

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankhe  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer

**Antitumorale Wirkungsmechanismen eines bispezifischen  
Antikörpers *in vitro* gegenüber Einzelzellen und  
dreidimensionalen Sphäroiden**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Annette Walz  
aus Bayreuth

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Kastenbauer Priv. Doz. Dr. med. T. Haferlach
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Schlöndorff Prof. Dr. med. Th. Brocker
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. R. Zeidler Priv. Doz. Dr. med. B. Wollenberg
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	20.06.2002

meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Hintergründe.....	1
1.1.1.	Epidemiologie von Kopf-Hals-Karzinomen.....	1
1.1.2.	Klinische Therapieverfahren bei Kopf-Hals-Karzinomen.....	2
1.1.3.	Tumoren und Immunsystem.....	2
1.1.3.1.	Induktion einer spezifischen Immunantwort.....	2
1.1.3.2.	Antikörperabhängige Immunreaktion.....	4
1.1.3.3.	Interaktion zwischen Tumoren und Immunsystem.....	4
1.1.4.	Entwicklung neuer antitumorale Strategien.....	6
1.1.5.	Einsatz von Antikörpern in der Tumorthapie.....	7
1.1.5.1.	Monoklonale Antikörper in der Tumorthapie.....	7
1.1.5.2.	Bispezifische Antikörper in der Tumorthapie.....	8
1.1.6.	Der bispezifische Antikörper BiUll.....	10
1.1.6.1.	Zusammensetzung von BiUll.....	10
1.1.6.2.	Immunologische Effekte von BiUll.....	11
1.1.7.	Tumorzell-Sphäroide.....	13
1.2.	Zielsetzung.....	14
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1.	Materialien und Geräte.....	15
2.1.1.	Zelllinien.....	15
2.1.2.	Antikörper.....	15
2.1.3.	Probandenmaterial.....	16
2.1.4.	Geräte.....	16
2.1.5.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.6.	Puffer und Lösungen.....	17
2.1.6.1.	Lösungen für die Zellkultur.....	17

2.1.6.2.	Lösungen für die Sphäroid-Einbettung .....	17
2.1.6.3.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	17
2.1.6.4.	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Färbung ....	17
2.1.6.5.	Avidin-Biotin-Komplex-Färbung .....	18
2.2.	Methoden .....	19
2.2.1.	Kultivierung und Zählen der Zellen.....	19
2.2.2.	Isolierung von Leukozyten des peripheren Blutes .....	19
2.2.3.	Anfertigung von Zytospin-Präparaten.....	19
2.2.4.	Tumorzell-Sphäroide .....	20
2.2.4.1.	Generierung von Tumorzell-Sphäroiden .....	20
2.2.4.2.	Kokultur von Tumorzell-Sphäroiden und Immunzellen .....	20
2.2.4.3.	Wiederausplattieren von Sphäroiden.....	21
2.2.4.4.	Einbettung und Verarbeitung von Sphäroiden .....	21
2.2.5.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	21
2.2.6.	Immunzytochemische und immuhistochemische Färbungen .....	22
2.2.7.	Durchflußzytometrische Untersuchungen .....	23
2.2.8.	Vitalitäts-Assay.....	24
2.2.9.	TNF $\alpha$ -Bioassay .....	24
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1.	Charakterisierung der eingesetzten Tumorzelllinien.....	25
3.2.	Untersuchungen an Einzelzellen.....	26
3.2.1.	Direkter Antikörpernachweis .....	27
3.2.2.	Bestimmung der Immunzellen.....	27
3.2.3.	Nachweis des Tri-Zell-Komplexes .....	28
3.2.4.	Nachweis antikörpervermittelter Phagozytose .....	28
3.3.	Untersuchungen am Sphäroid-Modell .....	30
3.3.1.	Etablierung des Sphäroid-Modells .....	30

3.3.2.	Histologische/immuhistochemische Charakterisierung der Sphäroide .31	
3.3.3.	Infiltrationsverhalten von Antikörpermolekülen an Sphäroiden.....32	
3.3.4.	Infiltrationsverhalten von Immunzellen in Sphäroide .....33	
3.3.5.	Infiltrat nach Inkubation von Sphäroiden mit Leukozyten und BiUII .....34	
3.3.6.	Lichtmikroskopie nach Inkubation mit Leukozyten und BiUII.....36	
3.3.7.	Funktionelle Effekte nach Inkubation mit Leukozyten und BiUII.....37	
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1.	Neue Strategien in der Tumorthherapie .....40	
4.2.	Konzept bispezifischer Antikörper .....40	
4.2.1.	Generelles Prinzip bispezifischer Antikörper .....40	
4.2.2.	Bispezifische Moleküle ohne kompletten Fc-Teil.....41	
4.2.3.	Komplette bispezifische Antikörper .....42	
4.2.3.1.	Bedeutung der Isotypzusammensetzung.....43	
4.2.3.2.	Immunstimulatorische Effekte durch BiUII .....44	
4.2.3.3.	Limitationen für den Einsatz kompletter bispezifischer Antikörper .45	
4.3.	Dreidimensionale Zellkultursysteme.....47	
4.3.1.	Eigenschaften von Sphäroidzellen .....48	
4.3.2.	Penetration von Antikörpern in Sphäroide.....49	
4.3.3.	Infiltration von Immunzellen in Sphäroide.....51	
4.3.4.	Wirkungsweise von BiUII am System der Sphäroide .....52	
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>71</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Hintergründe

### 1.1.1. Epidemiologie von Kopf-Hals-Karzinomen

Die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region stellen mit weltweit über 500.000 Erstdiagnosen jährlich etwa 5% der neu auftretenden Malignome dar (Parkin *et al.*, 1988). Dabei ist die Inzidenzrate steigend. Für die Entwicklung dieser Tumoren sind Nikotin- und Tabakkonsum die Hauptrisikofaktoren. Trotz verbesserter Therapie-strategien hat sich die Prognose der Erkrankungen in den letzten Jahren nicht verbessert (Kastenbauer und Wollenberg, 1999).

Dabei besteht ein enger Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der Prognose:

Die Lokalisation des Primärtumors hat einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. So haben Patienten mit glottischen Larynx-Karzinomen die besten Heilungschancen, während die Prognose bei Hypopharynxkarzinomen am schlechtesten ist.

Die Prognose von malignen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich steht weiterhin mit dem Tumorstadium und dem Ausmaß der lokoregionären und generalisierten Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Zusammenhang. Bei ca. 50-60% der Patienten liegen bereits lokoregionäre Metastasen vor (Schuller *et al.*, 1980), etwa 2/3 der Patienten haben bei Erstdiagnose weit fortgeschrittene T3-T4-Tumoren (Vokes *et al.*, 1993). Klinisch manifeste Fernmetastasen als Zeichen einer systemischen Erkrankung lassen sich bei Diagnosestellung in etwa 15-25% der Fälle nachweisen, wobei in Autopsien sogar eine Inzidenz von 40-57% beschrieben wird.

Darüber hinaus werden histologische Faktoren wie Differenzierungsgrad, perineurale Infiltration, Kapseldurchbruch metastatisch befallener Lymphknoten und Ausmaß der Tumervaskularisation als prognostische Variablen gewertet (Magnano *et al.*, 1999; Bockmühl *et al.*, 2000). Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (**Head and Neck Squamous Cell Carcinoma** = HNSCC) beträgt zwischen 22% und 63% (Berrino und Gatta, 1998).

### 1.1.2. Klinische Therapieverfahren bei Kopf-Hals-Karzinomen

Ziel der gängigen therapeutischen Verfahren bei Kopf-Hals-Karzinomen sind Organ- bzw. Funktionserhaltung, Erreichen eines lokal und systemisch tumorfreien Zustandes und eine Verbesserung der Überlebensraten sowie der Lebensqualität. Zirka 50% der Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium entwickeln nach primär chirurgischer Therapie und postoperativer adjuvanter Strahlentherapie Rezidive bzw. lokoregionäre Metastasen oder Fernmetastasen. Ursächlich wird angenommen, dass zum Zeitpunkt der Operation bereits eine Streuung von Tumorzellen stattgefunden hat, so dass es trotz lokal sanierender Operationstechniken zum Verbleib residualer Tumorzellen kommt. Diese subklinische Situation wird als „**minimal residual disease**“ (mrd) bezeichnet (Wollenberg *et al.*, 1994; Gath und Brakenhoff, 1999) und ist durch bildgebende und histopathologische Routineverfahren nicht erkennbar.

Die derzeit übliche Standardtherapie ist für jede Tumorlokalisation speziell definiert (vgl. Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches, 2000), besteht jedoch bis auf wenige Ausnahmen prinzipiell in der radikalen chirurgischen Entfernung des Primärtumors und in der Dissektion der lokoregionären Lymphknoten mit postoperativer Radio- oder Radiochemotherapie. Bei inoperablen Tumoren stehen Strahlentherapie und/oder chemotherapeutische Ansätze im Vordergrund.

### 1.1.3. Tumoren und Immunsystem

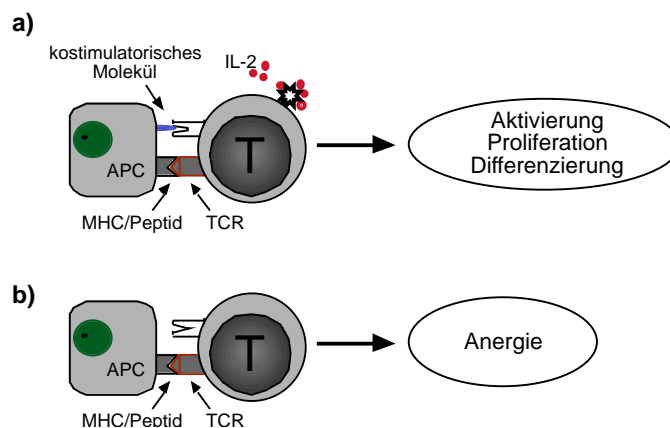
#### 1.1.3.1. Induktion einer spezifischen Immunantwort

Die Unterscheidung von *fremd* und *eigen* ist Voraussetzung dafür, dass Immunzellen zwar effektiv z.B. Bakterien oder Viren erkennen und eliminieren, körpereigene Proteine aber nicht angreifen. Einige Erreger werden durch die angeborene, unspezifische Immunantwort (etwa durch Monozyten/Makrophagen) eliminiert, andere Erreger haben Wege gefunden, sich davor zu schützen. Für deren Bekämpfung ist die Induktion einer spezifischen Immunreaktion nötig. Die wichtigsten Effektorzellen dieser Immunantwort sind T-Lymphozyten. Sie erkennen die Erreger nicht selbst, sondern bedürfen der Präsentation eines erregerspezifischen Antigens (Peptid) durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) in Assoziation mit Molekülen der MHC-Klasse I oder II. Hierfür müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: die T-Zellen müssen über den passenden T-Zellrezeptor verfügen, der das Peptid in Verbindung mit MHC-Molekülen erkennt und die professionellen APCs müssen ein



zweites Signal in Form eines kostimulatorischen Moleküls (z.B. B7.1 und B7.2) liefern. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, so kommt es zur Anergie der T-Zelle.

Zur Aktivierung einer naiven T-Zelle, ihrer anschließenden Proliferation und Differenzierung kommt es nur dann, wenn beide Signale (MHC/Peptid und kostimulatorisches Molekül) *auf derselben Zelle* präsent sind. Diese Voraussetzung wird nur von den professionellen APCs erfüllt (Abb. 1.1.). Die wichtigsten bekannten APCs sind dendritische Zellen, aber auch B-Lymphozyten und Makrophagen können als Antigen-präsentierende Zellen wirken.



**Abbildung 1.1.:** a) Die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung einer naiven T-Zelle findet nur statt, wenn MHC/Peptid-Komplex und kostimulatorisches Molekül auf derselben APC vorliegen. b) Fehlt das kostimulatorische Molekül, kommt es zur Anergie der T-Zelle.

Der erste Kontakt einer spezifischen T-Zelle mit einer Antigen-präsentierenden Zelle führt zur Induktion einer primären Immunantwort und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, wodurch bei späteren Kontakten mit demselben Antigen eine wesentlich schnellere Reaktion des Immunsystems ermöglicht wird.

Über MHC-Klasse I werden Antigene präsentiert, die in der präsentierenden Zelle selbst entstanden sind. Dagegen werden Antigene, die von außen aufgenommen wurden, mit MHC-Klasse II Molekülen an die Zelloberfläche transportiert. Der MHC-Kontext, in dem Antigene präsentiert werden, entscheidet darüber, welche T-Zellen aktiviert werden: Antigene, die über Klasse I präsentiert werden, führen zur Aktivierung von CD8-positiven Zellen, die dann zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) differenzieren. Klasse II Antigene induzieren die Aktivierung CD4-positiver T-Helferzellen, die sowohl für die Aktivierung CD8-positiver Zellen als auch für die Antikörper-Produktion durch B-Lymphozyten wichtige Signale liefern. Während nahezu alle Körperzellen MHC-Klasse I besitzen, sind nur APCs in der Lage, auch MHC-Klasse II zu exprimieren.

### 1.1.3.2. Antikörperabhängige Immunreaktion

Die antikörperabhängige Immunantwort dient dazu, Pathogene (z.B. Bakterien) spezifisch, effizient und schnell aus einem Organismus zu entfernen. Dies geschieht auf zwei Wegen: an Bakterien gebundene (opsonisierende) Antikörper binden über ihren Fc-Teil an phagozytierende Zellen, die dann den Erreger eliminieren (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Die opsonisierenden Antikörper können andererseits das Komplementsystem aktivieren und so zu einer Lyse des Zielpathogens führen.

Voraussetzung für diese antikörperabhängigen Wege der immunologischen Reaktion ist zum einen, dass zuvor die Induktion einer spezifischen Immunantwort stattgefunden hat (vgl. 1.1.3.1.) und dass zum anderen der Zweitkontakt mit dem Erreger über die Aktivierung von T-Helfer-Zellen zur Aktivierung und Differenzierung von spezifischen B-Zellen geführt hat.

### 1.1.3.3. Interaktion zwischen Tumoren und Immunsystem

Im gesunden Organismus unterliegen aberrante Zellen der Kontrolle des Immunsystems. Es kommt immer wieder zu der Ausbildung potentiell maligner Zellen, die jedoch durch eine funktionierende Immunabwehr eliminiert werden.

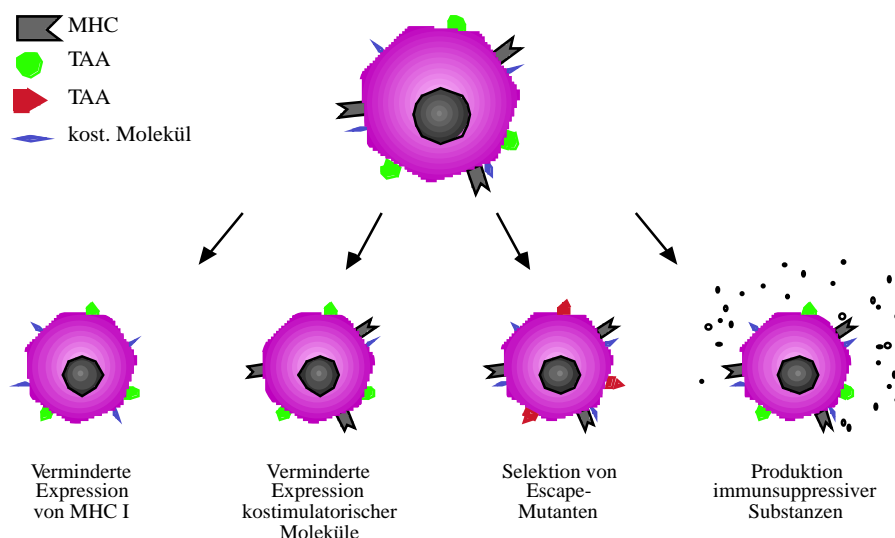
Eine gestörte Interaktion zwischen Tumorzelle und Immunsystem kann zu der Entwicklung klinisch relevanter Tumormassen führen. Hierfür kommen verschiedene Wege in Frage:

a) Ein funktionell gestörtes Immunsystem kann die Expansion maligner Tumorzellklone nicht aufhalten, z.B. bei langfristig immunsupprimierten Transplantationspatienten (Penn, 2000) oder bei HIV-Infizierten (Goedert, 2000; Spina *et al.*, 2000).  
 b) Tumorzellen können sich einer Elimination durch das Immunsystem entziehen. Einige Möglichkeiten dieser „**immune escape**“-Mechanismen sind im folgenden dargestellt (Abb. 1.2.):

- Tumoren exprimieren oft nur wenige oder keine MHC-Klasse I Moleküle. So kommt es in geringerem Ausmaß zu der Präsentation immunogener Peptide (Ferrone und Marincola, 1995, Hicklin *et al.*, 1999).
- Die T-Zellen benötigen zu ihrer effizienten Aktivierung neben MHC-präsentierten Peptiden ein kostimulatorisches Signal (s.o.). Tumoren exprimieren jedoch üblicherweise keine solchen Moleküle. Dann führt die Interaktion zwischen T-Zelle

und maligner Zelle nicht zu der Aktivierung sondern zu einer funktionellen Anergisierung der Immunzelle (vgl. Abb. 1.1.b., Janeway und Bottomly, 1994).

- Es gibt Hinweise darauf, dass T-Zellen ihren Phänotyp unter dem Einfluss von Tumoren verändern und so funktionell gestört werden (z.B. Herabregulation der TCR-assozierten  $\zeta$ -Kette und dadurch eine verminderte Signaltransduktion (Whiteside, 1999; Radoja und Frey, 2000).
- Unter dem Druck einer funktionierenden Immunabwehr können manifeste Tumoren ihr Repertoire antigener Proteine im Laufe der Zeit verändern, dadurch entstehen sogenannte „escape-Mutanten“ (Mäurer *et al.*, 1996; Gilboa, 1999). Auch ist die Antigenausstattung von Primärtumoren und Metastasen u.U. unterschiedlich (Natali *et al.*, 1983). Auf diesem Weg weichen Metastasen einer antigenspezifischen Immunabwehr aus.
- Tumoren können immunsuppressive Zytokine und Substanzen wie TGF $\beta$ , PGE2 oder IL-10 produzieren (Young *et al.*, 1996, Fosslie, 2000, Zeidler *et al.*, 2000).
- Die Expression sogenannter decoy-Rezeptoren ermöglicht zwar die Bindung von Liganden, das intrazelluläre Signal wird aber nicht weitergeleitet. Damit entziehen sich maligne Zellen z.B. apoptotischen Signalen (Ashkenazi und Dixit, 1999).
- Tumoren exprimieren Moleküle, die Immunzellen in Apoptose treiben (z.B. Fas-L, Moers *et al.*, 1999) oder funktionell inhibieren können (z.B. Mucin, Gimmi *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.2.: Immune escape Mechanismen**, mit deren Hilfe sich Tumorzellen dem Angriff durch das Immunsystem entziehen können.

Dennoch gibt es Oberflächenmoleküle, die die maligne Zelle als solche für das Immunsystem erkennbar machen können. Diese **tumorassoziierten Antigene** (TAAs) bieten sich als Zielmoleküle für immunologische Therapiestrategien an. Sie lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen (Übersicht bei Rosenberg, 1999):

- Mutierte zelleigene Proteine, z.B. Caspase 8 (Mandrizzato *et al.*, 1997), oder posttranslational verändert prozessierte Proteine, z.B. MUC 1 (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999).
- Überexprimierte - ansonsten aber unveränderte - zelluläre Proteine wie der EGF-Rezeptor (Stumm *et al.*, 1996) oder EpCAM (Litvinov *et al.*, 1996).
- Proteine der Differenzierungsphase, die in hochdifferenzierten reifen Gewebezellen nicht mehr exprimiert sind, z.B. CEA (Hammarstrom, 1999) oder ektoexprimierte, für andere Gewebe typische Proteine, wie z.B. NY-ESO-1, das üblicherweise nur auf testikulären Zellen exprimiert wird, sich jedoch auch auf Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes finden lässt (Chen *et al.*, 1997).
- Fremdproteine, v.a. virale Proteine (z.B. E6 und E7 des HPV oder LMP1 von EBV beim Nasopharynx-Karzinom), die bei Tumoren mit Virusassoziation an der Zelloberfläche erscheinen (Cheung *et al.*, 1998; Cornelison, 2000).

#### 1.1.4. Entwicklung neuer antitumoraler Strategien

Neue therapeutische Strategien zielen auf die Nutzung und Aktivierung des körpereigenen Immunsystems gegen den Tumor. Mit den konventionellen Therapiemöglichkeiten verglichen erscheint dieser Ansatz reizvoll, da hier eine hohe Tumorspezifität zugleich mit einer systemischen Wirkung kombiniert ist (zur Übersicht: van Dongen und Snow, 1997). Es werden vielfältige Strategien verfolgt, das Immunsystem für eine effiziente antitumorale Antwort zu rekrutieren (Übersicht für HNSCC bei Myers, 1999). Einige Ansätze sollen im Folgenden kurz genannt werden:

- Eine Reihe von Verfahren verwendet die *unspezifische Aktivierung* von T-Zellen; so werden Substanzen wie IL-2 oder GM-CSF alleine oder in Kombination mit anderen Protokollen eingesetzt (Mantovani *et al.*, 1998; Jaffee, 1999). Neben der oft nebenwirkungsreichen systemischen Anwendung werden lokale Verfahren wie Inhalation (Heinzer *et al.*, 1999) oder vektorvermittelter Gentransfer (Wollenberg *et al.*, 1999) erprobt. Ein anderer unspezifischer Weg nutzt die immunstimulatorischen Eigenschaften

bakterieller DNA-Motive (CpG-DNA), wobei die molekularen Wege dieses Effektes noch nicht gut verstanden werden (Hartmann und Krieg, 2000).

- Eine spezifische Aktivierung des Immunsystems wird bei der *Verwendung professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APCs) als Vakzine* verfolgt. Hierzu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. So lassen sich dendritische Zellen *ex vivo* mit Tumorzellpräparationen „beladen“, Teile der Tumorzellen werden aufgenommen und prozessiert. Diese dann präsentierenden dendritischen Zellen werden dem Patienten zurückinjiziert. *In vivo* können sie zur Induktion einer tumorspezifischen T-Zellantwort führen (Fong und Engleman, 2000; Melero *et al.*, 2000). Basierend auf derselben Grundidee können dendritische Zellen genetisch so verändert werden, dass sie Tumorantigene selbst exprimieren und präsentieren (Rughetti *et al.*, 2000).
- Neben den Antigen-präsentierenden Zellen lassen sich *in vitro* auch *tumorreaktive zytotoxische T-Zellen (CTLs)* generieren, die dem Patienten *als „adoptive transfer“* zurückgegeben werden (Soda *et al.*, 1999).
- Das Immunsystem kann über die *Gabe von Antikörpermolekülen* zu einer antitumoralen Aktivität angeregt werden, indem Immunzellen an den Ort von Tumorzellen redirigiert werden. Diese Möglichkeit wird in dem folgenden Abschnitt näher erläutert.

### **1.1.5. Einsatz von Antikörpern in der Tumorthherapie**

Seit der Entwicklung der Hybridom-Technik (Köhler und Milstein, 1975) wird die Immuntherapie mit Antikörpern verschiedenster Modifikationen in der Onkologie erprobt. Den Therapien mit Antikörpern liegt die Vorstellung zugrunde, dass das Immunsystem antikörperbestückte Tumorzellen als opsonisierte Zielzellen erkennt, eine antikörperabhängige Immunantwort in Gang setzt und so die Zielzelle entweder über Phagozytose (ADCC) oder das Komplementsystem eliminiert (vgl. 1.1.3.2.). Hierbei werden tumorassoziierte Antigene als geeignete Zielepitope verwendet.

#### **1.1.5.1. Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie**

Für die Anwendung monoklonaler Antikörper werden unterschiedliche tumorassoziierte Antigene getestet (für Kopf-Hals-Karzinome siehe van Dongen *et al.*, 1996). Durch dieses Therapiekonzept können verschiedenste immunologische Effekte ausgelöst werden. Neben der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC,

Flieger *et al.*, 2000) und der Komplement-Aktivierung (complement-mediated cellular cytotoxicity, Ballare *et al.*, 1995) wird die Induktion von Apoptose (Vollmers *et al.*, 2000) und die Bildung von anti-Idiotyp-Antikörpern (Fagerberg *et al.*, 1994) beschrieben. Als kritische Faktoren für das Ausmaß einer antikörperabhängigen Tumorelimination werden die Expressionshöhe des Zielantigens, der aktivierte Effektorzelltyp sowie die Subklasse des verwendeten Antikörpers angesehen (Green *et al.*, 2000).

Einige monoklonale Antikörper sind bereits im klinischen Einsatz oder zeigen in klinischen Studien positive Ergebnisse (McLaughlin *et al.*, 1998; Riethmüller *et al.*, 1998; Baselga *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 1999). Häufig lässt sich jedoch *in vivo* keine ausreichende antitumorale Effizienz erreichen (LoBuglio und Saleh, 1992).

Um die Wirksamkeit monoklonaler Antikörpermoleküle zu steigern, wurden unterschiedliche Modifikationen entwickelt. Insbesondere wurden Versuche unternommen, zellschädigende Substanzen (z.B. Strahlentherapeutika, Endotoxine oder Enzyme) an die Antikörper zu koppeln (Bagshawe *et al.*, 1999; Kreitman, 1999; Illidge und Brock, 2000).

