

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Protease-aktivierbare T-Zell-bispezifische Antikörper für die Immuntherapie von Tumorerkrankungen

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

vorgelegt von

Martina Geiger, geb. Birk

aus Balingen, Deutschland

im Jahr 2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Böck

Prof. Dr. med. Michael Vogeser

Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. Peter Brünker, Dr. rer. nat. Christian Klein und Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2018

Für meine Familie und Freunde

Eidesstattliche Versicherung

Geiger, Martina

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

„Protease-aktivierbare T-Zell-bispezifische Antikörper für die Immuntherapie von Tumorerkrankungen“

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.

Obfelden, den 20.09.2017, Martina Geiger

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	1
2.	Abkürzungen	2
3.	Abstract	4
4.	Zusammenfassung	5
5.	Einleitung	7
5.1	Immunsystem und Krebserkrankungen	7
5.2	Immuntherapie bei Krebserkrankungen.....	7
5.3	T-Zell-bispezifische Antikörper	8
5.4	T-Zell-bispezifische Antikörper im 2 + 1 Format	8
5.5	Limitationen der T-Zell-bispezifische Antikörper im 2 + 1 Format.....	9
5.6	Zielsetzung.....	9
6.	Material und Methoden	11
6.1	Materialien.....	11
6.1.1	Verbrauchsmaterial.....	11
6.1.2	Kits.....	14
6.1.3	Kommerzielle Antikörper	15
6.1.4	Zelllinien.....	16
6.1.5	Tumorproben	17
6.1.6	Geräte.....	18
6.1.7	Software.....	18
6.2	Methoden	19
6.2.1	Generierung der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper	19
6.2.2	Klonierung der Antikörper	20
6.2.3	Expression.....	21
6.2.4	Reinigung der Antikörper	22
6.2.5	Funktionale Analyse	27
7.	Ergebnisse	33
7.1	Konstruktion und Produktion der Protease-aktivierbaren anti-CD3 Antikörper im IgG Format	33
7.2	Die Maskierung des anti-CD3-Fab reduziert die Aktivierung von T-Zellen.....	35
7.3	Konstruktion und Herstellung der Protease-aktivierbaren anti-CD3 Antikörper im TCB Format..	37
7.4	Die Maskierungseffizienz der anti-idiotypischen anti-CD3 scFv im TCB Format	40
7.5	Prot-FOLR1 TCB, invertiert <i>versus</i> klassisch	42
7.6	Der Prot-FOLR1 TCB kann durch Linkerspaltung aktiviert werden	43
7.7	Anwendbarkeit des maskierten anti-CD3-Fab für weitere TCBs	48
7.8	Reduktion der Zytotoxizität für primäre Zellen mit geringer FOLR1-Expression durch Maskierung des anti-CD3-Fabs	49
7.9	Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB durch Patientenproben.....	50
8.	Diskussion	52
8.1	Erkenntnisse dieser Arbeit.....	52
8.2	Ansätze zur Reduktion von Nebenwirkungen therapeutischer Antikörper	52
8.3	Anti-idiotypische anti-CD3-Maske.....	53
8.4	FOLR1	53
8.5	Blockierung des anti-CD3-Fab	54
8.6	Prot-FOLR1 TCB: Formatvergleich.....	55
8.7	Stabilität der Prot-FOLR1 TCBs	55
8.8	Tumor-assoziierte Proteasen und Proteaseaktivierung des Prot-FOLR1 TCBs	56
8.9	Verringerte Zytotoxizität des Prot-FOLR1 TCBs für Zellen mit geringer FOLR1-Expression.....	57
8.10	Ausblick.....	58
9.	Referenzen	59
10.	Danksagung	69
11.	Roche's Scientific Knowledge Repository	70

