

Generierung, Charakterisierung und Optimierung stabiler Zelllinien zur Produktion von bispezifischen Einzelkettenantikörpern

Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium)



vorgelegt von
Carolin Hieber
München
2012

Dissertation eingereicht am:	25.01.2012
Erstgutachter:	Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachter:	Herr Dr. Josef Mautner
Sondervotum:	Herr Prof. Dr. Patrick Baeuerle
Tag der mündlichen Prüfung:	11.06.2012

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 21.01.2012

Carolin Hieber

1 Zusammenfassung

Unabdingbare Voraussetzungen für die Herstellung von therapeutisch anwendbaren Proteinen sind eine hohe Ausbeute (Titer), Produktstabilität sowie Produkthomogenität. Ein wichtiger Meilenstein auf dem Weg dorthin ist die Generierung einer hochwertigen rekombinanten Zelllinie, meist basierend auf Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen). Der Prozess einer Zellliniengenerierung nimmt sechs bis neun Monate in Anspruch und ist dementsprechend kostspielig und aufwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien untersucht, um Zeitlinien für die Generierung von Produktionszelllinien zur Herstellung von sog. BiTE Antikörpern zu verkürzen. Bei BiTE Molekülen handelt es sich um bispezifische Einzelkettenantikörper (zwei scFv-Fragmente sind über eine Peptidbrücke verbunden), welche T-Zellen zur spezifischen Lyse von Tumorzellen rekrutieren.

Um den hohen Zeitaufwand einer eukaryotischen Zellliniengenerierung zu umgehen, wurde die Produzierbarkeit von BiTE Antikörpern in Prokaryoten evaluiert. Hierbei wurde deutlich, dass eine funktionelle Expression in *Escherichia coli* prinzipiell möglich, jedoch mit einer sehr geringen Ausbeute behaftet ist. Aufgrund erheblicher Probleme im Aufreinigungsprozeß, gepaart mit der geringen Ausbeute, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die bakterielle Expression derzeit keine sinnvolle Alternative zur Produktion von BiTE Antikörpern in CHO-Zellen darstellt.

Deshalb wurde der Hauptfokus dieser Arbeit auf die Optimierung der eukaryotischen Zellliniengenerierung gelegt. Zum einen wurde ein Verfahren entwickelt, welches es ermöglicht, die Qualität von stabilen Linien vor Beginn einer Zellliniengenerierung vorherzusagen. Hierbei wurde zunächst eine FACS-basierte Analytik zur Titerbestimmung entwickelt, die es erlaubt, geringe Expressionsunterschiede auf Basis transienter Transfektionen von HEK293-Zellen zu detektieren. Letztere sind sehr schnell und einfach durchzuführen und eignen sich deshalb besonders als Vorab-Screening. Mit Hilfe dieser Analytik konnte erstmals gezeigt werden, dass ein transienter Vergleich von BiTE Antikörpern in HEK293-Zellen möglich ist. Hierbei konnte eine hoch signifikante Korrelation zwischen stabilen Transfektionen in CHO-Zellen sowie transienten Transfektionen in HEK293-Zellen in Bezug auf die zwei genannten Parameter aufgezeigt werden. Damit ist es möglich, präzise Vorhersagen über Quantität (Titer) und Qualität (Monomergehalt) zukünftiger stabiler CHO-Zelllinie zu treffen. Diese Methode hat Eingang in die Routineanalytik von BiTE Wirkstoffkandidaten gefunden.

Zum anderen wurde ein auf automatisierter Zellselektion basierendes System für eine Zelliniengenerierung zur Produktion von BiTE Molekülen evaluiert (ClonePix-System). Hierbei werden sekretierte Antikörper mittels eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers präzipitiert und visualisiert. Da eine Quervernetzung auf Bindung an den Fc-Teil von Antikörpern beruht, ist das System nicht unverändert auf Einzelkettenantikörper übertragbar. An dieser Stelle konnte ein Prozess erarbeitet werden, welcher die Detektion und Präzipitation von BiTE Antikörpern ermöglicht. Bedingt durch die ursprüngliche Auslegung des ClonePix-Verfahrens auf komplette IgG-Antikörper war im Falle von BiTE Molekülen keine Diskriminierung von Monomeren und Multimeren möglich. Letztere wurden vom System entweder nicht als solche erkannt oder sogar bevorzugt. Dadurch kann mit Hilfe des ClonePix-Systems zwar eine deutliche zeitliche Verkürzung innerhalb einer Liniengenerierung erreicht werden, eine Selektion von Monomerproduzenten war jedoch nicht möglich. Folglich führt auch das ClonePix-System nicht zu einer Optimierung der Zelllinienentwicklung.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit eine Methode etabliert, um sowohl quantitative als auch qualitative Vorhersagen über stabile CHO-Zelllinien für eine Generierung von BiTE Antikörpern zu treffen.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	4
2 Einleitung	11
2.1 BiTE Antikörper	11
2.1.1 Vom murinen mAK zum BiTE Antikörper	11
2.1.1.1 mAKs – Aufbau und Wirkungsweise	11
2.1.1.2 Bispezifische Antikörper	16
2.1.2 Aufbau von BiTE Antikörpern	19
2.1.3 Charakteristika und Wirkmechanismus von BiTE Antikörpern	20
2.1.4 Kriterien für die Produktion eines BiTE Antikörpers	24
2.1.5 Stabile Zellliniengenerierung von BiTE Antikörpern	26
2.2 Das maligne Melanom & das MCSP-Antigen	28
2.2.1 Das maligne Melanom	28
2.2.2 Das MCSP Antigen	29
2.3 Zielsetzung der Arbeit	29
3 Material	31
3.1 Geräte	31
3.2 Laborbedarf	31
3.3 Kits	32
3.4 Puffer und Lösungen	33
3.5 Zellkultur	34
3.5.1 Reagenzien und Zusätze für die Zellkultur	34
3.5.2 Zellkulturmedien	34
3.5.3 Eukaryotische Organismen & Kultivierungsbedingungen	35
3.5.3.1 Transfektanten	35
3.5.3.2 Zelllinien	35
3.6 Antibiotika	35
3.7 Bakterienkultur	35

3.7.1	Bakterienstämme	35
3.7.2	Kulturmedien	36
3.8	Reagenzien für molekularbiologische Methoden	36
3.8.1	Enzyme und andere Reagenzien	36
3.8.2	DNA Marker, Proteinmarker, Ladepuffer	36
3.8.3	Oligonukleotide	36
3.8.3.1	Primer für die Klonierung bakterieller MCSP Konstrukte	37
3.8.3.2	Primer für die Klonierung eukaryotischer MCSP Konstrukte.....	37
3.8.3.3	Andere Konstrukte.....	38
3.8.4	Vektoren.....	38
3.9	Immunologische Reagenzien	39
3.9.1	Antikörper.....	39
3.9.2	Bispezifische Einzelkettenantikörper	39
3.9.3	Rekombinante Proteine	39
3.10	Detektion.....	39
3.11	Chemikalien und sonstige Reagenzien.....	40
3.12	Computersoftware und Datenbanken	40
4	Methoden	41
4.1	Zellbiologische Methoden.....	41
4.1.1	Zellkulturführung	41
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	41
4.1.3	Transfektion von Zellen	41
4.1.3.1	Transiente Transfektion.....	42
4.1.3.2	Stabile Transfektion (Lonza System).....	42
4.1.4	Zellliniengenerierung	42
4.1.5	Isolierung von PBMCs aus Humanblut	43
4.1.6	Stimulierung von PBMCs und Isolierung von CD8 ⁺ T-Zellen	44
4.1.7	Zytotoxizitätsexperimente mittels radioaktivem Chrom	44
4.2	Durchflußzytometrie	45
4.3	ELISA.....	46

4.3.1	Protein L-ELISA	46
4.3.2	CD3-ELISA	46
4.4	Das ClonePix-System	47
4.5	Molekularbiologische Methoden	47
4.5.1	Plasmidgewinnung aus <i>E. coli</i>	47
4.5.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	48
4.5.3	Isolation von DNS aus Agarosegelen	48
4.5.4	Restriktion von DNS	49
4.5.5	Dephosphorylierung linearer DNS-Fragmente.....	49
4.5.6	Ligation von DNS-Fragmenten	49
4.5.7	Transformation in <i>E. coli</i>	49
4.5.8	Amplifikation von DNS mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
4.5.8.1	Generelle PCR.....	50
4.5.8.2	GC-reiche PCR	51
4.5.9	Konzentrationsbestimmung von DNS	51
4.5.10	Sequenzierung	51
4.6	Expression von BiTE Molekülen in Bakterien	51
4.6.1	Produktion von BiTE Molekülen in <i>E. coli</i> über Arabinose-Induktion.....	51
4.6.2	Produktion der anti-CD3 Einzelkette in <i>E. coli</i> über IPTG-Induktion.....	52
4.6.3	Ultraschall Aufschluss des <i>E. coli</i> Pellets	52
4.7	Gelelektrophorese von Proteinen	52
4.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	52
4.7.2	Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-Page.....	52
4.8	Western Blot.....	53
4.9	Aufreinigung von BiTE Molekülen.....	53
4.10	Konzentrationsbestimmung von Proteinen über OD ₂₈₀ -Messung.....	53
5	Ergebnisse	54
5.1	Quantitative und qualitative Aussagen über stabile Zelllinien	54
5.1.1	Aufbau der Korrelationsstudien	54
5.1.2	Etablierung der Zelllinie für transiente Transfektionen	55

5.1.3	Optimierungen von Sequenzen für die Transfektion	56
5.1.3.1	Codonvariationen der MCSP-G10 Sequenz	57
5.1.3.2	Codonvariationen des Signalpeptids	60
5.1.4	Aufbau der FACS Analysen - Unterschiede zwischen anti-Ziel- und anti-CD3-gerichteten FACS Aufbau	61
5.1.5	Transfektion unterschiedlicher BiTE Konstrukte	63
5.1.5.1	Stabile Zelliniengenerierung	64
5.1.5.2	Ergebnisse der transienten Transfektionen	65
5.1.6	Korrelation zwischen stabilen und transienten Daten	67
5.1.6.1	Test auf Existenz einer Korrelation zwischen stabilen und transienten Daten.....	67
5.1.6.2	Bestätigung der Korrelation	69
5.2	Alternativen zur klassischen Zelliniengenerierung	72
5.2.1	BiTE Expression in <i>E. coli</i>	72
5.2.1.1	Arabinose-induzierte Expression in <i>E. coli</i>	72
5.2.1.2	Zytotoxizität bakterieller BiTE Moleküle	74
5.2.1.3	Einwirkungen bakterieller Endotoxine auf die Ziel-spezifische Zellyse	74
5.2.2	Das ClonePix-System zur Klonselktion.....	76
5.2.2.1	Das ClonePix-System der Firma Genetix: Screening von IgG Molekülen	76
5.2.2.2	BiTE Präzipitierung mittels eines CD3-Peptids und eines anti-Penta-His IgG-Alexa Fluor 488 Antikörpers	77
6	Diskussion	81
6.1	Korrelation von transienten und stabilen Transfektionen in Bezug auf Titer und Monomergehalt von BiTE Antikörpern	81
6.1.1	Stabile Zelliniengenerierung	81
6.1.2	Transiente Transfektionen.....	82
6.1.3	Transiente Transfektionen als „Horoskop“ für stabile Zelllinien.....	82
6.1.3.1	Systemetablierung mittels Codonvariationen.....	83
6.1.3.2	Relevanz von Codonoptimierungen für die Zelliniengenerierung	87
6.1.3.3	Ursächlichkeiten der Dimerisierung	88

6.1.3.4	Qualität von transienten Transfektionen als Vorhersage-System für die stabile Zellliniengenerierung	89
6.2	Alternativen zur klassischen Zellliniengenerierung	92
6.2.1	BiTE Generierung in <i>Escherichia coli</i>	92
6.2.2	Automation der Zellliniengenerierung (Das ClonePix System).....	93
7	Literaturverzeichnis	98
8	Abkürzungsverzeichnis	107

2 Einleitung

Krebserkrankungen stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache der Bevölkerung in Deutschland dar. Rund 219.000 Menschen starben 2010 an einem Krebsleiden, was 25,5 % aller Todesfälle ausmacht (einer Herz-Kreislauf-Erkrankung erlagen 2010 41,1 %). Bei Männern (54 % der Krebsopfer) waren hierbei hauptsächlich die Verdauungsorgane sowie die Lunge betroffen. Frauen starben zum größten Teil an Tumoren des Verdauungstraktes sowie an Brustkrebs (nach Angaben des Statistischen Bundesamtes).

Einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Tumoren stellen Biologika dar. Unter diesen versteht man sämtliche bio- sowie gentechnologisch hergestellten Proteine, wobei diese vom Aufbau her an körpereigene Substanzen angelehnt sind [1]. Zu Biologika zählen Impfstoffe, Hormone, gezüchtete Gewebe sowie monoklonale Antikörper (mAK).

MAK wurden über Jahrzehnte hinweg immer weiter optimiert [2]. Murine mAK wurden schnell durch humanisierte Antikörper verdrängt [3]. Bald wurden mAK mit zwei verschiedenen Spezifitäten entwickelt (bispezifische Antikörper) [4]. Zu letzteren zählen die sog. BiTE (Bispecific T-Cell Engager) Antikörper, eine noch nicht zugelassene Klasse von Therapeutika, die T-Zellen zur Lyse von Tumorzellen rekrutieren und in klinischen Studien bereits sehr vielversprechende Daten lieferten [5]. BiTE Antikörper, wie alle anderen therapeutischen Substanzen auch, müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, um neben einer hohen Wirksamkeit auch eine pharmazeutisch industrielle Relevanz zu besitzen. Zu letzterer zählen eine hohe Produktionsrate, Produktstabilität sowie Produkthomogenität.

2.1 BiTE Antikörper

2.1.1 Vom murinen mAK zum BiTE Antikörper

2.1.1.1 mAKs – Aufbau und Wirkungsweise

Abbildung 1 zeigt die Struktur eines mAKs auf IgG-Basis. Sie wurden erstmals 1975 durch somatische Zellhybridisierung synthetisiert. Hierzu wurde eine Maus mit Antigen immunisiert, die resultierenden B-Zellen aus der Milz entnommen und mit immortalen Myelomzellen verschmolzen. [6]. Diese Arbeit erhielt 1984 den Nobelpreis für Medizin (für César Milstein, Georges Köhler und Niels Jerne).

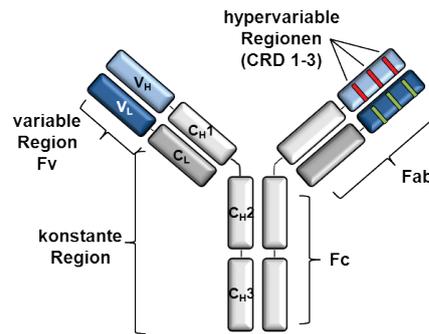


Abbildung 1: Ein mAK auf IgG-Basis

Ein IgG setzt sich aus zwei schweren sowie zwei leichten Ketten zusammen. Die schweren Ketten bestehen jeweils aus drei konstanten (C_H1-3) sowie einer variablen (V_H) Region. Die leichten Ketten besitzen je eine konstante (C_L) und eine variable (V_L) Region. Die Antigenbindungsstellen werden durch die variablen Domänen der leichten und der schweren Ketten gebildet. Am wichtigsten für die Antigenbindung sind die hypervariablen Regionen (CRD1-3: „Complementarity Determining Regions“) in den variablen Domänen.

Die ersten therapeutisch verwendeten mAK wurden aus Mäuse-Aszites isoliert. Allerdings kam es bei Anwendung von murinen Antikörpern im Patienten zu Komplikationen, wie dem Auftreten von allergischen Reaktionen sowie der Bildung von neutralisierenden anti-Maus-Antikörpern (human anti mouse antibodies, HAMA) [7]. Durch letztere sank der Spiegel an mAK im Serum rapide und eine Wirksamkeit war nicht mehr gegeben. Erst durch die aufkommende genetische Rekombination wurde ein Angleichen von Maus-AK an menschliche Sequenzen und damit eine Minimierung von HAMA möglich. Fünf verschiedene Stufen der Angleichung an humane Sequenzen können hierbei unterschieden werden. Die Herkunft des Antikörpers spiegelt sich dabei jeweils in der Namensendung wieder [8]:

- murine Antikörper (-omab)
- Primatenantikörper (-imab)
- chimäre Antikörper (-ximab)
- humanisierte Antikörper (-zumab)
- humane Antikörper (-mumab)

Bei chimären Antikörpern werden murine konstante Regionen gegen humane Sequenzen ausgetauscht. Dadurch entstehen Antikörper, die etwa zu 70 % human sind. Humanisierte Antikörper sind zu 95 % human. Hierbei werden lediglich die hypervariablen Regionen (CRD1-3) des Antikörpers murin belassen [3] (siehe Abbildung 2).

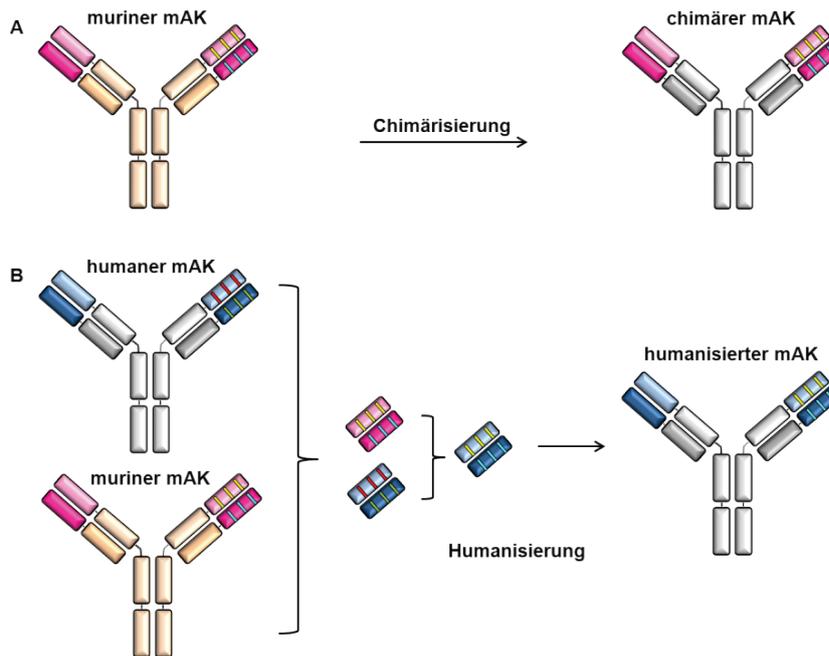


Abbildung 2: Chimärisierung und Humanisierung von Antikörpern (modifiziert nach [9])

A) Durch den Austausch von murinen (orange) gegen humane (grau) konstante Regionen entsteht ein chimärer Antikörper.

B) Im Zuge einer Humanisierung verbleiben lediglich die hypervariablen Domänen murin (gelbe und blaue Linien innerhalb der variablen Regionen). Die restlichen Bereiche des Antikörpers werden human (grau bzw. blau).

Für die Humanisierung von mAK kann die sog. „Phage Display“ Technologie herangezogen werden, welche 1985 von George Smith entwickelt wurde. Hierbei wird eine Bibliothek von Peptiden (z.B. Antikörperfragmenten) von Bakteriophagen präsentiert und der beste Binder innerhalb dieser Bibliothek durch zyklische Exposition mit Zielantigen identifiziert und isoliert [10].

Bei Verabreichung von mAK ist es möglich, sich mehrerer Wirkungsmechanismen zur Bekämpfung von Krebszellen zu bedienen (siehe Abbildung 3). Diese basieren (fast) immer auf der Bindung des mAK an ein Oberflächenantigen der Tumorzelle.

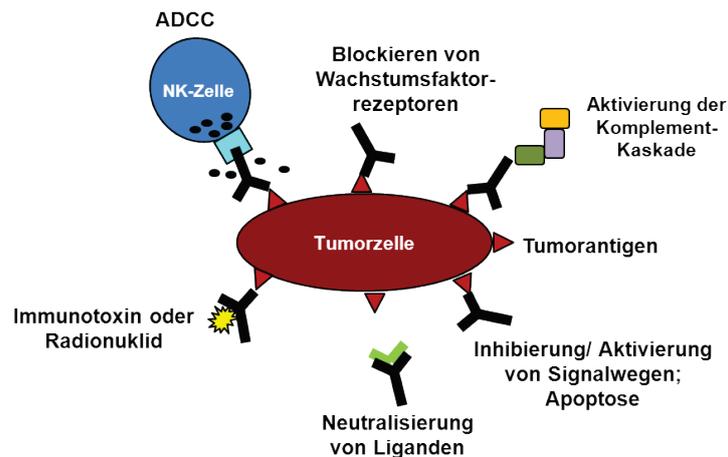


Abbildung 3: Wirkungsmechanismen von monoklonalen Antikörpern in Bezug auf Elimination des Tumors

Für die Elimination von Tumorzellen durch mAK stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Diese basieren zu größten Teilen auf der Bindung des mAKs an die Oberfläche der Tumorzelle. Hierzu zählt die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), was zu einer Lyse der Tumorzelle durch antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität führt (ADCC). Des Weiteren führt die Bindung eines mAKs an ein Tumorantigen zur Aktivierung der Komplement-Kaskade, was ebenfalls in der Zerstörung der Krebszelle resultiert. Die Markierung eines mAKs mit Toxinen bewirkt eine gezielte Akkumulierung dieser Toxine an den Krebszellen. Zusätzlich kann eine Bindung an ein Tumorantigen Signalwege aktivieren bzw. abschalten sowie die Bindung von Wachstumsfaktoren unterbinden. Als einziges nicht auf Bindung an ein Tumorantigen basierend ist die antikörperbedingte Neutralisierung von Liganden.

- Antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC): Der Antikörper wird nach Bindung an ein Tumor-assoziiertes Antigen über seinen Fc-Teil von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erkannt. Daraufhin werden Vesikel mit lytischen Proteinen freigesetzt und die Krebszelle verdaut.
- Blockieren von Wachstumsfaktoren: Die Bindung von mAKs an die Oberfläche der Tumorzelle verhindert die Bindung eines Wachstumsfaktors und damit die Signalweiterleitung (z.B. HER2 beim Mammakarzinom).
- Aktivierung der Komplementkaskade: Durch Bindung des Antikörpers an ein Tumorantigen wird ein Set von Plasmaproteinen aktiviert. Diese wirken kaskadenartig zusammen, was in der Bildung von Poren in der Krebszellmembran und deren Destabilisierung resultiert.
- Inhibierung/ Aktivierung von Signalwegen: mAK können über Andocken an ein Tumorantigen entweder Signalwege auslösen oder blockieren (z.B. Inhibierung der Zellzyklusprogression, Apoptose, etc. [8]).
- Neutralisierung von Liganden: durch die Erkennung eines Liganden von einem mAK wird dessen Bindung an das entsprechende Antigen unterbunden.
- Immunotoxine oder Radionuklide: Es ist möglich, mAK mit Toxinen zu koppeln (z.B. ¹³¹Iod, Rizin, Exotoxin A). Durch die spezifische Antigen-Antikörper Bindung wird das Toxin nur zu Zielzellen transportiert, von diesen internalisiert und kann dort seine Wirkung entfalten [11].

Der erste für therapeutische Zwecke zugelassene mAK (1996) war der Antikörper Muromonab-CD3 (OrthoClone OKT3). Er bindet an das CD3-Antigen auf T-Zellen und wird zur Immunsupprimierung bei Transplantationen eingesetzt [12].

Heutzutage ist eine Vielzahl an Antikörpern für diverse Indikationen zugelassen. Zu den Anwendungsgebieten zählen die Rheumatologie, die Dermatologie, die Gastroenterologie, die Neurologie, die Allergologie, chronisch-entzündliche Erkrankungen sowie die Onkologie (hauptsächlich hämatologische Tumore [13]).

In der Krebstherapie werden mAK zumeist in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt [1]. Beispiele sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: mAK in der Tumorthherapie

Antikörper	Zielmolekül	Krankheit
Rituximab	CD20	Follikuläres Lymphom
Alemtuzumab	CD52	Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)
Trastuzumab	HER2/ neu	Mammakarzinom (mit HER2 Überexpression)
Bevacizumab	VEGF	divers

Zwei unterschiedliche Gruppen von Antikörpern finden hierbei Anwendung: Antikörper, die definierte Antigene auf der Zelloberfläche erkennen sowie Antikörper, die in die Regulation der Gefäßneubildung eingreifen [14].

Zur ersten Gruppe zählt der Antikörper Trastuzumab (Herceptin) der Firma Roche. Dieser bindet an den Wachstumsfaktorrezeptor HER2 und hemmt so die Proliferation von Tumorzellen [15]. Herceptin wird sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit einem Chemotherapeutikum verabreicht. Es führt zur Verbesserung des progressionsfreien sowie des Gesamtüberlebens von Brustkrebspatientinnen (bei verlängerter Gabe bis zu einem Jahr nach Therapieende) [14].

Zu den Angiogenese-hemmenden mAK zählt der Antikörper Bevacizumab (Avastin, Roche). Überschreitet ein Tumor eine bestimmte Größe, so wird er nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Aus diesem Grund ist der Tumor darauf angewiesen, Gefäßneubildung anregen zu können. Für die Neubildung von Blutgefäßen sind spezielle Wachstumsfaktoren, die sog. Angiogenese-Faktoren verantwortlich, z.B. der Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor). Bevacizumab neutralisiert VEGF und kann somit besonders schnell wachsende Tumore in ihrem Wachstum hemmen. Da durch Bevacizumab auch die normale Neubildung von Blutgefäßen stark beeinträchtigt wird, ist die Therapie mit

erheblichen Nebenwirkungen, wie z.B. arterieller Hypertonie verbunden. Avastin wird beim metastasierenden kolorektalen Karzinom, beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sowie beim metastasierenden Mammakarzinom angewendet [8].

Den erhofften Erfolg in der Klinik als Monotherapie konnten mAK bisher nicht herbeiführen. Daher werden sie überwiegend mit anderen Therapeutika kombiniert. Optimierungsansätze von mAK beinhalten das Anhängen von Toxinen sowie die Mutagenese der Fc-Domäne, um eine Verbesserung von Bindung und Aktivierung zu erzielen [16].

2.1.1.2 Bispezifische Antikörper

Eine weitere Verbesserung des Antikörperkonzeptes stellen bispezifische Antikörper dar. Diese sind in der Lage, Effektorzellen des Immunsystems, wie z.B. T-Zellen oder Makrophagen, zu rekrutieren. Die Idee, bispezifische Antikörper zu generieren, wurde in den 1980 Jahren entwickelt [4].

Idealerweise sollten bispezifische Antikörper [17]

- nicht immunogen, also nicht murin sein,
- eine definierte Struktur besitzen,
- eine Aktivierung von Effektorzellen nur in Anwesenheit von Tumorantigen hervorrufen,
- keine Fc-Region besitzen, um Fc-vermittelte Zytokin-Ausschüttung zu vermeiden,
- klein genug sein, um einen Tumor infiltrieren zu können sowie
- groß genug sein, um eine Wirkung erzielen zu können (die Halbwertszeit darf nicht zu gering sein).

Bispezifische Antikörper können über verschiedene Wege hergestellt werden. Zu den frühen Methoden zählen die Hybrid-Hybridoma-Technologie (Fusion von zwei Hybridomen = Quadroma) sowie chemische Quervernetzung zweier IgG-Moleküle. Beide Methoden sind mit Schwierigkeiten behaftet, da es zum einen häufig zur Entstehung nicht funktioneller Nebenprodukte kommt und zum anderen der Aufreinigungsprozeß extrem aufwendig ist.

Eine Ausnahme stellen an dieser Stelle TriomAbs dar. Diese gehören zur Gruppe der Hybrid-Hybridome und wurden erstmals 1995 synthetisiert [18]. Sie bestehen aus murinen sowie Ratten-stämmigen Immunglobulin-Ketten. Durch die präferentielle Hybridisierung von Ratte/Ratte und Maus/ Maus leichten und schweren Ketten entstehen bei diesem Ansatz weniger unerwünschte und inaktive Nebenprodukte. Für die Aufreinigung von TriomAbs wird Protein A

verwendet. Die Tatsache, dass nur murine, nicht aber Ratten-stämmige Ketten an Protein A binden können, vereinfacht den Aufreinigungsprozeß maßgeblich. Ein Beispiel für TriomAbs ist der Antikörper Catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3), der 2009 in Europa zur Behandlung von malignem Aszites zugelassen wurde [19]. TriomAbs gehören neben den sog. BiTE Antikörpern (siehe 2.1.2) zu den therapeutisch am vielversprechendsten bispezifischen Antikörpern [20].

Durch enzymatischen Verdau von bispezifischen Antikörpern aus Quadroma-Zellen entstehen bispezifische $F(ab')_2$ -Fragmente [21]. Das Fehlen des Fc_γ -Teils führt hierbei zu einer Verringerung von Nebenwirkungen. Auch chemische Kreuzvernetzung von unterschiedlichen Fab-Fragmenten (siehe Abbildung 4) über Cysteinreste der Hinge-Region wird durchgeführt. Diese führt hierbei zu weniger ungewollten Nebenprodukten als die Vernetzung von kompletten IgG-Molekülen.

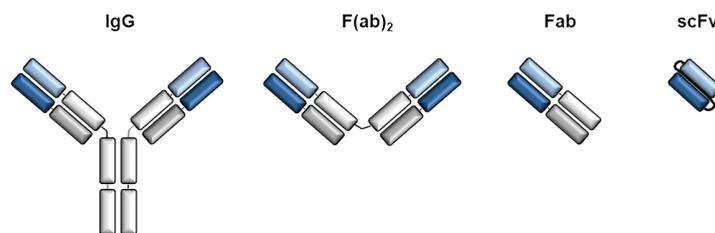


Abbildung 4: Antikörper und Antikörperfragmente

Ein kompletter IgG-Antikörper besteht aus zwei Fab- sowie einer Fc-Region. Wird letztere durch proteolytischen Verdau entfernt, so entstehen $F(ab)_2$ - sowie Fab-Fragmente. Einzelkettenantikörper (scFv: single-chain fragment variable) werden gentechnisch über die Verknüpfung einer variablen V_H - mit einer variablen V_L -Domäne mittels eines Verbindungspeptids hergestellt.

Die nächste Entwicklungsstufe stellten rekombinant hergestellte bispezifische Antikörper dar. Hierbei wurden durch gentechnische Methoden sowohl die Immunogenität als auch der Anteil falsch gepaarter Moleküle deutlich verringert. Zum einen wurden Maus- bzw. Ratten-Sequenzen durch humane ersetzt, wodurch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern stark reduziert werden konnte. Zum anderen wurden durch die sog. „knobs-into-holes“ Strategie [22] Modifikationen an der C_{H3} Domäne vorgenommen: An einer schweren Kette wurde eine kurze Seitenkette angefügt (knob), an die C_{H3} der anderen schweren Kette eine lange Seitenkette (hole). Dies führte zu präferentieller Bindung dieser beiden Ketten und konnte somit den Anteil falsch gepaarter Moleküle deutlich verringern.

Rekombinant hergestellte bispezifische Antikörper auf single-chain-Basis (siehe Abbildung 4) besitzen den Vorteil, dass sie keinen Fc-Teil aufweisen (keine Fc-vermittelten Effekte). Zu

single-chain-Varianten zählen tandem single-chain Fv-Fragmente, bispezifische Diabodies (Db) sowie single-chain Diabodies (scDb) (siehe Abbildung 5).

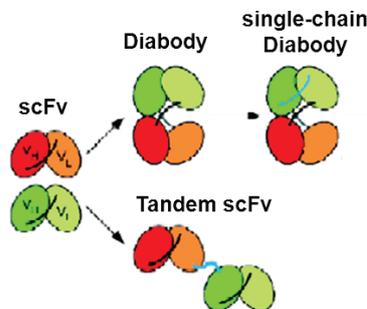


Abbildung 5: Bispezifische Antikörper

Zu den am weitesten verbreiteten bispezifischen Antikörpern zählen Diabodies sowie tandem single-chain Fv-Fragmente. Beiden Formaten liegen jeweils scFv-Fragmente zugrunde (modifiziert nach [17]).

Diese Formate basieren jeweils auf Einzelkettenantikörpern mit verschiedenen Spezifitäten, die miteinander verbunden werden. Bei Diabodies ist das Verbindungspeptid ca. 5 Aminosäuren lang. Die Kürze des Linkers erzwingt hierbei eine Dimerisierung der leichten und schweren variablen Domänen. Da bei Diabodies zwei verschiedene Polypeptidketten in einer einzigen Zelle exprimiert werden, kann es zur Ausbildung von inaktiven Homodimeren kommen.

ScDb besitzen einen zusätzlichen Linker von etwa 15 Aminosäuren Länge. Dies bedingt, dass sämtliche Moleküle, die die richtige Größe besitzen (50-60 kDa), im Gegensatz zu Db auch bispezifisch sind. Sowohl scDb als auch Db können löslich in Bakterien produziert werden [17].

Tandem single-chain Fv-Fragmente besitzen einen im Vergleich zu Db längeren Linker von bis zu 63 Aminosäuren. Sie sind in Bakterien nicht löslich zu produzieren, sondern bilden Aggregate. Aus diesem Grund wird der Großteil an tandem single-chain Fv-Fragmenten in Säugerzellen produziert. Eine in *E. coli* produzierte Ausnahme stellt ein HER2 x CD16 tandem single-chain-Fv Fragment dar, welches NK-Zellen zum humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 rekrutiert [23].

Zu den tandem single-chain Fv-Fragmenten gehören die von der Firma Micromet entwickelten BiTE Antikörper.

2.1.2 Aufbau von BiTE Antikörpern

BiTE Antikörper (Abbildung 6) bestehen aus zwei Einzelketten, die jeweils unterschiedliche Zielantigene erkennen: Ein Arm des BiTE Moleküls bindet das CD3 ϵ -Antigen auf T-Zellen (im Gegensatz zu mAKs, die nur Immunzellen mit Fc γ -Rezeptoren, wie NK-Zellen oder Makrophagen, binden können, sind BiTE Antikörper in der Lage, T-Zellen zu rekrutieren [24]). Die Rekrutierung von T-Zellen stellt ein vielversprechendes Konzept dar, da diese ein hohes zytotoxisches Potential besitzen, großflächig verbreitet im Körper vorkommen, eine „Such-und-Zerstör-Funktion“ besitzen und in der Lage sind, Entartungen, zumindest im Anfangsstadium, zu eliminieren [25]. Eine positive Korrelation zwischen Anwesenheit von T-Zellen im Tumor und Überleben konnte bereits für das Non-Hodgkin-Lymphom [26] sowie für Kolonkarzinome [27] gezeigt werden.

Der zweite Arm erkennt ein spezifisches Tumorantigen, z.B. das MCSP- (Melanom assoziiertes Chondroitin Sulfat Proteoglykan) Antigen (siehe 2.2.2). Die Verbindung der beiden Einzelketten erfolgt kovalent über einen nicht-immunogenen Peptid-Linker (Glycin-Serin-Linker) [28]. Beide Arme des BiTE Antikörpers können hierbei frei umeinander rotieren, was die Bindungsfähigkeit stark positiv beeinflusst [29].

