des Phagen Streptomyces φC31
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells*
PCR	Polymerase-Ketten (*chain*)-Reaktion
PE	R-phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Propidium Iodid
Red	Reduzierter Zustand eines Proteins
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
DMEM	Dulbecco's Modifiied Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
scFv	einzelkettiges variables Fragment (*single-chain variable fragment*)
$(scFv)_2$	dimeres scFv-Fragment
SA-POX	Peroxidase gekoppeltes Straptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSR	Spezifische Rekombination (*site specific recombination*)
SV40	Simian vacuolating virus 40 (auch Simian virus 40)
TCR	T-Zell Rezeptor (*T-cell receptor*)
TEMED	Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rotation per minute*)
V_H	variable Domäne der schweren Kette (*Variable Heavy*)
V_L	variable Domäne der leichten Kette (*Variable Light*)
Zeo^R	Zeocin Resistenzgen

6 LITERATURANGABEN

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., und Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 3983-8.

Alinari, L., Lapalombella, R., Andritsos, L., Baiocchi, R. A., Lin, T. S., und Byrd, J. C. 2007. Alemtuzumab (Campath-1H) in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Oncogene 26: 3644-53.

Allen, T. M. 2002. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer 2: 750-63.

Anderson, C. L., Chaudhury, C., Kim, J., Bronson, C. L., Wani, M. A., und Mohanty, S. 2006. Perspective-FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. Trends Immunol 27: 343-8.

Arlt, M. J., Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Gruenberg, J., Honer, M., Schubiger, P. A., Altevogt, P., und Krueger, A. 2006. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. Cancer Res 66: 936-43.

Baeuerle, P. A., und Gires, O. 2007. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. Br J Cancer 96: 1491.

Baeuerle, P. A., Kufer, P., und Bargou, R. 2009. BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Curr Opin Mol Ther 11: 22-30.

Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., und Litvinov, S. V. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). J Mol Med 77: 699-712.

Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmueller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A., und Kufer, P. 2008. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. Science 321: 974-7.

Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F., und Ziegler, A. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell 14: 9-20.

Baum, C., Forster, P., Hegewisch-Becker, S., und Harbers, K. 1994. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. Biotechniques 17: 1058-62.

Belteki, G., Gertsenstein, M., Ow, D. W., und Nagy, A. 2003. Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase. Nat Biotechnol 21: 321-4.

Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., und Tonegawa, S. 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. Cell 15: 1-14.

Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B., und Pastan, I. 1993. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 7538-42.

Brischwein, K., Schlereth, B., Gueller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbuese, R., Offner, S., Locher, M., Urbig, T., Raum, T., Kleindienst, P., Wimberger, P., Kimmig, R., Fichtner, I., Kufer, P., Hofmeister, R., da Silva, A. J., und Baeuerle, P. A. 2006. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. Mol Immunol 43: 1129-43.

Bruenke, J., Barbin, K., Kunert, S., Lang, P., Pfeiffer, M., Stieglmaier, K., Niethammer, D., Stockmeyer, B., Peipp, M., Repp, R., Valerius, T., und Fey, G. H. 2005. Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcgammaRIII (CD16). Br J Haematol 130: 218-28.

Brummendorf, T., und Rathjen, F. G. 1995. Cell adhesion molecules L1: immunoglobulin superfamily. Protein Profile 2: 963-1108.

Buchholz, F., und Bishop, M. 2001. LoxP-directed cloning: use of Cre recombinase as a universal restriction enzyme. Biotechniques 31: 906-8, 910, 912, 914, 916, 918.

Carlsson, J., Drevin, H., und Axen, R. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. Biochem J 173: 723-37.

Carter, P. 2001a. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. Nat Rev Cancer 1: 118-29.

Carter, P. 2001b. Bispecific human IgG by design. J Immunol Methods 248: 7-15.

Carter, P. J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. Nat Rev Immunol 6: 343-57.

Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., und Watier, H. 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. Blood 99: 754-8.

Coley, W. B. 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. Clin Orthop Relat Res: 3-11.

Cooley, S., Burns, L. J., Repka, T., und Miller, J. S. 1999. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. Exp Hematol 27: 1533-41.

Cragg, M. S., und Glennie, M. J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. Blood 103: 2738-43.

Croom, K. F., und McCormack, P. L. 2009. Adalimumab: in plaque psoriasis. Am J Clin Dermatol 10: 43-50.

Crowe, J. S., Hall, V. S., Smith, M. A., Cooper, H. J., und Tite, J. P. 1992. Humanized monoclonal antibody CAMPATH-1H: myeloma cell expression of genomic constructs, nucleotide sequence of cDNA constructs and comparison of effector mechanisms of myeloma and Chinese hamster ovary cell-derived material. Clin Exp Immunol 87: 105-10.

Curnow, R. T. 1997. Clinical experience with CD64-directed immunotherapy. An overview. Cancer Immunol Immunother 45: 210-5.

Dafhnis-Calas, F., Xu, Z., Haines, S., Malla, S. K., Smith, M. C., und Brown, W. R. 2005. Iterative in vivo assembly of large and complex transgenes by combining the activities of phiC31 integrase and Cre recombinase. Nucleic Acids Res 33: e189.

Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., und Clarke, M. F. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 10158-63.

Daniel, P. T., Kroidl, A., Kopp, J., Sturm, I., Moldenhauer, G., Dorken, B., und Pezzutto, A. 1998. Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. Blood 92: 4750-7.

De Angelis, E., Watkins, A., Schafer, M., Brummendorf, T., und Kenwrick, S. 2002. Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression. Hum Mol Genet 11: 1-12.

de Bono, J. S., Tolcher, A. W., Forero, A., Vanhove, G. F., Takimoto, C., Bauer, R. J., Hammond, L. A., Patnaik, A., White, M. L., Shen, S., Khazaeli, M. B., Rowinsky, E. K., und LoBuglio, A. F. 2004. ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. Clin Cancer Res 10: 7555-65.

Debiec, H., Christensen, E. I., und Ronco, P. M. 1998. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. J Cell Biol 143: 2067-79.

Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R., und van de Winkel, J. G. 1997. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. Immunol Today 18: 127-35.

Dul, J. L., Aviel, S., Melnick, J., und Argon, Y. 1996. Ig light chains are secreted predominantly as monomers. J Immunol 157: 2969-75.

Early, P., und Hood, L. 1981. Allelic exclusion and nonproductive immunoglobulin gene rearrangements. Cell 24: 1-3.

Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., und Hood, L. 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. Cell 19: 981-92.

Ebeling, O., Duczmal, A., Aigner, S., Geiger, C., Schollhammer, S., Kemshead, J. T., Moller, P., Schwartz-Albiez, R., und Altevogt, P. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. Eur J Immunol 26: 2508-16.

Edelman, G. M. 1971. Antibody structure and molecular immunology. Ann N Y Acad Sci 190: 5-25.

Edelman, G. M. 1973. Antibody structure and molecular immunology. Science 180: 830-40.

Edelman, G. M. 1991. Antibody structure and molecular immunology. Scand J Immunol 34: 1-22.

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., und Bishop, J. M. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Mol Cell Biol 5: 3610-6.

Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben-Arie, A., Huszar, M., und Altevogt, P. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. Lancet 362: 869-75.

Fogh, J., Wright, W. C., und Loveless, J. D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J Natl Cancer Inst 58: 209-14.

Fransen, E., Lemmon, V., Van Camp, G., Vits, L., Coucke, P., und Willems, P. J. 1995. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. Eur J Hum Genet 3: 273-84.

French, D. L., Laskov, R., und Scharff, M. D. 1989. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. Science 244: 1152-7.

Gast, D., Riedle, S., Issa, Y., Pfeifer, M., Beckhove, P., Sanderson, M. P., Arlt, M., Moldenhauer, G., Fogel, M., Krueger, A., und Altevogt, P. 2008. The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. Oncogene 27: 1281-9.

Gast, D., Riedle, S., Schabath, H., Schlich, S., Schneider, A., Issa, Y., Stoeck, A., Fogel, M., Joumaa, S., Wenger, T., Herr, I., Gutwein, P., und Altevogt, P. 2005. L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. Int J Cancer 115: 658-65.

Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T., und Ben-Ze'ev, A. 2005. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. J Cell Biol 168: 633-42.

Ghosh, K., und Van Duyne, G. D. 2002. Cre-loxP biochemistry. Methods 28: 374-83.

Gillies, S. D., Morrison, S. L., Oi, V. T., und Tonegawa, S. 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. Cell 33: 717-28.

Ginsburg, D. S., und Calos, M. P. 2005. Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes. Adv Genet 54: 179-87.

Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., und Plueckthun, A. 1990. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. Biochemistry 29: 1362-7.

Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., und et al. 1994. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. Nat Genet 7: 13-21.

Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B., und Calos, M. P. 2000. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 5995-6000.

Gutwein, P., Stoeck, A., Riedle, S., Gast, D., Runz, S., Condon, T. P., Marmé, A., Phong, M. C., Linderkamp, O., Skorokhod, A., und Altevogt, P. 2005. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. Clin Cancer Res 11: 2492-501.

Guyre, P. M., Graziano, R. F., Vance, B. A., Morganelli, P. M., und Fanger, M. W. 1989. Monoclonal antibodies that bind to distinct epitopes on Fc gamma RI are able to trigger receptor function. J Immunol 143: 1650-5.

Haas, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbuse, R., Schlereth, B., Kufer, P., und Baeuerle, P. A. 2009. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. Immunobiology.

Hale, G., Clark, M., und Waldmann, H. 1985. Therapeutic potential of rat monoclonal antibodies: isotype specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity with human lymphocytes. J Immunol 134: 3056-61.

Hammond, C., und Helenius, A. 1995. Quality control in the secretory pathway. Curr Opin Cell Biol 7: 523-9.

Hannam-Harris, A. C., und Smith, J. L. 1981. Free immunoglobulin light chain synthesis by human foetal liver and cord blood lymphocytes. Immunology 43: 417-23.

Harries, M., und Smith, I. 2002. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). Endocr Relat Cancer 9: 75-85.

Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., und Koprowski, H. 1979. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 1438-42.

Hoelzer, D., Gokbuget, N., Ottmann, O., Pui, C. H., Relling, M. V., Appelbaum, F. R., van Dongen, J. J., und Szczepanski, T. 2002. Acute lymphoblastic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 162-92.

Hopper, J. E., und Papagiannes, E. 1986. Evidence by radioimmunoassay that mitogen-activated human blood mononuclear cells secrete significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain. Cell Immunol 101: 122-31.

Hosen, N., Park, C. Y., Tatsumi, N., Oji, Y., Sugiyama, H., Gramatzki, M., Krensky, A. M., und Weissman, I. L. 2007. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 11008-13.

Huenig, T., und Dennehy, K. 2005. CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. Immunol Lett 100: 21-8.

Humphreys, D. P., Heywood, S. P., Henry, A., Ait-Lhadj, L., Antoniw, P., Palframan, R., Greenslade, K. J., Carrington, B., Reeks, D. G., Bowering, L. C., West, S., und Brand, H. A. 2007. Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering. Protein Eng Des Sel 20: 227-34.

Hurtley, S. M., Bole, D. G., Hoover-Litty, H., Helenius, A., und Copeland, C. S. 1989. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). J Cell Biol 108: 2117-26.

Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Bruccoleri, R. E., Haber, E., Crea, R., und et al. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 5879-83.

Huszar, M., Moldenhauer, G., Gschwend, V., Ben-Arie, A., Altevogt, P., und Fogel, M. 2006. Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. Hum Pathol 37: 1000-8.

Jain, R. K., und Baxter, L. T. 1988. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. Cancer Res 48: 7022-32.

Jakobovits, A. 1995. Production of fully human antibodies by transgenic mice. Curr Opin Biotechnol 6: 561-6.

Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., und Shlomchik, M. J. 2005. Immunobiology. Garland Science Publishing.

Jouet, M., Rosenthal, A., und Kenwrick, S. 1995. Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. Brain Res Mol Brain Res 30: 378-80.

Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S., und Foeller, C. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th ed US Department of Health and Human Services, NIH Publication.

Kaloff, C. R., und Haas, I. G. 1995. Coordination of immunoglobulin chain folding and immunoglobulin chain assembly is essential for the formation of functional IgG. Immunity 2: 629-37.

Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N., und Honjo, T. 1980. Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 919-23.

Kellner, C. 2009. Entwicklung und Charakterisierung bispezifischer Antikörper-Derivate zur Immuntherapie CD19-positiver Leukämien und Lymphome. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Dissertation

Kellner, C., Bruenke, J., Stieglmaier, J., Schwemmlein, M., Schwenkert, M., Singer, H., Mentz, K., Peipp, M., Lang, P., Oduncu, F., Stockmeyer, B., und Fey, G. H. 2008. A novel CD19-directed recombinant bispecific antibody derivative with enhanced immune effector functions for human leukemic cells. J Immunother 31: 871-84.

Kenwrick, S., Watkins, A., und De Angelis, E. 2000. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. Hum Mol Genet 9: 879-86.

Kiewe, P., und Thiel, E. 2008. Ertumaxomab: a trifunctional antibody for breast cancer treatment. Expert Opin Investig Drugs 17: 1553-8.

Kim, S., Davis, M., Sinn, E., Patten, P., und Hood, L. 1981. Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes. Cell 27: 573-81.

Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T., und Nishio, K. 2007. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. Cancer Sci 98: 1275-80.

Knittler, M. R., und Haas, I. G. 1992. Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. Embo J 11: 1573-81.

Koehler, G., und Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-7.

Kola, I., und Landis, J. 2004. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Discov 3: 711-5.

Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E. L., und Schlossman, S. F. 1979. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science 206: 347-9.

Lee, L. S., Conover, C., Shi, C., Whitlow, M., und Filpula, D. 1999a. Prolonged circulating lives of single-chain Fv proteins conjugated with polyethylene glycol: a comparison of conjugation chemistries and compounds. Bioconjug Chem 10: 973-81.

Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellman, R., und Hendershot, L. M. 1999b. BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. Mol Biol Cell 10: 2209-19.

Lefranc, M.-P., und Lefranc, G. 2001a. The Immunoglobulin Facts Book. Academic Press.