2. Abkürzungen

(G ₄ S) _n	Glutamin-Serin-Abfolgen
°C	Grad Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Konzentration
C1q	Proteinkomplex des Komplementsystems
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CDR	<i>Complementarit- determining regions</i>
CE-SDS	Natriumdodecylsulfatkapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate</i>)
CH1 – CH3	Konstante Region der schweren Kette 1 – 3 (<i>constant heavy chain</i>)
CL	Konstante Region der leichten Kette (<i>constant light chain</i>)
CMV	Cytomegalovirus
CV	Säulenvolumen (<i>column volumes</i>)
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
E:T	Effektor:Zielzelle-Verhältnis (<i>effector:target</i>)
EBV	Epstein Barr Virus
EC50	Mittlere effektive Konzentration (<i>half maximal effective concentration</i>)
ECACC	<i>European collection of cell cultures</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extra cellular matrix</i>)
FcRn	Neonataler Fcγ-Rezeptor
FcγR	Fc-gamma-Rezeptor
FKS	Fötale Kälberserum
FOLR1	Folat-Rezeptor-1, Synonym: Folat-Rezeptor-α
GPI	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunden
HAI	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-AktivatorInhibitor
HBepiC	Humane bronchiale Epithelzellen (<i>human bronchial epithelial cells</i>)
HC	Schwere Kette (<i>heavy chain</i>)
HEK293	Embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
His	Histidin
HrcEpiC	Humane Nierenrindenepithelzellen (<i>human renal cortical epithelial cells</i>)
i.p.	Intra-peritoneal
i.v.	Intra-venös
ICLC	<i>Interlab Cell Line Collection</i>
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
KiH	<i>Knobs-into-holes</i>
LC	Leichte Kette (<i>light chain</i>)

MABEL	<i>Minimum anticipated biological effect level</i>
MFI	Mittelwert der Fluoreszenzintensität (<i>median fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPSV	Myeloproliferatives Sarkom-Virus (<i>myeloproliferative sarcoma virus</i>)
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non essential amino acids</i>)
OriP	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PG LALA	P329G, L234A und L235A
Rcf	Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RhMatriptase	Rekombinante, humane Matriptase
RhMMP-2	Rekombinante, humane MMP-2
RhMMP-9	Rekombinante, humane MMP-9
RNS	Ribonukleinsäure
RPKM	<i>Reads per kilobase per million mapped reads</i>
Rpm	Drehzahl/Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s.c.	Subcutan
ScFv	VH und VL werden durch GS-Linker verbunden (<i>single chain variable fragment</i>)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance</i>)
TCB	T-Zell-bispezifischer Antikörper
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VH	Variable Region der schweren Kette
VL	Variable Region der leichten Kette
W/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

3. Abstract

T cell activation mediated by CD3 agonistic antibodies has proven value in tumor therapy, but systemic T cell activation is a major limitation of the approach. 2 + 1 T cell bispecific antibodies (TCB) consist of two target-antigen Fabs and one Fab targeting CD3 on T cells. TCBs crosslink tumor cells and CD3 positive T cells to induce T cell-mediated tumor cell killing. TCBs are potent and on-target toxicity in normal tissue remains a major challenge when selecting TCB targets. To prevent unspecific T cell activation, we have generated a novel masked anti-CD3-Fab fragment that can be activated by tumor-associated proteases, thereby enabling tumor-specific T cell activation. The mask is based on an anti-idiotypic anti-CD3 scFv linked to the anti-CD3-Fab fragment. Anti-idiotypic anti-CD3 antibodies were generated by immunization of mice with anti-CD3-Fab fragments. The respective anti-idiotypic anti-CD3 scFvs were fused to the N-terminus of the heavy chain of the anti-CD3-Fab fragment of a one-armed heterodimeric anti-CD3 antibody or a TCB via a protease cleavable linker. Several anti-idiotypic anti-CD3 antibodies with affinities of 0.07 to 1.5 nM were able to prevent binding to CD3 on T cells. Importantly, binding potency for CD3 could be fully recovered after cleavage with recombinant human matriptase. Similarly, co-incubation with Lovo tumor cells, expressing matriptase, allowed T cell activation through the anti-CD3-Fab (data not shown).