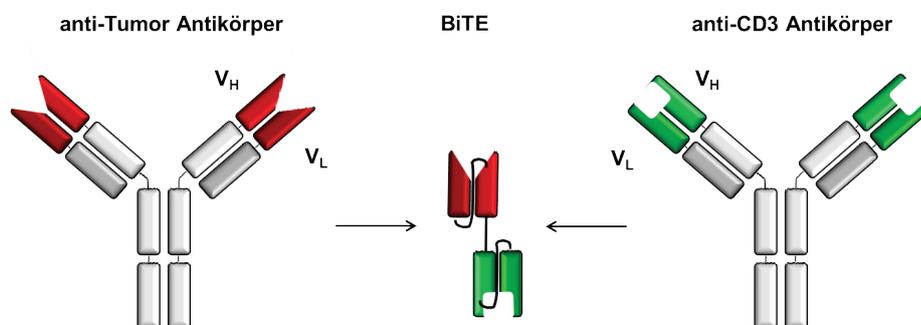


Abbildung 6: Aufbau von BiTE Antikörpern

Durch die Verbindung der variablen Domänen eines anti-CD3 ϵ -Antikörpers (N-terminal) mit denen eines anti-Tumor-Antikörpers (C-terminal) entsteht ein tandem single-chain Fv-Fragment, welches in der Lage ist, T-Zellen zur Lyse von Tumorzellen zu rekrutieren.

Am C-Terminus der anti-CD3-Kette besitzt das BiTE Molekül eine Hexahistidin-Sequenz. Diese erlaubt eine Aufreinigung der BiTE Antikörper aus Zellkulturüberstand über Affinitätschromatographie. Insgesamt sind BiTE Moleküle 55-60 kDa groß, sie sind nicht glykosyliert [30] und weisen eine hohe Stabilität auf.

Im Jahre 2008 konnte erstmals die Wirksamkeit von BiTE Molekülen in Patienten (rezidiertes Non-Hodgkin-Lymphom) nachgewiesen werden (clinical proof-of-concept) [5]. Zum jetzigen Zeitpunkt befinden sich drei BiTE Antikörper in der Klinik: MT103, ein gegen CD19 gerichtetes

Molekül, MT110 mit dem Zielantigen EpCAM [31] sowie MT111, ein gegen CEA gerichtetes BiTE [32]) sowie diverse BiTE Antikörper in der präklinischen Entwicklung (darunter ein anti-PSMA BiTE und ein MCSP-spezifisches BiTE [33]. Weitere weilen auf niedrigeren Entwicklungsstufen.

Das Hauptanwendungsgebiet von BiTE Antikörpern stellt die Onkologie dar. Es wird jedoch auch an BiTE Antikörpern gearbeitet (IgE BiTE), welche Einsatz in der Behandlung von Asthma und Allergien finden sollen [25].

2.1.3 Charakteristika und Wirkmechanismus von BiTE Antikörpern

BiTE Antikörper vermitteln eine Zielzell-spezifische Lyse bei pico- bis femtomolaren Konzentrationen [31]. Die Bindung an das Zielantigen ist hierbei hoch spezifisch. Eine Bindung an das CD3-Antigen auf T-Zellen alleine löst keine Aktivierung der T-Zelle aus. Im Falle einer „natürlichen“ T-Zellaktivierung (über MHC I mit gebundenem Peptid) ist es notwendig, dass eine bestimmte Anzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche zusammen kommen. BiTE Antikörper auf Zielzellen bilden eine Matrix, die diesen Effekt imitiert. BiTE Bindung an das CD3-Antigen alleine reicht somit für eine Aktivierung nicht aus [34], sondern beidarmiges Binden des BiTE Antikörpers ist eine Voraussetzung für eine T-Zellaktivierung. Hierbei können mehrere T-Zell-Subpopulationen aktiviert werden. Als am effektivsten haben sich T-Effektor-Gedächtniszellen erwiesen [35].

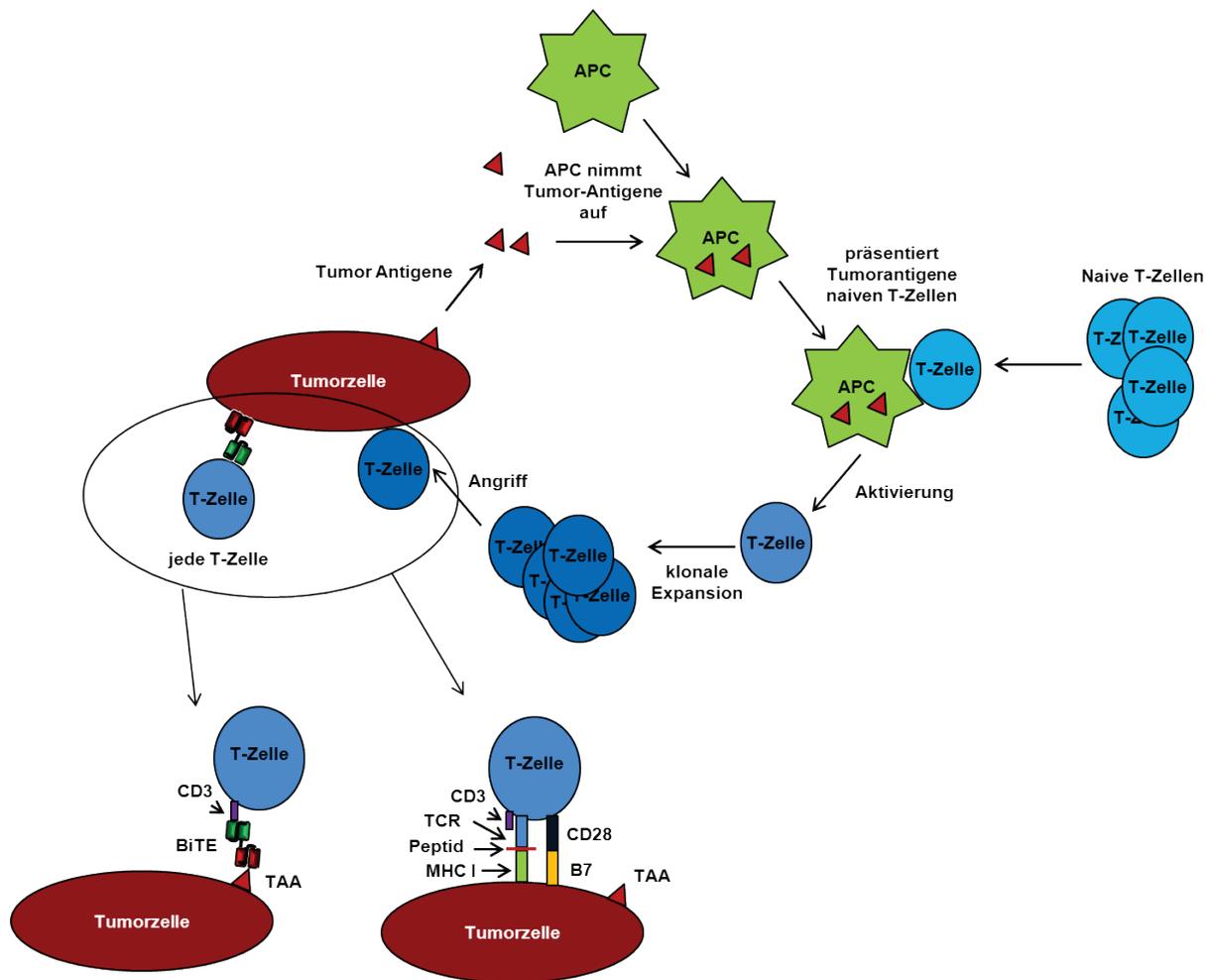


Abbildung 7: T-Zellaktivierung auf natürlichem Wege und über BiTE Antikörper

Durch Absterben von Tumorzellen werden Tumorantigene (TAA) freigesetzt. Diese können von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen werden und T-Zellen präsentiert werden. Der Kontakt zwischen einer APC mit einer für das entsprechende Tumorantigen spezifischen T-Zelle führt zur Aktivierung dieser naiven T-Zelle sowie deren Proliferation. Die entstandenen T-Zellklone sind im Folgenden in der Lage, unter Einwirkung von zusätzlichen costimulatorischen Signalen, Tumorzellen, die das entsprechende Tumorantigen auf der Oberfläche präsentieren, zu eliminieren. Erfolgt die Aktivierung einer T-Zelle über ein BiTE Molekül, so sind weder eine Spezifität für das entsprechende Tumorantigen noch costimulatorische Signale für ein Abtöten der Tumorzelle erforderlich.

Eine natürliche T-Zellaktivierung erfordert gewisse Rahmenbedingungen (Abbildung 7). Zu diesen zählen:

- a) Aufnahme und Präsentation von Tumorantigenen durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC): Tumor-assoziierte Antigene werden von APC aufgenommen und auf deren Oberfläche dargeboten [25].
- b) Bindung des Tumorantigens durch einen spezifischen T-Zellklon: Bindet eine für dieses Tumorantigen spezifische T-Zelle, so kommt es zu deren Aktivierung sowie klonalen Expansion [36].

- c) Präsentation von Tumorantigenen über MHC I-Moleküle (major histocompatibility complex) auf der Oberfläche der Tumorzelle: Die aktivierte T-Zelle erkennt entsprechende Tumorzellen daran, dass diese Tumorpeptide über MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche anzeigen [30].
- d) Vorhandensein von costimulatorischen Signalen für die T-Zellaktivierung: Zur Bildung einer zytolytischen Synapse kann es nur kommen, wenn zusätzlich zur Bindung des T-Zellrezeptors kostimulatorische Rezeptoren besetzt werden (z.B. durch Bindung von B7 an das CD28 Antigen auf T-Zellen). Fehlen diese Signale, so können T-Zellen trotz Aktivierung durch ein Tumor-assoziiertes Antigen nur unzureichende Mengen an Zytokinen produzieren, was zu Anergie sowie Apoptose von T-Zellen führt [37].

Für eine Aktivierung von T-Zellen über BiTE Antikörper ist [30, 31]

- a) keine Antigenpräsentation über APC nötig,
- b) kein spezifischer T-Zellklon erforderlich, sondern T-Zellen werden über einen BiTE Antikörper polyklonal aktiviert,
- c) keine Prozessierung von Antigenen sowie Assoziation mit dem MHC-Molekülen erforderlich, sondern die Erkennung wird über membranständige Antigene vermittelt (keine Prozessierung nötig) und
- d) keine zusätzlichen kostimulatorischen Signale vonnöten.

Prinzipiell ähnelt eine T-Zellaktivierung durch BiTE Antikörper stark einer natürlichen Aktivierung. Die Bindung eines BiTE Antikörpers an sowohl ein Tumorantigen auf Krebszellen als auch an das CD3 ϵ -Antigen auf T-Zellen führt zur Aktivierung sowie Proliferation letzterer. Hierbei reicht eine sehr geringe Anzahl an BiTE Antikörpern aus (analog reicht im natürlichen Aktivierungsweg bereits die Aktivierung einer einstelligen Anzahl an T-Zellrezeptoren aus [25]). Die BiTE-vermittelte Annäherung von Tumor- und T-Zelle führt zur Ausbildung einer zytolytischen Synapse [38] (Abbildung 8), die sich von einer regulären zytolytischen Synapse nicht unterscheiden lässt [39].

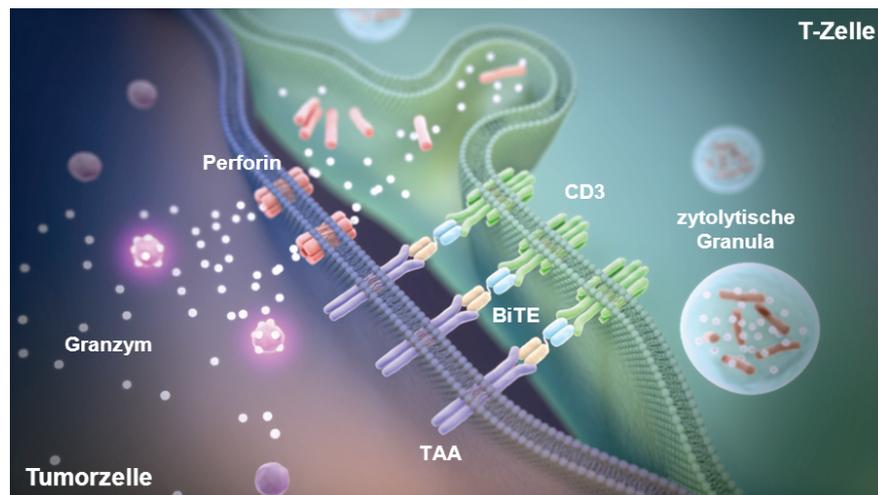


Abbildung 8: BiTE-vermittelte Lyse von Zielzellen (modifiziert nach www.micromet.com)

Zeitgleiche Bindung von BiTE Molekülen an T-Zellen (CD3-Antigen) sowie Tumorzellen (Tumorassoziiertes Antigen TAA) führt zur Aktivierung von T-Zellen sowie zur Ausbildung einer zytolytischen Synapse. Diese unterscheidet sich hierbei nicht von einer regulären zytologischen Synapse (außer, dass bei Aktivierung von T-Zellen durch BiTE Antikörper das Fehlen von MHC I/ Peptid-Komplexen nicht von Bedeutung ist). Es kommt zur Freisetzung von zytotoxischen Granula, die einen Cocktail aus toxischen Proteinen enthalten: Perforin durchlöchert die Zellmembran der Zielzelle, Granzyme, eine Form von Proteasen, spalten Proteine im Inneren der Tumorzellen. Dies führt zum Absterben der Tumorzelle durch Apoptose.

Diese besteht aus zwei Regionen: einem Bereich, der der Aktivierung von T-Zellen dient und Signalmoleküle anreichert sowie einem Bereich, der eine Übertragung von toxischen Proteinen auf die Zielzelle ermöglicht. Beide Regionen sind von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen umgeben. Die Freisetzung von toxischen Granula führt zur Durchlöcherung der Zellmembran (Perforine) sowie zur Spaltung von Proteinen innerhalb der Tumorzelle (Granzyme) und somit schließlich zum Tod der Krebszelle durch Apoptose [24].

Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer seriellen Eliminierung von Tumorzellen, die T-Zellen bleiben über mehrere Stunden mobil und scannen Zellen in ihrer Umgebung [40]. Somit werden nur sehr wenige T-Zellen (Effector) im Verhältnis zu Tumorzellen (Target) benötigt (E:T Ratio von 1:5 *in vitro* [41]). Auch wird ein BiTE Antikörper bei der Zelllyse nicht abgebaut, sondern bleibt löslich und kann weitere spezifische Lysen vermitteln. Somit ist von BiTE Antikörpern nur eine geringe Konzentration für eine effektive Lyse von Zielzellen erforderlich [25].

Eine herausragende Eigenschaft von BiTE Antikörpern besteht darin, dass sie im Gegensatz zu anderen therapeutischen Antikörpern als Monotherapie eingesetzt werden können und keine zusätzliche Behandlung mittels Chemotherapie benötigt wird [5].

2.1.4 Kriterien für die Produktion eines BiTE Antikörpers

Für den Einsatz eines therapeutischen Antikörpers in der Klinik muss gegeben sein, dass die Produktqualität sowie die Produkteigenschaften konstant bleiben. Daher sind einige Faktoren unerlässlich:

1) Hoher Titer

Auch wenn BiTE Antikörper 100x – 10.000x effizienter sind als mAK [41], so ist es essenziell, dass eine Produzentelinie hohe Titer hervorbringt, um eine ökonomische Produktion und damit eine Vermarktung des Endprodukts zu ermöglichen. Standardmäßig werden BiTE Moleküle in CHO-Zellen hergestellt, da diese in der Lage sind, korrekte posttranslationale Modifikationen auszubilden und die Produktion in eukaryotischen Zellen zu wesentlich höheren Titern führt als die Produktion in Prokaryoten (tandem single-chain Fv-Fragmente können allgemein in Bakterien nicht löslich produziert werden; siehe 2.1.1.2).

2) Produkthomogenität

a. Oligomerisierung

Wie alle scFv sind BiTE Moleküle in der Lage, zu aggregieren. Dies geschieht bevorzugt bei hohen Proteinkonzentrationen [42, 43]. Eine Transition von einem Monomer in ein Dimer basiert auf vielen verschiedenen Faktoren, darunter die Länge des Peptidlinkers, die Sequenz des Antikörpers sowie externe Faktoren (Temperatur, Puffer, pH, etc.) [43]. Im Patienten ist jedoch nur die monomere Version des scFv einsetzbar. Für das BiTE Molekül MT110 (anti-EpCAM x anti-CD3) konnte gezeigt werden, dass das Dimer zwar eine höhere Avidität für das EpCAM- sowie das CD3-Antigen besitzt, jedoch keine höhere Bioaktivität aufweist [44]. Des Weiteren sind Dimere in ihrem Verhalten nicht klar definierbar. Daher stellt im Falle von BiTE Antikörpern nicht nur der Titer ein ausschlaggebendes Kriterium dar, sondern auch der Monomergehalt.

Manche BiTE Antikörper neigen zu einem hohen, manche zu einem niedrigen Dimergehalt, obwohl die in dieser Arbeit betrachteten BiTE Moleküle alle denselben CD3-Binder besitzen. Hierbei handelt es sich um BiTE Antikörper der neuen Plattform, welche eine 100 % Kreuzreaktivität zwischen Mensch (*Homo sapiens*) und Langschwanzaffe (*Macaca fascicularis*) aufweisen.

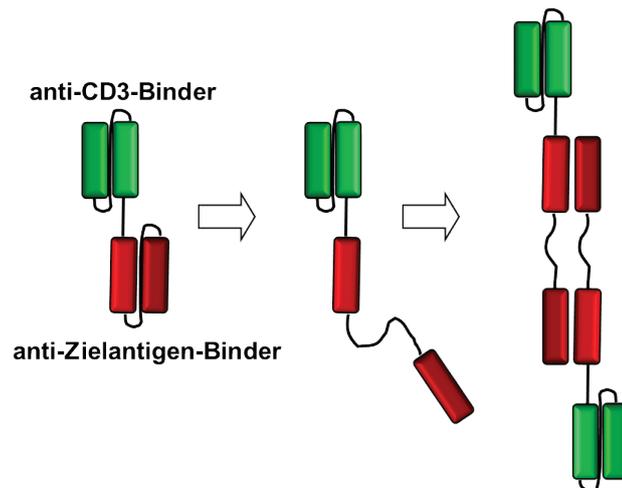


Abbildung 9: Theorie der Dimerbildung von BiTE Molekülen

Obwohl bislang nicht bewiesen, wird zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen, dass die Dimerbildung hauptsächlich am anti-Zielantigen-Arm des BiTE Antikörpers stattfindet. Hierzu werden die Bindungen zwischen der leichten und der schweren Kette des anti-Zielbinders gelöst und die Ketten klappen auf. Geschieht dies bei zwei BiTE Molekülen, so ist eine Dimerisierung innerhalb dieser beiden möglich.

Daher ist davon auszugehen, dass die Dimerbildung der BiTE Antikörper der neuen Plattform hauptsächlich vom anti-Zielantigen-Arm ausgeht (Abbildung 9). Eine Modellannahme besteht darin, dass bei zwei BiTE Antikörpern die leichten und die schweren Ketten des anti-Zielantigen Binders aufklappen. Nun ist eine Bindung zwischen den leichten und schweren Ketten zwei verschiedener BiTE Antikörper möglich und es kommt zur Bildung eines Dimers. Der Grad der Dimerisierung variiert sowohl zwischen verschiedenen Konstrukten als auch zwischen unterschiedlichen Klonen eines Konstrukts. Eine Diskriminierung zwischen Monomeren und Oligomeren ist über Größenausschlusschromatographie möglich, aber auch durch multimodale Chromatographie, wie z.B. Hydroxyapatit-Chromatographie.

b. Längenvariationen

Für eine Homogenität des Produkts ist eine verlässliche Abspaltung des Signalpeptids unerlässlich. Das für BiTE Antikörper verwendete Signalpeptid besteht aus 19 Aminosäuren und wurde einem Maus-Antikörper (NIP-spezifische-V_H-Kette) entnommen [45, 46]. Die Abspaltung erfolgt durch das Enzym Signalpeptidase, wobei die letzten Aminosäuren die wichtigsten für eine korrekte Prozessierung darstellen [47]. Eine korrekte Abspaltung lässt sich über Gelelektrophorese oder Größenausschlusschromatographie überprüfen.

Ebenfalls längenverändernd kann sich das Vorhandensein von aktiven Proteasen während der Zellkultivierung auswirken. Vor allem C-terminaler Abbau stellt ein zu bewältigendes Problem dar. Das Fehlen von einzelnen Aminosäuren kann über Massenspektrometrie bestimmt werden.

Abhilfe schaffen hier in der Regel Veränderungen der Kultivierungsbedingungen, wie z.B. des pH-Wertes oder der Temperatur.

3) Produktstabilität

Therapeutische Antikörper müssen unter physiologischen Bedingungen stabil sein, um ihre Wirkung entfalten zu können. Das heißt, dass sie bei 37°C über mehrere Stunden funktionell bleiben müssen ohne zu aggregieren oder abgebaut zu werden [48]. Gerade tandem single-chain Fv-Fragmente, zu denen auch BiTE Antikörper gehören, zählen zu denjenigen Molekülen, die dafür bekannt sind, unter physiologischen Bedingungen schnell inaktiviert zu werden [49]. Ein möglicher Ansatz, die Stabilität zu verbessern, ist das Einfügen von Disulfidbrücken zwischen den V_H - und den V_L -Domänen [17]. Des Weiteren müssen therapeutische Antikörper eine langfristige Stabilität bei 4°C bzw. -20°C aufweisen, um über Produktion, Versand und Lagerung in therapeutischen Zentren aktiv zu bleiben.

Die thermische Stabilität von BiTE Antikörpern wird bestimmt durch Inkubation des Antikörpers bei verschiedenen Temperaturen und anschließendem Test auf Vorhandensein von Bindung im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) oder über Dynamische Differenzkalorimetrie.

2.1.5 Stabile Zelliniengenerierung von BiTE Antikörpern

Um all diese Voraussetzungen gewährleisten zu können, muss sowohl die Auswahl des Konstrukts als auch die des Zellklons sehr sorgfältig getroffen werden. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Sequenz des Konstrukts auch der Zellklon einen Einfluss auf den Monomergehalt sowie C-terminale Prozessierungen (Proteaseabbau) hat.

Im Bereich der Klonselktion kann dies nur durch Analyse einer sehr hohen Anzahl an Klonen garantiert werden. Dies geschieht für BiTE Moleküle ohne Automation und ist daher ein zeitaufwendiger und kostspieliger Prozess.

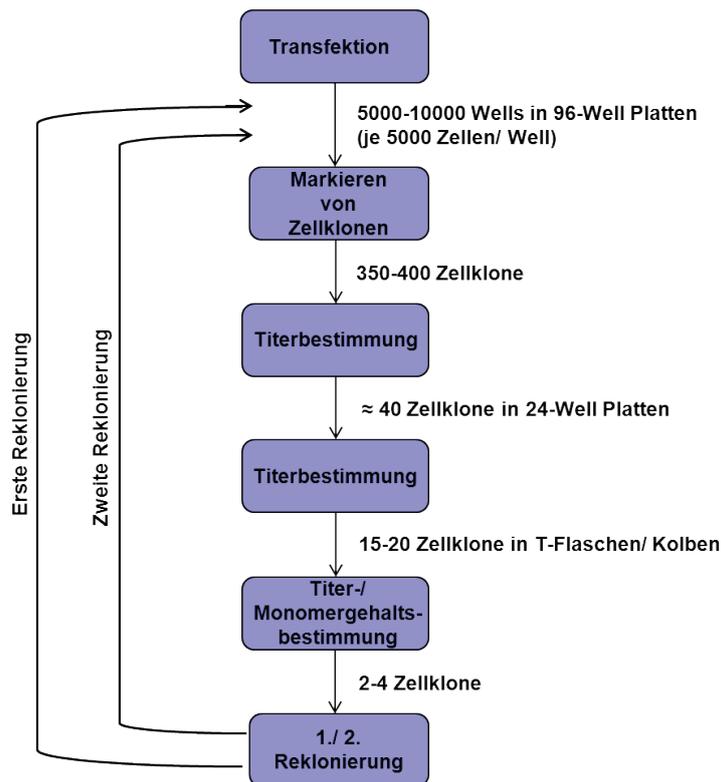


Abbildung 10: Stabile Zelliniengenerierung von BiTE Antikörpern

Für die Selektion eines Produzentenklons werden nach der Transfektion 5000 bis 10.000 Wells ausgesät. Nach etwa 14 Tagen werden diejenigen Vertiefungen markiert, in denen Zellkolonien hochgewachsen sind. Nach Titerbestimmung dieser werden die besten Kolonien in neue Platten übertragen, für einige Tage kultiviert und erneut eine Titerbestimmung durchgeführt. Die besten 15-20 Kolonien werden in Kolben transferiert und dort auf Wachstum, Titer sowie Monomergehalt untersucht. Die besten zwei bis vier Klone werden zuletzt über „Limited Dilution“ rekloniert. Dieser Schritt soll sicherstellen, dass es sich beim finalen Kandidaten um einen Klon und nicht um Poolzellen handelt.

Im Zuge einer stabilen Zelliniengenerierung (Abbildung 10) wird eine hochkonzentrierte Zellsuspension mittels Elektroporation transfiziert und anschließend auf 96-Well Platten verteilt. Hierbei werden mindestens 50-100 96-Well Platten ausplattiert mit einer Konzentration von 5000 Zellen/ Vertiefung und nach 48 h der entsprechende Selektionsdruck (Glutaminentzug, Methionin Sulphoximin) angelegt. Etwa zehn Tage später werden diejenigen Vertiefungen markiert, in denen Kolonien gewachsen sind (ca. 350-400 Kolonien). Diese werden über ELISA auf BiTE Produktion geprüft und die besten in 24-Well Platten übertragen (etwa 40 Kolonien). Nach einigen Tagen erfolgt erneut eine Titerbestimmung und die besten 15 bis 20 Klone werden in T-Flaschen und später in Kolben übertragen. Dort wird deren Wachstum, BiTE Produktion sowie der Monomergehalt der BiTE Antikörper überprüft. (Die Überprüfung des Monomergehalts ist erst ab diesem Stadium möglich). Die besten zwei bis vier Klone werden zuletzt über „Limited Dilution“ rekloniert. Hierbei wird eine gering konzentrierte Zellsuspension auf 96-Well Platten verteilt, so dass eine Zelldichte von unter einer Zelle pro Well entsteht. Der

Selektionsprozess ist derselbe wie bei der initialen Transfektionsrunde. In der Regel werden zwei Reklonierungen durchgeführt. Dies soll sicherstellen, dass der resultierende, finale Kandidat klonal ist, d.h. von nur einer einzigen Zelle abstammt. Der gesamte Prozess dauert in der Regel sechs bis neun Monate.

2.2 Das maligne Melanom & das MCSP-Antigen

Als Beispielmolekül wurde in dieser Arbeit das MCSP-G10 BiTE verwendet. Dieses richtet sich gegen das im Melanom vorkommende Antigen MCSP (Melanom-assoziiertes Chondroitin Sulfat Proteoglykan).

2.2.1 Das maligne Melanom

Beim malignen Melanom kommt es zu einer Entartung der Melanozyten der Haut. In selteneren Fällen können auch die Schleimhaut, die Aderhaut oder die Hirnhaut betroffen sein [50]. Melanozyten sind für die Versorgung von Keratinozyten mit dem Pigment Melanin verantwortlich, welcher die Zellen vor UV-Strahlung schützt.

Es handelt sich hierbei um die Krebsart mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz [51], wobei der weiße Anteil der Bevölkerung wesentlich stärker betroffen ist als der dunkelhäutige Anteil [52]. Dieser Anstieg lässt sich auf ein erhöhtes Sonnenverhalten der Bevölkerung sowie auf die fortschreitende Zerstörung der Ozonschicht zurückführen [53].

Das maligne Melanom besitzt ein hohes Metastasierungspotential und daraus resultierend eine hohe Sterberate [54]. Am häufigsten von Metastasen betroffen sind die Organe Lunge, Leber, Knochen, Gehirn sowie die Lymphknoten.

Hauptsächlich entwickelt sich diese Krebsform aus Naevi und Leberflecken. Die Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert dabei direkt mit der Dicke des Tumors (über 3 mm sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit auf unter 30%) [55].

Therapiert wird das maligne Melanom mittels Mono- oder Polychemotherapien (z.B. Dacarbazin [56]), BCL-2 (B-cell lymphoma 2; ein anti-apoptotisches Protein) Antisense Oligonukleotiden [57], Gabe von immunstimulierenden Substanzen (z.B. IL2) sowie radioaktiv markierten Antikörpern gegen das MCSP-Antigen [58].

2.2.2 Das MCSP-Antigen

Das MCSP-Antigen wurde 1981 entdeckt [59]. Bei diesem Molekül (und seinem besser untersuchten Rattenhomolog NG2) handelt es sich um ein Typ I-Transmembranprotein (>450 kDa). An seinem Glykoproteinkern sind Chondroitinsulfateinheiten gebunden. Die Transmembrandomäne besteht aus 25 hydrophoben Aminosäuren (AS), die extrazelluläre Domäne ist aus 2222 AS aufgebaut [60]. Diese kann in zwei äußere globuläre Bereiche sowie ein zentrales, stabförmiges Mittelstück unterteilt werden [61].

Das MCSP-Antigen ist als Angriffspunkt für Antikörper-basierte Therapien besonders gut geeignet, da es in über 90% aller Melanome exprimiert wird und dabei in über 80% der Zellen innerhalb einer Läsion [62], in ausdifferenzierten Melanozyten jedoch nicht vorkommt [63]. Abgesehen von der Haut wird MCSP im ausdifferenzierten Gewebe nur selten exprimiert, wie zum Beispiel auf glatten Muskelzellen, ist an diesen Stellen jedoch sehr wahrscheinlich nicht zugänglich. Des Weiteren wird MCSP in sich entwickelnden Geweben exprimiert, wie z. B. in sich bildenden Blutgefäßen [64].

Die biologische Funktion von MCSP ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass MCSP eine wichtige Rolle bei der Migration und Invasion von Zellen in das Gewebe sowie der Neubildung von Blutgefäßen spielt [65-68].

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Für therapeutisch eingesetzte bispezifische Antikörper sind einige Parameter essenziell. Zu diesen zählen Produktstabilität, Produkthomogenität sowie eine hohe Produktionsrate. All dies kann auf Klonebene nur erreicht werden, wenn viele Transfektanten des entsprechenden Konstrukts analysiert und evaluiert werden. Die Selektion hunderter bis tausender Klone macht eine Zelliniengenerierung sehr langwierig und kostspielig. Daher ist jede Möglichkeit der Verkürzung der Zeitlinien oder Reduktion von Kosten willkommen, die die Produktqualität nicht gleichzeitig mindern.

Im Zuge dieser Arbeit sollte ein diagnostisches Screening-System entwickelt werden, welches es erlauben würde, sowohl Produktqualität als auch Quantität von Zelllinien bereits vor Beginn der Generierung abzuschätzen. Dieses Wissen sollte im Folgenden helfen zu entscheiden, ob bestimmte Konstrukte in den langwierigen Prozess der Zelliniengenerierung eingeschleust werden sollten oder ob es bei Abwägung von Kosten/ Nutzen nicht vorteilhafter wäre, ein anderes Konstrukt auszuwählen.

Des Weiteren sollten Alternativen der klassischen Linienengineering betrachtet und bewertet werden. Hierzu zählen Ansätze zur Automation sowie die alternative Produktion von BiTE Antikörpern in Prokaryoten.

Als Beispielmolekül wurde ein gegen das MCSP-Antigen gerichtetes BiTE „MCSP-G10“ verwendet (anti-MCSP x anti-CD3).

