

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Charakterisierung eines neuen gegen humanes EGFR und
murines EpCAM gerichteten bispezifischen Antikörpers**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jonas Franz Henkel

aus Balingen

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat
PD Dr. rer. nat. Heike Pohla

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Sebastian Kobold

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2015

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Prognose und Behandlung von Tumorerkrankungen	1
1.2	Tumorimmuntherapien	1
1.2.1	Antikörpertherapie	2
1.2.1.1	Aufbau und Wirkungsmechanismen von therapeutischen Antikörpern	2
1.2.1.2	Komplementvermittelte Zytotoxizität	3
1.2.1.3	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	3
1.2.1.4	Antikörpervermittelte zelluläre Phagozytose	4
1.2.1.5	Limitierungen monospezifischer Antikörper	5
1.2.2	Bispezifische Antikörper	5
1.2.2.1	Trifunktionale bispezifische Antikörper	6
1.2.2.2	<i>Bispecific T-cell Engager</i>	7
1.2.2.3	Limitierungen bispezifischer Antikörpertherapien	8
1.2.3	Adoptive T-Zelltherapie	8
1.3	Kombination aus adoptivem T-Zelltransfer und T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern – ein neuer immuntherapeutischer Ansatz	11
1.3.1	<i>Proof-of-principle</i> in einem murinen Magenkarzinommodell	11
1.4	Fragestellung	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Technische Ausstattung	14
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.3	Puffer und Medien	16
2.1.4	Zelllinien	18
2.1.5	Zytokine und Wachstumsstimulatoren	19
2.1.6	Antikörper und Färbungen	19
2.1.7	Polyacrylamid-Gele	20
2.1.8	Software	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellkultur	21
2.2.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	21
2.2.1.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	21

2.2.1.3	Kultivierung von Tumorzellen	21
2.2.2	Generierung des hEGFR x mEPCAM bispezifischen Antikörpers	21
2.2.3	Produktion des G8.8 Ratten Anti-Maus-EpCAM-Antikörpers	22
2.2.4	Protein-Techniken	23
2.2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	23
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration durch die Bradford-Methode	23
2.2.5	Durchflusszytometrie	23
2.2.6	Präparation der Splenozyten und Stimulation zu Effektorzellen	23
2.2.7	Antikörperverdau mit Papain	24
2.2.8	Zytotoxizitätstest	24
2.2.8.1	Bestimmung der komplementvermittelten Zytotoxizität	25
2.2.8.2	Bestimmung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität	25
2.2.9	Histologie	26
2.2.10	<i>Cross-linking-Assay</i>	26
2.3	Tierexperimentelle Methoden	27
2.3.1	Allgemeine Haltebedingungen	27
2.3.2	Mäuse	27
2.3.3	Untersuchung der Maus	27
2.3.4	Narkose	27
2.3.5	Tumorinduktion	28
2.3.6	Organentnahme	28
2.3.7	Therapieversuch	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Aufreinigung des IgG2a Ratten EpCAM-Antikörpers aus der G8.8 Hybridomzelllinie	29
3.2	Bindungsverhalten des ER-Ep BiAk <i>in vitro</i>	30
3.2.1	Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung	30
3.2.1.1	Konzentrationsabhängige Bindung an murines EpCAM	30
3.2.1.2	Konzentrationsabhängige Bindung an humanes EGFR	31
3.2.2	<i>In-vitro</i> -Kinetik des ER-Ep BiAk	31
3.2.2.1	Antikörperkinetik auf EpCAM- und EGFR-positiven Zellen	31
3.3	Untersuchung der konventionellen Effektoreigenschaften des ER-Ep bispezifischen Antikörpers	32

3.3.1	Komplementvermittelte Zytotoxizität auf mGC8-Zellen	33
3.3.2	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität auf mGC8-Zellen	34
3.3.3	Bindung des Antikörpers über den Fc-Teil an Makrophagen	35
3.4	Rekrutierung von EGFR-transduzierten T-Zellen an EpCAM-positive Tumorzellen durch den ER-Ep bispezifischen Antikörper	36
3.5	Immunhistologische Untersuchungen	37
3.5.1	<i>In-vivo</i> -Untersuchung der EpCAM-Expression in der Maus	37
3.5.2	<i>In-vivo</i> -Verteilung und Anreicherung des Ratten mEpCAM-Ak in tumortragenden Mäusen	38
3.6	<i>In-vivo</i>-Wirkung des Ratten mEpCAM-Ak im autochthonen Magentumormodell der CEA424/SV40-TAg Maus	40
4.	DISKUSSION	41
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	41
4.2	<i>In-vitro</i>-Eigenschaften des ER-Ep bispezifischen Antikörpers	41
4.2.1	Bindungsspezifität und Affinität des ER-Ep bispezifischen Antikörpers	41
4.2.2	Antikörperabbau durch Internalisierung	42
4.3	Die Rolle des Fc-Teils in T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörperformaten	43
4.3.1	Beurteilung der konventionellen Effektormechanismen des ER-Ep bispezifischen Antikörpers	45
4.3.1.1	Beurteilung der komplementvermittelten Zytotoxizität	45
4.3.1.2	Beurteilung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität	47
4.3.1.3	Fc-Teil vermittelte Vakzinierungseffekte	49
4.3.2	Penetrationsvermögen des ER-Ep bispezifischen Antikörpers in solide Tumoren	50
4.4	Expression von EpCAM und seine Bedeutung als Target in der Tumorummuntherapie	51
4.5	Rekrutierung von T-Zellen im vorgestellten Therapiekonzept	53
4.6	Ausblick	54
5.	ZUSAMMENFASSUNG	56
6.	LITERATURVERZEICHNIS	57
7.	ANHANG	73

7.1	Abkürzungsverzeichnis	73
7.2	Veröffentlichungen	75
7.2.1	Veröffentlichung	75
7.2.2	Poster und Kongressbeiträge	75
7.3	Danksagung	76
7.4	Lebenslauf	76

1. EINLEITUNG

1.1 Prognose und Behandlung von Tumorerkrankungen

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2013). Das prognostizierte Lebenszeitrisko an Krebs zu erkranken ist stark gestiegen und liegt bei 51 % für Männer und 43 % für Frauen. In frühen Stadien können viele Tumorerkrankungen durch die Kombination oder Sequenz aus Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie geheilt werden. Die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu sterben liegt jedoch weiterhin bei 25 % (Robert Koch-Institut, 2013). Auch wenn der Tumor R0-reseziert ist, kommt es häufig zu Lokalrezidiven und/oder Metastasierung. Ein neuer Ansatz, der 1997 mit der Zulassung des CD20-spezifischen Antikörpers Rituximab klinisch begründet wurde, ist die Immuntherapie von Tumoren (McLaughlin et al., 1998). Heute haben sich Antikörpertherapien als neue Pfeiler in der Tumorbehandlung etabliert. Zahlreiche Präparate wurden bereits zur Anwendung in der Krebstherapie zugelassen (Scott et al., 2012). Die therapeutischen Erfolge der Immuntherapie sind jedoch nicht nur auf Antikörper begrenzt. So wurde 2010 erstmals auch eine zelluläre Therapie zur Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms zugelassen (Sipuleucel-T) (Cheever und Higano, 2011). Die Zahl der Innovationen im Bereich Antikörper und Zelltherapie hat stark zugenommen. 2013 kürte das Magazin Science die jüngsten Erfolge der Tumorimmuntherapie als Durchbruch des Jahres (Couzin-Frankel, 2013). Es sind jedoch trotz dieser Fortschritte und Erfolge, weiterhin neue therapeutische Konzepte erforderlich, um die Prognose von fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zu verbessern.

1.2 Tumorimmuntherapien

Das Ziel von Immuntherapien ist es, das Immunsystem gegen die Krebserkrankung zu richten (Sharma et al., 2011). 1975 beschrieben Cesar Milstein und Georges Köhler die Herstellung monoklonaler Antikörper und legten damit den Grundstein für die erste erfolgreiche Immuntherapie von Tumoren. Diese Technologie führte zur Zulassung des ersten Antikörpers im Jahre 1986 (anti-CD3, Muromomab). 1997 wurde der Antikörper Rituximab zur Tumortherapie zugelassen (McLaughlin et al., 1998). Weitere Antikörper folgten, andere werden derzeit in klinischen Studien getestet (Scott et al., 2012). Allgemein unterteilt man Immuntherapien in vier Kategorien: Monoklonale Antikörpertherapien, Krebsimpfstoffe (Vakzine), adoptiver Transfer tumorspezifischer

T-Zellen sowie die Gabe rekombinanter Proteine und Antikörper zur Kostimulation von Immunzellen oder zur Blockierung immuninhibitorischer Mechanismen.

Das im Rahmen dieser Dissertationsarbeit untersuchte Antikörpermolekül soll genutzt werden, um den adoptiven T-Zell-Transfer mit einer zielgerichteten Antikörpertherapie zu kombinieren. Deshalb werden im Folgenden diese beiden Behandlungsoptionen näher beleuchtet.

1.2.1 Antikörpertherapie

Antikörper gehören zum physiologischen Repertoire des adaptiven Immunsystems und werden nach spezifischer Stimulation von B-Zellen produziert (Parkin und Cohen, 2001). Zur Tumortherapie werden sie künstlich hergestellt und sind meist gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) gerichtet. Durch die spezifische Bindung an ihre Targetstruktur können sie zur Lyse der Zielzelle führen.

1.2.1.1 Aufbau und Wirkungsmechanismen von therapeutischen Antikörpern

Monospezifische Antikörper bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten und werden aufgrund unterschiedlicher schwerer Ketten in fünf Isotypen unterteilt. Zur Krebstherapie werden vor allem Antikörper des Typs Immunglobulin G (IgG) verwendet (Topalian et al., 2011). Funktionell wird ein Antigen-bindendes Fragment (*Fragment antigen binding*; Fab) und ein kristallisierbares Fragment (*Fragment crystallizable*; Fc) unterschieden. Das Fab-Molekül beinhaltet den variablen antigenspezifischen Teil des Antikörpers. Die Effektorfunktionen werden hingegen über Fc -Domänen vermittelt (Weiner et al., 2010). Die antitumorale Wirkung von Antikörpern basiert auf verschiedene Mechanismen (Scott et al., 2012). Zu den wichtigsten Effekten gehören die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Antibody dependant cellular cytotoxicity, ADCC), die komplementvermittelte Zytotoxizität (Complement dependent cytotoxicity, CDC), die antikörpervermittelte zelluläre Phagozytose (*Antibody dependent cellular phagocytosis*, ADCP) und die Blockade von Signalwegen (Van Cutsem et al., 2009; Hodi et al., 2010; Weiner, 2010).

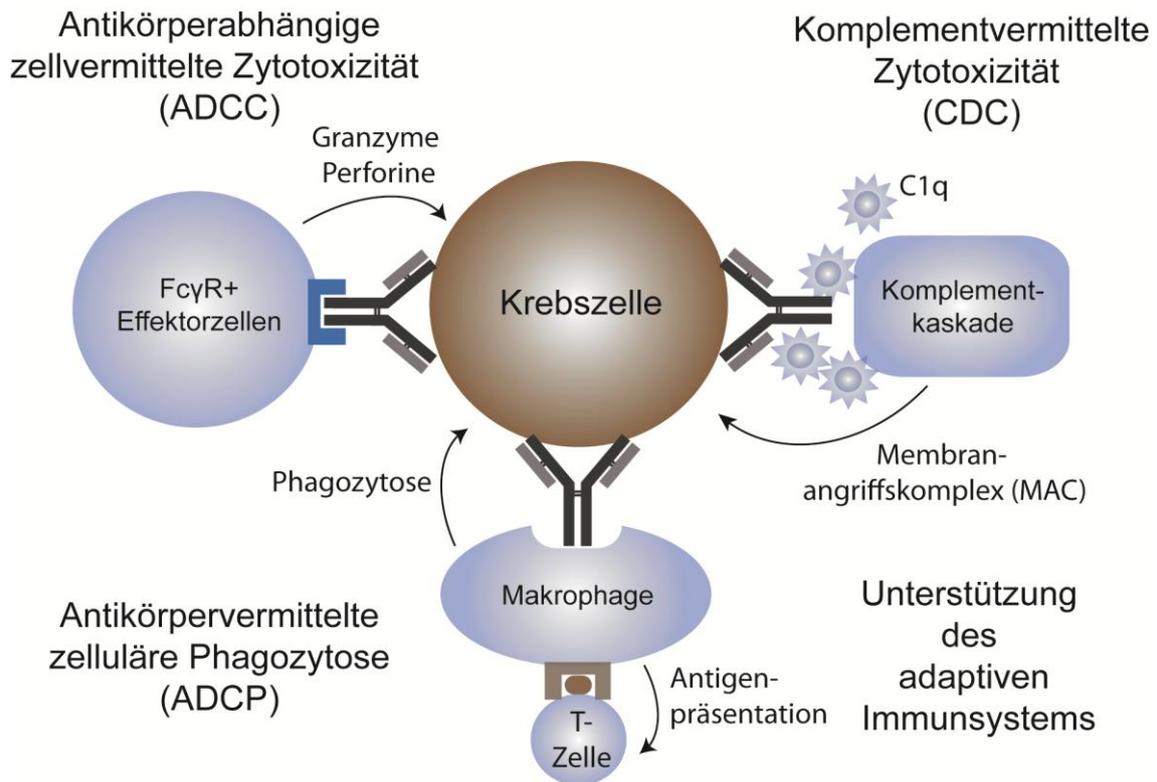


Abbildung 1: Antitumorale Effektorfunktionen eines monoklonalen Antikörpers im Überblick, modifiziert nach Topalian et al., 2011.

1.2.1.2 Komplementvermittelte Zytotoxizität

Das Komplementsystem gehört zum humoralen Teil des Immunsystems und beinhaltet mehr als 30 lösliche Plasmaproteine. Die komplementvermittelte Zytotoxizität (klassischer Weg der Komplementaktivierung) wird über die Bindung von mehr als zwei Antikörpern auf der Zelloberfläche ausgelöst. Dadurch kommt es zur Interaktion des C1q-Elements mit dem Fc-Teil des Antikörpers (Abbildung 1). Eine Spaltungskaskade von weiteren Proteinen wird ausgelöst, sie endet mit der Bildung des Membranangriffskomplexes und der Lyse der Tumorzelle. Zusätzlich werden chemotaktisch wirksame Moleküle (C3a und C5a) gebildet. Diese führen zur Mobilisierung und Aktivierung von Immuneffektorzellen wie Makrophagen, Neutrophilen, Basophilen und Mastzellen (Gelderman et al., 2004).

1.2.1.3 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität wird als eine der wichtigsten antitumoralen Mechanismen monoklonaler Antikörper beschrieben (Weiner et al., 2010). Auf Tumorzellen gebundene Antikörper können von Zellen, die zytotoxisch

wirken, erkannt werden. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen (DZ), Makrophagen oder Mastzellen binden die Fc-Domäne des Antikörpers über ihren Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) (Abbildung 1). Trägt die Zelle einen Fc γ RI oder Fc γ RIIIA, so kommt es zu einer Aktivierung (Nimmerjahn und Ravetch, 2006).

Kann die Bindung des Fc-Teils eine Aktivierung der Immunzellen auslösen, so kommt es über die Ausschüttung von Perforin und Granzymen aus zytotoxischen Granula zur Lyse der Zielzelle (Smyth et al., 2005). Für Rituximab und Trastuzumab – letzterer, ein humanisierter Antikörper gerichtet gegen den *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (Her2/neu) – konnte gezeigt werden, dass in Fc γ R-defizienten Mäusen die antitumorale Aktivität der Antikörper deutlich reduziert ist (Clynes et al., 2000). Dies unterstreicht die Bedeutung der ADCC für die antitumorale Wirkung eines Antikörpers. Ihr Beitrag zur Wirksamkeit kann in Abhängigkeit des Antikörpertyps und des Patienten variieren. So spielen einerseits die IgG-Unterklassen, andererseits die Zuckerketten von Fc-Domänen eine wichtige Rolle (Natsume et al., 2009). Neuere Arbeiten belegen auch, dass genetische Polymorphismen in Fc γ -Rezeptoren, welche die Affinität für den Antikörper regulieren, die Ansprechrate auf eine Antikörpertherapie erheblich beeinflussen (Cartron et al., 2002; Weng und Levy, 2003).

1.2.1.4 Antikörpervermittelte zelluläre Phagozytose

Ein weiterer Mechanismus, der *in vitro* zur antitumoralen Wirkung von Antikörpern beitragen konnte, ist die antikörpervermittelte zelluläre Phagozytose (ADCP) (Shibata-Koyama et al., 2009). Spezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems können Bakterien und körpereigene entartete Zellen aufnehmen und verdauen. Befähigt sind dazu DZ, gewebständige Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten (Flannagan et al., 2012). Über die Opsonierung der Tumorzelle durch den gebundenen Antikörper kommt es zu einer Aktivierung dieser Zellen. Der Vorgang wird über die Bindung des Antikörpers an Fc γ R der Immunzellen gesteuert (Richards et al., 2008). Nach Aufnahme und Abbau der Tumorzellen findet eine *Major histocompatibility complex*- (MHC-) abhängige Präsentation von Zellbestandteilen hauptsächlich durch DZ statt (Abbildung 1). Diese antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wandern in die abführenden Lymphknoten und tragen zur Aktivierung der spezifischen Immunantwort bei. Zytotoxische T-Zellen (ZTL) werden zum Ort des Geschehens gelenkt und verstärken den antitumoralen Effekt (Shankaran et al., 2001; Dhodapkar et al., 2002). Zwar wurde die ADCP in verschiedenen Untersuchungen als ein Wirkmechanismus

von Antikörpern *in vitro* gefunden, dennoch fehlt bisher ein eindeutiger Beweis für die klinische Relevanz (Cartron, *et al.* 2008; Shibata-Koyama, *et al.* 2009).

1.2.1.5 Limitierungen monospezifischer Antikörper

Trotz der klinischen Erfolge von Rituximab, Trastuzumab oder auch Cetuximab, die in Kombination mit Chemotherapien Patienten heilen oder zumindest deren krankheitsfreies Überleben verlängern, profitieren viele Patienten nicht von diesen Medikamenten (Cartron *et al.*, 2002; Lordick *et al.*, 2010). Der Therapieerfolg wird negativ beeinflusst durch das Auftreten von Resistenzen, durch immuninhibitorische Mechanismen im Tumormilieu und durch die Anwendung in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien mit großen Tumormassen (Chames *et al.*, 2009). Damit mehr Patienten von Antikörpertherapien profitieren können, sind zusätzliche Strategien erforderlich. Ein Ansatz ist es, durch Antikörper-*Engineering* die Antikörperstrukturen weiter zu optimieren (Riechmann *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 2010). Eine andere Strategie ist es, Synergien zwischen verschiedenen Immuntherapien in Kombinationsansätzen zu suchen (Disis *et al.*, 2009).

1.2.2 Bispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper (BiAk) stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Tumorimmuntherapie dar (Chames und Baty, 2009). Sie zeichnen sich durch zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen aus. Dadurch sind BiAk in der Lage zwei Zielzellen in einen räumlichen Zusammenhang zu bringen und diese miteinander zu vernetzen. Immuneffektorzellen können dadurch gezielt an den Tumor redirigiert werden und eine spezifische Lyse induzieren (Segal *et al.*, 2001). In neueren Konzepten werden BiAk eingesetzt, um gezielt zwei Signalmoleküle gleichzeitig zu blockieren und so synergistische antitumorale Wirkungen zu erzeugen (Castoldi *et al.*, 2013).

Verschiedene bispezifische Antikörperformate wurden bereits getestet (Milstein und Cuello, 1983; Kontermann, 2012). Dabei variieren Aufbau, Größe und Bindungsstellen. Viele BiAk konzentrieren sich – aufgrund des großen synergistischen Potenzials – auf die Rekrutierung von T-Zellen. Diese Zellen werden infolge der fehlenden Expression des Fc-Rezeptors von konventionellen monospezifischen Antikörpern nicht mobilisiert. Zur Rekrutierung von T-Zellen dient als Zielantigen häufig CD3, welches auf allen

T-Zellen exprimiert wird und ein erstes Aktivierungssignal vermittelt (Staerz und Bevan, 1986). Diese Gruppe der BiAk wird auch als *T-cell Engager* bezeichnet und kann effektiv T-Zellen *in vivo* rekrutieren (Baeuerle und Reinhardt, 2009). Blinatumomab, ein BiAk, der gegen CD19 und CD3-gerichtet ist, konnte in klinischen Studien starke antitumorale Effekte zeigen und wurde im Dezember 2014 zur Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) der B-Zellreihe zugelassen (Bargou et al., 2008; Topp et al., 2011). Neben T-Zell-rekrutierenden Konstrukten werden auch andere Strategien verfolgt; beispielsweise werden in der Literatur Formate beschrieben, welche NK-Zellen (CD16) oder Monozyten (CD64) rekrutieren (Weiner et al., 1995; Renner et al., 1997; James et al., 2001).

Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist das Wirkprinzip von trifunktionalen Antikörpern (TriomAbs) und *bispecific T-cell Engager* (BiTE) von besonderem Interesse. In klinischen Studien stellten beide Antikörper ihr Potenzial unter Beweis (Chames und Baty, 2009). Funktion, Wirkung und Limitierungen werden im Folgenden näher beleuchtet.

1.2.2.1 Trifunktionale bispezifische Antikörper

Zur ersten Generation BiAk gehören die durch Hybrid-Hybridromtechnik entstehenden Quadrome. Sie bestehen aus je einer schweren und einer leichten Kette zweier verschiedener monospezifischer Antikörper (Milstein und Cuello, 1983). Eine Weiterentwicklung dieser Antikörpergruppe sind TriomAbs. Hierzu werden ein Maus IgG2a-Hybridom mit einer Spezifität gegen ein TAA und ein Ratten IgG2b-Hybridom mit einer Spezifität gegen das CD3-Molekül miteinander fusioniert (Lindhofer et al., 1995). Der entstandene hybride Maus/Ratten Fc-Teil ist durch die selektive Bindung an aktivierende Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI, IIa und IIIa) auf akzessorischen Immunzellen in der Lage, zwei weitere Schlüsselfunktionen zu vermitteln (Zeidler et al., 1999). Zum einen führt die Rekrutierung von NK-Zellen und Makrophagen zu additiven Lyseeffekten mittels ADCC und Phagozytose (Zeidler et al., 2000), zum anderen liefern gebundene aktivierte APZ fehlende kostimulatorische Signale (B7/CD28, CD40/CD40L) und setzen Zytokine zur T-Zell-Aktivierung frei. Auf diese Weise wird eine langanhaltende Immunreaktion induziert (Seimetz et al., 2010; Eissler et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass über CD3-stimulierte T-Zellen ohne zusätzliche kostimulatorische Signale nur ungenügend aktiviert werden und sogar in einen anergen Zustand übergehen können (Linsley und Ledbetter, 1993; Howland et al., 2000).