Um das Auftreten einer HAMA-Reaktion (**h**uman **anti** **m**urine **a**ntibodies) zu verhindern und so eine mehrfache Anwendung des Antikörpers zu ermöglichen (Herlyn *et al.*, 1991; Winter und Harris, 1993), wurde ein Verfahren entwickelt, das den Austausch potentiell immunogener muriner Sequenzen gegen humane, weniger immunogene Proteinstrukturen erlaubt („Humanisierung“ muriner Antikörper, Jones *et al.*, 1986). Mit derselben Zielsetzung werden rekombinante single-chain Antikörper erprobt, die in den variablen Regionen konventionellen Antikörpern entsprechen, jedoch keinen konstanten Fc-Teil besitzen (Kufer *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000).

#### **1.1.5.2. Bispezifische Antikörper in der Tumorthherapie**

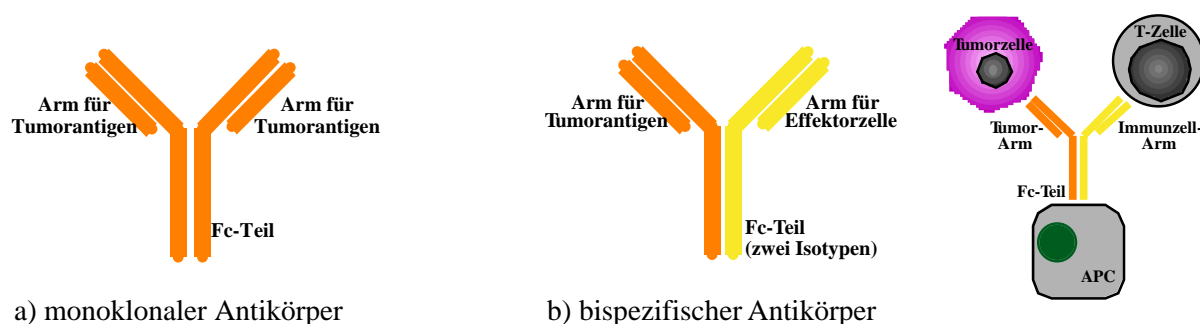
Die bispezifischen Antikörper wurden als Erweiterung monoklonaler Moleküle entwickelt. Während monoklonale Antikörper mit beiden variablen Regionen dasselbe Antigen erkennen (Abb. 1.3.a.), werden bei bispezifischen Molekülen zwei unterschiedliche Antigene targetiert. Diese Situation eröffnet die Möglichkeit, zusätzlich zu einem Tumorantigen ein Immunzellantigen zu binden, auf diese Weise Effektorzellen an den Ort von Tumorzellen zu dirigieren und sie gleichzeitig zu aktivieren (Abb. 1.3.b.).

Als potente Effektoren der antitumoralen Antwort gelten insbesondere T-Zellen, weshalb von vielen Gruppen der T-Zell-Marker CD3 als Immuzellantigen verwendet wird (Ohmi *et al.*, 1999; Katzenwadel *et al.*, 2000; Löffler *et al.*, 2000). Daneben werden aber auch andere Immunzellen, insbesondere akzessorische Zellen wie NK-Zellen (über CD16, Weiner *et al.*, 1995, Renner *et al.*, 2000) und Monozyten (über CD64, Chen *et al.*, 1995, Russoniello *et al.*, 1998) eingesetzt.

Auch bei den bispezifischen Molekülen gibt es verschiedene Modifikationen: sowohl komplette Antikörper (humanisiert und nicht humanisiert, z.B. Watanabe *et al.*, 1999) als auch Fab-Fragmente (Nitta *et al.*, 1989) und rekombinante single-chain-Moleküle (Mack *et al.*, 1995) werden verwendet.

Bispezifische Antikörper mit einem kompletten Fc-Teil können zusätzlich zu den beiden spezifischen Antigenen Fc-Rezeptor-positive Zellen (APCs) binden (Abb. 1.3.b.). Diese „Trivalenz“ ermöglicht die Einbeziehung Antigen-präsentierender Zellen in die immunologische Reaktion, kann deren Aktivierung bewirken und damit direkt Phagozytose und Prozessierung vermitteln. Dabei bestimmt die Isotyp-Zusammensetzung des Antikörpers, welcher Fc-Rezeptor-Typ und dadurch welche Gruppe Fc-Rezeptor-positiver Zellen gebunden werden kann.

Einige Studien geben Hinweise auf die Bedeutung der Isotypzusammensetzung für das Ausmaß der Immunzellaktivierung (Ceuppens und van Vaeck, 1989; Haagen *et al.*, 1994; Haagen *et al.*, 1995) und der antitumoralen Aktivität (Clynes *et al.*, 2000). So wird beschrieben, dass die Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren des Typs I oder III zu einer Aktivierung der akzessorischen Zelle führt, die Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptor II jedoch eine Inhibition zur Folge hat.



**Abbildung 1.3.:** a) Schema eines monoklonalen Antikörpers mit zwei spezifischen Armen, die sich gegen dasselbe Tumorantigen richten. b) Schema eines bispezifischen Antikörpers bestehend aus einem Arm gegen ein Tumorantigen, einem Arm gegen ein Antigen auf Immunzellen und einem Fc-Teil. Der Antikörper kann aus zwei unterschiedlichen Isotypen zusammengesetzt sein. Der resultierende **Tri-Zell-Komplex** besteht aus einer Tumorzelle, einer Immunzelle (z.B. T-Zelle) und einer Fc $\gamma$ -R-positiven akzessorischen Zelle. Es wird postuliert, dass der bispezifische Antikörper BiUll die Formierung solcher Tri-Zell-Komplexe vermittelt.

### 1.1.6. Der bispezifische Antikörper BiUII

Der in dieser Arbeit untersuchte bispezifische Antikörper BiUII besteht aus einem spezifischen Arm gegen das tumorassoziierte Antigen EpCAM, einem spezifischen Arm gegen das T-Zell-Antigen CD3 und einem kompletten Fc-Teil der Isotyp-zusammensetzung Maus IgG2a / Ratte IgG2b.

#### 1.1.6.1. Zusammensetzung von BiUII

**Tumorantigen (EpCAM):** Als tumorassoziiertes Antigen dient das membranständige epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül **EpCAM** (epithelial cell adhesion molecule, Übersicht bei Balzar *et al.*, 1999). EpCAM hat eine Bedeutung in der Differenzierung epithelialer Zellen (de Boer *et al.*, 1999) und in der embryonalen Entwicklung verschiedener Gewebe (Kasper *et al.*, 1995). Es findet sich beim Erwachsenen in bestimmten gesunden Geweben epithelialen Ursprungs (z.B. Drüsenepithelien, Momburg *et al.*, 1987). Gesundes Plattenepithel zeigt jedoch keine Expression dieses Moleküls. An Zervixkarzinomen und an Keratinozyten *in vitro* konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von EpCAM mit einer gesteigerten Zellproliferation und dem Verlust von Differenzierungsmarkern in Zusammenhang steht (Schön *et al.*, 1995; Litvinov *et al.*, 1996). Für den HNO-Bereich wurde beschrieben, dass EpCAM auf gesunden Epithelien des Oro-/Hypopharynx und des Larynx nicht vorkommt, während es auf Plattenepithelkarzinomen dieser Region in einem hohen Prozentsatz (>90%) nachzuweisen ist (Quak *et al.*, 1990). Studien an Knochenmarkaspiraten von HNSCC-Patienten zeigen, dass EpCAM sich hier als Markermolekül für disseminierte Tumorzellen eignet (Chaubal *et al.*, 1999), in gesundem Knochenmark findet man keine EpCAM-Expression (Helfrich *et al.*, 1997).

EpCAM ist ein immunogenes Protein. In einer Untersuchung an 1068 Patienten mit kolorektalem Karzinom ließen sich vor Beginn einer Behandlung in 15% Autoantikörper gegen dieses Oberflächenmolekül nachweisen (Mosolits *et al.*, 1999). Für das Mamma-Karzinom konnte in einer Studie mit 205 Patientinnen eine Assoziation zwischen EpCAM-Überexpression und einer schlechteren Prognose gezeigt werden (Gastl *et al.*, 2000).

EpCAM stellt also ein attraktives Zielmolekül für Antikörper-basierte Therapie-strategien dar und wird dafür von verschiedenen Gruppen eingesetzt (Ragnhammar *et al.*, 1993; Riethmüller *et al.*, 1998).



**Immunzellantigen (CD3):** Die Bindung von funktionell aktiven  $\alpha$ CD3-Antikörpern an T-Zellen führt zu einer Aggregation des CD3-Moleküls an der Zelloberfläche („cluster“-Bildung) sowie zur Zytokin-Freisetzung und MHC-unabhängigen zytotoxischen Aktivierung der T-Zelle. Diese Mechanismen resultieren im Mausmodell in einer effizienten Tumorzellelimination, die Umsetzung auf humane Tumorerkrankungen zeigte jedoch eine weit geringere Effizienz (Hoskin *et al.*, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von T-Zellen über  $\alpha$ CD3-Antikörper die Ausbildung eines spezifischen antitumoralen Gedächtnisses unterstützt (Newell *et al.*, 1991). Andererseits kann die Aggregation des CD3-T-Zell-Rezeptor-Komplexes auch zur Anergisierung oder Apoptose der T-Zelle führen (Wang *et al.*, 1994). Die Faktoren, die letztlich über Aktivierung oder Inhibierung der T-Zelle entscheiden, sind bislang nicht schlüssig geklärt.

**Fc-Teil:** BiUII besitzt einen kompletten Fc-Teil der sich aus den Isotypen Maus IgG2a und Ratte IgG2b zusammensetzt. Diese Kombination interagiert mit Fc $\gamma$ -Rezeptor I und mit Fc $\gamma$ -Rezeptor III, nicht jedoch mit Fc $\gamma$ -Rezeptor II (van de Winkel *et al.*, 1987; Haagen *et al.*, 1995). Damit werden Fc $\gamma$ -Rezeptor-Subgruppen gebunden, für die eine aktivierende Eigenschaft beschrieben wurde. Eine Bindung an Fc $\gamma$ -RII, einen inhibitorischen Fc-Rezeptor (Clynes *et al.*, 2000), bleibt aus.

#### **1.1.6.2. Immunologische Effekte von BiUII**

Aufgrund der beschriebenen Spezifitäten wird postuliert, dass BiUII sogenannte **Tri-Zell-Komplexe** aus EpCAM-positiver Tumorzelle, CD3-positiver T-Zelle und Fc-Rezeptor-positiver akzessorischer Zelle vermitteln kann (Abb. 1.3.b.). Die Bildung solcher Tri-Zell-Komplexe könnte ein breites Spektrum immunologischer Reaktionen auslösen (Abb. 1.4.):

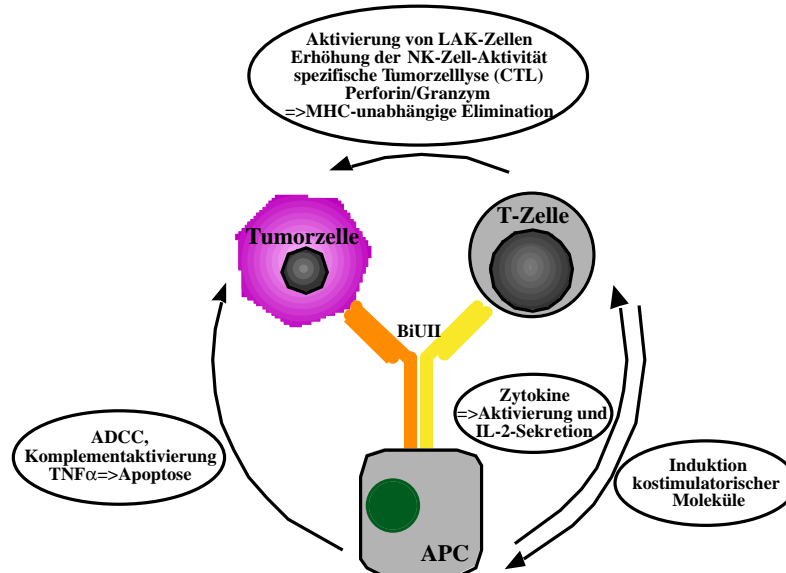
Die antikörpervermittelte Interaktion zwischen Tumorzelle und Fc-Rezeptor-positiver Zelle bewirkt die Aktivierung dieser akzessorischen Zelle. So kann die direkte Phagozytose der Tumorzelle, die Präsentation von Tumorpeptiden und letztlich die Induktion einer humoralen Antwort ausgelöst werden.

Aktivierete APCs sezernieren Zytokine wie IL-1 oder IL-12, die Lymphozyten aktivieren (Joseph *et al.*, 1998). Hierdurch wird die Produktion von IL-2 angestoßen, was im Gegenzug eine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen bewirkt (Zeidler *et al.*, 2000a).

Gerade diese kostimulatorischen Moleküle sind für die Induktion einer spezifischen Immunantwort von entscheidender Bedeutung (vgl. Abb. 1.1.). Zusätzlich kann IL-2 LAK-Zellen induzieren sowie zu einer Verstärkung der NK-Zell-Aktivität führen (Reiter, 1993) und auf diese Weise eine antigenunabhängige Tumorzelllyse bewirken.

Die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. über einen bispezifischen Antikörper) führt zu der Produktion von  $TNF\alpha$  (Zeidler *et al.*, 2001), einem Zytokin, das direkte Apoptose auslösen kann. Darüber hinaus steigert  $TNF\alpha$ , wie auch IL-2, die NK-Zell-Aktivität (Reiter, 1993).

Der bispezifische Antikörper BiUII redirigiert möglicherweise einige spezifische CTLs an Tumorzellen, wodurch eine MHC-abhängige Tumorzelllyse angestoßen wird. Die Interaktion aktivierter T-Zellen mit Tumorzellen führt aber auch zu einer MHC-unabhängigen Tumorzellzerstörung (Thiele und Lipsky, 1989). Dabei wird die Tumorzellelimination über die Exozytose von Perforinen/Granzymen (Riesenberg *et al.*, 2001) oder über die Bindung von Fas/Fas-Ligand vermittelt (Atkinson und Bleackley, 1995; Hahn *et al.*, 1995).



**Abbildung 1.4.: Immunologische Effekte, die bei Anwendung des bispezifischen Antikörpers BiUII postuliert werden.** Zum einen interagieren T-Zelle und Antigen-präsentierende Zelle (APC) direkt mit der Tumorzelle, zum anderen führt die Antikörperbindung zu einer Interaktion zwischen den Immunzellen untereinander, die zu einer Effizienzsteigerung der antitumoralen Reaktion führen soll.

Die Interaktion von Tumorzellen und Effektorzellen über einen bispezifischen Antikörper wie BiUll kann also ein komplexes Netzwerk immunologischer Effekte anstoßen, zu dem jede einzelne Zellart ihren speziellen Beitrag leistet. Die Beobachtung solcher Vorgänge *in vivo* ist allerdings außerordentlich komplex. Aus diesem Grund bietet sich die Verwendung eines *in vitro*-Systems an, das einerseits die Situation *in vivo* in Teilen widerspiegelt, andererseits die Komplexität auf ein interpretierbares Maß reduziert.

### 1.1.7. Tumorzell-Sphäroide

*In vitro*-Untersuchungen zur Lyse von Tumorzellen werden üblicherweise in zweidimensionalen Zellkulturmodellen durchgeführt. Diese Monolayer-Systeme haben den Nachteil, dass sie die Morphologie von disseminierten Tumorzellen oder Mikrometastasen nicht repräsentieren und damit für eine Anwendung *in vivo* nur wenig verlässliche Daten liefern. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell der Tumorzell-Sphäroide (**tumor-cell-spheroids**, **TCS**) (Sutherland, 1988) in unserem Labor etabliert und eingesetzt. Sphäroide imitieren in ihrer dreidimensionalen Struktur die „Wirklichkeit“ von Mikrometastasen besser als herkömmliche Zellkulturverfahren (Haas und Koldovsky, 1996). So ist zum Beispiel die Expression bestimmter Proteine in Monolayerkulturen anders reguliert als in Tumorzell-Sphäroiden (Waleh *et al.*, 1994). Auch reagieren Zellen eines Sphäroidverbandes anders auf antitumorale Verfahren als Zellen in Monolayerform (z.B. mit Resistenz gegenüber Bestrahlung, Olive und Durand, 1994).

Tumorzell-Sphäroide werden zu verschiedenen Zwecken in der Tumorforschung eingesetzt:

- An TCS lässt sich die Penetrationsfähigkeit von therapeutischen Substanzen untersuchen (z.B. monoklonale Antikörper, Kwok *et al.*, 1988).
- In Sphäroiden kann die Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen in einem gewebeähnlichen Umfeld studiert werden (Audran *et al.*, 1994).
- Sphäroide eignen sich zur Untersuchung von Effekten der Strahlentherapie (Santini *et al.*, 1999) oder Radioimmuntherapie (Essand *et al.*, 1995).

## 1.2. Zielsetzung

Trotz der Weiterentwicklung der gängigen Therapiekonzepte hat sich die Prognose für Patienten mit Karzinomen der Kopf-Hals-Region nicht wesentlich verbessert. Limitierend für die Prognose ist das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen oder nicht erkennbarer Mikrometastasen zu einem Zeitpunkt, an dem der Patient klinisch tumorfrei erscheint (minimal residual disease, mrd). Eine Therapiestrategie, die die Elimination genau dieser Zellen erreicht, würde die Metastasen- und Rezidivhäufigkeit senken und somit für die Patienten einen Überlebensvorteil bringen können. Mit diesem Gedanken werden Antikörpermoleküle in der onkologischen Forschung erprobt.

Bispezifische Antikörper können das Immunsystem auf zwei Wegen aktivieren:

Einerseits kann eine direkte Tumorzellelimination ausgelöst werden, andererseits kann die Entwicklung eines anhaltenden immunologischen Gedächtnisses gegen Tumorzellen induziert werden. Daher erscheint bei Patienten in einer mrd-Situation die Anwendung solcher bispezifischer Antikörper besonders erfolgversprechend. Andererseits ist der Kenntnisstand über die Wirkungsweise von bispezifischen Molekülen noch sehr gering.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher,

- die Wirkungsweise eines bispezifischen Antikörpers, BiUII, *in vitro* näher zu charakterisieren und
- die *in vitro*-Techniken zur Untersuchung von BiUII um ein dreidimensionales Kulturmodell zu erweitern und so eine realitätsnähere Beobachtung zu ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien und Geräte

#### 2.1.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- **FaDu**, eine humane Linie aus einem Plattenepithelkarzinom des Pharynx (ATCC Rockville, US) und
- **PCI-1** aus einem humanen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. T. Whiteside, Pittsburgh Cancer Institute, USA, zur Verfügung gestellt wurde.

#### 2.1.2. Antikörper

Der bispezifische Antikörper BiUII wurde uns freundlicherweise von Dr. H. Lindhofer, GSF, München, zur Verfügung gestellt.

Spezifität	Antikörper	Verwendung	Herkunft/Referenz
$\alpha$ -Tenascin	TN2	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -Fibronectin	3E3	Immunhistochemie	Boehringer, Mannheim
$\alpha$ -panCK	AE1 und AE3	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -EpCAM	C215 Kulturüberstand	FACS/ Immunhistochemie	(Bjork <i>et al.</i> , 1993)
$\alpha$ -HSPG	polyklonal	Immunhistochemie	Institut für Pathologie der LMU München
$\alpha$ -CD2	T9-10	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -CD3	UCHT1	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -CD4	MT310	FACS/ Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -CD8	DK25	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -CD68	KP1	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -MHC I	W6/32 Kulturüberstand	FACS	ATCC Rockville, US
$\alpha$ -MHC II	L243 Kulturüberstand	FACS	ATCC Rockville, US
$\alpha$ -Maus IgG	FITC-konjugierter Sekundärantikörper	FACS	Dianova, Hamburg

$\alpha$ -Maus IgG	APAAP-Brücken-Antikörper bzw. Sekundärantikörper	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -alkalische Phosphatase	APAAP-Komplex, konjugiert mit intestinaler alkalischer Phosphatase vom Kalb	Immunhistochemie	DAKO, Hamburg
$\alpha$ -Maus IgG	Biotinylierter Sekundär-Antikörper	Immunhistochemie	Vector, Burlingame
ABC-E	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	Detektion für Immunhistochemie	Vector, Burlingame

### 2.1.3. Probandenmaterial

In der hier vorgelegten Arbeit wurden Leukozyten (PBMCs) aus dem peripheren Blut freiwilliger gesunder Spender sowie aus „buffy coats“ der hauseigenen Blutbank verwendet.

### 2.1.4. Geräte

Der Kryostat (CM 1900) stammte von der Firma Leica in Benzheim, die Sterilbank von NUAIRE in Plymouth/US, der Brutschrank von der Firma Revko in Asheville/Kanada (bezogen über Fa. Labor Pabisch, München), die Mikroskope von Zeiss in Oberkochen und die Zentrifugen von Haereus (Biofuge 13 und Biofuge fresco), Jouan (CR 422) in Saint Herblain/Frankreich und Hettich (Universal 16A-Zytospinzentrifuge). Die durchflußzytometrischen Untersuchungen erfolgten an einem FACSCalibur der Firma Becton/Dickinson, Heidelberg. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer Kamera der Firma Zeiss auf einen Farbdiafilm (160T Elite Chrome, Kodak) aufgenommen und mittels eines AGFA-Scanners („SNAPSCAN 1236®“, AGFA) digitalisiert.

### 2.1.5. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle üblichen Chemikalien, Medienzusätze und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer (Mannheim), Gibco BRL, Life Technologies (Gaithersburgh/MD), Merck (Darmstadt), Seromed/Biochrom KG (Berlin), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Zudem kamen folgende Produkte zum Einsatz: DMEM-Zellkulturmedium (Dulbeccos modified eagle medium) und Ficoll/Hypaque von Seromed/Biochrom KG (Berlin), FCS von Gibco BRL, Life

Technologies (Gaithersburgh/MD), Tissue Tek® O.C.T.4583 Compound, Fa. Sakura Finetek Inc. (Torrance/CA) und Einbettungsschälchen von der Firma Miles Inc. Diagnostics Division (Elkhart/IN). Für die Immunhistochemie wurden „Vectastain® Elite ABC Kit“ von der Fa. Vector (Burlingame/USA), AB-Serum von Biotest (Dreieich), Ziegen- und Pferdeserum von DAKO (Hamburg), das APAAP-Detektionssystem von Dianova und die Chromogene fast blue und Aminoethylcarbazol von Sigma (Deisenhofen) sowie Neufuchsin (Chroma, Münster) benötigt. Die Zählkammern stammten von Madaus Diagnostik (Köln), die silanbeschichteten Objektträger von Menzel-Gläser. Die Einmal-Artikel wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes/US) und Sarstedt (Numbrecht) bezogen.

## **2.1.6. Puffer und Lösungen**

### **2.1.6.1. Lösungen für die Zellkultur**

PBS (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung):

0,21g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9,0g NaCl, 0,726g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ad 1l mit a. dest..

Trypsin/EDTA:

25mg Trypsin, 20mg EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure) in 10ml PBS.

### **2.1.6.2. Lösungen für die Sphäroid-Einbettung**

Paraformaldehyd 4%: 8g Paraformaldehyd (Fa Sigma, Deisenhofen) auf 100ml a. dest.. Nach dem Erhitzen wurde zum Lösen des Niederschlags tropfenweise 10N NaOH zugegeben. Zum Puffern wurden 100ml 0,2M PBS (pH 7,4) zugegeben, die Lösung filtriert und bei 4°C gelagert.

Sucrose 10%: 10g Saccharose auf 100ml PBS 0,1M, pH 7,4.

### **2.1.6.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Hämalaun-Lösung: Mayers Haemalaun (Fa. Chroma, Münster).

Eosin-Lösung: 0,5%-ige wässrige Eosin-gelb-Lösung.

### **2.1.6.4. Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Färbung**

TBS (Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung):

0,05M Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7,6.

Tris-Puffer (0,05M, pH 9,7):

6,057g Tris/1l a. dest.; pH-Einstellung auf 9,7 mit 2N HCl.

Neufuchsin-Lösung 5%:

0,5g Neufuchsin in 10ml 2N HCl.

Propandiol-Puffer 0,2M:

21,028g 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol auf 1l a. dest..

Substratlösung 1 (hexazotiertes Astra-Neufuchsin):

Mischung der folgenden Lösungen 1 und 3, dann Zugabe von Lösung 2. Das Gemisch wurde mit 2N HCl auf pH 8,7 eingestellt. *Lösung 1*: 25ml 0,2M Propandiol, 675mg NaCl, 40mg Levamisole, 75ml Tris-Puffer (pH 9,7). *Lösung 2*: 50mg Naphtol-AS-BI-Phosphat, 600µl N,N-Dimethylformamid. *Lösung 3*: 500µl 4%-ig NaNO<sub>2</sub>, 1ml a. dest.. 200µl Neufuchsinlösung.

Substratlösung 2 (fast blue):

2mg Naphthol AS-MX-Phosphat, 200µl DMFO, 9,8ml 0,1M TBS (pH 8,2), 2mg Levamisole, 10mg fast blue.