Lefranc, M. P., und Lefranc, G. 2001b. The Immunoglobulin Facts Book. Academic Press, London.

Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., und Simeone, D. M. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res 67: 1030-7.

Li, J. 2006. Recombinant IgG expression in mammalian cells. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Dissertation

Litvinov, S. V., Bakker, H. A., Gourevitch, M. M., Velders, M. P., und Warnaar, S. O. 1994. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. Cell Adhes Commun 2: 417-28.

Long, K. E., Asou, H., Snider, M. D., und Lemmon, V. 2001. The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. J Biol Chem 276: 1285-90.

Lüttgau, S. 2004. Humanisierung von Maus-Hybridomantikörpern. Ruprecht-Karls Universität Heidelberg. Dissertation

Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P. A., Munz, M., und Gires, O. 2009. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. Nat Cell Biol 11: 162-71.

Maki, R., Traunecker, A., Sakano, H., Roeder, W., und Tonegawa, S. 1980. Exon shuffling generates an immunoglobulin heavy chain gene. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 2138-42.

Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J. P., Jacob, M. C., Sotto, J. J., Leroux, D., Bensa, J. C., und Plumas, J. 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. Blood 101: 949-54.

Marmé, A., Strauss, G., Bastert, G., Grischke, E. M., und Moldenhauer, G. 2002. Intraperitoneal bispecific antibody (HEA125xOKT3) therapy inhibits malignant ascites production in advanced ovarian carcinoma. Int J Cancer 101: 183-9.

Meeker, T. C., Miller, R. A., Link, M. P., Bindl, J., Warnke, R., und Levy, R. 1984. A unique human B lymphocyte antigen defined by a monoclonal antibody. Hybridoma 3: 305-20.

Mendez, M. J., Green, L. L., Corvalan, J. R., Jia, X. C., Maynard-Currie, C. E., Yang, X. D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D. V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C. M., Abderrahim, H., Kirschenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. H., Fukushima, A., Hales, J. F., Klapholz, S., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M., und Jakobovits, A. 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Nat Genet 15: 146-56.

Michaelson, J. S., Demarest, S. J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W. B., Wu, X., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., Farrington, G. K., Lugovskoy, A., Joseph, I., Bailly, V., Wang, X., Garber, E., Browning, J., und Glaser, S. M. 2009. Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTβR. mAbs 1: 128-141.

Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R., und Levy, R. 1982. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. N Engl J Med 306: 517-22.

Miura, M., Kobayashi, M., Asou, H., und Uyemura, K. 1991. Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. FEBS Lett 289: 91-5.

Moldenhauer, G., Momburg, F., Möller, P., Schwartz, R., und Hämmerling, G. J. 1987. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. Br J Cancer 56: 714-21.

Momburg, F., Moldenhauer, G., Haemmerling, G. J., und Moeller, P. 1987. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. Cancer Res 47: 2883-91.

Montgomery, A. M., Becker, J. C., Siu, C. H., Lemmon, V. P., Cheresh, D. A., Pancook, J. D., Zhao, X., und Reisfeld, R. A. 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. J Cell Biol 132: 475-85.

Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K., und Schachner, M. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. Nature 334: 701-3.

Morrison, S. L., und Scharff, M. D. 1975. Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line. J Immunol 114: 655-9.

Muerköster, S. S., Lust, J., Arlt, A., Hasler, R., Witt, M., Sebens, T., Schreiber, S., Fölsch, U. R., und Schäfer, H. 2006. Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases. Oncogene 25: 3973-81.

Müller, D., und Kontermann, R. E. 2007a. Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy. Curr Opin Mol Ther 9: 319-26.

Müller, D., und Kontermann, R. 2007b. Bispecific Antibodies. *In* S. Duebel [ed.], Handbook of Therapeutic Antibodies. Wiley-VCH.

Müller, D., Karle, A., Meissburger, B., Hofig, I., Stork, R., und Kontermann, R. E. 2007. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. J Biol Chem 282: 12650-60.

Munz, M., Fellinger, K., Hofmann, T., Schmitt, B., und Gires, O. 2008. Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. Front Biosci 13: 5195-201.

Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., und Gires, O. 2004. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. Oncogene 23: 5748-58.

Nadler, L. M., Stashenko, P., Hardy, R., Kaplan, W. D., Button, L. N., Kufe, D. W., Antman, K. H., und Schlossman, S. F. 1980. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. Cancer Res 40: 3147-54.

Nagaraj, K., und Hortsch, M. 2006. Phosphorylation of L1-type cell-adhesion molecules-ankyrins away! Trends Biochem Sci 31: 544-6.

Naramura, M., Gillies, S. D., Mendelsohn, J., Reisfeld, R. A., und Mueller, B. M. 1993. Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma. Cancer Immunol Immunother 37: 343-9.

Naundorf, S., Preithner, S., Mayer, P., Lippold, S., Wolf, A., Hanakam, F., Fichtner, I., Kufer, P., Raum, T., Riethmueller, G., Baeuerle, P. A., und Dreier, T. 2002. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment. Int J Cancer 100: 101-10.

Nickoloff, J. A. 1992. Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. Mol Cell Biol 12: 5311-8.

Nisonoff, A., Wissler, F. C., Lipman, L. N., und Woernley, D. L. 1960. Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. Arch Biochem Biophys 89: 230-44.

Nomura, T., und Katunuma, N. 2005. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. J Med Invest 52: 1-9.

Novak-Hofer, I. 2007. The L1 cell adhesion molecule as a target for radioimmunotherapy. Cancer Biother Radiopharm 22: 175-84.

Novak-Hofer, I., Amstutz, H. P., Morgenthaler, J. J., und Schubiger, P. A. 1994. Internalization and degradation of monoclonal antibody chCE7 by human neuroblastoma cells. Int J Cancer 57: 427-32.

O'Reilly, D. R. 1997. Use of baculovirus expression vectors. Methods Mol Biol 62: 235-46.

Orphanides, G., und Reinberg, D. 2002. A unified theory of gene expression. Cell 108: 439-51.

Pancook, J. D., Reisfeld, R. A., Varki, N., Vitiello, A., Fox, R. I., und Montgomery, A. M. 1997. Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. J Immunol 158: 4413-21.

Peipp, M., und Valerius, T. 2002. Bispecific antibodies targeting cancer cells. Biochem Soc Trans 30: 507-11.

Plasson, C., Michel, R., Lienard, D., Saint-Jore-Dupas, C., Sourrouille, C., de March, G. G., und Gomord, V. 2009. Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells. Methods Mol Biol 483: 145-61.

Porter, R. R. 1959. The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem J 73: 119-26.

Porter, R. R. 1991. Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. Scand J Immunol 34: 381-9.

Potter, H., Weir, L., und Leder, P. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 7161-5.

Presta, L. G. 2008. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. Curr Opin Immunol 20: 460-70.

Raghavan, M., Chen, M. Y., Gastinel, L. N., und Bjorkman, P. J. 1994. Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand. Immunity 1: 303-15.

Rajagopal, V., Pastan, I., und Kreitman, R. J. 1997. A form of anti-Tac(Fv) which is both single-chain and disulfide stabilized: comparison with its single-chain and disulfide-stabilized homologs. Protein Eng 10: 1453-9.