Der wohl bekannteste Vertreter dieser Antikörpergruppe ist Catumaxomab, der erste BiAk mit Marktzulassung. Er bindet an das *Epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) und findet, intraperitoneal appliziert, Anwendung bei malignem Aszites (Seimetz et al., 2010). Derzeit wird im Rahmen klinischer Studien die Erweiterung der Indikation zur Therapie von Eierstock- und Magenkrebs untersucht (Heiss et al., 2010; Linke et al., 2010). Eine systemische intravenöse Anwendung von Catumaxomab ist aufgrund der starken Nebenwirkungen nicht machbar. Hierfür wird eine starke Zytokinausschüttung verantwortlich gemacht, die durch die T-Zellaktivierung, wohl auch tumorunabhängig ausgelöst wird (Sebastian et al., 2007; Eissler et al., 2013).

1.2.2.2 Bispecific T-cell Engager

Rekombinante Techniken ermöglichen die Produktion kleinerer Antikörperfragmente, welche auf die Antigenbindungseinheit reduziert wurden (Bird und Walker, 1991). Zwei dieser sogenannten Einzelketten-Fragmente der variablen Region (*single-chain fragment variable*, scFv) werden durch einen Linker verknüpft und stellen das Gerüst der BiTE dar. BiTEs binden, neben einem TAA, ebenfalls an den CD3-Komplex zur Aktivierung von T-Zellen. Ein Vorteil dieser Moleküle ist ihre geringe Größe, wodurch eine bessere Gewebepenetration gewährleistet werden soll. *In vitro* zeigen BiTE-Moleküle mit geringen Antikörperkonzentrationen ein großes T-Zell aktivierendes Potenzial und sind auch bei niedrigen Effektor-zu-Zielzell Ratios in der Lage, zytotoxische Effekte gegenüber Tumorzellen auszulösen (Mack et al., 1995; Loffler et al., 2000; Dreier et al., 2002). Es wird angenommen, dass diese antitumoralen Effekte aufgrund ihrer geringen molekularen Größe ihre Zielzellen in eine starke enge räumliche Verbindung bringen und so MHC-Komplex unabhängig funktionieren und keine kostimulatorischen Signale benötigen (Dreier et al., 2003; Offner et al., 2006). Aufgrund ihres geringen molekularen Gewichts werden BiTE-Antikörper jedoch sehr schnell im Körper abgebaut und besitzen deshalb eine kurze Serumhalbwertszeit (Nagorsen et al., 2012).

Blinatumomab konnte in klinischen Studien Remissionen in Patienten mit refraktären Non-Hodgkin-Lymphomen und Patienten mit ALL induzieren (Bargou et al., 2008; Topp et al., 2011). Ein weiterer BiTE-Antikörper, Solitomab (MT110), befindet sich momentan in einer klinischen Phase-I-Studie und bindet neben CD3 auch EpCAM. *In vitro*-Untersuchungen konnten die Zytotoxizität dieses Antikörpers belegen. Auch *in vivo* zeigte der Antikörper in einem Xenograft Mausmodell antitumorale Aktivität gegen

EpCAM-exprimierende Tumoren (Brischwein et al., 2006; Herrmann et al., 2010; Cioffi et al., 2012). Im Patienten konnte ein therapeutisches Ansprechen bisher jedoch nicht beobachtet werden (Fiedler et al., 2012).

Die Studienlage macht deutlich, dass ein erfolgreicher therapeutischer Einsatz von BiAk noch auf einige wenige Tumorerkrankungen begrenzt ist. Therapie-limitierende Faktoren werden im Folgenden erläutert.

1.2.2.3 Limitierungen bispezifischer Antikörpertherapien

Die Zulassung von Catumaxomab zur Behandlung des malignen Aszites und von Blinatumomab zur Therapie der B-Zell-ALL sind Beweis dafür, dass die Rekrutierung von T-Zellen durch BiAk zur Tumortherapie eingesetzt werden kann. Solide Tumore scheinen jedoch deutlich resistenter als hämatologische zu sein, sodass Präparate mit signifikanten klinischen Ansprechraten in der Indikation solider Tumorerkrankungen derzeit fehlen. Starke dosisabhängige Nebenwirkungen wurden beobachtet (Sebastian et al., 2007). Bei der Therapie mit TriomAbs als auch mit BiTE-Antikörpern treten unerwünschte Wirkungen wie Lymphopenie, Störungen des zentralen Nervensystems, Kopfschmerzen, Fieber und Ödeme auf. Ursächlich für diese dosislimitierenden Toxizitäten ist wahrscheinlich die über den CD3-Rezeptor vermittelte unspezifische Aktivierung polyklonaler T-Zellen und die damit verbundene Zytokinausschüttung (sogenannter „Zytokinsturm“) (Link et al., 1998; Baeuerle und Reinhardt, 2009; Seimetz et al., 2010). Diese unspezifische Aktivierung verhindert eine höhere Dosierung der Antikörper.

Zur Optimierung der Therapie werden unter anderem Kombinationsansätze verfolgt, die eine gezielte Rekrutierung von tumorspezifischen T-Zellen ermöglichen. Eine interessante Option stellt in diesem Zusammenhang die adoptive T-Zelltherapie dar, die in frühen klinischen Arbeiten deutliche Ansprechraten aufweisen konnte (Rosenberg et al., 2011).

1.2.3 Adoptive T-Zelltherapie

Zytotoxische T-Zellen (ZTL) werden als die effektivsten Effektorzellen des adaptiven Immunsystems gegen Krebszellen angesehen. Ihre hohe Tumorspezifität sowie ihre Fähigkeit den Tumor aktiv zu infiltrieren, zeichnen sie für therapeutische Zwecke aus

(Rosenberg, 2001; Boon et al., 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, mehrere Tumorzellen hintereinander zu lysieren (Hoffmann et al., 2005).

Bei der adoptiven T-Zelltherapie (AZT) werden *in vitro* stimulierte tumorspezifische T-Zellen zurück in den Patienten infundiert. In präklinischen sowie klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die AZT einen antitumoralen Effekt induziert; insbesondere wirkt die AZT bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, die resistent gegenüber konventionellen Therapien waren (Dudley et al., 2002; Yee et al., 2002; Landmeier et al., 2010). Das allgemeine Prinzip der AZT beruht auf dem Transfer einer aktivierten T-Zellpopulation, die spezifisch Antigene auf dem Tumor erkennt (Gattinoni et al., 2006). Es gibt verschiedene Ansätze, um tumorspezifische Zellpräparate herzustellen. Am bekanntesten sind die Expansion Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) und die Isolation und Expansion einzelner spezifischer T-Zellklone *ex vivo* (June, 2007). Je nach Ansatz werden die T-Zellen aus peripherem Blut (Yee et al., 2002), tumordrainierenden Lymphknoten (Shu et al., 1987) oder aus Zelllysaten des Tumorgewebes isoliert (Topalian et al., 1987).

Obwohl in präklinischen Modellen vielversprechende Ergebnisse gezeigt werden konnten (Alexander und Rosenberg, 1990), blieb die klinische Wirkung bisher hinter den Erwartungen zurück (Figlin et al., 1999). Der alleinige Transfer von TIL und einer IL-2-Hochdosistherapie konnte in Studien mit Melanompatienten nur Ansprechraten von 30 % erreichen, die jedoch meist nicht von langer Dauer waren (Rosenberg et al., 1994). Verantwortlich für die fehlende Effektivität sind vor allem Faktoren wie mangelnde T-Zellinfiltration und eingeschränkte T-Zell-Aktivierung im Tumor (Fisher et al., 1989). Evasionsmechanismen wie die selektive Herabregulation des MHC-I-Moleküls durch den Tumor (Vitale et al., 2005), aber auch das immunsuppressive Mikromilieu im Tumor verhindern eine effektive Aktivierung der T-Zellen (Curiel et al., 2004; Antony et al., 2005; Gattinoni et al., 2005).

Neben der Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *Transforming growth factor* (TGF- β) ist für diese Immunsuppression im Tumormikromilieu vor allem die Rekrutierung von immunregulatorischen Immunzellen verantwortlich. Dabei spielen besonders regulatorische T-Zellen (Treg) und *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) eine große Rolle. Unter anderem führen sie zur Hemmung von körpereigenen als auch transferierten zytotoxischen T-Zellen (Vesely et al., 2011).

Durch eine immunsuppressive Vorbehandlung des Patienten und Ausschaltung dieser Mechanismen gelingt es, die therapeutische Effektivität der AZT zu steigern (Cheever et al., 1980; Laport et al., 2003; Klebanoff et al., 2005). Durch Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung von transferierten T-Zellen im Tumor (Antony et al., 2005; Gattinoni et al., 2005). Die Kombination aus adoptiven Transfer IL-2-expandierter tumorspezifischer T-Zellen mit einer immunsuppressiven Vorbehandlung konnte die Ansprechrate in einer Studie bei Patienten mit metastasiertem Melanom auf bis zu 72 % steigern (Dudley et al., 2008). Auch nach drei Jahren zeigten noch 20 % der Patienten eine vollständige Remission der Erkrankung (Besser et al., 2010; Rosenberg et al., 2011).

Die AZT mit TIL konnte jedoch nur in Melanompatienten potente Wirkungen demonstrieren (Restifo et al., 2012). Grund hierfür ist, dass aus anderen Tumorentitäten keine ausreichenden Mengen tumorspezifischer ZTL isoliert werden konnten (Restifo et al., 2012). Durch gezielte genetische Veränderung der T-Zell-Spezifität wird versucht, diese Limitierung zu überwinden (Robbins et al., 2011; Brentjens et al., 2013; Grupp et al., 2013). Tumorspezifische T-Zell-Rezeptoren (TZR) werden mittels Gentransfer in naive T-Zellen transduziert. Dadurch werden hochpotente spezifische T-Zellen generiert.

Die antitumorale Wirkung dieser modifizierten T-Zellen konnte in murinen Tumormodellen gezeigt werden (Kessels et al., 2001; Chamoto et al., 2004). Auch aktuelle klinische Daten bestätigen das Potenzial dieser Form der Immuntherapie (Morgan et al., 2006; Johnson et al., 2009; Robbins et al., 2011); zeigen jedoch auch, dass diese Ansätze zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen können, die eine breite klinische Anwendung verhindern. Der Einsatz hochaffiner tumorspezifischer T-Zellen kann zu einer unerwünschten Bindung in physiologischem Gewebe führen und eine massive Zytokinausschüttung verursachen (Morgan et al., 2010). Die Nebenwirkungen dieser hochpotenten zytotoxischen T-Zellen sind schwer abzuschätzen und ihr Wirkungsprofil gilt als unsicher (Bendle et al., 2010; Jorritsma et al., 2011).

Die aktuelle Datenlage hebt die Notwendigkeit weiterer Forschung zur Verbesserung der therapeutischen Effektivität und Sicherheit hervor.

1.3 Kombination aus adoptivem T-Zelltransfer und T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern – ein neuer immuntherapeutischer Ansatz

Um die Defizite der einzelnen Ansätze auszugleichen und die Effektivität eines adoptiven T-Zell-Transfers zu verstärken, haben wir ein Therapiekonzept entwickelt, welches die AZT mit einem T-Zell-rekrutierenden BiAk verbindet. Bispezifische Antikörper rekrutieren transferierte T-Zellen an den Tumor, die dort spezifisch zytotoxische Effekte vermitteln können. Zudem wird durch den Zell-Transfer eine hohe Zahl ZTL bereitgestellt. Ziel dieser kombinierten Therapie ist es, die antitumoralen Effekte zu stärken, sowie die Therapiesicherheit durch Reduktion unspezifischer T-Zell-Aktivierung zu erhöhen.

Durch die Möglichkeit ZTL mit verschiedenen Rezeptoren gentechnisch zu modifizieren, können tumorspezifische T-Zellen mit einem inaktiven Antigen transduziert werden. Dieses Antigen kann dann gezielt durch einen bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörper erkannt werden. Dadurch, dass der Antikörper an sich nicht aktivierend ist, kann die Aktivierung der T-Zelle nur durch spezifische Interaktion des TZR mit der Tumorzelle stattfinden. Die Degranulation der T-Zelle außerhalb des Tumorgewebes wird verhindert und das Auftreten unerwünschter Wirkungen reduziert. In diesem neuen Therapiekonzept übernimmt der BiAk die Rolle des Vermittlers – er bindet an ein TAA auf der Tumoroberfläche und redirigiert die transferierten T-Zellen über das inaktive Antigen. Auf diese Weise erfolgen T-Zell-Aktivierung und Rekrutierung in zwei sequenziellen Schritten (Kobold et al., 2015).

1.3.1 *Proof-of-principle* in einem murinen Magenkarzinommodell

Die Umsetzung dieses Therapiekonzeptes sollte zunächst in einem murinen Magenkarzinommodell untersucht werden. Ziel war es CEA424-SV40-T-Antigen (CEA424/SV40-TAg) transgene Mäuse, welche im Laufe ihres Lebens ein Adenokarzinom im Magen entwickeln, zu behandeln. Für *In-vitro*-Untersuchungen wurde die aus diesem Mausmodell generierte Magentumorzelllinie 8 (mGC8) verwendet. Diese EpCAM-exprimierende Zelllinie präsentiert, wie auch das Adenokarzinom der transgenen Maus, ein Epitop des *Simian Vacuolating Virus 40 T-Antigen* (SV40-TAg) über den MHC-I-Komplex. Der verwendete hEGFR x mEPCAM bispezifische Antikörper (ER-Ep BiAk) bindet einerseits über das murine EpCAM an die Tumorzelle und andererseits an den humanen *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), welcher als trunkiertes, inaktives Antigen in die T-Zellen transduziert wurde

(Abbildung 2). Da das humane EGFR in der Maus nicht exprimiert wird und der verwendete Antikörper nicht kreuzreaktiv für das murine EGFR ist, stellt EGFR ein Modellantigen dar, welches in diesem System nur auf den transduzierten T-Zellen exprimiert wird. Für AZT wurden transgene CD8-positive T-Zellen verwendet (TCR-I). Diese Zellen stammen aus einer transgenen Maus und sind spezifisch für das auf dem mGC8-Tumor präsentierte SV40-TAg. Dieses liefert das zur Aktivierung nötige T-Zell-Signal.

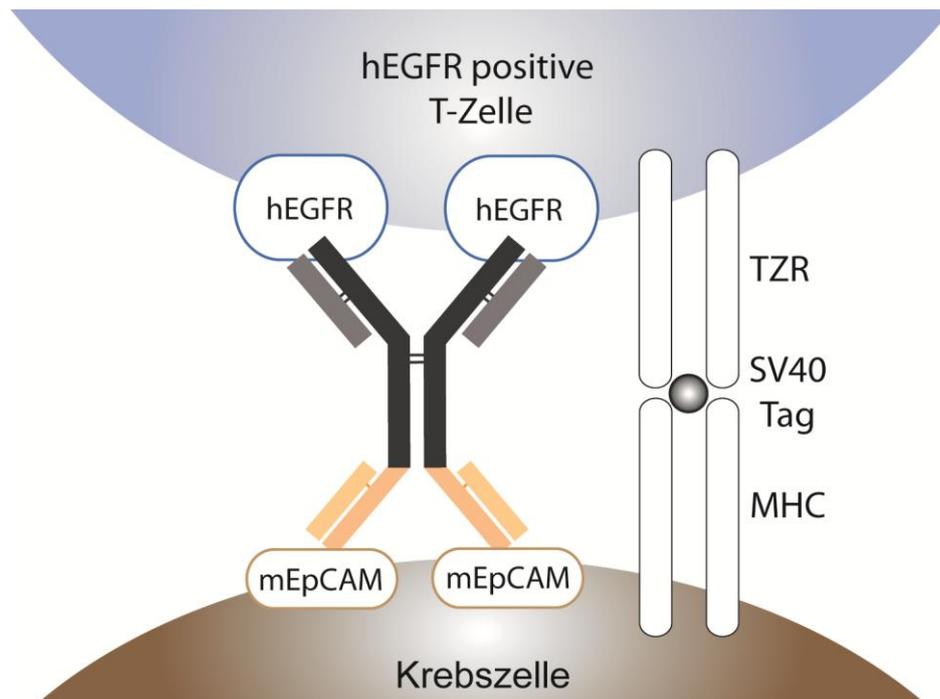


Abbildung 2: Therapieprinzip modifiziert nach Kobold et al., 2014: Der ER-Ep BiAk fördert die Bindung der EGFR-transduzierten tumorspezifischen T-Zellen an den Tumor. Die Aktivierung der T-Zelle findet durch die spezifische Bindung des TCR an das vom Tumor über den MHC-Komplex präsentierte SV40-TAg statt.

1.4 Fragestellung

Um die Grundlage zur Testung des oben genannten Konzeptes zu legen, war es das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit den neuen ER-Ep BiAk *in vitro* zu charakterisieren. Zudem sollte ermittelt werden, ob dieser Antikörper den Tumor erreichen kann und alleine bereits im angestrebten Mausmodell therapeutische Wirkung besitzt. Die Bindungseigenschaften, sowie Effektorfunktionen dieses therapeutischen Antikörpers sollten näher beschrieben und mit den parentalen monospezifischen EpCAM- und EGFR-Antikörpern verglichen werden. Diese Erkenntnisse sollten Grundlage für nachfolgende *In-vivo*-Versuche sein. Es sollten vier zentrale Fragen beantwortet werden:

- Werden konventionelle Antikörper-abhängige Lysemechanismen wie CDC und ADCC durch den ER-Ep BiAk vermittelt?
- Kann der ER-Ep BiAk zwei Zelltypen zusammenbringen?
- Kann ein EpCAM-spezifischer Antikörper in den Tumor penetrieren?
- Zeigen EpCAM-spezifische Antikörper im verwendeten transgenen Maustumormodell *in vivo* therapeutische Wirkung?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausstattung

CO ₂ Brutschrank (BD6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACSCanto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
HiTrap Protein G HP	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden
Kühl- und Gefrierschränke (4°C, -20°C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mithras LB940 ELISA Reader	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nanophotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
PowerPac Basic Spannungsgerät	Biorad, München, Deutschland
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL, USA
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Waage CPA 1003S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Applichem GmbH, Darmstadt
--------	---------------------------

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calcein-AM	R&D Systems Inc., Minneapolis,
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Dulbecco's modified Eagles Medium</i> (DMEM),	PAA, Pasching, Österreich
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Ethanol 100 %	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco Products, Grand Island NY, USA
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences, New Jersey, USA
HEPES-Puffer 1M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hybridoma Express Plus	PAA, Pasching, Österreich
Isofluran	Abbott, Zug, Schweiz
Isopropanol (70 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
L-Glutamin 200mM	PAA, Pasching, Österreich
MEM <i>Non-essential amino acids</i> (NEAA, 100x)	Gibco Products, Grand Island NY, USA
Natriumchlorid 0,9 %	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
Natrium-Pyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Papain (2 x kristallisierte Suspension)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roswell Park Memory Institute (RPMI),	PAA, Pasching, Österreich
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis Lösung 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 2N	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Very low endotoxine (VLE) RPMI	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.3 Puffer und Medien

Erythrozyten-Lyse:
PharmLyse (10x) 1:10
in PBS

Trypsin Lösung:
0,05 % Trypsin
0,02 % EDTA

Coomassie Entfärbelösung:
50 % H₂O
40 % Methanol
10 % Essigsäure

Coomassie-Blau-Lösung:
1 g Coomassie *brilliant blue* 250
50 % H₂O
40 % Methanol
10 % Essigsäure

Puffer für die Antikörperaufreinigung:

Dialysepuffer:
ddH₂O
100 mM Natriumphosphat (pH 7)

Glycin Puffer:
ddH₂O
Glycin 0,1 M (pH 2,7)

TRIS-Puffer:
ddH₂O
TRIS 1 M (pH 9,0)

Laufpuffer (10x) für SDS-PAGE Gelelektrophorese:

ddH₂O
1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
0,25 M Tris-Cl
2 M Glycin
pH 8,3

Puffer für den Papain Antikörperverdau:

PBS
0,04 M EDTA
0,04 M Cystein
< 10 Stunden auf Eis aufbewahren
(doppelte Endkonzentration)

Medien:

DMEM-Vollmedium (mgC8):

DMEM High Glucose
10 % FKS
2 mM L-Glutamin
1 % MEM-NEAA
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

RPMI-Vollmedium (4T1):

RPMI 1640
10 % FKS
2 mM L-Glutamin
1 % MEM-NEAA
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1 mM Natrium-Pyruvat

Effektorzellmedium (Splenozyten;B3Z):

VLE-RPMI
10 % FKS
2 mM L-Glutamin
1 % MEM-NEAA
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1mM Natrium-Pyruvat
50 µM β-Mercaptoethanol
1 mM Hepes

G8.8 Medium:

DMEM High Glucose

20 % FKS

2 mM L-Glutamin

50 µg/ml Gentamycin

Hybridommedium:

Hybridoma Express Plus

2 mM L-Glutamin

50 µg/ml Gentamycin

Einfriermedium:

90 % FKS

10 % PBS

2.1.4 Zelllinien

Murine Magenkarzinomzelllinie 8:

Die mGC8-Zelllinie wurde aus einem spontan entwickelnden Adenokarzinom des Magens in CEA424/SV40-TAg transgenen Mäusen etabliert und von W. Zimmermann (München, Deutschland) zu Verfügung gestellt (Nockel et al., 2006). Etwa 70 - 80 % der mGC8-Zellen sind positiv für EpCAM. Zusätzlich präsentieren diese Zellen über MHC-I ein Epitop des SV40-TAg auf ihrer Oberfläche. Alle Bindungs- und Zytotoxizitätsuntersuchungen der EpCAM-Antikörper wurden mit dieser Zelllinie durchgeführt.

Humane Pankreaskarzinomzelllinie IMIM-PC-1:

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie IMIM-PC-1 wurde zur Untersuchung des Maus hEGFR-Antikörper (hEGFR-Ak) verwendet (Vila et al., 1995). Diese Zelllinie exprimiert den humanen EGFR ubiquitär auf ihrer Oberfläche, während Antikörper gegen das murine EpCAM-Antigen nicht daran binden.

Murine Brustkrebszelllinie 4T1:

Die murine Brustkrebszelllinie 4T1 wurde von M. Wartenberg (Jena, Deutschland) bereitgestellt. Diese Zellen zeigen eine starke EpCAM-Expression auf ihrer Oberfläche (Pulaski 2001).

Murine T-Zelllinie B3Z-EGFR:

Die von W. Uckert (Berlin, Germany) stammende Zelllinie B3Z wurde von der Arbeitsgruppe mit dem humanen EGFR-Antigen stabil transduziert (Karttunen et al., 1992; Kobold et al., 2015).

Murine Makrophagenzelllinie J774

Die murine Makrophagenzelllinie J774 diente zur FcR-Bindungsuntersuchung des Maus mEpCAM-Ak (Ralph und Nakoinz, 1975).

G8.8 Hybridomzelllinie

Die G8.8 Hybridomzelllinie wurde von der DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank) in Iowa erworben. Sie produziert einen Ratten IgG2a-Antikörper, der gegen das murine EpCAM gerichtet ist (Farr et al., 1991).