#### **2.1.6.5. Avidin-Biotin-Komplex-Färbung**

PBS-Puffer, 0,1M:

8g NaCl, 0,2g Natriumdihydrogenphosphat, 1,45mg di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, in 1l a. dest. (pH 7,4).

ABC-Komplex:

10µl Lösung 1, 10µl Lösung 2, 700µl PBS, 300µl AB-0-Serum, (ABC-Komplex 30min vor Verwendung angesetzt). (Lösung 1: Avidin gelöst in Tris-Puffer (50mM Tris pH 7,5, 0,15M NaCl) und 0,1M Natrium-Acetat-Lösung, pH 4,5; Lösung 2: biotinylierte Meerrettich-Peroxidase H).

AEC-Substratlösung:

20mg Aminoethylcarbazol, 10ml Dimethylsulfoxid (DMSO), 200ml Na-Acetat-Puffer (0,1M), 40-80µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).

DAB-Substratlösung:

6mg Diaminobenzidin, 10ml Tris-Puffer (0,05 M; pH 7,6) 100ml 3%ig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Kultivierung und Zählen der Zellen**

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C unter einer feuchten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> in üblichen Gewebekulturflaschen aus Polypropylen kultiviert. Dem Kulturmedium (DMEM) wurden 10% fötales Kälberserum, 2mM Glutamin, 1mM nichtessentielle Aminosäuren, 1mM Natriumpyruvat sowie 100IE/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Die adhärent wachsenden Tumorzelllinien FaDu und PCI-1 wurden alle drei bis vier Tage 1:5 verdünnt. Zum Ablösen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vollständig benetzt, fünf Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit Medium abgespült.

Zum Zählen wurden die Zellsuspensionen 1:1 mit 0,5% Trypanblau (in PBS) gemischt, in einer Neubauer-Kammer mikroskopiert und gezählt. Nach dem Trypanblau-Ausschluß-Verfahren lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Abgestorbene Zellen färben sich dunkelblau, vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf.

### **2.2.2. Isolierung von Leukozyten des peripheren Blutes**

Leukozyten des peripheren Blutes (PBMCs) wurden entweder aus Leukozytenkonzentraten der Blutbank im Haus oder aus dem Vollblut freiwilliger Spender gewonnen. Das Material wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt und auf einen Ficoll-Gradienten überschichtet. Nach Zentrifugation (25 Minuten mit 770g ohne Bremse, 30°C) wurde die Interphase abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen (10 Minuten mit 270g, 30°C) und in Medium aufgenommen.

### **2.2.3. Anfertigung von Zytospin-Präparaten**

Zur Anfertigung von Zytospins wurden Suspensionen von ca.  $3 \times 10^5$  Zellen auf 3-Amino-Trioxysilan-beschichtete Objektträger gegeben, für 10 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die verbleibende Flüssigkeit mit Hilfe von Filterpapier entfernt (Abb. 2.1.). Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und bei -20°C eingefroren.

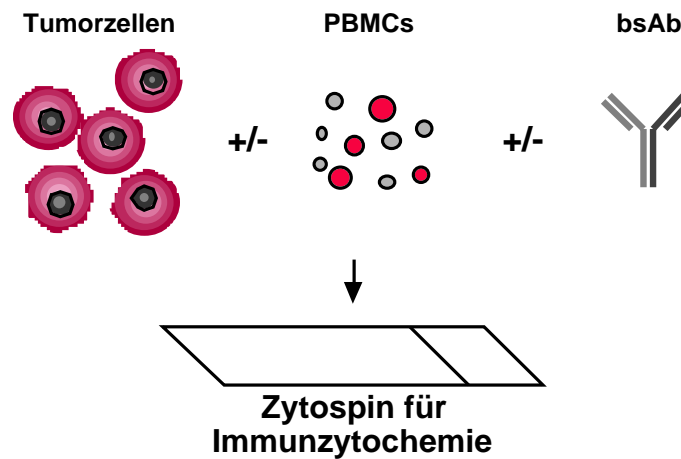


Abb. 2.1.: Erstellen von Zytospinpräparaten für die immunzytochemische Untersuchung von Einzelzellen.

## 2.2.4. Tumorzell-Sphäroide

### 2.2.4.1. Generierung von Tumorzell-Sphäroiden

96-well-Platten wurden mit 100µl 1%iger Agarose (in PBS) bestückt. Zur Generierung der Sphäroide wurden 200µl einer Suspension von  $1,5 \times 10^4$  /ml (FaDu) bzw.  $2,5 \times 10^4$  Zellen /ml (PCI-1) auf die ausgehärtete Agarose gegeben. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C bildeten sich Sphäroide mit einem Durchmesser von etwa 300µm aus (Abb. 2.2.).

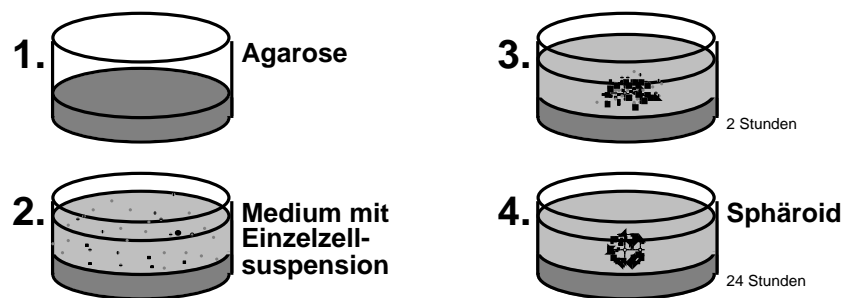


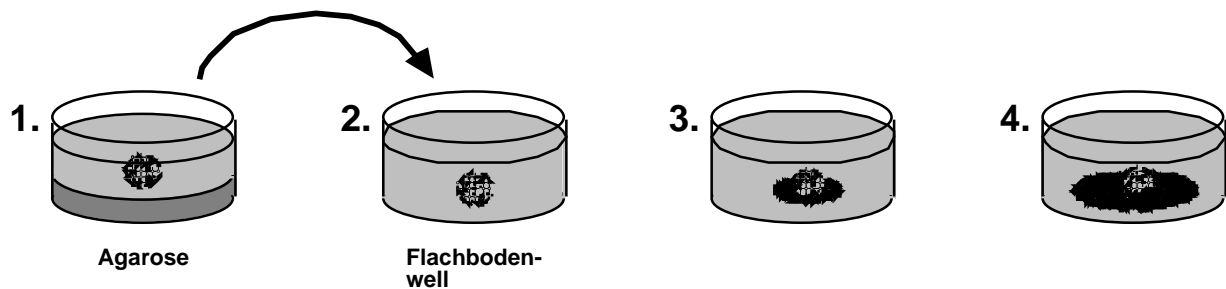
Abbildung 2.2.: Generierung von Sphäroiden: Eine Tumorzellsuspension (2.) wird auf Agarose-beschichtete 96-well-Platten (1.) gegeben. Innerhalb von 24 Stunden bilden sich Sphäroide aus (4.).

### 2.2.4.2. Kokultur von Tumorzell-Sphäroiden und Immunzellen

Zur Durchführung von Kokultur-Experimenten wurden Immunzell-Suspensionen und/oder Antikörper auf Sphäroide pipettiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Immunzellen in einem Verhältnis von 20:1 zu den Tumorzell-Sphäroiden gegeben, die Antikörper in einer Endkonzentration von 100ng/ml eingesetzt.

### 2.2.4.3. Wiederausplattieren von Sphäroiden

Sphäroide wurden mit einer 1ml-Pipette aufgenommen und in eine 96well-Flachbodenplatte umgesetzt (Abbildung 2.3.). Vitale Tumorzellen in einem Sphäroid wuchsen unter diesen Bedingungen wieder als adhärenente Monolayer aus. Der Zeitraum, der hierfür benötigt wurde, variierte zwischen den Zelllinien (24 Stunden für FaDu, 3 Tage für PCI-1).



**Abbildung 2.3.: Replattieren von Sphäroiden:** Wird ein aus vitalen Tumorzellen bestehendes TCS (1.) auf ein Flachbodenwell umgesetzt (2.), wachsen die Zellen innerhalb von Tagen wieder als Monolayer aus (3./4.).

### 2.2.4.4. Einbettung und Verarbeitung von Sphäroiden

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Sphäroide von der Agarose genommen und in ein Einbettungsschälchen überführt. Das Kulturmedium wurde komplett entfernt, die Sphäroide fünf Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte ein „Verkleben“ des Zellverbandes mit 10% Sucrose in PBS. Die Sphäroide wurden noch zweimal mit PBS gewaschen und mit 1µl Eosin angefärbt. Hierauf erfolgte die luftblasenfreie Überschichtung mit Einbettmedium und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Blöcke wurden mit einem Kryostat zu 5µm dünnen Präparaten geschnitten, auf Super Frost Plus Objektträger (Fa. Menzel) aufgezogen, über Nacht luftgetrocknet und anschließend zehn Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

### 2.2.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die luftgetrockneten und Aceton-fixierten Schnitte wurden fünf Minuten in 4% Paraformaldehyd vorbehandelt, zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen, dann zehn Minuten mit Hämalaun gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Zytoplasmafärbung mit Eosin (fünf Minuten). Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe differenziert (70%ig bzw.

80%ig Ethanol), fixiert (fünf Minuten 96% Ethanol, fünf Minuten 100% Ethanol), zehn Minuten in Xylol ausgehärtet und mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg) eingedeckt.

### **2.2.6. Immunzytochemische und immuhistochemische Färbungen**

Zur immunzyto- bzw. -histochemischen Aufbereitung der Zytospins und Sphäroidschnitte wurde sowohl die alkalische Phosphatase/anti-alkalische Phosphatase-Methode (APAAP) als auch die Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode (ABC) verwendet.

APAAP-Färbung: Die Detektion des Primärantikörpers beruht bei dieser Technik nach Cordell (Cordell *et al.*, 1984) auf der Bindung des APAAP-Komplexes (APAAP = Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper) an den Zweitantikörper (= Brückenantikörper, Kaninchen-anti-Maus IgG), der gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet ist. Durch Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem Substrat Naphtol-AS-BI-Phosphat und dem Chromogen (beides in der Färbelösung enthalten) erfolgt die Farbentwicklung.

Die aufgetauten und luftgetrockneten Schnitte oder Zytospins wurden zehn Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert, erneut luftgetrocknet (30 Minuten) und in TBS rehydriert. Alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Durch 25-minütige Inkubation mit normalem Kaninchen-Serum (1:20 in TBS) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Hierauf wurde 45 Minuten mit dem entsprechenden Erstantikörper inkubiert, drei- bis fünfmal mit TBS gewaschen und dann der Brückenantikörper im Überschuss (1:25) für 30 Minuten zugegeben. Nach weiteren Waschschritten (drei- bis fünfmal TBS) wurde der APAAP-Komplex (1:50, 30min) zugegeben, erneut gewaschen und letztlich die spezifische Färbung der gebundenen alkalischen Phosphatase durch die Färbelösung durchgeführt.

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Objektträger zwei Minuten in eine saure Hämalaun-Lösung gegeben, zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

ABC-Färbung: Bei dieser Methode wird ein biotinylierter, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper eingesetzt, der mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (ABC = Avidin-Biotin-Komplex) eine feste Bindung eingeht. Durch die Reaktion der Peroxidase mit Aminoethylcarbazol (AEC) bzw. mit Diaminobenzidin (DAB) in der Färbelösung entsteht die spezifische Farbreaktion.

Nach Auftauen, Fixieren und Lufttrocknen (s.o.) wurden die Präparate fünf Minuten in PBS gestellt, dann zur Blockierung endogener Peroxidasen in derselben Küvette 30 Minuten unter Zusatz von 200µl Wasserstoffperoxid geschwenkt und hierauf wieder zehn Minuten in PBS belassen. Auch hier erfolgten die weiteren Schritte wieder in einer feuchten Kammer. Für die folgenden 25 Minuten wurden die Objektträger in PBS mit normalem Pferdeserum (1:20) inkubiert (Absättigung unspezifischer Bindungen) und anschließend eine Stunde mit Primärantikörper versehen. Nach dreimaligem Waschen durch Schwenken in PBS wurde der biotinylierte Zweitantikörper (1:200) unter Zugabe von 30% humanem AB-Serum 30 Minuten auf die Präparate gegeben, die dann (nach weiteren drei Waschschritten) für eine halbe Stunde mit dem Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex inkubiert, nochmals gewaschen und dann in die AEC- bzw. DAB-Lösung (entsprechend den Anleitungen des Herstellers) gegeben wurden. Zur Beendigung der Färbung wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun.

### Mehrfachfärbungen:

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Mehrfachfärbungen wurden die APAAP- und die ABC-Methode kombiniert eingesetzt. Die benutzten Chromogene sind bei den entsprechenden Abbildungen jeweils gesondert angegeben. Im Falle der Doppelfärbungen fand zunächst eine Reaktion nach ABC-Protokoll statt, darauf folgte die APAAP-Zweitfärbung. Für die Dreifachfärbungen wurde eine zusätzliche dritte Detektion nach der APAAP-Methode durchgeführt.

### **2.2.7. Durchflußzytometrische Untersuchungen**

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist die Expression zytoplasmatischer oder membranständiger Proteine bestimmbar. Diese Proteine werden mit einem spezifischen Erstantikörper markiert, der entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist oder mit einem konjugierten Zweitantikörpers detektiert werden muss.

Im Einzelnen wurden die Suspensionen ( $1 \times 10^5$  Zellen) mit 1ml FACS-Puffer (PBS, 2% FCS) gewaschen, für 30 Minuten bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert und erneut mit 1ml FACS-Puffer gewaschen. Dann erfolgte, falls notwendig, die Färbung mit dem Zweitantikörper (30 Minuten bei 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit einem FACS-Gerät ausgewertet.

### **2.2.8. Vitalitäts-Assay**

Der MTT-Assay (nach Mosmann, 1983) dient der Vitalitätsbestimmung adhärenter Zellen. Er basiert auf der Konvertierung des Substrats MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch eine mitochondriale Dehydrogenase. Hierbei entsteht ein farbiges Produkt, das durch Messung der optischen Dichte quantifiziert wird.

$1-3 \times 10^4$  Zellen wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l in Triplikaten ausplattiert und kultiviert. Zur Messung der MTT-Konversion wurden je 10  $\mu$ l Thiazolblau (5mg/ml) mit Superoxiddismutase (1mg/ml) (9:1) zugegeben. Nach 4 Stunden bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle mit je 200  $\mu$ l Isopropanol/1M HCl (24:1) gelöst und die Absorption bei 540nm unter Subtraktion des Wertes bei 630nm gemessen.

### **2.2.9. TNF $\alpha$ -Bioassay**

Die Bestimmung des biologisch aktiven TNF $\alpha$  in zellfreien Kulturüberständen erfolgte unter Verwendung der TNF-sensitiven Indikatorzelllinie L929 (Hogan und Vogel, 1988). Diese Zellen gehen bereits bei geringen Mengen TNF in Apoptose, wobei das Ausmaß der Apoptose mit dem TNF-Gehalt im Medium korreliert.

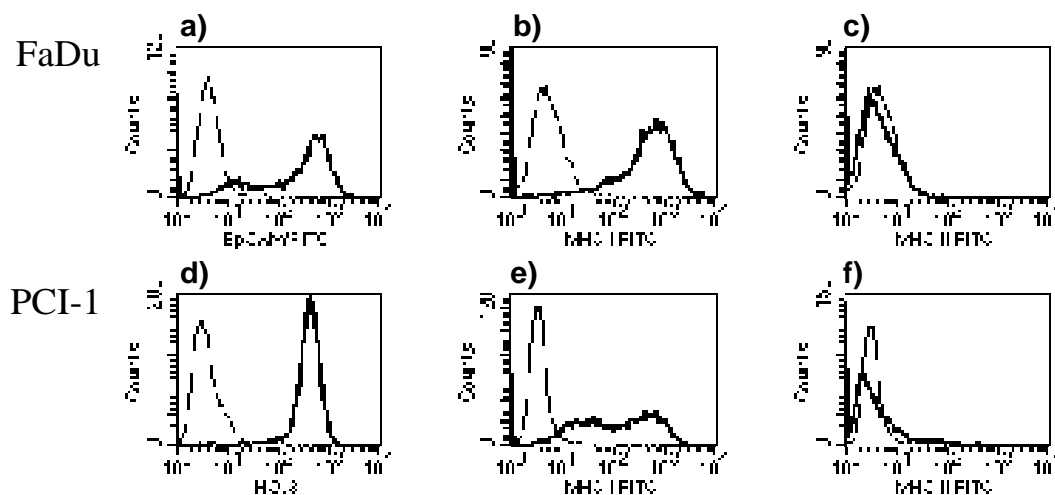
L929-Zellen wurden in Mikrotiterplatten ausgesät ( $2,5 \times 10^4$ /well) und 24 Stunden inkubiert. Die zu testenden Überstände wurden in acht Verdünnungen und Triplikaten je Konzentration auf die konfluenten Monolayer gegeben. Rekombinantes humanes TNF $\alpha$  diente als Standard, zur Steigerung der Sensitivität wurde Actinomycin D in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml zugegeben. Nach einer Inkubation für weitere 24 Stunden erfolgte die Auswertung über einen MTT-Assay.

### 3. Ergebnisse

Es wird postuliert, dass BiUII in der Lage ist, sogenannte Tri-Zell-Komplexe zu vermitteln. Dabei denkt man an die Konstellation aus EpCAM-positiver Tumorzelle, CD3-positiver T-Zelle und Fc-Rezeptor-positiver Zelle entsprechend den drei Bindungsstellen des Antikörpermoleküls. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden daher Untersuchungen durchgeführt, die die durch BiUII induzierten Zellformationen darstellen sollten. Der zweite Teil der Experimente galt der Charakterisierung der *in vitro*-Effekte von BiUII. Hierfür wurde das System der *Tumorzell-Sphäroide (TCS)* etabliert, welches es ermöglicht, die Auswirkungen der Antikörperbehandlung an einem dreidimensionalen Modell zu studieren.

#### 3.1. Charakterisierung der eingesetzten Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien FaDu und PCI-1 wurden auf die für die folgenden Experimente wesentlichen Eigenschaften überprüft. Unter Verwendung der Durchflußzytometrie wurde die Expression des tumorassoziierten Antigens EpCAM getestet. In vier unabhängigen Versuchen erwiesen sich beide Zelllinien als EpCAM-positiv. In einer Analyse der MHC-Klassen waren sowohl FaDu- als auch PCI-1-Zellen positiv für MHC-Klasse I jedoch negativ für MHC-Klasse II- Moleküle (Abb. 3.1.).



**Abbildung 3.1.:** FACS-Analyse der Zelllinien FaDu und PCI-1 auf die Expression des tumorassoziierten Antigens EpCAM bzw. auf die Expression von MHC-Klasse I und II. **a)** FaDu  $\alpha$ -EpCAM. **b)** FaDu  $\alpha$ -MHC-Klasse I. **c)** FaDu  $\alpha$ -MHC-Klasse II. **d)** PCI-1  $\alpha$ -EpCAM. **e)** PCI-1  $\alpha$ -MHC-Klasse I. **f)** PCI-1  $\alpha$ -MHC-Klasse II.

### 3.2. Untersuchungen an Einzelzellen

Zunächst wurde untersucht, in wieweit der bispezifische Antikörper BiUII die Bindungseigenschaften aufweist, die aufgrund seines Aufbaues postuliert werden. Insbesondere folgende Fragen sollten geklärt werden:

- Binden T-Zellen bzw. Monozyten/Makrophagen über den bispezifischen Antikörper an EpCAM-positive Tumorzellen?
- Ist die postulierte Konstellation eines Tri-Zell-Komplexes bestehend aus EpCAM-positiver Tumorzelle, T-Zelle und Fc-Rezeptor-positiver Zelle sterisch möglich und experimentell nachweisbar?

Um eine möglichst übersichtliche Darstellung zu erreichen, wurden die Untersuchungen an Zytospins einer Suspension aus Tumorzellen, PBMCs und dem bispezifischen Antikörper durchgeführt (vgl. Abb. 2.1.). Dafür wurden Tumorzellen (FaDu) mit PBMCs im Verhältnis 1:1 gemischt und mit BiUII 30 Minuten inkubiert. Die hiervon angefertigten Zytospins wurden mit DAPI (Kernfärbung) gefärbt und in Doppelbelichtung (Fluoreszenzanregung bei 365nm und Durchlicht) dokumentiert (Abb.3.2.). Mit dieser Methode ließen sich enge Kontaktflächen zwischen den Tumorzellen und den Effektorzellen erkennen (Pfeile).

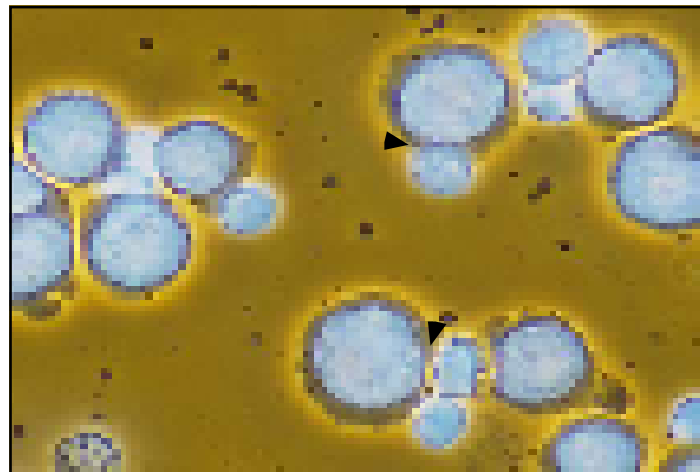
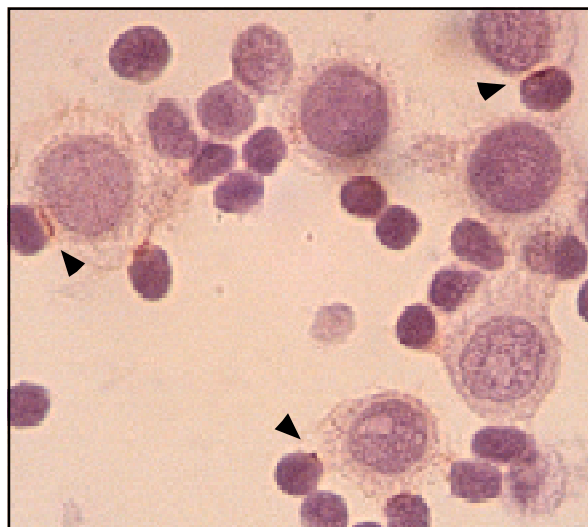


Abbildung 3.2.: Zellkontakte zwischen Tumor- und Immunzellen in Anwesenheit von BiUII (100 ng/ml). (FaDu-Zellen und PBMCs im Verhältnis 1:1, 30 Minuten Inkubation). DAPI-Kernfärbung, Doppelbelichtung (Fluoreszenzanregung bei 365 nm und Durchlicht).



### 3.2.1. Direkter Antikörpernachweis

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die in Abb. 3.2. dargestellten Zellkontakte durch den bispezifischen Antikörper vermittelt sind. Hierfür wurden Zytospinpräparate der gleichen Suspension mit einem konjugierten  $\alpha$ Maus-IgG-Antikörper inkubiert, der murines Immunglobulin detektiert. Mit dieser immunzytochemischen Färbung war es möglich, den bispezifischen Antikörper direkt nachzuweisen. Wie in Abbildung 3.3. exemplarisch gezeigt, fand sich die spezifische Färbung von BiUII als schmales Band an den Kontaktflächen zwischen Immunzellen und Tumorzellen (Pfeile).



**Abbildung 3.3.: Direkter immunzytochemischer Nachweis des bispezifischen Antikörpers BiUII.** Der Antikörper färbt sich als schmaler Streifen an den Kontaktzonen zwischen Tumor- und Immunzellen spezifisch an. (FaDu-Zellen und PBMCs 1:1, BiUII 100ng/ml, 30 Minuten Inkubation), Nachweis des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes mit Aminoethylcarbazol als Chromogen.

### 3.2.2. Bestimmung der Immunzellen

Aufgrund der „Konstruktion“ von BiUII wurde postuliert, dass T-Zellen und Monozyten/Makrophagen jeweils eine BiUII-vermittelte Bindung zu EpCAM-positiven Tumorzellen eingehen können. Die folgenden Versuche sollten klären, ob diese Immunzellgruppen *in vitro* antikörpervermittelte Kontakte zu den Tumorzellen bilden.

Mit immunzytochemischen Doppelfärbungen wurde der bispezifische Antikörper detektiert und gleichzeitig die entsprechende Effektor-Subpopulation untersucht (T-Zellen für den CD3-Arm, Fc $\gamma$ -RI-positive Zellen wie Monozyten/Makrophagen für den Fc-Teil). Sowohl für CD4- und CD8-positive T-Zellen als auch für Monozyten/Makrophagen konnten BiUII-vermittelte Zellkontakte immunhistochemisch gezeigt werden (Abb. 3.4.).