Ramsland, P. A., und Farrugia, W. 2002. Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. J Mol Recognit 15: 248-59.

Rathjen, F. G., und Schachner, M. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. Embo J 3: 1-10.

Raveh, S., Gavert, N., und Ben-Ze'ev, A. 2009. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. Cancer Lett.

Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., und Lee, M. G. 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. Biotechniques 20: 102-4, 106, 108-10.

Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., und Anderson, D. R. 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 83: 435-45.

Reichert, J. M., Rosensweig, C. J., Faden, L. B., und Dewitz, M. C. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. Nat Biotechnol 23: 1073-8.

Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B., und Pastan, I. 1996. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. Nat Biotechnol 14: 1239-45.

Reiter, Y., Brinkmann, U., Kreitman, R. J., Jung, S. H., Lee, B., und Pastan, I. 1994. Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. Biochemistry 33: 5451-9.

Renner, C., Held, G., Ohnesorge, S., Bauer, S., Gerlach, K., Pfitzenmeier, J. P., und Pfreundschuh, M. 1997a. Role of perforin, granzymes and the proliferative state of the target cells in apoptosis and necrosis mediated by bispecific-antibody-activated cytotoxic T cells. Cancer Immunol Immunother 44: 70-6.

Renner, C., Held, G., Ohnesorge, S., Bauer, S., Gerlach, K., Pfitzenmeier, J. P., und Pfreundschuh, M. 1997b. Role of naive and memory T cells in tumor cell lysis mediated by bi-specific antibodies. Immunobiology 197: 122-32.

Renner, C., Jung, W., Sahin, U., Denfeld, R., Pohl, C., Trumper, L., Hartmann, F., Diehl, V., van Lier, R., und Pfreundschuh, M. 1994. Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells. Science 264: 833-5.

Riethmüller, G., Schneider-Gadicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., und et al. 1994. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. Lancet 343: 1177-83.

Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., und Tonegawa, S. 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. Nature 280: 288-94.

Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., und Tonegawa, S. 1980. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. Nature 286: 676-83.

Schaefer, A. W., Kamiguchi, H., Wong, E. V., Beach, C. M., Landreth, G., und Lemmon, V. 1999. Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. J Biol Chem 274: 37965-73.

Sears, H. F., Herlyn, D., Steplewski, Z., und Koprowski, H. 1984. Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma. J Biol Response Mod 3: 138-50.

Sears, H. F., Atkinson, B., Mattis, J., Ernst, C., Herlyn, D., Steplewski, Z., Hayry, P., und Koprowski, H. 1982. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. Lancet 1: 762-5.

Sebastian, M., Kiewe, P., Schuette, W., Brust, D., Peschel, C., Schneller, F., Ruehle, K. H., Nilius, G., Ewert, R., Lodziewski, S., Passlick, B., Sienel, W., Wiewrodt, R., Jaeger, M., Lindhofer, H., Friccius-Quecke, H., und Schmittel, A. 2009. Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (Removab) (anti-EpCAM x Anti-CD3): results of a phase 1/2 study. J Immunother 32: 195-202.

Semple, T. U., Quinn, L. A., Woods, L. K., und Moore, G. E. 1978. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. Cancer Res 38: 1345-55.

Shan, D., Ledbetter, J. A., und Press, O. W. 1998. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. Blood 91: 1644-52.

Shapiro, A. L., Scharff, M. D., Maizel, J. V., und Uhr, J. W. 1966. Synthesis of excess light chains of gamma globulin by rabbit lymph node cells. Nature 211: 243-5.

Shein, H. M., und Enders, J. F. 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A 48: 1164-72.

Shen, J., und Zhu, Z. 2008. Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. Curr Opin Mol Ther 10: 273-84.

Shulman, M. J., Nissen, L., und Collins, C. 1990. Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length. Mol Cell Biol 10: 4466-72.

Silletti, S., Yebra, M., Perez, B., Cirulli, V., McMahon, M., und Montgomery, A. M. 2004. Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. J Biol Chem 279: 28880-8.

Skvortsov, V. T., und Gurvich, A. E. 1968. Relative rates of synthesis of immunoglobulins and light chains in rabbit spleen cells during secondary response. Nature 218: 377-8.

Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P. A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Gastl, G., und Zeimet, A. G. 2006. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 103: 483-8.

Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., Maurer, R., Metzger, U., von Castelberg, B., Bart, R., Stopatschinskaya, S., Kochli, O. R., Haas, P., Mross, F., Zuber, M., Dietrich, H., Bischoff, S., Mirlacher, M., Sauter, G., und Gastl, G. 2004. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 86: 207-13.

Staerz, U. D., Kanagawa, O., und Bevan, M. J. 1985. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. Nature 314: 628-31.

Stanglmaier, M., Faltin, M., Ruf, P., Bodenhausen, A., Schroder, P., und Lindhofer, H. 2008. Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels. Int J Cancer 123: 1181-9.

Stoeck, A., Gast, D., Sanderson, M. P., Issa, Y., Gutwein, P., und Altevogt, P. 2007. L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. Gynecol Oncol 104: 461-9.

Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M. P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E., und Altevogt, P. 2006. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. Biochem J 393: 609-18.

Stoger, E., Sack, M., Fischer, R., und Christou, P. 2002. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. Curr Opin Biotechnol 13: 161-6.

Strauss, G., Gückel, B., Wallwiener, D., und Moldenhauer, G. 1999. Without prior stimulation, tumor-associated lymphocytes from malignant effusions lyse autologous tumor cells in the presence of bispecific antibody HEA125xOKT3. Clin Cancer Res 5: 171-80.

Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., und Panoskaltsis, N. 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med 355: 1018-28.

Takeda, Y., Asou, H., Murakami, Y., Miura, M., Kobayashi, M., und Uyemura, K. 1996. A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. J Neurochem 66: 2338-49.

Taussig, D. C., Pearce, D. J., Simpson, C., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A., Kelly, G., Luongo, J. L., Danet-Desnoyers, G. A., und Bonnet, D. 2005. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. Blood 106: 4086-92.

Thomas, J. O., und Kornberg, R. D. 1975. An octamer of histones in chromatin and free in solution. Proc Natl Acad Sci U S A 72: 2626-30.

Thomas, K. R., und Capecchi, M. R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell 51: 503-12.

Thorpe, H. M., und Smith, M. C. 1998. In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 5505-10.

Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature 302: 575-81.

Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S., und Bernardini, A. 1974. Evidence for somatic generation of antibody diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 71: 4027-31.

Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriel, A. B., Graziano, R. F., van den Herik-Oudijk, I. E., Repp, R., Deo, Y. M., Lund, J., Kalden, J. R., Gramatzki, M., und van de Winkel, J. G. 1997. FcalphaRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. Blood 90: 4485-92.

van Spriel, A. B., van Ojik, H. H., und van De Winkel, J. G. 2000. Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. Immunol Today 21: 391-7.

Vasquez, K. M., Marburger, K., Intody, Z., und Wilson, J. H. 2001. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 8403-10.

Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J., und Hood, L. 1980. The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. Nature 283: 497-9.