2.1.5 Zytokine und Wachstumsstimulatoren

Murines Interleukin-2 (IL-2)	PreproTech, Rocky Hill NJ, USA
<i>Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor</i> (GM-CSF)	PreproTech, Rocky Hill NJ, USA

2.1.6 Antikörper und FärbungenSekundärantikörper:

<i>Cy2-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG F(ab)2 Fragment Specific</i>	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
<i>Cy2-conjugated Affini Pure F(ab)2 Fragment Donkey anti-Rat IgG (H+L)</i>	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA

Immunfluoreszenzfärbung:

Dapi Nucleic Acid Stain	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA
-------------------------	---

2.1.7 Polyacrylamid-Gele

Gele für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden wie folgt hergestellt:

Trenngele:

Gelkomponenten	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)
ddH ₂ O	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
30 % Acrylamid	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M TRIS-HCL, pH8,8 / 10 % SDS	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Sammelgel:

Gelkomponenten	Sammelgel (5 %)
ddH ₂ O	2,26 ml
30 % Acrylamid	0,68 ml
0,5 M TRIS-HCL, pH 6,8 / 10 % SDS	1,00 ml
10% APS	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

2.1.8 Software

Adobe Illustrator CS3	Adobe System, San Jose, USA
Endnote X5	Thompson Reuter, Carlsbad, USA
FlowJo	Tree Star, Ashland OR, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Image J	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer und dem Trypanblau-Ausschlusstest quantifiziert. Die Zellzahl wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

Zellzahl pro ml = Anzahl in einer Kammer × Verdünnungsfaktor × 10⁴

2.2.1.3 Kultivierung von Tumorzellen

Arbeiten in der Zellkultur fanden unter sterilen Bedingungen statt. Hierfür wurde eine Lamina-Air-Flow (Heraeus) verwendet. Die Tumorzellen wurden in 75 cm² und 175 cm² Kulturflaschen passagiert. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium, dem Wachstum entsprechend, gewechselt oder die Zellen wurden in eine zusätzliche Zellkulturflasche expandiert. Adhärente Zellen wurden mit einer Lösung aus Trypsin und EDTA abgelöst. Ein Befall mit Mykoplasmen konnte durch regelmäßige Testung ausgeschlossen werden.

2.2.2 Generierung des hEGFR x mEPCAM bispezifischen Antikörpers

Der untersuchte BiAk wurde von der Firma Roche (Penzberg, Deutschland) in gemeinsamer Planung mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie generiert und zur Verfügung gestellt. Das gegen den humanen EGFR- und das murine EpCAM-gerichtete Konstrukt wurde rekombinant hergestellt und besteht aus einem murinen IgG2a-Grundgerüst in einer zwei-plus-zwei tetravalenten Antikörperstruktur. Verwendet wurden die Sequenzen des hEGFR-Ak (Mab225) (Prewett et al., 1996) und des G8.8

Ratten Anti-Maus EpCAM-Antikörpers (Ratten mEpCAM-Ak) (Farr et al., 1991). Zwei scFv-Fragmente des Ratten mEpCAM-Ak wurden mit Hilfe eines (G4S)₂ Segmentes an den Fc-Teil des intakten hEGFR-Ak fusioniert. Durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) wurden die Bindungseigenschaften auf rekombinant hergestellten Antigenen (murinem EpCAM und humanem EGFR) von Roche ermittelt (Rich und Myszk, 2007). Dabei zeigte der neue ER-Ep BiAk nahezu die gleichen Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper (Tabelle 1).

Tabelle 1: Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie der Antikörperaffinität auf murinem EpCAM- und humanem EGFR-Antigenen. Ka = Assoziationskonstante; Kd = Dissoziationskonstante; KD = Bindungskonstante; T1/2 = Halbwertszeit, M = mol/L

Antikörper	Analyt	Ka [M ⁻¹ s ⁻¹]	Kd [s ⁻¹]	T(1/2) [min]	KD [M]
ER-Ep BiAk	Murines EpCAM	2,0 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁻³	4,6	1,2 × 10 ⁻⁸
Monoklonaler Maus mEpCAM-Ak (G8.8)	Murines EpCAM	2,2 × 10 ⁵	1,3 × 10 ⁻²	0,9	6,1 × 10 ⁻⁸
ER-Ep BiAk	Humanes EGFR	1,1 × 10 ⁶	5,7 × 10 ⁻³	2,0	5,5 × 10 ⁻⁹
Monoklonaler hEGFR-Ak (Mab 225)	Humanes EGFR	1,3 × 10 ⁶	5,7 × 10 ⁻³	2,0	4,3 × 10 ⁻⁹

2.2.3 Produktion des G8.8 Ratten Anti-Maus-EpCAM-Antikörpers

Die Hybridomzelllinie G8.8 wurde in Kultur schrittweise auf serumfreies Hybridommedium überführt. Nach vier Tagen kontinuierlicher Kultivierung wurde der Zellüberstand abgenommen und mit den Proteaseinhibitoren Leustatin, Chymostatin und Pepstatin (LCP) versetzt. Das Zellpellet wurde 30 min bei Raumtemperatur lysiert und erneut abzentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden gepoolt und zweimal steril filtriert. Zur Anreicherung höhermolekularer Proteine wurden die antikörperhaltigen Lösungen über Nacht mit einem 20 kDa Filter gegen einen Phosphatpuffer dialysiert. Am nächsten Morgen wurden die Antikörper nach Angaben des Herstellers (GE Healthcare) mittels Protein-G-Säulenchromatographie aufgereinigt (Brown et al., 2000). Die eluierten Antikörper wurden erneut über Nacht dialysiert. Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung

wurde der Ratten mEpCAM-Ak nachgewiesen. Die Konzentrationen der verschiedenen Elutionen konnten nach der Bradford-Methode bestimmt werden (Bradford, 1976).

2.2.4 Protein-Techniken

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Antikörpern und deren Fragmente wurden 12 % SDS-Trenngele verwendet (Laemmli, 1970). Die Gele wurden nach ihrer Polymerisation in eine Kammer mit Laufpuffer gespannt. Die Proben wurden mit Ladepuffer 10 min aufgekocht und in die Geltaschen geladen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei 30 mA über 90 min durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie-Brillant-Blau Lösung gefärbt und nachgewiesen.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch die Bradford-Methode

Die Konzentration der Antikörperaufreinigungen wurde mittels Bradford-Test photometrisch bestimmt (Bradford, 1976).

2.2.5 Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Analysen wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 50 μ l PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten (direkte Fluoreszenz), oder unmarkierten Antikörpern (indirekte Fluoreszenz) 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und zwei Mal mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der indirekten Fluoreszenz wurden diese Schritte mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper wiederholt. Dieser detektiert die Bindung des Primärantikörpers. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen und korreliert mit der Expression des jeweiligen Antigens auf den Zellen.

2.2.6 Präparation der Splenozyten und Stimulation zu Effektorzellen

Nach Entnahme wurden die Milzen mechanisch zerkleinert und mit PBS durch ein 40 μ m Sieb filtriert, um die Zellen vom restlichen Bindegewebe zu trennen. Die

erhaltene Zellsuspension wurde in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1,5 bis 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt und in Effektorzellmedium überführt. Die Zellen wurden unter Zugabe von IL-2 (10 U/ml) und GM-CSF (10 ng/ml) 4 Tage bei 37°C inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.7 Antikörperverdau mit Papain

Zum Verdau der IgG2a-Antikörper zu Fab-Molekülen wurde Papain verwendet. 30 min vor dem Verdau wurde das Papain in Cystein-haltigem Verdaupuffer aktiviert (Parham et al., 1982; Andrew und Titus, 2001). Der Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 1 mg/ml und einem Enzym zu Antikörper Verhältnis von 1:1000 verdaut. Im 37°C warmen Wasserbad wurden die Antikörper zwischen 5 min und 6 h inkubiert. Nach Ende der Reaktionszeit wurde der Verdau durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung auf 12 % Gelen gezeigt und die Bindung des fragmentierten Antikörpers auf der Makrophagen Zelllinie J774 untersucht.

2.2.8 Zytotoxizitätstest

Alle Zytotoxizitätstests wurden mit dem Calcein-AM-Kit durchgeführt. Dazu wurden die Zielzellen mit Calcein-AM markiert. Calcein-AM ist ein nicht fluoreszierender Stoff, der in die Zelle aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen in einen stark fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird. Dieser Farbstoff wird im Zytoplasma zurückgehalten, bei Lyse der Zelle jedoch in den Überstand abgegeben. Dort kann die Fluoreszenz quantitativ ermittelt werden. Da sich die freigesetzte Menge an Calcein proportional zur Lyse der Zielzellen verhält, kann man Rückschlüsse auf das zytotoxische Potenzial des Antikörpers ziehen. Die gemessene Größe ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Calcein wird bei 490 nm angeregt und durch einen 520 nm Emissionsfilter erfasst.

Die Zytotoxizität wurde in Prozent spezifische Lyse mit folgender Formel errechnet:
Spezifische Lyse = (experimentelle Calcein-Freisetzung (MFI) – spontane Calcein-Freisetzung (MFI)) / (maximale Calcein-Freisetzung (MFI) – spontane Calcein-Freisetzung (MFI)) × 100 %

Vor Gebrauch wurde das Calcein in 50 µl DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt. Die Zielzellen wurden in Medium auf 10^6 Zellen pro ml aufgenommen und zusammen mit 10 µl pro 10^6 Zellen des 1 mM Calcein-AM-Stocks etwa 30 min bei 37°C unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Zellen in gewünschter Konzentration in phenolrotfreiem Medium aufgenommen werden. Die auf diese Weise mit Calcein-markierten Zellen wurden zur Bestimmung von ADCC und CDC verwendet.

2.2.8.1 Bestimmung der komplementvermittelten Zytotoxizität

Die Versuche wurden in einer 96-Well Rundboden-Platte in Triplikaten durchgeführt. Pro Well wurden 5×10^4 Calcein-markierte Zielzellen mit 20 % humanem Serum als Komplementquelle und variierender Antikörpermenge in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Um Schwankungen in der Serumzusammensetzung zu verhindern, wurde in allen Versuchen das Serum desselben Spenders verwendet. Die Antikörpermenge wurde in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^2 µg/ml titriert. Nach vier Stunden Inkubation wurde die Platte abzentrifugiert und jeweils 150 µl des Überstands auf eine neue 96-Well Flachboden-Platte mit getönten Rändern überführt.

Zur Berechnung der Zytotoxizität wurden die spontane Calcein-Freisetzung, ohne Zugabe von aktivem Serum, und die maximale Calcein-Freisetzung, durch Lyse aller Zellen, als Ausgangswert ermittelt. Alle Zytotoxizitätstests wurden in phenolrotfreiem DMEM-Medium mit 10 % FKS durchgeführt.

2.2.8.2 Bestimmung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität

Die gewünschte Anzahl an Zielzellen wurde mit Calcein markiert und in 10^5 Zellen pro ml Medium aufgenommen. Der Versuch wurde in einer 96-Well Rundboden-Platte in Triplikaten durchgeführt. Als Effektorzellen wurden stimulierte Milzzellen oder Knochenmarkzellen untersucht. Pro Well wurden 10^4 Zielzellen in variierenden Verhältnissen mit den Effektorzellen gemischt (E:Z Ratio) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Durch Verdünnung der Effektorzellen wurde das E:Z-Ratio von 180:1 bis 5:1 in sechs Konditionen titriert. Antikörper wurden in einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Ermittlung der ADCC entspricht dem unter 2.2.9.1 beschriebenen Auswerteverfahren.

2.2.9 Histologie

Die aus der Maus entnommenen Gewebe wurden in *Tissue-Freezing Medium* eingelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Gewebe wurden später an einem Kryostat bei -20°C bis -30°C geschnitten und zu 5 µm dünnen Schnitten verarbeitet. Diese wurden auf Objektträgern aufgezogen und über Nacht luftgetrocknet. Zunächst wurde jeder Schnitt in Aceton fixiert und mit 10 % Eselserum geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Zur Detektion der EpCAM-Expression in den verschiedenen Geweben wurden die Schnitte 60 min mittels Primärantikörper (Ratten mEpCAM-Ak) und anschließend 30 min mit Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper (*Donkey Anti-Ratten IgG (H+L)*) gefärbt. Um die Verteilung und Anreicherung des zuvor *in vivo* injizierten Antikörpers zu ermitteln, wurden die Schnitte nur mit Sekundärantikörper angefärbt. Alle Schnitte wurden mit DAPI (1/25,000) etwa 3 min gegengefärbt und in Vectashield eingebettet.

Die in 40-facher Vergrößerung mittels Lichtmikroskop angefertigten Bilder wurden durch die Software ImageJ analysiert (Schneider et al., 2012) – nekrotische und beschädigte Schnitte wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Berechnet wurde die prozentuale fluoreszierende Fläche gemessen an der Gesamtfläche.

2.2.10 Cross-linking-Assay

Um die gleichzeitige Bindung und Vernetzung der beschriebenen Antigene durch den ER-Ep BiAk nachweisen zu können, wurde ein *Cross-linking Assay* durchgeführt. Auf einer 6-Well Platte wurden 4T1-Mammakarzinomzellen zu einem dichten, adhärenen Zellrasen herangezogen. Die nicht adhärenente T-Zelllinie B3Z-EGFR wurde mit Calcein markiert. Nach Vorinkubation der T-Zellen mit ER-Ep BiAk wurden diese mit den 4T1-Zellen kokultiviert. Als Kontrollen dienten der Ratten mEPCAM-Ak und der hEGFR-Ak. Nach 60 Minuten wurden die Überstände abgenommen und die Wells mehrmals vorsichtig mit PBS gespült. Die durch bispezifische Bindung zurückgehaltenen, mit Calcein-markierten T-Zellen konnten fluoreszenzmikroskopisch visualisiert und durch einen Mithras *ELISA* nach Lyse quantifiziert werden. Die Menge an retiniertem Calcein wurde zur gesamteingesetzten Menge (100 %) normiert.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Allgemeine Haltebedingungen

Die Mäuse wurden im Maustierstall der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München gehalten. Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.3.2 Mäuse

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden bei Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben. Sie wurden als Spendertiere für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark und Milz verwendet. Für therapeutische Versuche wurden CEA424/SV40-TAg Mäuse verwendet (Thompson et al., 2000). Das Onkogen „SV40-TAg“ wird bei diesen transgenen Mäusen durch einem humanen CEA-Promoter reguliert und Magen-spezifisch exprimiert. Ab dem 40. Tag führt dieses Onkogen zu Zelldysplasien im Pylorusbereich, welche sich zu Adenokarzinomen der Magenschleimhaut entwickeln. Aufgrund der entstehenden Pylorusstenose sterben die Mäuse in der Regel zwischen Tag 90 und 110.

2.3.3 Untersuchung der Maus

Alle tumortragenden Mäuse wurden zwei bis dreimal wöchentlich nach Ihrem Befinden untersucht und zusätzlich von Tierpflegern überwacht. Bei Anzeichen einer tumorbedingten Verschlechterung des Allgemeinbefindens wurden die Mäuse getötet. Die Abbruchkriterien wurden laut der Belastungstabelle nach GV SOLAS, 1988 eingehalten. Dazu zählten Gewichtsabnahme über 20 %, struppiges, ungepflegtes Fell oder Bewegungsunfähigkeit.

2.3.4 Narkose

Zur Injektion von Tumorzellen oder direkt vor Tötung durch zervikale Dislokation wurden die Mäuse in einem geschlossenen Glasgefäß mit Isofluran narkotisiert.

2.3.5 Tumorinduktion

Subkutane mGC8-Tumore wurden wie beschrieben induziert (Nockel et al., 2006). Die Mäuse wurden zur Injektion der Tumorzellen in die rechte dorsale Flanke narkotisiert (siehe 2.3.4). 3×10^6 Tumorzellen wurden in einem Injektionsvolumen von 50 μ l verabreicht. Die Mäuse wurden ab einer Tumorgröße von 11 x 11 mm getötet.

2.3.6 Organentnahme

Zur Entnahme der Organe wurden alle Mäuse getötet und mit 70 % Isopropanol benetzt. Mittels Längsschnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet und die zu untersuchenden Organe freigelegt und entnommen.

2.3.7 Therapieversuch

CEA424/SV40-TAg Mäuse wurden in Therapie- und Kontrollgruppe eingeteilt ($n = 3$). Bei der Gruppeneinteilung wurde auf Geschlecht, Alter und Abstammung geachtet, um möglichst gleiche Kohorten zu erhalten. Unter Narkose wurde den Mäusen im Alter von 70 Tagen zweimal – im Abstand von 14 Tagen – 300 μ g Ratten mEpCAM-Ak oder PBS intraperitoneal injiziert. Ab dem 100. Lebenstag wurden die Mäuse täglich kontrolliert. Bei Anzeichen einer tumorbedingten Verschlechterung des Allgemeinzustandes (2.3.3) wurden die Tiere getötet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Aufreinigung des IgG2a Ratten EpCAM-Antikörpers aus der G8.8 Hybridomzelllinie

Der monospezifische G8.8 IgG2a Ratten Anti-Maus EpCAM-Antikörper (Ratte mEpCAM-Ak) wurde aus einer Hybridomzelllinie produziert und aufgereinigt. Dieser Antikörper wurde für Zytotoxizitätsassays und *In-vivo*-Versuche benötigt. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht und seine Konzentration durch einen Bradford-Test ermittelt. Eine FACS-Analyse konnte die Bindung des Antikörpers zeigen.

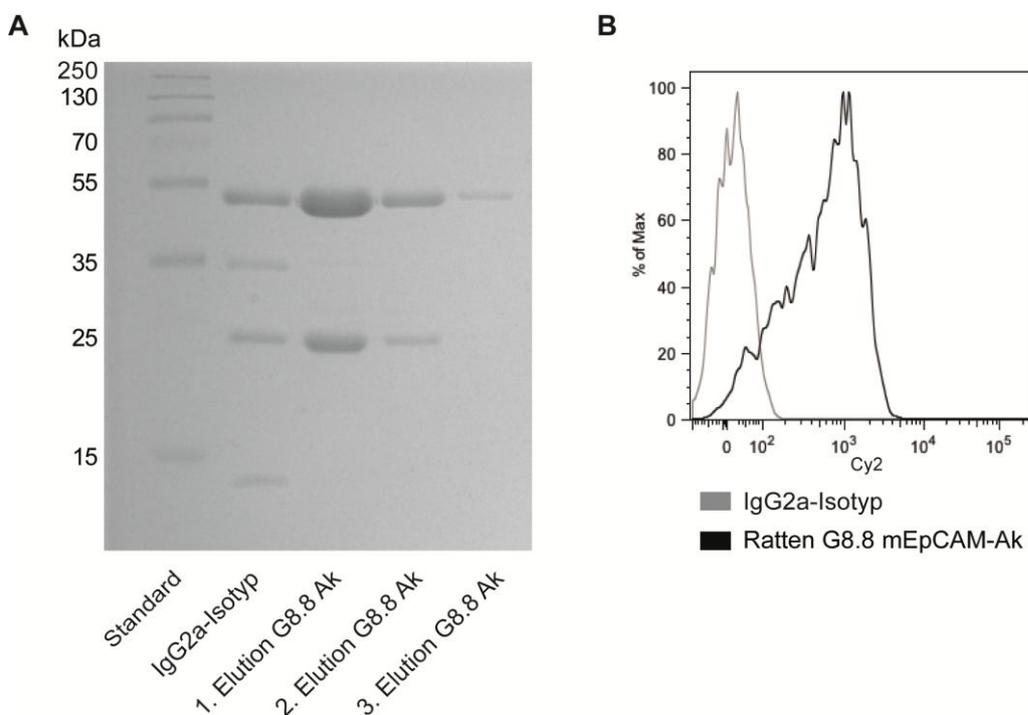


Abbildung 3: Untersuchung des aufgereinigten G8.8 Ratten mEpCAM-Ak. (A) Antikörpernachweis durch gelelektrophoretische Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie-Färbung. Als Kontrolle diente ein IgG2a Isotyp. **(B)** Durchflusszytometrische Untersuchung der EpCAM-spezifischen Bindung des G8.8 Ratten mEpCAM-Ak auf mGC8-Zellen. Antikörperdetektion mittels Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper.

Der aufgereinigte Antikörper wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Mit der anschließenden Coomassie-Färbung können leichte und schwere Kette, jeweils bei 50 kDa und 25 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3A). Der Bradford-Test zeigte abnehmende Konzentrationen der Elutionen eins bis drei. Dies ist auch an der Breite der Proteinbanden im Gel deutlich erkennbar. Eine Konzentrationsbestimmung mithilfe der Bradford-Methode zeigte für Elution eins eine Konzentration von 1,0 bis 2,5 mg/ml, je nach Charge. Im Mittel wurden pro Aufreinigung etwa 3 mg Antikörper gewonnen

(n = 4). Anschließend wurde die Spezifität des Antikörpers untersucht. Dazu wurde die Bindung des Antikörpers auf der murinen EpCAM-positiven mGC8-Zelllinie gezeigt (Abbildung 3B). Die Rechtsverschiebung der Ratten mEpCAM-Ak-beladenen Zellpopulation (schwarz) im Vergleich zu Zellen mit Isotyp-Kontrolle (grau) bestätigt die spezifische Antigen-Antikörperbindung auf mGC8-Zellen. 75 % der dargestellten mGC8-Population war EpCAM-positiv. Auf EpCAM-negativen Zellen fand keine Bindung statt.

3.2 Bindungsverhalten des ER-Ep BiAk *in vitro*

Die ermittelten Antigenbindungsaffinitäten geben Hinweise darauf, dass der ER-Ep BiAk sich in der Antigenbindung nicht von den parentalen monospezifischen Antikörpern unterscheidet (siehe Tabelle 1). Um diese Ergebnisse auch für die nativen, natürlich vorkommenden Antigene zu bestätigen, wurde sowohl die konzentrationsabhängige Antikörperbindung als auch das Bindungsverhalten über die Zeit auf EGFR- oder EpCAM-exprimierenden Zellen untersucht. Die Bindung an EpCAM wurde auf der mGC8-Zelllinie untersucht. Das Bindungsverhalten des EGFR-bindenden Arms wurde auf der Pankreaskarzinomzelllinie IMIM-PC-1 analysiert.

3.2.1 Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung

3.2.1.1 Konzentrationsabhängige Bindung an murines EpCAM

Die FACS-Analyse auf mGC8-Zellen zeigt, dass der ER-Ep BiAk das natürlich vorkommende EpCAM erkennt. Die konzentrationsabhängige Bindungskurve überlappt mit denen der monospezifischen Ratten und Maus mEpCAM-Ak. Die EpCAM-Bindung durch den BiAk war maximal ab einer Konzentration von 1 µg/ml. Dabei hatten 80 % der Tumorzellen den Antikörper gebunden (Abbildung 4A). Die getesteten Antikörper unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Bindung auf die EpCAM-positive mGC8-Zelllinie. Unter einer Konzentration von 1 µg/ml fällt das Fluoreszenzsignal bei allen drei Antikörpern stark ab. Dieser Sättigungsverlust zeigte sich mit dem BiAk etwas schneller. Auch hier waren keine relevanten Unterschiede zu verzeichnen. Bei Konzentrationen unter 0,01 µg/ml war keine Antikörper-Bindung nachweisbar. Als Negativkontrolle diente der Maus hEGFR-Ak.