3 Material

3.1 Geräte

Äkta™ Explorer	GE Healthcare
Äkta™ Purifier	GE Healthcare
Begasungsbrutschrank HeraCell 240	Kendro
Blot Module Xcell II	Invitrogen
Brutschrank Heraeus BBD 6220	Kendro
Brutschrank OL30-H Schüttelinkubator	Ovan
Brutschrank Minitron Typ AI 72 Schüttelinkubator	Infors
DM-FZ 30eGLumix Digitalkamera	Panasonic
Elektrophoresekammern	Bio-Rad
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
ELISA-Leser	Tecan
ELISA-Waschgerät	Tecan
FACS Calibur	Becton Dickinson
FACS Canto II	Becton Dickinson
Festwinkelrotor GS-3	Kendro
Gammazähler	Perkin Elmer
Geldokumentationsgerät	Syngene
Gelgießstand	Bio-Rad
Gelkammern	Invitrogen
Gelnetzteil	Bio-Rad
Inverses Mikroskop Nikon TE200	Nikon
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge Rotina 46R	Hettich
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss
Magnet zur Zellaufreinigung Dynal MPC-50	Invitrogen
PCR-Robocycler Gradient 96	Stratagene
PCR-Thermocycler	MJ Research
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
POLARstar Optima	BMG Labtech
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HSP12	Kendro
Sonoplus HD 2070 Homogenisator	Bandelin
Thermomixer/-block	Eppendorf
Waagen	Kern; Ohaus
Wasserbad	GFL
Wipptische ELMI;	Labortechnik Fräbel
Wizard 300 Gammacounter	Perkin Elmer
Zellkulturzentrifugen	Kendro; Hettich

3.2 Laborbedarf

Acrylamid-Fertiggele NuPAGE 4-12% Bis-Tris	Invitrogen
Aufkonzentrierungsröhrchen Nanosep	PALL
Einmalkanülen	Terumo
Einmalspritzen	Dispomed

Einwegskalpelle, steril	Ratiomed
ELISA-Platten	Nunc, Greiner
Elektroporierküvetten	Bio-Rad
Eppendorf Caps 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Micronic
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Gelfiltrationssäule HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule Sephadex G 25	GE Healthcare
Gewebekulturplatten, 96 Kammer V-, U-Form, steril	Greiner
Gewebekulturplatten, 6-, 12-, 24-Kammer, steril	Becton Dickinson
Kryoröhrchen	Nunc
Nalgene Filter, steril	Nunc
Ni ²⁺ -NTA Säulen	GE Healthcare
Nitrozellulose Membran Bio Trace NT	Pall
PBMC Isolation Falcons, Leucosep, 30 ml, steril	Greiner
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific
Petrischalen, ø 8,5cm	Greiner
Polystyrene Rundboden Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson
Protein G-Sepharose 4B	Sigma
Pyrogenfreie Polycarbonat Erlenmyerkolben, steril	Corning
Säulengehäuse XK16/20	GE Healthcare
Schwammkissen für Westernblot	Invitrogen
Sephadex-S200 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
Sterilfilter 0,2 µm	PALL
Streptavidin beschichtete Platten	Nunc
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll
XK 16/26 Fractogelsäule	GE Healthcare
Zählkammer	Neubauer
Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc
Zebra™ Desalt Polycarbonat Spin Columns, 2ml	Pierce
Zellkulturröhrchen 50 ml, 15 ml	Becton Dickinson

3.3 Kits

293fectin™ Transfection Reagent	Invitrogen
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Invitrogen
EZ-Link® NHS-PEO ₄ -Biotinylation Kit	Pierce
FreeStyle™ MAX Reagent	Invitrogen
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche
FuGENE® HD Transfection Reagent	Roche
GeneJammer Transfection Reagent	Stratagene
Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents	Invitrogene
Pierce® Biotin Quantitation Kit	Pierce
SatisFfection Transfection Reagent	Stratagene
QIAfilter Plasmid Maxi-Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

3.4 Puffer und Lösungen

1x TAE:	40 mM Tris-Base pH 8,0 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA
6x Formulierungspuffer:	10 mM Citrat-Monohydrat 75 mM Lysin-Monohydrochlorid 24 % (w/v) Trehalose 0,18 % Tween-80
10x PBS:	90 g/l NaCl 14,33 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2,67 g/l KH ₂ PO ₄
CES (Combinatorial Enhancer Solution): (5x)	2,7 M Betain 6,7 mM DTT 6,7 % DMSO 55 µg/ml BSA
Citrat-Lysin Puffer:	25 mM Citrat pH 7,0 200 mM Lysin 5 % Glycerol
FACS-Waschpuffer:	1x PBS 2 % FCS
ELISA-Blockpuffer:	1x PBS 4 % BSA
ELISA-Verdünnungspuffer (PBS-T):	1x PBS 0,05 % Tween-20 1 % BSA
ELISA-Waschpuffer:	1x PBS 0,05 % Tween-20
Ultraschall-Resuspensions-Puffer:	10 mM Tris/HCl 1 mg/ml MgCl ₂ x 6H ₂ O 100 µg/ml Lysozym
Puffer A:	20 mM Na ₂ HPO ₄ 400 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,2
Puffer B:	20 mM Na ₂ HPO ₄ 400 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7,2

3.5 Zellkultur

3.5.1 Reagenzien und Zusätze für die Zellkultur

AAU 10x	26 g/l HEPES (0,1 M); pH 7,2 2,92 g/l Adenosin (11 mM) 0,074 g/l L-Adenosin (0,5 M) 2,4 g/l Uridin (10 mM)	
Erythrozyten-Lysepuffer:	8,29 g/l NH ₄ Cl (0,15 M) 1,00 g/l KHCO ₃ (10 mM) 37,2 mg/l Na ₂ EDTA (0,1 mM)	
1x NEA		Biochrom AG
Bicoll (1,077 g/ml)		Biochrom AG
2-Mercaptoethanol		Gibco
dFCS		Biochrom AG
DMSO		Sigma-Aldrich
EDTA		Biochrom AG
Eosin G		Roth
FCS		Biochrom AG
Heparin		Ratiopharm
HEPES		Biochrom AG
L-Glutamin (200 mM)		Invitrogen
Methionin Sulphoximin		Sigma
Methotrexat (MTX) (0,5 mM)		Hexal
Na-Pyruvat		Biochrom AG
PBS-Dulbecco 1x w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺		Biochrom AG
Phenolrot		Biochrom AG
ReHum IL-2 Proleukin		Novartis
Trypsin		Biochrom AG
Ultrareines Wasser, steril		Biochrom AG

3.5.2 Zellkulturmedien

RPMI ⁺ / dRPMI ⁺	RPMI 1640-Medium (Biochrom AG) 10 % FCS/ dFCS 10 mM HEPES 1x NEAA (100x) 1 mM Na-Pyruvat 500 mM 2-Mercaptoethanol	
HyQ Medium		Thermo Scientific
GIBCO® Freestyle™ 293 Expression Medium		Invitrogen
GIBCO® CD CHO		Invitrogen

3.5.3 Eukaryotische Organismen & Kultivierungsbedingungen

3.5.3.1 Transfektanten

Tabelle 2: Transfektantenlinien, ihre Medien und Kultivierungsbedingungen (LF = Luftfeuchtigkeit)

Zelllinie	Medium	Selektion	Kultivierungsbedingungen	Herkunft	Quelle
CHO MCSP human D3	dRPMI ⁺	Primärselektion (dFCS)	37°C, 95 % LF, 5 % CO ₂ , 85 rpm	Hamster; Ovar	Micromet GmbH
CHO BiTE B mut 12 human	HyQ	Erste Amplifikation 20 nM MTX	37°C, 95 % LF, 5 % CO ₂ , 85 rpm	Hamster; Ovar	Micromet GmbH
CHO CD33 human transmembran	HyQ	Primärselektion (ohne AAU)	37°C, 95 % LF, 5 % CO ₂ , 85 rpm	Hamster; Ovar	Micromet GmbH

3.5.3.2 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien, Medien und Kultivierungsbedingungen

Zelllinie	Medium	Selektion	Kultivierungsbedingungen	Herkunft	Quelle
HEK293-F	Freestyle™ 293 Expression Medium	-	37°C, 95 % LF, 7 % CO ₂ , 135 rpm	Homo sapiens; Nierenzelllinie & Adenovirus 5	Invitrogen
HPB-ALL	RPMI ⁺	-	37°C, 95 % LF, 5 % CO ₂ , 85 rpm	Homo sapiens; T-Zelllinie	DSMZ (ACC#483)
CHO dhfr-	HyQ	- 1x AAU	37°C, 95 % LF, 5 % CO ₂ , 85 rpm	Hamster; Ovar	ATCC
CHOK1SV	CD CHO	4mM Glutamin	37°C, 95 % LF, 5 % CO ₂ , 85 rpm	Hamster; Ovar	Lonza

3.6 Antibiotika

Penizillin/ Streptomycin (10 mg/ml)
 Karbenizillin
 Kanamycin

Biochrom AG
 Roth
 Roth

3.7 Bakterienkultur

3.7.1 Bakterienstämme

XL1 Blue
 BL21 A1

Stratgene
 VWR Novagen

3.7.2 Kulturmedien

LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 340 mM NaCl pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen
LB-Platten:	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
SOC-Medium:	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose

3.8 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

3.8.1 Enzyme und andere Reagenzien

Alkalische Phosphatase (calf intestinal, CIP)	New England Biolabs
Benzonase	Novagen
dNTP Mix (2 mM)	Fermentas
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Restriktionsenzyme (BsrGI, BspEI, Sall, EcoRI, NcoI usw.)	New England Biolabs
RNAse A	Qiagen
T4 DNA Ligase	Roche

3.8.2 DNA Marker, Proteinmarker, Ladepuffer

6x Loading Dye	Fermentas
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
Novex® Sharp Protein Standard	Invitrogen
NuPage LDS Proben-Puffer	Invitrogen

3.8.3 Oligonukleotide

Sämtliche verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma Metabion (München, Martinsried) bereitgestellt.

3.8.3.1 Primer für die Klonierung bakterieller MCSP Konstrukte

Tabelle 4: Primer (bakterielle Konstrukte)

Name	Konstrukt	Sequenz 5´-3´
pGood CHO opt fw	pGood MCSP-G10 CHO opt	gtacagccatggagggtgcagctgggtgcagctggcgccgaagt
pGood CHO opt rev	pGood MCSP-G10 CHO opt	ccagttgcggccgctcagtggtgatgggtgggtgaccggtactagtc gtacgcagcacggcagcttgggt
pGood fw	Diverse pGood Vektoren	ctcctcgtgccagccggcgatggccatg
pGood coli opt rev	pGood MCSP-G10 coli opt	tcgagtgcggccgcttaatggtgatgatgggtgatgcagaacggtcag ttttgtacc
pGood AT-reich rev	pGood MCSP-G10 AT-reich	tcgagtgcggccgcttaatgatgatgatgatgtaaacagtaatt ttgttc
pGood GC-reich rev	pGood MCSP-G10 GC-reich	tcgagtgcggccgcttagtggtggtggtggtgaggaccgctcag cttgggtgcc
pGood CHO opt rev_2	pGood MCSP-G10 CHO opt	tcgagtgcggccgctatcagtggtgatgggtggtggtgcagcacggc cagcttgggtccc

3.8.3.2 Primer für die Klonierung eukaryotischer MCSP Konstrukte

Tabelle 5: Primer (eukaryotische MCSP Klonierungen)

Name	Konstrukt	Sequenz 5´-3´
DHFR CHO opt fw	pEF DHFR MCSP-G10 CHO opt	aggaattcgcggccaccatgggctggctctgc
DHFR coli opt fw	pEF DHFR MCSP-G10 coli opt	tgaggaattcgcggccaccatgggctggctctgcacatcctgtttctg gtggctacagccaccggcgctgcattctcaggttcagctg gttcagagcgggtgcagaagttaaacgt
DHFR coli opt rev	pEF DHFR MCSP-G10 coli opt	taagtcgacctatcattaatggtgatgatgggtgatgcagaacgg
DHFR AT fw	pEF DHFR MCSP-G10 AT	gaggaattcgcggccaccatgggctggctctgc
DHFR AT rev	pEF DHFR MCSP-G10 AT	taagtcgacctatcattaatgatgatgatgatg
DHFR GC fw	pEF DHFR MCSP-G10 GC	tgaggaattcgcggccaccatgggctggctctgcacatcctgtttctg gtggctacagccaccggcgctgcattctcaggttcagctggtccagtc ggggcggagggtgaagcgg
DHFR GC rev	pEF DHFR MCSP-G10 GC	taagtcgacctatcattagtggtggtggtggtggtgaggaccg
DHFR leader opt fw	pEF DHFR MCSP-G10 leader opt	aggaattcaccatgggctggctctgcacatcctgtttctggtggctac agccaccggcgctgcattctcaggttcagctggtccagctggtggcgtg aggatgaagagg
DHFR leader opt rev	pEF DHFR MCSP-G10 leader opt	ttttaagtcgacctaatgatgatgggtgatgatgtaggac
DHFR leader opt Kozak	pEF DHFR MCSP-G10 leader opt Kozak	gaggaattcgcggccaccatgggctggctctgcacatcctgtttc
pEE12.4 G10 fw	pEE12.4 MCSP-G10	acgaagcttgcggccaccatgggc
pEE12.4 G10 rev	pEE12.4 MCSP-G10	caatgaattctaataatgatgatggtga
pEE12.4 coli opt fw	pEE12.4 MCSP-G10 coli opt	gacacgaagcttgcggccaccatgggctggctctgcacatcctgttt ctggtggctacagccaccggcgctgcattctcaggttcagctggttcag agcgggtgcagaagttaaacgt
pEE12.4 coli opt rev	pEE12.4 MCSP-G10 coli opt	caatgaattctatcattaatggtgatgatgggtgatgcag

pEE12.4 AT fw	pEE12.4 MCSP-G10 AT	gacacgaagcttgccgccaccatgggctggctctgcatcatcctgttt ctggggctacagccaccggcgtgcattctcaggtacaattagtagaca aagtgagctgaagttaaaga
pEE12.4 AT rev	pEE12.4 MCSP-G10 AT	caatgaattctatcattaatgatgatgatgatgatgtaa
pEE12.4 GC fw	pEE12.4 MCSP-G10 GC	gacacgaagcttgccgccaccatgggctggctctgcatcatcctgttt ctggggctacagccaccggcgtgcattctcaggtgcagctggcca gtcggggcgagggtgaagcgg
pEE12.4 GC rev	pEE12.4 MCSP-G10 GC	caatgaattctatcattagtggtggtggtggtggtgag

3.8.3.3 Andere Konstrukte

Tabelle 6: Primer (eukaryotische, nicht-MCSP Klonierungen)

Name	Konstrukt	Sequenz 5´-3´
pEE12.4 BiTE B CHO opt fw	pEE12.4 BiTE B CHO opt	acgaagcttgccgccaccatgggctggctctgcatcatcctgtttctgg tggctacagccaccggcgtgcattctcaggtgcagctggg cgagtctggcggcgactggtg
pEE12.4 CD33 CHO opt fw	pEE12.4 CD33 CHO opt	acgaagcttgccgccaccatgggctggctctgcatcatcctgtttctgg tggctacagccaccggcgtgcattctcaggtgcagctgggctcagct ggagctgagggtgaag
pEE12.4 BiTE B/ CD33 CHO opt rev	pEE12.4 BiTE B/ CD33 CHO opt	aatgaattctaatgatgatggtgatgatgtaggacagtcagttt
pEE12.4 CFP fw	pEE12.4 CFP	acgaagcttatggtgagcaagggc
pEE12.4 CFP rev	pEE12.4 CFP	caatgaattcttactgtacagctc

3.8.4 Vektoren

Tabelle 7: Verwendete Vektoren

Vektor	Charakteristik	Herkunft
pEF DHFR	Derivat des Expressionsvektors pMT2PC, besitzt eine bizistronische Transkriptionseinheit, bestehend aus dem Promotor für den Elongationsfaktor 1 α , einer multiplen Klonierungsregion (MCS), einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), dem murinen Dihydrofolatreduktasegen, einer Poly-Adenylierungsstelle der SV40 mRNA, bakterieller Ursprung der Replikation (ori), Karbenizillin-Resistenz (bla-Gen)	Invitrogen/ Micromet GmbH
pEE12.4	Besitzt einen hCMV-MIE Promotor (Stamm AD169), 5´ untranslatierte Sequenzen des hCMV-MIE Gens (verstärkt mRNA und Expressionslevel), die Hamster GS cDNS Transkriptionseinheit von pSV2.GS (beinhaltet den SV40 early Promotor, die GS cDNS und die SV40 Splicing und Polyadenylierungssignale von pSV.dhfr), eine multiple Klonierungsregion, ein Ampizillin-Resistenzgen	Lonza
pGood	Abänderung des pBad Vektors von Invitrogen (trägt statt einer Ampizillin eine Kanamycin Resistenz), <i>Escherichia coli</i> Arabinose Operon (Expressionskontrolle über Arabinose-Induktion: pBAD Promotor, AraC Aktivator), pBR322 Ursprung der Replikation, multiple Klonierungsregion, Kanamycin-Resistenz	Micromet GmbH

3.9 Immunologische Reagenzien

3.9.1 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antigen	Wirt	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung (FACS)
Anti-Human CD3	Maus	IgG2a	-	-	Janssen-Cilag	-
Anti-Human CD4	Maus	IgG1k	-	L200	BD	-
Anti-Human CD28	Maus	IgG1k	-	L293	BD	-
Anti-Human CD56	Maus	IgG1k	-	B159	BD	-
Anti-Penta His	Maus	IgG1	-	-	Qiagen	1µg/ml
Anti-Penta His	Maus	IgG1	Biotin	-	Qiagen	1:5000 (WB)
Anti-Penta His	Maus	IgG1k	Alexa 488	AD1.1.10	Micromet AG	-
Anti-Penta His	Maus	Fab	Alexa Fluor	AD1.1.10	Micromet AG	-
Anti-FLAG M2		IgG1	-	-	Sigma	1:1000
Anti-Maus IgG Fc	Ziege	F'(ab) ₂	PE	-	Jackson/Dianova	1µg/ml
Anti-6x His	Kaninchen	IgG	HRP	-	abcam	1:5000

3.9.2 Bispezifische Einzelkettenantikörper

MCSP-G10 x I2C
 BiTE B PM68-B10 x I2C
 CD33 E11 x I2C

Micromet GmbH
 Micromet GmbH
 Micromet GmbH

3.9.3 Rekombinante Proteine

hu CD3 x hu IgG1 Fc1
 hu CD3 x hu IgG1 Fc1 – Biotin

Micromet GmbH
 Micromet GmbH

3.10 Detektion

Alkaline Phosphatase Streptavidin
 InstantBlue
 PE-Streptavidin

Vector Laboratories
 expedeon
 Becton Dickinson

3.11 Chemikalien und sonstige Reagenzien

ABTS Substratlösung	Roche
Agarose GTQ	Roche
Alexa Fluor 488-NHS	Molecular Probes
Arabinose	Sigma
BCIP/ NBT	Sigma
BSA	Sigma
Bacto Hefeextrakt	Roth
Bacto Trypton	Roth
Bacto Agar	Roth
Dimethylsulfoxid	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethidiumbromid-Lösung 0,07 %	AppliChem
Ficoll	Biochrom AG
Fractogel EMD Chelat (M)	Merck
D-Glucose	Sigma
Glyzerin	Merck
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm
InstantBLUE™	expedeon
IPTG	Roth
Lysozym	Sigma
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roth
NuPAGE Antioxidans	Invitrogen
NuPAGE MES SDS Laufpuffer 20x	Invitrogen
NuPAGE Transferpuffer 20x	Invitrogen
Propidiumjodid Lösung	Sigma
Radioaktives ⁵¹ Cr	Hartmann Analytics
Tween 20	Roth

3.12 Computersoftware und Datenbanken

Codon Usage Database	http://www.kazusa.or.jp/codon/
Cell Quest Pro	Becton Dickinson
Easy WIN fitting V6.0a	Tecan
BD FACS Diva Version 6.1.2	Becton Dickinson
FlowJo 7.6	Tree Star, Inc.
GeneSnap 6.08	Syngene
Grafiksoftware LuciaG Version 4.60	Laboratory Imaging
NCBI BLAST	http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi
Prism 4	GraphPad Software
Unicorn 5.2	GE Healthcare
Vector NTI	Infor Max

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkulturführung

Sämtliche Zelllinien wurden in den in Kapitel 3.5.3 genannten Medien und Kultivierungsbedingungen gehalten. Suspensionslinien wurden dreimal wöchentlich auf $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Adhärente Zellen wurden im selben Teilungsrhythmus mit PBS gewaschen, mittels einer 0,25 % Trypsin und 0,05 % EDTA PBS-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und anschließend in frischem Medium eingesät.

Zum Einfrieren wurden jeweils $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium (90 % Zellkulturmedium, 10 % DMSO) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach erfolgtem negativem Mykoplasmentest wurden die Zellen in einen Stickstofftank (-192°C) überführt.

Zur Rekultivierung wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert und in frischem Medium ausgesät. Bei Suspensionszellen wurde nach 24 h die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl sowie die Vitalität der Zellen wurde mittels des Farbstoffes Eosin in einer Neubauer Zählkammer (Tiefe: 0,1 mm; Kammerfaktor: 10^4) ermittelt. Vitale Zellen erschienen hierbei hell, tote Zellen rot oder schwarz.

Hierzu wurde eine Probe je nach Bedarf mit PBS vorverdünnt und anschließend 1:2 mit Eosin vermischt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Zellen in } 4 \times 16 \text{ Quadranten}) / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

4.1.3 Transfektion von Zellen

Bei einer Transfektion wird fremdes, genetisches Material in eine Zelle eingeschleust. Dies ist sowohl transient als auch stabil möglich.

4.1.3.1 Transiente Transfektion

Für transiente Transfektionen wurden HEK293-F-Suspensionszellen von Invitrogen verwendet. Diese wurden jeweils am Vortag der Transfektion auf $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Am Tag der Transfektion wurden pro Transfektionsansatz 3×10^7 Zellen abzentrifugiert, in 30 ml Freestyle 293 Expression Medium (Invitrogen) aufgenommen und bei 37°C und 7% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden je 20 μg DNS sowie 40 μl 293fectin (Invitrogen) zu je 1 ml Opti-MEM-Medium (Invitrogen) gegeben und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Die beiden Agenzien wurden nachfolgend vermischt, 25 Minuten bei RT inkubiert und zuletzt tropfenweise zu den zuvor vorbereiteten Zellen pipettiert. Probennahme erfolgte jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h, analysiert wurden diese mittels FACS, ELISA sowie His Spin Säulchen (GE Healthcare).

4.1.3.2 Stabile Transfektion (Lonza System)

Im Unterschied zur transienten Transfektion liegt die Fremd-DNS bei stabiler Transfektion nicht extrachromosomal vor, sondern wird in das Genom der Wirtszelle integriert. Für stabile Transfektionen wurden CHOK1SV-Zellen verwendet und nach Lonza Protokoll mittels Elektroporation transfiziert.

Hierzu wurden jeweils 1×10^7 Zellen (Splitten am Vortag auf $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml) zweimal mit PBS gewaschen, in CD CHO Medium (Gibco) resuspendiert und in eine Elektroporierküvette überführt. Anschließend wurden je 40 μg DNS zugegeben und die Zellen elektroporiert (300 V, 900 μFarad , Dauer: 12-20 ms). Die Zellen wurden nach dem Impuls in 200 ml CD CHO Medium überführt, auf 96-Well Platten ausplattiert (5000 Zellen/ Well) und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

4.1.4 Zelliniengenerierung

Stabile Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels des Lonza Systems generiert. Hierbei wurde der Expressionsvektor pEE12.4 für die Einführung eines Fremdgens verwendet. In diesem Vektor liegt das Zielgen hinter einem starken viralen Promotor, dem hCMV-MIE Promotor, der für eine hohe Expression des Zielgens sorgt. Hinter einen schwächeren Promotor geschaltet befindet sich das Glutaminsynthetase (GS) Gen. GS katalysiert die Synthese von Glutamin, welches essenziell für den Zellmetabolismus ist und als Stickstoffdonor während der Nukleotidsynthese dient. Die hier verwendeten CHOK1SV-Zellen besitzen zwar ein endogenes GS-Gen, werden jedoch durch bereits relativ geringe (3 μM) MSX (Methionin Sulphoximin) Konzentrationen, welches die GS hemmt, abgetötet. Somit ist es möglich, durch die Kopplung

des Zielgens an GS, „Produzenten“ über Entzug von Glutamin und Gabe von MSX zu selektieren. Die enge Kopplung eines starken (Zielgen) mit einem schwächeren Promotor (Selektionsgen) soll sicherstellen, dass der Vektor in eine transkriptionell aktive Stelle im Genom inseriert.

Den ersten Schritt der Zelliniengenerierung stellt die Transfektion dar. Diese wurde wie in 4.1.3.2 beschrieben durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurde MSX in einer Endkonzentration von 50 μM zugegeben. Die Platten (ca. 50 Platten = 4800 Wells) wurden daraufhin zwei bis drei Wochen inkubiert und anschließend hochgewachsene Einzelklone (ca. 300-350) markiert. Der Titer im Überstand wurde mittels ELISA (siehe 4.3) gemessen und die jeweils besten Klone in 24 well Platten überführt (ca. 40 Klone). Ab diesem Schritt wurde MSX immer in einer Endkonzentration von 25 μM eingesetzt. In den 24-Well Platten wurden die Klone über weitere 10 bis 14 Tage expandiert und der Überstand nochmals im ELISA getestet. Die dabei besten Klone (etwa 10 Klone) wurden in T-Flaschen überführt, expandiert und in einen Schüttelkolben eingesät (85 rpm; $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml). Zur Selektion des endgültigen Klones wurde ein Wachstumsexperiment angesetzt. Hierzu wurden jeweils Kolben mit 30 ml bzw. 100 ml Zellsuspension ($0,3 \times 10^6$ Zellen/ml) angesetzt und über neun Tage ohne Splitten inkubiert. Im Zweitages-Rhythmus wurden Proben entnommen für Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen sowie Konzentrations- und Monomergehaltsbestimmungen.

Die besten zwei bis drei Klone der primären Transfektionsrunde wurden anschließend rekloniert („*Limited Dilution*“). Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 0,3 Zellen/ Well ausplattiert. Die Selektion war im Nachfolgenden identisch zu der der primären Transfektionsrunde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine stabile Zelllinie für ein Melanom BiTE (MCSP-G10 BiTE) durchgeführt. Hierzu wurden vier unabhängige Transfektionen zu je 50 Platten angesetzt. Drei davon wurden nach der ersten Reklonierung beendet, eine nach der primären Transfektionsrunde.

4.1.5 Isolierung von PBMCs aus Humanblut

Humane PBMCs aus heparinisiertem Blut wurden über eine Ficoll-Dichtezentrifugation gewonnen. Hierzu wurde ein 50 ml Leucosep-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Separationsmedium befüllt und bei 1200 rpm kurz abzentrifugiert, bis sich das Medium unter der Separations-Fritte befand. Die Röhrchen wurden daraufhin mit maximal 35 ml Humanblut überschichtet und bei RT für 20 Minuten bei 2200 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der hierbei entstehende Dichtegradient ermöglicht die Auftrennung von Erythrozyten und Leukozyten. Das den PBMCs übergelagerte Serum wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Leukozyten-Ringe zweier

Röhrchen abgenommen und in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Anschließend wurden die PBMCs mit kaltem PBS/ 2% FCS aufgefüllt und für 6 Minuten bei 1500 rpm 4°C abzentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die verbliebenen Erythrozyten mittels eines Erythrozyten-Lysepuffers entfernt (5 ml; 5 min; RT). Die Zellen eines Spenders wurden nach der Lyse in einem Röhrchen zusammengefasst, nochmals gewaschen und in 30 ml PBS/ 2% FCS aufgenommen. Von dieser Suspension wurde die Zellzahl bestimmt.

4.1.6 Stimulierung von PBMCs und Isolierung von CD8⁺ T-Zellen

Um PBMCs zu stimulieren, wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 8,5 cm mit 1 µg/ml anti-humanem CD28- und CD3-Antikörper beschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Antikörpergemisch abgesaugt und die Petrischalen mit PBS gewaschen. Die isolierten PBMCs wurden nun in 50 ml RPMI⁺ Medium aufgenommen, IL2 in einer Endkonzentration von 20 U/ml zugegeben und auf die beschichteten Petrischalen pipettiert. Die Platten wurden anschließend für 72 h inkubiert.

CD8⁺ T-Zellen wurden über Depletion von CD4⁺/CD56⁺ PBMCs aufgereinigt. Hierzu wurde das magnetische Zelltrennungssystem von Dynal verwendet. Im Zuge des Dynal Systems werden die Zellen mit Antikörpern markiert und anschließend mit antikörpergekoppelten, superparamagnetischen Partikeln zusammengebracht. Über Anlegen eines Magnetfeldes können die so markierten Zellen depletiert werden. Jeweils 1×10^7 Zellen wurden in 500 µl kaltem PBS/ 2% FCS, 0,5 mg/ml anti-CD4-Antikörper und 1 mg/ml anti-CD56-Antikörper resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS/ 2% FCS gewaschen, in 400 µl PBS/ 2% FCS resuspendiert, mit 70 µl Magnetpartikel versetzt und für 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Ansatz mit PBS/ 2% FCS auf 10 ml aufgefüllt und das Falcon-Röhrchen für 5 Minuten in ein Magnetfeld gestellt. Die aufgereinigten CD8⁺ Zellen befanden sich nun im Überstand, wurden abpipettiert und für spätere Zytotoxizitätsexperimente gezählt. Die Reinheit der aufgereinigten CD8⁺ Zellen wurde mittels eines FACS-Assays mit den Antikörpern anti-human CD8 und anti-human CD3 überprüft.

4.1.7 Zytotoxizitätsexperimente mittels radioaktivem Chrom

Mittels Zytotox-Assay sollte *in vitro* die Fähigkeit von BiTE Molekülen getestet werden, eine Zielzell-spezifische Lyse zu vermitteln.

Hierzu wurden MCSP-Antigen-tragenden Zielzellen mit ca. 7 MBq ^{51}Cr versetzt (eine Stunde Inkubation bei 37°C) und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zuvor isolierte CD8⁺ T-Zellen und Zielzellen wurden in einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 10:1 gemischt und in je 100 µl Aliquots in 96-Well Platten pipettiert. Dazu wurde je eine Verdünnungsreihe von MCSP BiTE in einem Volumen von 100 µl pipettiert. Nach einer Inkubation von 18 h bei 37°C, 5% CO₂ wurde das durch BiTE-vermittelte Lyse freigesetzte Chrom im Überstand gemessen. Mit Hilfe der Messwerte für spontane (radioaktive Zielzellen ohne Effektoren) und maximale (radioaktive Zielzellen versetzt mit Triton-X100) Lyse konnte aus den gemessenen Daten die spezifische, Effektor-abhängige Lyse der Zielzellen ermittelt werden. Hierzu wurde der Wizard 300 Gammazähler sowie die Graph Pad Prism4 Software verwendet.

4.2 Durchflußzytometrie

Im FACS-Gerät werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren anschließend einzeln einen Laserstrahl. Dabei streuen die Zellen je nach Größe und Dichte das Licht, wodurch Rückschlüsse auf die Population möglich sind. Bei einer vorangegangenen Färbung durch fluoreszenzmarkierte Antikörper werden die Elektronen des Farbstoffes durch Anregung mit einem monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Somit wird das absorbierte Licht mit weniger Energie, also längerwelligerem Licht, wieder abgegeben. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich dabei proportional zur Menge an gebundenem Antikörper und lässt so Rückschlüsse auf die Quantität des Zielantigens zu. Dies wird am Gerät mit Hilfe eines Histogramms dargestellt, wobei die x-Achse die Fluoreszenz und die y-Achse die Zellzahl wiedergibt.

Für eine Färbung wurden jeweils $0,2 \times 10^6$ Zellen in 100 µl in eine 96-Well V-Bodenplatte ausplattiert. Der zu messende Überstand wurde in einem Volumen von 100 µl zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 150 µl PBS/ 2% FCS wurde als Primär-Antikörper das huCD3 x huFc1 – Biotin Peptid in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS/ 2% FCS eingesetzt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde einmal mit 150 µl PBS/ 2% FCS gewaschen und Streptavidin-PE (1 µg/ml) unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen zuletzt in 200 µl PBS/ 2% FCS resuspendiert und im FACS gemessen. Um Rückschlüsse auf die genaue Konzentration anstellen zu können, wurde eine Eichgerade des jeweiligen BiTE Moleküls mitgemessen.

Wurden mit dem CFP Protein transfizierte Zellen gemessen, so war keine Färbung nötig. Die Zellen wurden zweimal mit PBS/ 2% FCS gewaschen und nach Anregung durch den violetten Laser gemessen.

4.3 ELISA

Die ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Messung wurde neben dem FACS-Assay zur Titerbestimmung sowie zur quantitativen Unterscheidung von Einzelklonen während der stabilen Zelliniengenerierung verwendet.

4.3.1 Protein L-ELISA

Der Protein L-ELISA wurde in einem frühen Stadium der Zelliniengenerierung (CLD 1-3) verwendet. Protein L ist wie Protein A oder Protein G ein bakterielles Protein, welches in der Lage ist, Immunglobuline zu binden. Im Falle von Protein L handelt es sich dabei um die V_L kappa-Kette (Protein A/G binden an den Fc-Teil von Antikörpern).

Protein L wurde in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ in 100 μl Volumen für 1 h auf 96-Well Platten immobilisiert, die Platten gewaschen (PBS-T) und eine Stunde bei RT mit 200 μl PBS/ 4% BSA (bovines Serum Albumin) geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben in der jeweiligen Verdünnung (Verdünnungspuffer: PBS-BT) aufgetragen und ebenfalls eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen, der Detektionsantikörper (Anti-His-HRP; 1:5000 verdünnt) zugegeben, für 1 h inkubiert und die Platten ein letztes Mal gewaschen. Die Detektion erfolgte über eine 1x ABTS-Substratlösung. Hierbei erzeugt die an den Detektionsantikörper gekoppelte Peroxidase freie Radikale, welche bei 405 nm photometrisch erfassbar sind.

Im Laufe dieser Arbeit kristallisierte sich heraus, dass der Protein L-ELISA im Falle von MCSP Dimere sehr stark bevorzugt. Um die Selektion von Dimerproduzenten zu vermeiden, wurde daraufhin auf den CD3-ELISA umgeschwenkt. Im Falle von transienten Transfektionen wurde lediglich der CD3-ELISA verwendet.

4.3.2 CD3-ELISA

Der CD3-ELISA ist an den Aufbau des FACS-Ansatzes angelehnt. Im Gegensatz zum Protein L-ELISA wird an die Platten huCD3 x huFc1 Peptid gekoppelt. Das BiTE bindet in diesem Fall mit seinem anti-CD3-Arm an das CD3-Peptid. Die Waschschriffe und die restlichen

Inkubationsschritte sind identisch zu denen des Protein L-ELISAs. Da dieser Assay sehr sensitiv ist, wurde als Standard jeweils eine Anfangskonzentration von 0,1 µg/ml des jeweiligen BiTE Moleküls vorgelegt. Die Verdünnung erfolgte in 1:2 Schritten.

4.4 Das ClonePix-System

Das ClonePix System ist ein von der Firma Genetix entwickeltes Klonselktionswerkzeug. Hierbei sollen Zellen in semisolidem Agar ausplattiert werden, welcher die Zellen stationär hält. Somit sekretieren die Zellen einen Ring aus Antikörpern um die wachsende Kolonie. Dieser wird mittels fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper präzipitiert und visualisiert. Die Antikörperkonzentration korreliert hierbei direkt mit der Intensität des Fluoreszenzsignals.

Hierzu wurde semisolidem Medium (90 ml pro Flasche) am Tag vor Ausplattierung der Zellen aufgetaut, am nächsten Tag mit Selektionsagenzien versetzt und mit PBS auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurden transfizierte Zellen in 2 ml semisolidem Medium mit den jeweiligen Antikörperkombinationen, die zur Präzipitierung der BiTE Antikörper dienten, in eine Vertiefung einer 6-Well Platte ausplattiert und über 10 Tage inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Platten im Fluoreszenzmikroskop auf BiTE Präzipitation untersucht.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Plasmidgewinnung aus *E. coli*

Transformiert man Bakterien mit einem Vektor, so vermehrt sich dieser durch das Wachstum der Bakterien und kann anschließend zurückgewonnen werden. Hierzu wurden je nach Bedarf an DNS Mini- oder Maxipräparationen durchgeführt. Die Kits stammten dabei jeweils von der Firma Qiagen.

Der gewünschte Vektor wurde als Erstes in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert und diese über Nacht (als Vorkultur) angezogen. Am nächsten Tag wurde im Falle einer Minipräparation die Kultur abzentrifugiert und das Pellet weiter verarbeitet. Für Maxipräparationen wurde aus der Vorkultur eine Hauptkultur von bis zu 250 ml angesetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und ebenfalls über Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde anschließend in einem alkalischen Lysepuffer aufgenommen. Das darin enthaltene SDS löst Phospholipide und Proteine aus der Membran und führt so zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung des gewünschten Plasmids. Genomische DNS wird durch den hohen pH-Wert denaturiert, die Plasmid-DNS bleibt jedoch doppelsträngig. Als nächster Schritt wurde

Neutralisationspuffer zugegeben, der zum Ausfällen von chromosomaler DNS als unlösliche Netzstruktur, hochmolekularer RNS sowie Protein-SDS-Komplexen führt. Die ausgefallenen Komplexe wurden abzentrifugiert und der Plasmid-enthaltende Überstand auf Anionentauscher-Säulchen aufgetragen. Die Plasmid DNS bindet unter Hochsalzbedingungen und hohem pH-Wert an die Säulchen, niedermolekulare RNS sowie Proteine und Verschmutzungen können dabei ausgewaschen werden. Eluiert wurde die DNS zuletzt mit Niedrigsalz-Elutionspuffer oder Wasser und bei -20°C gelagert.

4.5.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäure-Fragmente nach Größe aufzutrennen, wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. Hierbei wird die DNS in ein Maschenwerk aus Zuckermolekülen pipettiert und anschließend ein elektrisches Feld angelegt. Die DNS läuft daraufhin entsprechend ihrer negativen Ladung zum Pluspol und trennt sich dabei der Größe nach auf. Zur Abschätzung der Länge der Fragmente wurde jeweils ein Größenstandard mitgeführt.

Für kleinere DNS-Fragmente (<200 bp) wurde ein dichteres Maschenwerk gewählt (1,5 % Gel), für größere eine Fragmente ein gröberes (1 %). Hierzu wurde Agarose in 1x TAE Puffer aufgekocht, auf 50°C abgekühlt, mit fünf Tropfen Ethidiumbromidlösung vermischt und in einen Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und für 40 Minuten bei 160 Volt aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Visualisierung der Fragmente bei 254 nm durch das in die DNS interkalierte Ethidiumbromid.

4.5.3 Isolation von DNS aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde nach Herstellerangaben mit dem „QIAquick Gel-Extraktions-Kit“ von Qiagen durchgeführt.

Hierzu wurde das gewünschte Fragment nach der Auftrennung unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, in Puffer gelöst, mit Isopropanol versetzt und auf ein Silica-Säulchen aufgetragen. Dort bindet die DNS unter Hochsalz-Bedingungen und Verunreinigungen können ausgewaschen werden. Die nachfolgende Elution wurde mit Niedrigsalz-Puffer oder Wasser durchgeführt.