On-target off-tumor toxicity was seen in non-human primates with an anti-folate receptor 1 (FOLR1) TCB. To overcome this limitation, we generated a protease activatable TCB with an anti-idiotypic anti-CD3 mask connected to the anti-CD3-Fab of an FOLR1 TCB through a tumor specific protease-cleavable linker. The potency of the TCB was fully recovered following cleavage of the anti-idiotypic anti-CD3 scFv, no difference was seen in potency as compared to a conventional FOLR1 TCB. Cleavage could be achieved either by recombinant proteases including recombinant human matriptase or by proteases expressed by tumor cell lines. Similarly, malignant human ovarian cancer samples but not a benign tumor sample activated the protease activatable FOLR1 TCB. In contrast, killing of human bronchial epithelial cells and human renal cortical epithelial cells, expressing low amounts of FOLR1, was significantly reduced for the protease activatable FOLR1 TCB compared to the FOLR1 TCB. The concept of masking the anti-CD3-Fab fragment is not restricted to a FOLR1 TCB. As a consequence, this concept could be used to enhance specificity and safety of T cell activating bispecific antibodies targeting tumor antigens whose expression is not limited to tumor cells.

4. Zusammenfassung

Die Aktivierung von T-Zellen durch CD3 agonistische bispezifische Antikörper hat sich in der Tumorthherapie als vielversprechend erwiesen. Allerdings ist die systemische T-Zell-Aktivierung bisher eine Limitierung dieses Ansatzes. 2+1 T-Zell-bispezifische Antikörper (TCB) bestehen aus einem inaktiven Fc, zwei Zielantigenbindern und einem anti-CD3-Fab. TCBs verbinden die Tumorzelle mit einer CD3 positiven T-Zelle was zur T-Zell-Aktivierung und zur Lyse der Tumorzelle führt. TCBs sind sehr potent, weshalb es zu Toxizität in gesundem Gewebe kommen kann, wenn das Zielantigen nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert wird. Um unspezifische T-Zell-Aktivierung zu verhindern, wurde ein maskierter anti-CD3-Fab generiert. Die Maske wurde mit dem anti-CD3-Fab durch einen Linker verbunden, der durch tumorspezifische Proteasen gespalten werden kann. Die Maske, bestehend aus einem anti-idiotypischen anti-CD3 scFv, wurde N-terminal an die variable schwere Kette des anti-CD3-Fab-Fragments fusioniert. Zunächst wurden monovalente CD3 IgGs mit verschiedenen anti-idiotypischen anti-CD3-Masken, mit Affinitäten im Bereich von 0,07 bis 1,5 nM, generiert. Alle Masken konnten die T-Zell-Aktivierung verhindern, solange der Linker nicht geschnitten wurde. Die Bindungskapazität des anti-CD3-Fab konnte nach Linkerspaltung vollständig wiedererlangt werden. Die Abspaltung der Maske konnte sowohl durch Zugabe von rekombinanter humaner Matriptase (rhMatriptase) als auch durch Ko-Inkubation mit Matriptase exprimierenden Tumorzellen erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Anwendbarkeit des maskierten anti-CD3-Fab s zu zeigen, wurde der anti-CD3-Fab eines anti-Folat-Rezeptor-1 -TCBs (FOLR1 TCB) maskiert. Der Protease-aktivierbare FOLR1 TCB (Prot-FOLR1 TCB) erreichte nach Spaltung des Linkers die Aktivität des parentalen FOLR1 TCBs. Die Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB durch Spaltung des Linkers konnte sowohl durch rhMatriptase als auch durch Proteasen verschiedener Tumorzelllinien erfolgen. Prot-FOLR1 TCBs mit nicht-schneidbarem Linker induzierten keine bzw. deutlich geringere Tumorzelllyse. Des Weiteren konnte der Prot-FOLR1 TCB durch maligne Ovarialkarzinomproben aktiviert werden, wobei das Signal für den Prot-FOLR1 TCB und den FOLR1 TCB vergleichbar waren. FOLR1 wird nicht nur auf Tumorzellen exprimiert, sondern in geringer Anzahl auch auf gesunden Zellen, z. B. in der Lunge und der Niere (Parker et al. 2005). Aufgrund dessen wurde der FOLR1 TCB mit dem Prot-FOLR1 TCB auf humanen Bronchialepithelzellen und humanen Nierenrindeneithelzellen verglichen. Die Zytotoxizität des Prot-FOLR1 TCBs war deutlich geringer als die des FOLR1 TCBs was ein erster Hinweis war, dass die Toxizität des FOLR1 TCBs durch die Maskierung des

anti-CD3-Fabs verringert werden könnte. Der Vorteil der Maskierung des anti-CD3-Fabs liegt darin, dass dieses Konzept nicht nur für den FOLR1 TCB verwendet werden kann.