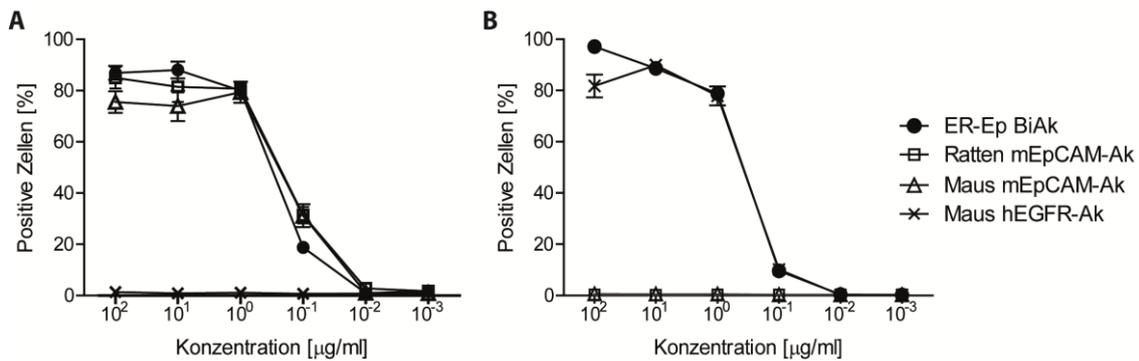


Abbildung 4: Konzentrationsabhängige Bindung des ER-Ep BiAk im Vergleich mit den parentalen monospezifischen Antikörpern *in vitro*. 5×10^5 Tumorzellen wurden mit Antikörperkonzentrationen zwischen 100 und 0,001 µg/ml inkubiert. Die Antikörperbindung wurde über einen Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. **(A)** Bindung der Antikörper auf der EpCAM-positiven murinen Tumorzelllinie mGC8. **(B)** Bindung der Antikörper auf der EGFR-positiven humanen Tumorzelllinie IMIM-PC-1. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.2.1.2 Konzentrationsabhängige Bindung an humanes EGFR

Der ER-Ep BiAk zeigt auf IMIM-PC-1 Zellen eine spezifische Bindung an humanes EGFR. Im Vergleich zu dem monospezifischen hEGFR-Ak zeigte das bispezifische Konstrukt ein identisches Bindungsverhalten (Abbildung 4B). Der BiAk bindet somit auch das natürlich vorkommende EGFR und bestätigt somit die Resultate der Plasmonenresonanzspektroskopie. Beide Antikörper bilden ab einer Konzentration von 1 µg/ml ein Bindungsplateau mit 80 % positiv gefärbter Zellen. Ähnlich wie bei den EpCAM-Antikörpern fällt bei Konzentrationen unter 1 µg/ml die Fluoreszenz stark ab und zeigt bei 0,01 µg/ml kein Signal mehr. Die mEpCAM-Antikörper dienten hier als Kontrolle.

Die Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung zeigt, dass eine Konzentration von 10 µg/ml des ER-Ep BiAk für EpCAM und EGFR sättigend ist und wurde daher für nachfolgende Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzt.

3.2.2 *In-vitro*-Kinetik des ER-Ep BiAk

3.2.2.1 Antikörperkinetik auf EpCAM- und EGFR-positiven Zellen

Um *in vitro* antitumorale Effekte studieren zu können, ist es wichtig, dass der Antikörper nicht zu schnell von der Tumorzelle aufgenommen wird oder abdiffundiert (Scott et al., 2012). Zudem können bei längeren Inkubationszeiten unspezifische

Antikörperbindungen auftreten (Clynes et al., 2000). In einer sechsständigen Kinetik konnte mittels FACS-Analyse beobachtet werden, dass der ER-Ep BiAk *in vitro* nicht signifikant von den Tumorzellen abdiffundiert oder internalisiert wird (Abbildung 5). Vergleicht man diesen Endpunkt sowohl für die EpCAM- als auch für die EGFR-Bindung zwischen dem ER-Ep BiAk und den monospezifischen Antikörpern finden sich keine Unterschiede. Die EpCAM-Antikörperbindung auf den mGC8-Zellen lag während des sechsständigen Versuches auf einem konstanten Niveau und schwankte nicht signifikant zwischen 60 bis 80 % positiven Zellen (Abbildung 5A). Bis Stunde sechs bleibt die Antikörperbindung – mit geringfügigen Schwankungen – bei 75 %.

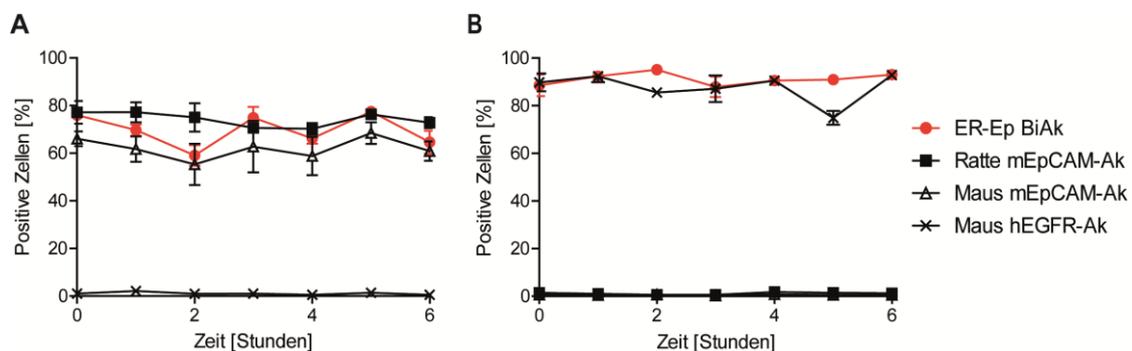


Abbildung 5: Bindungskinetik des ER-Ep BiAk *in vitro* über 6 Stunden. 5×10^5 Tumorzellen wurde mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper inkubiert **(A)** EpCAM Bindung des ER-Ep BiAk und den parental Ratten und Maus mEPCAM-Ak auf mGC8-Zellen. **(B)** EGFR-Bindung des ER-Ep BiAk sowie des monospezifischen Maus hEGFR-Ak auf IMIM-PC-1 Zellen. Alle Konditionen wurden in Triplets durchgeführt und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Auch während der Untersuchung der EGFR-Bindungskinetik auf der humanen Pankreaskarzinomzelllinie IMIM-PC-1 zeigte der ER-Ep BiAk keine Abdiffusion über den untersuchten Zeitraum von sechs Stunden (Abbildung 5B). Die Bindung lag bei allen Antikörpern bei einem konstanten Wert von 90 % positiver Zellen.

3.3 Untersuchung der konventionellen Effektoreigenschaften des ER-Ep bispezifischen Antikörpers

Die Wirkung monospezifischer Antikörper beruht unter anderem auf der Aktivierung von konventionellen Effektormechanismen wie CDC und ADCC. Diese Zytotoxizitätsmechanismen werden über den Fc-Teil eines Antikörpers vermittelt (Ravetch und Clynes, 1998). In welchem Umfang der ER-Ep BiAk in der Lage ist, diese antitumoralen Mechanismen zu mobilisieren wurde in den folgenden Versuchen untersucht. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass der monospezifische Ratten mEpCAM-Ak an Effektorzellen über seinen Fc-Teil bindet.

Das Wissen über CDC und ADCC Aktivität kann helfen die antitumoralen Effekte späterer *In-vivo*-Versuche besser vorherzusehen. Alle Versuche wurden an mGC8-Tumorzellen mit ER-Ep BiAk und den monospezifischen mEpCAM-Ak durchgeführt. Als Effektorzellen dienten IL-2 und GM-CSF stimulierte Zellen aus der Milz.

3.3.1 Komplementvermittelte Zytotoxizität auf mGC8-Zellen

Zur Untersuchung der CDC wurde der ER-Ep BiAk auf mGC8-Zellen mit humanem Serum inkubiert. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der BiAk in der Lage ist das Komplementsystem zu aktivieren und eine Zytolyse hervorzurufen (Abbildung 6A). Konzentrationen von 0,1 μg bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurden untersucht. Mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnte die maximale Lyse von 15 % der Zellen erreicht werden. Mit den monospezifischen G8.8 mEpCAM-Ak konnte im Vergleich zum BiAk eine höhere Zytotoxizität von bis zu 30 % erzielt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit des BiAk CDC zu vermitteln ähnlich die der monospezifischen Maus und Ratten mEpCAM-Ak ist, wenn auch numerisch geringer. Die Negativkontrolle mit monospezifischem hEGFR-Ak zeigt keine Zytolyse.

Um den Zusammenhang der gezeigten Zytolyse vom klassischen Komplementweg zu zeigen, wurde das Serum mit EDTA vorbehandelt. Ca^{2+} wird dadurch gebunden und steht zur Aktivierung der Komplementkaskade nicht mehr zur Verfügung. Bei keinem der getesteten Antikörper konnte dabei eine Lyse beobachtet werden (Abbildung 6B).

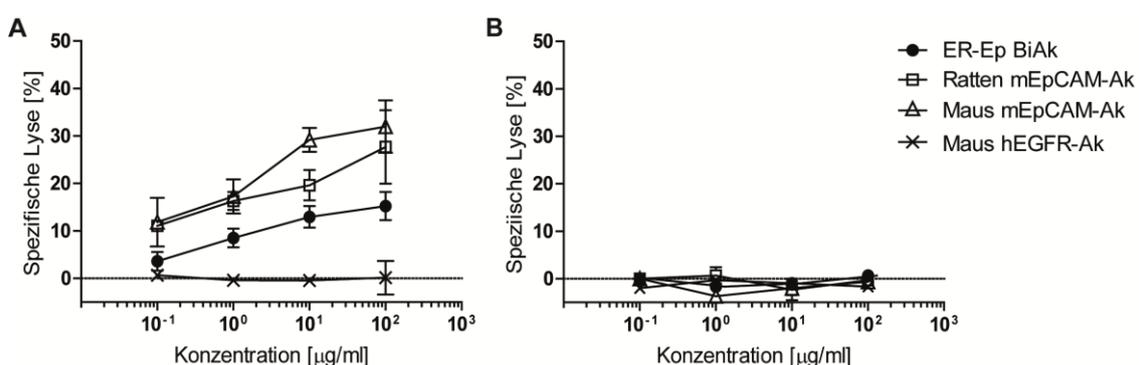


Abbildung 6: CDC des ER-Ep BiAk. (A) Spezifische Lyse der mGC8-Zellen durch ER-Ep BiAk im Vergleich zu den monospezifischen EpCAM-Antikörpern. (B) Untersuchung der CDC mit EDTA inaktiviertem Komplement. Die Versuche wurden mit humanem Serum (20 %) durchgeführt. Die spezifische Lyse wurde mittels Calcein-Release ermittelt. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt (n = 3).

3.3.2 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität auf mGC8-Zellen

Die ADCC wird als wichtige Effektorfunktion monospezifischer Antikörper gesehen (Clynes et al., 2000). Ob der tetravalente ER-Ep BiAk neben CDC auch die ADCC aktiviert wurde ebenfalls auf Calcein-markierten mGC8-Zellen untersucht. Dazu wurden Effektorzellen aus der Milz stimuliert, in verschiedenen E:Z Ratios zu mGC8-Zellen gegeben und mit Antikörper über Nacht inkubiert. Der ER-Ep BiAk konnte dabei in allen Ansätzen keine eindeutige zellvermittelte Zytolyseaktivität zeigen und war den Negativkontrollen ohne Antikörper oder hEGFR-Ak nicht überlegen (Abbildung 7A). Mit höchstem E:Z Ratio zeigte der ER-Ep BiAk eine spezifische Lyse von 35 %, die jedoch auch in der Negativkontrolle mit Milzeffektorzellen allein erzielt wurde.

Beide monospezifischen G8.8 mEpCAM-Ak, sowohl Ratte als auch Maus induzierten über ihren IgG2a Fc-Teil eine ADCC von 70 bis 80 % (Abbildung 7B). Bereits mit einer E:Z Ratio von 80:1 wurde die maximale Lyseaktivität erreicht. Antitumorale Effekte konnten bei beiden monospezifischen Antikörpern bereits mit einer E:Z Ratio von unter 20:1 beobachtet werden.

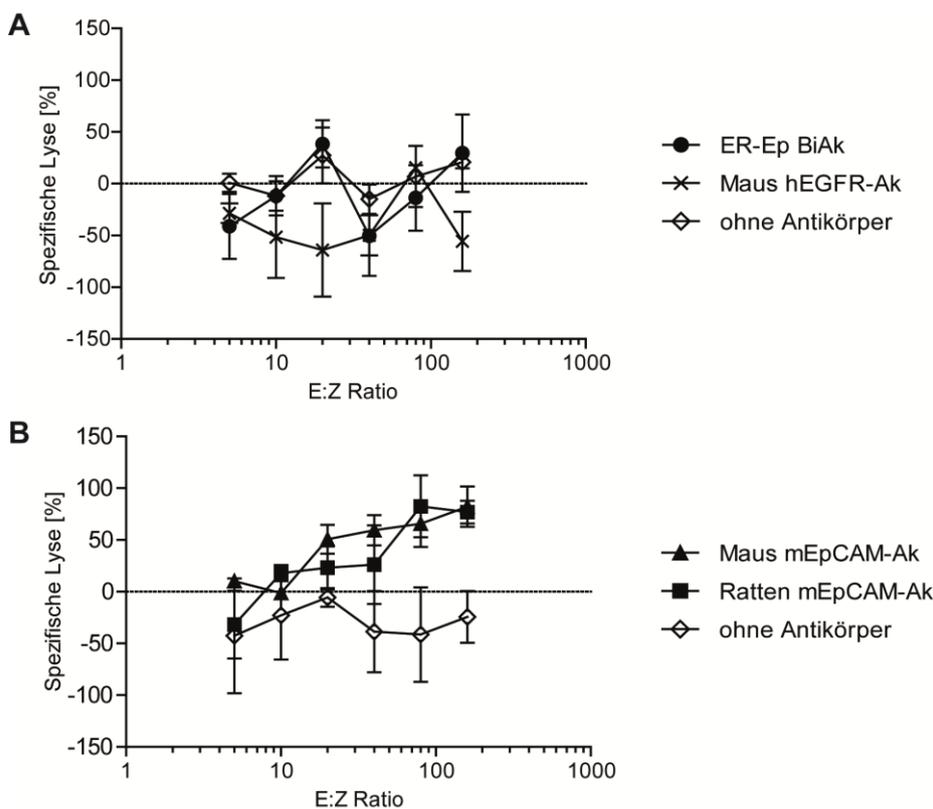


Abbildung 7: ADCC der EpCAM-Antikörper. Als Effektorzellen dienten stimulierte Splenozyten, 10 µg/ml Antikörper wurden eingesetzt. Die E:Z Ratio bewegte sich zwischen 5 und 180. **(A)** Zytotoxizität des ER-Ep BiAk im Vergleich zur Negativkontrolle mit monospezifischem Maus hEGFR-Ak. **(B)** ADCC der monoklonalen G8.8 Ratten und Maus mEPCAM-Ak. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt (n = 3).

Zusammengefasst ist der tetravalente ER-Ep BiAk nicht oder nur schwach in der Lage Fc-Rezeptor vermittelte Effektormechanismen wie ADCC und CDC zu induzieren. Besonders der Vergleich zu den parentalen chimären IgG2a mEpCAM-Ak zeigte, dass deren Effektormechanismen *in vitro* ausgeprägter sind.

3.3.3 Bindung des Antikörpers über den Fc-Teil an Makrophagen

Mithilfe eines Papain-Antikörperverdau konnte gezeigt werden, dass der EpCAM-Antikörper an Effektorzellen über seine Fc-Domäne bindet. Dafür wurde der Maus mEpCAM-Ak mit dem Enzym Papain in zwei univalente Fab-Fragmente sowie ein Fc-Fragment gespalten und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie auf der Makrophagenzelllinie J774 getestet. Durch Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung konnte der Verdau bestätigt werden (Abbildung 8A). Der reduzierte Maus mEpCAM-Ak zeigt unverdaut bei 50 kDa die schwere und bei 25 kDa die leichte Kette. Im Laufe der Fragmentierung verschwindet die schwere Kette und wird bei 27 kDa zum verdauten Fc-Fragment. Nach einer Reaktionszeit von 90 min war der Antikörper vollständig verdaut.

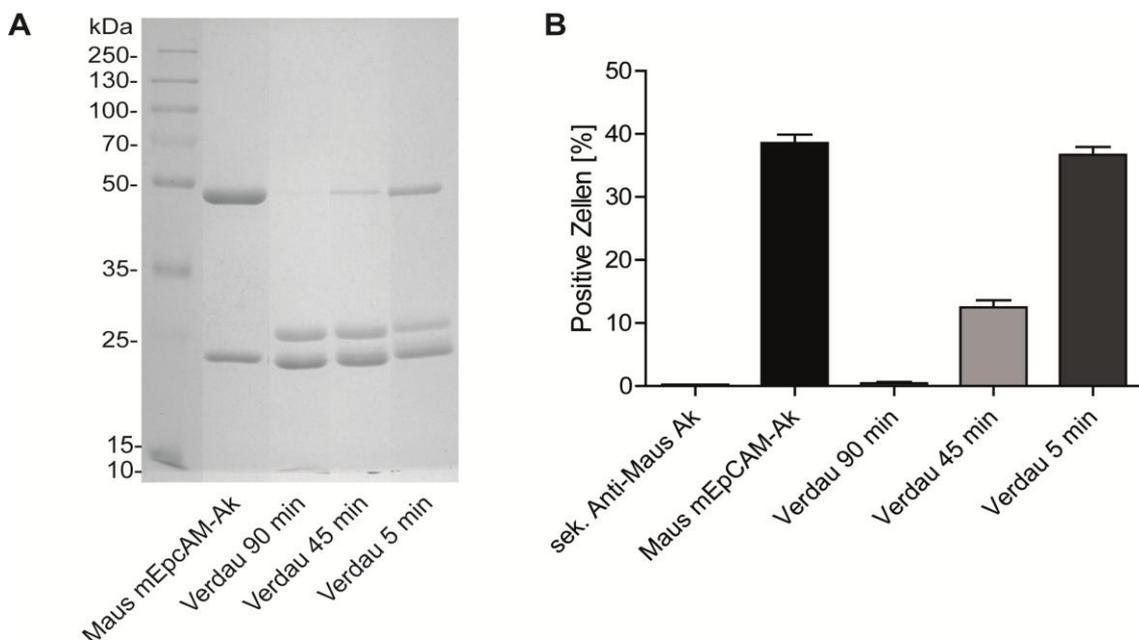


Abbildung 8: Untersuchung der Fc-Teil-spezifischen Bindung des Maus mEpCAM-Ak auf der Makrophagenzelllinie J774. (A) Antikörperverdau mit Papain (1:1000) und anschließende Auftrennung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel. Das Bild zeigt die Antikörperfragmente in ihrer reduzierten Form nach Coomassie-Blau Färbung. **(B)** Quantitative Auswertung Cy2-positiv gefärbter J774-Zellen mit zunehmender Abspaltung des Fab-Teils. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n = 3).

Anschließend wurde durch FACS-Analyse die Bindung des Maus mEpCAM-Ak und seiner verdauten Fragmente auf der Makrophagenzelllinie J774 getestet. Der zur Detektion verwendete Sekundärantikörper bindet spezifisch Fab-Fragmente eines murinen Antikörpers. Dadurch können nur Antikörperbindungen, die Fab-Moleküle enthalten, erkannt werden. Der unverdaute Maus mEpCAM-Ak bindet an 40 % der J774-Zellen. Mit zunehmendem Verdau reduzierte sich der Anteil positiver Zellen (Abbildung 8B). Da das Signal des Sekundärantikörpers von der Anwesenheit von Fab-Molekülen abhängt, kann aus der Signalabnahme geschlossen werden, dass die Bindung auf J774 Zellen Fc-Rezeptor vermittelt ist. Die im Laufe des Verdaus abgespalteten Fab-Fragmente binden nicht an die Effektorzellen, da diese Antigen-negativ sind. Gleichzeitig können die gebundenen Fc-Fragmente über den Sekundärantikörper nicht mehr erkannt werden. Daraus lässt sich schließen, dass der Maus mEpCAM-Ak *in vitro* mit den Effektorzellen J774 über den Fc-Rezeptor eine Bindung ausbildet.

3.4 Rekrutierung von EGFR-transduzierten T-Zellen an EpCAM-positive Tumorzellen durch den ER-Ep bispezifischen Antikörper

Um eine Kombinationstherapie aus ER-Ep BiAk und EGFR-transduzierten T-Zellen *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen, muss zuvor die Fähigkeit des Antikörpers beide Antigene gleichzeitig zu binden nachgewiesen werden. Denn erst die Vernetzung ermöglicht eine spezifische Aktivierung der T-Zellen auf dem Tumor.

Für diese Fragestellung wurde die nicht-adhärenente T-Zelllinie B3Z-EGFR mit Calcein markiert. ER-Ep BiAk wurde zusammen mit den markierten T-Zellen auf adhärenenten EpCAM-positiven 4T1-Zellen inkubiert. Untersucht wurde die durch den BiAk vermittelte Zell-Retention an die Tumorzellen.

In dieser Kokultur konnte gezeigt werden, dass der ER-Ep BiAk in der Lage ist EGFR-positive T-Zellen an den Tumor zu rekrutieren. 90 % der T-Zellen konnten durch den BiAk an den Tumorzellen gebunden werden (Abbildung 9A). Nur 40 % der gesamten inkubierten T-Zellen blieben ohne Antikörper im Well zurück. Auch die monospezifischen Antikörper waren aufgrund des fehlenden zweiten Bindungsarms nicht in der Lage eine Vernetzung zwischen T-Zellen und Tumorzelle auszubilden (Abbildung 9A). Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Zellretention der markierten T-Zellen visualisiert und die Menge an retiniertem Calcein mittels Multilabel Reader quantifiziert und zur gesamteingesetzten Menge normiert. Die bispezifische

Vernetzung der Zellen zeigt sich durch die Fluoreszenz zurückgehaltener T-Zellen (Abbildung 9B).