4.5.4 Restriktion von DNS

Für die Spaltung von Plasmid-DNS wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese besitzen palindromische Erkennungssequenzen von 4-8 bp. Beim Verdau können entweder glatte Enden oder 5' bzw. 3' überhängende Enden entstehen.

Je 1 Unit Enzym wurde pro μg DNS eingesetzt. Die Verwendung des entsprechenden Puffers oder BSA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für Klonierungen wurden für das Insert jeweils 20 μl PCR Ansatz verdaut und für den Vektor jeweils 2 μg Plasmid-DNS. Für einen Kontrollverdau einer Minipräparation wurden jeweils 200 ng DNS angesetzt.

4.5.5 Dephosphorylierung linearer DNS-Fragmente

Die Dephosphorylierung von Vektor-DNS verhindert eine Religation der DNS nach einem Verdau. Hierzu wurde die Antarctic Phosphatase (AP) der Firma NEB eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine alkalische Phosphatase, welche die 5' terminalen Phosphatgruppen der DNS abspaltet. Je 1 Unit AP wurde für 2 μg DNS eingesetzt und dabei 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung des Enzyms erfolgte über Gelelektrophorese.

4.5.6 Ligation von DNS-Fragmenten

Für die Ligation einer Insert-DNS in ein Vektorrückgrat wurde die T4 Ligase der Firma NEB verwendet. Ligasen katalysieren ATP-abhängig die Veresterung von 5' Phosphatenden mit kompatiblen 3'-Hydroxyenden.

Je 7 μl des aufgereinigten Inserts (PCR-generiert) wurden verwendet sowie 1 μl eines aufgereinigten, verdauten Vektors (jeweils 2 μg). Diese beiden wurden mit 1 μl 10xT4 Ligase Puffer sowie mit 1 μl T4 Ligase vermischt und für 4-16 h bei 16°C inkubiert.

4.5.7 Transformation in *E. coli*

Transformation stellt die Aufnahme von Plasmiden in kompetente Bakterien dar. Die DNS wird hierzu zu den Bakterienzellen pipettiert und diese kurz auf Eis gelagert. Während dieser Zeit können sich die DNS-Moleküle an die Zellen anlagern und bei nachfolgendem Hitzeschock in die Zellen aufgenommen werden.

100 μl kompetente *E. coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit DNS versetzt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Der nachfolgende Hitzeschock wurde bei 42°C für 30 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für

60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zuletzt wurde je nach Anwendung ein Teil des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit jeweiligem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für Klonierung, Mini- und Maxipräparationen wurden hierzu der Stamm XL1 Blue verwendet. Bei der Expression von BiTE Molekülen in Bakterien wurden der BL21 A1 Stamm transformiert.

4.5.8 Amplifikation von DNS mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.5.8.1 Generelle PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNS-Abschnitten *in vitro*. Hierbei wird das gewünschte DNS-Stück durch zyklische Verdopplung mittels zweier Oligonukleotide (Primer) und einer DNS-Polymerase amplifiziert. Einer der beiden Primer ist dabei komplementär zum 5' Bereich der gewünschten DNS Sequenz und der andere zum 3' Bereich des Gegenstranges. Typischerweise besteht ein Zyklus einer PCR-Reaktion aus einer Denaturierung bei 95°C, wobei die doppelsträngige DNS aufgeschmolzen wird. Im nächsten „*Annealing*-Schritt“ lagern sich die beiden Primer bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur an die DNS-Matrize an. Die Temperatur richtet sich dabei nach der Länge sowie der Basenzusammensetzung des Hybridisierungsbereiches. Als letzter Schritt amplifiziert eine DNS-Polymerase die DNS in ihrem Temperaturoptimum (meist 72°C).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grund der hohen Fehlergenauigkeit ausschließlich mit einer High Fidelity Polymerase gearbeitet. War das Längenverhältnis der beiden Primer sehr unterschiedlich, so wurde dies durch Berechnung des molaren Verhältnisses ausgeglichen. Ein typischer PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

x µl Template (ca. 20 ng)
2,5 µl 10x High Fidelity Puffer (Roche)
2,5 µl dNTPs (2 mM; Fermentas)
0,5 µl 5' Primer (20 µM) (Metabion)
0,5 µl 3' Primer (20 µM) (Metabion)
0,2 µl High Fidelity DNS-Polymerase (Roche)
ad 25 µl ddH₂O

4.5.8.2 GC-reiche PCR

Im Laufe dieser Arbeit wurden einige Sequenzen kloniert, die einen sehr hohen GC-Gehalt auswiesen. Diese ließen sich mit der generellen PCR Methode nicht amplifizieren. Für diese Sequenzen wurde die „Combinatorial Enhancer Solution“ (CES) verwendet [69]. CES wurde als 5x Konzentrat hergestellt und jeweils 5 µl in einen 25 µl Ansatz pipettiert.

4.5.9 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentrationsbestimmung von DNS erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei gilt: optische Dichte 1 = 50 µg/ml doppelsträngige DNS. Die Reinheit der DNS in Bezug auf Proteinverunreinigungen lässt sich dabei über den Quotienten der optischen Dichte von 260 nm zu 280 nm abschätzen. Ein Wert von 1,8 bis 2 stellt reine DNS dar, liegt der Wert darunter, so liegt eine Kontamination durch Proteinkomponenten vor. Für die Messung wurden die Proben je nach Bedarf im Elutionspuffer verdünnt.

4.5.10 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierarbeiten für diese Arbeit wurden von der Firma Sequiserve (www.sequiserve.de) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels der Software Vektor NTI ausgewertet.

4.6 Expression von BiTE Molekülen in Bakterien

4.6.1 Produktion von BiTE Molekülen in *E. coli* über Arabinose-Induktion

Die Expression von BiTE Molekülen in Bakterien erfolgte Arabinose-abhängig über den in Abschnitt 3.8.4 dargestellten Vektor pGood. Hierzu wurde das gewünschte DNS-Konstrukt in den *E. coli* Stamm BL21 A1 transformiert. Am darauf folgenden Tag wurde eine Kolonie in 12 ml LB/ Kan überführt, mit 1 % Glucose versetzt und über Nacht bei 37°C angezogen. Am Folgetag wurde die Vorkultur 1:100 in frischem LB/ Kan verdünnt, 0,1% Glucose zugesetzt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6-0,7 bei 37°C inkubiert. Hatte die Kultur diese OD erreicht, so wurden pro 500 ml Kultur 2 ml 20 %ige Arabinose zugegeben und die Kultur für 4 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand bei 3000 g für 30 Minuten abzentrifugiert, verworfen und das bakterielle Pellet bei -80°C eingefroren.

4.6.2 Produktion der anti-CD3 Einzelkette in *E. coli* über IPTG-Induktion

Hierzu wurde der in Abschnitt 3.8.4 beschriebene Vektor pComb verwendet. Die Expression verlief mit zwei Abweichungen parallel zur Expression mittel Arabinose: anstatt Kanamycin wurde als Antibiotikum Ampizillin verwendet und die Induktion erfolgte über 1 mM IPTG.

4.6.3 Ultraschall Aufschluss des *E. coli* Pellets

Um produzierte Proteine aus dem Periplasma zu lösen (für den Transport in das Periplasma sorgt das dem BiTE Gen vorgeschaltete *pelB* Signalpeptid), wurden die Bakterien mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurde das bakterielle Pellet in einer Konzentration von 0,2 g/ml Zellfeuchtgewicht in Ultraschall-Resuspensions-Puffer aufgenommen und mit 100 µg/ml Lysozym versetzt. Je ein Pellet aus 250 ml Bakterienkultur wurde als eine Einheit weiterverarbeitet. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe des Sonoplus HD2070 Homogenisator bei einer Amplitude von 40 % und einer Pulsstufe von 9 15 x 15 s auf Eis (dazwischen jeweils 15 s Pause auf Eis). Anschließend wurden die Proben mit 12,5 U Benzonase versetzt und für 10 Minuten auf einem Drehrad bei RT inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei 4600 rpm für 1 h abzentrifugiert und der Überstand analysiert (FACS, SDS-Gel) bzw. aufgereinigt.

4.7 Gelelektrophorese von Proteinen

4.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für eine Proteinauftrennung nach Größe im elektrischen Feld wurden jeweils 60 µl Probe mit 10 µl DTT sowie 20 µl Auftragspuffer versetzt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem Größenstandard auf ein Gel aufgetragen (Bis-Tris Gele 4-12 %). Die angelegte Spannung betrug 200 V, die Zeit variierte je nach Größe des aufzutrennenden Fragments zwischen 30 und 65 Minuten.

4.7.2 Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-Page

Für die Anfärbung von Proteinen im SDS-Gel wurde das Gel nach der Elektrophorese für 1 h in ca. 10 ml InstantBlue Lösung gefärbt und unter Wippen inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Färbungen in Wasser entfernt und das Gel fotografiert.

4.8 Western Blot

Nach erfolgter Auftrennung von Proteinproben über eine SDS-Page wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurden Gel und Membran, ummantelt von in Transferpuffer getränktem Whatman-Papier, in eine Naßblot-Elektrophorese-Apparatur eingebracht und die Proteine bei 30 V über 65 Minuten vom Gel auf die Membran übertragen. Nach der Elektrophorese wurde die Membran mit PBS/ 2 % BSA über Nacht abgesättigt und anschließend die Proteinproben über ihren His-Tag detektiert. Zu diesem Zweck wurde ein biotinylierter Anti-Histidin Antikörper von Qiagen (1:5000 verdünnt) mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat (1:5000 verdünnt) in 15 ml PBS auf die Membran gegeben und für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal in PBS/ 0,2 % BSA/ 0,1 % Tween gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte über BCIP/ NBT, abgestoppt wurde die Reaktion über VE-Wasser.

4.9 Aufreinigung von BiTE Molekülen

Produzierter BiTE Überstand (CHO, *E. coli*) wurde abzentrifugiert und im Falle der Bakterien mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurde der Überstand mit 10 mM Imidazol versetzt und auf Fractogelsäulen aufgetragen, die einen Chelatkomplex mit Zink-Ionen enthielten. BiTE Moleküle besitzen C-terminal einen 6x Histidin-Tag, welcher bei einem pH von 6-8 an die Zinkionen auf der Säule bindet. Die Säule wurde anschließend einmal mit Puffer A gewaschen und ein weiteres Mal mit einer 9:1 Mischung Puffer A zu B, um Proteinverunreinigungen zu entfernen. Zuletzt wurden die BiTE Moleküle mit Puffer B eluiert (Puffer B enthält 500 mM Imidazol, welches der Struktur des His-Tags ähnelt und daher mit dem His-Tag um die vorhandenen Zinkionen konkurriert). Das Eluat wurde aufkonzentriert und mittels einer Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Auf diesem Wege war es möglich, Monomer von Dimeren, Aggregaten und Abbau zu trennen.

4.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen über OD₂₈₀-Messung

Die Konzentration von aufgereinigten Proteinproben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Hilfe eines proteinspezifischen Extinktionskoeffizienten ($1A_{280}[\text{corr.}]$), welcher über die Software Vector NTI bestimmt wurde, ermittelt. Hierzu wurde folgende Formel verwendet:

$$c \text{ (mg/ml)} = 1A_{280}[\text{corr.}] \times OD_{280}$$

5 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, positiven Einfluss auf den komplexen und sehr zeitintensiven Ablauf einer stabilen Zellliniengenerierung von BiTE Antikörpern zu nehmen. Dabei stand zum einen die Entwicklung eines Modells im Mittelpunkt, welches es ermöglicht, bereits vor Beginn der Zellliniengenerierung quantitative sowie qualitative Vorhersagen über das entsprechende BiTE Molekül zu treffen. Des Weiteren sollten Alternativen zur klassischen Zellliniengenerierung entwickelt und evaluiert werden.

5.1 Quantitative und qualitative Aussagen über stabile Zelllinien

5.1.1 Aufbau der Korrelationsstudien

Eine stabile Zellliniengenerierung ist ein extrem zeitaufwendiger und kostspieliger Prozess. Daher ist es hilfreich, bereits vor Beginn einer Zellliniengenerierung eine Vorstellung davon zu haben, wie sich das entsprechende Molekül bezüglich des Titers und Monomergehaltes verhalten wird. BiTE Antikörper gehören zur Gruppe der Einzelkettenantikörper, welche in der Lage sind zu oligomerisieren. Da für die Klinik nur die monomere Form von BiTE Antikörpern verwendet wird, bildet der Monomergehalt neben dem Titer ein wichtiges Selektionskriterium. Zu diesem Zweck wurden transiente Transfektionen durchgeführt und diese auf eine Korrelation mit stabilen Transfektionen für Titer und Monomergehalt untersucht.

Hierzu wurden HEK293-Zellen mittels 293fectin mit Vektoren für drei BiTE Antikörpern (A-C) transfiziert (siehe 4.1.3.1) und der Titer an produzierten BiTE Molekülen nach 24 h, 48 h und 72 h über FACS-Messung bestimmt. Parallel dazu wurden dieselben BiTE Antikörper stabil in CHOK1SV Zellen transfiziert und beide Datensätze miteinander verglichen (siehe Abbildung 11).

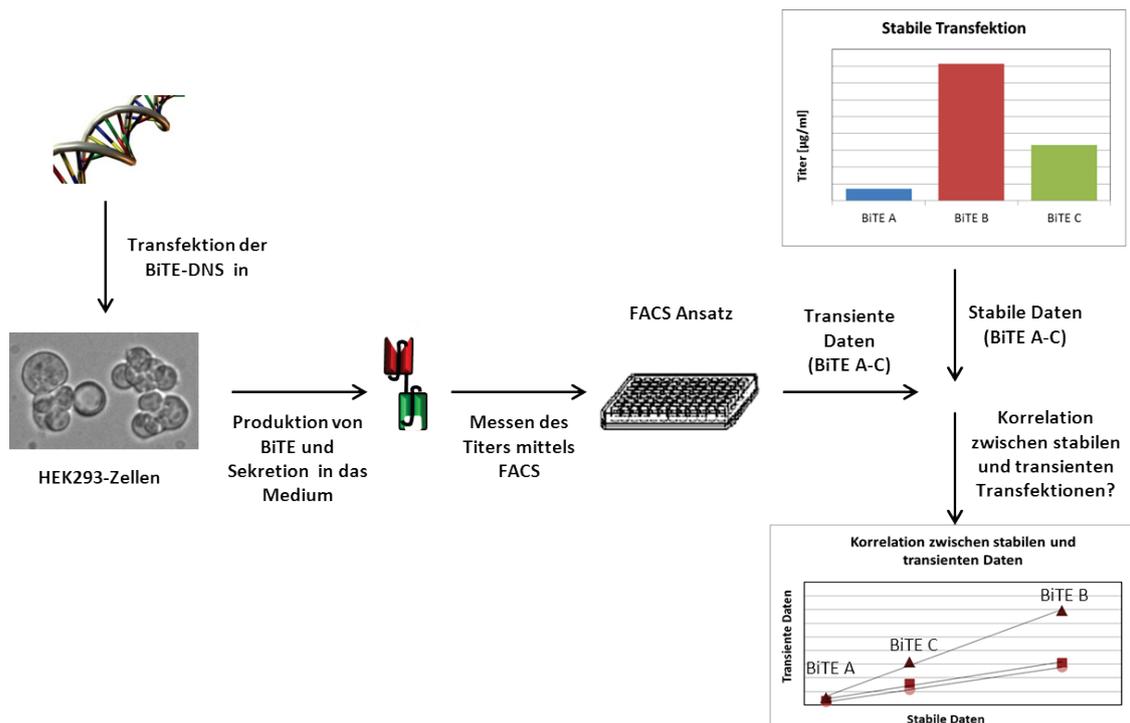


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Korrelationsstudien

Als erster Schritt wurde die DNS von drei BiTE Antikörpern mittels 293fectin in HEK293-Zellen eingebracht. Diese wurden anschließend über drei Tage kultiviert und sekretierten während dieser Zeit BiTE in das Medium. Aus diesem wurde alle 24 h mittels FACS der BiTE Titer ermittelt. Die Korrelation der transienten und der stabilen Daten wurde anschließend überprüft.

5.1.2 Etablierung der Zelllinie für transiente Transfektionen

Da für stabile Zellliniengenerierungen CHOK1SV-Zellen verwendet werden, wurden zunächst diverse für CHO-Zellen geeignete Transfektionskits getestet [70-72]. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz [73-76] wurde ein CFP- (Cyan Fluorescent Protein) Konstrukt in CHOK1SV-Zellen transfiziert, diese in 6-Well Platten ausplattiert und nach 48 h im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden die Zellen sowohl im Durchlicht als auch nach Anregung durch monochromatisches Licht gezählt und anschließend der Quotient aus „grünen“ und „nicht grünen“ Zellen gebildet.

Tabelle 9: Effizienzen diverser Transfektionskits

Kit	SatisFection	Freestyle Max	FuGENE 6	FuGENE HD	DOTAP	Genejammer
Effizienz [%]	0,00	4,33	0,00	1,82	0,04	0,11

Die Transfektionseffizienz sämtlicher getesteter Kits erwies sich hierbei als sehr gering. Aus diesem Grund wurde als Zellbasis auf HEK293-Zellen von Invitrogen umgeschwenkt.

HEK293-Zellen sind sehr leicht zu transfizieren, produzieren hohe Titer und sind in der Lage, die meisten posttranslationalen Prozessierungen durchzuführen [77].

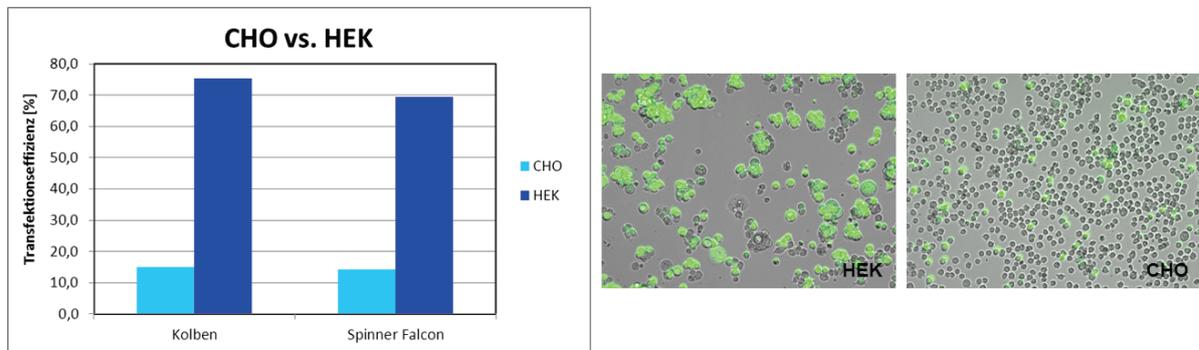


Abbildung 12: Vergleich der Transfektionseffizienzen von CHO- und HEK293-Zellen

Ein CFP-Konstrukt wurde mittels 293fectin in HEK293 sowie mittels Freestyle Max in CHOK1SV-Zellen transfiziert und diese jeweils in einen Kolben und ein Falcon eingesät. Nach 48 h wurde die Transfektionseffizienz im FACS und im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Transfektion von HEK293-Zellen eine wesentlich höhere Fluoreszenz zur Folge hatte als die Expression von Fremdgenen in CHO-Zellen. Der Vergleich Kolben und Falcon favorisierte den Kolben.

Für einen direkten Vergleich von transienter Proteinexpression in CHO- bzw. HEK293-Zellen wurde für erstere das Freestyle Max Reagenz (effizientester Kit) sowie für letztere 293fectin ausgewählt. Gleichzeitig sollten Kultivierungsbedingungen im Kolben und im Spinner-Falcon verglichen werden (Abbildung 12). 48 h nach Transfektion wurde die Effizienz beider Reagenzien im FACS und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Beide Analysemethoden favorisierten hierbei deutlich HEK293-Zellen im Vergleich zu CHO-Zellen. Als beste Kultivierungsmöglichkeit wurde der Schüttelkolben identifiziert. Dieser zeigte auch im Vergleich zur 6-Well Platte eine deutliche Erhöhung der Transfektionseffizienz: im 6-Well lag diese für CHO-Zellen bei 4,3 %, im Kolben hingegen bei ca. 15 % (Freestyle Max Reagenz; siehe Tabelle 9).

Somit wurden im Folgenden HEK293-Zellen im Kolben für die Korrelationsstudien verwendet.

5.1.3 Optimierungen von Sequenzen für die Transfektion

Im Zuge einer stabilen Zelliniengenerierung werden in der Regel vorhandene Konstrukte für CHO-Expression optimiert. Um zu testen, inwiefern eine Veränderung der Codonzusammensetzung einen Einfluss auf die Proteinexpression hat, wurden diverse Variationen der Sequenz eines Melanom BiTE (MCSP-G10) generiert und transient in HEK293-Zellen transfiziert. Gleichzeitig sollte über die Codonvariationen getestet werden, ob

die ausgewählte Analytik (siehe Abbildung 13) sensitiv genug ist, um geringe Expressionsunterschiede detektieren zu können.

5.1.3.1 Codonvariationen der MCSP-G10 Sequenz

Folgenden Sequenzen wurden generiert und in den Vektor pEE12.4 kloniert: neben der nicht optimierten, über Phage Display selektierten Grundsequenz (MCSP-G10) wurden Optimierungen für die Organismen *Cricetulus griseus* (CHO-Zellen) und *Escherichia coli* kloniert sowie künstlich extreme AT- bzw. GC-reiche Konstrukte. Die künstlich hergestellten Konstrukte dienten hierbei als „Negativkontrolle“, von der eine sehr geringe Expression aufgrund ihrer Widernatürlichkeit erwartet wurde. Dies galt besonders für das AT-reiche Konstrukt. Tabelle 10 gibt den Ursprung der Sequenzinformation an.

Tabelle 10: Codonvariationen der MCSP-G10 Sequenz

Sequenz	Merkmal	Herkunft (Sequenz)
MCSP-G10	durch Phage Display selektierte Sequenz	Micromet GmbH, T. Raum
MCSP-G10 CHO opt	auf CHO-Expression abgestimmte Sequenz	GeneArt®
MCSP-G10 coli opt	auf <i>E. coli</i> -Expression abgestimmte Sequenz	GeneArt®
MCSP-G10 AT	jedes Codon so AT-reich wie möglich	Micromet GmbH, C. Hieber
MCSP-G10 GC	jedes Codon so GC-reich wie möglich	Micromet GmbH, C. Hieber

Um abzuschätzen, welches Konstrukt am besten exprimieren müsste, wurde vor Beginn der Transfektionen für sämtliche Konstrukte der Codon Adaption Index (CAI) auf Basis von CHO-Expression berechnet. Der CAI beschreibt, wie gut eine bestimmte Sequenz an die Codon-Nutzung eines ausgewählten Organismus (hier *Cricetulus griseus*, aus dessen Ovar die CHO-Zelllinie abstammt) angepasst ist. Der CAI wurde durch Paul Sharp und Wen-Hsiung Li eingeführt und laut ihren Ausführungen berechnet [78]. Die dafür benötigten Referenzdaten wurden der „Codon Usage Database“ (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) entnommen. Werte für CAI liegen zwischen 0 und 1, wobei der Wert 1 für eine optimale Anpassung steht. Tabelle 11 fasst die berechneten Daten zusammen.

Tabelle 11: Codon Adaption Index der MCSP-Konstrukte auf CHO-Basis

Konstrukt	CAI Basis CHO
MCSP-G10	0,78
MCSP-G10 CHO opt	0,94
MCSP-G10 coli opt	0,75
MCSP-G10 AT	0,61
MCSP-G10 GC	0,8

Die Codonvarianten wurden wie in 4.1.3.1 beschrieben in HEK293-Zellen transfiziert und für 72 h kultiviert. Während dieser Zeit wurde täglich der Titer per FACS und am letzten Tag zusätzlich der Monomergehalt über Affinitätschromatographiesäulchen (mit Ni^{2+} als Ligand, die selektiv den C-terminalen His-Tag von BiTE Antikörpern binden; His Spin Säulchen) und anschließender Auftrennung mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt. Das Prinzip der FACS-Messung ist in Abbildung 13A graphisch dargestellt. Als Zellbasis wurden MCSP-exprimierende CHO-Zellen verwendet (Antigen: humanes MCSP Domäne D3). Das BiTE bindet an das MCSP-Antigen und wird seinerseits durch ein biotinyliertes CD3-Peptid gebunden. Beim CD3-Peptid handelt es sich um ein Fusionspeptid aus 27 N-terminalen Aminosäuren des CD3 ϵ mit der Fc-Domäne eines IgG-Antikörpers (Abbildung 13B). Über letztere ist das Peptid in der Lage zu dimerisieren. Die Detektion erfolgte über Färbung mit Phycoerythrin-(PE) markiertem Streptavidin. Um jeweils den Titer des Überstandes bestimmen zu können, wurde eine Eichgerade aus aufgereinigtem MCSP-G10 BiTE mitgeführt.

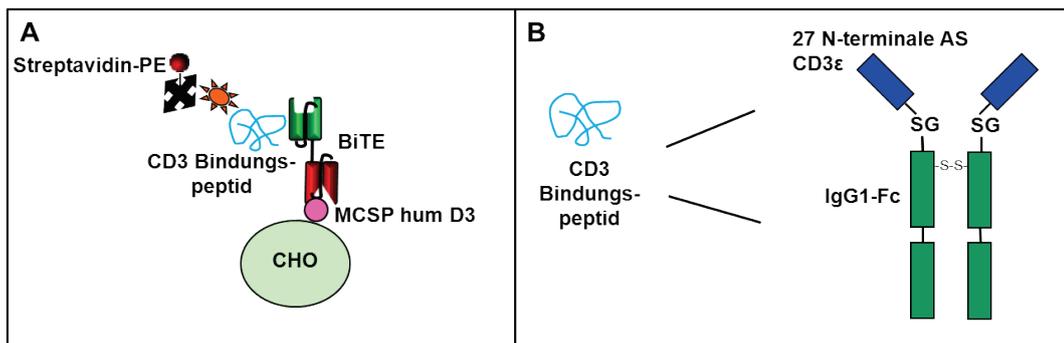


Abbildung 13: Prinzip der FACS-Messung zur transienten Titerbestimmung

Die Abbildung stellt das Bindungsschema der FACS-Messung zur Titerbestimmung der transienten Transfektionen dar.

A) BiTE im Überstand bindet mit dem anti-Zielantigen-Arm an MCSP-Antigen auf der Oberfläche von entsprechenden CHO-Zellen und wird seinerseits von einem biotinylierten CD3-Peptid erkannt (anti-CD3-Arm). Die Detektion erfolgte über mit PE-markiertem Streptavidin. Zu Quantifizierungszwecken wurde jeweils eine Eichgerade mitgemessen.

B) Das CD3-Peptid ist wie folgt aufgebaut: 27 N-terminale Aminosäuren des CD3 ϵ wurden über einen Serin-Glycin-Linker an den Fc-Teil eines IgG-Antikörpers fusioniert. Das Vorhandensein eines Fc-Teils ermöglicht es dem Fusionspeptid zu dimerisieren.

Der Titerverlauf dieser Expression ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Tabelle 12 faßt die Monomerdaten zusammen.

Nach 72 h zeigte das MCSP-G10 Grundkonstrukt eine Expression von 5,2 µg/ml. Die beiden optimierten Konstrukte MCSP-G10 CHO opt sowie MCSP-G10 coli opt lagen bei einem Proteintiter von jeweils 4,4 µg/ml bzw. 0,6 µg/ml. Die beiden künstlichen Konstrukte unterschieden sich stark in ihrer Expression. Während das GC-reiche Konstrukt eine ähnliche Produktion wie das CHO-optimierte Konstrukt aufwies (4,5 µg/ml), lag das AT-reiche im Bereich des coli-optimierten Konstrukts mit einem Titer von 0,3 µg/ml.

Somit konnte durch die Codonoptimierung auf CHO-Basis keine zusätzliche Expressionssteigerung gegenüber dem aus Phage Display selektierten Konstrukt gemessen werden. Überraschenderweise führte das GC-reiche Konstrukt zu einer gleich hohen Expression wie das CHO-optimierte und das nicht-optimierte Grundkonstrukt. Das AT-reiche und das coli-optimierte Konstrukt zeigten aufgrund ihrer schlechten Anpassung an CHO-Expression wie erwartet eine wesentlich geringere Expression.

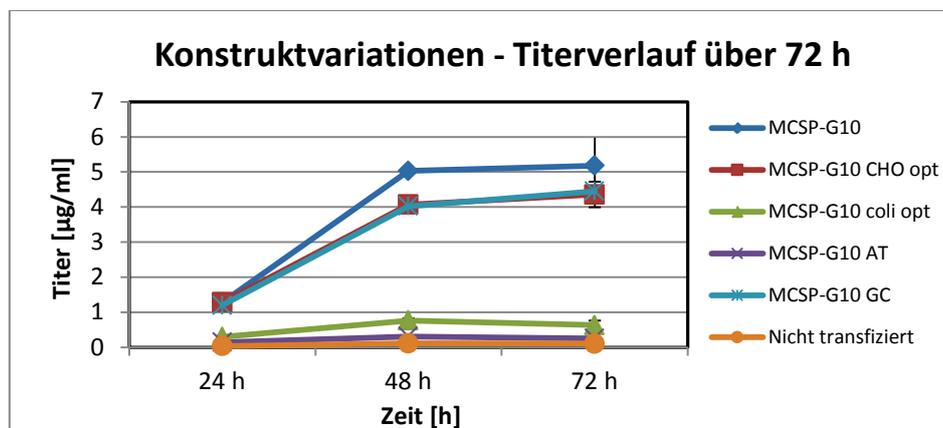


Abbildung 14: Transiente Transfektion von MCSP-Konstruktvariationen

Die Sequenz von MCSP wurde in verschiedenste Richtungen optimiert bzw. verändert und anschließend alle Konstrukte transient in HEK293-Zellen transfiziert. Über 72 h hinweg wurde der Titerverlauf verfolgt. Hierbei exprimierte das MCSP-G10 Grundkonstrukt am besten (ca. 5 µg/ml). Das GC-reiche Konstrukt sowie das für CHO-Expression optimierte Konstrukt zeigten eine identische Expression von ca. 4,4 µg/ml. Das für *E. coli* optimierte Konstrukt sowie das AT-reiche Konstrukt zeigten jeweils eine sehr geringe Expression, wobei das AT-reiche Konstrukt den niedrigsten Titer aufwies.

Die Konstrukte MCSP-G10, MCSP-G10 CHO opt sowie MCSP-G10 GC-reich besaßen alle einen relativ ähnlichen Monomergehalt zwischen 55 % und 59 %. Der Monomergehalt des für *E. coli*-Expression optimierten Konstrukts lag mit 45 % deutlich darunter. Einen noch größeren Abfall zeigte das AT-reiche Konstrukt mit 27 % monomeren BiTE Antikörper.

Tabelle 12: Monomergehalt 72 h nach transienter Transfektion – MCSP-Konstruktvariationen

Konstrukt	Monomergehalt [%]
MCSP-G10	58,6
MCSP-G10 CHO opt	58,2
MCSP-G10 coli opt	45,3
MCSP-G10 AT	27,1
MCSP-G10 GC	54,8

Es konnte somit gezeigt werden, dass mit der hier etablierten Analytik sehr geringe Expressionsunterschiede quantifiziert werden können.

5.1.3.2 Codonvariationen des Signalpeptids

Nach Analyse der Transfektionsstudien über Codonvariationen der Proteinsequenz sollte zunächst die Auswirkung einer Optimierung des Signalpeptids auf den Titer überprüft werden. Diese Optimierung wird im Zuge einer stabilen Zelliniengenerierung standardmäßig zusammen mit der des proteinkodierenden Anteils von der Firma Geneart® für CHO-Expression durchgeführt. Dieser Schritt sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Optimierung des Signalpeptids zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration führt. Hierzu wurden drei verschiedene Konstrukte im Vektor pEF DHFR verwendet.

Tabelle 13: Variationen des Signalpeptids

Name	Signalpeptid	Kozak
pEF DHFR MCSP-G10	nicht optimiert	-
pEF DHFR MCSP-G10 oSP	optimiert	-
pEF DHFR MCSP-G10 oSPK	optimiert	+

Als erstes wurde ein Konstrukt generiert, bei dem das Signalpeptid in nicht-optimierter Form vorlag (pEF DHFR MCSP-G10), zweitens ein Konstrukt, dessen Signalpeptid auf CHO-Expression optimiert worden war (pEF DHFR MCSP-G10 oSP) und zuletzt das pEF DHFR MCSP-G10 oSP Konstrukt, das ein optimiertes Signalpeptid sowie zusätzlich eine Kozak-Sequenz besaß. Bei der Kozak-Sequenz handelt es sich um einen für die Translation bedeutsamen Abschnitt. An dieser Stelle dockt das Ribosom an die mRNA. Die Sequenz der Kozak-Sequenz ist meist wie folgt aufgebaut: **(GCC)GCCRCCATGG** (Kozak, Startcodon, erste Base des folgenden Proteins) [79].

Dieselben Transfektions- und Analysierungsmethoden wie im Experiment 5.1.3.1 führten zu folgendem Ergebnis (Abbildung 15):

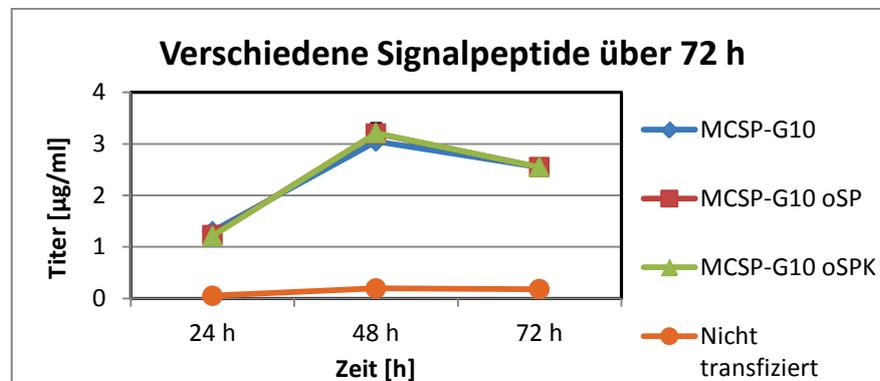


Abbildung 15: Transiente Transfektion von Signalpeptid-Variationen

Drei verschiedene Variationen des Signalpeptids wurden vor ein MCSP BiTE kloniert und transient über 72 h exprimiert. Die Dokumentation des Titer über diese Zeit zeigte keine signifikanten Abweichungen innerhalb dieser drei Konstrukte. Der endgültige Titer lag jeweils zwischen 2,6 µg/ml und 2,7 µg/ml.

Die Titerdaten wiesen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied voneinander auf. Zum Endpunkt 72 h lagen die Titer aller drei Konstrukte zwischen 2,6 µg/ml und 2,7 µg/ml.

Somit führte die Optimierung des Signalpeptids und die Einführung einer zusätzlichen Kozak Sequenz vor dem Signalpeptid zu keiner weiteren Expressionssteigerung.