Weiner, L. M., Holmes, M., Richeson, A., Godwin, A., Adams, G. P., Hsieh-Ma, S. T., Ring, D. B., und Alpaugh, R. K. 1993. Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1. J Immunol 151: 2877-86.

Weiss, A., Wiskocil, R. L., und Stobo, J. D. 1984. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J Immunol 133: 123-8.

Weng, W. K., und Levy, R. 2001. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. Blood 98: 1352-7.

Weng, W. K., und Levy, R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. J Clin Oncol 21: 3940-7.

Went, P., Dirnhofer, S., Salvisberg, T., Amin, M. B., Lim, S. D., Diener, P. A., und Moch, H. 2005. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in renal epithelial tumors. Am J Surg Pathol 29: 83-8.

Went, P., Vasei, M., Bubendorf, L., Terracciano, L., Tornillo, L., Riede, U., Kononen, J., Simon, R., Sauter, G., und Baeuerle, P. A. 2006. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. Br J Cancer 94: 128-35.

Witzig, T. E., White, C. A., Wiseman, G. A., Gordon, L. I., Emmanouilides, C., Raubitschek, A., Janakiraman, N., Gutheil, J., Schilder, R. J., Spies, S., Silverman, D. H., Parker, E., und Grillo-Lopez, A. J. 1999. Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 17: 3793-803.

Wörn, A., und Plückthun, A. 1999. Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. Biochemistry 38: 8739-50.

Wörn, A., und Plückthun, A. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J Mol Biol 305: 989-1010.

Yamaguchi, Y., Kim, H., Kato, K., Masuda, K., Shimada, I., und Arata, Y. 1995. Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. J Immunol Methods 181: 259-67.

Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M., und Schlom, J. 1992. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. Cancer Res 52: 3402-8.

Young, N. M., MacKenzie, C. R., Narang, S. A., Oomen, R. P., und Baenziger, J. E. 1995. Thermal stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. FEBS Lett 377: 135-9.

Zecchini, S., Bianchi, M., Colombo, N., Fasani, R., Goisis, G., Casadio, C., Viale, G., Liu, J., Herlyn, M., Godwin, A. K., Nuciforo, P. G., und Cavallaro, U. 2008. The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. Cancer Res 68: 1110-8.

Zentgraf, H., Frey, M., Schwinn, S., Tessmer, C., Willemann, B., Samstag, Y., und Velhagen, I. 1995. Detection of histidine-tagged fusion proteins by using a high-specific mouse monoclonal anti-histidine tag antibody. Nucleic Acids Res 23: 3347-8.

Zur Hausen, H. 1967. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. J Virol 1: 1174-85.

1 ANHANG

ANHANG I: Oligonukleotide und Plasmide

Primer #	Sequenz	Enzym-Überhang
O1-f	AGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC	BlpI
O2-r	GATCATGCGGCCGCTCAGTGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTC	NotI
O3-f	TGCTCTCACTTCCTATCTTTGGGTAC	
O4-r	CCTTAGAAGGGAAGATAGGATGGAGCTGGG	
O5-f	GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC	
O6-f	CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC	
O7-f	CTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTC	
O8-r	GGGAAATCCCCTGCCATTACAAGAGGTGG	
O9-r	CCGCGAGAGCCCGGGGAGCGGGGGCTTGC	
O10	GGACTGTAGGACAGCCGGGAAGGT	
O11-f	CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG	
O12-r	GGCTGGGAGGGCTTTGTTGGAGACC	
O13-f	GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC	
O14-r	GGAGCCGTCGGAGTCCAGCACGGGAG	
O15	GAGGGTGTCCTTGGG	
O16-f	GTAGTTGTAGAGGAACAGGGGCAGATTAG	
O17-r	GGGCGCAGAGGCCCCTGGGTTCTTAACTG	
O18-f	CTCGCGGTCGCACGAGGATGCTTGG	
O19-r	CTGCCAGTCACGGGAAGGCAGGTGCTCAC	
O20-r	CTGGTGACAGCTTAGGCATGATATGCCAAG	
O21-f	TCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGG	
O22-r	GAGTTACCCGATTGGAGGGCGTTATCCAC	
P23-f	GTAGTTGTAGAGGAACAGGGGCAGATTAG	
O24-r	GGGCGCAGAGGCCCCTGGGTTCTTAACTG	
O25-f	CCCAAATACAGACCCTGGCTTAAGG	
O26-r	GATCATGCGGCCGCTCAGTGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTC	NotI
O27-f	CTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTC	
O28-r	CCGCGAGAGCCCGGGGAGCGGGGGCTTGC	
O29-r	GGGAAATCCCCTGCCATTACAAGAGGTGG	
O30-f	ATCTATGGATCCCAGGTCCAGCTGCAGCAATCTGG	BamHI
O31-r	ACTGTCCTCGAGTTATCAGTTGATTTCCAGCTTTGTCC	XhoI, Stop
O32-f	GGGCCCA-TATGTGAGGTGGAGTACGC	ApaI
O33-f	GTGAGGTGGAGTACGCG	
O34-r	CAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGATCT	
O35-r	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG	
O36-f	CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC	
O37-r	CCATGCTGGGCGCCCGGGAAGTATG	
O38-r	CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAG	
O39-f	ACGTATGAGCTCGAGTAACCTGAGGCTATGGCAG	SacI
O40-r	AGGTCGACATGTGAACCAGCTGTGGAATGTGTG	AflIII
O41-f	CAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCC	
O42-r	CACACAAAAAACCAACACACAGATG	
O43-f	ATGGGCTGGTCCTACATCATCCTGTTTCTGG	
O44-f	AGACCCAAGCTTGCCACCATGGATTTTGGGC	
O45-r	TGATCCCCAGGTTGCTAATGG	