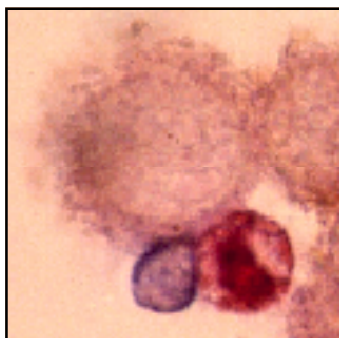


**Abbildung 3.4.: BiUII vermittelt Kontakte zwischen EpCAM-positiven Tumorzellen und Immunzellen.** Doppelfärbungen mit dem Nachweis von BiUII (braun, Aminoethylcarbazol als Chromogen) und dem jeweiligen CD-Antigen (blau, fast blue als Chromogen). **a)** BiUII/CD4. **b)** BiUII/CD8 **c)** BiUII/CD68. (FaDu/PBMCs 1:1, BiUII 100ng/ml, Inkubation 1h).

### 3.2.3. Nachweis des Tri-Zell-Komplexes

Wie in Abbildung 3.4. gezeigt, können sowohl T-Zellen als auch monozytäre Zellen über den bispezifischen Antikörper BiUII mit EpCAM-positiven Tumorzellen Kontakte eingehen. Es stellte sich die Frage, ob auch der postulierte Tri-Zell-Komplex immunzytochemisch nachweisbar ist.

Zu diesem Zweck wurden Dreifachfärbungen angefertigt (Abb. 3.5.). CD68 diente als Marker für die Monozyten, der biotinylierte Zweitantikörper zur Detektion von BiUII. CD2 wurde als Antigen für den Nachweis von T-Zellen gewählt (da einerseits CD3 als Bindungsstelle des bispezifischen Antikörpers nicht zur Verfügung stand und andererseits CD4- und CD8-positiv T-Zellen gleichzeitig erfasst werden sollten). Mit dieser Methode war es erstmals möglich, die Formierung von Tri-Zell-Komplexen darzustellen. Abbildung 3.5. zeigt beispielhaft einen solchen Komplex.



**Abbildung 3.5.: Darstellung eines Tri-Zell-Komplexes** bestehend aus einer BiUII-tragenden EpCAM-positiven Tumorzelle (rotbraun, ABC-Methode, Aminoethylcarbazol als Chromogen), einer CD2-positiven T-Zelle (blau, APAAP-Methode, fast blue als Chromogen) und einer CD68-positiven monozytären Zelle (rot, APAAP, Neufuchsin als Chromogen).

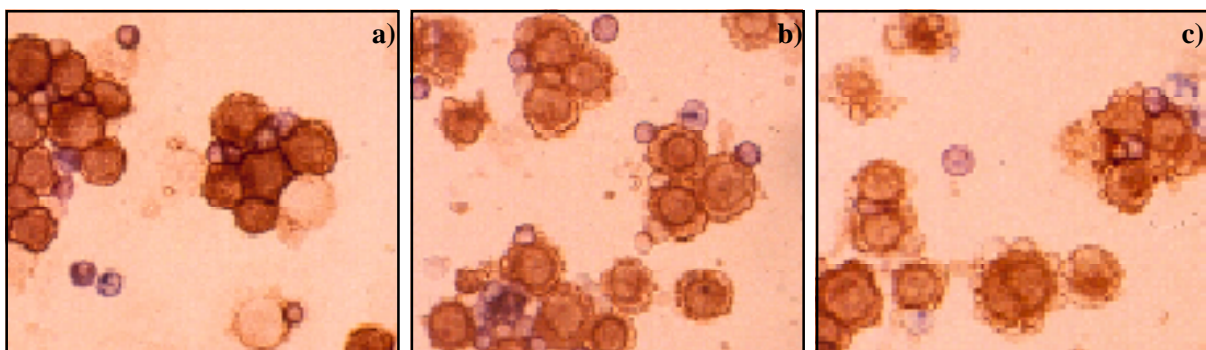
### 3.2.4. Nachweis antikörpervermittelter Phagozytose

Die bisher beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass schon nach einer Inkubationszeit von nur 30 Minuten die postulierten Bindungen zwischen Tumor- und Immunzellen eingegangen werden können. Im weiteren sollte untersucht werden, ob die Zellen nach längerer Inkubationsdauer morphologischen Veränderungen zeigen. Insbesondere folgende Aspekte waren hierbei von besonderem Interesse:

- Verändern sich die *Tumorzellen* morphologisch, d.h. gibt es Hinweise auf eine Schädigung oder Zerstörung der Tumorzellen?
- Verändern sich die *Immunzellen* morphologisch, d.h. gibt es Zeichen für eine Aktivierung von T-Zellen oder Makrophagen?

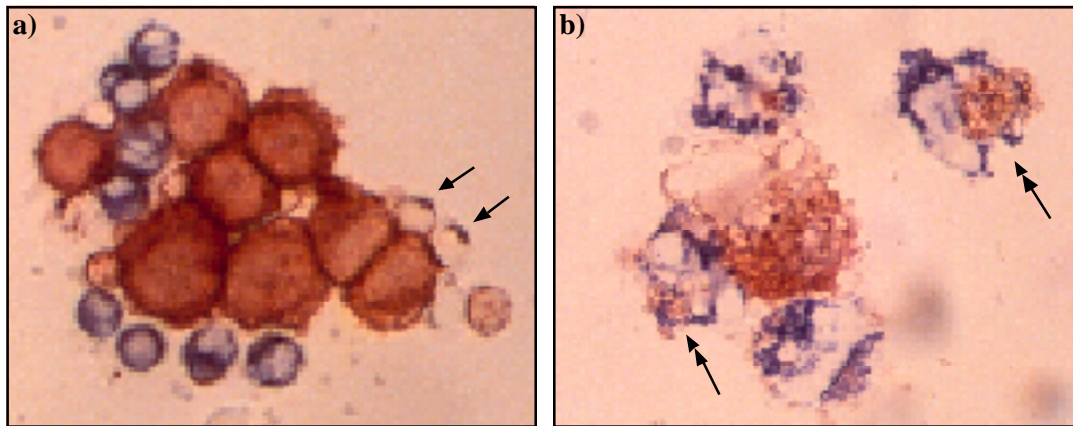
In einem Kinetik-Experiment wurden daher zu verschiedenen Zeitpunkten Zytospins derselben Suspensionsprobe angefertigt und immunzytochemisch gefärbt. Abbildung 3.6. zeigt die Proben nach einer, vier und acht Stunden.

Nach einer Stunde stellten sich die *Tumorzellen* noch scharf begrenzt und intakt dar (Abb. 3.6.a.). Bereits nach vier Stunden zeigte das Zytoplasma eine Auflockerung, die Zellen waren insgesamt größer (Abb. 3.6.b.). Nach 8 Stunden hatten die noch erhaltenen Tumorzellen ein blasig aufgetriebenes Zytoplasma und es ließen sich vermehrt Reste zerstörter Tumorzellen finden (Abb. 3.6.c.). Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden (Abb. 3.7.b.) waren von den Tumorzellen nur noch Zellreste nachweisbar.



**Abbildung 3.6.:** Die morphologische Veränderung von Tumorzellen bei Koinkubation mit PBMCs und BiUII. Tumorzellen braun, (ABC-Methode, Diaminobenzidin als Chromogen), Immunzellen pink (APAAP, Neufuchsin als Chromogen). a) 1h Inkubation b) 4h Inkubation c) 8h Inkubation. (FaDu/PBMCs 1:1, BiUII 100 ng/ml).

Auch bei den *Effektorzellen* waren morphologische Veränderungen zu beobachten (Abb. 3.7.): An der Oberfläche von T-Zellen färbte sich der bispezifische Antikörper akkumuliert an (Abb. 3.7.a., Pfeile). Diese Beobachtung zeigte indirekt, dass eine Cluster-Bildung von CD3 und eine Aktivierung der T-Zellen stattgefunden hatte. Die CD68-positiven Monozyten/Makrophagen zeigten nach 12-stündiger Inkubation eine deutliche Größenzunahme, intrazellulär fanden sich braune Einschlüsse, ein Hinweis darauf, dass Tumorzellanteile phagozytiert wurden (Abb. 3.7.b., Pfeile).



**Abbildung 3.7.: Morphologische Veränderungen von Immunzellen bei Inkubation mit Tumorzellen und BiUll.** **a)** 1 Stunde. Tumorzellen (braun, Diaminobenzidin) und Makrophagen (blau, fast blue) in engem Kontakt, auch T-Zellen (ungefärbt, einfache Pfeile) sind beteiligt. Einfache Pfeile: T-Lymphozyten zeigen BiUll-Cluster an der Zelloberfläche. **b)** 12 Stunden. Hier finden sich nur noch Reste EpCAM-positiver Tumorzellen. Die Makrophagen zeigen ein inhomogenes Färbemuster, sind größer und haben zytoplasmatische Einschlüsse (Doppel-pfeile). FaDu + PBMCs (1:1) inkubiert mit BiUll (500ng/ml).

Diese bislang beschriebenen Experimente an den Zellsuspensionen hatten erbracht, dass BiUll zu einer effizienten Zerstörung der Tumorzellen führen kann. An den Immunzellen ließen sich Zeichen einer funktionellen Aktivierung erkennen.

Der folgende Teil der Arbeit galt den Untersuchungen am dreidimensionalen System. In Kokultur- und Replattierungs-Experimenten sollten die Veränderungen untersucht werden, die aus der Behandlung von Tumorzell-Sphäroiden mit Immunzellen und BiUll resultierten.

### 3.3. Untersuchungen am Sphäroid-Modell

Die Mikrometastasen und disseminierten Tumorzellen solider Karzinome werden für eine adjuvante Immuntherapie z.B. mit dem hier untersuchten Antikörper als geeignete Zielobjekte angesehen. Weder Zellsuspensionen noch adhären wachsende Kulturzellen können die Situation z.B. einer Mikrometastase *in vivo* angemessen repräsentieren. Aus diesem Grund wurde die Generierung und Bearbeitung dreidimensionaler Zellverbände, sogenannter Tumorzell-Sphäroide (TCS), in unserem Labor etabliert und für Kokultur-Experimente eingesetzt.

#### 3.3.1. Etablierung des Sphäroid-Modells

Tumorzell-Sphäroide sind kugelförmige Verbände aus  $2 \times 10^3$  bis  $5 \times 10^3$  Tumorzellen. Sie werden generiert, indem eine Suspension von Tumorzellen auf eine Agarose-beschichtete 96-well-Platte gegeben wird. Innerhalb von 24 Stunden bilden sich runde, homogene Sphäroide aus (vgl. Abb. 2.2.). Diese Tumorzell-Sphäroide sind je

nach verwendeter Zelllinie unterschiedlich kompakt. So bilden die hier verwendeten PCI-1-Zellen erheblich stabilere Sphäroide als die FaDu-Zelllinie.

Werden Sphäroide auf übliche Kulturschalen mit flachem Boden umgesetzt, so wachsen vitale Zellen wieder als adhärenente Monolayer aus. In Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie dauert dieser Vorgang zwischen einem (FaDu) und drei Tagen (PCI-1).

Zunächst wurden die von uns verwendeten Tumorzell-Sphäroide histologisch charakterisiert, dann erfolgten Experimente zum Infiltrationsverhalten von bispezifischen Antikörpern und Effektorzellen.

Schließlich wurden die Veränderungen untersucht, die aus der gleichzeitigen Behandlung von Sphäroiden mit Immunzellen und BiUII resultierten.

### **3.3.2. Histologische/immuhistochemische Charakterisierung der Sphäroide**

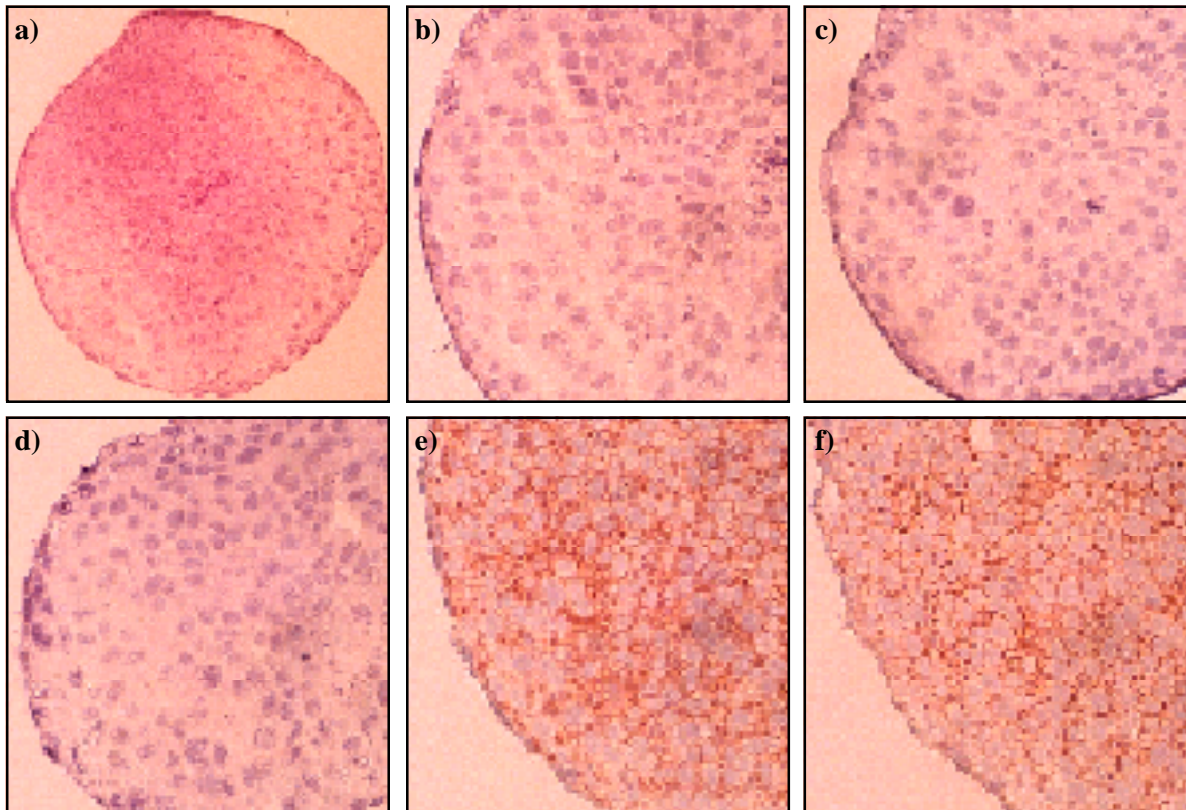
HE-Färbung (Abb. 3.8.a.): Die Tumorzelllinien FaDu und PCI-1 bildeten Sphäroide mit einer dichten äußeren Hüllschicht flächig aufliegender, pflastersteinartiger Zellen. Die Zellen im Inneren zeigten eine der Histologie von Plattenepithelkarzinomen ähnliche Anordnung, in den äußeren Zelllagen fanden sich Mitosen als Zeichen einer weiterbestehenden Teilungsaktivität. Nach etwa fünf Tagen bildeten sich im Zentrum der Sphäroide Nekrosen aus.

Extrazelluläre Matrix (Abb. 3.8b.-d.): Eine Expression von Tenascin, Fibronectin und HSPG (Heparansulfatproteoglykane) konnte nicht nachgewiesen werden.

Zytokeratine (Abb. 3.8.e.): Immunhistochemische Färbungen gegen pan-Zytokeratin erbrachten das für plattenepitheliale Zellen typische zytoplasmatische Muster.

EpCAM-Expression (Abb. 3.8.f.): In mehreren unabhängigen Versuchen zeigte sich eine konstante, membranständige Expression im Inneren der Sphäroide. Die äußersten Zellschichten der Sphäroide exprimierten geringere Mengen EpCAM.





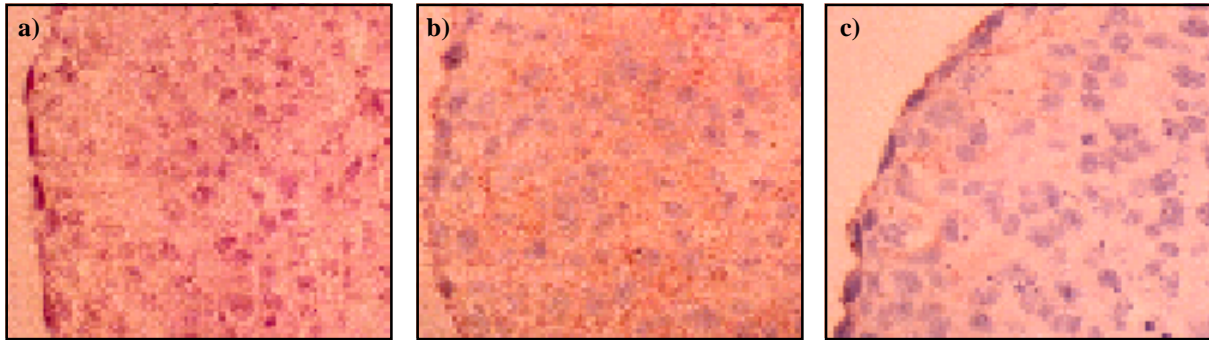
**Abbildung 3.8.: Immunhistochemische Charakterisierung unbehandelter Sphäroide** a) HE-Färbung. b)-f) FaDu-Sphäroide produzieren weder Fibronectin (3.8.b.), noch Tenascin (3.8.c.) oder HSPG (3.8.d.). Es findet sich eine stabile Expression von Zytokeratinen (3.8.e., Färbung gegen pan-Zytokeratin) und EpCAM (3.8.f.). Nachweis des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes jeweils mit Aminoethylcarbazol.

### 3.3.3. Infiltrationsverhalten von Antikörpermolekülen an Sphäroiden

Aus der Literatur ist bekannt, dass Antikörpermoleküle unterschiedlich gut in Sphäroide diffundieren können. Dabei beeinflusst eine Vielzahl von Faktoren die Antikörperverteilung in einem dreidimensionalen Zellverband (vgl. 4.3.2.).

Um zu untersuchen, wie stark BiUII EpCAM-positive Sphäroide penetriert, wurden TCS mit diesem bispezifischen Antikörper (100ng/ml für 24 Stunden) inkubiert und dann immunhistochemisch mit einem direkt konjugierten Zweitantikörper gefärbt.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass BiUII in die äußeren Bereiche EpCAM-positiver Sphäroide eindringt (Abb. 3.9.c.). Der Antikörper kam entsprechend der Verteilung des spezifischen Antigens EpCAM membranständig zur Darstellung. In den tiefer liegenden Zellschichten gelang der Nachweis von BiUII nicht.



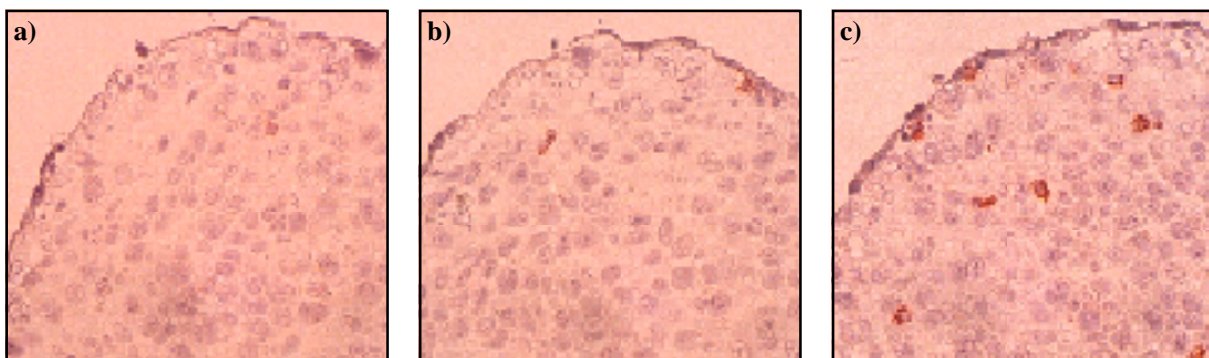
**Abbildung 3.9.: BiUII-Infiltration in TCS.** a) HE-Färbung, b) EpCAM-Expression, c) BiUII-Färbung. Neben einer starken Anfärbung an der äußeren Hüllschicht fand sich BiUII auch in den unmittelbar darunterliegenden Zelllagen. Dabei ist das membranständige Färbemuster vergleichbar mit der Verteilung des spezifischen Antigens EpCAM in b). (FaDu-TCS  $3 \times 10^5$  Zellen, BiUII 100ng/ml, 24 Stunden inkubiert, Nachweis des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes mit Aminoethylcarbazol als Chromogen).

### 3.3.4. Infiltrationsverhalten von Immunzellen in Sphäroide

Die nächste Versuchsserie sollte klären, ob auch Immunzellen in Sphäroide infiltrieren und ob allogene PBMCs einen schädigenden Effekt auf die Tumorzellen im Sphäroid-Verband ausüben.

Die Tumorzell-Sphäroide wurden hierfür 24 Stunden mit allogenen PBMCs inkubiert und anschließend immunhistochemisch gegen CD4, CD8 und CD68 gefärbt (Abb. 3.10.). Dabei ließ sich - unabhängig von der Herkunft der PBMCs - folgende Verteilung der Immunzellen beobachten:

*CD4-positive Lymphozyten* wurden nur ganz vereinzelt nachgewiesen (Abb. 3.10.a.). In einer Häufigkeit von 1-3 Zellen pro Schnitt fanden sich *CD8-positive T-Zellen* (Abb. 3.10.b.). *Monozyten/Makrophagen* wanderten in einer weit höheren Anzahl in Sphäroide ein (8-12 Zellen/Schnitt, Abb. 3.10.c.).



**Abbildung 3.10.: Infiltrationsverhalten von Immunzellen in TCS.** Färbungen gegen CD4, CD8 und CD68 an Schnitten eines 24 Stunden mit PBMCs kokubierten Sphäroids. a) CD4-positive T-Zellen lassen sich nur vereinzelt finden. b) CD8-positive Zellen kommen regelmäßig zur Darstellung. c) Monozytäre Zellen färben sich in einer Anzahl von 8-12 positiven Zellen pro Schnitt. (Nachweis des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes jeweils mit Aminoethylcarbazol als Chromogen).

Zeichen einer Zellschädigung oder Veränderungen im Wachstumsverhalten ließen sich bei Sphäroiden nach Koinkubation mit PBMCs nicht feststellen. Die Verteilung und das Infiltrationsausmaß der Immunzellen war unabhängig von der Herkunft der Spenderleukozyten. Insbesondere ließ sich kein Unterschied zwischen den PBMCs von gesunden Spendern und PBMCs aus buffy coats der Blutbank ausmachen.

### 3.3.5. Infiltrat nach Inkubation von Sphäroiden mit Leukozyten und BiUII

In den vorhergehenden Abschnitten wurde das Infiltrationsverhalten des bispezifischen Antikörpers bzw. der PBMCs jeweils alleine in Sphäroide beschrieben. Die Auswirkungen einer gleichzeitigen Inkubation der Tumorzell-Sphäroide mit PBMCs und dem bispezifischen Antikörper wurden in der folgenden Versuchsserie untersucht. Diese Tumorzell-Sphäroide wurden sowohl morphologisch (lichtmikroskopisch und histologisch) als auch funktionell analysiert (Abb. 3.11.):

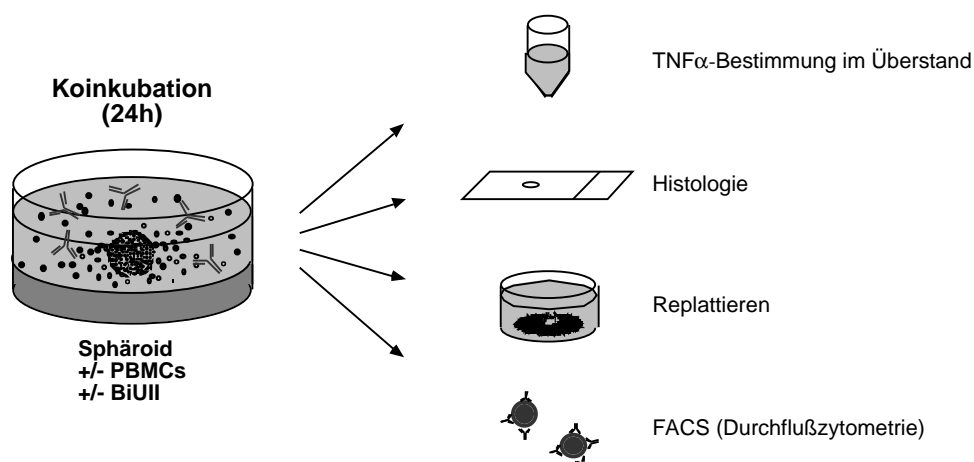


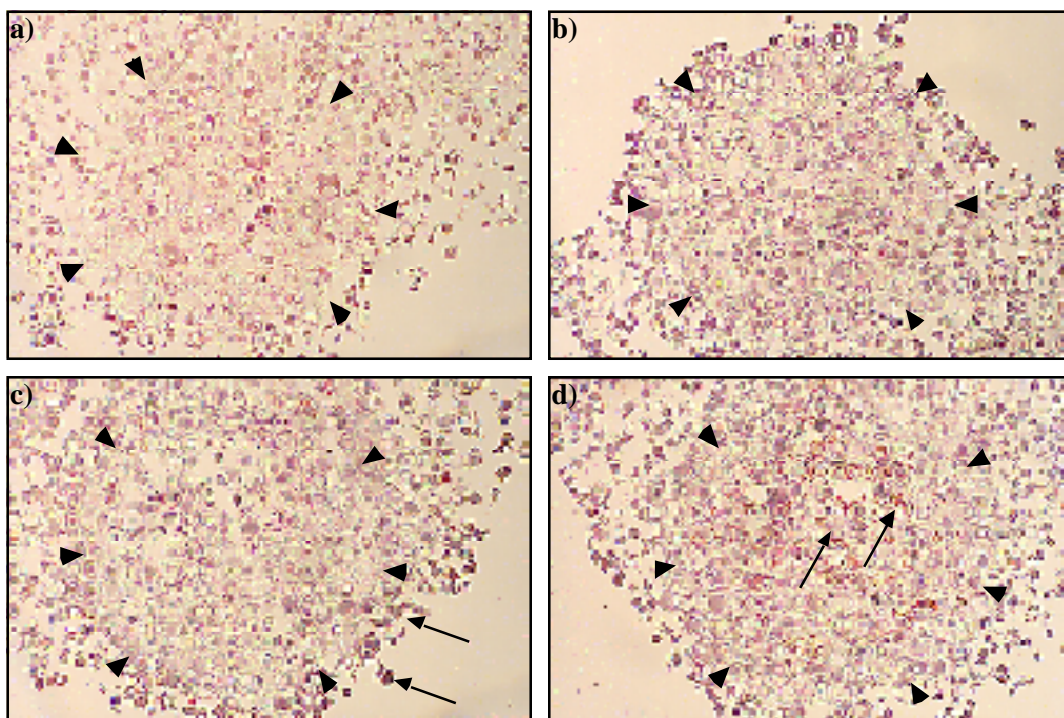
Abbildung 3.11.: Weiterverarbeitung von Tumorzell-Sphäroiden nach Kokultur mit PBMCs und BiUII.