5.1.4 Aufbau der FACS Analysen - Unterschiede zwischen anti-Ziel- und anti-CD3-gerichtetem FACS Aufbau

Die verwendete FACS-Messung (siehe Abbildung 13) stellt einen Test auf bispezifische Bindung dar, da in diesem Ansatz beide Arme des BiTE Antikörpers funktionell sein müssen, um ein Signal im FACS erzeugen zu können: Der anti-Ziel-Arm muss an die vorgelegten Zellen binden und der anti-CD3-Arm an das CD3-Peptid. Die Titerkurven der Codonvariations-Experimente zeigten einen Verlauf, der bis 48 h anstieg und anschließend stagnierte (siehe Abbildung 14). Eine parallel gemessene Titerbestimmung per ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), die lediglich die CD3-Bindung, nicht jedoch die Zielantigenbindung detektierte, lieferte bis zum 72 h Zeitpunkt ansteigende Titer. Um zu klären, ob diese Unterschiede durch die Wahl der Methode (FACS vs. ELISA) oder durch die Art der Bindung (monospezifisch vs. bispezifisch) zustande kamen, wurde eine FACS-Messung etabliert, die es ermöglicht, sowohl bispezifische als auch monospezifische Bindung auf MCSP/ CD3-Seite zu

testen. Hierzu wurde eine Transfektion mit dem pEE12.4 MCSP-G10 CHO opt Vektor in HEK293-Zellen durchgeführt.

Für die Testung der bispezifischen Bindung wurde der vorgestellte FACS-Assay verwendet (Abbildung 16A). Die monospezifische Bindung der MCSP-Seite wurde ebenfalls auf MCSP-exprimierenden CHO-Zellen gemessen. Als Detektionsantikörper wurde ein muriner anti-Penta-His-Antikörper eingesetzt, der das BiTE an seinem His-Tag erkennt. Die Visualisierung erfolgte über einen PE-markierten anti-Maus IgG Fc-Antikörper (Abbildung 16B). Die monospezifische Bindung des BiTE an das CD3-Antigen wurde auf HPB-ALL Zellen getestet. Die Detektion der Bindung an die Zellen wurde auf die gleiche Weise nachgewiesen wie die der monospezifischen MCSP-Bindung (Abbildung 16C). Bei HPB-ALL handelt es sich um eine T-Zelllinie, die 1973 aus einem an ALL erkranktem, 14-jährigen Jungen generiert wurde und somit das CD3-Antigen exprimiert [80].

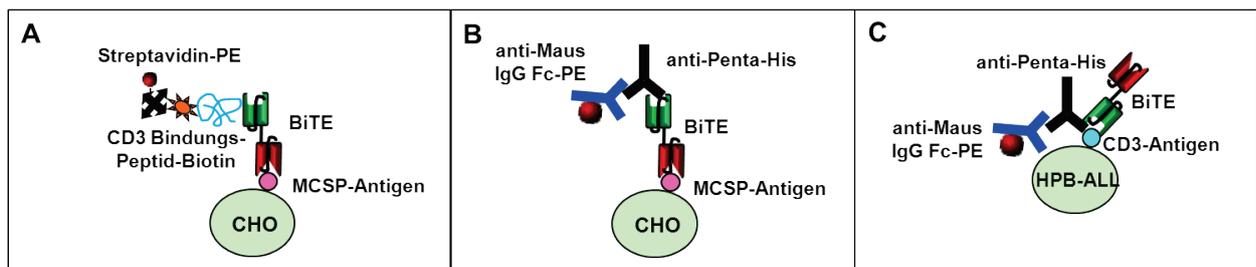


Abbildung 16: Prinzip des mono- und bispezifischen FACS-Aufbaus

A) Nachweis für bispezifische Bindung: das BiTE Molekül erkennt mit seinem anti-Zielantigen-Arm das MCSP-Antigen auf CHO-Zellen. Die CD3-Seite des BiTE wird über ein biotinyliertes CD3- Fusionspeptid erkannt. Die Visualisierung erfolgt über Streptavidin-PE.

B) Monospezifische MCSP-Bindung: Ausgangspunkt stellen ebenfalls MCSP-exprimierende CHO-Zellen dar (anti-Zielantigen-Arm des BiTE bindet hier). Das BiTE wird seinerseits durch einen anti-Penta-His-Antikörper (Maus) an seinem Poly-Histidin-Tag erkannt. Die Visualisierung findet über einen PE-markierten anti-Maus IgG Fc-Antikörper statt.

C) Der Nachweis der monospezifischen CD3-Bindung erfolgte auf analog zur Bestimmung der monospezifischen MCSP-Bindung. Allerdings wurden hier als Zellbasis CD3-exprimierende HBP-ALL Zellen verwendet.

Die Titerwerte wurden über 72 h aufgenommen und miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich die bispezifischen Titerdaten von den monospezifischen Titerdaten während der ersten 48 h kaum voneinander unterschieden. Zum 72 h Zeitpunkt wurde jedoch deutlich, dass die monospezifische Bindung der CD3-Seite auch bis Tag drei weiter anstieg. Die Messung der bispezifischen sowie die der monospezifischen anti-MCSP-Bindung zeigte zu Tag drei keinen signifikanten Anstieg mehr und lieferte fast nur die Hälfte des Titerwertes der monospezifischen CD3-Bindung (Faktor 1,7).

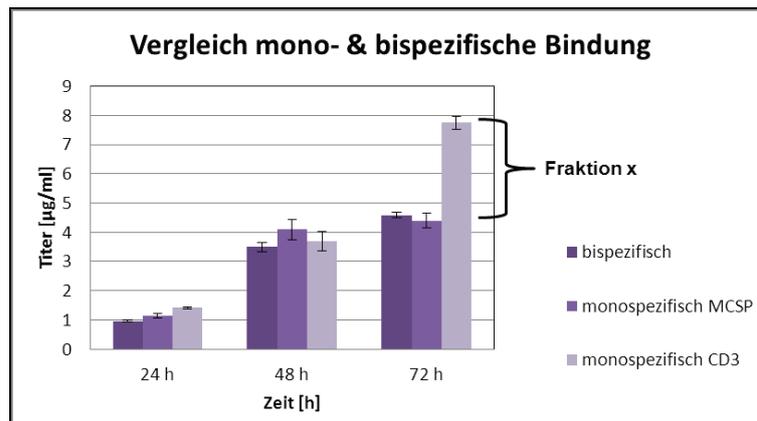


Abbildung 17: Vergleich von mono- und bispezifischer Bindung im FACS

Die mono- sowie bispezifische Bindung eines transient in HEK293-Zellen transfizierten MCSP BiTE wurde über 72 h im FACS gemessen. Hierbei zeigten die bispezifische sowie die monospezifische MCSP-Bindung einen deutlichen Titeranstieg von 24 h zu 48 Stunden. Zum 72 h Zeitpunkt hin fand jedoch keine signifikante Titerzunahme mehr statt. Im Falle der monospezifischen CD3-Bindung konnte hingegen über alle Meßtage hinweg ein deutlicher Anstieg des Titers beobachtet werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Fraktion (in Abbildung 17: „Fraktion x“) des vorhandenen BiTE Pools nicht in der Lage ist, an das Zielantigen MCSP zu binden. Gleichzeitig kann diese BiTE Population dennoch an das CD3-Antigen binden und über einen monospezifischen CD3 FACS-Assay detektiert werden. Es handelt sich um nicht funktionsfähiges BiTE, da nur durch eine bispezifische Bindung T-Zellen zur Lyse von Tumorzellen rekrutiert werden können. Um sicher zu gehen, nur voll funktionales BiTE zu messen, wurde im Folgenden ausschließlich mit dem bispezifischen FACS Ansatz gearbeitet.

5.1.5 Transfektion unterschiedlicher BiTE Konstrukte

Nach der erfolgreichen Etablierung einer Analytik, die in der Lage ist, geringe Expressionsunterschiede zu detektieren, wurden nun BiTE Antikörper, zu denen jeweils stabile Zelllinien vorhanden waren, in transienten Transfektionsstudien verglichen. Im Anschluss wurden die transienten Daten auf eine mögliche Expression in stabilen Linien extrapoliert und diese mit Werten der vorhandenen stabilen Zelllinien verglichen. Dies diente der Evaluierung der Aussagekraft der transienten Studien.

Hierzu wurden drei BiTE Moleküle (BiTE A-C) in jeweils ihrer CHO-spezifischen Codonoptimierung ausgewählt. Alle drei BiTE Antikörper besaßen dieselbe anti-CD3-Einzelkette und unterschieden sich lediglich durch ihren Ziel-bindenden Arm. Bei BiTE A handelt es sich um das bereits eingeführte MCSP-spezifische BiTE. BiTE B ist gegen ein nicht-

öffentlich bekanntgegebenes, solides Tumorantigen gerichtet. BiTE C bindet an das Oberflächenprotein CD33, welches in myeloischen Zelllinien exprimiert wird.

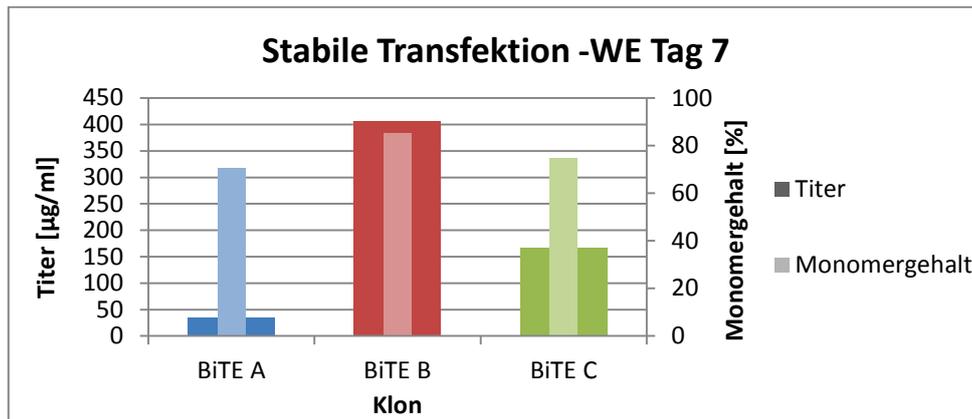
5.1.5.1 Stabile Zellliniengenerierung

Die stabilen Zelllinien wurden wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben erstellt. BiTE A wurde hierbei einmal mit 0,3 Zellen/ Well rekloniert, BiTE B und BiTE C durchliefen jeweils zwei Selektionsrunden zu je 0,3 Zellen/ Well.

Tabelle 14: Herkunft der stabilen Zelllinien

Zelllinie	Zielmolekül	Herkunft
CHOK1SV – BiTE A	MCSP	Micromet GmbH, C. Hieber
CHOK1SV – BiTE B	solides Tumorantigen	Micromet GmbH, J. Lumsden
CHOK1SV – BiTE C	CD33	Micromet GmbH, E. Weidinger

Für die stabile Titer- und Monomergehaltserfassung wurde je ein Wachstumsexperiment (WE) angesetzt. Hierzu wurden die Zellen auf eine Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ ml eingestellt und über neun Tage ohne Splitten inkubiert. Jeden Tag wurde Überstand abgenommen und daraus der Titer (durch OD280 nm Messung nach Aufreinigung mittel His-Spin Säulchen) sowie der Monomergehalt (Auffrennung des His-Spin Säulchen Eluats über HP-SEC) bestimmt. Für den Vergleich der errechneten mit den tatsächlichen stabilen Daten wurden die Werte von Meßtag 7 herangezogen. Abbildung 18 fasst diese Daten zusammen.



Stabile Transfektion – Tag 7	BiTE A	BiTE B	BiTE C
Titer [µg/ml]	35,1	406,7	166,0
Monomergehalt [%]	70,6	85,1	75,0

Abbildung 18: Titer- und Monomerdaten der stabilen Zelllinien; Tag 7 Wachstumsexperiment

Von den drei BiTE Antikörpern A-C wurden stabile CHO-Expressionszelllinien generiert. In einem Wachstumsexperiment (WE) wurden jeweils die Entwicklung des Titers (breite Balken) sowie die des Monomergehalts (schmale Balken) über 9 Tage verfolgt. In der Abbildung sind die Daten des Meßtages 7 aufgeführt. Diese wurden wie folgt ermittelt: die BiTE Antikörper wurden über ihren His-Tag mit Hilfe von His-Spin Säulchen aufgereinigt. Ausgehend von diesem Eluat wurde die OD280 nm bestimmt (Titerbestimmung) und das Eluat mittels HP-SEC nach Größe aufgetrennt (Monomergehaltsbestimmung).

BiTE B zeigte hierbei den höchsten Titer (406,7 µg/ml) sowie Monomergehalt (85,1 %). Die Transfektion mit BiTE C lieferte etwas weniger als die Hälfte an Protein mit 166 µg/ml und führte zu einem etwas geringeren Monomergehalt von 75,0 %. Die stabile Zelllinie von BiTE A produzierte 35,1 µg/ml Antikörper mit einem Monomergehalt von 70,6 %.

5.1.5.2 Ergebnisse der transienten Transfektionen

Dieselben drei BiTE Konstrukte wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert und über 72 h kultiviert. Dabei wurden täglich Proben des Überstandes genommen und der Titer über FACS Messung bestimmt (siehe Abbildung 13). Am 72 h Zeitpunkt wurde zusätzlich der Monomergehalt der BiTE Antikörper über His-Spin Säulchen gemessen. (Der Monomergehalt wurde aus Gründen der Proteinknappheit nur zum 72 h Zeitpunkt erhoben.) Hierbei wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt (jeweils in Doppelkulturen) und diese anschließend gemittelt. Abbildung 19 zeigt den Titerverlauf über drei Tage. Abbildung 20 stellt den Monomergehalt zum Zeitpunkt 72 h dar.

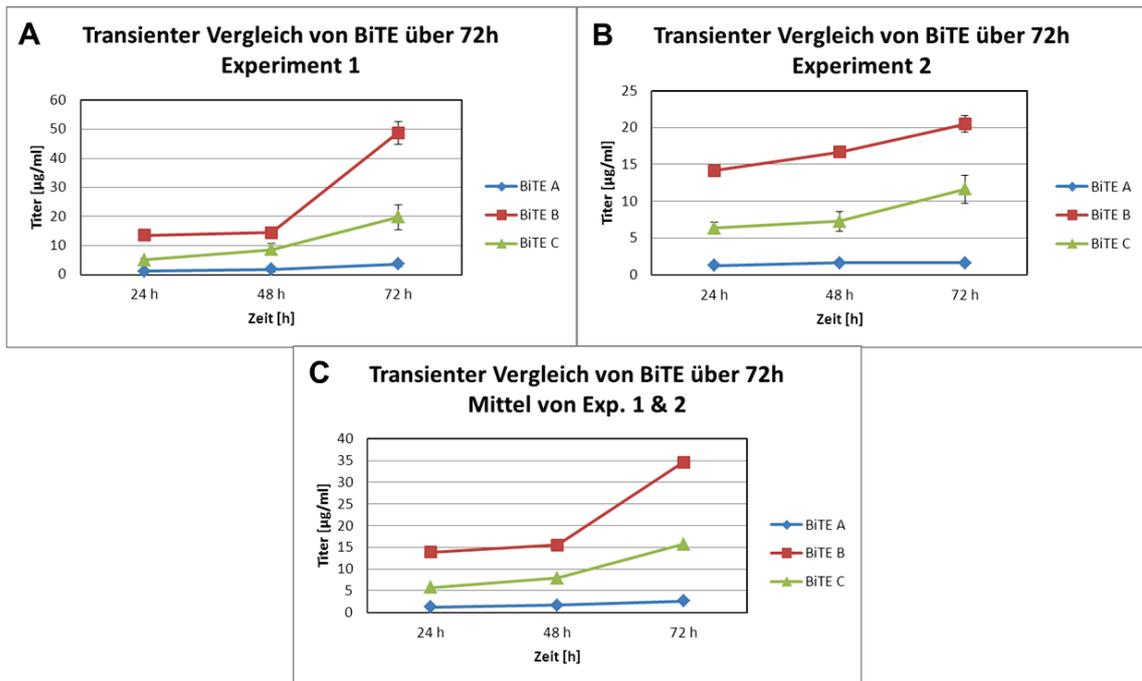


Abbildung 19: Titerverlauf der transienten Transfektionen der BiTE Antikörper A-C (Experiment 1 (A) und 2 (B) sowie deren Mittelung (C))

In jedem Experiment ist jeweils der Mittelwert aus Doppelkulturen mit Standardabweichung angegeben. Drei BiTE Moleküle A-C wurden jeweils mittels 293fectin in HEK293-Zellen transfiziert und über 72 Stunden kultiviert. Alle 24 Stunden wurde aus dem Überstand der BiTE Titer ermittelt. Der Verlauf über drei Tage zeigt, dass BiTE B die größte Menge an Protein produzierte, gefolgt von BiTE C und schließlich BiTE A.

Die Mittelung beider Experimente lieferte für BiTE A einen Titer (72 h Zeitpunkt) von 2,6 µg/ml, BiTE B produzierte den höchsten Titer mit 34,6 µg/ml und die Transfektion mit BiTE C resultierte in einem Titer von 15,7 µg/ml.

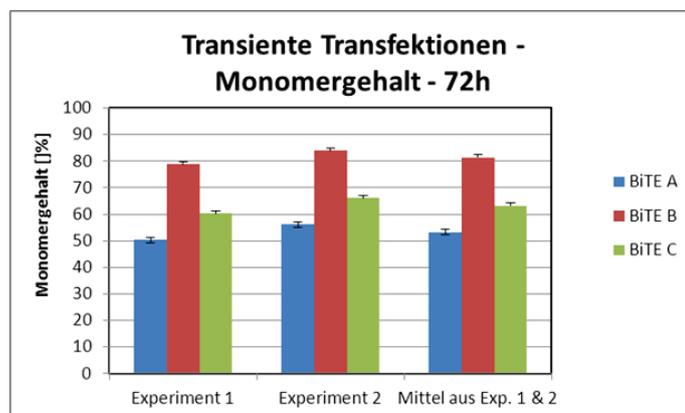


Abbildung 20: Monomergehalt der transienten Experimente

Angegeben ist der Mittelwert aus Doppelkulturen mit Standardabweichung. Transiente Transfektionen mit verschiedenen BiTE Antikörpern lieferten zum 72 h Zeitpunkt für BiTE A den niedrigsten Monomergehalt und für BiTE B den höchsten.

BiTE A lieferte nach drei Tagen einen Monomergehalt von 53,2 %. BiTE B wurde mit 81,3 % Monomergehalt gemessen. Bei BiTE C betrug dieser Wert 63,2 % (jeweils Mittelungen der beiden Einzelerperimente).

5.1.6 Korrelation zwischen stabilen und transienten Daten

5.1.6.1 Test auf Existenz einer Korrelation zwischen stabilen und transienten Daten

Um zu überprüfen, ob transiente und stabile Transfektionen korrelieren, wurden die Daten beider Transfektionsarten miteinander verglichen. Hierzu wurden beide Datensätze graphisch gegenüber gestellt. (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22).

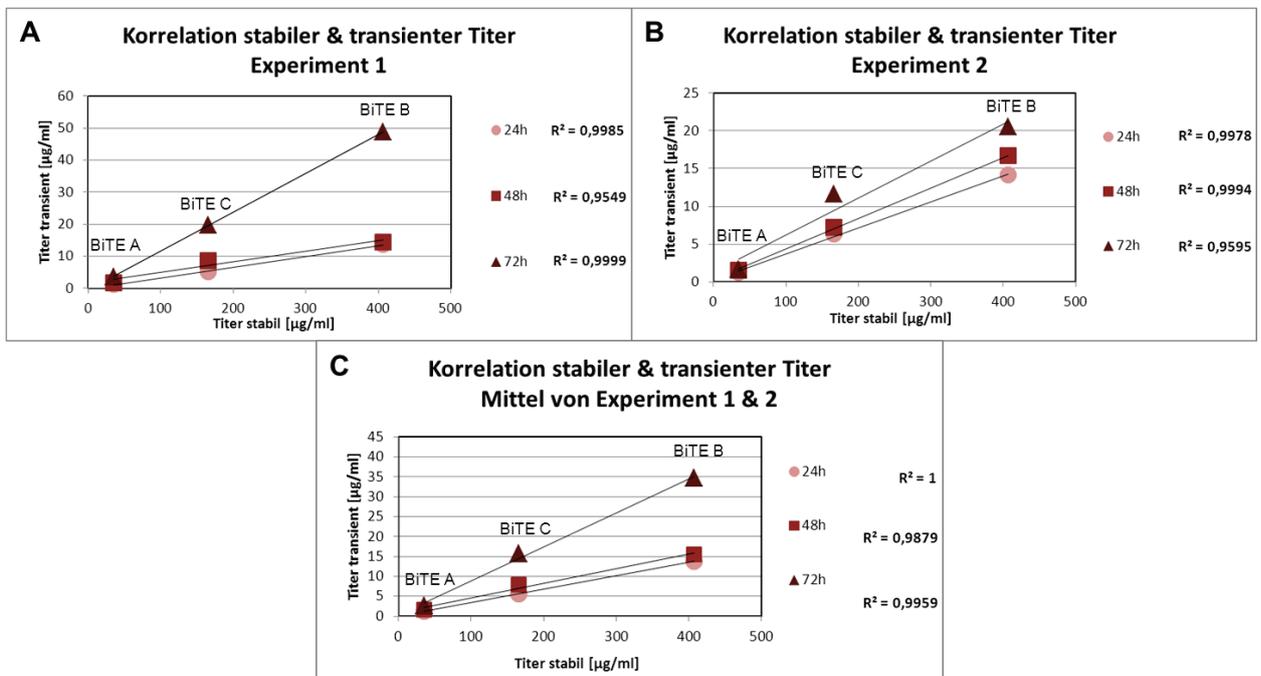


Abbildung 21: Korrelation von stabilen und transienten Transfektionen – Titer

Stabile und transiente Transfektionen wurden für drei BiTE Antikörper durchgeführt und deren Korrelation in Bezug auf den Titer überprüft (2 Parallelexperimente 1 (A) & 2 (B) und deren Mittelung (C)). Hierzu wurden die stabilen Werte auf die Abszisse und die transienten Daten auf die Ordinate eines Diagramms aufgetragen. In A-C konnte jeweils eine sehr starke Korrelation mit R²-Werten von mindestens 0,95 festgestellt werden.

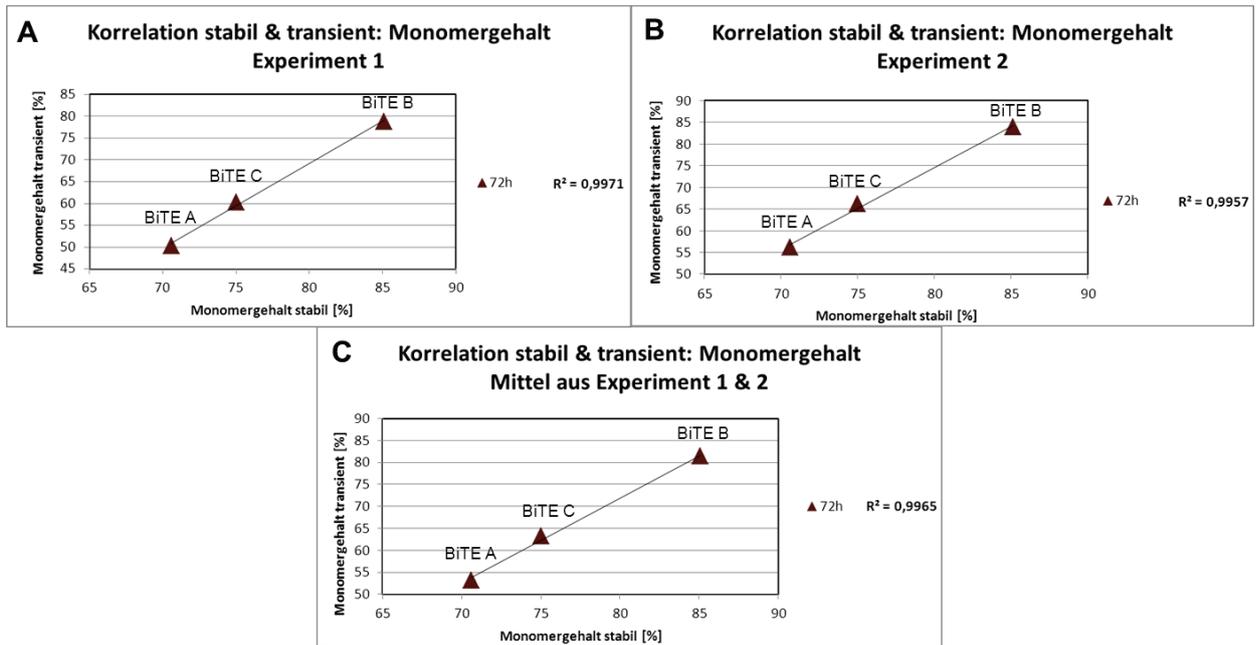


Abbildung 22: Korrelation von stabilen und transienten Transfektionen – Monomergehalt

Stabile und transiente Transfektion wurden für drei BiTE Antikörper durchgeführt und deren Korrelation in Bezug auf den Monomergehalt überprüft (2 Parallelexperimente 1 (A) & 2 (B) und deren Mittelung (C)). Sowohl beide Einzelexperimente als auch deren Mittelung zeigten eine extrem hohe Korrelation mit R^2 -Werten von mindestens 0,99.

Durch die resultierenden Punkte jeweils eines Meßtages wurde eine Ausgleichsgerade gelegt und zu dieser die Geradengleichung sowie der R^2 -Wert bestimmt. Der R^2 -Wert, auch Bestimmtheitsmaß genannt, gibt die Qualität der Korrelation zweier Datenserien an. Er variiert zwischen 1 und 0, wobei 1 für eine perfekte Korrelation steht. Der R^2 -Wert kann prozentual interpretiert werden [81]. Tabelle 15 fasst diese Daten zusammen. Betrachtet man die Mittelung beider Experimente, so ergab sich für den 24 h Messwert der höchste R^2 -Wert für den Titer. Alle R^2 -Werte lagen bei mindestens 0,97. Die Korrelation der stabilen und transienten Daten lag somit bei mindestens 97 %.

Tabelle 15: Korrelation des Titers – Gleichungen und R^2 -Werte

Zeit	Geradengleichung: $y =$			R^2 Titer		
	Exp. 1	Exp. 2	Mittel	Exp. 1	Exp. 2	Mittel
24 h	$0,0338x-0,2797$	$0,0345x+0,2411$	$0,0342x-0,0193$	0,9985	0,9978	1,000
48 h	$0,0328x+1,5851$	$0,0404x+0,3086$	$0,0366x+0,9468$	0,9549	0,9994	0,9777
72 h	$0,1214x-0,5578$	$0,0491x+1,273$	$0,0853x+0,3576$	0,9999	0,9595	0,9956

Tabelle 16: Korrelation des Monomergehalts – Gleichungen und R²-Werte

Zeit	Geradengleichung: y =			R ² Monomergehalt		
	Exp. 1	Exp. 2	Mittel	Exp. 1	Exp. 2	Mittel
72 h	1,9389x-85,968	1,8909x-76,689	1,9149x-81,328	0,9971	0,9957	0,9965

Der Monomergehalt (nur zum 72 h Zeitpunkt erhoben) wies ebenfalls eine deutliche Korrelation von 99,7 % auf.

Für beide Parameter (Titer und Monomergehalt) konnte somit eine starke Korrelation zwischen stabilen und transienten Transfektionen nachgewiesen werden.

5.1.6.2 Bestätigung der Korrelation

Aufgrund der extrem hohen R²-Werte von nahezu 1 ist es theoretisch möglich, ausgehend von den Geradengleichungen der Ausgleichsgeraden, Werte für stabile Transfektanten auf der Basis von transienten Daten zu berechnen. Sämtliche Geradengleichungen wurden deshalb nach „x“ aufgelöst und jeweils der stabile Titerwert/ Monomergehalt berechnet.

Tabelle 17 & Tabelle 18 fassen diese Berechnungen zusammen.

Tabelle 17: Titerberechnung mittels Geradengleichungen

Zeitpunkt	BiTE A [µg/ml]		
	Exp. 1	Exp. 2	Mittel 1 & 2
24 h	40,5	28,6	34,4
48 h	4,9	31,7	19,7
72 h	34,1	6,6	26,2
∅	26,5	22,3	26,8
gemessener stabiler Titer	<u>35,1</u>		

Zeitpunkt	BiTE B [µg/ml]		
	Exp. 1	Exp. 2	Mittel 1 & 2
24 h	409,4	403,5	405,8
48 h	390,7	405,3	398,8
72 h	406,2	391,5	401,7
∅	402,1	400,1	402,1
gemessener stabiler Titer	<u>406,7</u>		

Zeitpunkt	BiTE C [$\mu\text{g/ml}$]		
	Exp. 1	Exp. 2	Mittel 1 & 2
24 h	157,5	176,3	166,8
48 h	212,9	171,4	190,0
72 h	167,5	210,2	179,7
\emptyset	179,3	186,0	178,8
gemessener stabiler Titer	<u>166,0</u>		

Meßtag mit akkuratestem Ergebnis; akkuratester Mittelwert aller Meßtage

Hierbei soll im Folgenden nur auf die Daten der Mittelung der Experimente 1 & 2 eingegangen werden. Für BiTE A ergaben sich über drei Meßtage hinweg Werte zwischen 20 $\mu\text{g/ml}$ und 34 $\mu\text{g/ml}$. Der tatsächliche stabile Wert betrug 35 $\mu\text{g/ml}$. BiTE B wurde zwischen 399 $\mu\text{g/ml}$ und 406 $\mu\text{g/ml}$ eingegrenzt bei einem tatsächlichen stabilen Titer von 407 $\mu\text{g/ml}$. Werte zwischen 167 $\mu\text{g/ml}$ und 190 $\mu\text{g/ml}$ wurden für BiTE C berechnet. Dessen tatsächlicher stabiler Titer betrug 166 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 18: Monomergehaltsberechnung mittels Geradengleichungen

Monomergehalt (MG) 72 h	BiTE A [%]	BiTE B [%]	BiTE C [%]
Exp. 1	70,3	85,0	75,4
Exp. 2	70,2	84,9	75,5
Mittel 1 & 2	70,3	84,9	75,5
gemessener stabiler MG	<u>70,6</u>	<u>85,1</u>	<u>75,0</u>

Die Berechnungen des Monomergehaltes lieferten hoch akkurate Werte, die sich lediglich im Zehntelbereich von den gemessenen Daten unterschieden.

Betrachtet man nun die Abweichungen von den errechneten stabilen Werten zu den gemessenen Daten, so erhält man Titer- und Monomergehaltsprognosen von unterschiedlicher Qualität mit unterschiedlich großen Abweichungen vom gemessenen stabilen Wert (Tabelle 19 und Tabelle 20). Dabei ist zu beobachten, dass erwartungsgemäß diejenige Berechnung, der die Geradengleichung mit dem besten R^2 -Wert zugrunde lag, auch die korrektesten Daten lieferte. Für die Mittelung beider Experimente ist dies die Geradengleichung des 24 h Wertes. Hierbei ergeben sich für alle drei BiTE Antikörper Titervorhersagen, die lediglich um maximal 2 % vom tatsächlichen gemessenen Titerwert abweichen.

Tabelle 19: Prozentuale Abweichung der errechneten sowie der gemessenen stabilen Daten

Zeit	BiTE A [%]		BiTE B [%]		BiTE C [%]		R ² -Wert	
	Exp.1/ 2	Mittel	Exp.1/ 2	Mittel	Exp.1/ 2	Mittel	Exp.1/ 2	Mittel
24 h	-15,4/ 18,6	1,95	-0,7/ 0,8	0,21	5,1/ -6,2	-0,47	0,9985/ 0,9978	1
48 h	86,0/ 9,6	43,83	3,9/ 0,3	1,95	-28,2/ -3,3	-14,46	0,9549/ 0,9994	0,9879
72 h	2,8/ 81,3	25,48	0,1/ 3,7	1,23	- 0,9/ -26,7	-8,27	0,9999/ 0,9595	0,9959

Im Falle des Monomergehalts war eine noch perfektere Vorhersage möglich mit Abweichungen von unter einem Prozent.

Tabelle 20: Abweichung der Monomergehaltsvorhersage von den gemessenen stabilen Daten

Zeit	BiTE A [%]		BiTE B [%]		BiTE C [%]	
	Exp.1/ 2	Mittel	Exp.1/ 2	Mittel	Exp.1/ 2	Mittel
72 h	0,4/ 0,5	0,49	0,2/ 0,2	0,18	-0,6/ -0,7	-0,66

Eine graphische Gegenüberstellung (Abbildung 23) der besten Vorhersage gegen die tatsächlich gemessenen stabilen Daten unterstreicht die starke Korrelation der beiden Datensätze sowie die hohe Qualität der Titer- und Monomergehaltsvorhersage.

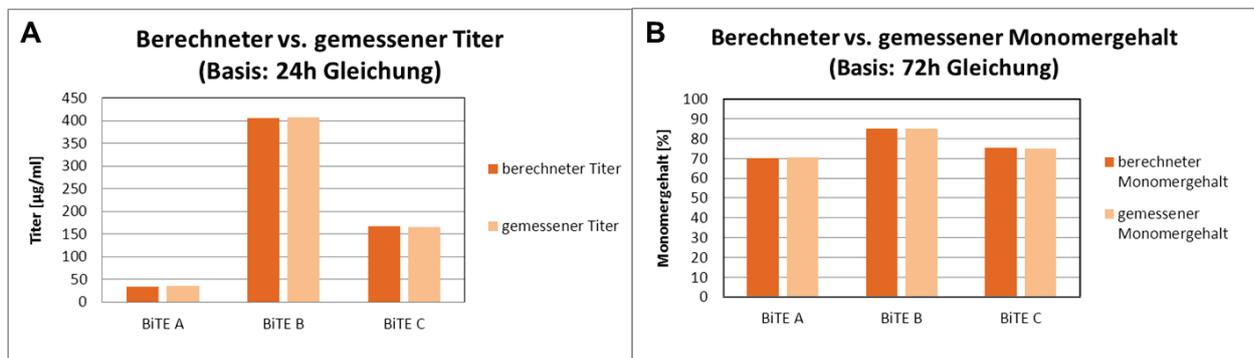


Abbildung 23: Gegenüberstellung von berechneten und gemessenen stabilen Daten (Mittelung von Exp. 1 & 2)

Drei BiTE Antikörper wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert. Mit Hilfe einer zuvor ermittelten Geradengleichung wurden Daten (Titer und Monomergehalt) für eine stabile Variante der Zelllinien berechnet. Diese Berechnungen wurden zuletzt den tatsächlich gemessenen stabilen Daten gegenübergestellt. Hierbei wurde deutlich, dass die untersuchte Art der Titer- (A) und Monomergehaltsberechnung (B) sehr akkurate Daten mit extrem geringen Abweichungen liefert.

Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch die transient in HEK293-Zellen gewonnenen Daten sehr präzise Vorhersagen für entsprechende stabile Linien bezüglich Titer und Monomergehalt zu treffen.

5.2 Alternativen zur klassischen Zelliniengenerierung

Als zweiter Teil dieser Doktorarbeit sollten alternative Wege zur BiTE Generierung betrachtet werden bzw. Abweichungen vom klassischen Prozess in Bezug auf Screening Verbesserung getestet werden.

5.2.1 BiTE Expression in *E. coli*

Zum einen sollte untersucht werden, ob sich BiTE Moleküle abgesehen von CHO-Zellen auch in Prokaryoten exprimieren lassen. Hierzu wurde das Bakterium *Escherichia coli* ausgewählt. Zum anderen wurde der Einfluss unterschiedlicher Codonoptimierungen auf die Expression in *E. coli* untersucht.