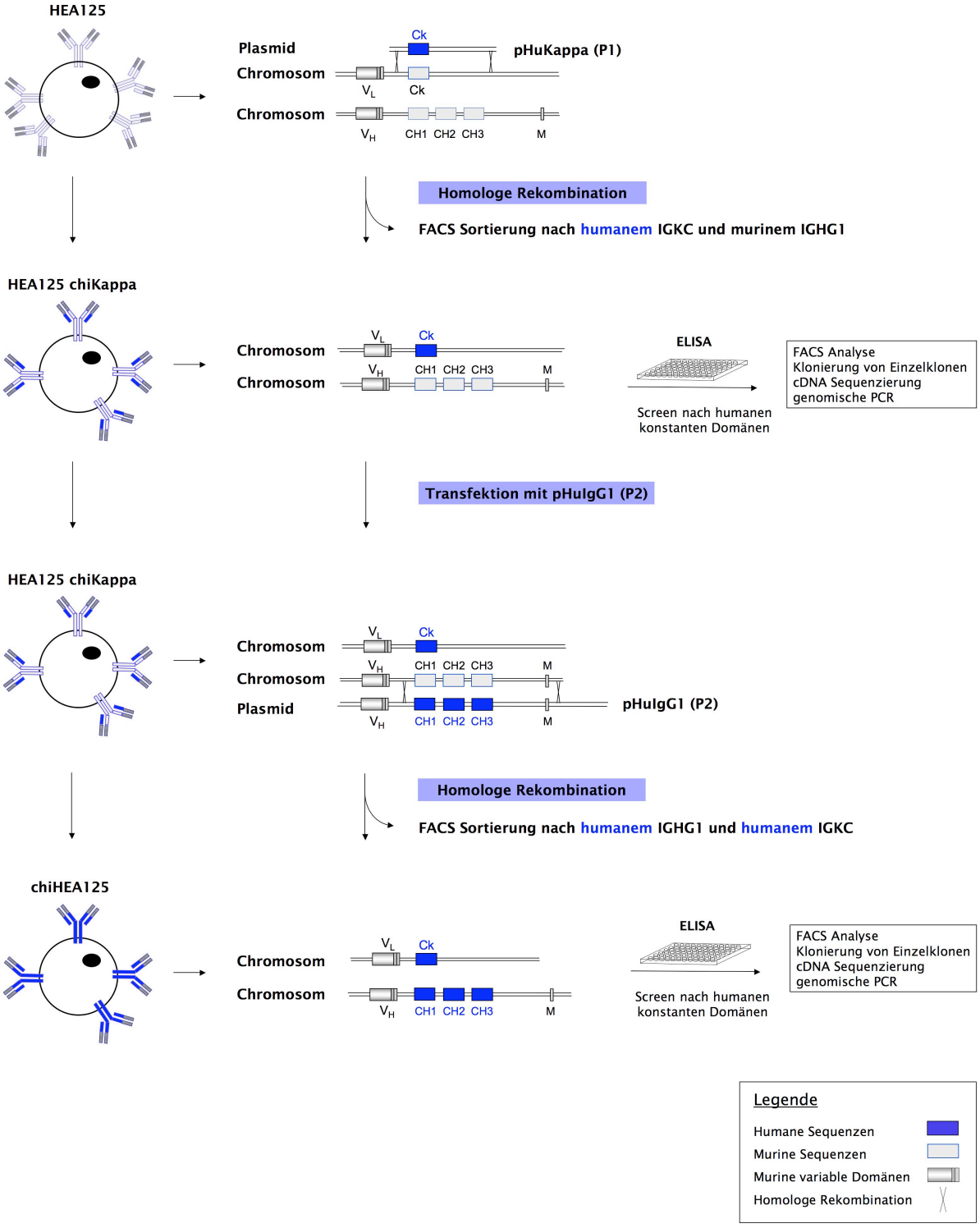
Plasmid #	Bezeichnung
P1	pHuKappa
P2	pHuIgG1
P3	p(Fab)$_2$ x dsFvOKT3
P4	pHuKappa-*attP*
P5	pPhiC31
P6	p*AttP*-DsRed_*attB*-EGFP
P7	pEGFP N3
P8	pDsRed Monomer
P9	p*AttB*-Tags
P10	p*AttB*-dsFvOKT3
P11	pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP
P12	p*AttB*-Tags-neoR(-)

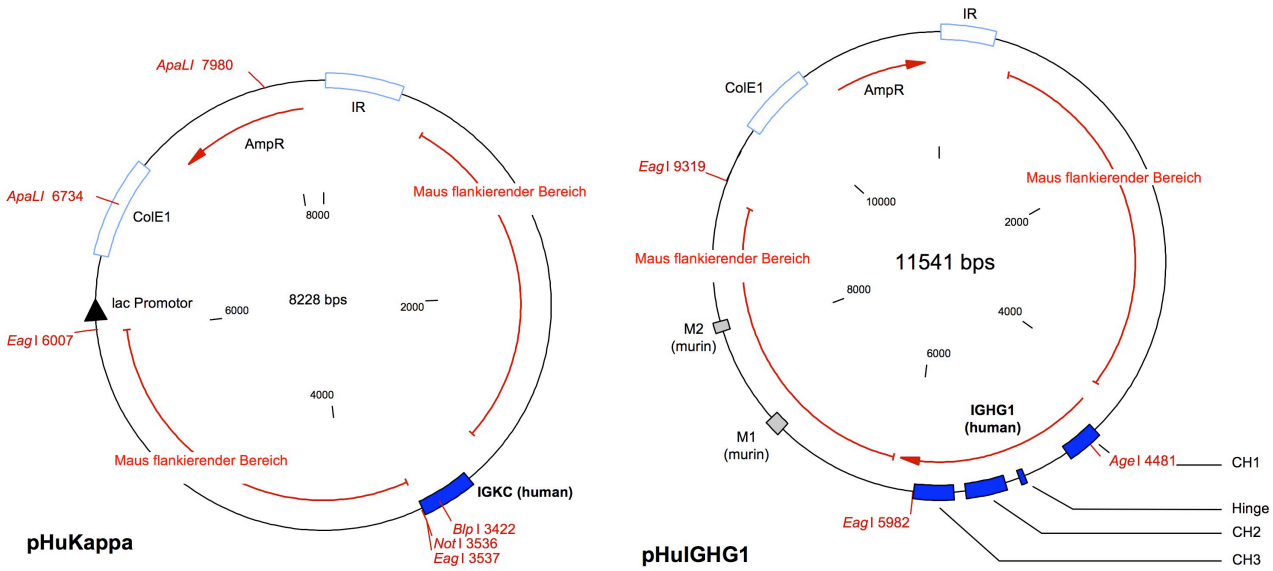
Weiter	Weiter
P13	p*AttB*-dsFvOKT3-neoR(-)
P14	pCH1-dsFvOKT3.V2-neoR(-)
P15	pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2-IGK
P16	pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V2-IGK
P17	pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V3-IGK
P18	pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V3-IGK
P19	pHCre2mycnucFRTN1ampFRT
P20	pZeoR
P21	piCre