Bei der histologischen Bearbeitung stand die Frage im Vordergrund, wie sich das zelluläre Infiltrat durch die zusätzliche Behandlung mit dem bispezifischen Antikörper BiUII verändert. Als Vergleich dienten die in Abschnitt 3.3.4. beschriebenen Experimente, bei denen die Sphäroide lediglich mit PBMCs inkubiert worden waren (Abb. 3.10.). Bei diesen Proben war es zu einer Infiltration der Effektorzellen gekommen, ohne dass das Sphäroid sich in seiner Struktur verändert hätte. Durch die Kokultur in Anwesenheit von BiUII ergab sich nun ein ganz anderes Bild:



Nach 24stündiger Kokultivierung hatten die Sphäroide ihre Kontur und die umgebende Hüllschicht verloren. Abbildung 3.12.a. zeigt einen repräsentativen Schnitt durch ein solches Tumorzell-Sphäroid. Die dicken Pfeile markieren die ungefähre Begrenzung des Sphäroids. In den umgebenden Bereichen sind anhängende Immunkzellen mit angeschnitten.

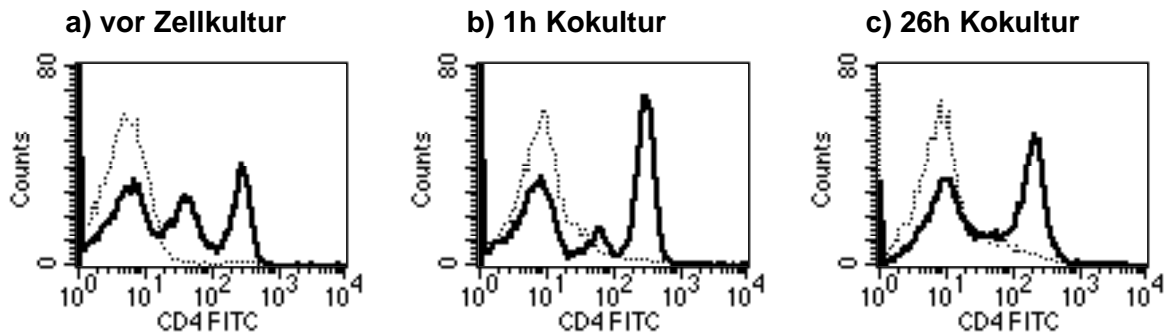
Das Immunzellinfiltrat hatte sich erheblich verändert: CD8-positive Zellen färbten sich vorwiegend am Sphäroid-Rand (Abb. 3.12.c.). Im Unterschied hierzu fanden sich monozytäre Zellen in großer Zahl im Zentrum des Sphäroids (Abb. 3.12.d.). Eine Färbung von CD4-positiven T-Zellen gelang nicht (Abb. 3.12.b.).



**Abbildung 3.12.: Infiltrationsverhalten von PBMCs in FaDu-Sphäroide in Anwesenheit von BiUII.** Die dicken Pfeile markieren die TCS-Ränder. **a)** HE-Färbung. **b)** CD4. **c)** CD8. **d)** CD68. (FaDu-TCS 3000 Zellen, 6h Inkubation, E:T 20:1, BiUII 100ng/ml, Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, Aminoethylcarbazol als Chromogen).

Besonders auffällig war, dass innerhalb der Sphäroide keine CD4-positiven Zellen zur Darstellung kamen. Es stellte sich die Frage, ob diese Population nicht in die Sphäroide einwandert, oder ob sie im Verlauf der Koinkubation zugrunde geht.

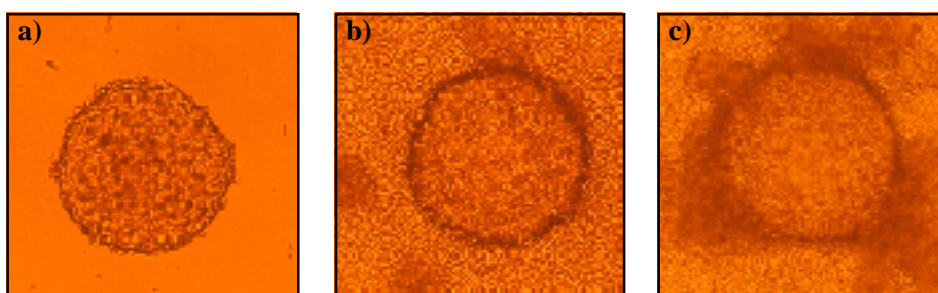
Um diesem Phänomen nachzugehen wurden diejenigen Immunzellen asserviert, die nicht in die Sphäroide eingewandert waren. Diese Zellen wurde mittels FACS-Analyse auf das Vorhandensein CD4-positiver Zellen untersucht. Wie Abbildung 3.13. zeigt, ließen sich auch nach 26 Stunden noch CD4-positive T-Zellen nachweisen. Warum diese Zellen nicht in die Sphäroide gelangen, ist bislang unklar.



**Abbildung 3.13.:** FACS-Analyse der nicht in die Sphäroide infiltrierten Immunzellen. CD4-positive Zellen lassen sich sowohl vor als auch nach 26 Stunden Kokultur (TCS+PBMC+BiUII) noch nachweisen.

### 3.3.6. Lichtmikroskopie nach Inkubation mit Leukozyten und BiUII

Zwischen Sphäroiden nach Inkubation mit BiUII (nicht gezeigt) und unbehandelten Sphäroiden (Abb. 3.14.a.) ließ sich lichtmikroskopisch kein Unterschied feststellen. Wurden Tumorzell-Sphäroide mit PBMCs koinkubiert, zeigte sich ein breiter, homogener Hof von Immunzellen um das Sphäroid (Abb. 3.14.b.). Nach gleichzeitiger Inkubation mit PBMCs und BiUII änderte sich die Verteilung der Immunzellen: Sie lagen nicht mehr als Hof um das TCS, sondern fanden sich in unregelmäßigen Klumpen konzentriert an der Sphäroidhülle (Abb. 3.14.c.).

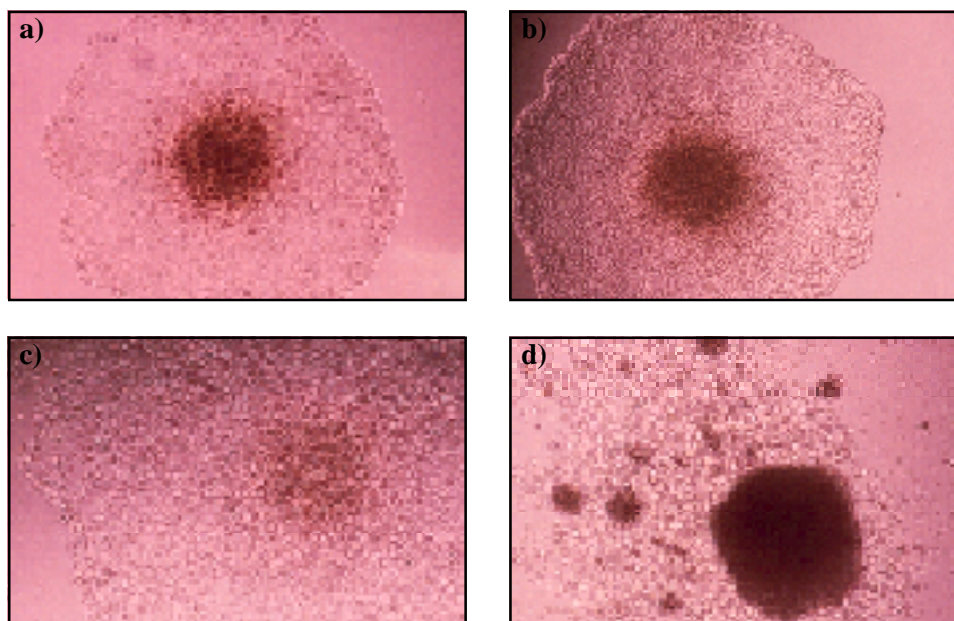


**Abbildung 3.14.:** Lichtmikroskopischer Vergleich von Sphäroiden. a) ohne Behandlung. b) Inkubation mit PBMCs. c) Inkubation mit PBMCs und BiUII. ( $3 \times 10^3$  Zellen, BiUII 500 ng/ml, E:T 20:1, Inkubationszeit 5h).

### 3.3.7. Funktionelle Effekte nach Inkubation mit Leukozyten und BiUll

Sphäroide können nach Umsetzen auf eine Flachboden-Kulturschale wieder als Monolayer-Rasen auswachsen (vgl. Abb. 2.3.). Diese Fähigkeit ist ein Zeichen ihrer erhaltenen funktionellen Vitalität. Je stärker die Schädigung eines Sphäroids z.B. durch eine antitumorale Behandlung ist, umso schwächer und langsamer fällt das Wiederauswachsen adhärenter Tumorzellen aus.

Mit dieser Methode untersuchten wir, ob die Koinkubation von Sphäroiden mit PBMCs und/oder BiUll zu einem Verlust dieser funktionellen Fähigkeit führt. Unbehandelte Sphäroide, Sphäroide nach Koinkubation mit BiUll, Sphäroide nach Koinkubation mit PBMCs und Sphäroide nach Koinkubation mit beiden Komponenten wurden parallel wiederausplattiert (Abbildung 3.15.).

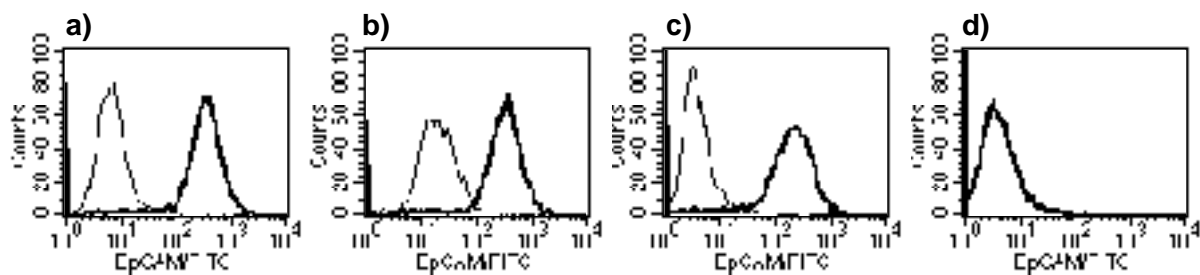


**Abbildung 3.15.: Wiederauswachsen adhärenter Monolayer-Zellen aus TCS nach unterschiedlicher Behandlung.** a) unbehandelt. b) Sphäroid+BiUll. c) Sphäroid+PBMCs. d) Sphäroid+PBMCs+BiUll. (3 Tage replattiert, BiUll 100 ng/ml, E:T 20:1, 5h inkubiert).

Die unbehandelten FaDu-Sphäroide und mit BiUll alleine inkubierten Sphäroide wuchsen nach drei Tagen deutlich wieder aus (Abb. 3.15.a./b.). Nach Inkubation von Sphäroiden mit PBMCs alleine (Abb. 3.15.c.) fand ebenfalls ein adhärentes Wachstum der Zellen statt. Der Hof auswachsender Zellen war noch etwas größer als in a) und b), die Zellen also proliferationsfreudiger.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen kam es nach gleichzeitiger Inkubation von Sphäroiden mit PBMCs und BiUII zu keinem Auswachsen von Tumorzellen (Abb. 3.25.d.). Die replattierten Sphäroide zeigten sich in diesem Fall zwar umgeben von einzelnen Zellen, die aber im Vergleich zu Tumorzellen deutlich kleiner waren und kaum auf der Kulturschale adhärten. Die Sphäroidzellen hatten also durch die kombinierte Behandlung mit BiUII und PBMCs unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen vollständig die Fähigkeit verloren, als Monolayer wieder auszuwachsen.

Die FACS-Analyse gegen EpCAM bestätigte, dass es sich bei den auswachsenden Zellen in 3.15.a.-c. tatsächlich um Tumorzellen handelte und dass in 3.15.d. keine vitalen Tumorzellen mehr vorhanden waren (Abb. 3.16.): In den ersten drei Ansätzen zeigte sich eine einheitliche Population EpCAM-positiver Zellen, während die Zellen in Probe d) für diese Färbung negativ waren.

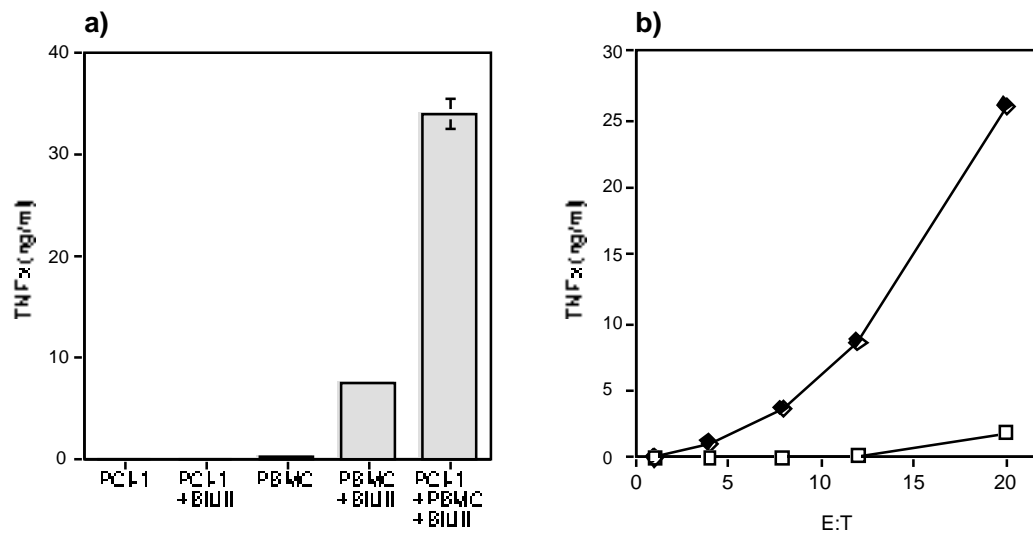


**Abbildung 3.16.:  $\alpha$ EpCAM-FACS-Analyse replattierter Sphäroide (7 Tage replattiert): a)** Auswachsen EpCAM-positiver Tumorzellen bei unbehandelten TCS. **b)** bei TCS+BiUII. **c)** bei TCS+PBMCs. **d)** Nach gleichzeitiger Inkubation des TCS mit BiUII und PBMCs wurden keine EpCAM-positiven Zellen nachgewiesen.

Schließlich sollte auch die Aktivierung der in diesen Kokultur-Experimenten eingesetzten PBMCs untersucht werden. Dazu wurden zellfreie Überstände asserviert und der Gehalt an biologisch aktivem  $\text{TNF}\alpha$  (als Zeichen der Aktivierung von Makrophagen) bestimmt (Abb. 3.17.a.).

Diese Experimente zeigten, dass weder Tumorzellen alleine noch PBMCs alleine nennenswerte Mengen  $\text{TNF}\alpha$  produzierten. Die Inkubation von Leukozyten mit BiUII (ohne Tumorzellen) dagegen zeigte bereits nachweisbare  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel. Bei der Inkubation von Tumorzell-Sphäroiden mit PBMCs in Anwesenheit von BiUII nahm die Zytokinmenge (also die Aktivierung der monozytären Zellen) erheblich zu.

Es ließ sich dabei ein direkter Zusammenhang zwischen der verwendeten Immunzell-Anzahl und dem Ausmaß der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion nachweisen (Abbildung 3.17.b.).



**Abbildung 3.17.:** Die TNF $\alpha$ -Produktion BiUll-aktivierter PBMCs wird durch die Anwesenheit von Target-Zellen gesteigert und ist abhängig von der Anzahl der eingesetzten PBMCs. **a)** Während Tumorzellen bzw. PBMCs alleine keine detektierbaren Mengen TNF $\alpha$  produzieren, führt die Zugabe von BiUll zu einer Aktivierung der monozytären Zellen, die in Anwesenheit geeigneter Zielzellen weiter zunimmt (PCI-1/PBMC 1:20, BiUll 100 ng/ml, Inkubation 1d in Flachbodenwells). **b)** Die TNF $\alpha$ -Produktion korreliert hierbei mit der Anzahl der eingesetzten Effektorzellen (FaDu-TCS mit  $3 \times 10^3$  Zellen, (◆) Inkubation mit BiUll 10 ng/ml, (□) Inkubation ohne BiUll).

## 4. Diskussion

### 4.1. Neue Strategien in der Tumorthherapie

Trotz verbesserter Therapiestrategien haben Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des HNO-Fachgebietes nach wie vor eine schlechte Prognose (Lingen *et al.*, 2000). Verschiedene Faktoren tragen dazu bei: Die meisten dieser Karzinome entwickeln sich auf dem Boden einer durch langjährigen Nikotin- und Alkoholabusus geschädigten Schleimhaut. So entstehen in diesem vorbelasteten Gewebe gehäuft Zweitkarzinome (Prinzip der Feldkanzerisierung, van Oijen und Slootweg, 2000). Andererseits wird der Verbleib disseminierter Tumorzellen und Mikrometastasen („minimal residual disease“) als Ursache für Rezidive von HNO-Karzinomen angesehen (Wollenberg *et al.*, 1994; Pantel, 1996; van Dongen *et al.*, 1996). Zusätzlich ist bekannt, dass bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen die antitumorale Immunkompetenz vermindert ist (Young *et al.*, 1996). Daher konzentrieren sich Forschungsprojekte der letzten Jahre auf die Entwicklung adjuvanter Therapiemöglichkeiten, die das Auftreten von Lokalrezidiven und lokoregionären Metastasen verringern und so die Prognose dieser Erkrankungen verbessern sollen. Verschiedene Wege der Immuntherapie, z.B. die Verwendung von Antikörpermolekülen, werden eingeschlagen (Ganly und Kaye, 2000), wobei sowohl monoklonale als auch bispezifische Antikörper getestet werden. Trotz vielversprechender *in vitro*-Ergebnisse gestaltet sich die Umsetzung von Antikörpertherapien *in vivo* problematisch, die *in vitro* beobachtete hohe antitumorale Effizienz lässt sich meist *in vivo* nicht erzielen (Talac und Nelson, 2000).

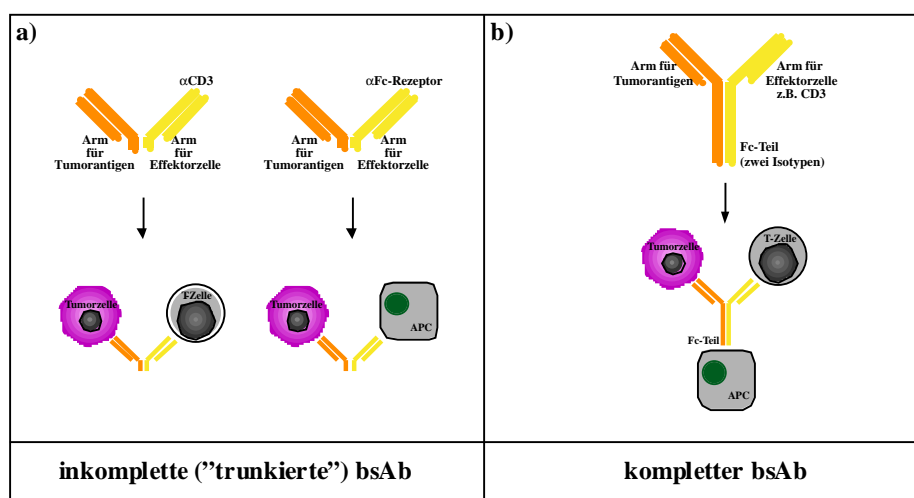
### 4.2. Konzept bispezifischer Antikörper

#### 4.2.1. Generelles Prinzip bispezifischer Antikörper

Bispezifische Antikörper sind Moleküle, die - anders als physiologische Antikörper - mit jedem der beiden variablen Arme ein anderes Antigen binden: einerseits werden Tumorzellen über ein tumorassoziiertes Antigen, andererseits Immuneffektorzellen über ein für ihren Zelltyp charakteristisches Oberflächenmolekül erkannt. Auf diese Weise dirigieren bispezifische Antikörper eine spezielle Immunzell-Subpopulation an Tumorzellen und induzieren eine immunologische Reaktion. Häufig verwendete Immunzellepitope sind CD16 bei NK-Zellen (Weiner *et al.*, 1995) oder CD64 bei

Monozyten (Chen *et al.*, 1995). Da T-Zellen als die wichtigsten Effektoren der antitumoralen Antwort gelten, wird von vielen Gruppen CD3 als Immuzellantigen eingesetzt (Ohmi *et al.*, 1999; Katzenwadel *et al.*, 2000). Meist werden CD3-Antikörper verwendet, die bei der Bindung an ihr Epitop gleichzeitig eine Aktivierung der T-Zelle bewirken.

Prinzipiell lassen sich bispezifische Antikörper in solche mit einem Fc-Teil („komplette bsAb“) und solche ohne Fc-Teil („trunkierte bsAb“) einteilen. Komplette bispezifische Antikörper ermöglichen über den Fc-Teil die zusätzliche Bindung einer zweiten Immuzell-Klasse, sind also trivalent (Abb. 1.3.b., Abb. 4.1.b.).



**Abbildung 4.1.:** Beispiele verschiedener bispezifischer Antikörper. **a) Inkomplette bispezifische Antikörper** dirigieren eine einzelne Immuzellart an Tumorzellen. **b) Komplette bispezifische Antikörper** sind trivalent und ermöglichen die Bindung zweier verschiedener Immuzell-Klassen.

Bei der klinischen Anwendung zeigen komplette bispezifische Antikörper zum Teil erstzunehmende Herz-Kreislauf-Wirkungen, die auf die Freisetzung ungewöhnlich hoher Zytokin-Mengen bei der Immuzellaktivierung zurückgeführt werden („cytokine release syndrome“). In schweren Fällen resultiert hieraus ein der Sepsis ähnlicher Symptomenkomplex, der als SIRS („systemic inflammatory release syndrome“) bezeichnet wird.

#### 4.2.2. Bispezifische Moleküle ohne kompletten Fc-Teil

Für das Auftreten solcher systemisch-toxischer Nebenwirkungen wurde insbesondere der Fc-Teil kompletter Antikörper verantwortlich gemacht (McCall *et al.*, 1999). Zur Vermeidung dieser Effekte wurden von verschiedenen Gruppen trunkierte Moleküle entwickelt, die keinen Fc-Teil besitzen (z.B. single-chain-Antikörper (Kufer *et al.*, 1997) oder Fab'-Fragmente (Elsässer *et al.*, 1999)). So soll das Ausmaß der



Zytokin-Sekretion - und damit das Risiko systemischer Nebenwirkungen - niedrig gehalten werden. Ob der Verzicht auf einen Fc-Teil diese Erwartung tatsächlich erfüllt, ist derzeit noch fraglich. Es gibt Hinweise dafür, dass auch inkomplette Antikörpermoleküle toxische Nebenwirkungen stärkeren Ausmaßes verursachen können. So wurde z.B. für ein F(ab')-Fragment mit den Spezifitäten EpCAMxCD3 eine erhebliche systemische Reaktion mit Vasokonstriktion, Dyspnoe und Fieber berichtet (Kroesen *et al.*, 1997), die mit der CD3-medierte T-Zell-Aktivierung begründet wurde. Offenbar ist die Auslösung von systemischen Nebenwirkungen nicht nur dem Fc-Teil kompletter bispezifischer Antikörper zuzuschreiben, sondern auch bei Aktivierung von T-Zellen über einen funktionell aktiven CD3-Arm möglich.

Die direkt zytotoxische, antitumorale Effizienz von Molekülen ohne kompletten Fc-Teil scheint im Vergleich zu kompletten Antikörpern geringer zu sein (Grosse-Hovest *et al.*, 1999; Clynes *et al.*, 2000), darüber hinaus gibt es bislang keine Berichte über die Induktion von Phagozytose oder eine langfristige humorale Immunantwort nach der Anwendung trunkierter Antikörper, zwei Argumente, die für die Verwendung kompletter bispezifischer Antikörper sprechen.