5.2.1.1 Arabinose-induzierte Expression in *E. coli*

Für die Produktion von BiTE Antikörpern in Bakterien wurde der *E. coli* Stamm BL21 A1 herangezogen. Als zugehöriger Vektor wurde das Plasmid „pGood“ benutzt. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation des pBad Plasmids der Firma Invitrogen (Austausch der Ampizillin-Resistenz gegen eine Kanamycin-Resistenz). Das Plasmid pGood beinhaltet einen bakteriellen Replikationsursprung, Elemente zur Arabinose-induzierten Proteinexpression [82] und eine Kanamycin-Resistenz. BiTE Moleküle wurden an das pelB-Signalpeptid angehängt, welches für den Transport von produziertem Protein in das Periplasma verantwortlich ist [83] und in den in 5.1.5 aufgeführten Konstruktvarianten in das Plasmid kloniert. Die Durchführung der Arabinose-Induktion ist in Kapitel 4.6.1 beschrieben. Aufschluss der Bakterien und Isolation der BiTE Antikörper wurden mittels Ultraschall durchgeführt (siehe 4.6.3) und die gewonnene BiTE Lösung per FACS-Analyse quantifiziert (siehe 4.2).

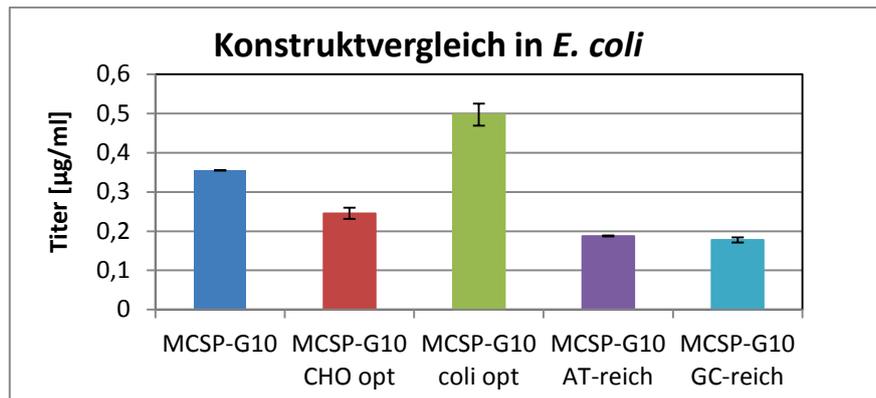
Die Berechnung des CAI (siehe 5.1.3.1) für die verschiedenen Konstruktvarianten auf der Basis von *E. coli* ergab folgende theoretisch zu erwartende Expressionsreihenfolge:

Tabelle 21: CAI auf der Basis von *E. coli*-Expression

Konstrukt	CAI Basis <i>E. coli</i>
MCSP-G10	0,73
MCSP-G10 CHO opt	0,77
MCSP-G10 coli opt	0,97
MCSP-G10 AT	0,80
MCSP-G10 GC	0,70

Demnach wurde für das coli-optimierte Konstrukt die beste Expression erwartet, gefolgt vom AT-reichen, Grundkonstrukt MCSP-G10, CHO-optimierten sowie GC-reichen Konstrukt.

Die tatsächliche Expression von verschiedenen Konstruktvarianten lieferte folgendes Bild (Abbildung 24):



Konstrukt	MCSP-G10	MCSP-G10 CHO opt	MCSP-G10 coli opt	MCSP-G10 AT-reich	MCSP-G10 GC-reich
Titer	0,36	0,25	0,50	0,19	0,18

Abbildung 24: Expression verschiedener MCSP-Varianten in *Escherichia coli*

Fünf verschiedene bakteriell exprimierte Varianten der MCSP-G10 BiTE Sequenz wurden im FACS auf Expression getestet. Die beste Expression zeigte hierbei das für *E. coli*-Expression optimierte Konstrukt, gefolgt von MCSP-G10, MCSP-G10 CHO opt, MCSP-G10 AT-reich sowie MCSP-G10 GC-reich.

Die beste BiTE Expression zeigte wie erwartet das für *E. coli*-Expression optimierte MCSP-G10 Konstrukt. Auf dieses folgten das unveränderte Konstrukt (MCSP-G10), das CHO-optimierte Konstrukt, das AT-reiche Konstrukt und schließlich das GC-reiche Konstrukt. Für sämtliche Konstrukte konnte somit bispezifische Bindung nachgewiesen werden, wobei die Expression aller Konstrukte sehr gering war (zwischen 0,18 µg/ml und 0,50 µg/ml). Für das AT-reiche Konstrukt war laut CAI eine höhere Expression zu erwarten gewesen. Tatsächlich führt eine Transformation mit diesem Konstrukt zur zweitschlechtesten Expression, eine geringere Expression besaß lediglich das GC-reiche Konstrukt. Wie erwartet zeigten also die unnatürlichen, in das Extreme artifizierten Konstrukte (AT-reich und GC-reich) weniger als 40 % der Expression des für *E. coli*-Expression optimierten Konstrukts. Dagegen brachte die auf *E. coli*-Expression ausgelegte Optimierung eine Expressionssteigerung von 30 % gegenüber dem aus Phage Display selektiertem Konstrukt. Deshalb sollte eine Codonoptimierung ausgelegt auf *E. coli* für bakterielle Expression durchgeführt werden.

5.2.1.2 Zytotoxizität bakterieller BiTE Moleküle

Um zu testen, ob die in *E. coli* produzierten BiTE Antikörper in der Lage sind, *in vitro* zur spezifischen Lyse von Zielzellen zu führen, wurde ein Zytotoxizitätsexperiment durchgeführt (siehe 4.1.7). Hierzu wurde bakterielles BiTE aufgereinigt. Im Zuge der Aufreinigung war es nicht möglich, reines Monomer zu gewinnen. Die Reinheit der monomeren Fraktion wurde anhand des Coomassie Gels sowie des Western Blots auf 50 % geschätzt. Um nun die korrekte Menge an funktionellem BiTE einsetzen zu können, wurde dieser Faktor bei der Berechnung der zu pipettierenden BiTE Menge berücksichtigt. Als Vergleichswert wurde in CHO-Zellen generiertes BiTE mitgeführt.

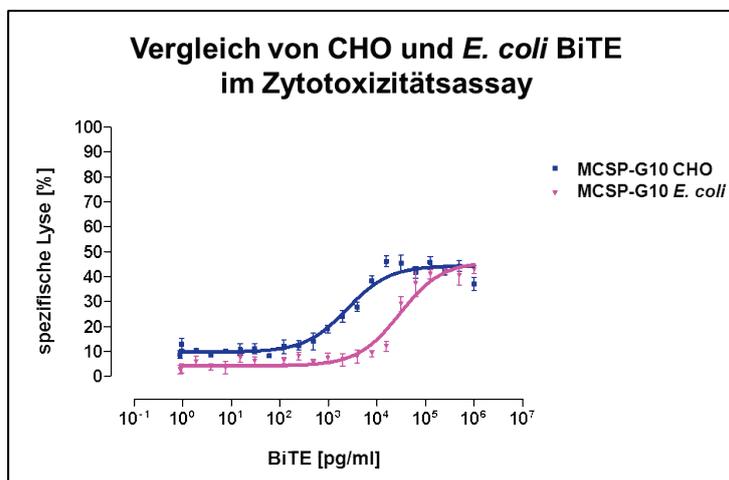


Abbildung 25: Zytotoxizitätsassay mit bakteriellem BiTE

Je ein aus CHO sowie ein aus *E. coli* isoliertes MCSP-G10 BiTE wurden in einem Zytotoxizitätsassay getestet. Hierzu wurden mit radioaktivem Chrom markierte, MCSP-Antigen-tragende CHO-Zellen mit MCSP BiTE sowie CD8⁺ T-Zellen für 18 h inkubiert. Durch Lyse der Zielzellen kam es zur Freisetzung von radioaktivem Chrom, welches nach 18 h gemessen wurde.

Hierbei konnte bestätigt werden (Abbildung 25), dass bakterielle BiTE Antikörper in der Lage sind, eine Zielzell-spezifische Lyse zu vermitteln. Die Werte für eine halbmaximale Lyse (EC50) waren hierbei beim CHO BiTE deutlich geringer als beim *E. coli* BiTE. Für das CHO BiTE waren 2437 pg/ml für eine Lyse der Hälfte der Zielzellen nötig, für das *E. coli* BiTE betrug die EC50 29413 pg/ml. Somit ist das CHO BiTE um einen Faktor 10 potenter als das *E. coli* BiTE.

5.2.1.3 Einwirkungen bakterieller Endotoxine auf die Ziel-spezifische Zelllyse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bakterielle BiTE Antikörper in der Lage sind, eine Zielzell-spezifische Lyse zu vermitteln, sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der T-Zellen

tatsächlich durch das BiTE verursacht wird oder ob sie lediglich auf im bakteriellen BiTE enthaltene Endotoxine zurückgeht.

Hierfür wurden folgende Konstrukte verwendet:

- ein *E. coli* MCSP-G10 BiTE (Endotoxingehalt: 186 EU/ml)
- ein *E. coli* CD3-Binder; hierbei handelt es sich um den in *E. coli* produzierten CD3-Binder eines BiTE Antikörpers. Dieser ist ohne anti-Zielantigen-Arm nicht in der Lage, eine Lyse der Zielzellen zu vermitteln. Die Produktion erfolgte IPTG-abhängig über den Vektor pComb (siehe 4.6.2). Die anti-CD3-Einzelkette ließ sich hierbei deutlich besser aufreinigen als das komplette BiTE Molekül. Sie zeigte weniger Abbau sowie Verunreinigungen durch *E. coli* Proteine und wurde mit einer Reinheit von 85 % bewertet. (Endotoxingehalt: 2,85 EU/ml; mittels Lipopolysacchariden (LPS) auf 186 EU/ml eingestellt)
- ein CHO MCSP-G10 BiTE (Endotoxingehalt: 1,17 EU/ml)
- ein CHO MCSP-G10 BiTE, das auf denselben Endotoxingehalt eingestellt wurde wie das *E. coli* BiTE (Endotoxingehalt: 1,17 EU/ml; eingestellt mit LPS auf 186 EU/ml)

Diese wurden gemeinsam in einem Zytotoxizitätsexperiment getestet (siehe 4.1.7). Dabei ergab sich folgendes Bild (Abbildung 26):

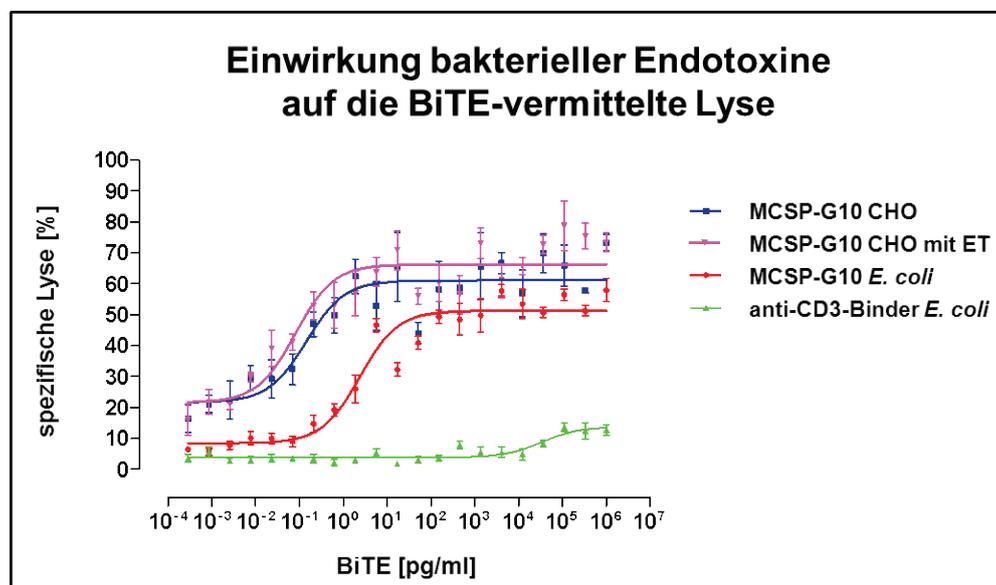


Abbildung 26: Einfluss bakterieller Endotoxine auf die Zielzell-spezifische Lyse

Um zu testen, welchen Einfluss Endotoxine (ET) auf die spezifische Lyse haben, wurden ein aus *E. coli* isoliertes BiTE, ein in *E. coli* produzierter anti-CD3 Binder, ein in CHO exprimiertes BiTE sowie ein dem *E. coli* Endotoxinwert angeglichenes CHO BiTE im Zytotox eingesetzt.

Der mit Endotoxinen versetzte, bakterielle anti-CD3-Binder führte zu keiner Zielzell-spezifischen Lyse. Da für eine Lyse von Zielzellen ein „halbes BiTE“ nicht ausreicht, sprechen die Daten dafür, dass die in der anti-CD3-Einzelkette enthaltenen Endotoxine zu keiner Aktivierung von T-Zellen gegen Antigen-tragende Zellen führen.

Das bakterielle MCSP-G10 BiTE zeigte eine EC50 von 2,391 pg/ml. Der große Unterschied zur EC50 des vorangegangenen Zytotoxansatzes liegt zum einen am Spender der CD8⁺ Zellen. Zum anderen ist ein Grund für die niedrigere EC50, dass das bakterielle BiTE aufgrund seiner Unreinheit bei diesem Ansatz mit einem höheren Faktor korrigiert wurde. Beim ersten Zytotoxansatz wurde eine Reinheit von 50 % geschätzt. Da sich dies jedoch als zu gut bewertet herausstellte, wurde die Reinheit auf 25 % korrigiert.

Der Unterschied in der halbmaximalen Lyse zwischen dem CHO und dem *E. coli*-stämmigen BiTE beträgt etwa einen Faktor von 17, d.h. das CHO BiTE war 17 fach so potent wie das *E. coli*-stämmige BiTE. Das mit Endotoxinen versetzte CHO BiTE (EC50: 0,08 pg/ml) unterschied sich um einen Faktor von 1,8 vom unbehandelten CHO BiTE (EC50: 0,14 pg/ml), was keinen signifikanten Unterschied darstellte.

Somit konnte gezeigt werden, dass die im BiTE enthaltenen Endotoxine keinen wesentlichen Einfluss auf die Zielzell-spezifische Lyse ausüben. Zum einen zeigte die bakterielle anti-CD3-Einzelkette keine nennenswerte Lyse und zum anderen zeigte eine Versetzung von CHO BiTE mit Endotoxinen keine signifikante Erniedrigung der halbmaximalen Lyse.

5.2.2 Das ClonePix-System zur Klonselktion

Als letzter Punkt wurden Ansätze gesucht, die eine klassische Zellliniengenerierung verkürzen würden.

5.2.2.1 Das ClonePix-System der Firma Genetix: Screening von IgG Molekülen

Beim ClonePix System handelt es sich um ein vollständig automatisiertes System zur Klonselktion (www.genetix.com).

Es wird hauptsächlich für die Produktion von Antikörpern verwendet. Hierbei werden Zellen nach der Transfektion in semisolidem Agar ausplattiert. Die Verwendung des Agars bewirkt, dass die Zellen stationär bleiben, eine Kolonie sich somit aus einer einzigen Zelle bilden kann und ein Ring aus Antikörpern um die wachsende Kolonie sezerniert wird. Dieser Antikörpering wird mittels des sog. „CloneDetect“, einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, quervernetzt und visualisiert (Abbildung 27). Hierbei gilt, je größer die sezernierte

Antikörpermenge desto stärker das Fluoreszenzsignal. Zusätzlich können schnell wachsende Klone selektiert werden, die nach definierter Zeit größer sind als andere. Ein Pickroboter pickt zuletzt diejenigen Kolonien mit dem stärksten Signal und überführt sie in eine neue Platte.

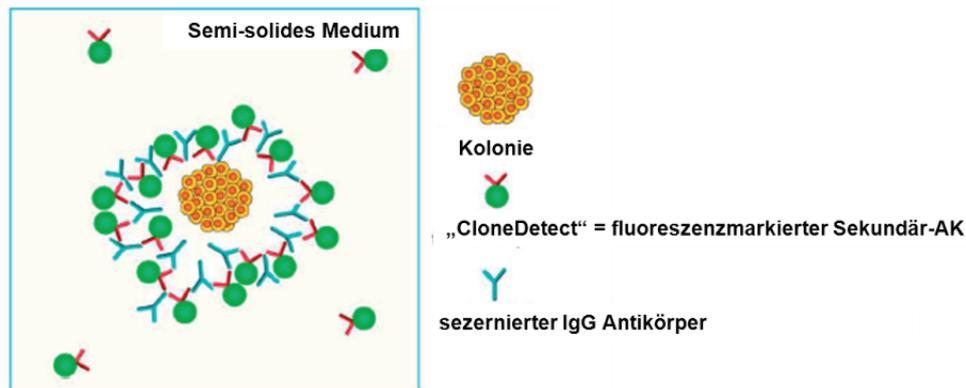


Abbildung 27: Das klassische ClonePix-Prinzip von Genetix (modifiziert nach www.genetix.com)

Zellen werden im semisoliden Agar ausplattiert und sekretieren einen Antikörper um die wachsende Kolonie. Dieser Ring wird mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (CloneDetect) präzipitiert und visualisiert.

Da die Erkennung durch den „CloneDetect“-Antikörper auf Bindung an den Fc-Teil eines Antikörpers beruht, ist dieses Prinzip im Falle von BiTE Antikörpern nicht einsetzbar (BiTE Antikörper besitzen keinen Fc-Teil). Deshalb wurden im Folgenden verschiedene Methoden zur Quervernetzung und Visualisierung getestet.

5.2.2.2 BiTE Präzipitierung mittels eines CD3-Peptids und eines anti-Penta-His-IgG Alexa Fluor 488-Antikörpers

In einem ersten Ansatz wurde der „CloneDetect“ Antikörper durch einen fluoreszenzmarkierten anti-Penta-His IgG-Antikörper sowie ein CD3-Peptid ersetzt. Das CD3-Peptid besteht aus 27 N-terminalen AS des CD3 ϵ sowie einem IgG Fc-Fragment. Letzteres erlaubt eine Dimerisierung des Moleküls (siehe Abbildung 13B).

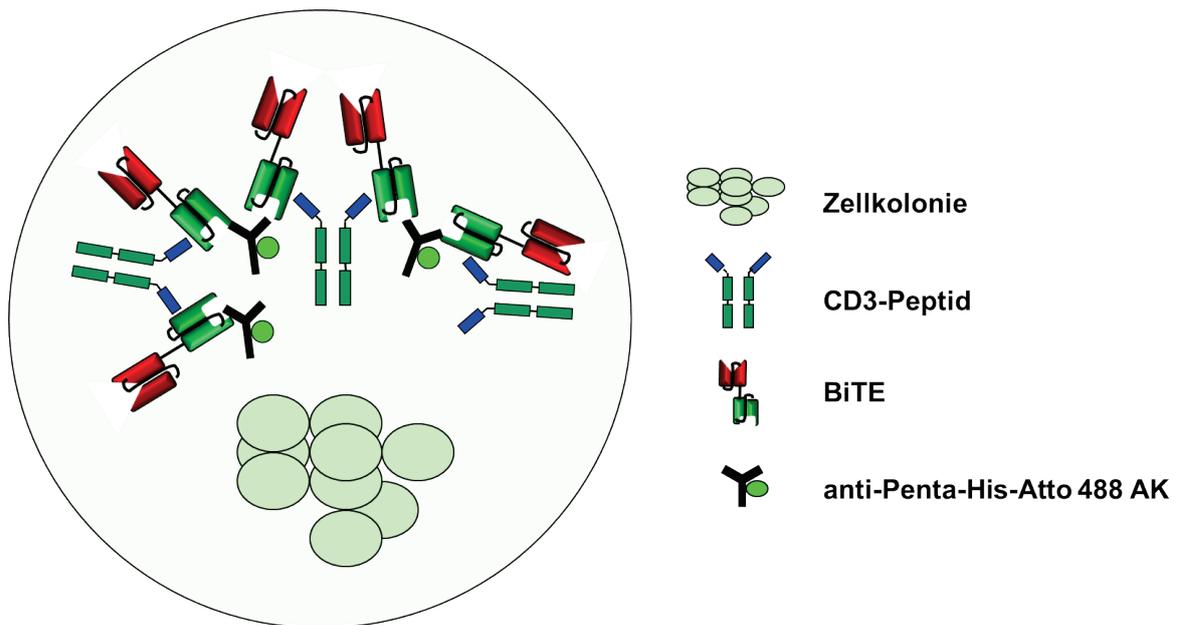


Abbildung 28: BiTE Präzipitation mittels eines CD3-Peptids und eines anti-Penta-His-Antikörpers

Eine Kolonie von Zellen bildet BiTE Antikörper und sezerniert diese in einen semisoliden Agar. Dort findet eine Quervernetzung mittels eines CD3-Peptids und eines fluoreszenzmarkierten anti-Penta-His-AKs statt: das CD3-Peptid (Dimer) verknüpft zwei BiTE Moleküle durch Bindung an den anti-CD3-Arm des BiTE; der anti-Penta-His-Antikörper wiederum verknüpft zwei weitere BiTE Moleküle durch Bindung an den Histidin-Tag der BiTE Antikörper.

Über das eingesetzte CD3-Peptid findet dadurch eine Verbindung zweier BiTE Antikörper statt, als dass ein CD3-Peptid Dimer jeweils zwei BiTE Moleküle an ihren anti-CD3-Einzelketten erkennt. Zur Quervernetzung kommt es durch die zusätzliche Gabe eines anti-Penta-His-Antikörpers. Dieser kann jeweils zwei BiTE Antikörper an ihren Histidin-Tags erkennen. Eine Fluoreszenzmarkierung des anti-Penta-His-Antikörpers ermöglicht eine Detektion des Präzipitats (Abbildung 28).

Um dies zu testen, wurde statt frischen Transfektanten eine fertige, stabile Zelllinie verwendet. Dies sollte sicherstellen, dass BiTE Sezernierung in das semisolid Medium stattfindet. Transfektanten des BiTE MCSP-G10 CHO opt wurden ausplattiert und für 10 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien im Fluoreszenzmikroskop auf Entstehung von BiTE Präzipitaten untersucht. Hierzu wurde mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt (Abbildung 29).

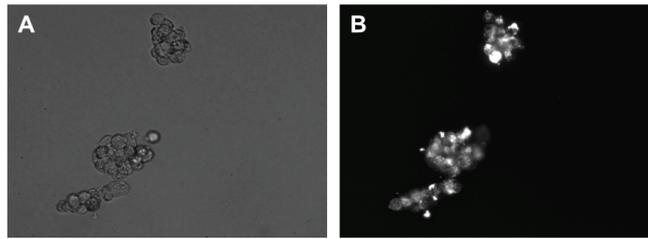


Abbildung 29: Präzipitierung von BiTE Antikörpern mittels eines CD3-Peptids und eines anti-Penta-His-Antikörpers

MCSP-G10 Transfektanten wurden in semisolidem Agar mit CD3-Peptid sowie fluoreszenzmarkiertem anti-Penta-His-AK ausplattiert und über 10 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Entstehung von Präzipitaten geprüft.

A) Zwei Zellkolonien in 5x Vergrößerung im Durchlicht (1 ms Belichtung)

B) Zwei Kolonien in 5x Vergrößerung nach Anregung mit blauem Licht. Ringe aus BiTE Präzipitaten sind um die einzelnen Zellen sichtbar (100 ms Belichtung).

Dabei konnten deutliche Fluoreszenzsignale detektiert werden. Anders als beim klassischen ClonePix-System erschienen die Fluoreszenzringe hierbei nicht um die komplette Kolonie, sondern um jede einzelne Zelle. Ein Grund hierfür scheint die hoch spezifische Bindung der Detektionsagenzien im Vergleich zu der des polyklonalen Serums des klassischen Ansatzes zu sein.

Diese Art der Detektion bringt jedoch ein Problem mit sich: im Falle von Dimerbildung der BiTE Moleküle kommt es auch ohne Zugabe eines CD3-Peptids zu einer Quervernetzung und somit zu einer Präzipitatbildung (Abbildung 30). Dies würde bedeuten, dass Kolonien, die vermehrt Dimere bilden, ein verstärktes Signal produzieren, was wiederum zur Selektion von Klonen führen würde, die einen nur geringen Anteil an Monomeren produzieren.

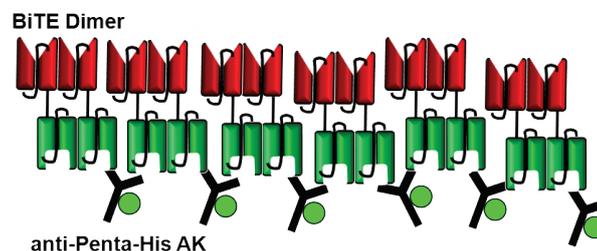


Abbildung 30: Präzipitatbildung verursacht durch BiTE Dimere

Zwei BiTE Monomere sind in der Lage, ein Dimer bilden. Im Falle eines Dimers kann es über einen anti-Penta-His-AK zu einer Präzipitatbildung kommen, ohne dass ein CD3-Peptid zur Quervernetzung zugegeben wird.

Da für eine stabile Zelllinie jedoch ein hoher Monomergehalt essentiell ist, sollte dieser Effekt ausgeschlossen werden. Hierzu wurden zwei verschiedene MCSP-G10 Klone ausgewählt, ein

„Monomer-Produzent“ (ein Klon, der vermehrt Monomer produziert) sowie ein „Dimer-Produzent“. Beide wurden jeweils mit bzw. ohne CD3-Peptid ausplattiert, 10 Tage inkubiert und auf Fluoreszenzbildung untersucht (Abbildung 31).

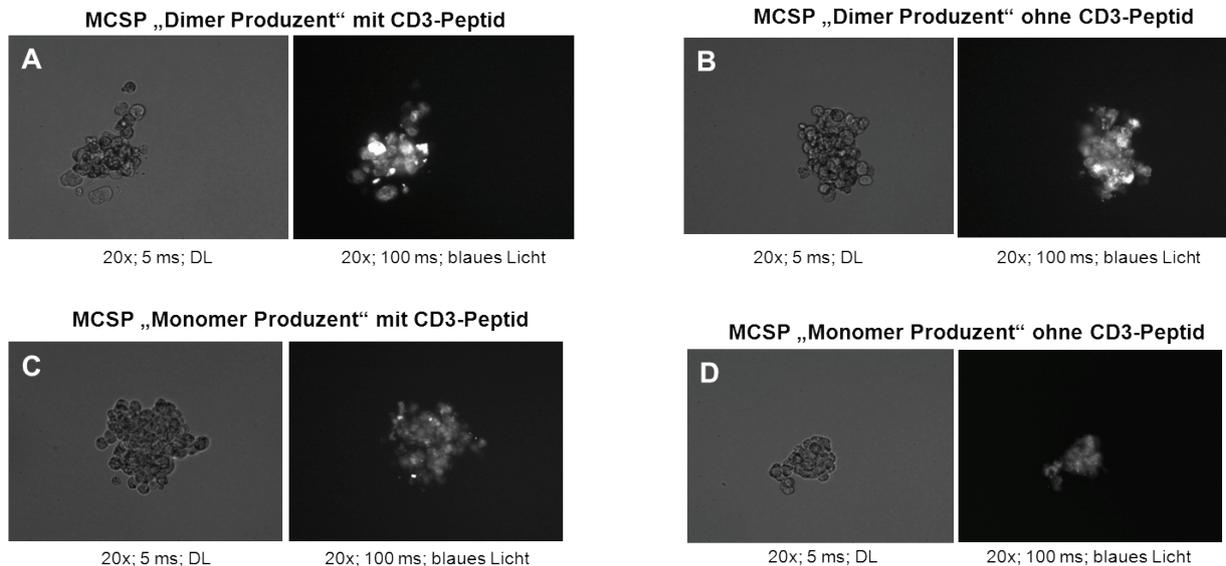


Abbildung 31: Präzipitation von BiTE Antikörpern mit bzw. ohne ein CD3-Peptid

Um zu testen, ob Dimerbildung zu einer ungewollten Präzipitatbildung und somit zu einer Intensivierung des Fluoreszenzsignales führt, wurden Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Penta-His-AK sowie mit bzw. ohne einem CD3-Peptid in semisolidem Agar ausplattiert und über 10 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die gewachsenen Kolonien im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

A/ B) Ein MCSP Klon, der einen sehr hohe Anteil an Dimer produziert, zeigte sowohl mit als auch ohne CD3-Peptid ein deutliches Signal nach Bestrahlung mit blauem Licht.

C/ D) Ein MCSP-Klon, der einen höheren Anteil an Monomer produziert, zeigte nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm ein deutlich schwächeres Signal als der „Dimer Produzent“. In beiden Fällen (mit und ohne CD3-Peptid) war ein Fluoreszenzsignal detektierbar.

Der Dimer-Produzent zeigte nach Anregung mit blauem Licht sowohl mit als auch ohne CD3-Peptid ein deutliches Fluoreszenzsignal. Hierbei zeigten sich in beiden Fällen keinerlei Unterschiede in den Intensitäten. Im Falle des Monomer-Produzenten kam es ebenfalls in beiden Fällen zur Emittierung eines Fluoreszenzsignals. Hierbei ist zu bedenken, dass kein Klon zu 100 % Monomer produziert. Bei dem hier ausgewählten Klon betrug das Verhältnis Monomer zu Dimer 70 % zu 30 %. Die Intensität des Signals war bei Zugabe eines CD3-Peptids minimal höher als ohne. Sowohl mit als auch ohne CD3-Peptid war das Signal jedoch deutlich schwächer als dasjenige des Dimer-Produzenten. Demnach ist dieser Aufbau für die Identifizierung eines Produzentenklons ungeeignet, da hiermit favorisiert unerwünschte Dimerproduzenten identifiziert werden.

6 Diskussion

6.1 Korrelation von transienten und stabilen Transfektionen in Bezug auf Titer und Monomergehalt von BiTE Antikörpern

6.1.1 Stabile Zellliniengenerierung

Die wachsende Nachfrage nach Biopharmazeutika hat zu großem Bedarf an gut produzierenden Zelllinien geführt [84]. Forschung und Innovationen im Bereich Vektoroptimierung, Wirtszell-Engineering, Medienentwicklung, Screening-Methoden sowie Prozessentwicklung haben hohe Ausbeuten an therapeutischen Proteinen möglich gemacht [85]. Wie für alle Biopharmazeutika ist es auch für BiTE Antikörper trotz ihrer hohen Wirksamkeit bei bereits geringen Dosen [5] notwendig, einen guten, stabilen Produzentenklon zu generieren. Die meisten biologisch aktiven Verbindungen werden in mammalian Zellen produziert [85], da diese in der Lage sind, große Mengen an Protein zu produzieren sowie korrekte posttranslationale Modifikationen auszubilden [86]. Hierbei wird meist die CHO-Zelllinie herangezogen, da diese bereits seit mehreren Jahrzehnten für die Produktion von Biologika verwendet wird und somit eine Virussicherheit demonstriert ist [87]. Alternativ werden für diese Zwecke auch Maus-Myeloma-Zellen (NS0), Baby Hamster Nierenzellen (BHK) sowie humane, embryonale Nierenzellen (HEK) verwendet [85]. Expression von Fremd-Genen findet hierbei hauptsächlich in Suspension statt. Aus diesem Grund wurde die CHO-K1-S Zelllinie entwickelt, welche in serumfreiem Medium wächst [88].

Eine stabile Zellliniengenerierung birgt jedoch auch massive Nachteile. Es handelt sich hierbei um einen extrem zeitaufwendigen sowie sehr kostspieligen Prozess, dessen Erfolg von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist. Dazu zählen die Integrationsstelle des eingebrachten Plasmids in die DNS der Wirtszelle, die Kopienanzahl an Plasmiden pro Zelle, die genomische Stabilität der Wirtszelle, die Stabilität der mRNA, die Vektorreinheit, der Wachstumsstatus der Zellen sowie die Sequenz des Zielgens selbst [86]. Die meisten Transfektionsmethoden basieren auf zufälliger Integration des Zielgenes in die Wirts-DNS, daher ist die Expression des Zielproteins sehr unberechenbar [89]. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Zielgen in eine stark transkribierte Region integriert, ist nicht besonders hoch [90, 91]. Als Konsequenz produzieren die meisten Klone eher geringe Mengen an Protein und folglich muss eine große Anzahl an Klonen überprüft werden, um einen guten Produzenten zu identifizieren. Des Weiteren führt eine Integration des Ziel-Gens in die Nähe von Heterochromatin zur Instabilität des Klones [92], was für eine Produzentenlinie ein Ausschlusskriterium darstellt [93].

6.1.2 Transiente Transfektionen

Mittels transienten Transfektionen können sehr schnell größere Mengen an rekombinantem Protein produziert werden [76]. Die für stabile Transfektionen gut geeignete CHO-Zelllinie führt bei transienten Transfektionen in der Regel nicht zu ausreichenden Proteinausbeuten [94]. Für transiente Transfektionen ist hingegen die HEK-Zelllinie sehr gut geeignet, da diese in der Lage ist, funktionale Proteine verschiedenster Quellen in angemessenen Titern zu bilden [77].

Vorteile von transienten Transfektionen bestehen zum Beispiel darin, dass sie im Vergleich zu stabilen sehr einfach und sehr schnell durchzuführen sind. Auch die Konstruktion der benötigten Vektoren ist sehr unkompliziert: Der Plasmid-Vektor enthält in der Regel einen oft viralen Promotor/ Enhancer, prokaryotische Elemente zur Reproduktion in Bakterien (Replikationsursprung, Antibiotika-Resistenzen) sowie das Zielgen. Stabile Vektorkonstrukte benötigen zusätzliche Selektionsmarker unter eigenen Promotoren [86]. Des Weiteren zählt zu den Vorteilen transienter Transfektionen, dass viele verschiedene Wirtszellen verwendet werden können, dass gleichzeitiges Fahren vieler verschiedener Transfektionen möglich ist und die Dauer transienter Transfektionen sehr kurz (1-3 Tage) ist. Nach 12-72 Stunden wird ein Expressionsmaximum erreicht, danach kommt es zu einem rapiden Abbau durch Verlust des Plasmids (keine Selektion im Gegensatz zu stabilen Transfektionen) oder Tod der Zellen [94].

6.1.3 Transiente Transfektionen als „Horoskop“ für stabile Zelllinien

Als Teil dieser Arbeit sollte eine einfache Screeningmethode entwickelt werden, die Einblicke in den Verlauf einer stabilen Zelliniengenerierung ermöglichen würde. Hierzu wurden transiente Transfektionen ausgewählt und die Aussagekraft dieser in Bezug auf Titer und Monomergehalt von stabilen Linien überprüft. Dies wurde am Beispiel von bispezifischen Einzelkettenantikörpern, den sog. BiTE Antikörpern (Bispecific T-cell Engager) durchgeführt.

BiTE Antikörper besitzen eine anti-Zielantigen- sowie eine anti-CD3-spezifische Einzelkette, verbunden über einen Glycin-Serin Linker [28]. Ihre anti-Tumor Wirkung rührt daher, dass sie körpereigene T-Zellen gegen Tumorzellen richten [95]. Diese Aktivierung findet nur in Anwesenheit des Zielantigens statt [96]. Die immunologische Synapse, deren Bildung durch die BiTE Moleküle angeregt wird, ist unabhängig von MHC Klasse I Erkennung, was die Eliminierung eines häufig vom Tumor genutzten Mechanismus, der Immunabwehr zu entgehen, ermöglicht [39].

Wie alle Einzelkettenantikörper sind auch BiTE Moleküle in der Lage, Oligomere zu bilden [42]. Die Umwandlung von einem Monomer in ein Dimer ist abhängig von der Länge des Linkers,

von der Sequenz des Antikörpers sowie von externen Faktoren (Temperatur, Puffer, etc.) [43]. Da jedoch nur die monomere Version des Antikörpers in der Klinik einsetzbar ist, stellt im Falle von BiTE Antikörpern nicht nur der Titer ein ausschlaggebendes Kriterium dar, sondern auch der Monomergehalt.