ANHANG II: Zelllinien

Zelllinie	**Antikörper**	**Plasmid zur Transfektion**	**Cre**	**Res**	**Lokus**	**HR/SSR**
chiL1-9.3 K-dsFvOKT3	$(Fab)_2$ L1 x dsFvOKT3	p$(Fab)_2$-dsFvOKT3 (P3)			**LC**	HR
HuL1-9.3 chiK-*attP*	HuL1-9.3 chiK-*attP*	pHuKappa-*attP* (P4)			**LC**	SSR
chiL1-9.3 K-*attP*	chiL1-9.3 K-*attP*	pHuIgG1 (P2)			**LC**	SSR
chiL1-9.3 K-*attR*-dsFvOKT3	$(Fab)_2$ L1 x dsFvOKT3_SSR	p*AttB*-dsFvOKT3 (P10)			**LC**	SSR
chiL1-9.3 K-*attR*-Tags	$(Fab)_2$ L1 x Tags_SSR	p*AttB*-Tags (P9)			**LC**	SSR
chiL1-9.3 CH1-*attP*-neo(-)	Fab chiL1-9.3	pCH1-*attP*-[neoR(-)-*attP*] LoxP (P11)		neo	**HC**	HR
chiL1-9.3 CH1-*attP*	Fab chiL1-9.3	piCre (P21)	x		**HC**	HR
chiL1-9.3 CH1-*attR-Tags*-neo(-)	Fab L1 x Tags_SSR	p*AttB*-Tags-neoR(-) (P12)		neo	**HC**	SSR
chiL1-9.3 CH1-*attR-Tags*	Fab L1 x Tags_SSR	piCre (P21)	x		**HC**	SSR
chiL1-9.3 CH1-*attR-dsFvOKT3*-neo(-)	Fab L1 x dsFvOKT3_SSR	p*AttB*-dsFvOKT3-neoR(-) (P13)		neo	**HC**	SSR
chiL1-9.3 CH1-*attR-dsFvOKT3*	Fab L1 x dsFvOKT3_SSR	piCre (P21)	x		**HC**	SSR
chiL1-9.3 CH1-dsFvOKT3_V2-neo(-)	Fab L1 x dsFvOKT3_V2	pCH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) (P14)		neo	**HC**	HR
chiL1-9.3 CH1-dsFvOKT3_V2	Fab L1 x dsFvOKT3_V2	piCre (P21)	x		**HC**	HR
chiHEA125 CH1-dsFvOKT3_V2-neo(-)	Fab HEA x dsFvOKT3_V2	pCH1-dsFvOKT3.V2-neo^R(-) (P14)		neo	**HC**	HR
chiHEA125 CH1-dsFvOKT3_V2	Fab HEA x dsFvOKT3_V2	piCre (P21)	x		**HC**	HR
HEK_Fab L1 x dsFvOKT3_V2	HEK_Fab L1 x dsFvOKT3_V2	pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2-IGK (P15) + pZeo (P20)		zeo		
HEK_Fab HEA x dsFvOKT3_V2	HEK_Fab HEA x dsFvOKT3_V2	pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V2-IGK (P16) + pZeo (P20)		zeo		
HEK_Fab L1 x dsFvOKT3_V3	HEK_Fab L1 x dsFvOKT3_V3	pHEK_FabHEAxdsFvOKT3.V2-IGK (P17) + pZeo (P20)		zeo		
HEK_Fab HEA x dsFvOKT3_V3	HEK_Fab HEA x dsFvOKT3_V3	pHEK_FabL1xdsFvOKT3.V2-IGK (P18) + pZeo (P20)		zeo		

ANHANG III: Homologe Rekombination zur Chimärisierung von Maushybridomantikörpern am Beispiel des Hybridoms HEA125 (Kapitel 3.1.1.1)





Plasmidkarte der Plasmide zur Chimärisierung von Maushybridomantikörpern. Das Plasmid pHuKappa (P1) wurde von der Keimbahnsequenz des murinen Antikörperlokus der leichten Kette (Datenbankeintrag L80040) abgeleitet und enthält nicht kodierende Sequenzen, die die 3′ und 5′ Enden der IGKC Domäne flankieren (Maus flankierende Domänen, rot). Das IGKC Gen der Maus wurde durch das humane IGKC Gen ersetzt (blaue Box). **Das Plasmide pHuIGHG1 (P2)** wurde von der Keimbahnsequenz des murinen Antikörperlokus der schweren Kette des IgG1 Isotyps (Datenbankeintrag AB097849) abgeleitet und enthält nicht kodierende Sequenzen, die die 3′ und 5′ Enden der IGHG1 Domäne flankieren (Maus flankierende Domänen, rot). Das IGHG1 Gen der Maus kodiert für CH1, *Hinge*, CH2, CH3, M1 und M1 Domänen. Die Gene, wurden durch humane Gene für CH1, *Hinge*, CH2 und CH3 ersetzt (blaue Box, Datenbankeintrag J00228). IR, *intergenic region*; ColE1, *origin or replication*; AmpR, Ampicillin Resistenzgen.

Das Plasmid pHuKappa (P1) dient der Chimärisierung der konstanten Domäne der leichten Antikörperkette und wurde bereits in S. Lüttgau (2004) beschrieben. Die Nukleotidsequenzen der murinen und humanen Antikörpersequenzen sind bekannt (Lefranc und Lefranc 2001b). In beiden Organismen ist lediglich ein funktionelles Gen für die konstante Kappa Domäne vorhanden. Anhand der Datenbanksequenzen (L80040) wurde der kodierende *Mus musculus* IGKC Keimbahnlokus (J1-J5 und Cκ) inklusive der flankierenden Bereiche isoliert. Der 3′ flankierende Bereich und der 5′ flankierende Bereich der Sequenz wurden in den Vektor pBS II SK (+) kloniert. Dazwischen befindet sich anstelle des IGKC Gens der Maus das humane IGKC Gen.

Das Plasmid pHuIgG1 (P2) dient der Chimärisierung der konstanten Domäne der schweren Antikörperkette mittels homologer Rekombination und wurde ebenfalls in S. Lüttgau (2004) beschrieben. Der Sequenzeintrag AB097849 in Datenbanken enthält den *Mus musculus* IGHG1 Keimbahnlokus der auf Chromosom 14 kodiert ist. Das IGHG1 Gen enthält drei Hauptexons, welche die CH1, CH2 und CH3 Domänen codieren, ein separates *Hinge* Exon zwischen CH1 und CH2 und zwei Transmembranexons M1 und M2 die sich downstream von CH3 befinden. Das Plasmid pHuIgG1 enthält analog zu pHuKappa die 3000 ersten bp der 3′ und 5′ flankierende Sequenzen des Keinmbahnlokus. Die konstanten Domänen des Mausantikörpers (CH1, *Hinge*, CH2 und CH3) wurden durch humane konstante Domänen ersetzt. Die 3′ und 5′ flankierenden Sequenzen des murinen Keimbahnlokus wurden beibehalten und dienen der homologen Rekombination. Die Nukleotidsequenz der humanen konstanten Domäne der schweren IgG1 Kette findet sich unter J00228.