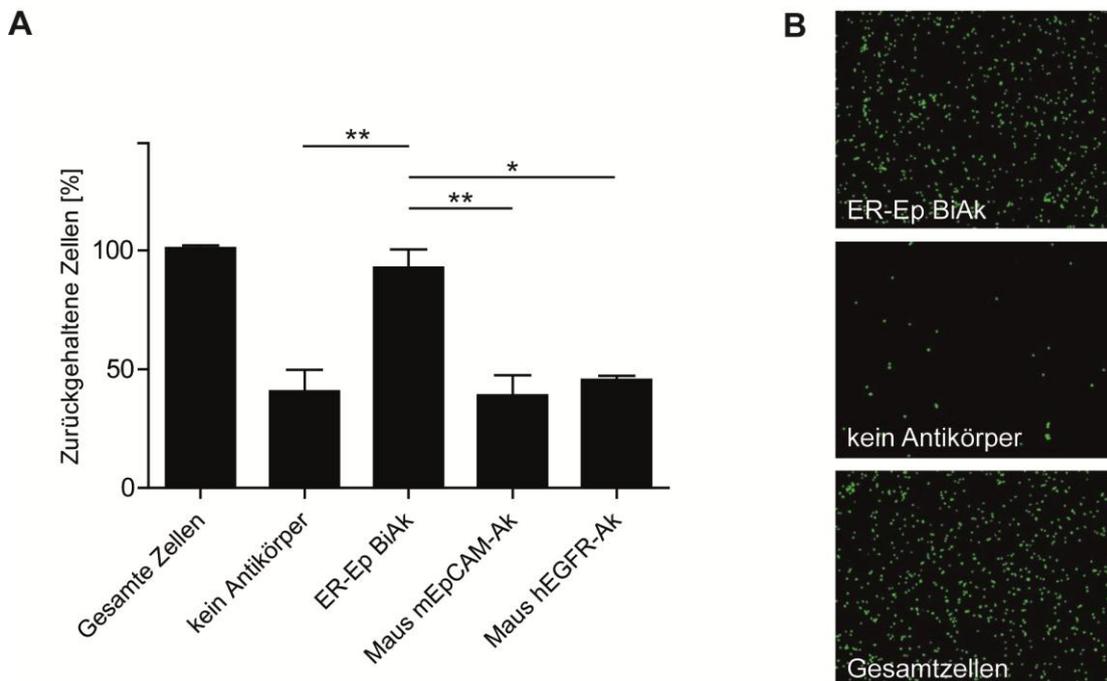


Abbildung 9: Darstellung der bispezifischen Bindung hEGFR x mEpCAM BiAk. (A) Vernetzung und Retention Calcein-markierter B3Z-EGFR T-Zellen auf adhärenen EpCAM-positiven 4T1-Zellen mittels BiAk oder monospezifischen Kontrollantikörpern. Der Anteil zurückgehaltener T-Zellen verhält sich proportional zur Fluoreszenz. Die Werte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM (n = 4), Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001). **(B)** Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung zurückgehaltener Calcein-markierter T-Zellen (grün) auf adhärenen 4T1-Tumorzellen +/- ER-Ep BiAk, verglichen mit den Gesamtzellen

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Voraussetzungen für eine spezifische Rekrutierung und Aktivierung von transduzierten T-Zellen zum Tumor mittels BiAk gegeben sind. Weitere Versuche müssen überprüfen, ob auch *in vivo* die transduzierten T-Zellen in einem soliden Tumor mittels BiAk angereichert und durch eine Vernetzung aktiviert werden können.

3.5 Immunhistologische Untersuchungen

3.5.1 *In-vivo*-Untersuchung der EpCAM-Expression in der Maus

Für eine zielgerichtete Krebsimmuntherapie ist die räumliche Zugänglichkeit des Antigens auf dem Tumor wichtig. Mittels Durchflusszytometrie konnte bereits gezeigt werden, dass 80 % der Zellen des untersuchten mGC8-Magenkarzinommodells *in vitro* EpCAM exprimieren. Nun war es wichtig nachzuweisen, dass die EpCAM-Expression auch *in vivo* erhalten bleibt. Hierzu wurden Schnitte von subkutanen mGC8-Tumoren

mit EpCAM-Antikörpern inkubiert und mittels Sekundärantikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Auch Organe wie Niere, Milz, Leber, Lunge, Dünndarm und Magen wurden auf ihre EpCAM-Expression analysiert (Abbildung 10). In den Schnitten des subkutanen Tumors konnte in etwa 40 % der Schnittfläche EpCAM nachgewiesen werden (Abbildung 10A). Ähnliche Ergebnisse konnten in den Organen des Gastrointestinaltraktes, mit Dünndarm 50 % und Magen 40 % gefunden werden. Auch die Niere wies mit 35 % eine hohe EpCAM-Expression auf. Leber, Milz und Lunge zeigten eine moderate EpCAM-Expressionen von 0 - 15 %. Bei der Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder kann man gewebstypische Unterschiede in Anordnung und Lage von EpCAM erkennen (Abbildung 10B).

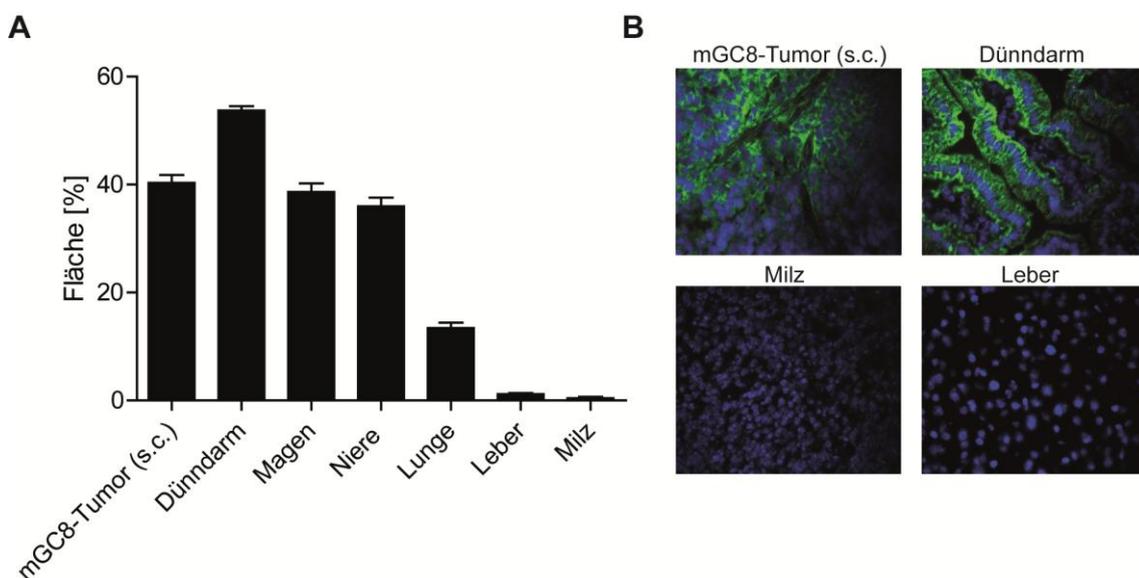


Abbildung 10: EpCAM-Expression in verschiedenen Organen der Maus. (A). Quantitative Darstellung; die Expression ergibt sich aus der fluoreszierenden Fläche bezogen auf die Gesamtfläche. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n = 5$). **(B)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Färbungen von EpCAM-positiven als auch EpCAM-negativen murinen Geweben. Die Aufnahmen wurden in 40-facher Vergrößerung erstellt (blau = DAPI; grün = EpCAM).

3.5.2 *In-vivo*-Verteilung und Anreicherung des Ratten mEpCAM-Ak in tumortragenden Mäusen

Ein mögliches Problem Antikörper-basierter Therapien ist der Zugang zum Tumor. Um zu überprüfen, ob EpCAM als Zielantigen einer Antikörper-gestützten Immuntherapie im mGC8-Tumormodell zugänglich ist, wurde die Verteilung des Ratten mEpCAM-Ak *in vivo* untersucht. Dazu wurde tumortragenden Mäusen Ratten mEpCAM-Ak intraperitoneal injiziert und die zu untersuchenden Gewebe 48 h später entnommen. Mittels fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper gegen Ratten IgG konnte die Verteilung des mEpCAM-Ak im Gewebe nachgewiesen werden.

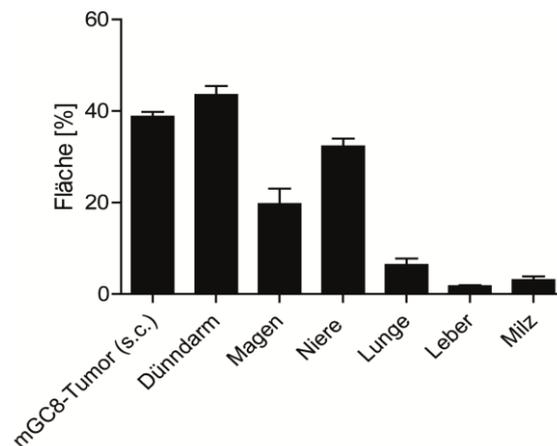


Abbildung 11: *In-vivo*-Anreicherung des monospezifischen Ratten mEpCAM-Ak nach intraperitonealer Injektion. Quantitative Darstellung in verschiedenen murinen Geweben; die Verteilung wurde berechnet aus der fluoreszierenden Fläche bezogen auf die Gesamtfläche. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt (n=5).

Die Aufnahmen zeigen, dass der Antikörper den mGC8-Tumor erreicht und proportional zur Expressionsrate an das Zielantigen bindet (Abbildung 11). Deutliche Antikörpersignale finden sich ebenfalls in den EpCAM-positiv getesteten Organen wie Dünndarm, Magen, Niere und Lunge (Abbildung 11 und 12). EpCAM-negative Gewebe wie Leber und Milz zeigen kein Antikörpersignal, was auf eine spezifische Anreicherung in EpCAM-positiven Geweben hinweist. Als Negativkontrolle wurde PBS intraperitoneal injiziert.

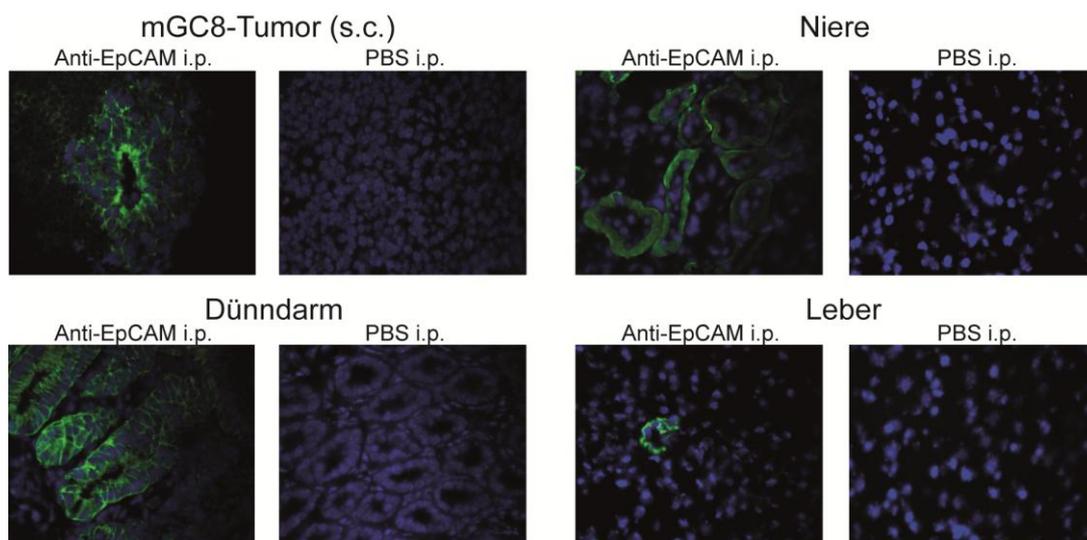


Abbildung 12: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach intraperitonealer Injektion von Ratten mEpCAM-Ak *in vivo*. Die Aufnahmen wurden in 40-facher Vergrößerung erstellt (blau = DAPI; grün = EpCAM). Als Kontrolle diente die intraperitoneale Injektion von PBS.

3.6 *In-vivo*-Wirkung des Ratten mEpCAM-Ak im autochthonen Magentumormodell der CEA424/SV40-TAg Maus

Bisher konnte gezeigt werden, dass die mEpCAM-Ak *in vitro* CDC und ADCC aktivieren. Um die Sensitivität des Magenkarzinommodells für eine EpCAM-gerichteten Therapie zu untersuchen, wurde ein Therapievorsuch mit dem Ratten G8.8 mEpCAM-Ak durchgeführt. Mäuse der Therapiegruppe (n = 3) erhielten im Abstand von 14 Tagen zwei Antikörper-Injektionen (jeweils 300 µg) intraperitoneal, während die Kontrolltiere mit PBS behandelt wurden. Das Kaplan-Maier-Diagramm deutet auf eine antitumorale Aktivität des Ratten G8.8 mEpCAM-Ak *in vivo* hin (Abbildung 13). Die Mäuse der Therapiegruppe leben länger und zeigen ein medianes Überleben von 129 Tagen, verglichen mit 118 Tagen in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant (p = 0,067), dennoch zeichnet sich aus dem Ergebnis des Therapievorsuchs ab, dass das Modell gegenüber einer EpCAM-gerichteten Therapie zugänglich sein kann.

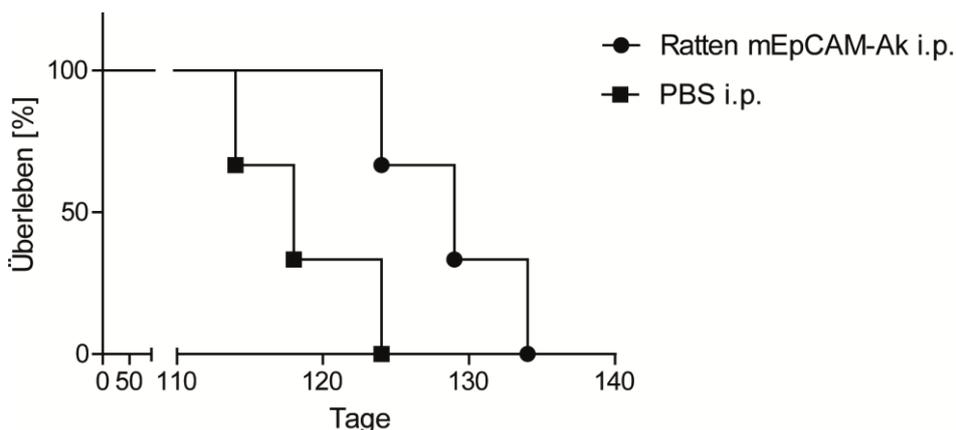


Abbildung 13: Behandlung der CEA424/SV40-TAg Mäuse mit dem monospezifischen G8.8 Ratten mEpCAM-Ak. Das Kaplan-Meier-Diagramm zeigt das Überleben nach zweimaliger intraperitonealer Gabe von 300µg Antikörper (an Tag 60 und 74). Der Überlebensvorteil ist statistisch nicht signifikant (Log-rank Test: p= 0,067, n = 3).

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ER-Ep BiAk in der Lage ist, seine beiden Zielantigene spezifisch zu binden. Die Bindungsanalyse zeigte im Vergleich zu den monospezifischen Antikörpern keinen Affinitätsverlust gegenüber den Zielantigenen. Die Untersuchung der konventionellen Antikörpermechanismen ergab eine geringe CDC, jedoch keine ADCC-Effekte durch den ER-Ep BiAk. Auch erhöhte E:Z Ratios erbrachten keine Verbesserung der Fc-vermittelten Lyseaktivität des BiAk. Die monospezifischen EpCAM-Antikörper zeigten hingegen eine signifikante Zytolyse *in vitro*. Zuvor wurde die Fc-abhängige Bindung der monospezifischen mEpCAM-Ak mit den Effektorzellen bestätigt, was eine Voraussetzung für die ADCC darstellt. *In vitro* vernetzt das bispezifische Antikörperkonstrukt die Markerantigen-transduzierten T-Zellen mit der EpCAM-exprimierenden Tumorzelle. Ein erster Therapieversuch mit dem Ratten mEpCAM-Ak in der CEA424/SV40-Tag Maus konnte Hinweise auf die antitumorale Wirkung eines EpCAM-Antikörpers im spontanen autochthonen Magenkarzinommodell aufzeigen.

Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnten zeigen, dass EpCAM im Magenkarzinommodell eine starke Expression aufweist. Gleichzeitig zeigte sich eine ubiquitäre EpCAM-Expression in der Maus. Zudem konnte gezeigt werden, dass EpCAM im subkutanen mGC8-Tumor für eine zielgerichtete Therapie zugänglich ist und der verwendete Antikörper in den Tumor penetrieren kann. Allerdings konnte auch im normalen EpCAM-exprimierenden Gewebe eine Anreicherung des Antikörpers gefunden werden.

4.2 *In-vitro*-Eigenschaften des ER-Ep bispezifischen Antikörpers

4.2.1 Bindungsspezifität und Affinität des ER-Ep bispezifischen Antikörpers

Bindungsspezifität und Affinität haben Einfluss auf Effektivität, Toxizität und Verteilung des Antikörpers im Organismus (Velders et al., 1995; Weiner und Thakur, 2001). Eine hohe Affinität zur Targetstruktur verstärkt die Effektorfunktion eines Antikörpers, erhöht jedoch gleichzeitig auch seine potenzielle Toxizität (Goel et al., 2007).

Der tetravalente ER-Ep BiAk zeigte in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den parentalen monospezifischen Antikörpern keine Bindungsverluste oder Nachteile in der

Antigenerkennung. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Affinitätsuntersuchungen unseres Kollaborationspartners. In der SPR-Spektroskopie wurde eine KD von $1,2 \times 10^{-8}$ M für den EpCAM- beziehungsweise $5,5 \times 10^{-9}$ M für den EGFR-bindenden Arm ermittelt. Dies beweist die hochaffine Bindung des BiAk an seine Zielantigene. Die Werte des ER-Ep BiAk weichen dabei nur geringfügig von den Affinitäten der monospezifischen Antikörper gegen EpCAM und EGFR ab (KD: mEpCAM-Ak: $6,1 \times 10^{-8}$ M; hEGFR-Ak: $4,3 \times 10^{-9}$ M).

Vergleicht man nun die Bindungsaffinität des BiAk mit den EpCAM-bindenden BiAk Catumaxomab (KD: $5,6 \times 10^{-10}$ M) und Solitomab (KD: $1,6 \times 10^{-10}$ M) so zeigt sich, dass diese Konstrukte stärkere Affinitäten zu EpCAM aufweisen. Allerdings ist bekannt, dass höhere Affinitäten nicht immer ein verbessertes Wirkungsprofil des Antikörpers mit sich bringen. Im Gegenteil führten hochaffine monospezifische EpCAM-Antikörper mit einer KD im Bereich von 10^{-10} M zu stärksten Toxizitäten, wie beispielsweise einer Pankreatitis (Goel et al., 2007). Zudem wurde gezeigt, dass hochaffine Antikörper schlechter in der Lage sind den Tumor zu penetrieren. Affinitäten im Bereich von 10^{-7} - 10^{-8} M, wie sie unsere EpCAM-Antikörper aufzeigen, erzielten in einer Untersuchung mit scFv-Molekülen die beste Tumorerinfiltration (Adams et al., 2001). Zusammengefasst sind dies gute Voraussetzungen für das Bindungsverhalten des ER-Ep BiAk gegenüber seinem Target *in vivo*.

4.2.2 Antikörperabbau durch Internalisierung

Die Bindung eines Antikörpers an sein Zielantigen kann zur Aufnahme durch Endozytose und zum anschließenden Abbau des Moleküls durch die Zielzelle führen (Kyriakos et al., 1992; Lammerts van Bueren et al., 2006). In einigen Fällen wird dieser Abbauprozess therapeutisch genutzt, so zum Beispiel bei Toxin-gebundenen monospezifischen Antikörpern (Damle, 2004). Im untersuchten Therapiekonzept wird die Antikörperfunktion jedoch durch Interaktion mit Oberflächenantigenen vermittelt, weshalb zur maximalen Wirkungsentfaltung keine Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes durch die Zielzelle erwünscht ist.

Die Internalisierung hängt von der Funktion des bindenden Zielrezeptors, sowie von der Beschaffenheit der Zielzelle ab (Carriere et al., 1989). Besonders für EGFR-Antikörper konnte nach Antigenbindung eine Aufnahme in die Tumorzelle gezeigt werden (Sunada et al., 1986; Perera et al., 2007). Um Wirkungsverluste durch Aufnahme des ER-Ep BiAk in unserem System zu erfassen, wurde die Antigenbindung

auf EpCAM- beziehungsweise EGFR-positiven Zellen untersucht. Dabei wurde keine signifikante Antikörperaufnahme durch unsere Zielzellen beobachtet.

Die im Vergleich zur Literatur ausbleibende Internalisierung des hEGFR-Ak sowie des ER-Ep BiAk kann unterschiedliche Ursachen haben. Wheeler et al. beobachteten, dass Zellen, welche resistent gegenüber der Wirkung von EGFR-Antikörper waren, eine verminderte Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes aufzeigten (Wheeler et al., 2008). Bisher ist nicht bekannt, ob auch die untersuchte Pankreaskarzinomzelllinie IMIM-PC-1 über derartige Resistenzmechanismen verfügt. Auch die EGFR-Antigenbindungsstelle könnte die Internalisierung des hEGFR-Ak beeinflussen. In der Literatur ist beschrieben, dass verschiedene EGFR-Antikörper unterschiedlich stark in die Zielzellen aufgenommen wurden (Perera et al., 2007).

Eine Übertragung der bisherigen Erkenntnisse auf die angestrebte Anwendung des ER-Ep-BiAk ist jedoch nur bedingt möglich. Um eine verlässliche Aussage treffen zu können, sollte daher die Internalisierung des BiAk auch auf EGFR-transduzierten T-Zellen überprüft werden. Anders als für EGFR, ist für EpCAM keine Aufnahme des Antigen-Antikörper-Komplexes beschrieben und entsprechend unserer Beobachtungen für mGC8-Zellen auch nicht zu erwarten.

4.3 Die Rolle des Fc-Teils in T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörperformaten

Neue BiAk zur Tumorthherapie zeigen aufgrund großer Fortschritte in der Entwicklung und Herstellung rekombinanter Moleküle eine enorme Vielfalt auf. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften kann die Wahl des Formats für eine Krebsimmuntherapie von großer Bedeutung sein (Kontermann, 2012).

Der hier untersuchte tetravalente ER-Ep BiAk entstand durch die genetische Fusion einer zweiten Bindungsspezifität an einen monoklonalen Antikörper (Coloma und Morrison, 1997; Orcutt et al., 2010). In diesem Fall handelt es sich um einen Maus IgG2a Antikörper, welcher gegen humanes EGFR gerichtet ist. An den Fc-Terminus dieses Antikörpers wurden zusätzlich zwei scFv-Bindungseinheiten gegen murines EpCAM gekoppelt. Das Konstrukt gehört damit zur Gruppe der Fc-Teil-tragenden BiAk-Formate. Klassische BiAk wie die Quadroma Antikörper sind ebenfalls Vertreter dieser Gruppe. Sie entstehen jedoch aus der Hybrid-Hybridoma Technologie und bilden

asymmetrische monovalente BiAk (Milstein und Cuello, 1983). Zu ihnen zählt beispielsweise Catumaxomab (Seimetz et al., 2010).

Eine Fc-Domäne wie in unserem ER-Ep BiAk kann aus zwei Gründen für eine Krebsimmuntherapie interessant sein. Es konnte gezeigt werden, dass der Fc-Teil auf die Serumhalbwertszeit von Antikörpern einen entscheidenden Einfluss besitzt. Die Interaktion des Fc-Teils mit neonatalen Fc-Rezeptoren (FcRn) schützt das IgG-Molekül vor dem lysosomalen Abbau (Junghans, 1997). Dadurch besitzen IgG-Moleküle im Vergleich zu Konstrukten ohne Fc-Teil deutlich längere Halbwertszeiten im Serum mit konstanten Serumspiegeln und erhöhte Retentionsraten im Tumor (Spiegelberg und Fishkin, 1972; Vieira und Rajewsky, 1988). Eigenschaften, welche zu einer anhaltenden antitumoralen Wirkung beitragen können.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein Fc-Teil durch die Vermittlung von CDC und ADCC die Effektorfunktion eines T-Zell-rekrutierenden BiAk verstärken kann. Clynes et al. konnten zeigen, dass FcγR-vermittelte Mechanismen in der Antikörpertherapie eine wichtige Rolle spielen (Clynes 2000). Durch die zusätzliche Rekrutierung von NK-Zellen, Makrophagen und DZ kann die antitumorale Wirkung von T-Zellen unterstützt und eine langanhaltende systemische Immunantwort generiert werden. Zudem werden über die Fc-Domäne kostimulatorische Signale vermittelt, welche von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen sind (Linsley und Ledbetter, 1993; Daniel et al., 1998).