Von der zweitgenannten Einschränkung sind diejenigen inkompletten bispezifischen Antikörper ausgenommen, die als Immuzellantigen einen Fc-Rezeptor binden (Abb. 4.1.a., z.B. Wallace *et al.*, 2000). Sie können APCs für die Immunreaktion rekrutieren, so dass eine humorale Immunantwort entsteht (Renner *et al.*, 2000), verzichten aber gleichzeitig auf eine antikörpervermittelte T-Zell-Aktivierung.

#### **4.2.3. Komplette bispezifische Antikörper**

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise dafür, dass insbesondere bei bispezifischen Antikörpern, deren Immuzellarm sich gegen CD3 richtet, ein kompletter Fc-Teil von entscheidender Bedeutung ist. So verglich Weiner zwei Antikörpermoleküle mit gleicher Spezifität, die sich lediglich im Vorhandensein eines Fc-Teils unterschieden. Er konnte im Mausmodell zeigen, dass der komplette Antikörper bereits nach einmaliger Gabe zu einer effizienten Hemmung des Tumorwachstums führte. Für das entsprechende F(ab')<sub>2</sub>-Fragment war eine wiederholte Anwendung bzw. eine gleichzeitige Gabe von T-Zell-Aktivatoren notwendig, um einen vergleichbaren Effekt zu erreichen (Weiner *et al.*, 1994).

Zudem wurde berichtet, dass T-Zellen mit Anergie oder Apoptose reagieren können, wenn sie lediglich über CD3 aktiviert werden, eine gleichzeitige Interaktion des Fc-



Teils mit einem Fc-Rezeptor jedoch ausbleibt („activation-induced anergy“, Daniel *et al.*, 1998, Carpenter *et al.*, 2000).

Diesen Problemen begegnen komplette bispezifische Antikörper wie BiUII, die zusätzlich zu den spezifischen Armen auch Fc-Rezeptor-positive Zellen binden können. Hieraus resultieren sogenannte „Tri-Zell-Komplexe“, die ein breites Netzwerk immunologischer Effekte erlauben (Abb. 1.4.) und damit einer Immunreaktion *in vivo* näher kommen, als bei Verwendung nur einer Effektorpopulation.

Grundvoraussetzung für eine möglichst effiziente immunologische Reaktion nach BiUII-Anwendung ist also, dass jede einzelne der möglichen Zellverbindungen eingegangen wird.

Daher war zunächst das Ziel der Untersuchungen, die BiUII-vermittelten Zell-Zell-Kontakte *in vitro* zu beschreiben. Mit immunzytochemischen Untersuchungen konnten wir folgende Bindungseigenschaften zeigen:

- BiUII vermittelt engen Kontakt zwischen Tumorzellen und Zellen des Immunsystems (Abb. 3.2.) und lässt sich an diesen Kontaktstellen nachweisen (Abb. 3.3).
- Diese BiUII-induzierten Kontakte treten sowohl zwischen Tumor- und T-Zellen (CD4- und CD8-positiv) als auch zwischen Tumorzellen und monozytären Zellen auf (Abb. 3.4.a.-c.).
- *In vitro* ist die Ausbildung und die Darstellung von BiUII-vermittelten Tri-Zell-Komplexen möglich (Abb. 3.5.).

Diese Untersuchungen belegen die postulierten Bindungseigenschaften als grundlegende Voraussetzung für eine effiziente Wirkungsweise von BiUII.

#### **4.2.3.1. Bedeutung der Isotypzusammensetzung**

Die Isotypzusammensetzung des Fc-Teils bestimmt, an welchen Fc-Rezeptor ein Antikörper bindet. Da verschiedene Fc-Rezeptoren verschiedene Effekte vermitteln (Aktivierung oder Inhibition), entscheidet die Wahl der Isotypzusammensetzung über die immunologischen Auswirkungen und damit z.B. über die Effizienz bispezifischer Antikörper.

Von den IgG-bindenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren vermitteln Fc $\gamma$ -RI und Fc $\gamma$ -RIII eine Aktivierung, während die Bindung an Fc $\gamma$ -RII zu einem inhibitorischen Effekt führt (vgl. Tabelle 4.1.)

	<b>Expression auf</b>	<b>Effekt</b>	<b>Isotypbindung</b>
Fc $\gamma$ -RI=CD64	Monozyten, Makrophagen	Aktivierung	IgG2a, IgG2b „high affinity“
Fc $\gamma$ -RII=CD32	Granulozyten, Makrophagen, B-Zellen u.a.	Inhibierung	IgG1
Fc $\gamma$ -RIII=CD16	NK-Zellen, Makrophagen	Aktivierung	IgG2a, IgG2b „low affinity“

**Tabelle 4.1.: Verteilung und Funktion der verschiedenen Fc $\gamma$ -Rezeptoren.**

Die meisten bispezifischen Antikörper setzen sich aus einem IgG1- und einem IgG2-Teil oder aus zwei IgG1-Isotypen zusammen (jeweils Maus oder Ratte, z.B. Hombach *et al.*, 1993). IgG1 bindet an den inhibitorischen humanen Fc $\gamma$ -RII-Rezeptor (Ceuppens und van Vaeck, 1989) und zeigt wegen der fehlenden Aktivierung oder sogar Inhibition der so gebundenen akzessorischen Zelle eine geringe antitumorale Effizienz (Clynes *et al.*, 2000). IgG2a und IgG2b binden überwiegend an den „high affinity“ Fc $\gamma$ -RI-Rezeptor und vermitteln so eine Aktivierung von Monozyten/Makrophagen (Mack *et al.*, 1995).

Aufgrund dieser Vorkenntnisse wurden in dieser Arbeit weitere Versuche durchgeführt, die den Einfluss von BiUII auf die Aktivierung von Immunzellen näher beschreiben sollten.

#### **4.2.3.2. Immunstimulatorische Effekte durch BiUII**

Aus Vorarbeiten in unserem Labor sind folgende Daten zur Aktivierung von Immunzellen durch BiUII bekannt (Zeidler *et al.*, 2000a):

Der bispezifische Antikörper BiUII (Maus IgG2a / Ratte IgG2b) bindet an Monozyten und NK-Zellen (Fc $\gamma$ -RI- bzw. Fc $\gamma$ -RIII-positiv), nicht jedoch an Fc $\gamma$ -RII-positive Zellen. Aus dieser Bindung resultiert eine Aktivierung von Monozyten/Makrophagen, die sich z.B. an der Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  zeigen lässt (Zeidler *et al.*, 1999; Zeidler *et al.*, 2001).

BiUII induziert *in vitro* eine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD86) und Aktivierungsmarkern (z.B. CD83) auf dendritischen Zellen.

Die Aktivierung akzessorischer Zellen durch BiUII *in vitro* benötigt keine Zugabe exogener Zytokine. Im Gegensatz hierzu berichtete Klein von einem Antikörper der Zusammensetzung murines IgG1/ Ratte IgG2b (anti-CD3 x anti-CD19), der bei *in vitro*-Versuchen erst nach Zugabe von exogenem IL-2 eine maximale antitumorale

Aktivität erreichte (Klein *et al.*, 1997) und *in vivo* keine Zeichen einer Aktivierung akzessorischer Zellen zeigte (de Gast *et al.*, 1995).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden weitere Experimente durchgeführt, die direkt oder indirekt eine Aktivierung von Immunzellen belegen konnten:

- BiUIII bewirkt an Zellsuspensionen eine ausgesprochen effiziente Tumorzell-elimination, die in dieser Arbeit erstmals auch in dem komplexeren dreidimensionalen Sphäroidmodell beschrieben werden konnte.
- Immunzytochemisch ließen sich nach 12-stündiger Koinkubation intrazelluläre Einschlüsse in Makrophagen morphologisch darstellen, die für eine Elimination von Tumorzellen über antikörpervermittelte Phagozytose sprechen (Abb. 3.7.b.). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung zu früheren FACS-Experimenten, in denen BiUIII CD14-positive Zellen (=Fc $\gamma$ -RI-positive Zellen) zur direkten Phagozytose von Tumorzellen stimulierte (Zeidler *et al.*, 2000a).
- T-Zellen bilden Cluster von CD3 an der Zellmembran (Abb. 3.7.a.). Diese Beobachtung ist als Zeichen einer funktionellen Stimulierung der T-Zellen zu werten.
- Die in dieser Arbeit gezeigte TNF $\alpha$ -Induktion ist Ausdruck einer ausgeprägten Aktivierung professioneller APCs durch BiUIII (Abb. 3.17.).

Die hier vorgelegten Untersuchungen liefern also weitere Daten, die zeigen, dass BiUIII *in vitro* eine erhebliche Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen bewirkt und eine sehr effiziente Tumorzellelimination induziert.

#### **4.2.3.3. Limitationen für den Einsatz kompletter bispezifischer Antikörper**

Eine Limitation für den klinischen Einsatz kompletter bispezifischer Antikörper ist die bereits beschriebene erhebliche Toxizität bei systemischer Anwendung (z.B. Kroesen *et al.*, 1997). Die Ursachen für dieses Phänomen sind noch nicht endgültig geklärt, zumeist wird die Aktivierung akzessorischer Zellen über die Fc-Teil-Fc-Rezeptor-Interaktion als verantwortlich angesehen. Für Immuntherapien, die CD3 als spezifisches Immunzelltarget einsetzen, wird zusätzlich eine überschießende antikörpervermittelte T-Zell-Aktivierung als Auslöser vermutet (Tibben *et al.*, 1996; Link *et al.*, 1998). Auch die hier gezeigten Versuche weisen auf eine massive Aktivierung solcher Mechanismen hin.

Möglicherweise würde durch eine geeignete Komedikation die klinische Anwendung komplikationsärmer verlaufen. So zeigen erste *in vitro*-Untersuchungen, dass sich die

ausgeprägte TNF $\alpha$ -Produktion bei den Kokultur-Experimenten (siehe Abb. 3.17.) durch eine gleichzeitige Zugabe von Prednisolon erheblich reduzieren lässt, ohne die Effizienz der Tumorzellelimination wesentlich zu vermindern (Daten nicht gezeigt). Andererseits werden gerade auch Mechanismen wie die Freisetzung von Zytokinen oder Perforinen/ Granzymen als wesentlich für eine Aktivierung des Immunsystems *in vivo* und eine effiziente Tumorzellzerstörung angesehen („bystander effect“). Die Grenze zwischen erwünschtem Effekt und unerwünschter Nebenwirkung ist hier nicht eindeutig zu definieren. Durch die Gabe einer Komedikation, die die Nebenwirkungen einschränkt, würde man sich also möglicherweise eine verminderte Effizienz der Therapie erkaufen.

Ein weiterer kritischer Aspekt für die klinische Anwendung ist die Frage, wie sich bispezifische Antikörper bei intravenöser Gabe im Organismus verteilen. Es ist außerordentlich schwierig, das Verteilungsmuster *in vivo* zu untersuchen. Die Mehrzahl der Daten zur Biodistribution von therapeutischen Antikörpern wurde an xenotransplantierten Tieren erhoben, sie repräsentieren die Situation im humanen Organismus nur zum Teil (Hosono *et al.*, 1998). Für Antikörper wie BiUII ist aufgrund des CD3-Arms ein quantitatives „Abgreifen“ durch zirkulierende Lymphozyten vor dem Erreichen von Tumorzellen als wahrscheinlich anzunehmen. So zeigten Tibben *et al.* in FACS-Analysen, dass unmittelbar nach Gabe eines bispezifischen Antikörpers mit  $\alpha$ CD3-Arm alle peripheren T-Zellen das Molekül gebunden hatten (Tibben *et al.*, 1996). Aufgrund des kompletten Fc-Teils ist bei BiUII darüber hinaus auch eine Bindung an akzessorische Zellen bereits in der Blutbahn wahrscheinlich. Bei der i.v.-Anwendung eines solchen Moleküls muss man also zumindest mit der Möglichkeit rechnen, dass T-Zellen und Fc-Rezeptor-positive Zellen über den bispezifischen Antikörper aneinander gebunden werden und es zu einer intravasalen „Verklumpung“ und gleichzeitigen nicht-antigenspezifischen Aktivierung dieser Immunzellen kommt. Das wäre eine Erklärung für die beobachtete Leukopenie wenige Stunden nach i.v.-Gabe von BiUII (Wollenberg, manuscript in preparation). Es ist also fraglich, ob der Antikörper sein Ziel, die Tumorzellen, bei i.v.-Gabe überhaupt erreichen kann.

Für künftige Studien erscheinen daher Protokolle mit einer anderen als der intravenösen Applikation von besonderer Attraktivität. Bei Ovarialkarzinomen gibt es bereits ermutigende Ergebnisse bei intraperitonealer Anwendung. Die bei i.v.-Gabe beobachteten systemischen Nebenwirkungen bispezifischer Antikörper bleiben bei intraperitonealer Anwendung größtenteils aus (Lamers *et al.*, 1997). Im HNO-Bereich

würde sich aufgrund der guten Zugänglichkeit der Karzinome eine intratumorale Injektion anbieten, bislang gibt es jedoch kaum Berichte über ein solches Vorgehen (Manzke *et al.*, 2001), so dass die Frage des therapeutischen Effektes und der Nebenwirkungen derzeit noch offen bleibt.

Bei mehrfachem Einsatz von kompletten bispezifischen Antikörpern besteht das Risiko einer HAMA- oder HARA-Reaktion (**h**uman **a**nti **m**urine/**r**at **a**ntibodies), d.h. die Ausbildung von Antikörpern gegen den als Fremdprotein erkannten bispezifischen Antikörper. Im Rahmen zweier klinischer Studien kam es beispielsweise zu einer HAMA-Reaktion bei 6 von 13 (Renner *et al.*, 2000), bzw. 14 von 15 Patienten (Weiner *et al.*, 1995). Für den in dieser Arbeit untersuchten Antikörper BiUII wurde in einer Phase I-Studie das Auftreten einer HAMA-Reaktion bei 3 von 11 Patienten beobachtet (Wollenberg, manuscript in preparation).

Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich nicht festlegen, ob die Verwendung kompletter oder trunkierter bispezifischer Antikörper den größeren klinischen Erfolg bringen wird. Vor dem Hintergrund der Bedeutung einer simultanen Aktivierung mehrerer Effektorzell-Klassen erscheint es uns sinnvoller, das Problem der systemischen *in-vivo*-Toxizität eher über eine sehr sorgfältige Dosisfindung und alternative Applikationsformen (z.B. intraperitoneal/intratumoral) sowie ggf. eine geeignete Komedikation zu umgehen, als auf den Fc-Teil des Moleküls zu verzichten.

### 4.3. Dreidimensionale Zellkultursysteme

Übliche Zellkultur-Untersuchungen verwenden adhärent wachsende Monolayer. Dieses zweidimensionale System kann für viele Fragestellungen wertvolle Ergebnisse liefern. Es ist jedoch artifiziell, von den Gegebenheiten *in vivo* weit entfernt und daher in seiner Aussagefähigkeit eingeschränkt. Daraus ergibt sich die Suche nach geeigneten dreidimensionalen Versuchssystemen, die die „Wirklichkeit“ *in vivo* besser repräsentieren.

Es stehen unterschiedliche Verfahren dreidimensionaler Zellkultivierung zur Verfügung, die sich in Morphologie und biologischem Verhalten der komplexen *in vivo*-Situation annähern (Müller-Klieser, 1997). Tumorzell-Sphäroide (TCS, Sutherland, 1988) sind das in der onkologischen Forschung am häufigsten verwendete dreidimensionale Tumor-Modell. Solche Sphäroide sind in vielen Eigenschaften Geweben *in vivo* vergleichbar, erlauben aber andererseits Untersuchungen in einem weniger komplexen und zuverlässig reproduzierbaren Rahmen (Kunz-Schughart *et*

*al.*, 1998). Aufgrund ihrer Struktur finden sie insbesondere als Modell für nicht-vaskularisierte Mikrometastasen und intervaskuläre Regionen in soliden Tumoren Anwendung. So werden TCS für die Testung verschiedenster antitumoraler Therapien wie z.B. Bestrahlungsregimen (Santini *et al.*, 1999), Radioimmuntherapien (Essand *et al.*, 1995) u.a. eingesetzt und eignen sich auch für grundlegende Experimente zum Wirkmechanismus therapeutischer Antikörper (Gabler *et al.*, 1997; Fracasso und Colombatti, 2000).

#### 4.3.1. Eigenschaften von Sphäroidzellen

Die in der Literatur beschriebenen Sphäroide wurden aus den unterschiedlichsten Tumorzelllinien generiert. Entsprechend unterschiedlich sind auch ihre Eigenschaften. Es gibt jedoch einige Merkmale, die für Sphäroid-Zellen allgemein gelten:

- Sphäroid-Zellen erweisen sich - verglichen mit Monolayer-Zellen - oft als resistent gegenüber einer Behandlung mit antitumoralen Substanzen (Hamilton, 1998; Desoize und Jardillier, 2000). Dieses Phänomen wird als „multicellular resistance“ bezeichnet (Green *et al.*, 1999).
- Zellen im Sphäroidverband bilden untereinander Strukturen wie z.B. Desmosomen oder tight junctions aus (Ballangrud *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 1999). Die Ausbildung solcher Kontaktstrukturen trägt zu der interzellulären Kommunikation bei. Hierin liegt eine mögliche Erklärung für das veränderte Verhalten von Sphäroiden gegenüber antitumoralen Substanzen (Olive und Durand, 1994).
- TCS-Zellen zeigen - abhängig von ihrer Position innerhalb des Sphäroidverbandes - spezielle morphologische Differenzierungen. Im Zentrum der Sphäroide lässt sich ein Kern kleiner, nicht proliferierender Zellen beobachten (Freyer, 1998). Ab einer gewissen Größe oder Kultivierungsdauer bilden sich im Sphäroid-Inneren Nekrosen aus (Romero *et al.*, 1997). Die äußeren Zellen sind dagegen größer und weisen Mitosen auf (Desoize *et al.*, 1998).
- Sauer *et al.* zeigten einen Gradienten in der metabolischen Aktivität von Sphäroid-Zellen (Sauer *et al.*, 1998), Freyer belegte eine Verminderung der Mitochondrien-Aktivität, je tiefere Sphäroid-Schichten erreicht wurden (Freyer, 1998).
- Auf molekularer Ebene findet sich eine differentielle Expression verschiedener Proteine mit funktioneller Bedeutung (z.B. von Adhäsionsmolekülen und proliferationsassoziierten Proteinen; LaRue *et al.*, 1998; Rainaldi *et al.*, 1999).

Tumorzell-Sphäroide sind also nicht homogene Gebilde bestehend aus vielen gleichförmigen Zellen, sondern weisen vielmehr eine komplex differenzierte dreidimensionale Struktur auf.

Die morphologische Charakterisierung der von uns verwendeten Tumorzell-Sphäroide zeigte in den grundlegenden Eigenschaften eine gute Übereinstimmung zu den in der Literatur beschriebenen Modellen (Daten nicht gezeigt): Es fand sich eine Differenzierung in kleinere Zellen im Zentrum und größere Zellen am Rand des Sphäroids. In den Außenbereichen waren Mitosen zu beobachten. Ein nekrotischer Kern bildete sich nach etwa fünf Tagen Kultivierung.

#### 4.3.2. Penetration von Antikörpern in Sphäroide

Solide Tumoren und unvascularisierte Mikrometastasen *in vivo* werden von Antikörpermolekülen in nur geringem Ausmaß penetriert (Juweid *et al.*, 1992; Saga *et al.*, 1995). Die Verteilung im Tumorgewebe zeigt dabei ein inhomogenes Muster. Folgende Ursachen werden für diese Phänomene diskutiert (Übersicht bei Jain, 1990):

- Antikörper mit hohem Molekulargewicht (z.B. intakte Antikörpermoleküle) diffundieren langsam in Tumorgewebe, kleinere Moleküle zeigen (z.B. F(ab)-Fragmente) eine höhere Diffusionsrate (Lane *et al.*, 1994).
- Tumoren mit starker Vaskularisation und gleichzeitig geringer Lymphdrainage zeigen gegenüber Normalgewebe einen erhöhten interstitiellen Druck. Dadurch ist die Diffusion von Antikörpern in das Tumorgewebe erschwert (Flessner und Dedrick, 1998).
- Innerhalb eines Tumors ist die Verteilung eines Ziel-Antigens heterogen, entsprechend ungleichmäßig ist die Verteilung des spezifischen Antikörpers.
- In einem soliden Tumor gibt es Regionen unterschiedlich starker Vaskularisation. Hierdurch ist das „Anfluten“ therapeutischer Antikörper nicht in allen Bereichen in gleichem Ausmaß gegeben.
- Je höher die Expression des Ziel-Antigens auf den Tumorzellen ausfällt und je stärker die Affinität eines Antikörpers zu seinem Epitop ist, umso mehr Antikörpermoleküle werden bereits in gefäßnahen Regionen „abgefangen“. So steht für Areale in weiterer Entfernung von den versorgenden Blutgefäßen weniger Antikörper zur Verfügung („binding site barrier“-Hypothese, Weinstein *et al.*, 1987).

Für **Sphäroide** konnten ähnliche Bedingungen für die Penetration von Antikörpermolekülen gezeigt werden:

Die Eindringtiefe monoklonaler Antikörper hängt maßgeblich vom Molekulargewicht des eingesetzten Makromoleküls ab. Sutherland *et al.* beschrieben zum Beispiel, dass komplette Antikörper weniger tief in Sphäroide penetrieren als F(ab')<sub>2</sub>- und Fab'-Fragmente derselben Spezifität (Sutherland *et al.*, 1987).

Olabiran *et al.* zeigten, dass das Ausmaß der Diffusion in TCS auch von der eingesetzten Antikörper-Konzentration abhängt (Olabiran *et al.*, 1994).

Die Arbeit von Langmuir und Mitarbeitern weist darauf hin, dass eine hohe Expression des spezifischen Antigens die Sphäroid-Penetration eines Antikörpers verlangsamt (Langmuir *et al.*, 1991) und Hjelstuen *et al.* belegten, dass ein Antikörper umso langsamer in ein Sphäroid gelangt, je höher seine Affinität zu dem spezifischen Antigen ist (Hjelstuen *et al.*, 1998).

Der Vergleich zeigt, dass sich Tumorzell-Sphäroide in diesen Eigenschaften sehr ähnlich wie primäre Tumoren *in vivo* verhalten. Auch in Hinblick auf diesen Aspekt erscheinen sie daher als ein geeignetes Modell, um das Verhalten eines bispezifischen Antikörpers *in vitro* zu untersuchen.

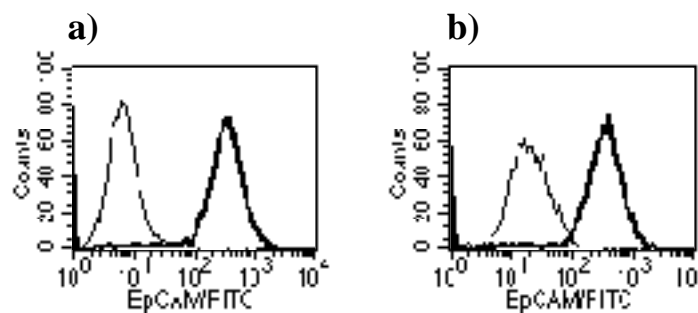
Für den bispezifischen Antikörper **BiUII** konnten wir mit immunhistochemischen Methoden ein Eindringen in die äußeren Zellschichten der Sphäroide zeigen (Abbildung 3.9.c.). Es wurden drei bis fünf Zellschichten erreicht. In den tieferen Arealen ließ sich der Antikörper nicht mehr nachweisen. Das Färbemuster zeigte eine wabenförmige membranständige Verteilung an den Tumorzellen entsprechend der Expression des spezifischen Antigens EpCAM. Die beobachtete geringe Penetrationstiefe ist in Übereinstimmung mit den oben genannten Daten aus der Literatur. In der hier verwendeten Versuchskonstellation sind unterschiedliche Erklärungen für dieses Phänomen möglich:

Die verwendeten Zellen zeigen eine starke EpCAM-Expression (vgl. Abb. 3.1.), so ist es wahrscheinlich, dass der bispezifische Antikörper - entsprechend der „binding-site-barrier“-Hypothese - bereits in den äußersten Bereichen des Sphäroids komplett „abgefangen“ wird. Zu erwähnen ist allerdings, dass das für BiUII spezifische Antigen EpCAM gerade am Rand der Sphäroide in geringerer Menge exprimiert wird als in den tieferen Schichten. Wahrscheinlich ist jedoch die EpCAM-Expression dennoch hoch genug, um alle Antikörpermoleküle abzufangen, bzw. die eingesetzte



Antikörper-Konzentration zu gering, um ein tieferes Eindringen zu ermöglichen. Hierbei wurde die verwendete BiUII-Menge (100 ng/ml) so gewählt, dass sie einer Serumkonzentration bei i.v.-Gabe *in vivo* vergleichbar ist.