5. Einleitung

5.1 Immunsystem und Krebserkrankungen

Tumorzellen sind Zellen des eigenen Körpers, die häufig vom Immunsystem aufgrund der Selbsttoleranz nicht erkannt und angegriffen werden. Werden sie erkannt, haben Tumore verschiedene Möglichkeiten dem Immunsystem zu entkommen. So können Tumorzellen Tumorzellen infiltrierenden Immunzellen ausbremsen, indem sie immunsuppressive Liganden (z. B. PD-L1) exprimieren (Wang et al. 2016). Auch Zellen der Tumorumgebung, wie tumor-assoziierte Makrophagen (TAM, in entzündeten soliden Tumoren) können das Immunsystem inhibieren (Induktion von T-Zellanergie, Suppression von T-Zellen durch regulatorische T-Zellen) (Prendergast 2007). Erkennt das Immunsystem die Tumorzellen nicht, so können sich diese vermehren und metastasieren. Es gilt als anerkanntes Konzept, dass nur solche Tumorzellen zu einer klinisch manifesten Tumorerkrankung führen können, die nicht oder nicht mehr vom Immunsystem suffizient erkannt und zerstört werden können.

5.2 Immuntherapie bei Krebserkrankungen

Die Krebsimmuntherapie ist aufgrund bedeutender Wirksamkeit in mehreren Indikationen ist von zunehmender klinischer Bedeutung (Kobold et al. 2015). Klinisch wird die Krebsimmuntherapie vornehmlich in Form von Antikörper angewendet. Gegenwärtig besitzen diese auch unterschiedliche Wirkungsweisen: Die Induktion der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC, „antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“), Induktion des Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC, „complement dependent cytotoxicity“), Induktion der Antikörper-abhängigen zellvermittelte Phagozytose (ADCP, „Antibody-dependent cellular phagocytosis“), Induktion von direkter Apoptose und Blockade von Immun-Checkpoints. Diese Antikörper binden mit ihren variablen Bereichen an Antigene auf den Tumorzellen, der Fc-Teil des Antikörpers kann an Fc-Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen oder an das Komplementprotein C1q binden und dadurch den Tod der Tumorzellen induzieren (z.B. Rituximab (Maloney 2001), Cetuximab (Humblet 2004) und Obinutuzumab (Hoy 2015)). Manche dieser monoklonalen Antikörper binden ein Protein und blockieren es dadurch, was das Wachstum von Tumorzellen (z.B. Trastuzumab (Harries et al. 2002)) oder die Suppression von Immunzellen hemmen kann (z.B. Nivolumab (Paoluzzi et al. 2016), Ipilimumab (Larkin et al. 2015)). Die meisten derzeit klinisch angewendeten Antikörper sind IgG-basierte Antikörper. T-Zell-bispezifische Antikörper hingegen besitzen eine andere Struktur und Wirkungsweise.

5.3 T-Zell-bispezifische Antikörper

T-Zell-bispezifische Antikörper adressieren zwei verschiedene Antigene, ein Antigen auf der Tumorzelle und CD3 auf der T-Zelle. Dadurch können T-Zellen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-unabhängig aktiviert werden können. Sowohl Fc-freie bispezifische Antikörper, sogenannte BiTEs (bispecific T cell engagers) (Huehls et al. 2015, Le Jeune et al. 2016, Smits et al. 2016) als auch IgG-basierte T-Zell-bispezifische Antikörper finden klinische Anwendung (Bacac et al. 2016). Catumaxomab ist ein IgG-basierter anti-EpCam-CD3 Antikörper (Staerz et al. 1985). Es handelt sich um einen Ratte/Maus hybriden Antikörper mit funktionalem Fc. Catumaxomab ist der erste zugelassene bispezifische Antikörper. Die Zulassung betrifft die Therapie des malignen Aszites. Dieser bispezifische Antikörper induziert eine hohe systemische Immunaktivierung, daher ist er auf die lokale Anwendung beschränkt. Die nicht-humanisierten Bereiche des Antikörpers und der Fc-Teil können im Menschen zu einer starken Immunreaktion führen. Die Problematik des aktivierenden Fc-Teils gibt es bei den Blinatumomab (BLINCYTO[®]), der zweite zugelassene bispezifische Antikörper nicht, jedoch haben diese Antikörper eine kurze Halbwertszeit und müssen daher über intravenöse Dauerinfusionen (Infusionspumpe) verabreicht werden (Sanford 2015). Ein Vorteil der kurzen Halbwertszeit ist, dass bei Anzeichen von Toxizität die Verabreichung sofort gestoppt werden kann und der Antikörper innerhalb von wenigen Stunden abgebaut ist.