Jedoch zeigen große Fc-Teil-beinhalten BiAk auch Nachteile gegenüber kleineren Formaten, wie tandem scFv und Diabodies (Holliger und Hudson, 2005). Diese Antikörperkonstrukte verzichten auf die Fc-Domäne und bestehen nur noch aus der Verknüpfung kleinster Antigen-bindender Fragmente (Saerens et al., 2008). Durch die kompakte Antikörperstruktur (50-60 kDa) können die Zielstrukturen in eine enge räumliche Verbindung gebracht werden und auf diese Weise eine hohe antitumorale Aktivität vermitteln (Wolf et al., 2005). Zur Gruppe der tandem scFv gehören auch die CD3-spezifischen T-Zell-rekrutierenden BiTE-Antikörper (Mack et al., 1995).

Diese Antikörper zeigen aufgrund ihrer geringen molekularen Größe und Masse eine bessere Penetrationsfähigkeit in den Tumor. Der Fc-Teil eines Antikörpers fördert zwar eine lange Serumhalbwertszeit, besitzt jedoch einen negativen Einfluss auf die Einwanderung in das Tumorgewebe (Pluen et al., 2001).

Eine weitere therapielimitierende Eigenschaft von CD3-bindenden BiAk mit intaktem Fc-Teil wird im hohen toxischen Potenzial gesehen. Es wird vermutet, dass der Fc-Teil eine Vernetzung zwischen FcγR-positiver APZ und T-Zelle auch unabhängig von der Bindung an die Tumorzelle vermittelt. Dadurch kann es – auch abseits des Tumors – zu einer starken T-Zell-Aktivierung kommen (Eissler et al., 2013). Hohe Zytokinausschüttungen sind die Folge und können schwere Nebenwirkungen verursachen. Ein sogenannter Zytokinsturm führt häufig zum Auftreten grippeähnlicher Symptome mit heftigem Schüttelfrost und Fieber (Jeyarajah und Thistlethwaite, 1993; Suntharalingam et al., 2006). Zur Prävention unerwünschter Wirkungen wird die Therapie mit einer sehr geringen Antikörperdosierung begonnen und im Therapieverlauf sukzessiv gesteigert (Kiewe et al., 2006; Heiss et al., 2010). Eine weitere Maßnahme stellt die Begleitmedikation mit Glucocorticoiden oder Antihistaminika dar (Sebastian et al., 2007). Ein solcher Zytokinsturm wurde bisher bei aktivierenden über CD3-bindenden BiAk beobachtet. Da der ER-Ep BiAk jedoch T-Zellen über das inaktive EGFR rekrutiert, wird in unserem Therapieansatz keine ausgeprägte unspezifische T-Zell-Aktivierung erwartet.

Die Möglichkeit durch eine Fc-Domäne zusätzliche antitumorale Effekte zu mobilisieren, führte zu der Entscheidung den ER-Ep BiAk für das vorgestellte Therapiekonzept zu verwenden. Untersuchte Effektorfunktionen, sowie das Penetrationsvermögens des Antikörpers ins Tumorgewebe werden im Folgenden diskutiert.

4.3.1 Beurteilung der konventionellen Effektormechanismen des ER-Ep bispezifischen Antikörpers

4.3.1.1 Beurteilung der komplementvermittelten Zytotoxizität

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die CDC bei vielen therapeutischen Antikörpern einen Beitrag zur antitumoralen Wirkung leistet (Flieger et al., 2000; Zent et al., 2008). Vor allem in der Wirkweise des gegen CD20-gerichteten Antikörpers Rituximab besitzt die CDC eine wichtige Funktion. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass Rituximab in Lymphom-tragenden Mäusen nach Depletion der Komplementfaktoren mittels *cobra venom factor* keine therapeutischen Effekte mehr vermittelte (Golay et al., 2006). Auch für einige EpCAM-Antikörper wurde bereits die Fähigkeit zur CDC *in vitro* nachgewiesen (Naundorf et al., 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten monospezifischen EpCAM-Antikörper waren in der Lage mit Konzentrationen von über 0,1 µg/ml Tumorzellen mittels Komplementaktivierung zu lysieren. Dabei konnten 30 % der mGC8-Zellen lysiert werden. *In-vitro*-Studien anderer EpCAM-Antikörper ermittelten vergleichbare CDC-Effekte. Auf einer humanen Magenkarzinomzelllinie wurde der gegen das humane EpCAM-gerichtete murine IgG2a Antikörper Edrecolomab und der rekombinante humane IgG1 EpCAM-Antikörper Adecatumumab (MT201) mit zwei weiteren EpCAM-Antikörpern untersucht. Alle vier Antikörper zeigten dabei CDC-Effekte von 30 bis 50 % Tumorzellyse mit einer Konzentration von 20 µg/ml (Munz et al., 2010). Aufgrund der unterschiedlichen Targetzellen ist ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur jedoch nur bedingt möglich. Das Ausmaß der Antigenexpression sowie das Vorkommen von membrangebundenen Komplement-regulierenden Proteinen auf Tumorzellen können die CDC beeinflussen (Prang et al., 2005). In diesem Zusammenhang zeigten Untersuchungen mit MT201, dass die CDC eines Antikörpers auf unterschiedlichen Tumorzellen stark variieren kann (Naundorf et al., 2002).

Verglichen mit den parentalen monospezifischen EpCAM-Antikörpern ist die Fähigkeit des tetravalenten ER-Ep BiAk zur Tumorzellyse geringfügig eingeschränkt. Grund dafür könnte eine erschwerte Bindung und Aktivierung von Komplementfaktoren an das sterisch anspruchsvolle tetravalente Konstrukt sein. Denn erst durch eine Dimerisierung des IgG-Moleküls auf der Tumorzelle kann es zur Anlagerung des C1q-Proteins kommen. Diese ist für eine effiziente Komplementaktivierung essenziell (Gelderman et al., 2004). Desweiteren konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass sich IgG-Antikörper am Antigen sogar zu Hexameren formieren, um eine C1-Aktivierung zu induzieren (Diebolder et al., 2014). Es ist daher denkbar, dass der tetravalente Antikörper dazu nur begrenzt in der Lage ist, was die geringere Fähigkeit zur CDC begründen würde.

Welche Rolle die CDC wirklich in der Antikörpertherapie von extravaskulären interstitiellen Tumoren *in vivo* spielt, ist noch unklar. Zum einen werden Tumorzellen unter physiologischen Bedingungen durch die oben bereits genannten membrangebundenen Komplement-regulierenden Proteinen geschützt, zum anderen ist die Aktivität der Komplementfaktoren außerhalb des Gefäßsystems weitestgehend unbekannt (Fishelson et al., 2003). Andere Arbeiten konnten zudem zeigen, dass Komplement und FcγR-positive Zellen um die Fc-Bindung konkurrieren und sich so gegenseitig beeinträchtigen (Wang et al., 2009). Daher wird der Einfluss von CDC auf die antitumorale Wirkung von Antikörpern nach wie vor kontrovers diskutiert.

4.3.1.2 Beurteilung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität

Verschiedene Studien konnten im Mausmodell die bedeutende Rolle der Fc γ R-vermittelten ADCC-Effekte auf die antitumorale Wirkung therapeutischer Antikörper zeigen. So konnte beispielsweise in Mäusen, welche funktionsunfähige Fc γ R exprimieren, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine wirkungsvolle Antikörper-induzierte Tumorantwort nachgewiesen werden (de Haij et al., 2010; Hubert et al., 2011).

Auch Fc-Teil-beinhaltende BiAk können diese zytolytischen Mechanismen zusätzlich aktivieren. Sie sind in der Lage, neben T-Zellen auch akzessorische Zellen, wie Makrophagen, NK-Zellen und DZ zu rekrutieren (Zeidler et al., 2000). Für verschiedene BiAk wurden diese Effekte bereits nachgewiesen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Catumaxomab über seinen chimären Fc-Teil selektiv an aktivierende Fc γ R auf humanen Immuneffektorzellen bindet (Chelius et al., 2010) und mit einer Konzentration von über 10 μ g/ml eine starke antitumorale Wirkung auf Kolonkarzinomzellen vermittelt (Ruf et al., 2007).

In-vitro-Zytotoxizitätsassays des ER-Ep BiAk mit stimulierten Splenozyten als Effektorzellen zeigten jedoch keine zusätzliche Lyse durch ADCC-Effekte auf. Im Gegensatz zum ER-Ep BiAk erzielten die beiden parentalen monospezifischen EpCAM-Antikörper eine Tumolyse von 80 % mit E:Z Ratios von 80:1. Zudem konnte gezeigt werden, dass der monospezifische Ratten mEpCAM-Ak über seinen Fc-Teil an die Fc γ R auf Effektorzellen bindet. Die prinzipielle Voraussetzung für die Vermittlung von ADCC ist somit gegeben. Auch in der Literatur finden sich Beispiele für die Vermittlung von ADCC durch monospezifische EpCAM-Ak. Der murine gegen humanes EpCAM-gerichtete Antikörper Edrecolomab konnte auf humanen Magenkarzinomzellen eine Lyse von 30 % erreichen. Noch stärkere ADCC-Effekte wurden durch die humanen IgG1 EpCAM-Antikörper Adecatumumab und ING-1 beobachtet (Munz et al., 2010). Sie führten zu einer Zytolyse zwischen 50 bis 100 %. Diese konnte bereits mit E:Z Ratios von 50:1 und Konzentrationen im pM-Bereich erzielt werden, was eine starke Lyseaktivität indiziert.

Die beobachtete, sowie die in der Literatur beschriebene Fähigkeit der monospezifischen EpCAM-Antikörper ADCC zu induzieren, macht deutlich, dass nicht das Target EpCAM für die ausbleibenden ADCC-Effekte des ER-Ep BiAk verantwortlich ist. Vielmehr scheinen Format und Aufbau des BiAk die Bindung und

Aktivierung der akzessorischen Effektorzellen negativ zu beeinflussen. Die im ER-Ep BiAk verwendete IgG2a Subklasse besitzt in der Maus ein hohes Potenzial aktivierende FcγR zu binden (Clynes et al., 2000). Dies konnte auch mit den monospezifischen mEpCAM-Ak gezeigt werden. Die Wahl dieser IgG-Unterklassen ist für die Fähigkeit eines Antikörpers ADCC zu vermitteln von großer Bedeutung. Neben der Wahl der IgG-Subklassen spielen jedoch auch Glykosylierungsmuster des Fc-Teils für die Lysekapazität eine Rolle (Krapp et al., 2003). Im ER-Ep BiAk stammt das IgG2a-Grundgerüst vom hEGFR-Ak (Mab225) und nicht vom Maus mEpCAM-Ak. Obwohl es sich bei beiden Fc-Fragmenten um IgG2a-Antikörper handelt, können Unterschiede der Zuckerketten große Auswirkungen auf die FcγR-Affinität haben (Shinkawa et al., 2003) und so die Mobilisierung von ADCC-Effekten beeinflussen.

Einen weitaus größeren Einfluss auf die FcγR-Bindung hat vermutlich die zwei plus zwei tetraivalente Antikörperstruktur des ER-Ep BiAk. Die EpCAM-bindende Einheit des BiAk ist mit einem Linker am C-Terminus der schweren Kette verbunden – die eigentliche Bindungsstelle des Fc-Teils. Castoldi et al. konnten jedoch zeigen, dass ein mit dem ER-Ep BiAk verwandter tetravalenter trispezifischer Antikörper in der Lage ist den FcγRIIIa über seinen Fc-Teil zu binden. Diese Fähigkeit wurde durch die gleichzeitige Bindung der Zielantigene über die Bindungsarme des Antikörpers nicht beeinträchtigt (Castoldi et al., 2012). In dieser Untersuchung erfolgte die Bindung der Zielantigene jedoch erst nach Kopplung des Fc-Teils. Eine bereits vorhandene Bindung des Antikörpers an EpCAM könnte die Fc-Domäne für akzessorische Effektorzellen unzugänglich machen und eine ADCC verhindern. Diese These wird durch eine Untersuchung gestützt, welche unterschiedliche bispezifische zwei plus zwei tetraivalente Antikörperformate auf ihre Fähigkeit zur ADCC miteinander vergleicht. Dabei wurde deutlich, dass die Lage der gekoppelten scFv-Moleküle am Antikörper großen Einfluss auf die ADCC hat. Ein BiAk, der die Antigen-bindende Einheit an den C-Terminus der schweren Kette gekoppelt hatte – entsprechend der Struktur im ER-Ep BiAk – konnte ebenfalls nur geringfügig ADCC vermitteln (Croasdale et al., 2012). Die Lage des EpCAM-scFv im ER-Ep BiAk ist somit vermutlich der limitierende Faktor im Hinblick auf die Bindung von akzessorischen Zellen über den Fc-Teil.

Um *in vivo* neben der spezifischen Rekrutierung von T-Zellen auch ADCC-vermittelte antitumorale Effekte des ER-Ep BiAk zu erhalten, sollten die genannten Aspekte genauer untersucht werden. Auch sollte in diesem Zusammenhang über eine Änderung des Antikörperformats zur Optimierung der ADCC-Funktion nachgedacht werden (Croasdale et al., 2012).

4.3.1.3 Fc-Teil vermittelte Vakzinierungseffekte

Eine weitere Wirkung T-Zell-rekrutierender BiAk-Formate mit einer intakten Fc-Domäne konnte durch TriomAbs demonstriert werden. Die Fähigkeit, neben T-Zellen auch akzessorische Zellen zu binden, ermöglicht zusätzliche kostimulatorische Signale, die eine effektive langanhaltende T-Zell-Immunantwort unterstützen. Neben der Aktivierung von CD40, CD80 und CD86 kommt es durch Makrophagen und DZ zur Aufnahme und Präsentation weiterer TAA, was eine polyvalente spezifische T-Zellantwort gegen den Tumor induziert (Zeidler et al., 2000). Diese Mechanismen führten im Mausmodell zur Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses und zu langanhaltenden antitumoralen Immunantworten (Ruf und Lindhofer, 2001; Eissler et al., 2012).

Ob der ER-Ep BiAk ebenfalls in der Lage ist, diese Mechanismen zu aktivieren, ist nicht bekannt. Prinzipiell besitzen IgG2a Antikörper, wie oben bereits erwähnt, ein starkes Potenzial DZ zu aktivieren (Clynes et al., 2000). Allerdings deutet die fehlende Vermittlung von ADCC-Effekten darauf hin, dass der BiAk nur bedingt in der Lage ist, akzessorische Zellen zu mobilisieren.

Das Auftreten von Vakzinierungseffekten ist aufgrund der anhaltenden antitumorale Wirkung für viele immuntherapeutische Methoden wünschenswert (Eissler et al., 2012). In unserem System könnte sich jedoch eine Immunantwort gegen die transduzierten T-Zellen zum Nachteil entwickeln. Das transduzierte, zur Rekrutierung genutzte inaktive Antigen gehört nicht zur physiologischen Oberfläche von T-Zellen. In unserem aktuellen Modell handelt es sich hierbei um humanes EGFR. Die Erkennung und Prozessierung dieses fremden Antigens durch Makrophagen und DZ könnte eine Immunreaktion gegen die transferierten T-Zellen induzieren. Beispielsweise ist bekannt, dass genetisch veränderte T-Zellen aufgrund speziefremder Anteile des transduzierten Antigens zu Abstoßungsreaktionen führen (Sadelain et al., 2003). Die spezifische Rekrutierung von APZ an transferierte T-Zellen würde diese Wirkung zusätzlich verstärken. Um das Risiko für eine Autoimmunreaktion zu reduzieren, könnte auch hier eine Änderung des Formats hin zu kleineren Molekülen ohne Fc-Teil sinnvoll sein. Eine weitere Möglichkeit bietet die Veränderung des Fc-Teils mittels Punktmutation, wodurch FcγR-Bindungen verhindert werden können (Wines et al., 2000).

4.3.2 Penetrationsvermögen des ER-Ep bispezifischen Antikörpers in solide Tumoren

Um eine selektive Aktivierung der transferierten tumorspezifischen T-Zellen im Tumorgewebe zu gewährleisten, muss der ER-Ep BiAk in der Lage sein den subkutanen mGC8-Magentumor ausreichend stark zu infiltrieren. Es ist jedoch bekannt, dass Fc-Teil-beinhaltende Antikörper, aufgrund ihres hohen Molekulargewichts, dazu häufig nicht fähig sind. Die Diffusionsrate eines Stoffes in den Tumor hängt neben Konzentration und Affinität stark von seiner molekularen Masse ab (Pluen et al., 2001) und verhält sich meist umgekehrt proportional zum Molekulargewicht (Nugent und Jain, 1984). Eine frühe Arbeit mit dreidimensionalen Tumorsphäroiden aus Dickdarmzellen konnte die unzureichende und verlangsamte Diffusion monoklonaler Antikörper im Vergleich zu seinen kleineren Proteinfragmenten wie F(ab)₂ zeigen (Sutherland et al., 1987). So diffundieren scFv-Fragmente (30 kDa) bis zu sechsmal schneller in den Tumor als intakte IgG-Antikörper (150 kDa) (Graff und Wittrup, 2003).

Aus der immunhistologischen Untersuchung des parentalen Ratten mEpCAM-Ak ging hervor, dass dieser im verwendeten Modell den Tumor infiltrieren kann. Der Ratten mEpCAM-Ak kumuliert besonders im Bereich der Tumorgefäße. Dieses Penetrationsmuster war so nicht unbedingt zu erwarten. Selbst in der Klinik erfolgreich eingesetzte IgG-Antikörper zeigen oft nur ein begrenztes Penetrationsvermögen in den Tumor. Trastuzumab zum Beispiel wandert nur sehr langsam in den Tumor ein. Erst 24 Stunden nach Injektion konnte eine gleichmäßige Verteilung im Tumorgewebe gezeigt werden. Diese verzögerte Aufnahme führt zu erhöhten Antikörperserumspiegeln im Organismus – unspezifische Toxizitäten können die Folge sein (Sutherland et al., 1987; Lee und Tannock, 2010). Auch Catumaxomab (150 kDa) hat Schwierigkeiten eine solide Tumorzellmasse zu infiltrieren. Eine Arbeit von Walz et al. zeigt in einem EpCAM-positiven Tumorsphäroidmodell zwar eine Antikörper-vermittelte Infiltration und Aktivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes, der Antikörper selbst kann jedoch nur die oberste Tumorzellreihe des Sphäroids durchdringen (Walz et al., 2004).

Das beobachtete Penetrationsverhalten des Ratten mEpCAM-Ak legt nahe, dass auch andere EpCAM-spezifische IgG-Antikörper in der Lage sind, in den Tumor einzuwandern. Es bleibt jedoch offen, ob auch der ER-Ep BiAk aufgrund seiner molekularen Größe und tetravalenten Struktur diese Fähigkeit besitzt.

4.4 Expression von EpCAM und seine Bedeutung als Target in der Tumorimmuntherapie

Die Suche nach optimalen Targets auf Tumorzellen ist die größte Herausforderung in der zielgerichteten Immuntherapie. So konnten bisher spezifische, ausschließlich auf dem Tumor exprimierte Antigene nicht sicher identifiziert werden. Vielmehr wird heute von TAA gesprochen, die auf dem Tumor zwar verstärkt präsent, jedoch auf gesunden Zellen ebenfalls vorhanden sind. Neben dem Hauptkriterium Spezifität, sollten TAA idealerweise auf Tumoren weit verbreitet und für Antikörper zugänglich sein (Scott et al., 2012). All diese Eigenschaften haben später Einfluss auf Wirkung und Sicherheit der Antikörpertherapie.

Zur Untersuchung der Durchführbarkeit des neuen Therapiekonzepts wurde ein bekanntes und häufig vorkommendes TAA gewählt – EpCAM. Hierbei handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches physiologisch auf der basolateralen Zelloberfläche der meisten Epithelien exprimiert wird (Balzar et al., 1999). Seine Hauptfunktion ist die interzelluläre Zelladhäsion (Patriarca et al., 2012). EpCAM wird auf nahezu allen Karzinomen exprimiert. Besonders Adenokarzinome des Kolons, Magens, Lunge und Pankreas zeigen eine ausgeprägte homogene EpCAM-Expression auf (Balzar et al., 1999; Went et al., 2004). Auch das hier verwendete murine mGC8-Magentumormodell exprimiert EpCAM. Die immunhistologische Untersuchung zeigte weiterhin, dass sich der monospezifische mEpCAM-Ak im Tumor anreichern kann. Diese Eigenschaften sind Voraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung unseres Therapiekonzeptes.

Jedoch konnte auch im gesunden Gewebe der Maus eine starke EpCAM-Expression nachgewiesen werden. Darm, Magen, Niere und Lunge waren EpCAM-positiv. Diese Ergebnisse decken sich mit der Expressionsanalyse von Amann et al. in der Maus (Amann et al., 2008). Auch im Menschen ist bekannt, dass EpCAM auf epithelalem, stark proliferierendem Gewebe physiologisch anzutreffen ist – ganz besonders in der Mucosa des Gastrointestinaltraktes (Litvinov et al., 1994). Das beschriebene Expressionsmuster lässt starke Toxizitäten aufgrund fehlender Tumorspezifität beim therapeutischen Einsatz von EpCAM-Antikörpern vermuten. Die Tatsache, dass der untersuchte Ratten mEpCAM-Ak *in vivo* eine starke Anreicherung im gesunden Epithel der Maus zeigte, unterstreicht diese Gefahr. Auf der anderen Seite ist in der Literatur jedoch auch beschrieben, dass EpCAM-Antikörper in der Lage sind zwischen Tumoren und physiologischem Gewebe zu differenzieren (Amann et al., 2009). Im gesunden Epithel wird EpCAM hauptsächlich auf der basolateralen Zellmembran im

Intrazellulärraum vorgefunden (Balzar et al., 1999) und liegt dort geschützt von Membranproteinen vor (Ladwein et al., 2005). Es wird daher angenommen, dass EpCAM auf normalem Gewebe für Antikörper nur eingeschränkt zugänglich ist.

Amann et al. konnten mit dem murinen EpCAM/CD3 BiTE-Antikörper muS110, welcher ebenfalls aus dem G8.8 EpCAM-Antikörper synthetisiert wurde, signifikante antitumorale Effekte in einem murinen Brustkrebsmodell belegen (Amann et al., 2008). Mit höheren Konzentrationen kam es jedoch zu starken dosislimitierenden Effekten. Anders als erwartet, zeigten histopathologische Untersuchungen jedoch keine Gewebläsionen auf normalem EpCAM-exprimierendem Gewebe (Amann et al., 2009). Vielmehr wurde die unspezifische Wirkung auf eine akute T-Zellaktivierung durch eine kleine Population von EpCAM-exprimierenden Lymphozyten zurückgeführt, welche im humanen Organismus nicht existiert.