BiUII ist ein bispezifischer Antikörper mit komplettem Fc-Teil, also ein vergleichsweise großes Molekül und weist eine hohe Bindungsaffinität an EpCAM auf. Hinweise für diese hohe Bindungsaffinität von BiUII ergeben sich z.B. aus den FACS-Analysen der replattierten Sphäroide (Abb. 3.16., Abb. 4.2.): Der Vergleich der Proben ohne (a) und mit (b) BiUII zeigt eine Verschiebung der Isotypkontrolle (dünn gezeichnete Linie) nach rechts, d.h., der Sekundärantikörper erkennt zusätzlich zu dem unspezifischen Hintergrund (Isotypkontrolle in Abbildung 3.16.a.) murines Immunglobulin auf den Tumorzellen, der bispezifische Antikörper ist also auch nach achttägiger Inkubation noch in nachweisbaren Mengen auf der Membran der Tumorzellen gebunden.



**Abbildung 4.2.: Rechtsverschiebung der Isotypkontrolle bei FACS-Analyse replattierter FaDu-Sphäroide. a) ohne bsAb. b) nach Inkubation mit BiUII (1d), jeweils acht Tage replattiert.**

#### 4.3.3. Infiltration von Immunzellen in Sphäroide

Über das Infiltrationsverhalten von Immunzellen in Tumorzell-Sphäroide gibt es nur wenige Berichte in der Literatur. Beschrieben ist, dass unstimulierte PBLs nur in geringem Ausmaß in Sphäroide gelangen (Iwasaki *et al.*, 1990). Konur *et al.* zeigten das Einwandern von Monozyten (Konur *et al.*, 1996), für LAK- und NK-Zellen gibt es ähnliche Daten (Jaaskelainen *et al.*, 1989; Whiteside *et al.*, 1998). Es handelt sich hier jedoch um einzelne Beobachtungen, eine Verallgemeinerung ist aufgrund der verschiedenen verwendeten Tumorzelllinien und der unterschiedlichen Vorbehandlungen der Immuneffektorzellen nicht möglich.

In den hier gezeigten Experimenten wurden unstimulierte Gesamt-Leukozyten des peripheren Blutes zu vorgeformten Sphäroiden gegeben. Wir konnten beobachten,

dass sowohl Monozyten/Makrophagen als auch T-Zellen ohne vorhergehende Aktivierung in die Sphäroide einwanderten. Auffälligerweise erreichten T-Zellen (sowohl CD4- als auch CD8-positive) eine nur geringe Infiltrationsrate, während monozytäre Zellen deutlich häufiger ihren Weg in das Sphäroid fanden (vgl. Abb. 3.10.).

Aufgrund der hier beschriebenen allogenen Situation erwarteten wir eine gewisse Reaktivität der PBMCs gegen die Tumorzellen. Es fanden sich jedoch bei der Kokultivierung von Sphäroiden mit unstimulierten PBMCs keine Zeichen einer Zerstörung oder eines Vitalitätsverlustes der Tumorzellen. Die Verwendung von PBMCs unterschiedlicher Spender zeigte keine wesentlichen Schwankungen im Infiltrationsverhalten der Leukozyten. Die Replattierungs-Experimente (Abbildung 3.15.) zeigten vielmehr eine deutlich verstärkte Proliferation der Tumorzellen nach Inkubation mit allogenen PBMCs. Welche Faktoren diesem wachstumsfördernden Phänomen zugrunde liegen, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

Die beschriebenen Beobachtungen zeichnen kein getreues Bild der „Wirklichkeit“ *in vivo*. Die Experimente beschreiben eine allogene Situation, *in vivo* treten jedoch körpereigene Effektorzellen in Kontakt mit den Tumorzellen. Zum anderen beeinflussen *in vivo* eine Vielzahl von lokalen Faktoren die Art des Kontaktes zwischen Tumorzellen und Immunzellen (z.B. Extrazelluläre Matrix, lösliche, immunsuppressive Faktoren von Tumor- oder Stromazellen u.v.m.), die in dem hier beschriebenen *in vitro*-Modell nicht nachgestellt werden können.

#### **4.3.4. Wirkungsweise von BiUII am System der Sphäroide**

Nach den Beobachtungen an Einzelzellen und der Etablierung des Sphäroid-Modells wurden in der vorliegenden Arbeit diejenigen Effekte untersucht, die bei gleichzeitiger Gabe von BiUII und PBMCs zu Tumorzell-Sphäroiden zu beobachten waren (zum experimentellen Aufbau vgl. Abb. 3.11.).

Abbildung 3.14. zeigt, dass bereits nach wenigen Stunden lichtmikroskopisch eine Verklumpung der PBMCs um das Sphäroid zu erkennen war. Bei der Weiterbearbeitung zeichneten sich diese Sphäroide durch eine ausgeprägte „Fragilität“ aus, sie brachen sehr leicht auseinander. Nur mit großer Vorsicht war z.B. ein Einbetten dieser TCS *in toto* für histologische Untersuchungen möglich. Bei Replattierungsversuchen wuchsen keine vitale Tumorzellen mehr aus (Abb. 3.15.d.). Parallel zu den Replattierungsversuchen wurden FACS-Analysen durchgeführt (Abb. 3.16.), die

zeigten, dass bereits zum Zeitpunkt des Replattierens alle Tumorzellen im Sphäroid avital waren.

In den korrespondierenden immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine erhebliche Steigerung des Immunzell-Infiltrates, die Struktur der Sphäroide war nur noch andeutungsweise zu erkennen, intakte Tumorzellen ließen sich nicht mehr nachweisen (Abb. 3.12.).

Passend zu diesen Beobachtungen wiesen die Daten aus den TNF $\alpha$ -Bioassays auf eine ausgeprägte Aktivierung der Immunzellen in den Kokultur-Experimenten hin (Abb. 3.17.). Die Koinkubation von TCS mit PBMCs in Anwesenheit von BiUII führte zu einer 4,5-fachen Steigerung der TNF $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zu der Inkubation von PBMCs mit dem bispezifischen Antikörper.

Interessanterweise zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen eine definierte Verteilung der Effektorzellen im Sphäroid nach Applikation von BiUII. Monozytäre Zellen ließen sich vor allem im Zentrum der Sphäroide färben, CD8-positive T-Zellen fanden sich nahezu ausschließlich an der Sphäroid-Peripherie. Die Darstellung CD4-positiver Zellen gelang nicht.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen das Modell der TCS als geeignetes System, immunologische Effekte bispezifischer Antikörper in einem dreidimensionalen Kontext zu untersuchen. Der bispezifische Antikörper BiUII zeichnet sich dabei durch eine äußerst hohe antitumorale Effizienz sowohl in Suspensionen als auch im Sphäroid-Modell aus.

In zukünftigen Untersuchungen sollen die Mechanismen der Tumorzellzerstörung in Sphäroiden weiter aufgeschlüsselt und detaillierter beschrieben werden.

Insbesondere zur Vermeidung alloreaktiver Effekte ist die Generierung von Sphäroiden aus Primärmaterial geplant. Dies würde eine individuelle Testung des einzelnen Patienten mit eigenen (autologen) PBMCs ermöglichen und der *in vivo* Situation ein weiteres Stück näher kommen. Gerade bei der guten Zugänglichkeit von Tumoren im HNO-Gebiet scheint dies eine attraktive Vorgehensweise sowohl für Forschungszwecke als auch für die präklinische Testung bispezifischer Antikörper zu sein.

## 5. Zusammenfassung

Da die Prognose für Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen trotz Verbesserung der chirurgischen und strahlen- bzw. chemotherapeutischen Strategien unverändert schlecht ist, werden vermehrt immunologische Therapieansätze erforscht, die eine systemisch wirksame und gleichzeitig tumorspezifische Behandlung ermöglichen sollen. Dadurch soll die Häufigkeit von Lokalrezidiven und Metastasen gesenkt werden.

Bispezifische Antikörper werden in diesem Zusammenhang als vielversprechende Therapieoption angesehen. Sie erkennen einerseits Tumorzellen und dirigieren andererseits Immunzellen an den Ort des Tumors. So soll eine immunologische Auseinandersetzung mit dem Tumor angestoßen werden. Komplette bispezifische Antikörper können darüber hinaus akzessorische Zellen binden. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose und Präsentation phagozytierter Proteine. Hiervon verspricht man sich die Induktion eines langfristigen humoralen Gedächtnisses gegen den Tumor.

In der vorliegenden Arbeit wurde der komplette bispezifische Antikörper BiUII ( $\alpha$ EpCAM/ $\alpha$ CD3) untersucht. Es wurde postuliert, dass dieses Molekül in der Lage sei, sogenannte Tri-Zell-Komplexe aus Tumorzellen, T-Zellen und akzessorischen Zellen zu vermitteln. Die Eingangsexperimente sollten daher die grundlegende Frage klären, welche Zellkontakte durch BiUII herbeigeführt werden können, und ob *in vitro* Tri-Zell-Komplexe darstellbar sind. Anschließend wurde die antitumorale Wirksamkeit des Antikörpers an Einzelzellen und an dreidimensionalen Tumorzell-Sphäroiden getestet.

Mit immunzytochemischen Färbungen an Einzelzell-Präparaten konnte erstmals die Bildung von Tri-Zell-Komplexen nachgewiesen werden. Die durch BiUII angestoßene Immunreaktion führte innerhalb von wenigen Stunden zu einer effizienten Tumorzell-elimination. Neben unspezifischen Mechanismen konnte die Phagozytose von Tumorzellen als ein Weg der BiUII-vermittelten Tumorzellzerstörung beobachtet werden.

Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass BiUII auch in Tumorzell-Sphäroiden, einem dreidimensionalen Modell für Mikrometastasen, zu einer vollständigen Elimination

vitaler Tumorzellen führte, ohne dass hierfür die exogene Zufuhr immunstimulatorischer Substanzen erforderlich war.

Die beschriebenen *in vitro*-Ergebnisse zeigen also zum einen, dass der bispezifische Antikörper BiUII diejenigen Anforderungen erfüllt, die aufgrund seiner Konstruktion gefordert wurden und zum anderen, dass das Molekül *in vitro* ein sehr hohes antitumorales Potential aufweist.

Weiterführende Experimente werden unternommen, die die Mechanismen der Tumorzellzerstörung detaillierter beschreiben sollen. Darüber hinaus ist es Ziel der kommenden Untersuchungen, mögliche Komedikationen sowie andere Applikationsformen (z.B. intratumoral) zu testen, um die bei systemischer Gabe beobachteten Nebenwirkungen einzuschränken.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1999) *Apoptosis control by death and decoy receptors*. *Curr Opin Cell Biol* 11:255-60
- Atkinson, E. A. and Bleackley, R. C. (1995) *Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells*. *Crit Rev Immunol* 15:359-84
- Audran, R.; Dazard, L. and Toujas, L. (1994) *Interactions between human macrophages and tumor cells in three-dimensional cultures*. *Cancer Immunol Immunother* 39:299-304
- Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Burke, P. J.; Melton, R. G. and Knox, R. J. (1999) *Developments with targeted enzymes in cancer therapy*. *Curr Opin Immunol* 11:579-83
- Ballangrud, A. M.; Yang, W. H.; Dnistrian, A.; Lampen, N. M. and Sgouros, G. (1999) *Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids*. *Clin Cancer Res* 5:3171s-3176s
- Ballare, C.; Barrio, M.; Portela, P. and Mordoh, J. (1995) *Functional properties of FC-2.15, a monoclonal antibody that mediates human complement cytotoxicity against breast cancer cells*. *Cancer Immunol Immunother* 41:15-22
- Balzar, M.; Winter, M. J.; de Boer, C. J. and Litvinov, S. V. (1999) *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. *J Mol Med* 77:699-712
- Baselga, J.; Tripathy, D.; Mendelsohn, J.; Baughman, S.; Benz, C. C.; Dantis, L.; Sklarin, N. T.; Seidman, A. D.; Hudis, C. A.; Moore, J.; Rosen, P. P.; Twaddell, T.; Henderson, I. C. and Norton, L. (1999) *Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. *Semin Oncol* 26:78-83
- Berrino, F. and Gatta, G. (1998) *Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the site of origin of the tumours*. *EUROCARE Working Group*. *Eur J Cancer* 34:2154-61
- Bjork, P.; Jonsson, U.; Svedberg, H.; Larsson, K.; Lind, P.; Dillner, J.; Hedlund, G.; Dohlsten, M. and Kalland, T. (1993) *Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell-surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody*. *J Biol Chem* 268:24232-41.
- Bockmühl, U.; Küchler, I. and Petersen, I. (2000) *Verbesserte Prognoseeinschätzung bei Kopf-Hals-Karzinomen durch neue genetische Marker*. *HNO* 48:451-6
- Carpenter, P. A.; Pavlovic, S.; Tso, J. Y.; Press, O. W.; Gooley, T.; Yu, X. Z. and Anasetti, C. (2000) *Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells*. *J Immunol* 165:6205-6213
- Ceuppens, J. L. and van Vaeck, F. (1989) *Human T cell activation induced by a monoclonal mouse IgG3 anti-CD3 antibody (RIV9) requires binding of the Fc part of the antibody to the monocytic 72-kDa high-affinity Fc receptor (FcRI)*. *Cell Immunol* 118:136-46

- Chaubal, S.; Wollenberg, B.; Kastenbauer, E. and Zeidler, R. (1999) *Ep-CAM - a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN*. *Anticancer Res* 19:2237-42
- Chen, H.; Wang, P. and Das Gupta, T. K. (2000) *Engineering and characterization of a single-chain antibody fragment (scFV1924) against the human sarcoma-associated antigen p102*. *Anticancer Res* 20:2753-60
- Chen, J.; Zhou, J. H. and Ball, E. D. (1995) *Monocyte-mediated lysis of acute myeloid leukemia cells in the presence of the bispecific antibody 251 x 22 (anti-CD33 x anti-CD64)*. *Clin Cancer Res* 1:1319-25
- Chen, Y. T.; Scanlan, M. J.; Sahin, U.; Tureci, O.; Gure, A. O.; Tsang, S.; Williamson, B.; Stockert, E.; Pfreundschuh, M. and Old, L. J. (1997) *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914-8
- Cheung, S. T.; Leung, S. F.; Lo, K. W.; Chiu, K. W.; Tam, J. S.; Fok, T. F.; Johnson, P. J.; Lee, J. C. and Huang, D. P. (1998) *Specific latent membrane protein 1 gene sequences in type 1 and type 2 Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong*. *Int J Cancer* 76:399-406
- Clynes, R. A.; Towers, T. L.; Presta, L. G. and Ravetch, J. V. (2000) *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. *Nat Med* 6:443-6
- Cordell, J. L.; Falini, B.; Erber, W. N.; Ghosh, A. K.; Abdulaziz, Z.; MacDonald, S.; Pulford, K. A.; Stein, H. and Mason, D. Y. (1984) *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)*. *J Histochem Cytochem* 32:219-29.
- Cornelison, T. L. (2000) *Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment*. *Curr Opin Oncol* 12:466-73
- Daniel, P. T.; Kroidl, A.; Kopp, J.; Sturm, I.; Moldenhauer, G.; Dorken, B. and 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
- Davis, T. A.; White, C. A.; Grillo-Lopez, A. J.; Velasquez, W. S.; Link, B.; Maloney, D. G.; Dillman, R. O.; Williams, M. E.; Mohrbacher, A.; Weaver, R.; Dowden, S. and Levy, R. (1999) *Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab*. *J Clin Oncol* 17:1851-7
- de Boer, C. J.; van Krieken, J. H.; Janssen-van Rhijn, C. M. and Litvinov, S. V. (1999) *Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver*. *J Pathol* 188:201-6
- de Gast, G. C.; Haagen, I. A.; van Houten, A. A.; Klein, S. C.; Duits, A. J.; de Weger, R. A.; Vroom, T. M.; Clark, M. R.; Phillips, J.; van Dijk, A. J. and et al. (1995) *CD8 T cell activation after intravenous administration of CD3 x CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma*. *Cancer Immunol Immunother* 40:390-6
- Desoize, B.; Gimonet, D. and Jardiller, J. C. (1998) *Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance*. *Anticancer Res* 18:4147-58

- Desoize, B. and Jardillier, J. (2000) *Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?* Crit Rev Oncol Hematol 36:193-207.
- Elsässer, D.; Stadick, H.; Stark, S.; van de Winkel, J. G.; Gramatzki, M.; Schrott, K. M.; Valerius, T. and Schafhauser, W. (1999) *Preclinical studies combining bispecific antibodies with cytokine-stimulated effector cells for immunotherapy of renal cell carcinoma.* Anticancer Res 19:1525-8
- Essand, M.; Gronvik, C.; Hartman, T. and Carlsson, J. (1995) *Radioimmunotherapy of prostatic adenocarcinomas: effects of 131I-labelled E4 antibodies on cells at different depth in DU 145 spheroids.* Int J Cancer 63:387-94
- Fagerberg, J.; Frodin, J. E.; Ragnhammar, P.; Steinitz, M.; Wigzell, H. and Mellstedt, H. (1994) *Induction of an immune network cascade in cancer patients treated with monoclonal antibodies (ab1). II. Is induction of anti-idiotypic reactive T cells (T3) of importance for tumor response to mAb therapy?* Cancer Immunol Immunother 38:149-59
- Filella, X.; Alcover, J.; Zarco, M. A.; Beardo, P.; Molina, R. and Ballesta, A. M. (2000) *Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer.* Prostate 44:271-4
- Flessner, M. F. and Dedrick, R. L. (1998) *Tissue-level transport mechanisms of intraperitoneally-administered monoclonal antibodies.* J Control Release 53:69-75.
- Flieger, D.; Spengler, U.; Beier, I.; Sauerbruch, T. and Schmidt-Wolf, I. G. (2000) *Prestimulation of monocytes by the cytokines GM-CSF or IL-2 enhances the antibody dependent cellular cytotoxicity of monoclonal antibody 17-1A.* Z Gastroenterol 38:615-22
- Fong, L. and Engleman, E. G. (2000) *Dendritic cells in cancer immunotherapy.* Annu Rev Immunol 18:245-73
- Fosslien, E. (2000) *Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia.* Ann Clin Lab Sci 30:3-21
- Fracasso, G. and Colombatti, M. (2000) *Effect of therapeutic macromolecules in spheroids.* Crit Rev Oncol Hematol 36:159-78.
- Freyer, J. P. (1998) *Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids.* J Cell Physiol 176:138-49
- Gabler, B.; Aicher, T.; Heiss, P. and Senekowitsch Schmidtke, R. (1997) *Growth inhibition of human papillary thyroid carcinoma cells and multicellular spheroids by anti-EGF-receptor antibody.* Anticancer Res 17:3157-9
- Ganly, I. and Kaye, S. B. (2000) *Recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck: overview of current therapy and future prospects.* Ann Oncol 11:11-6
- Gastl, G.; Spizzo, G.; Obrist, P.; Dunser, M. and Mikuz, G. (2000) *Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.* Lancet 356:1981-2
- Gath, H. J. and Brakenhoff, R. H. (1999) *Minimal residual disease in head and neck cancer.* Cancer Metastasis Rev 18:109-26
- Gilboa, E. (1999) *How tumors escape immune destruction and what we can do about it.* Cancer Immunol Immunother 48:382-5



- Gimmi, C. D.; Morrison, B. W.; Mainprice, B. A.; Gribben, J. G.; Boussiotis, V. A.; Freeman, G. J.; Park, S. Y.; Watanabe, M.; Gong, J.; Hayes, D. F.; Kufe, D. W. and Nadler, L. M. (1996) *Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells*. *Nat Med* 2:1367-70
- Goedert, J. J. (2000) *The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies*. *Semin Oncol* 27:390-401
- Green, M. C.; Murray, J. L. and Hortobagyi, G. N. (2000) *Monoclonal antibody therapy for solid tumors*. *Cancer Treat Rev* 26:269-86
- Green, S. K.; Frankel, A. and Kerbel, R. S. (1999) *Adhesion-dependent multicellular drug resistance*. *Anticancer Drug Des* 14:153-68
- Grosse-Hovest, L.; Brandl, M.; Dohlsten, M.; Kalland, T.; Wilmanns, W. and Jung, G. (1999) *Tumor-growth inhibition with bispecific antibody fragments in a syngeneic mouse melanoma model: the role of targeted T-cell co-stimulation via CD28*. *Int J Cancer* 80:138-44.
- Haagen, I. A.; Geerars, A. J.; Bast, E. J.; de Gast, G. C.; van de Winkel, J. G. and de Lau, W. B. (1994) *Evaluation of Fc gamma receptor mediated T-cell activation by two purified CD3 x CD19 bispecific monoclonal antibodies with hybrid Fc domains*. *Ther Immunol* 1:279-87
- Haagen, I. A.; Geerars, A. J.; Clark, M. R. and van de Winkel, J. G. (1995) *Interaction of human monocyte Fc gamma receptors with rat IgG2b. A new indicator for the Fc gamma RIla (R-H131) polymorphism*. *J Immunol* 154:1852-60
- Haas, I. and Koldovsky, P. (1996) *Expression von zellulären Antigenen eines Hypopharynx-Karzinoms unter verschiedenen Kulturbedingungen*. *Laryngorhinootologie* 75:543-7
- Hahn, S.; Gehri, R. and Erb, P. (1995) *Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity*. *Immunol Rev* 146:57-79
- Hamilton, G. (1998) *Multicellular spheroids as an in vitro tumor model*. *Cancer Lett* 131:29-34
- Hammarstrom, S. (1999) *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues*. *Semin Cancer Biol* 9:67-81
- Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000) *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. *J Immunol* 164:944-53.
- Heinzer, H.; Huland, E.; Aalamian, M. and Huland, H. (1999) *Behandlung des pulmonal metastasierten Nierenzellkarzinoms mit inhalativem Interleukin-2, Unizentrische Hamburger Erfahrungen seit 10 Jahren*. *Urologe A* 38:466-73
- Helfrich, W.; ten Poele, R.; Meersma, G. J.; Mulder, N. H.; de Vries, E. G.; de Leij, L. and Smit, E. F. (1997) *A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction-based assay to detect carcinoma cells in peripheral blood*. *Br J Cancer* 76:29-35
- Herlyn, D.; Sears, H. F.; Ernst, C. S.; Iliopoulos, D.; Steplewski, Z. and Koprowski, H. (1991) *Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma*. *Am J Clin Oncol* 14:371-8

- Hjelstuen, M. H.; Rasch-Halvorsen, K.; Bruland, O. and De, L. D. C. (1998) *Uptake, penetration, and binding of monoclonal antibodies with increasing affinity in human osteosarcoma multicell spheroids*. *Anticancer Res* 18:3153-61.
- Hogan, M. M. and Vogel, S. N. (1988) *Production of tumor necrosis factor by rIFN-gamma-primed C3H/HeJ (Lpsd) macrophages requires the presence of lipid A-associated proteins*. *J Immunol* 141:4196-202
- Hombach, A.; Jung, W.; Pohl, C.; Renner, C.; Sahin, U.; Schmits, R.; Wolf, J.; Kapp, U.; Diehl, V. and Pfreundschuh, M. (1993) *A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells in vitro and in vivo*. *Int J Cancer* 55:830-6.
- Hoskin, D. W.; Williams, B.; Fitzpatrick, L. and Makrigiannis, A. P. (1998) *Cell biology and possible therapeutic applications of anti-CD3-activated killer-T cells (review)*. *Int J Mol Med* 1:893-902
- Hosono, M.; Hosono, M. N.; Kraeber-Bodere, F.; Devys, A.; Thedrez, P.; Fiche, M.; Gautherot, E.; Barbet, J. and Chatal, J. F. (1998) *Biodistribution and dosimetric study in medullary thyroid cancer xenograft using bispecific antibody and iodine-125-labeled bivalent hapten*. *J Nucl Med* 39:1608-13.
- Illidge, T. M. and Brock, S. (2000) *Radioimmunotherapy of cancer: using monoclonal antibodies to target radiotherapy*. *Curr Pharm Des* 6:1399-418
- Iwasaki, K.; Kikuchi, H.; Miyatake, S.; Aoki, T.; Yamasaki, T. and Oda, Y. (1990) *Infiltrative and cytolytic activities of lymphokine-activated killer cells against a human glioma spheroid model*. *Cancer Res* 50:2429-36.
- Jaaskelainen, J.; Kalliomaki, P.; Paetau, A. and Timonen, T. (1989) *Effect of LAK cells against three-dimensional tumor tissue. In vitro study using multi-cellular human glioma spheroids as targets*. *J Immunol* 142:1036-45.
- Jaffee, E. M. (1999) *Immunotherapy of cancer*. *Ann N Y Acad Sci* 886:67-72
- Jain, R. K. (1990) *Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors*. *Cancer Res* 50:814s-819s.
- Janeway, C. A., Jr. and Bottomly, K. (1994) *Signals and signs for lymphocyte responses*. *Cell* 76:275-85
- Jones, P. T.; Dear, P. H.; Foote, J.; Neuberger, M. S. and Winter, G. (1986) *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. *Nature* 321:522-5
- Joseph, S. B.; Miner, K. T. and Croft, M. (1998) *Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF*. *Eur J Immunol* 28:277-89
- Juweid, M.; Neumann, R.; Paik, C.; Perez-Bacete, M. J.; Sato, J.; van Osdol, W. and Weinstein, J. N. (1992) *Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier*. *Cancer Res* 52:5144-53.
- Kasper, M.; Behrens, J.; Schuh, D. and Muller, M. (1995) *Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury*. *Histochem Cell Biol* 103:281-6