BiTE Antikörper der neuen Generation (Kreuzreaktivität zu Cynomolgus Affe) besitzen alle denselben CD3-Binder und unterscheiden sich lediglich durch die anti-Zielantigen-bindende Einzelkette. Somit geht die Divergenz der Titerwerte verschiedener BiTE Antikörper auf den anti-Zielantigen-Arm zurück, da der anti-CD3-Arm nicht variant ist.

Um das Vorhandensein einer Korrelation von transienten und stabilen Transfektionen zu überprüfen, wurden verschiedene BiTE Moleküle zunächst stabil und anschließend transient miteinander verglichen. In einem nächsten Schritt wurde die Übertragbarkeit der transienten Titer- und Monomerdaten auf das stabile System beurteilt.

6.1.3.1 Systemetablierung mittels Codonvariationen

Da ein solches Screeningsystem in der Lage sein muss, feinste Expressionsunterschiede zu detektieren, wurde die prinzipielle Funktionalität dieses Ansatzes zunächst anhand von Codonvariationen der Sequenz eines Melanom BiTE (MCSP BiTE) überprüft.

Der genetische Code ist degeneriert, das bedeutet, dass für eine Aminosäure (AS) mehr als ein zugehöriges Basentriplett zur Verfügung steht (Ausnahmen bilden die AS Methionin und Tryptophan, von denen jeweils nur ein Codon existiert) [97]. Diese synonymen Codons werden allerdings nicht gleichwertig verwendet (Codon Bias). Der Codon Bias unterscheidet sich zum einen zwischen verschiedenen Spezies, zum anderen aber auch zwischen verschiedenen Genen innerhalb einer Spezies [98]. Ursachen für diesen unterschiedlichen Gebrauch liegen bei Mutationsmustern, translationaler Selektion zwischen Codons, Selektion gegen bestimmte Strukturen in der DNS und vor allem bei Verfügbarkeit der jeweiligen t-RNS. Stark exprimierte Gene zeigen hierbei einen sehr starken Bias, wohingegen niedrig exprimierte Gene fast zu synonymen Codongebrauch neigen [98]. Dies ist bedingt durch die Tatsache, dass der Codon Bias die Translationsgeschwindigkeit und damit die Genexpression beeinflusst [99]. Des Weiteren wird durch Codon Bias der Energieaufwand der Fehlerkorrektur klein gehalten, welche ein sehr kostspieliger Prozess ist. Nicht optimale Codons können zu Fehlern in der Translation führen. Der nötige Austausch der „falschen AS“ steigert dabei die GTP-Hydrolyse und damit den Energieverbrauch der Zelle [97, 100].

Im Allgemeinen besitzt der GC-Gehalt den größten Einfluss auf den Codon Bias. Des Weiteren stehen zwei Codons zur Verfügung, die auf Adenin oder Thymin enden können, so wird in der Regel dasjenige Codon mit der Base Thymin bevorzugt. Dies soll vor sog. „near-stop Codons“ schützen. „Near-stop Codons“ sind nur eine Punktmutation von Stopcodons entfernt und daher gefährdet, einen frühzeitigen Proteinabbruch herbeizuführen. Zu diesen Codons zählen die Triplets TCA (Serin), CGA (Arginin) sowie GGA (Glycin) [101].

Auch Stopcodons unterliegen dem Codon Bias. Während Prokaryoten und niedrige Eukaryoten das Stopcodon TAA bevorzugen, präferieren höhere Eukaryoten das TGA Codon [102-105].

Für die verschiedenen Konstruktvariationen wurden zum einen künstliche Extreme generiert (möglichst AT-/ GC-reich) und zum anderen Optimierungen für die Organismen *Cricetulus griseus* (Herkunftsorganismus der CHO-Zelllinie) sowie *Escherichia coli* durchgeführt. Der Codongebrauch der einzelnen Sequenzen ist in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Verwendung der jeweiligen Codons in den unterschiedlichen Konstruktvariationen

AS	Codon	MCSP-G10	MCSP-G10 CHO opt	MCSP-G10 coli opt	MCSP-G10 AT	MCSP-G10 GC
Glutamin	CAG	71,43	100,00	92,86	3,57	100,00
	CAA	28,57	0,00	7,14	96,43	0,00
Valin	GTT	13,51	0,00	81,08	48,65	0,00
	GTC	43,24	24,32	0,00	0,00	54,05
	GTA	5,41	0,00	2,70	51,35	0,00
	GTG	37,84	75,68	16,22	0,00	45,95
Leucin	CTT	6,06	0,00	0,00	0,00	3,03
	CTC	24,24	0,00	0,00	0,00	39,39
	CTA	12,12	0,00	0,00	0,00	0,00
	CTG	33,33	100,00	100,00	0,00	57,58
	TTA	6,06	0,00	0,00	100,00	0,00
	TTG	18,18	0,00	0,00	0,00	0,00
Phenylalanin	TTT	20,00	6,67	93,33	100,00	0,00
	TTC	80,00	93,33	6,67	0,00	100,00
Isoleucin	ATT	9,09	0,00	90,91	54,55	0,00
	ATC	54,55	100,00	9,09	0,00	100,00
	ATA	36,36	0,00	0,00	45,45	0,00
Methionin	ATG	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Alanin	GCT	34,38	31,25	3,13	56,25	0,00
	GCC	40,63	62,50	28,13	0,00	62,50
	GCA	18,75	6,25	68,75	43,75	0,00
	GCG	6,25	0,00	0,00	0,00	37,50
Prolin	CCT	52,63	68,42	15,79	57,89	0,00
	CCC	10,53	21,05	0,00	0,00	63,16
	CCA	31,58	10,53	0,00	42,11	0,00
	CCG	5,26	0,00	84,21	0,00	36,84
	TGT	75,00	25,00	62,50	100,00	0,00
Cystein	TGC	25,00	75,00	37,50	0,00	100,00
	TCT	23,33	28,33	11,67	35,00	0,00
Serin	TCC	33,33	63,33	0,00	0,00	55,00
	TCA	18,33	0,00	5,00	40,00	0,00
	TCG	1,67	0,00	0,00	0,00	21,67
	AGT	6,67	1,67	3,33	25,00	0,00
	AGC	16,67	6,67	80,00	0,00	23,33
	TGT	75,00	25,00	62,50	100,00	0,00
Threonin	ACT	32,50	0,00	0,00	55,00	0,00
	ACC	42,50	95,00	85,00	0,00	62,50
	ACA	17,50	5,00	12,50	45,00	0,00
	ACG	7,50	0,00	2,50	0,00	37,50
Aspartat	GAT	46,15	15,38	100,00	100,00	0,00
	GAC	53,85	84,62	0,00	0,00	100,00
Glutamat	GAA	31,25	56,25	100,00	100,00	0,00
	GAG	68,75	43,75	0,00	0,00	100,00
Tyrosin	TAT	37,04	22,22	100,00	100,00	0,00
	TAC	62,96	77,78	0,00	0,00	100,00
Asparagin	AAT	31,82	4,55	95,45	100,00	0,00
	AAC	68,18	95,45	4,55	0,00	100,00
Lysin	AAA	40,91	18,18	100,00	100,00	0,00
	AAG	59,09	81,82	0,00	0,00	100,00
Histidin	CAT	77,78	11,11	77,78	100,00	0,00
	CAC	22,22	88,89	22,22	0,00	100,00
Glycin	GGT	40,00	12,00	74,67	60,00	0,00
	GGC	22,67	58,67	21,33	0,00	57,33
	GGA	20,00	22,67	4,00	40,00	0,00
	GGG	17,33	6,67	0,00	0,00	42,67
Tryptophan	TGG	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Arginin	AGA	35,29	17,65	0,00	58,82	0,00
	AGG	23,53	29,41	0,00	0,00	0,00
	CGT	5,88	0,00	88,24	17,65	0,00
	CGC	17,65	5,88	11,76	0,00	47,06
	CGA	11,76	0,00	0,00	23,53	0,00
	CGG	5,88	47,06	0,00	0,00	52,94
Stop	TAA	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00
	TAG	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	TGA	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00

Aufschluss darüber, welche Konstruktvariation am besten exprimieren müsste, lieferte der Codon Adaption Index (CAI) [98]. Die hierfür berechneten Werte sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Demnach müssten bei Funktionieren der transienten Transfektionsstudien die Konstrukte in folgender Reihenfolge mit absteigenden Titerwerten exprimieren:

MCSP-G10 CHO opt > MCSP-G10 GC-reich > MCSP-G10 > MCSP-G10 coli opt > MCSP-G10 AT-reich

Dieses Bild stellte sich zu größten Teilen ein. Die künstlich AT-reiche Sequenz (GC-Gehalt: 34,57 %) produzierte die geringste Proteinmenge. Dies ist mit dem CAI im Einklang und wurde auch insoweit erwartet, als dass AT-reiche Sequenzen generell von Bakterien bevorzugt werden, nicht aber von Eukaryoten, zu denen CHO-Zellen gehören. Als zweit-schlechtester Produzent wurden die Transfektanten des MCSP-G10 coli opt Konstruktes identifiziert. Auch dies entspricht den Erwartungen, da die für *E. coli*-Expression optimierte Sequenz ebenfalls eher AT-reich ist (GC Gehalt: 50,46 %) und somit für eukaryotische Expression ungeeignet ist.

Die Konstrukte MCSP-G10 CHO opt (GC-Gehalt: 62,00 %) und MCSP-G10 GC-reich (GC-Gehalt: 69,13 %) lagen gleich auf. Dies erfüllte ebenso die Erwartungen, nach denen Eukaryoten wie CHO-Zellen GC-reiche DNS einer AT-reichen vorziehen.

Laut CAI sollte die MCSP-G10 Ursprungssequenz die goldene Mitte darstellen. Praktisch zeigte dieses Konstrukt jedoch die beste Expression. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass das MCSP-G10-Grundkonstrukt eine extrem hohe Sequenzähnlichkeit zur humanen Keimbahn aufweist und die Sequenz damit für die Expression eines humanen Antikörpers am besten geeignet ist.

Die Auftrennung sämtlicher Konstrukte in der Größenausschlusschromatographie zeigte, dass im Gegensatz zu den Konstrukten MCSP-G10, MCSP-G10 CHO opt sowie MCSP-G10 GC-reich das coli-optimierte sowie das AT-reiche Konstrukt Abbau aufwiesen. Eben diese beiden Konstrukte sind von der Häufigkeit der verwendeten Codons der Zelllinie CHO sehr unangepasst (siehe 5.1.3.1). Die fortwährende Verwendung von Codons, zu denen es in CHO-Zellen nur einen sehr beschränkten Vorrat an passenden t-RNSs gibt, führt dazu, dass die Zelle nicht in der Lage ist, das Protein vollständig zu translatieren. Sobald die den Basentriplets zugehörigen t-RNSs „ausgehen“, kann die Zelle die Proteinproduktion nicht fortsetzen und es kommt zur Entstehung von Proteinfragmenten. Im Normalfall werden missgefaltete Proteine oder Proteinbruchstücke im Proteasom abgebaut [106]. Kommt es jedoch zur Lyse der Zelle, werden diese Bruchstücke freigesetzt.

Dies könnte die geringere Konzentration trotz identischer Proteinsequenz aller MSCP-Variationen für diese beiden Konstrukte sowie das Vorhandensein von Abbau erklären.

Für die Detektion von Abbau gibt es außerdem Folgendes zu bedenken: zur Bestimmung der Anteile an Monomer, Dimer, Aggregat und Abbau wurde der Zellkulturüberstand zunächst über His-Spin Säulchen aufgereinigt. Da die Aufreinigung über den His-Tag der Antikörper erfolgte, sollte demnach Abbau, der meist C-terminal auftritt, nicht aufgereinigt werden können (C terminaler Abbau führt zur Abtrennung des His-Tags). Hierzu wurden jedoch sehr unstringente Bedingungen gewählt, um möglichst die komplette Proteinmenge zu eluieren. Somit ist es möglich, dass in Ansätzen, in denen die Konzentration sehr gering war und die Bindungsstellen der Säulchen nicht durch Antikörper mit intakten His-Tag vollbesetzt waren (AT-reich/ coli optimiert), bedingt durch die niedrige Stringenz auch Proteinpartikel binden konnten, die einen degradierten oder keinen His-Tag aufwiesen. Auf diesem Wege konnte neben N-terminalem Abbau auch C-terminaler Abbau in das Eluat gelangen.

Die Ergebnisse konnten somit bestätigen, dass es möglich ist, über transiente Transfektionen feine Expressionsunterschiede, verursacht durch Codonvariationen [107-112], zu detektieren. Dementsprechend wurde das System weiter verwendet, um qualitative und quantitative Vorhersagen über stabile BiTE Expression zu treffen.

6.1.3.2 Relevanz von Codonoptimierungen für die Zelliniengenerierung

Über den Vergleich von Codonvariationen ließ sich zeigen, dass das für CHO-Expression optimierte Konstrukt in der Praxis zu keiner besseren Expression führte wie dasjenige Konstrukt, das über Phage Display als Kandidat selektiert wurde (MCSP-G10). Auch der Vergleich der unterschiedlichen Optimierungen des Signalpeptids lieferte keinerlei Erhöhung der Expression. Die Codonoptimierung für CHO-Expression ist jedoch Standard für eine stabile Zelliniengenerierung [113]. Sie ist mit deutlichem finanziellem sowie zeitlichem Aufwand verbunden. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten werfen die Frage auf, ob eine Codonoptimierung mit ihren Nachteilen (teuer, zeitintensiv) sinnvoll ist. Die Investierung eines Neuntels bis Sechstels der Dauer einer Zelllinienentwicklung in einen Prozess, der Geldmittel verschlingt und unter Umständen zu keiner Verbesserung der Zelllinie führt, muss sorgfältig abgewogen werden.

6.1.3.3 Ursächlichkeiten der Dimerisierung

Die Betrachtung des Monomergehalts (Größenausschlusschromatographie) der unterschiedlichen MCSP-Konstrukte zeigte große Unterschiede auf. Während die gut exprimierenden Konstrukte MCSP-G10, MCSP-G10 CHO opt sowie MCSP-G10 GC-reich relativ gleiche Monomerdaten aufwiesen (55 %-60 %), ergaben sich für die Konstrukte MCSP-G10 coli opt und MCSP-G10 AT-reich weitaus geringere Prozentwerte. Das AT-reiche Konstrukt mit der mit Abstand geringsten Expression besaß einen Monomergehalt von 27 % und lag somit noch einmal deutlich unter dem für *E. coli*-Expression optimierten Konstrukt (45 %). Hierbei ist zu vermuten, dass der geringe Titer und vor allem das dadurch bedingte Vorhandensein von Abbau und Fremdproteinen das Verhältnis von Monomer zu Dimer verschoben.

Bei Durchführung der transienten Transfektionsstudien boten sich im FACS mehrere Möglichkeiten zur Titerbestimmung: 1) ein Test auf bispezifische Bindung (das BiTE bindet an das Zielantigen und gleichzeitig an das CD3-Antigen) sowie 2) die Bestimmung des Titers über nur einen der beiden Antikörper-Arme. Um zu überprüfen, ob die Art der Bestimmung eine Auswirkung auf den detektierten Titer hat, wurden alle drei Messmethoden im FACS getestet (bispezifisch, monospezifisch anti-Zielantigen, monospezifisch anti-CD3). Hierbei zeigte sich, dass die monospezifische anti-Zielantigen-Bindung sowie die bispezifische Bindung relativ gleiche Titerdaten lieferten, die nach 48 h nicht mehr signifikant anstiegen. Der Ansatz auf Basis der monospezifischen Bindung der CD3-Seite führte jedoch zu Titerdaten, die über 72 h hinweg kontinuierlich anstiegen und am letzten Meßtag in etwa den doppelten Titerwert der monospezifischen anti-Zielantigen/ bispezifischen Bindung ausmachten. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass es im Laufe der 72 h Kultivierung zu Abbau des BiTE am Antigen-bindenden Arm kam (N-terminal). Da jedoch BiTE Abbau eher C-terminal (CD3-Binder) stattfindet, ist es wahrscheinlicher, dass die fehlende Bindung durch vermehrte Dimerbildung am anti-Zielantigen-bindenden Arm zustande kam. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass das hierbei verwendete BiTE MCSP-G10 ein Molekül ist, das relativ stark zur Dimerisierung neigt. (Verschiedene BiTE Moleküle besitzen ein unterschiedliches Dimerverhalten, obwohl sie denselben CD3-bindenden Arm besitzen.)

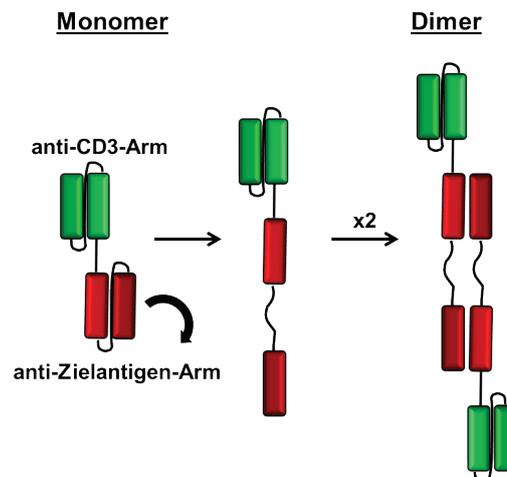


Abbildung 32: Theorie der Dimerbildung von BiTE Molekülen

Ein noch unbewiesenes Modell besagt, dass die Dimerbildung hauptsächlich am anti-Zielantigen-Arm des BiTE Antikörpers stattfindet. Hierbei lösen sich die Bindungen zwischen der leichten und der schweren Kette des anti-Zielbinders und die Ketten klappen auf. Passiert dies bei zwei BiTE Molekülen, so ist eine Dimerisierung zwischen zwei monomeren Einzelkettenantikörpern möglich.

Daher liegt der Schluss nahe, dass die Dimerbildung hauptsächlich vom anti-Zielantigen-Arm ausgeht. Eine noch nicht bestätigte Modellvorstellung besteht darin, dass die leichte und die schwere Kette des anti-Zielantigen-Binders aufklappen und dadurch eine Dimerbildung zwischen zwei monomeren BiTE Molekülen ermöglicht wird (Abbildung 32). Eben diese Dimerisierung kann nun ihrerseits zur Störung der anti-Zielantigen-Bindung führen und somit die Höhe der gemessenen Titerwerte beeinflussen.

Da über den monospezifischen CD3-FACS-Ansatz zusätzlich zu intakten BiTE Molekülen auch die dimerisierte Fraktion quantifiziert wird, ist es empfehlenswert, die Titerbestimmung auf einen Assay auszurichten, der nur bispezifische Bindung detektiert. Nur so kann sichergestellt werden, dass lediglich intaktes, aktives BiTE gemessen wird.

6.1.3.4 Qualität von transienten Transfektionen als Vorhersage-System für die stabile Zelliniengenerierung

Um auf möglichst einfachem und schnellem Wege die Qualität von stabilen Zelllinien abzuschätzen, wurden transiente Transfektionsstudien durchgeführt und evaluiert. Drei verschiedene BiTE Antikörper (A-C) wurden hierzu transient in HEK293-Zellen eingebracht und jeweils der Titer und der Monomergehalt (bei Einzelkettenantikörpern neben dem Titer ein wichtiges Selektionskriterium) über drei Tage aufgenommen (2 Parallelexperimente). Dieselben BiTE Antikörper wurden jeweils parallel über stabile Transfektion in CHOK1SV-Zellen transfiziert. Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen transienten und stabilen

Transfektionen besteht, wurden die entsprechenden Titer- bzw. Monomerdaten graphisch gegenüber gestellt (stabile Daten auf die Abszisse, transiente Daten auf die Ordinate; siehe Abbildung 21) und die einzelnen Datenpunkte miteinander verbunden. Hierzu wurden jeweils die Geradengleichung und der R^2 -Wert der Trendlinie bestimmt. Für sämtliche Meßtage (Mittlung beider Experimente) lag der R^2 -Wert über 0,97, was deutlich macht, dass eine starke Korrelation zwischen den beiden Transfektionsarten besteht, nämlich von mindestens 97 %. Diese Korrelation wurde zusätzlich bestätigt, indem ausgehend von den transienten Daten über die zuvor bestimmte Geradengleichung die stabilen Titer- sowie Monomergehaltsdaten berechnet wurden. Hierbei konnten extrem genaue Berechnungen angestellt werden: Für den Titer ergaben sich für sämtliche getesteten BiTE Antikörper Abweichungen von maximal 2 % vom gemessenen Titerwert.

Im Gegensatz zum Monomergehalt wurden die Titerdaten zu drei verschiedenen Zeitpunkten transient bestimmt. Die Ergebnisse machen deutlich, dass prinzipiell eine Berechnung an jedem dieser Tage möglich ist. Als einziges zeitliches Kriterium ist vorgegeben, dass die Probennahme bis Tag 3 stattgefunden haben muss, da es nach diesem Zeitpunkt zum Absterben der Zellen sowie zum Verlust des Plasmidvektors kommt [94]. Einfluss auf die Qualität der Vorhersage haben jedoch nicht bestimmte Zeitpunkte, sondern allein der R^2 -Wert der verwendeten Geradengleichung. Zwei parallel durchgeführte Experimente besaßen zu unterschiedlichen Zeitpunkten den höchsten R^2 -Wert. Für Experiment 1 war dies der 72 h Zeitpunkt, für Experiment 2 der 48 h Zeitpunkt und für die Mittlung beider Experimente der 24 h Messpunkt. Für Experiment 1 wurden die akkuratesten Titer mittels der 72 h Gleichungen berechnet, für Experiment 2 mittels der 48 h Gleichung und für die Mittlung beider Ansätze lieferte die Geradengleichung des 24 h Zeitpunkts diejenigen Werte mit den geringsten Abweichungen von den stabilen Referenzdaten. Somit ist die Qualität der Vorhersage vom Zeitpunkt der Probennahme unabhängig und wird lediglich durch den R^2 -Wert definiert.

Für die Berechnung des Monomergehaltes stand nur der 72 h Messwert zur Verfügung. Dieser Zeitpunkt wies einen sehr hohen R^2 -Wert (0,9965) auf und lieferte folglich sehr genaue Vorhersagen.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsstudien, dass transiente Transfektionen einen sehr sinnvollen Vorgänger einer stabilen Zellliniengenerierung darstellen. Sie ermöglichen es, sehr genaue Vorhersagen über die Titerproduktion sowie den Monomergehalt zu treffen und dies mit sehr geringem zeitlichem und materiellem Aufwand. Dabei ist zu beachten, dass für die Abschätzung eines „neuen“ BiTE Antikörpers immer mindestens zwei BiTE Antikörper mit bestehenden stabilen Linien als Referenz mit transfiziert

werden müssen, da die Proteinausbeuten zwischen zwei Transfektionsrunden stark schwanken.

Der Literatur ist zu entnehmen, dass es für eine Abschätzung einer Zelllinie wichtig ist, möglichst die gleichen Bedingungen zu schaffen wie bei der letztendlichen stabilen Transfektion. Beispielsweise ist es nicht möglich, mittels einer adhärennten Version einer Zelllinie Rückschlüsse auf die Suspensions-Variante zu ziehen [114]. In der Regel sind Vektoren für transiente Transfektionen einfacher aufgebaut als Vektoren für stabile Zelliniengenerierungen (zusätzliche Selektionsmarker, etc.) [86]. Das hier vorgestellte System stellt jedoch eine identische Kopie des späteren stabilen Systems dar, indem es an dieser Stelle möglich ist, denselben Vektor zu verwenden, der später auch in der Generierung der stabilen Zelllinie verwendet wird.

Was innerhalb dieser Studie nicht komplett dem stabilen System angepasst werden konnte, ist die Zelllinie. Für stabile Transfektionen werden standardmäßig CHO-Zellen verwendet, was im Falle der transienten Transfektionen nicht möglich war. Dies war bedingt durch die schlechte transiente Transfizierbarkeit von CHO-Zellen [94]. Die gute Übereinstimmung von den berechneten mit den realen stabilen Titerdaten konnte jedoch bestätigen, dass die Verwendung der HEK-Zelllinie ein sehr gutes System darstellt, um eine präzise Vorhersage der stabilen Titer und Monomerdaten in CHO-Zellen zu erstellen.

Vorrausschauend und auch zukunftsorientierter kann die hier etablierte Methode neben der stabilen Zelliniengenerierung auch in der Kandidatenselektion innerhalb eines BiTE Antikörpers eingesetzt werden. In diesem Prozess werden diverse Konstrukte, die gegen dasselbe Zielantigen gerichtet sind, jedoch feine Unterschiede in der Proteinsequenz aufweisen, miteinander verglichen. Unter vielen anderen Kriterien, wie zum Beispiel anti-Zielantigen-Bindung, ist der Titer und der Monomergehalt hierbei ein wichtiges Selektionskriterium in diesem Stadium der therapeutischen Antikörperproduktion. Durch den in dieser Arbeit erbrachten Beweis, dass es möglich ist, BiTE Antikörper transient zu vergleichen, durch die Einfachheit der vorgestellten Methode sowie die Möglichkeit, viele Kandidaten parallel und in einem Experiment betrachten zu können, sind transiente Transfektionsstudien bestens geeignet, als Screening-Methode mit in diesen Prozess aufgenommen zu werden.

Zu bedenken ist, dass sich der hierbei abgeschätzte Titer auf ein ungefüttertes Wachstumsexperiment des finalen Klons bezieht, nicht den maximal erreichbaren Titer. Durch Fütterung der Zellen sowie weiterer Entwicklung des Fermentationsprozesses ist es möglich, den Titer noch weiterhin zu steigern [115, 116].

6.2 Alternativen zur klassischen Zelliniengenerierung

6.2.1 BiTE Generierung in *Escherichia coli*

Fermentation in Mikroorganismen kam in den 1900 Jahren auf. Die ersten großangelegten anaeroben Fermentationen dienten der Herstellung von Chemikalien, wie Aceton [117]. Bis heute ist *Escherichia coli* das am meisten genutzte Bakterium für die Produktion von rekombinanten Proteinen, da es am besten charakterisiert ist [118]. Der größte Nachteil von *E. coli* besteht darin, dass das Bakterium nicht in der Lage ist, produziertes Protein in das Medium zu sezernieren [119]. Stattdessen gibt es zwei Möglichkeiten: Die Produktion von Proteinen im Zytoplasma sowie im Periplasma. Bei Produktion im Zytoplasma sind höhere Proteinausbeuten möglich, allerdings können dort keine Disulfidbrücken ausgebildet werden (reduktives Milieu). Stattdessen kommt es zur Bildung von unlöslichen Einschlusskörperchen (Inclusion bodies), deren Rückfaltung extrem kompliziert ist und nur sehr geringe Ausbeuten zur Folge hat [120]. Im Periplasma ist die Proteaseaktivität geringer, es existieren weniger kontaminierende Proteine und eine korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken ist möglich. Die Proteinausbeute bei Produktion im Periplasma ist jedoch deutlich geringer als diejenige im Zytoplasma [121]. Des Weiteren ist *E. coli* nicht in der Lage, posttranslationale Modifikationen der mammalian Zellen, wie z.B. Glykosylierungen, durchzuführen. Dies sollte im Falle von BiTE Antikörpern jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen, da BiTE Moleküle nicht glykosyliert oder anderweitig posttranslational modifiziert sind.

Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine periplasmatische Produktion von BiTE Antikörpern in *E. coli* möglich ist. Hierzu wurde das MCSP-G10 BiTE in denjenigen Konstruktvariationen, die bereits für die Validierung der Transfektionsstudien verwendet wurden (siehe 5.1.3.1), im *E. coli* Stamm BL21 A1 exprimiert. Der Literatur ist zu entnehmen, dass die Expression von tandem single-chain Fv-Fragmenten in Prokaryoten prinzipiell problematisch ist [122]. Dies konnte insofern bestätigt werden, als dass produzierte Titer unter 1 µg/ml lagen. Jedoch konnte per auf bispezifischer Bindung aufbauender FACS-Analyse gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, funktionelle BiTE Antikörper in *Escherichia coli* zu generieren.

Um zu überprüfen, ob das *E. coli*-Material biologisch aktiv ist, wurde ein Zytotoxizitätsexperiment durchgeführt. Hierzu musste bakteriell produziertes BiTE aufgereinigt werden. Wie auch der Literatur zu entnehmen ist [122], gestaltete sich die Aufreinigung extrem schwierig. Es war nicht möglich, die Monomerfraktion sauber abzutrennen. Sowohl Abbau als auch Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine lagen vor, so dass die Reinheit des Monomers lediglich 25 % betrug. Ein möglicher Grund hierfür ist die extrem geringe Konzentration an BiTE Antikörpern bei der bakteriellen Produktion (unter 1 µg/ml). Ist die aufzureinigende Probe sehr

gering konzentriert, so steigt das Risiko, dass andere Proteinbestandteile an die Säule binden. Im Gegensatz dazu ließ sich eine anti-CD3-Einzelkette deutlich besser exprimieren (kleiner und einfacher aufgebaut) und aufreinigen (höher konzentriert).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass bakterielles BiTE in der Lage ist, eine Zielzell-spezifische Lyse zu vermitteln. Um den Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die Lyse von Zielzellen beurteilen zu können, wurde zum einen eukaryotisches BiTE mit Endotoxinen (Lipopolysaccharide: LPS) versetzt und zum anderen die CD3-bindende Kette in Bakterien produziert. Die anti-CD3-Einzelkette alleine ist nicht in der Lage, eine spezifische Lyse zu vermitteln [123]. Demnach würde eine Lyse von Zielzellen in diesem Fall alleine auf im Ansatz vorhandene Endotoxine zurückgehen.

Hierbei zeigte sich, dass der Einfluss von Endotoxinen minimal war, die bakterielle anti-CD3-Einzelkette führte zu keinerlei signifikanter Lyse. Beim Vergleich zwischen „normalem“ und mit Endotoxinen versetzten eukaryotischen BiTE zeigte sich, dass die Versetzung mit LPS zu keiner deutlichen Abnahme der EC50 (Faktor 1,7) führte. Somit konnte bestätigt werden, dass die zytotoxische Wirkung bakterieller BiTE Antikörper tatsächlich auf das BiTE Molekül selbst zurückzuführen ist und nicht durch andere im Ansatz vorhandene Substanzen ausgelöst wird.

Abschließend lässt sich aus den Ergebnissen folgern, dass es prinzipiell möglich ist, BiTE Antikörper in Bakterien zu produzieren, dass die Ausbeute jedoch extrem gering ist. Eine Aktivität *in vitro* konnte bestätigt werden, jedoch war es nicht möglich, eine reine Monomerfraktionen zu gewinnen. Dies stellt in Bezug auf Zulassung durch Behörden das größte Problem dar, da es sich nur beim Monomer um eine sauber definierbare Fraktion handelt. Somit ist, obwohl ein Einfluss von bakteriellen Endotoxinen auf die Lyse von Zielzellen als sehr gering eingestuft werden konnte, bakterielle BiTE Produktion keine lohnende Alternative zur BiTE Herstellung in Eukaryoten.

6.2.2 Automation der Zelliniengenerierung (Das ClonePix System)

Wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, ist eine stabile Zelliniengenerierung extrem langwierig und aufwendig. Daher ist jede Vereinfachung des klassischen Weges willkommen. Mehrere Arten der Klonselktion sind hierbei in der Literatur beschrieben:

Die klassische Methode ist die „Limited Dilution“. Hierbei wird eine gering konzentrierte Zellsuspension in 96-Well Platten verteilt, so dass eine Dichte von weniger als einer Zelle pro Well entsteht. Vertiefungen, in denen Klone hochwachsen, werden markiert und anschließend

über ELISA analysiert. Ziel dieser Methode ist es, sicher zu stellen, dass die finale Zelllinie von nur einer einzigen Zelle abstammt und somit klonal ist. Hierzu werden in der Regel zwei Reklonierungsrunden angesetzt [124]. Zu den Alternativen zählen die Sortierung mittels Flußzytometrie, Methoden, die die Proteinsekretion einzelner Zellen detektieren [125, 126] sowie automatisierte Systeme zur Zellselektion. Zu letzteren zählen automatisierte Kolonie-Pick-Systeme, wie das auf Antikörper ausgelegte ClonePix-System der Firma Genetix (<http://www.genetix.com>). Hierbei werden Zellen in semisolidem Medium ausplattiert, welches sie stationär hält. Produzierte Antikörper bilden einen Ring um die wachsende Kolonie und werden durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers präzipitiert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist hierbei proportional zur Höhe des produzierten Titers (siehe Abbildung 33).

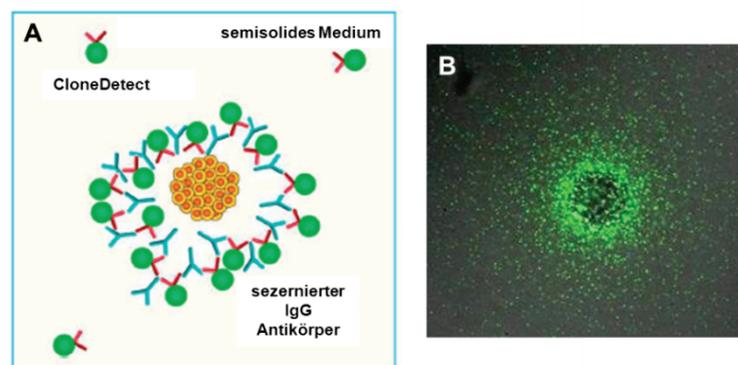


Abbildung 33: ClonePix-System der Firma Genetix (© Genetix)

Das ClonePix-System von Genetix ist ein automatisierter Kolonie-Pick-Apparat. Zellen werden hierbei nach der Transfektion in semisoliden Agar ausgesät und geben produziertes Protein in diesen ab. Das sezernierte Protein wird anschließend mittels eines fluoreszenzmarkierten Antiköpers (CloneDetect) detektiert.

A) Sezernierte Antikörper werden mittels des CloneDetect quervernetzt und visualisiert.

B) Dargestellt ist die Fluoreszenzaufnahme eines Proteinpräzipitats um eine sezernierende Kolonie.

Kolonien mit den stärksten Signalen werden vom System gepickt und in eine neue Platte überführt.

Was bei kompletten Antikörpern sehr gut funktioniert, führt bei scFv zu Problemen: Da die klassische Detektion auf Bindung des Detektionsantikörpers an den Fc-Teil von Antikörpern basiert, welchen scFv nicht besitzen, ist es nicht möglich, das System unverändert auf BiTE Antikörper zu übertragen. Zum einen muss ein alternativer Präzipitationsweg gefunden werden und zum anderen muss zusätzlich zu einem hohen Titer ein hoher Monomergehalt als Selektionskriterium mit eingeschlossen werden.