Allerdings konnten auch im Menschen schwere unerwünschte Wirkungen durch EpCAM-Antikörper beobachtet werden (de Bono, 2004). Unter der Therapie mit zwei humanisierten IgG1 EpCAM-Antikörpern ING-1 und 3622W94 kam es zu schweren lebensbedrohlichen akuten Pankreatitiden (Goel et al., 2007). Eine Expression von EpCAM auf normalem epithelalem Pankreasgewebe ist bekannt (Takiyama et al., 1989). Daher wird angenommen, dass eine unspezifische Bindung und Aktivierung des Immunsystems im Pankreas zu einer Autodigestion des Gewebes führte. Auch der EpCAM-BiAk Catumaxomab zeigte in klinischen Studien starke Toxizitäten auf. Eine intravenöse und somit systemische Gabe des Antikörpers führte bei den Patienten unter anderem zu einem deutlichen Anstieg der Leberenzyme. Auch hier wird neben der massiven Ausschüttung von Zytokinen durch die Immunaktivierung (Zytokinsturm), die unspezifische Bindung an EpCAM und damit Immunaktivierung auf epithelialen Zellen der Gallengänge, oder beides diskutiert (Sebastian et al., 2007).

Zusammengefasst wird EpCAM zwar auf vielen Karzinomen stark exprimiert, jedoch wird der Therapieerfolg, wie viele Studien zeigen, durch tumorunselektive Immunaktivierung limitiert. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits mit BiAk eine erfolgreiche Redirektion von T-Zellen an EpCAM-exprimierende Tumorzellen demonstrieren (Amann et al., 2009). Aufgrund des beobachteten Nebenwirkungsprofils ist der Einsatz von EpCAM-Antikörpern unter therapeutischen Gesichtspunkten jedoch wenig erfolgsversprechend. Dennoch könnte dieses TAA, in Verbindung mit dem subkutanen SV40-positiven mGC8-Tumor, als geeignete Modellstruktur dienen, um die Durchführbarkeit dieses Therapiekonzepts zu untersuchen. Dies bekräftigen auch die

Ergebnisse des ersten Therapieversuchs mit dem monospezifischen Ratten mEpCAM-Ak in der CEA424/SV40-Tag Maus. Die positive Beeinflussung des medianen Überlebens deuten daraufhin, dass das Magenkarzinommodell grundsätzlich für eine EpCAM-gerichtete Therapie zugänglich ist.

4.5 Rekrutierung von T-Zellen im vorgestellten Therapiekonzept

Verschiedene Antikörper und Konzepte zur Rekrutierung von T-Zellen an den Tumor wurden in der Literatur bereits beschrieben. Aktuell zeigen sich besonders CD3-spezifische Antikörper vom BiTE-Format als vielversprechende Moleküle, um T-Zellen an den Tumor zu steuern und eine T-Zellaktivierung herbeizuführen (Frankel und Baeuerle, 2013). Allen voran konnte der gegen CD3- und CD19-gerichtete Antikörper Blinatumomab erfolgreich T-Zellen an Tumorzellen rekrutieren und diese bereits in geringsten Konzentrationen lysieren (Dreier 2002). Die T-Zellaktivierung wird dabei – wie bei vielen anderen Ansätzen auch – über die Bindung an das aktivierende CD3-Signal vermittelt. Die Redirektion der T-Zellen über ein stimulierendes Molekül kann jedoch zu unspezifischer T-Zell-Aktivierung führen und schwerwiegende therapielimitierende Nebenwirkungen zur Folge haben (Baeuerle und Reinhardt, 2009; Seimetz et al., 2010).

Auch der in dieser Arbeit charakterisierte ER-Ep BiAk soll, neben der Induktion konventioneller Fc-vermittelter Antikörpereffekte, wie ADCC und CDC, primär zur Rekrutierung von tumorspezifischen T-Zellen dienen. Unser postuliertes Therapiekonzept, bestehend aus der Kombination Markerantigen-transduzierter tumorspezifischer T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk, unterscheidet sich zu allen bisherigen Ansätzen darin, dass die Redirektion über ein transduziertes inaktives Antigen erfolgt. Zu einer Aktivierung der tumorspezifischen T-Zelle kommt es dabei erst durch die Bindung an MHC-I-präsentierte Antigene auf dem Tumor selbst. Neben der Bindung der T-Zellen über ein inaktives Antigen besteht der besondere Vorteil unseres Therapiekonzeptes in der selektiven Rekrutierung von TAA-spezifischen T-Zellen. Auf diese Weise wird eine unselektive Mobilisierung von T-Zellen, wie beispielweise bei CD3-bindenden BiAk beobachtet, minimiert. Über diese zwei Mechanismen soll unser Therapiekonzept zu einer gesteigerten Redirektion von transduzierten T-Zellen an den Tumor führen und dabei gleichzeitig die Sicherheit des AZT erhöhen.

In dieser Arbeit konnte eine *In-vitro*-Untersuchung zum ersten Mal zeigen, dass ein nicht-aktivierender BiAk in der Lage ist, T-Zellen über ein transduziertes, inaktives

Antigen an den Tumor zu rekrutieren. Dabei wurden EGFR-transduzierte T-Zellen mittels ER-Ep BiAk an EpCAM-exprimierende Tumorzellen gelenkt und die T-Zellen über eine bispezifische Bindung auf dem Tumor zurückgehalten. Ob eine vermehrte Redirektion der T-Zellen auch *in vivo* im subkutanen Tumormodell erreicht werden kann, muss zukünftig untersucht werden.

4.6 Ausblick

Die Zulassung von Blinatumomab zur Therapie der akuten lymphatischen Leukämie sowie von Catumaxomab zur Behandlung des malignen Aszites sind Beispiele dafür, dass eine erfolgreiche Redirektion von T-Zellen an eine Tumorzielstruktur mittels BiAk möglich ist. Bisher konnte eine klinische systemische Wirksamkeit jedoch nur für hämatologische Tumorerkrankungen bestätigt werden. Die Herausforderung liegt nun in der Optimierung und Erweiterung des therapeutischen Potenzials dieser neuen Behandlungsansätze – insbesondere in der Anwendung solider Tumoren. Zusätzliche Effizienz verspricht man sich beispielsweise aus einer Kombination der Antikörpertherapie mit dem adoptiven Transfer tumorspezifischer T-Zellen.

Der in dieser Arbeit charakterisierte ER-Ep BiAk ist in der Lage, spezifisch an das transduzierte Markerantigen EGFR in T-Zellen zu binden und eine Vernetzung zu EpCAM-tragenden Zielzellen zu vermitteln. Zudem zeigt das subkutane mGC8-Tumormodell eine hohe EpCAM-Expression *in vivo*. Somit sind der ER-Ep BiAk und das Magenkarzinommodell geeignet, um die Wirkung einer kombinierten Therapie mit tumorspezifischen T-Zellen *in vivo* zu untersuchen. Neben der Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit in der Maus sollte auch das Auftreten von Nebenwirkungen genau dokumentiert werden. Für eine klinische Weiterentwicklung unseres Konzeptes ist dies von großer Bedeutung.

Aufgrund des mäßigen Potenzials des ER-Ep BiAk *in vitro* CDC und ADCC zu vermitteln, ist nicht davon auszugehen, dass diese Effekte *in vivo* eine Rolle spielen werden. Durch gezielte strukturelle Veränderungen am ER-Ep BiAk kann man versuchen diese zytotoxischen Mechanismen zu mobilisieren. Letztendlich müssen jedoch die positiven und negativen Effekte eines intakten Fc-Teils sorgsam gegeneinander abgewogen werden. Auch die Synthese eines kleineren Formats ist in Betracht zu ziehen. Auf diese Weise könnte das mögliche Auftreten von Autoimmunreaktionen reduziert und das Penetrationsvermögen in den Tumor verbessert werden. Für die Übertragung des Therapiekonzeptes auf humane

Krebserkrankungen sollte man diesen Ansatz auf weitere TAA ausweiten. Aufgrund der geringen Tumorspezifität von EpCAM sind bei intravenöser Anwendung schwerwiegende unerwünschte Wirkungen zu befürchten, die sich limitierend auf den Therapieerfolg auswirken können. Sicherlich ist dies auch ein Grund dafür, dass bislang kein EpCAM-Antikörper zur intravenösen Anwendung zugelassen ist. Die Suche nach neuen therapeutischen Zielstrukturen wird auch in Zukunft von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Umsetzung der Immuntherapie von Tumoren sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz bispezifischer Antikörper zur Unterstützung der T-Zellantwort in Krebsimmuntherapien hat großes Potenzial – ihre therapeutische Wirksamkeit konnte bereits in verschiedenen klinischen Studien belegt werden. Bispezifische Antikörper (BiAk) führen hierzu T-Zellen an die Tumorzelle heran und aktivieren zytotoxische Mechanismen, die zu einer spezifischen Tumorzelllyse führen. Je nach Antikörperkonstrukt tragen dazu auch akzessorische Zellen bei, die über den Fc-Teil mobilisiert werden. Die Verstärkung der T-Zellantwort führt jedoch häufig zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen im Patienten. Dazu trägt vermutlich eine CD3-vermittelte, T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung von T-Zellen bei.

Ein neues Konzept zur CD3-unabhängigen Rekrutierung transferierter T-Zellen mittels BiAk sollte deshalb in einem murinen Tumormodell aus subkutan injizierten Zellen einer syngenen Magenkarzinomzelllinie mGC8 untersucht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den hierzu eigens konstruierten hEGFR x mEpCAM bispezifischen Antikörper (ER-Ep BiAk) in Bezug auf Bindungseigenschaften und Funktion zu charakterisieren, sowie das verwendete murine Tumormodell auf EpCAM-Expression und Antikörper-Zugänglichkeit zu untersuchen.

Der ER-Ep BiAk war in der Lage, in geringen Konzentrationen spezifisch an sein Zielantigen zu binden. Zudem konnte zum ersten Mal eine Rekrutierung von T-Zellen über das transduzierte inaktive EGFR an EpCAM-tragende Tumorzellen *in vitro* gezeigt werden. Zytotoxizitätsanalysen zeigten, im Vergleich zu den parentalen monospezifischen EpCAM-Antikörpern, nur geringe CDC- und keine ADCC-Effekte des ER-Ep BiAk *in vitro*. Immunhistologische Untersuchungen ließen eine hohe EpCAM-Expression in den subkutanen Tumoren *in vivo* erkennen. Allerdings konnte auch auf gesundem Gewebe EpCAM nachgewiesen werden. In einem ersten Therapieversuch wurde gezeigt, dass dieses Antigen für eine Antikörpertherapie grundsätzlich zugänglich ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass der ER-Ep BiAk für den kombinierten Einsatz mit transduzierten tumorspezifischen T-Zellen geeignet ist. Zudem ist der subkutane mGC8-Magentumor ein günstiges Modell, um die Wirkung des kombinierten Therapiekonzeptes *in vivo* zu untersuchen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D. and Weiner, L.M. (2001). High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules.
Cancer Res 61(12): 4750-4755.

Alexander, R.B. and Rosenberg, S.A. (1990). Long-term survival of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice.
J Immunol 145(5): 1615-1620.

Amann, M., Brischwein, K., Lutterbuese, P., Parr, L., Petersen, L., Lorenczewski, G., Krinner, E., Bruckmeier, S., Lippold, S., Kischel, R., Lutterbuese, R., Kufer, P., Baeuerle, P.A. and Schlereth, B. (2008). Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3.
Cancer Res 68(1): 143-151.

Amann, M., Friedrich, M., Lutterbuese, P., Vieser, E., Lorenczewski, G., Petersen, L., Brischwein, K., Kufer, P., Kischel, R., Baeuerle, P.A. and Schlereth, B. (2009). Therapeutic window of an EpCAM/CD3-specific BiTE antibody in mice is determined by a subpopulation of EpCAM-expressing lymphocytes that is absent in humans.
Cancer Immunol Immunother 58(1): 95-109.

Andrew, S.M. and Titus, J.A. (2001). Fragmentation of immunoglobulin G.
Curr Protoc Immunol Chapter 2: Unit 2 8.

Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpinarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (2005). CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells.
J Immunol 174(5): 2591-2601.

Baeuerle, P.A. and Reinhardt, C. (2009). Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy.
Cancer Res 69(12): 4941-4944.

Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J. and Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).
J Mol Med (Berl) 77(10): 699-712.

Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P.A. and Kufer, P. (2008). Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody.
Science 321(5891): 974-977.

Bendle, G.M., Linnemann, C., Hooijkaas, A.I., Bies, L., de Witte, M.A., Jorritsma, A., Kaiser, A.D., Pouw, N., Debets, R., Kieback, E., Uckert, W., Song, J.Y., Haanen, J.B. and Schumacher, T.N. (2010). Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy.
Nat Med 16(5): 565-570, 561p following 570.

Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Treves, A.J., Zippel, D., Itzhaki, O., Hershkovitz, L., Levy, D., Kubi, A., Hovav, E., Chermoshniuk, N., Shalmon, B., Hardan, I., Catane, R., Markel, G., Apter, S., Ben-Nun, A., Kuchuk, I., Shimoni, A., Nagler, A. and Schachter, J. (2010). Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients.

Clinical Cancer Research 16(9): 2646-2655.

Bird, R.E. and Walker, B.W. (1991). Single chain antibody variable regions.

Trends Biotechnol 9(4): 132-137.

Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma.

Annu Rev Immunol 24: 175-208.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem 72: 248-254.

Brentjens, R.J., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I.V., Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., Steinherz, P., Jurcic, J., Rosenblatt, T., Maslak, P., Frattini, M. and Sadelain, M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia.

Sci Transl Med 5(177): 177ra138.

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.J. and Baeuerle, P.A. (2006). MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors.

Mol Immunol 43(8): 1129-1143.

Brown, M.A., Stenberg, L.M., Persson, U. and Stenflo, J. (2000). Identification and purification of vitamin K-dependent proteins and peptides with monoclonal antibodies specific for gamma -carboxyglutamyl (Gla) residues.

J Biol Chem 275(26): 19795-19802.

Carriere, D., Arcier, J.M., Derocq, J.M., Fontaine, C. and Richer, G. (1989). Antigenic modulation induced by four monoclonal antibodies adsorbed on gold particles (specificity anti-CD4, anti-CD5, anti-CD7, and anti-150-kDa antigen): relationship between modulation and cytotoxic activity of immunotoxins.

Exp Cell Res 182(1): 114-128.

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

Blood 99(3): 754-758.

Castoldi, R., Jucknischke, U., Pradel, L.P., Arnold, E., Klein, C., Scheiblich, S., Niederfellner, G. and Sustmann, C. (2012). Molecular characterization of novel trispecific ErbB-cMet-IGF1R antibodies and their antigen-binding properties.

Protein Eng Des Sel 25(10): 551-559.

- Chames, P. and Baty, D. (2009). Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?
MAbs 1(6): 539-547.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.
Brit J of Pharmacol 157(2): 220-233.
- Chamoto, K., Tsuji, T., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Sato, T., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Takeshima, T., Togashi, Y. and Nishimura, T. (2004). Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells.
Cancer Res 64(1): 386-390.
- Cheever, M.A., Greenberg, P.D. and Fefer, A. (1980). Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors.
J Immunol 125(2): 711-714.
- Cheever, M.A. and Higano, C.S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine.
Clin Cancer Res 17(11): 3520-3526.
- Chelius, D., Ruf, P., Gruber, P., Ploscher, M., Liedtke, R., Gansberger, E., Hess, J., Wasiliu, M. and Lindhofer, H. (2010). Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab.
MAbs 2(3): 309-319.
- Cioffi, M., Dorado, J., Baeuerle, P.A. and Heeschen, C. (2012). EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells.
Clin Cancer Res 18(2): 465-474.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G. and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.
Nat Med 6(4): 443-446.
- Coloma, M.J. and Morrison, S.L. (1997). Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies.
Nat Biotechnol 15(2): 159-163.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy.
Science 342(6165): 1432-1433.
- Croasdale, R., Wartha, K., Schanzer, J.M., Kuenkele, K.P., Ries, C., Mayer, K., Gassner, C., Wagner, M., Dimoudis, N., Herter, S., Jaeger, C., Ferrara, C., Hoffmann, E., Kling, L., Lau, W., Staack, R.F., Heinrich, J., Scheuer, W., Stracke, J., Gerdes, C., Brinkmann, U., Umana, P. and Klein, C. (2012). Development of tetravalent IgG1 dual targeting IGF-1R-EGFR antibodies with potent tumor inhibition.
Arch Biochem Biophys 526(2): 206-218.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L. and Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.
Nat Med 10(9): 942-949.

- Damle, N.K. (2004). Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin.
Expert Opin Biol Ther 4(9): 1445-1452.
- Daniel, P.T., Kroidl, A., Kopp, J., Sturm, I., Moldenhauer, G., Dorken, B. and Pezzutto, A. (1998). Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells.
Blood 92(12): 4750-4757.
- de Haij, S., Jansen, J.H., Boross, P., Beurskens, F.J., Bakema, J.E., Bos, D.L., Martens, A., Verbeek, J.S., Parren, P.W., van de Winkel, J.G. and Leusen, J.H. (2010). In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling.
Cancer Res 70(8): 3209-3217.
- Dhodapkar, K.M., Krasovsky, J., Williamson, B. and Dhodapkar, M.V. (2002). Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells.
J Exp Med 195(1): 125-133.
- Diebold, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J., van de Winkel, J.G., Wilson, I.A., Koster, A.J., Taylor, R.P., Saphire, E.O., Burton, D.R., Schuurman, J., Gros, P. and Parren, P.W. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface.
Science 343(6176): 1260-1263.
- Disis, M.L., Wallace, D.R., Gooley, T.A., Dang, Y., Slota, M., Lu, H., Coveler, A.L., Childs, J.S., Higgins, D.M., Fintak, P.A., dela Rosa, C., Tietje, K., Link, J., Waisman, J. and Salazar, L.G. (2009). Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer.
J Clin Oncol 27(28): 4685-4692.
- Dreier, T., Baeuerle, P.A., Fichtner, I., Grun, M., Schlereth, B., Lorenczewski, G., Kufer, P., Lutterbuse, R., Riethmuller, G., Gyorstrup, P. and Bargou, R.C. (2003). T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct.
J Immunol 170(8): 4397-4402.
- Dreier, T., Lorenczewski, G., Brandl, C., Hoffmann, P., Syring, U., Hanakam, F., Kufer, P., Riethmuller, G., Bargou, R. and Baeuerle, P.A. (2002). Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody.
Int J Cancer 100(6): 690-697.
- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., Robinson, M.R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., White, D.E. and Rosenberg, S.A. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.
Science 298(5594): 850-854.

Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., Wunderlich, J., Restifo, N.P., Thomasian, A., Downey, S.G., Smith, F.O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D.E. and Rosenberg, S.A. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26(32): 5233-5239.

Eissler, N., Mysliwietz, J., Deppisch, N., Ruf, P., Lindhofer, H. and Mocikat, R. (2013). Potential of the trifunctional bispecific antibody surek depends on dendritic cells: rationale for a new approach of tumor immunotherapy. *Mol Med* 19: 54-61.

Eissler, N., Ruf, P., Mysliwietz, J., Lindhofer, H. and Mocikat, R. (2012). Trifunctional bispecific antibodies induce tumor-specific T cells and elicit a vaccination effect. *Cancer Res* 72(16): 3958-3966.

Farr, A., Nelson, A., Truex, J. and Hosier, S. (1991). Epithelial heterogeneity in the murine thymus: a cell surface glycoprotein expressed by subcapsular and medullary epithelium. *J Histochem Cytochem* 39(5): 645-653.

Fiedler, W.M., Wolf, M., Kebenko, M., Goebeler, M.-E., Ritter, B., Quaas, A., Vieser, E., Hijazi, Y., Patzak, I., Friedrich, M., Kufer, P., Frankel, S., Seggewiss-Bernhardt, R. and Kaubitzsch, S. (2012). A phase I study of EpCAM/CD3-bispecific antibody (MT110) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 30(suppl; abstr 2504) 2012 ASCO Annual Meeting Proceeding.

Figlin, R.A., Thompson, J.A., Bukowski, R.M., Vogelzang, N.J., Novick, A.C., Lange, P., Steinberg, G.D. and Belldegrun, A.S. (1999). Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 17(8): 2521-2529.

Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S. and Kirschfink, M. (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 40(2-4): 109-123.

Fisher, B., Packard, B.S., Read, E.J., Carrasquillo, J.A., Carter, C.S., Topalian, S.L., Yang, J.C., Yolles, P., Larson, S.M. and Rosenberg, S.A. (1989). Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 7(2): 250-261.

Flannagan, R.S., Jaumouille, V. and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7: 61-98.

Flieger, D., Renoth, S., Beier, I., Sauerbruch, T. and Schmidt-Wolf, I. (2000). Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol* 204(1): 55-63.

Frankel, S.R. and Baeuerle, P.A. (2013). Targeting T cells to tumor cells using bispecific antibodies. *Curr Opin Chem Biol* 17(3): 385-392.

Gattinoni, L., Finkelstein, S.E., Klebanoff, C.A., Antony, P.A., Palmer, D.C., Spiess, P.J., Hwang, L.N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D.M., Surh, C.D., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202(7): 907-912.

Gattinoni, L., Powell, D.J., Jr., Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6(5): 383-393.

Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D. and Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 25(3): 158-164.

Goel, S., Bauer, R.J., Desai, K., Bulgaru, A., Iqbal, T., Strachan, B.K., Kim, G., Kaubisch, A., Vanhove, G.F., Goldberg, G. and Mani, S. (2007). Pharmacokinetic and safety study of subcutaneously administered weekly ING-1, a human engineered monoclonal antibody targeting human EpCAM, in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 18(10): 1704-1707.

Golay, J., Cittera, E., Di Gaetano, N., Manganini, M., Mosca, M., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Vago, L. and Introna, M. (2006). The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica* 91(2): 176-183.

Graff, C.P. and Wittrup, K.D. (2003). Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: importance of dosage for penetration, and affinity for retention. *Cancer Res* 63(6): 1288-1296.

Grupp, S.A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D.L., Rheingold, S.R., Teachey, D.T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J.F., Milone, M.C., Levine, B.L. and June, C.H. (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368(16): 1509-1518.

Heiss, M.M., Murawa, P., Koralewski, P., Kutarska, E., Kolesnik, O.O., Ivanchenko, V.V., Dudnichenko, A.S., Aleknaviciene, B., Razbadauskas, A., Gore, M., Ganea-Motan, E., Ciuleanu, T., Wimberger, P., Schmittel, A., Schmalfeldt, B., Burges, A., Bokemeyer, C., Lindhofer, H., Lahr, A. and Parsons, S.L. (2010). The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 127(9): 2209-2221.

Herrmann, I., Baeuerle, P.A., Friedrich, M., Murr, A., Filusch, S., Ruttinger, D., Majdoub, M.W., Sharma, S., Kufer, P., Raum, T. and Munz, M. (2010). Highly efficient elimination of colorectal tumor-initiating cells by an EpCAM/CD3-bispecific antibody engaging human T cells. *PLoS One* 5(10): e13474.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A. and Urban, W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8): 711-723.