- Kastenbauer, E. and Wollenberg, B. (1999) *Auf der Suche nach neuen Behandlungsstrategien beim Kopf-Hals-Karzinom*. Laryngorhinootologie 78:31-5
- Katzenwadel, A.; Schleer, H.; Gierschner, D.; Wetterauer, U. and Elsässer-Beile, U. (2000) *Construction and in vivo evaluation of an anti-PSA x anti-CD3 bispecific antibody for the immunotherapy of prostate cancer*. Anticancer Res 20:1551-5
- Klein, S. C.; Boer, L. H.; de Weger, R. A.; de Gast, G. C. and Bast, E. J. (1997) *Release of cytokines and soluble cell surface molecules by PBMC after activation with the bispecific antibody CD3 x CD19*. Scand J Immunol 46:452-8
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256:495-7
- Konur, A.; Kreutz, M.; Knüchel, R.; Krause, S. W. and Andreesen, R. (1996) *Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells: analysis of macrophage differentiation and activation*. Int J Cancer 66:645-52.
- Kreitman, R. J. (1999) *Immunotoxins in cancer therapy*. Curr Opin Immunol 11:570-8
- Kroesen, B. J.; Nieken, J.; Sleijfer, D. T.; Molema, G.; de Vries, E. G.; Groen, H. J.; Helfrich, W.; The, T. H.; Mulder, N. H. and de Leij, L. (1997) *Approaches to lung cancer treatment using the CD3 x EGP-2-directed bispecific monoclonal antibody BIS-1*. Cancer Immunol Immunother 45:203-6.
- Kufer, P.; Mack, M.; Gruber, R.; Lutterbuse, R.; Zettl, F. and Riethmüller, G. (1997) *Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer*. Cancer Immunol Immunother 45:193-7
- Kunz-Schughart, L. A.; Kreutz, M. and Knüchel, R. (1998) *Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology*. Int J Exp Pathol 79:1-23
- Kwok, C. S.; Cole, S. E. and Liao, S. K. (1988) *Uptake kinetics of monoclonal antibodies by human malignant melanoma multicell spheroids*. Cancer Res 48:1856-63
- Lamers, C. H.; Bolhuis, R. L.; Warnaar, S. O.; Stoter, G. and Gratama, J. W. (1997) *Local but no systemic immunomodulation by intraperitoneal treatment of advanced ovarian cancer with autologous T lymphocytes re-targeted by a bi-specific monoclonal antibody*. Int J Cancer 73:211-9
- Lane, D. M.; Eagle, K. F.; Begent, R. H.; Hope-Stone, L. D.; Green, A. J.; Casey, J. L.; Keep, P. A.; Kelly, A. M.; Ledermann, J. A.; Glaser, M. G. and et al. (1994) *Radioimmunotherapy of metastatic colorectal tumours with iodine-131-labelled antibody to carcinoembryonic antigen: phase I/II study with comparative biodistribution of intact and F(ab')<sub>2</sub> antibodies*. Br J Cancer 70:521-5.
- Langmuir, V. K.; McGann, J. K.; Buchegger, F. and Sutherland, R. M. (1991) *The effect of antigen concentration, antibody valency and size, and tumor architecture on antibody binding in multicell spheroids*. Int J Rad Appl Instrum B 18:753-64
- LaRue, K. E.; Bradbury, E. M. and Freyer, J. P. (1998) *Differential regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors in monolayer and spheroid cultures of tumorigenic and nontumorigenic fibroblasts*. Cancer Res 58:1305-14

- Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches, Deutsche Gesellschaft für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie (2000) *Konsensusbericht*. HNO 48:104-18
- Lian, W. N.; Tsai, J. W.; Yu, P. M.; Wu, T. W.; Yang, S. C.; Chau, Y. P. and Lin, C. H. (1999) *Targeting of aminopeptidase N to bile canaliculi correlates with secretory activities of the developing canalicular domain*. Hepatology 30:748-60
- Lingen, M. W.; Emami, B. and Clark, J. I. (2000) *New therapeutic strategies for the treatment and prevention of head and neck cancer*. Expert Opinion on Investigational Drugs 9:2855-2872
- Link, B. K.; Kostelny, S. A.; Cole, M. S.; Fusselman, W. P.; Tso, J. Y. and Weiner, G. J. (1998) *Anti-CD3-based bispecific antibody designed for therapy of human B-cell malignancy can induce T-cell activation by antigen-dependent and antigen-independent mechanisms*. Int J Cancer 77:251-6.
- Litvinov, S. V.; van Driel, W.; van Rhijn, C. M.; Bakker, H. A.; van Krieken, H.; Fleuren, G. J. and Warnaar, S. O. (1996) *Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation*. Am J Pathol 148:865-75
- LoBuglio, A. F. and Saleh, M. N. (1992) *Advances in monoclonal antibody therapy of cancer*. Am J Med Sci 304:214-24
- Löffler, A.; Kufer, P.; Lutterbuse, R.; Zettl, F.; Daniel, P. T.; Schwenkenbecher, J. M.; Riethmüller, G.; Dorken, B. and Bargou, R. C. (2000) *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. Blood 95:2098-103
- Mack, M.; Riethmüller, G. and Kufer, P. (1995) *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:7021-5
- Magnano, M.; Bongioannini, G.; Lerda, W.; Canale, G.; Tondolo, E.; Bona, M.; Viora, L.; Gabini, A. and Gabriele, P. (1999) *Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables*. J Exp Clin Cancer Res 18:79-83
- Mandruzzato, S.; Brasseur, F.; Andry, G.; Boon, T. and van der Bruggen, P. (1997) *A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma*. J Exp Med 186:785-93
- Mantovani, G.; Gebbia, V.; Airoidi, M.; Bumma, C.; Contu, P.; Bianchi, A.; Ghiani, M.; Dessi, D.; Massa, E.; Curreli, L.; Lampis, B.; Lai, P.; Mulas, C.; Testa, A.; Proto, E.; Cadeddu, G. and Tore, G. (1998) *Neo-adjuvant chemo-(immuno-)therapy of advanced squamous-cell head and neck carcinoma: a multicenter, phase III, randomized study comparing cisplatin + 5-fluorouracil (5-FU) with cisplatin + 5-FU + recombinant interleukin 2*. Cancer Immunol Immunother 47:149-56
- Manzke, O.; Tesch, H.; Lorenzen, J.; Diehl, V. and Bohlen, H. (2001) *Locoregional treatment of low-grade B-cell lymphoma with CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation. II. Assessment of cellular immune responses*. Int J Cancer 91:516-22.
- Mäurer, M. J.; Gollin, S. M.; Martin, D.; Swaney, W.; Bryant, J.; Castelli, C.; Robbins, P.; Parmiani, G.; Storkus, W. J. and Lotze, M. T. (1996) *Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent*

*melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen.* J Clin Invest 98:1633-41

McCall, A. M.; Adams, G. P.; Amoroso, A. R.; Nielsen, U. B.; Zhang, L.; Horak, E.; Simmons, H.; Schier, R.; Marks, J. D. and Weiner, L. M. (1999) *Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity.* Mol Immunol 36:433-45

McLaughlin, P.; Grillo-Lopez, A. J.; Link, B. K.; Levy, R.; Czuczman, M. S.; Williams, M. E.; Heyman, M. R.; Bence-Bruckler, I.; White, C. A.; Cabanillas, F.; Jain, V.; Ho, A. D.; Lister, J.; Wey, K.; Shen, D. and Dallaire, B. K. (1998) *Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program.* J Clin Oncol 16:2825-33

Melero, I.; Vile, R. G. and Colombo, M. P. (2000) *Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or a la carte?* Gene Ther 7:1167-70

Moers, C.; Warskulat, U.; Muschen, M.; Even, J.; Niederacher, D.; Josien, R.; Koldovsky, U.; Beckmann, M. W. and Haussinger, D. (1999) *Regulation of CD95 (Apo-1/Fas) ligand and receptor expression in squamous-cell carcinoma by interferon-gamma and cisplatin.* Int J Cancer 80:564-72

Momburg, F.; Moldenhauer, G.; Hammerling, G. J. and Möller, 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

Mosmann, T. (1983) *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods 65:55-63

Mosolits, S.; Harmenberg, U.; Ruden, U.; Ohman, L.; Nilsson, B.; Wahren, B.; Fagerberg, J. and Mellstedt, H. (1999) *Autoantibodies against the tumour-associated antigen GA733-2 in patients with colorectal carcinoma.* Cancer Immunol Immunother 47:315-20

Müller-Klieser, W. (1997) *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications.* Am J Physiol 273:C1109-23

Myers, J. N. (1999) *The use of biological therapy in cancer of the head and neck.* Curr Probl Cancer 23:106-34

Natali, P. G.; Giacomini, P.; Bigotti, A.; Imai, K.; Nicotra, M. R.; Ng, A. K. and Ferrone, S. (1983) *Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells.* Cancer Res 43:660-8

Newell, K. A.; Ellenhorn, J. D.; Hirsch, R. and Bluestone, J. A. (1991) *Immunopotential of anti-viral and anti-tumor immune responses using anti-T cell receptor antibodies and mitogens.* Ann N Y Acad Sci 636:279-87

Nitta, T.; Yagita, H.; Azuma, T.; Sato, K. and Okumura, K. (1989) *Bispecific F(ab')<sub>2</sub> monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytotoxicity of human T cells.* Eur J Immunol 19:1437-41

- Ohmi, Y.; Shiku, H. and Nishimura, T. (1999) *Tumor-specific targeting of T helper type 1 (Th1) cells by anti-CD3 x anti-c-ErbB-2 bispecific antibody*. *Cancer Immunol Immunother* 48:456-62
- Olabiran, Y.; Ledermann, J. A.; Marston, N. J.; Boxer, G. M.; Hicks, R.; Souhami, R. L.; Spiro, S. G. and Stahel, R. A. (1994) *The selection of antibodies for targeted therapy of small-cell lung cancer (SCLC) using a human tumour spheroid model to compare the uptake of cluster 1 and cluster w4 antibodies*. *Br J Cancer* 69:247-52.
- Olive, P. L. and Durand, R. E. (1994) *Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics*. *Cancer Metastasis Rev* 13:121-38
- Pantel, K. (1996) *Detection of minimal disease in patients with solid tumors*. *J Hematother* 5:359-67.
- Parkin, D. M.; Laara, E. and Muir, C. S. (1988) *Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980*. *Int J Cancer* 41:184-97
- Penn, I. (2000) *Cancers in renal transplant recipients*. *Adv Ren Replace Ther* 7:147-56
- Quak, J. J.; van Dongen, G.; Brakkee, J. G.; Hayashida, D. J.; Balm, A. J.; Snow, G. B. and Meijer, C. J. (1990) *Production of a monoclonal antibody (K 931) to a squamous cell carcinoma associated antigen identified as the 17-1A antigen*. *Hybridoma* 9:377-87
- Radoja, S. and Frey, A. B. (2000) *Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing*. *Mol Med* 6:465-79
- Ragnhammar, P.; Fagerberg, J.; Frodin, J. E.; Hjelm, A. L.; Lindemalm, C.; Magnusson, I.; Masucci, G. and Mellstedt, H. (1993) *Effect of monoclonal antibody 17-1A and GM-CSF in patients with advanced colorectal carcinoma--long-lasting, complete remissions can be induced*. *Int J Cancer* 53:751-8
- Rainaldi, G.; Calcabrini, A.; Arancia, G. and Santini, M. T. (1999) *Differential expression of adhesion molecules (CD44, ICAM-1 and LFA-3) in cancer cells grown in monolayer or as multicellular spheroids*. *Anticancer Res* 19:1769-78
- Reiter, Z. (1993) *Dual effects of cytokines in regulation of MHC-unrestricted cell mediated cytotoxicity*. *Crit Rev Immunol* 13:1-34
- Renner, C.; Hartmann, F.; Jung, W.; Deisting, C.; Juwana, M. and Pfreundschuh, M. (2000) *Initiation of humoral and cellular immune responses in patients with refractory Hodgkin's disease by treatment with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody*. *Cancer Immunol Immunother* 49:173-80
- Riesenberg, R.; Buchner, A.; Pohla, H. and Lindhofer, H. (2001) *Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3)*. *J Histochem Cytochem* 49:911-7.
- purification/metabolism
- Riethmüller, G.; Holz, E.; Schlimok, G.; Schmiegel, W.; Raab, R.; Höffken, K.; Gruber, R.; Funke, I.; Pichlmaier, H.; Hirche, H.; Buggisch, P.; Witte, J. and Pichlmayr, R. (1998) *Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial*. *J Clin Oncol* 16:1788-94

- Romero, F. J.; Zukowski, D. and Müller-Klieser, W. (1997) *Glutathione content of V79 cells in two- or three-dimensional culture*. Am J Physiol 272:C1507-12
- Rosenberg, S. A. (1999) *A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens*. Immunity 10:281-7
- Rughetti, A.; Biffoni, M.; Sabbatucci, M.; Rahimi, H.; Pellicciotta, I.; Fattorossi, A.; Pierelli, L.; Scambia, G.; Lavitrano, M.; Frati, L. and Nuti, M. (2000) *Transfected human dendritic cells to induce antitumor immunity*. Gene Ther 7:1458-66
- Russoniello, C.; Somasundaram, C.; Schlom, J.; Deo, Y. M. and Keler, T. (1998) *Characterization of a novel bispecific antibody that mediates Fcγ receptor type I-dependent killing of tumor-associated glycoprotein-72-expressing tumor cells*. Clin Cancer Res 4:2237-43
- Saga, T.; Neumann, R. D.; Heya, T.; Sato, J.; Kinuya, S.; Le, N.; Paik, C. H. and Weinstein, J. N. (1995) *Targeting cancer micrometastases with monoclonal antibodies: a binding-site barrier*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:8999-9003
- Santini, M. T.; Rainaldi, G. and Indovina, P. L. (1999) *Multicellular tumour spheroids in radiation biology*. Int J Radiat Biol 75:787-99
- Sauer, H.; Ritgen, J.; Hescheler, J. and Wartenberg, M. (1998) *Hypotonic Ca<sup>2+</sup> signaling and volume regulation in proliferating and quiescent cells from multicellular spheroids*. J Cell Physiol 175:129-40
- Schön, M. P.; Schön, M.; Klein, C. E.; Kaufmann, R.; Herzberg, F.; Schmidt, R. and Orfanos, C. E. (1995) *Properties of the carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4 in normal and transformed human keratinocytes: regulation of synthesis, molecular cross-linking and ultrastructural localization*. Br J Dermatol 133:176-85
- Schuller, D. E.; McGuirt, W. F.; McCabe, B. F. and Young, D. (1980) *The prognostic significance of metastatic cervical lymph nodes*. Laryngoscope 90:557-70
- Soda, H.; Koda, K.; Yasutomi, J.; Oda, K.; Takiguchi, N.; Saito, N. and Nakajima, N. (1999) *Adoptive immunotherapy for advanced cancer patients using in vitro activated cytotoxic T lymphocytes*. J Surg Oncol 72:211-7
- Spina, M.; Vaccher, E.; Nasti, G. and Tirelli, U. (2000) *Human immunodeficiency virus-associated Hodgkin's disease*. Semin Oncol 27:480-8
- Stumm, G.; Eberwein, S.; Rostock-Wolf, S.; Stein, H.; Pomer, S.; Schlegel, J. and Waldherr, R. (1996) *Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis*. Int J Cancer 69:17-22
- Sutherland, R.; Buchegger, F.; Schreyer, M.; Vacca, A. and Mach, J. P. (1987) *Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids*. Cancer Res 47:1627-33.
- Sutherland, R. M. (1988) *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science 240:177-84

- Talac, R. and Nelson, H. (2000) *Current perspectives of bispecific antibody-based immunotherapy*. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents 14:175-181.
- Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.; Miles, D. W. and Dalziel, M. (1999) *MUC1 and cancer*. Biochim Biophys Acta 1455:301-13
- Thiele, D. L. and Lipsky, P. E. (1989) *The role of cell surface recognition structures in the initiation of MHC-unrestricted 'promiscuous' killing by T cells*. Immunol Today 10:375-81
- Tibben, J. G.; Boerman, O. C.; Massuger, L. F.; Schijf, C. P.; Claessens, R. A. and Corstens, F. H. (1996) *Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')<sub>2</sub> in ovarian carcinoma patients*. Int J Cancer 66:477-83.
- van de Winkel, J. G.; Tax, W. J.; van Bruggen, M. C.; van Roozendaal, C. E.; Willems, H. W.; Vlug, A.; Capel, P. J. and Koene, R. A. (1987) *Characterization of two Fc receptors for mouse immunoglobulins on human monocytes and cell lines*. Scand J Immunol 26:663-72
- van Dongen, G. A.; Brakenhoff, R. M.; ten Brink, C. T.; van Gog, F. B.; de Bree, R.; Quak, J. J. and Snow, G. B. (1996) *Squamous cell carcinoma-associated antigens used in novel strategies for the detection and treatment of minimal residual head and neck cancer*. Anticancer Res 16:2409-13
- van Dongen, G. A. and Snow, G. B. (1997) *Prospects for future studies in head and neck cancer*. Eur J Surg Oncol 23:486-91
- van Oijen, M. G. and Slootweg, P. J. (2000) *Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:249-56
- Vokes, E. E.; Weichselbaum, R. R.; Lippman, S. M. and Hong, W. K. (1993) *Head and neck cancer*. N Engl J Med 328:184-94
- Vollmers, H. P.; Timmermann, W.; Hensel, F.; Illert, B.; Thiede, A. and Müller-Hermelink, H. K. (2000) *Additive Immuntherapie des Magenkarzinoms durch antikörpervermittelte Apoptose*. Zentralbl Chir 125 Suppl 1:37-40
- Waleh, N. S.; Gallo, J.; Grant, T. D.; Murphy, B. J.; Kramer, R. H. and Sutherland, R. M. (1994) *Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma*. Cancer Res 54:838-43
- Wallace, P. K.; Romet-Lemonne, J. L.; Chokri, M.; Kasper, L. H.; Fanger, M. W. and Fadul, C. E. (2000) *Production of macrophage-activated killer cells for targeting of glioblastoma cells with bispecific antibody to FcγRI and the epidermal growth factor receptor*. Cancer Immunol Immunother 49:493-503
- Wang, J.; Stohlman, S. A. and Dennert, G. (1994) *TCR cross-linking induces CTL death via internal action of TNF*. J Immunol 152:3824-32
- Watanabe, M.; Wallace, P. K.; Keler, T.; Deo, Y. M.; Akewanlop, C. and Hayes, D. F. (1999) *Antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of breast cancer cells mediated by bispecific antibody, MDX-210*. Breast Cancer Res Treat 53:199-207



- Weiner, G. J.; Kostelny, S. A.; Hillstrom, J. R.; Cole, M. S.; Link, B. K.; Wang, S. L. and Tso, J. Y. (1994) *The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy*. J Immunol 152:2385-92.
- Weiner, L. M.; Clark, J. I.; Ring, D. B. and Alpaugh, R. K. (1995) *Clinical development of 2B1, a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII*. J Hematother 4:453-6
- Weinstein, J. N.; Eger, R. R.; Covell, D. G.; Black, C. D.; Mulshine, J.; Carrasquillo, J. A.; Larson, S. M. and Keenan, A. M. (1987) *The pharmacology of monoclonal antibodies*. Ann N Y Acad Sci 507:199-210.
- Whiteside, T. L.; Sung, M. W.; Nagashima, S.; Chikamatsu, K.; Okada, K. and Vujanovic, N. L. (1998) *Human tumor antigen-specific T lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparisons of antitumor effects in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res 4:1135-45
- Whiteside, T. L. (1999) *Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy*. Cancer Immunol Immunother 48:346-52
- Winter, G. and Harris, W. J. (1993) *Humanized antibodies*. Immunol Today 14:243-6
- Wollenberg, B.; Ollesch, A.; Maag, K.; Funke, I. and Wilmes, E. (1994) *Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches*. Laryngorhinootologie 73:88-93.
- Wollenberg, B.; Kastenbauer, M.; Mundl, H.; Schaumberg, J.; Mayer, A.; Andratschke, M.; Lang, S.; Pauli, C.; Zeidler, R.; Ihrler, S.; Löhrs, Naujoks, K. and Rollston, R. (1999) *Gene therapy - phase I trial for primary untreated head and neck squamous cell cancer (HNSCC) UICC stage II-IV with a single intratumoral injection of hIL-2 plasmids formulated in DOTMA/Chol*. Hum Gene Ther 10:141-7
- Young, M. R.; Wright, M. A.; Lozano, Y.; Matthews, J. P.; Benefield, J. and Prechel, M. M. (1996) *Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer*. Int J Cancer 67:333-8
- Zeidler, R.; Reisbach, G.; Wollenberg, B.; Lang, S.; Chaubal, S.; Schmitt, B. and Lindhofer, H. (1999) *Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing*. J Immunol 163:1246-52
- Zeidler, R.; Mysliwietz, J.; Csanady, M.; Walz, A.; Ziegler, I.; Schmitt, B.; Wollenberg, B. and Lindhofer, H. (2000a) *The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells*. Br J Cancer 83:261-6
- Zeidler, R.; Csanady, M.; Gires, O.; Lang, S.; Schmitt, B. and Wollenberg, B. (2000b) *Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1*. Faseb J 14:661-8.
- Zeidler, R.; Mayer, A.; Gires, O.; Schmitt, B.; Mack, B.; Lindhofer, H.; Wollenberg, B. and Walz, A. (2001) *TNF $\alpha$  contributes to the antitumor activity of a bispecific, trifunctional antibody*. Anticancer Res 21:4099-104

## 7. Abkürzungsverzeichnis

a. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity)
AEC	Aminoethylcarbazol
APAAP	alkalische Phosphatase / anti-alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
bsAb	bispezifischer Antikörper
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CEA	karzinoembryonales Antigen
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E:T	Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EpCAM	epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül (epithelial cell adhesion molecule)
Fab	variable Region eines Antikörpers (Fragment antigen binding)
FACS	Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell sorting)

Fas-L	Fas-Ligand
Fc	konstante Region eines Antikörpers (Fragment crystallizable)
Fc-R	Fc-Rezeptor
FCS	fetales Kälber-Serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/macrophage colony stimulating factor)
h	Stunde
HAMA/HARA	humaner anti-Maus/-Ratte Antikörper
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
l	Liter
LAK	Lymphokin-aktivierte Killer-Zelle
LMP	latent membrane protein
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

mM	Millimolar
mrd	minimal residual disease
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
MUC	Mucin
N	Normal
NK	natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
PBLs	Lymphozyten des peripheren Blutes (peripheral blood lymphocytes)
PBMCs	Leukozyten des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PGE	Prostaglandin E
pH	neg. dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
TAA	tumorassoziertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCS	Tumorzell-Sphäroid (tumor cell spheroid)
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
U/min	Umdrehungen/Minute

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Annette Walz  
 Geburtsdatum: 05.08.1970  
 Geburtsort: Bayreuth  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig

### Schulbildung

1976 – 1980 Grundschole Lerchenbühl, Bayreuth  
 1980 – 1989 Gymnasium Fridericianum, Erlangen  
 1989 Abitur

### Studium

Okt. 1989 – März 1992 Mathematikstudium an der Universität Würzburg  
 März 1992 – Sept. 1997 Medizinstudium an der Universität Marburg  
 Okt. 1997 – Sept. 1998 Medizinstudium (PJ) an der LMU München  
 März 1994 Physikum  
 März 1995 1. Staatsexamen  
 September 1997 2. Staatsexamen  
 November 1998 3. Staatsexamen

### Berufstätigkeit

April 1999 – Sept. 2000 Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München  
 Seit Oktober 2000 Assistentin an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München  
 August 1999 – Febr. 2002 Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. E. Kastenbauer in dem Labor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer danke ich für die stets umfassende Unterstützung dieser Arbeit sowie für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau PD Dr. med. Barbara Wollenberg und Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für motivierende und kritische Diskussionen und für die wissenschaftlichen Freiräume, die mir ein unbefangenes Experimentieren ermöglichten. Herrn Dr. rer. nat. Olivier Gires danke ich für vielfältigste Unterstützung und die Geduld, die hierfür notwendig war.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Bärbel Schmitt und Frau Brigitte Mack für ihre aufopfernde Mitarbeit und fröhliche Geduld. Ohne ihre Unterstützung wäre eine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Dank auch an all die übrigen Mitarbeiter im HNO-Forschungslabor: Frau T. Hofmann, Frau G. Hollweck, Herrn C. Kieu, Frau T. Krug, Frau K. Lempart, Frau A. Mayer, Herrn A. Moosmann, Herrn M. Münz, Frau M. Shabani und Frau C. Zentz. Durch sie war ein Arbeiten in einer diskussionsfreudigen, positiven Atmosphäre möglich, wie sie wohl selten ist.

Ein besonderes Dankeschön gilt all denjenigen Lehrern, die mir Motivation und Freude an wissenschaftlicher und klinischer Medizin vermittelt haben. Insbesondere Herr Prof. Dr. med. J. Schlegel und Frau Dr. med. G. Stumm seien hier erwähnt, die den Grundstein für mein Interesse an wissenschaftlicher Arbeit legen konnten.

Last but not least gilt mein Dank denjenigen, die mich während der Zeit der Arbeit durch gute Gespräche und viel erquickliche Musik begleitet und unterstützt haben.