Als Präzipitations- und Detektionsagenzien wurden ein humanes CD3 x Fc Peptid ausgewählt (Aufbau siehe: Abbildung 13B) sowie ein fluoreszenzmarkierter anti-Penta-His Antikörper. Das Bindungsprinzip ist in Abbildung 28 dargestellt. Mit Hilfe dieses Ansatzes war es zwar möglich, BiTE Antikörper zu präzipitieren, jedoch zeigte sich, dass die Formierung von Dimeren zur Bildung eines Präzipitats führte, ohne dass ein CD3-Peptid zugegeben wurde. Somit besteht bei dieser Art des Versuchsaufbaus die Gefahr, dass Dimerproduzenten durch erhöhte Fluoreszenzintensitäten per se bevorzugt werden. Eben dies, die Selektion eines hohen Dimergehaltes, ist für die Selektion eines Klonen, der Biologika für die Pharmaindustrie produzieren soll, ein Ausschlusskriterium. Da im Falle eines Dimers bis heute nicht bekannt ist, wie es zu seiner Bildung kommt bzw. ob jedes Dimer gleich aufgebaut ist, ist es nur im Falle eines Monomers möglich, eine genaue Charakterisierung vorzunehmen. Deshalb werden Dimere und größere Aggregate als „Unreinheiten“ angesehen und müssen abgereichert werden.

Das Problem der Präzipitierung mittels anti-Penta-His AK ohne CD3-Peptid legt den Schluss nahe, den anti-Penta-His AK durch ein anti-Penta-His Fab Fragment zu ersetzen.

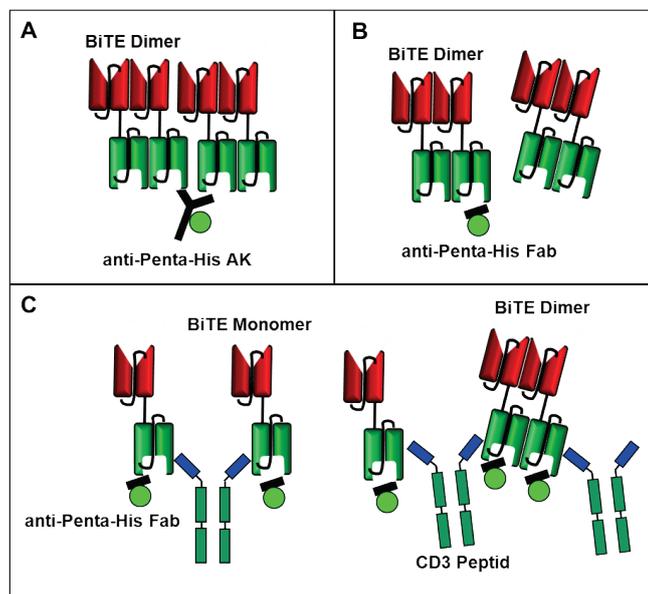


Abbildung 34: BiTE Präzipitierung mittels eines CD3-Peptids und eines anti-Penta-His Fabs

A/ B) Während die Gabe eines anti-Penta-His AKs alleine zu einer Präzipitatbildung von Dimermolekülen führt (**A**) ist im Falle eines anti-Penta-His Fab (**B**) noch ein weiteres Agens nötig.

C) Dieses zusätzliche Agens ist ein huCD3 x huFc Peptid. Hierbei entsteht jedoch das Problem, dass durch die Spezifität der CD3-Bindung an das BiTE keine Präzipitierung desselben in monomerer Form möglich ist. Dies ist nur möglich im Falle eines Dimers, welches jedoch nicht selektioniert werden soll.

Auf diese Weise wird zwar die Präzipitatbildung über den Antikörper unterbunden (Abbildung 34 A & B), jedoch ist über ein anti-Penta-His Fab und ein CD3-Peptid keine Fällung von

monomeren BiTE Antikörpern möglich: Die hoch Epitop-spezifische Bindung des CD3-Peptids an das BiTE führt dazu, dass ein BiTE Molekül nur von einem einzigen CD3-Peptid gebunden werden kann. Somit ist nur die Verknüpfung zweier BiTE Antikörper möglich. Die Ausbildung eines Dimers überbrückt dieses Problem und ein leuchtendes Präzipitat entsteht (Abbildung 34C). Eine Selektion von „hellsten“ Klonen wurde folglich auch in diesem Fall Dimerproduzenten auswählen.

Dieses Problem ließe sich durch Ersetzen des CD3-Peptids durch einen polyklonalen anti-CD3-Binder AK lösen. Hierbei würden durch die Bindung des AKs an den anti-CD3-Arm viele BiTE Antikörper miteinander verknüpft und somit präzipitiert werden. Für die nötige Visualisierung ist das anti-Penta-His Fab bestens geeignet, da es alleine zu keiner Quervernetzung führen kann (Abbildung 35A). Alternativ ist jedoch auch die Verwendung eines direkt markierten AKs denkbar. Da jedoch kein anti-CD3-Binder Antikörper zur Verfügung stand, konnte der vorgeschlagene Ansatz nicht überprüft werden.

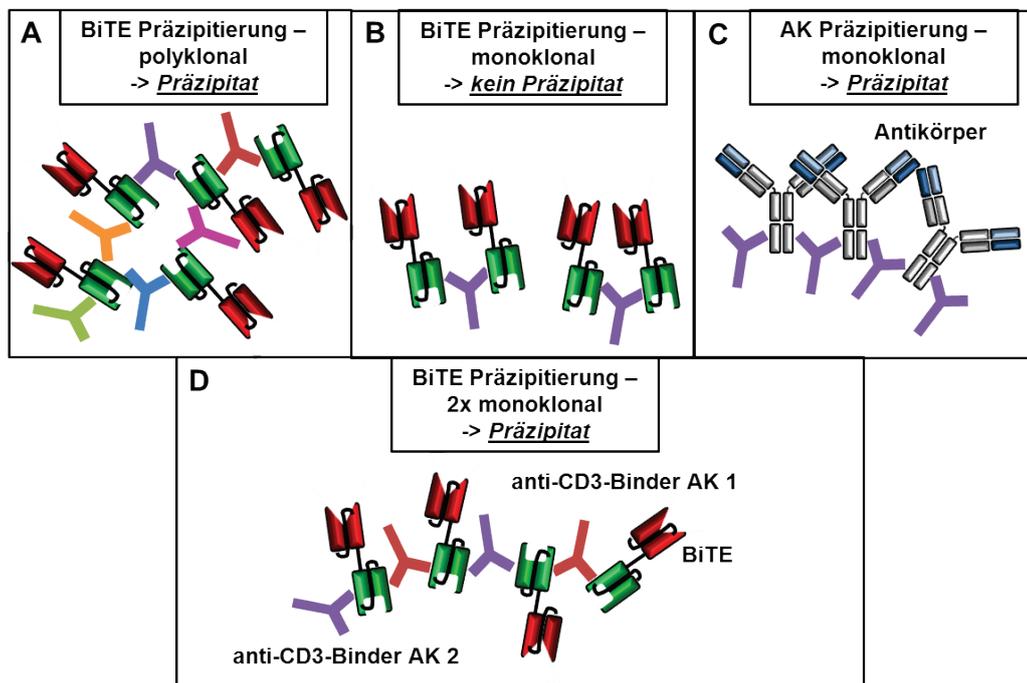


Abbildung 35: BiTE und Antikörper-Präzipitierung mittels mono- und polyklonalen Antikörpern

- A)** Verwendung von polyklonalen Antikörpern führt zu einer Quervernetzung von BiTE Molekülen.
B) Wird nur ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, so können maximal zwei monomere BiTE Antikörper miteinander verknüpft werden.
C) Im Falle von Antikörpern hingegen ist eine Präzipitierung mittels eines monoklonalen Antikörpers möglich, da von jeder Polypeptidkette zwei Exemplare vorliegen.
D) Die Verwendung von zwei verschiedenen monoklonalen anti-CD3-Binder AK hingegen macht eine Präzipitierung von BiTE Antikörpern möglich.

Die Problematik des Ansatzes besteht darin, dass für eine erfolgreiche Präzipitation polyklonale Antikörper verwendet werden müssen (Abbildung 35A). Dies stellt in Bezug auf Zulassung durch Behörden ein Problem dar, da die Produzentenzelllinie hierbei in Kontakt mit aus tierischem Serum gewonnenen Antikörpern kommt. Im Falle des klassischen ClonePix-Systems ist die Verwendung eines gentechnisch hergestellten, monoklonalen mAK möglich, da bei kompletten IgG-Antikörpern von jeder Kette zwei Exemplare vorhanden sind (Abbildung 35C). Im Falle eines BiTE Antikörpers würden durch einen monoklonalen Antikörper nur jeweils zwei BiTE Moleküle miteinander verknüpft werden (in Bezug auf Monomere; Abbildung 35B).

Eine mögliche Lösung dieses Problems besteht in der parallelen Verwendung von zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen die anti-CD3-Binder-Einzelkette. In diesem Falle wäre eine kettenförmige Quervernetzung von BiTE Antikörpern möglich, ohne auf tierisches Serum zurückgreifen zu müssen. Jedoch besteht mittels des ClonePix-Systems auch mit diesem Ansatz nicht die Möglichkeit, Monomere von Dimeren zu diskriminieren, was für die Selektion einer Produzentenzelllinie essenziell wäre. Diese Möglichkeit besteht allerdings auch in der klassischen Form der Zelliniengenerierung nicht bzw. erst ab einem Stadium, indem sich die Zellklone im Kolben befinden und folglich auf eine geringe Anzahl reduziert worden sind.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass eine Zelliniengenerierung mittels Limited Dilution in CHO-Zellen zum jetzigen Zeitpunkt trotz ihres hohen zeitlichen Aufwands nach wie vor die beste Methode darstellt, bispezifische Einzelkettenantikörper herzustellen. Alternative Herangehensweisen, wie die Produktion von BiTE Antikörpern in Prokaryoten sowie das Heranziehen eines automatisierten Klonselktionstools (ClonePix) konnten keine einschlägige Verbesserung herbeiführen. Während die Produktion von BiTE Molekülen in Prokaryoten aufgrund der extrem niedrigen Produktivität sowie schlechten Aufreinigbarkeit nicht weiter verfolgt wurde, verspricht das ClonePix System bei Findung einer geeigneten Antikörperkombination zur BiTE Präzipitation eine deutliche zeitliche Verkürzung. Als solche kommt ein fluoreszenzmarkierter anti-CD3-Binder Antikörper in Frage. Jedoch gilt es nach wie vor, eine Methode zu finden, welche eine frühere Analyse des Monomergehalts zulässt. Solange dies nicht der Falle ist, können die hier vorgestellten Korrelationsstudien zur Qualitäts- und Quantitätsabschätzung herangezogen werden und als Entscheidungskriterium dienen, ob von einem BiTE Molekül eine stabile Zelllinie mit einer guten Produktivität und hohen Produktqualität generiert werden kann.

7 Literaturverzeichnis

1. Ziegenhagen, D. (2009). Biologika – der aktuelle Mega-Trend in der Arzneimitteltherapie. *Versicherungsmedizin*, 61, 4-9
2. Eichbaum, C., Haefeli, W. (2011). Nomenklatur und Einteilung von Biologicals. *Therapeutische Umschau*, 68, 593-601
3. Baca, M., Presta, L., O'Connor, S., Wells, J. (1997). Antibody humanization using monovalent phage display. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 10678-10684
4. Karpovsky, B., Titus, J., Stephany, D., Segal, D. (1984). Production of Target-Specific Effector cells using hetero-crosslinked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc-gamma receptor antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 160, 1686-1701
5. Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P., Kufer, P. (2008). Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody. *Science*, 321, 974-977
6. Kohler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497
7. Koshida, S., Asanuma, K., Kuribayashi, K., Goto, M., Tsuji, M., Kobayashi, D., Tanaka, M., Watanabe, M. (2010). Prevalence of human anti mouse antibodies (HAMA) in routine examinations. *Clinica Chimica Acta*, 411, 391-394
8. Wilhelm, C., Neubauer, A. (2008). Molekulare Tumorthherapie. *Internist*, 49, 581-592
9. Krawczyk, A. (2010). Humanisierung und funktionelle Charakterisierung eines gegen Herpes Simplex Viren Typ-1 und Typ-2 (HSV-1 und HSV-2) gerichteten murinen monoklonalen Antikörpers. *Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Biologie und Geografie*
10. Smith, G. (1985). Filamentous fusion phage: Novel Expression Vectors That Display Clones Antigens on the Virion Surface. *Science*, 228, 1315-1317
11. Holzman, D. (2009). Whatever happened to Immunotoxins? Research, and Hope, Are Still Alive. *Journal of the National Cancer Institute*, 101, 624-625
12. Yamada, T. (2011). Therapeutic Monoclonal Antibodies. *The Keio Journal of Medicine*, 60, 37-46
13. Ball, E., Broome, H. (2010). Monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Best Practice & Research: Clinical Haematology*, 23, 403-416
14. Slamon, D., Eiermann W., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M., Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendahmane, B., Tabah-Fisch, I., Lindsay, M., Riva, A., Crown, J., Breast Cancer International Research Group. (2011). Adjuvant trastuzumab in HER2-positiv breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 365, 1273-1283

15. Untch, M., Jackisch, C., Thomssen, C., Nitz, U., von Minckwitz, G., Kaufmann, M. (2006). Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt*, 103, A 3406-3410
16. Shire, S. (2009). Formulation and manufacturability of biologics. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 708-714
17. Kontermann, R. (2005). Recombinant Bispecific antibodies for cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26, 1-9
18. Lindhofer, H., Mocikat, R., Steipe, B., Thierfelder, S. (1995). Preferential Species-Restricted Heavy/ Light Chain Pairing in Rat/ Mouse Quadromas. *Journal of Immunology*, 155, 219-225
19. Linke, R., Klein, A., Seimetz, D. (2010). Catumaxomab. Clinical development an future directions. *mAbs*, 2, 129-136
20. Chames, P., Baty, D. (2009). Bispecific antibodies for cancer therapy. The light at the end of the tunnel? *MAbs*, 1, 539-547
21. Kufer, P., Lutterbüse, R., Baeuerle, P. (2004). A revival of bispecific antibodies, *TRENDS in Biotechnology*, 22, 238-244
22. Kostelny, S. Cole, M., Tso, J. (1992) Formation of a Bispecific antibody by the use of leucine zippers. *Journal of Immunology*, 148, 1547-1553
23. McCall, A., Adams, G., Amoroso, A., Nielsen, U., Zhang, L., Horak, E., Simmons, H., Schier, R., Marks, J., Weiner, L. (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. *Molecular Immunology*, 36, 433-445
24. Baeuerle, P., Wolf, E. (2005). Neuartige Medikamente mobilisieren T-Zellen gegen Krebszellen. *Onkologie*, 5/6, 34-38
25. Bauerle, P., Kufer, P., Bargou, R. (2009). BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Current opinion in Molecular Therapeutics*, 11, 22-30
26. Staerz, U., Kanagawa, O., Bevan, M. (1985). Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature*, 314, 628-631
27. Bargou, R., Kufer, P., Goebeler, M., Knop, S., Einsele, H., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Riethmüller, G., Baeuerle, P., Leo, E. *et al* (2007). Anti-CD19 BiTE antibody MT103 (MEDI-538) induces dose-dependent objective complete and partial responses in relapsed non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients. Update from ongoing phase I study MT103-104. *Blood*, 110, Abs 2557
28. Mack, M., Riethmüller, G., Kufer, P. (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, 7021-7025
29. Choi, B., Cai, M., Bigner, D., Mehta, A., Kuan, C., Sampson, J. (2011). Bispecific antibodies engage T cells for antitumor immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11, 843-853
30. Baeuerle, P., Reinhardt, C., Kufer P. (2008). BiTE: a new class of antibodies that recruit T-cells. *Drugs of the Future*, 33, 1-11

31. Baeuerle, P., Zugmaier, G., Rüttinger, D. (2011). Bispecific T Cell Engager for Cancer Therapy. *Bispecific Antibodies, Chapter 15, 273-287*
32. Lutterbuese, R., Raum, T., Kischel, R., Lutterbuese, P., Schlereth, B., Schaller, E., Mangold, S., Rau, D., Meier, P., Kiener, P., Mulgrew, K., Oberst, M., Hammond, S., Baeuerle, P., Kufer, P. (2009). Potent control of tumor growth by CEA/CD3-bispecific single-chain antibody constructs that are not competitively inhibited by soluble CEA. *Journal of Immunotherapy, 32, 341-352*
33. Bluemel, C., Hausmann, S., Fluhr, P., Srisikandarajah, M., Stallup, W., Baeuerle, P., Kufer, P. (2010). Epitope distance to target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunology and Immunotherapy, 59, 1197-1209*
34. Brischwein, K., Parr, L., Pflanz, S., Volkland, J., Lumsden, J., Klinger, M., Locher, M., Hammond, S., Kiener, P., Kufer, P., Schlereth, B., Baeuerle, P. (2007). Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of BiTE class. *Molecular Immunology, 30, 798-807*
35. Kischel, R., Hausmann, S., Klinger, M., Baeuerle, P., Kufer, P. (2009). Effector memory T cells make a major contribution to redirected lysis by T cell-engaging BiTE antibody MT110. *100th meeting of the American Association for Cancer Research 2009, abstract no 3252*
36. Baeuerle, P., Reinhardt, C. (2009). Bispecific T-Cell Engaging Antibodies for Cancer Therapy. *Cancer Research, 69, 4941-4944*
37. Rattenhuber, C. (2006). Untersuchungen apoptoseinduzierender und costimulatorischer Signalwege im xenogenen System: Wechselwirkungen zwischen porcinen Endothelzellen und humanen Jurkat-Zellen. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Medizinische Fakultät*
38. Baeuerle, P., Rattel, B. (2011). Passive immunotherapy by T cell-engaging bispecific antibodies. *Cancer Vaccines, Chapter 18, 250-262*
39. Offner, S., Hofmeister, R., Romaniuk, A., Kufer, P., Baeuerle, P. (2006). Induction of regular cytolytic synapses by Bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Molecular Immunology, 43, 763-771*
40. Hoffmann, P., Hofmeister, R., Brischwein, K., Brandl, C., Crommer, S., Bargou, R., Itin, C., Prang, N., Baeuerle, P. (2005). Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *International Journal of Cancer, 115, 98-104*
41. Wolf, E., Hofmeister, R., Kufer, P., Schlereth, Baeuerle, P. (2005). BiTEs: Bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug Discovery Today, 10, 1237-1244*
42. Raag, R., Whitlow, M. (1995). Single-chain Fvs. *FASEB Journal, 9, 73-80*
43. Arndt, K., Müller, K., Plückthun, A. (1998). Factors Influencing the Dimer to Monomer Transition of an Antibody Single-chain Fv Fragment. *Biochemistry, 37, 12918-12926*
44. Brischwein, K., Schlereth, B., Guller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbuese, R., Offner, S., Locher, M., Urbig, T., Raum, T., Kleindienst, P., Wimberger, P., Kimmig, R., Fichtner, I., Kufer, P., Hofmeister, R., da Silva, A., Baeuerle, P. (2006). MT110: A novel bispecific

- single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Molecular Immunology*, 43, 1129-1143
45. Bothwell, A., Paskind, M., Reth, M., Imanishi-Kari, T., Rajewsky, K., Baltimore, D. (1981). Heavy Chain Variable Region Contribution to the NP^b Family of Antibodies: Somatic Mutation Evident in a γ 2a Region. *Cell*, 24, 625-637
 46. Blier, P., Bothwell, A. (1987). A Limited number of B Cell Lineages Generates the Heterogeneity of a Secondary Immune Response. *Journal of Immunology*, 139, 3996-4006
 47. Fikes, J., Bankaitis, V., Ryan, P., Bassford, P. (1987). Mutational Alterations Affecting the Export Competence of a Truncated but Fully Functional Maltose-Binding Protein Signal Peptide. *Journal of Bacteriology*, 169, 2345-2351
 48. Wörn, A., Plückthun, A. (2001). Stability Engineering of Antibody Single-chain Fv Fragments. *Journal of Molecular Biology*, 305, 989-1010
 49. Korn, T., Nettelbeck, D., Völkel, T., Müller, R., Kontermann, R. (2004). Recombinant bispecific antibodies for targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumor cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *Journal of Gene Medicine*, 6, 642-651
 50. Riede, U., Schäfer, H. (1993). Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 51. Riegel, D., Carucci, J. (2000). Malignant melanoma: prevention, detection and early treatment in the 21st century. *A Cancer Journal for Clinicians*, 50, 215-236
 52. Tsai, T., Henson, D. (2005). Cutaneous, ocular and visceral melanoma in African Americans and Caucasians. *Melanoma Research*, 15, 213-217
 53. Pons, M., Quintanilla, M. (2006). Molecular biology of malignant melanoma and other cutaneous tumors. *Clinical and Translational Oncology*, 8, 466-474
 54. Schuchter, L. (2001). Review of the 2001 AJCC staging system for cutaneous malignant melanoma. *Current Oncology Reports*, 3, 332-337
 55. Breslow, A. (1970). Thickness, Cross-Sectional Areas and Depths of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery*, 172, 902-908
 56. Huber, H., Grunewald, K. (1978). Dacarbazine (DTIC) in the therapy of a malignant disease. A review. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 90, 861-861
 57. Frankel, S. (2003). Oblimersen sodium (G3139 Bcl-2antisense oligonucleotide) therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: a targeted approach to enhance apoptosis. *Seminars in Oncology*, 30, 300-304
 58. Bigner, D., Brown, M., Coleman, R., Friedman, A., Friedman, H., McLendon, R., Bigner, S., Zhao, X., Wikstrand, C., Pegram, C., et al. (1995). Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with ¹³¹I-radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Me1-14 F (ab')₂-a preliminary report. *Journal of Neuro-Oncology*, 24, 109-122
 59. Morgan, A., Galloway, D., Reisfeld, R. (1981). Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma specific glycoprotein. *Hybridoma*, 1, 27-36

60. Pluschke, G., Vanek, M., Evans, A., Dittmar, D., Schmid, P., Itin, P., Filardo, E., Reisfeld, R. (1996). Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *93*, 9710-9715
61. Tillet, E., Ruggiero, F., Nishiyama, A., Stallcup, W. (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagen V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 10769-10776
62. Campoli, M., Chang, C., Kageshita, T., Wang, X., McCarthy, J., Ferrone, S. (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP) with biological and clinical significance. *Critical Reviews in Immunology*, *24*, 267-296
63. De Vries, J., Keizer, G., te Velde, A., Voordouw, A., Ruiter, D., Rumke, P., Spits, H., Figdor, C. (1986). Characterization of melanoma-associated surface antigens involved in the adhesion and motility of human melanoma cells. *International Journal of Cancer*, *15*, 465-473
64. Ozerdem, U., Grako, K., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., Stallcup, W. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics*, *222*, 218-227
65. Burg, M., Pasqualini, R., Arap, W., Ruoslahti, E., Stallcup, W. (1999). NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Research*, *15*, 2869-2874
66. Iida, J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M., Herlyn, M., Furcht, L., McCarthy, J. (2001). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 18786-18794
67. Eisenmann, K., McCarthy, J., Simpson, A., Keely, P., Guan, J., Tachibana, K., Lim, L., Manser, E., Furcht, L., Iida, J. (1999). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1, p130cas. *Nature Cell Biology*, *1*, 507-513
68. Iida, J., Meijne, A., Spiro, R., Roos, E., Furcht, L., McCarthy, J. (1995). Spreading and focal contact formation of human melanoma cells in response to the stimulation of both melanoma-associated proteoglycan (NG2) and alpha 4 beta 1 integrin. *Cancer Research*, *55*, 2177-2185
69. Ralser, M., Querfurth, R., Warnatz, H., Lehrach, H., Yaspo, M., Krobitsch, S. (2006). An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *347*, 747-751
70. Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J., Chiou, H. (2008). Transient Transfection Factors for High-Level Recombinant Protein Production in Suspension Cultured Mammalian Cells. *Molecular Biotechnology*, *39*, 141-153
71. Pham, P., Kamen, A., Durocher, Y. (2006). Large-Scale Transfection of Mammalian Cells for the Fast Production of Recombinant Protein. *Molecular Biotechnology*, *34*, 225-237
72. Rosser, M., Xia, W., Hartsell, S., McCaman, M., Zhu, Y., Wang, S., Harvey, S., Bringmann, P., Cobb, R. (2005). Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Protein Expression and Purification*, *40*, 237-243

73. Reisinger, H., Sevcsik, E., Vorauer-Uhl, K., Lohner, K., Katinger, H., Kunert, R. (2007). Serum-free transfection of CHO-cells with tailor-made unilamellar vesicles. *Cytotechnology*, 54, 157-168
74. Derouazi, M., Girard, P., Van, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M., Wurm, F. (2004). Serum-free Large-Scale Transient Transfection of CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 537-545
75. Colosimo, A., Goncz, K., Holmes, A., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R., Bennett, M., Gruenert, D. (2000). Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells. *BioTechniques*, 29, 314-331
76. Bollin, F., Dechavanne, V., Chevalet, L. (2011). Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expression and Purification*, 78, 61-68
77. Thomas, P., Smart, T. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51, 187-200
78. Sharp, P., Li, W. (1987). The codon adaption index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 15, 1281-1295
79. Kozak, M. (1978). How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?. *Cell*, 15, 1109-1123
80. Morikawa, S., Tatsumi, E., Baba, M., Harada, T., Yasuhira, K. (1978). Two E-Rosette-Forming Lymphoid Cell Lines. *International journal of Cancer*, 21, 166-170
81. Yule, G. (1897). On the theory of correlation. *Journal of the Royal Statistical Society*, 62, 249-295
82. Schleif, R. (2000). Regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*. *Trends in Genetics*, 16, 559-565
83. Lei, S., Lin, H., Wang, S., Callaway, J., Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* Gene and Its Product Pectate Lyase. *Journal of bacteriology*, 169, 4379-4383
84. Muller, N., Girard, P., Hacker, D., Jordan, M., Wurm, F. (2005). Orbital Shaker Technology for the Cultivation of Mammalian Cells in Suspension. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 400-406
85. Wurm, F. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 11, 1393-1398
86. Colosimo, A., Goncz, K., Holmes, A., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R., Bennett, M., Gruenert, D. (2000). Transfer and Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells. *BioTechniques*, 29, 314-331
87. Jayapal, K., Wlaschin, K., Yap, M., Hu, W. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103, 40-47
88. Posser, M., Xia, W., Hartsell, S., McCaman, M., Zhu, Y., Wang, S., Harvey, S., Bringmann, P., Cobb, R. (2004). Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Protein Expression and Purification*, 40, 237-243

89. Matasci, M., Baldi, L., Hacker, D., Wurm, F. (2011). The *PiggyBac* Transposon Enhances the Frequency of CHO Stable Cell Line Generation and Yields Recombinant Lines With Superior Productivity and Stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 2141-2150
90. Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Itami, S., Kameoka, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M., Suga, K. (2000). Evaluation of stable and highly productive gene amplified CHO cell line based on the location of amplified genes. *Cytotechnology*, 33, 37-46
91. Lattenmeyer, C., Loeschel, M., Steinfeldner, W., Trummer, E., Mueller, D., Schriebl, K., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H., Kunert, R. (2006). Identification of transgene integration loci of different highly expressing recombinant CHO cell lines by FISH. *Cytotechnology*, 51, 171-182
92. Kim, S., Lee, G. (1999). Cytogenetic Analysis of Chimeric Antibody-Producing CHO Cells in the Course of Dihydrofolate Reductase-Mediated Gene Amplification and their Stability in the Absence of Selection Pressure. *Biotechnology and Bioengineering*. 64, 741-749
93. Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128, 693-705
94. Wurm, F., Bernard, A. (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 156-159
95. Baeuerle, P., Kufer, P., Lutterbüse, R. (2003). Bispecific antibodies for polyclonal T-cell engagement. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 5, 413-419
96. Kufer, P., Mack, M., Gruber, R., Lutterbüse, R., Zettl, F., Riethmüller, G. (1997). Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 45, 193-197
97. Ikemura, T. (1985). Codon Usage and tRNA Content in Unicellular and Multicellular Organisms. *Molecular Biology and Evolution*, 2, 13-34
98. Sharp, P., Cowe, E., Higgins, D., Shields, D., Wolfe, K., Wright, F. (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Research*, 16, 8207-8211
99. Schmid, P., Flegel, W. (2011). Codon usage in vertebrates is associated with a low risk of acquiring nonsense mutations. *Journal of Translational Medicine*, 9:87
100. Stoletzki, N., Eyer-Walker, A. (2007). Synonymous Codon Usage in *Escherichia coli*: Selection for Translational Accuracy. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 374-381
101. Johnson, L., Cotton, J., Lichtenstein, C., Elgar, G., Nichols, R., Polly, D., Le Comber, S. (2011). Stops making sense: translational trade-offs and stop codon reassignment. *BMC Evolutionary Biology*, 11:227
102. Eyre-Walker, A. (1996). The Close Proximity of *Escherichia coli* Genes: Consequences for Stop Codon and Synonymous Codon Use. *Journal of Molecular Evolution*, 42, 73-78
103. Brown, C., Dalphin, M., Stockwell, P., Tate, W. (1993). The translational termination signal database. *Nucleic Acids Research*, 21, 3119-3123

104. Sun, J., Chen, M., Luo, J. (2005). Relationships Among Stop Codon Usage Bias, Its Context, Isochores, and Gene Expression Level in Various Eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 61, 437-444
105. Sharp, P., Bulmer, M. (1988). Selective differences among translation termination codons. *Gene*, 63, 141-145
106. Goldberg, A. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426, 895-899
107. Plotkin, J., Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12, 32-42
108. Andrea, L., Pinto, R., Bosch, A., Musto, H., Cristina, J. (2011). A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in Hepatitis A virus. *Virus Research*, 157, 19-24
109. Fox, J., Erill, I. (2010). Relative Codon Adaption: A Generic Codon Bias Index for Prediction of Gene Expression. *DNA Research*, 17, 185-196
110. Wright, F. (1990). The "effective number of codons" used in a gene. *Gene*, 87, 23-29
111. Burgess-Brown, N., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., Gileadi, O. (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expression and Purification*, 59, 94-102
112. Stoletzki, N., Eyer-Walker, A. (2007). Synonymous Codon Usage in *Escherichia coli*: Selection for Translational Accuracy. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 374-381
113. Fath, S., Bauer, A., Liss, M., Priestersbach, A., Maertens, B., Hahn, P., Ludwig, C., Schäfer, F., Graf, M., Wagner, R. (2011). Multiparameter RNA and Codon Optimization: A Standardized Tool to Assess and Enhance Autologous Mammalian Gene Expression. *PLoS One*, 6, e17596
114. Porter, A., Racher, A. (2010). Strategies for Selecting Recombinant CHO Cell Lines for cGMP Manufacturing: Improving the Efficiency of Cell Line Generation. *Biotechnology Progress*, 26, 1455-1464
115. Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., Vorauer-Uhl, K., Weik, R., Borth, N., Katinger, H., Müller, D. (2006). Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation – A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 1045-1052
116. Büntemeyer, H., Lütkemeyer, D., Lehmann, J. (1991). Optimization of serum-free fermentation processes for antibody production. *Cytotechnology*, 5, 57-67
117. Demain, A., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant protein by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27, 297-306
118. Lee, S. (1996). High cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14, 98-105
119. Chen, R. (2011). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, doi:10.1016/j.biotechad.2011.09.013
120. Choi, J., Lee, S. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 625-635

121. Miller, K., Weaver-Feldhaus, J., Gray, S., Siegel, R., Feldhaus, M. (2005). Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 42, 255-267
122. Peipp, M., Valerius, T. (2002). Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, 30, 507-511
123. Torisu-Itakura, H., Schoelhammer, H., Sim, M., Irie, R., Hausmann, S., Raum, T., Baeuerle, P., Morton, D. (2011). Redirected Lysis of Human Melanoma Cells by a MCSP/CD3-bispecific BiTE Antibody That engages Patient-derived T Cells. *Journal of Immunotherapy*, 34, 597-605
124. Browne, S., Al-Rubeai, M. (2007). Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends in Biotechnology*, 25, 425-432
125. Achselband, Y., Moen, P., McGrath, P. (2003). Isolation of rare isotype switch variants in hybridoma cell lines using an agarose gel microdrop-based protein secretion assay. *Assay and drug development technologies*, 1, 619-626
126. Manz, R., Assenmacher, M., Pflüger, E., Miltenyi, S., Radbruch, A. (1995). Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, 1921-1925

8 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BiTE [®]	Bispecific T Cell Engager (Eingetragenes Markenzeichen)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
C-Terminus	Carboxyterminus
CFP	Cyan Fluorescent Protein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E:T	Effektor zu Target
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EU	Endotoxin Units
Exp.	Experiment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	konstante Region des Antikörper
FCS	fötales Kälberserum
dFCS	dialysiertes FCS
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde/n
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
hu	human
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
LF	Luftfeuchtigkeit
mAK	monoklonaler Antikörper
MG	Monomergehalt
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
NIP	4 hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetic Säure
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RW	Reinstwasser
scFv	<i>Single-chain antibody fragment variable</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl)-Aminoethan
U	Unit
V	Volt
V _H oder V _L	variable Domäne der schweren oder leichten Kette
WE	Wachstumsexperiment

Danksagung

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß dafür bedanken, dass sie sich dafür bereit erklärt hat, die Vertretung vor dem Lehrstuhl für Biologie zu übernehmen sowie bei Herrn Dr. Josef Mautner für die Übernahme der Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich herzlich bei der Micromet GmbH und bei Prof. Dr. Patrick Baeuerle für die Überlassung des interessanten Themas, für die kompetente fachliche Betreuung, viele Anregungen sowie die großartige Hilfe bei der Entstehung der Publikation.

Ein besonders Dankeschön gilt Herrn Rüdiger Neef für die hervorragende Betreuung über die drei Jahre hinweg. Sowohl in ergebnisreichen als auch in ergebnislosen Zeiten hat er mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgebaut.

Für eine gründliche Korrektur des Manuskripts sowie Anstöße beim Schreiben möchte ich mich bei Jörg Volkland, Konrad Hieber sowie Tobias Raum bedanken. Letzterem gilt auch besonderer Dank für seine Ratschläge im Bereich der bakteriellen BiTE Expression.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Matthias Klinger für viele, viele wertvolle Tipps. Er war mir gerade in den letzten Monaten eine sehr wertvolle Unterstützung.

Für eine tatkräftige/ seelische Unterstützung und eine inzwischen tiefe Freundschaft möchte ich mich bei Johanna Schorr und Katja Kondratenko von ganzem Herzen bedanken. Diese beiden haben mich immer wieder aufgebaut und mit mir schöne Stunden und Abende zugebracht.

Für viele, viele Tipps und Kniffe im Labor möchte ich mich ganz herzlich bei Petra Meier und vor allem Susanne Hausmann bedanken. Gerade zu Beginn dieser Arbeit haben sich diese beiden sehr liebevoll und auch mit der nötigen Prise Pfeffer um mich gekümmert.

Der gesamten Zellkultur Arbeitsgruppe einen lieben Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der „am-Leben-Haltung“ von Zellen, Elisabeth Weidinger und John Lumsden für die Bereitstellung stabiler Zelllinien und Elisabeth Grieblinger für ihre Hilfe bei der Aufreinigung von störrischen Peptiden.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht wäre ein Studium oder eine Doktorarbeit nie möglich gewesen. Ich danke Gott dafür, dass ich mit den besten Eltern gesegnet wurde, die ein Mensch sich wünschen kann.

Im Gedenken an meine geliebten Großeltern, die immer gewusst haben, dass aus ihrem Mädele auch einmal etwas wird.

Meinem Josch, für seine starke Schulter, sein geduldiges Zuhören und dafür, dass er mir zu jeder Zeit das Gefühl gegeben hat, dass kein Zweifel daran besteht, dass ich das alles schaffe.

Publikationen

Hieber, C., Klinger, M., Urbig, T., Baeuerle, P., Neef, R. (2012). Productivity and Quality of Recombinant Proteins Produced by Stable CHO Cell Clones Can Be Predicted from Their Transient Expression in HEK Cells. Eingereicht bei Molecular Biotechnology am 12.01.2012