Hoffmann, P., Hofmeister, R., Brischwein, K., Brandl, C., Crommer, S., Bargou, R., Itin, C., Prang, N. and Baeuerle, P.A. (2005). Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct.
Int J Cancer 115(1): 98-104.

Holliger, P. and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains.
Nat Biotechnol 23(9): 1126-1136.

Howland, K.C., Ausubel, L.J., London, C.A. and Abbas, A.K. (2000). The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance.
J Immunol 164(9): 4465-4470.

Hubert, P., Heitzmann, A., Viel, S., Nicolas, A., Sastre-Garau, X., Oppezco, P., Pritsch, O., Osinaga, E. and Amigorena, S. (2011). Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy.
Cancer Res 71(15): 5134-5143.

James, N.D., Atherton, P.J., Jones, J., Howie, A.J., Tchekmedyian, S. and Curnow, R.T. (2001). A phase II study of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-HER2 x CD64) with GM-CSF in HER2+ advanced prostate cancer.
Br J Cancer 85(2): 152-156.

Jeyarajah, D.R. and Thistlethwaite, J.R., Jr. (1993). General aspects of cytokine-release syndrome: timing and incidence of symptoms.
Transplant Proc 25(2 Suppl 1): 16-20.

Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Royal, R.E., Sherry, R.M., Wunderlich, J.R., Lee, C.C., Restifo, N.P., Schwarz, S.L., Cogdill, A.P., Bishop, R.J., Kim, H., Brewer, C.C., Rudy, S.F., VanWaes, C., Davis, J.L., Mathur, A., Ripley, R.T., Nathan, D.A., Laurencot, C.M. and Rosenberg, S.A. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen.
Blood 114(3): 535-546.

Jorritsma, A., Schotte, R., Coccoris, M., de Witte, M.A. and Schumacher, T.N. (2011). Prospects and limitations of T cell receptor gene therapy.
Curr Gene Ther 11(4): 276-287.

June, C.H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic.
J Clin Invest 117(6): 1466-1476.

Junghans, R.P. (1997). Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG.
Immunol Res 16(1): 29-57.

Karttunen, J., Sanderson, S. and Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens.
Proc Natl Acad Sci U S A 89(13): 6020-6024.

Kessels, H.W., Wolkers, M.C., van den Boom, M.D., van der Valk, M.A. and Schumacher, T.N. (2001). Immunotherapy through TCR gene transfer.
Nat Immunol 2(10): 957-961.

- Kiewe, P., Hasmuller, S., Kahlert, S., Heinrigs, M., Rack, B., Marme, A., Korfel, A., Jager, M., Lindhofer, H., Sommer, H., Thiel, E. and Untch, M. (2006). Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer.
Clin Cancer Res 12(10): 3085-3091.
- Klebanoff, C.A., Khong, H.T., Antony, P.A., Palmer, D.C. and Restifo, N.P. (2005). Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy.
Trends Immunol 26(2): 111-117.
- Kobold, S., Steffen, J., Chaloupka, M., Grassmann, S., Henkel, J., Castoldi, R., Zeng, Y., Chmielewski, M., Schmollinger, J.C., Schnurr, M., Rothenfusser, S., Schendel, D.J., Abken, H., Sustmann, C., Niederfellner, G., Klein, C., Bourquin, C. and Endres, S. (2015). Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer.
J Natl Cancer Inst 107(1).
- Kontermann, R. (2012). Dual targeting strategies with bispecific antibodies.
MAbs 4(2).
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R. and Sondermann, P. (2003). Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity.
J Mol Biol 325(5): 979-989.
- Kyriakos, R.J., Shih, L.B., Ong, G.L., Patel, K., Goldenberg, D.M. and Mattes, M.J. (1992). The fate of antibodies bound to the surface of tumor cells in vitro.
Cancer Res 52(4): 835-842.
- Ladwein, M., Pape, U.F., Schmidt, D.S., Schnolzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W.W., Moldenhauer, G. and Zoller, M. (2005). The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7.
Exp Cell Res 309(2): 345-357.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227(5259): 680-685.
- Lammerts van Bueren, J.J., Bleeker, W.K., Bogh, H.O., Houtkamp, M., Schuurman, J., van de Winkel, J.G. and Parren, P.W. (2006). Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor: implications for the mechanisms of action.
Cancer Res 66(15): 7630-7638.
- Landmeier, S., Altvater, B., Pscherer, S., Meltzer, J., Sebire, N., Pule, M., Vera, J., Hotfilder, M., Juergens, H., Vormoor, J. and Rossig, C. (2010). Cytotoxic T cells transduced with chimeric anti-CD19 receptors prevent engraftment of primary lymphoblastic leukemia in vivo.
Leukemia 24(5): 1080-1084.

Laport, G.G., Levine, B.L., Stadtmauer, E.A., Schuster, S.J., Luger, S.M., Grupp, S., Bunin, N., Strobl, F.J., Cotte, J., Zheng, Z., Gregson, B., Rivers, P., Vonderheide, R.H., Liebowitz, D.N., Porter, D.L. and June, C.H. (2003). Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34+-selected hematopoietic cell transplantation. *Blood* 102(6): 2004-2013.

Lee, C.M. and Tannock, I.F. (2010). The distribution of the therapeutic monoclonal antibodies cetuximab and trastuzumab within solid tumors. *BMC Cancer* 10: 255.

Lindhofer, H., Mocikat, R., Steipe, B. and Thierfelder, S. (1995). Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol* 155(1): 219-225.

Link, B.K., Kostelny, S.A., Cole, M.S., Fusselman, W.P., Tso, J.Y. and Weiner, G.J. (1998). Anti-CD3-based bispecific antibody designed for therapy of human B-cell malignancy can induce T-cell activation by antigen-dependent and antigen-independent mechanisms. *Int J Cancer* 77(2): 251-256.

Linke, R., Klein, A. and Seimetz, D. (2010). Catumaxomab: clinical development and future directions. *MAbs* 2(2): 129-136.

Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11: 191-212.

Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J. and Warnaar, S.O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125(2): 437-446.

Loffler, A., Kufer, P., Lutterbuse, R., Zettl, F., Daniel, P.T., Schwenkenbecher, J.M., Riethmuller, G., Dorken, B. and Bargou, R.C. (2000). A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95(6): 2098-2103.

Lordick, F., Luber, B., Lorenzen, S., Hegewisch-Becker, S., Folprecht, G., Woll, E., Decker, T., Endlicher, E., Rothling, N., Schuster, T., Keller, G., Fend, F. and Peschel, C. (2010). Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer* 102(3): 500-505.

Mack, M., Riethmuller, G. and Kufer, P. (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7021-7025.

McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A.D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. and Dallaire, B.K. (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program.
J Clin Oncol 16(8): 2825-2833.

Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry.
Nature 305(5934): 537-540.

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A. and Rosenberg, S.A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.
Science 314(5796): 126-129.

Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M. and Rosenberg, S.A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.
Mol Ther 18(4): 843-851.

Munz, M., Murr, A., Kvesic, M., Rau, D., Mangold, S., Pflanz, S., Lumsden, J., Volkland, J., Fagerberg, J., Riethmuller, G., Ruttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A. and Raum, T. (2010). Side-by-side analysis of five clinically tested anti-EpCAM monoclonal antibodies.
Cancer Cell Int 10: 44.

Nagorsen, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A. and Bargou, R. (2012). Blinatumomab: a historical perspective.
Pharmacol Ther 136(3): 334-342.

Natsume, A., Niwa, R. and Satoh, M. (2009). Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC.
Drug Des Devel Ther 3: 7-16.

Naundorf, S., Preithner, S., Mayer, P., Lippold, S., Wolf, A., Hanakam, F., Fichtner, I., Kufer, P., Raum, T., Riethmuller, G., Baeuerle, P.A. and Dreier, T. (2002). In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancreatic carcinoma treatment.
Int J Cancer 100(1): 101-110.

Nelson, A.L., Dhimolea, E. and Reichert, J.M. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics.
Nat Rev Drug Discov 9(10): 767-774.

Nimmerjahn, F. and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members.
Immunity 24(1): 19-28.

Nockel, J., van den Engel, N.K., Winter, H., Hatz, R.A., Zimmermann, W. and Kammerer, R. (2006). Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene.
BMC Cancer 6: 57.

- Nugent, L.J. and Jain, R.K. (1984). Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues.
Cancer Res 44(1): 238-244.
- Offner, S., Hofmeister, R., Romaniuk, A., Kufer, P. and Baeuerle, P.A. (2006). Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells.
Mol Immunol 43(6): 763-771.
- Orcutt, K.D., Ackerman, M.E., Cieslewicz, M., Quiroz, E., Slusarczyk, A.L., Frangioni, J.V. and Wittrup, K.D. (2010). A modular IgG-scFv bispecific antibody topology.
Protein Eng Des Sel 23(4): 221-228.
- Parham, P., Androlewicz, M.J., Brodsky, F.M., Holmes, N.J. and Ways, J.P. (1982). Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens.
J Immunol Methods 53(2): 133-173.
- Parkin, J. and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system.
Lancet 357(9270): 1777-1789.
- Patriarca, C., Macchi, R.M., Marschner, A.K. and Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review.
Cancer Treat Rev 38(1): 68-75.
- Perera, R.M., Zoncu, R., Johns, T.G., Pypaert, M., Lee, F.T., Mellman, I., Old, L.J., Toomre, D.K. and Scott, A.M. (2007). Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody.
Neoplasia 9(12): 1099-1110.
- Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T.D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E.B., Izumi, Y., Campbell, R.B., Berk, D.A. and Jain, R.K. (2001). Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors.
Proc Natl Acad Sci U S A 98(8): 4628-4633.
- Prang, N., Preithner, S., Brischwein, K., Goster, P., Woppel, A., Muller, J., Steiger, C., Peters, M., Baeuerle, P.A. and da Silva, A.J. (2005). Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines.
Br J Cancer 92(2): 342-349.
- Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, R.F., Giorgio, N.A., Mendelsohn, J., Scher, H.I. and Goldstein, N.I. (1996). The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma.
J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(6): 419-427.
- Ralph, P. and Nakoinz, I. (1975). Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line.
Nature 257(5525): 393-394.
- Ravetch, J.V. and Clynes, R.A. (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo.
Annu Rev Immunol 16: 421-432.

- Renner, C., Hartmann, F. and Pfreundschuh, M. (1997). Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Cancer Immunol Immunother* 45(3-4): 184-186.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E. and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12(4): 269-281.
- Rich, R.L. and Myszkowski, D.G. (2007). Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal Biochem* 361(1): 1-6.
- Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W. and Desjarlais, J.R. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 7(8): 2517-2527.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. and Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332(6162): 323-327.
- Robbins, P.F., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Nahvi, A.V., Helman, L.J., Mackall, C.L., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Restifo, N.P., Raffeld, M., Lee, C.C., Levy, C.L., Li, Y.F., El-Gamil, M., Schwarz, S.L., Laurencot, C. and Rosenberg, S.A. (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 29(7): 917-924.
- Robert Koch-Institut (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin. 9. Ausgabe.
- Rosenberg, S.A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835): 380-384.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., Morton, K.E., Laurencot, C.M., Steinberg, S.M., White, D.E. and Dudley, M.E. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17(13): 4550-4557.
- Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. and White, D.E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86(15): 1159-1166.
- Ruf, P., Gires, O., Jager, M., Fellingner, K., Atz, J. and Lindhofer, H. (2007). Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer* 97(3): 315-321.
- Ruf, P. and Lindhofer, H. (2001). Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 98(8): 2526-2534.

- Sadelain, M., Riviere, I. and Brentjens, R. (2003). Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes.
Nat Rev Cancer 3(1): 35-45.
- Saerens, D., Ghassabeh, G.H. and Muyldermans, S. (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics.
Curr Opin Pharmacol 8(5): 600-608.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.
Nat Methods 9(7): 671-675.
- Scott, A.M., Allison, J.P. and Wolchok, J.D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy.
Cancer Immun 12: 14.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D. and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer.
Nat Rev Cancer 12(4): 278-287.
- Sebastian, M., Passlick, B., Friccius-Quecke, H., Jager, M., Lindhofer, H., Kannies, F., Wiewrodt, R., Thiel, E., Buhl, R. and Schmittel, A. (2007). Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study.
Cancer Immunol Immunother 56(10): 1637-1644.
- Segal, D.M., Weiner, G.J. and Weiner, L.M. (2001). Introduction: bispecific antibodies.
J Immunol Methods 248(1-2): 1-6.
- Seimetz, D., Lindhofer, H. and Bokemeyer, C. (2010). Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy.
Cancer Treat Rev 36(6): 458-467.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.
Nature 410(6832): 1107-1111.
- Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J.D. and Allison, J.P. (2011). Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps.
Nat Rev Cancer 11(11): 805-812.
- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Misaka, H., Mori, K., Yano, K., Shitara, K. and Satoh, M. (2009). Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for Fc γ RIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils.
Exp Hematol 37(3): 309-321.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N. and Shitara, K. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity.
J Biol Chem 278(5): 3466-3473.

Shu, S.Y., Chou, T. and Rosenberg, S.A. (1987). Generation from tumor-bearing mice of lymphocytes with in vivo therapeutic efficacy.
J Immunol 139(1): 295-304.

Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A. and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity.
Mol Immunol 42(4): 501-510.

Spiegelberg, H.L. and Fishkin, B.G. (1972). The catabolism of human G immunoglobulins of different heavy chain subclasses. 3. The catabolism of heavy chain disease proteins and of Fc fragments of myeloma proteins.
Clin Exp Immunol 10(4): 599-607.

Staerz, U.D. and Bevan, M.J. (1986). Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity.
Proc Natl Acad Sci U S A 83(5): 1453-1457.

Sunada, H., Magun, B.E., Mendelsohn, J. and MacLeod, C.L. (1986). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation.
Proc Natl Acad Sci U S A 83(11): 3825-3829.

Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D. and Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.
N Engl J Med 355(10): 1018-1028.

Sutherland, R., Buchegger, F., Schreyer, M., Vacca, A. and Mach, J.P. (1987). Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids.
Cancer Res 47(6): 1627-1633.

Takiyama, Y., Tempero, M.A., Takasaki, H., Onda, M., Tsuchiya, R., Buchler, M., Ness, M., Colcher, D., Schlom, J. and Pour, P.M. (1989). Reactivity of CO17-1A and B72.3 in benign and malignant pancreatic diseases.
Hum Pathol 20(9): 832-838.

Thompson, J., Epting, T., Schwarzkopf, G., Singhofen, A., Eades-Perner, A.M., van Der Putten, H. and Zimmermann, W. (2000). A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy.
Int J Cancer 86(6): 863-869.

Topalian, S.L., Muul, L.M., Solomon, D. and Rosenberg, S.A. (1987). Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials.
J Immunol Methods 102(1): 127-141.

Topalian, S.L., Weiner, G.J. and Pardoll, D.M. (2011). Cancer immunotherapy comes of age.
J Clin Oncol 29(36): 4828-4836.

Topp, M.S., Kufer, P., Gokbuget, N., Goebeler, M., Klinger, M., Neumann, S., Horst, H.A., Raff, T., Viardot, A., Schmid, M., Stelljes, M., Schaich, M., Degenhard, E., Kohne-Volland, R., Bruggemann, M., Ottmann, O., Pfeifer, H., Burmeister, T., Nagorsen, D., Schmidt, M., Lutterbuese, R., Reinhardt, C., Baeuerle, P.A., Kneba, M., Einsele, H., Riethmuller, G., Hoelzer, D., Zugmaier, G. and Bargou, R.C. (2011). Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival.
J Clin Oncol 29(18): 2493-2498.

Van Cutsem, E., Kohne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J. and Rougier, P. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med 360(14): 1408-1417.

Velders, M.P., van Rhijn, C.M., Briaire, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O. and Litvinov, S.V. (1995). Immunotherapy with low and high affinity monoclonal antibodies 17-1A and 323/A3 in a nude mouse xenograft carcinoma model.
Cancer Res 55(19): 4398-4403.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D. and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer.
Annu Rev Immunol 29: 235-271.

Vieira, P. and Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice.
Eur J Immunol 18(2): 313-316.

Vila, M.R., Lloreta, J., Schussler, M.H., Berrozpe, G., Welt, S. and Real, F.X. (1995). New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation.
Lab Invest 72(4): 395-404.

Vitale, M., Pelusi, G., Taroni, B., Gobbi, G., Micheloni, C., Rezzani, R., Donato, F., Wang, X. and Ferrone, S. (2005). HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage.
Clin Cancer Res 11(1): 67-72.

Walz, A., Mack, B., Schmitt, B., Gires, O., Wollenberg, B. and Zeidler, R. (2004). Antitumour effects of a bispecific trivalent antibody in multicellular tumour spheroids.
Anticancer Res 24(2B): 887-893.

Wang, S.Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzinger, D.C., Vogel, C.W., St John, W. and Weiner, G.J. (2009). Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model.
Blood 114(26): 5322-5330.

Weiner, G.J. (2010). Rituximab: Mechanism of Action.
Seminars in Hematology 47(2): 115-123.

Weiner, L.M., Clark, J.I., Ring, D.B. and Alpaugh, R.K. (1995). Clinical development of 2B1, a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII.
J Hematother 4(5): 453-456.

- Weiner, L.M., Surana, R. and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.
Nat Rev Immunol 10(5): 317-327.
- Weiner, R.E. and Thakur, M.L. (2001). Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy.
Semin Nucl Med 31(4): 296-311.
- Weng, W.K. and Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma.
J Clin Oncol 21(21): 3940-3947.
- Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G. and Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas.
Hum Pathol 35(1): 122-128.
- Wheeler, D.L., Huang, S., Kruser, T.J., Nechrebecki, M.M., Armstrong, E.A., Benavente, S., Gondi, V., Hsu, K.T. and Harari, P.M. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members.
Oncogene 27(28): 3944-3956.
- Wines, B.D., Powell, M.S., Parren, P.W., Barnes, N. and Hogarth, P.M. (2000). The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc gamma RI and Fc gamma RIIa bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein A.
J Immunol 164(10): 5313-5318.
- Wolf, E., Hofmeister, R., Kufer, P., Schlereth, B. and Baeuerle, P.A. (2005). BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity.
Drug Discov Today 10(18): 1237-1244.
- Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E. and Greenberg, P.D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 99(25): 16168-16173.
- Zeidler, R., Mysliwicz, J., Csanady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B. and Lindhofer, H. (2000). The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells.
Br J Cancer 83(2): 261-266.
- Zeidler, R., Reisbach, G., Wollenberg, B., Lang, S., Chaubal, S., Schmitt, B. and Lindhofer, H. (1999). Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing.
J Immunol 163(3): 1246-1252.
- Zent, C.S., Secreto, C.R., LaPlant, B.R., Bone, N.D., Call, T.G., Shanafelt, T.D., Jelinek, D.F., Tschumper, R.C. and Kay, N.E. (2008). Direct and complement dependent cytotoxicity in CLL cells from patients with high-risk early-intermediate stage chronic lymphocytic leukemia (CLL) treated with alemtuzumab and rituximab.
Leuk Res 32(12): 1849-1856.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity;</i> Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	<i>Antibody dependent cellular phagocytosis;</i> Antikörpervermittelte zelluläre Phagozytose
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AZT	Adoptive T-Zelltherapie
BiAk	Bispezifischer Antikörper
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	<i>Complement dependent cytotoxicity;</i> Komplementvermittelte Zytotoxizität
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
E:Z Ratio	Effektor- zu Zielzell-Ratio
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ER-Ep BiAk	hEGFR x mEPCAM bispezifische Antikörper
et al.	et alii
Fab	<i>Fragment antigen binding;</i> Antigen-bindendes Fragment
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting;</i> Durchflusszytometrie
FKS	Fetales Kälberserum
Fc	<i>Fragment crystallisable;</i> kristallisierbares Fragment
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FcγR	Fcγ-Rezeptor
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HCl	Chlorwasserstoff
hEGFR-Ak	Maus hEGFR-Antikörper (Mab225)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
Her2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>

IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
KD	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
LCP	Leustatin, Chymostatin, Pepstatin
M	mol/L
Maus mEpCAM-Ak	G8.8 Maus Anti-Maus EpCAM-Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mGC8	Murine Magentumorzelllinie 8
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NEAA	<i>Nonessential amino acids</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Dulbecco's <i>phosphate-buffered Saline</i>
pM	Pikomolar
Ratten mEpCAM-Ak	G8.8 Ratten Anti-Maus EpCAM-Antikörper
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i> ; Einzelketten-Fragmente der variablen Region
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40-Tag	<i>Simian Vacuolating Virus-40 T-Antigen</i>
SPR-Spektroskopie	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TriomAbs	Trifunktionalen Antikörper
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZTL	Zytotoxische T-Zellen

7.2 Veröffentlichungen

7.2.1 Veröffentlichung

Kobold, S., Steffen, J., Chaloupka, M., Grassmann, S., **Henkel, J.**, Castoldi, R., Zeng, Y., Chmielewski, M., Schmollinger, J., Schnurr, M., Rothenfußer, S., Schendel, D., Abken, H., Sustmann, C., Niederfellner, G., Klein, C., Bourquin, C. and Endres, S. (2015): Selective bispecific T cell recruiting antibody and anti-tumor activity of adoptive T cell transfer. *J Natl Cancer Inst.* 107(1). (*Journal-impact-Faktor* 15,161)

7.2.2 Poster und Kongressbeiträge

Henkel, J., Steffen, J., Graßmann, S., Zimmermann, W., Bourquin, C., Endres, S. and Kobold, S. (2012): EpCAM-targeting antibodies for the treatment of a murine model of spontaneous gastric cancer.

Cancer Immunotherapy 2012 – 10th Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy, Mainz, Abstract Book, Seite 167

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Stefan Endres, der die erfolgreiche Durchführung und Anfertigung meiner Promotionsarbeit ermöglichte. Auch für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und für seine persönliche Förderung bedanke ich mich sehr.

Herrn PD Dr. Sebastian Kobold danke ich außerordentlich für die gute Betreuung, die intensive Anleitung beim Erlernen zahlreicher Methoden sowie seiner persönlichen Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Unseren Kooperationspartnern von der Firma Roche – Dr. Raffaella Castoldi, Dr. Claudio Sustmann, Dr. Gerhard Niederfellner und Dr. Christian Klein – danke ich für die Bereitstellung des bispezifischen Antikörpers und die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinischen Pharmakologie München für ihre wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bedanken. Besonders Alex und Gabi danke ich für die Unterstützung und Aufmunterung, aber auch für die schönen Gespräche über nicht-forschungsrelevante Themen.

Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, besonders meiner Mutter und meinem Vater die mit ihrer unermüdlichen Unterstützung und Liebe nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit, sondern auch zum erfolgreichen Studienabschluss beigetragen haben. Es ist sehr wertvoll diesen Rückhalt zu spüren. Herzlichsten Dank auch meiner Nina, die mich während allen Hochs und Tiefs begleitete und mir zur Seite stand, für ihre konstruktive Kritik und für das Korrekturlesen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Charakterisierung eines neuen gegen humanes EGFR und murines EpCAM gerichteten bispezifischen Antikörpers“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den

.....

(Jonas Henkel)