ANHANG IV: Sequenzvergleich der bispezifischen Antikörper HEK-$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 bzw. HEK-$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 und HEK-$_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V3 bzw. HEK-$_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V3

```
                                 Leader                                                   IGVH HEA125 bzw. HuL1-9.3
FabHEAxdsFvOKT3.V2      1 mdfg-liffivallk gvqcevkllesggglvqpggslklscaasgfdfsrfwmtwvrqapgkglewigeinldsstinytpslkdkfiisrdnakntlfl
FabL1xdsFvOKT3.V2       1 mgwsyiilflvatat dvhsqvqlqqpgaelvksgasvnlscrasgytftrywmlwvrqrpghglewvgeinprndrtnynekfktkatltvdrssstaym
FabHEAxdsFvOKT3.V3      1 mdfg-liffivallk gvqcevkllesggglvqpggslklscaasgfdfsrfwmtwvrqapgkglewigeinldsstinytpslkdkfiisrdnakntlfl
FabL1xdsFvOKT3.V3       1 mgwsyiilflvatat dvhsqvqlqqpgaelvksgasvnlscrasgytftrywmlwvrqrpghglewvgeinprndrtnynekfktkatltvdrssstaym

                                                                                         IGHG1-CH1 (human)
FabHEAxdsFvOKT3.V2    298 qmskvrsedtalyycsrg--ismdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglys
FabL1xdsFvOKT3.V2     301 qltsltsedsavyfcalgggyamdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglys
FabHEAxdsFvOKT3.V3    298 qmskvrsedtalyycsrg--ismdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglys
FabL1xdsFvOKT3.V3     301 qltsltsedsavyfcalgggyamdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglys

                                                                N'Hinge  Gly-Ser-Linker
FabHEAxdsFvOKT3.V2    592 lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv -----  ggggsggggsggggsts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqc
FabL1xdsFvOKT3.V2     601 lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv -----  ggggsggggsggggsts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqc
FabHEAxdsFvOKT3.V3    592 lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv epksc  ggggsggggsggggsts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqc
FabL1xdsFvOKT3.V3     601 lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv epksc  ggggsggggsggggsts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqc

                                  IGHV OKT3                                                                Gly-Ser-Linker
FabHEAxdsFvOKT3.V2    877 lewigyinpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspai
FabL1xdsFvOKT3.V2     886 lewigyinpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspai
FabHEAxdsFvOKT3.V3    892 lewigyinpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspai
FabL1xdsFvOKT3.V3     901 lewigyinpsrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspai

                                  IGKV OKT3
FabHEAxdsFvOKT3.V2   1177 msaspgekvtmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhh
FabL1xdsFvOKT3.V2    1186 msaspgekvtmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhh
FabHEAxdsFvOKT3.V3   1192 msaspgekvtmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhh
FabL1xdsFvOKT3.V3    1201 msaspgekvtmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhh
```

```
                          His-Tag          2A Peptid              Leader kappa              IGVL HEA125 bzw. HuL1-9.3
FabHEAxdsFvOKT3.V2  1477 hhhhhh legsgatnfsllkqagdveenpgpg mvstpqflvfllfwipasrg dilltqspailsvspgervsfscrasqsigislhwyqqrpsdsprllik
FabL1xdsFvOKT3.V2   1486 hhhhhh legsgatnfsllkqagdveenpgpg mmssaqflgllllclqgtrc diqmtqttsslsaflgdrvtiscrasqdisnylnwyqqkpdgtvklliy
FabHEAxdsFvOKT3.V3  1492 hhhhhh legsgatnfsllkqagdveenpgpg mvstpqflvfllfwipasrg dilltqspailsvspgervsfscrasqsigislhwyqqrpsdsprllik
FabL1xdsFvOKT3.V3   1501 hhhhhh legsgatnfsllkqagdveenpgpg mmssaqflgllllclqgtrc diqmtqttsslsaflgdrvtiscrasqdisnylnwyqqkpdgtvklliy

                                                                                                   IGKC (human)
FabHEAxdsFvOKT3.V2  1777 yasesisgipsrfsgsgsgtdftlsinsvesediadyycqqsniwpttfgagtklelk rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwk
FabL1xdsFvOKT3.V2   1786 ytsrlhsgvpsrfsgsgsgtdyslticsnleqedfatyfcqqgntlpwtfggtkleik rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwk
FabHEAxdsFvOKT3.V3  1792 yasesisgipsrfsgsgsgtdftlsinsvesediadyycqqsniwpttfgagtklelk rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwk
FabL1xdsFvOKT3.V3   1801 ytsrlhsgvpsrfsgsgsgtdyslticsnleqedfatyfcqqgntlpwtfggtkleik rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwk

FabHEAxdsFvOKT3.V2  2077 vdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
FabL1xdsFvOKT3.V2   2086 vdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
FabHEAxdsFvOKT3.V3  2092 vdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
FabL1xdsFvOKT3.V3   2101 vdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec*
```

ANHANG V: Sequenzvergleich der bispezifischen Antikörper $_{Fab}$HEAx$_{dsFv}$OKT3.V2 und $_{Fab}$L1x$_{dsFv}$OKT3.V2 aus Hybridomen und HEK293T Zellen

```
                                   Leader                                                   IGVH HEA125 bzw. HuL1-9.3
FabHEAxdsFvOKT3.V2          1 mdfg-liffivallk gvqcevkllesggglvqpggslklscaasgfdfsrfwmtwvrqapgkglewigeinldsstinytpslkdkfiisrdnakntlflq
FabHEAxdsFvOKT3.V2(HEK)     1 mdfg-liffivallk gvqcevkllesggglvqpggslklscaasgfdfsrfwmtwvrqapgkglewigeinldsstinytpslkdkfiisrdnakntlflq
FabL1xdsFvOKT3.V2           1 mgwsyiilflvatat dvhsqvqlqqpgaelvksgasvnlscrasgytftrywmlwvrqrpghglewvgeinprndrtnynekfktkatltvdrssstaymq
FabL1xdsFvOKT3.V2 (HEK)     1 mgwsyiilflvatat dvhsqvqlqqpgaelvksgasvnlscrasgytftrywmlwvrqrpghglewvgeinprndrtnynekfktkatltvdrssstaymq

                                                                                IGHG1-CH1 (human)
FabHEAxdsFvOKT3.V2        301 mskvrsedtalyycsrg--ismdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
FabHEAxdsFvOKT3.V2(HEK)   301 mskvrsedtalyycsrg--ismdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
FabL1xdsFvOKT3.V2         304 ltsltsedsavyfcalgggyamdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls
FabL1xdsFvOKT3.V2 (HEK)   304 ltsltsedsavyfcalgggyamdywgqgtsvtvss astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglysls

                                                   Gly-Ser-Linker
FabHEAxdsFvOKT3.V2        598 svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv ggsgggggg------ts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqclewigyin
FabHEAxdsFvOKT3.V2(HEK)   598 svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv gggsgggsgggggsts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqclewigyin
FabL1xdsFvOKT3.V2         607 svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv ggsgggggg------ts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqclewigyin
FabL1xdsFvOKT3.V2 (HEK)   607 svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkv gggsgggggsgggggsts qvqlqqsgaelarpgasvkmsckasgytftrytmhwvkqrpgqclewigyin

                                   IGHV OKT3                                                   Gly-Ser-Linker
FabHEAxdsFvOKT3.V2        883 psrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspaimsaspgekv
FabHEAxdsFvOKT3.V2(HEK)   901 psrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspaimsaspgekv
FabL1xdsFvOKT3.V2         892 psrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspaimsaspgekv
FabL1xdsFvOKT3.V2 (HEK)   910 psrgytnynqkfkdkatlttdkssstaymqlssltsedsavyycaryyddhysldywgqgttltvss ggggsggggsggggs qivltqspaimsaspgekv

                                   IGKV OKT3                                                                                His-Tag
FabHEAxdsFvOKT3.V2       1186 tmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhhhhhhhh*
FabHEAxdsFvOKT3.V2(HEK)  1204 tmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhhhhhhhh-
FabL1xdsFvOKT3.V2        1195 tmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhhhhhhhh*
FabL1xdsFvOKT3.V2 (HEK)  1213 tmtcsasssvsymnwyqqksgtspkrwiydtsklasgvpahfrgsgsgtsysltisgmeaedaatyycqqwssnpftfgcgtklein hhhhhhhhhh-

                                   2A Peptid
FabHEAxdsFvOKT3.V2       1480 -------------------------
FabHEAxdsFvOKT3.V2(HEK)  1495 legsgatnfsllkqagdveenpgpg
FabL1xdsFvOKT3.V2        1489 -------------------------
FabL1xdsFvOKT3.V2 (HEK)  1504 legsgatnfsllkqagdveenpgpg
```