5.4 T-Zell-bispezifische Antikörper im 2 + 1 Format

T-Zell-bispezifische Antikörper sind sehr potente, bislang aber experimentelle Antikörper, die serielle T-Zell vermittelte Tumorzelllyse induzieren können, indem sie Tumorzelle und T-Zelle binden und eine sogenannte immunologische Synapse ausbilden. T-Zell bispezifische Antikörper im 2+1 Format (TCB) bestehen aus einem nicht-funktionalen Fc, zwei Fabs gegen Antigene auf der Tumorzelle und einem Fab gegen CD3 (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016, Klein et al. 2017). Die Diskriminierung zwischen Tumorzellen, die viel Antigen exprimieren und gesunden Zellen, die wenig Antigen exprimieren wird durch die Avidität der beiden Tumorantigen-Bindeeinheiten verbessert. Für CD3 sind die TCBs monovalent, damit die Aktivierung der T-Zellen über CD3 nur durch Kreuzvernetzung mit Tumorzellen stattfinden kann. Die Aktivierung der T-Zellen durch den TCB benötigt keinen Ko-Stimulus (Arndt et al. 2013, Haas et al. 2009, Hoffmann et al. 2005, Offner et al. 2006). Der Fc-Teil stabilisiert den Antikörper und trägt dadurch zu einer verlängerten Halbwertszeit im Vergleich zu kleineren Fc-freien Formaten bei (Le Jeune et al. 2016, Roskopf et al. 2016). Des Weiteren wird die systemische Aktivierung von Immunzellen mittels FcγR- oder

Komplement-Aktivierung verhindert. Die Inaktivierung des Fc erfolgt durch das Einfügen dreier Mutationen (L234A/L235A; P329G) in CH2 und CH3, wodurch das Recycling über FcRn aber nicht beeinträchtigt wird (Schlothauer et al. 2016).

Kürzlich wurde die potenzielle Wirksamkeit eines Carcinoembryonalen Antigen (CEA) spezifischen TCB in zwei frühen klinischen Studien gezeigt (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016, ClinicalTrials.gov 2014, Klein et al. 2017). Eine anti-tumorale Wirkung könnte in Patienten mit CEA-positiven soliden Tumoren, inklusive "microsatellite stable" (MSS) metastatischen colorektalen Tumoren (mCRC), die CEA überexprimieren und trotz mindestens zwei Chemotherapie-Zyklen fortgeschritten sind, existieren. Eine anti-tumorale Potenz deutet sich auch in Kombination mit TECENTRIQ® (atezolizumab, einem PD-L1-spezifischen Antikörper) an (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016, ClinicalTrials.gov 2014, Klein et al. 2017). Der CEA TCB induziert die Lyse von Tumorzellen, die viel CEA exprimieren, während gesunde Zellen nicht lysiert werden. Für die CEA TCB induzierte Tumorzellyse ist eine minimale Anzahl an CEA Antigenen (>10.000 CEA Antigene / Zelle) erforderlich (Bacac et al. 2016).

5.5 Limitationen der T-Zell-bispezifische Antikörper im 2 + 1 Format

Diesen Schwellenwert gibt es jedoch nicht für alle TCBs, manche können sogar gesunde Zellen mit niedriger Zielantigendichte (weniger als 1000 Antigene / Zelle) lysieren. Wird das Zielantigen auch auf normalen Zellen exprimiert, kann es zu Toxizität in diesem Gewebe kommen (Hinrichs et al. 2013). Da es kaum Tumorspezifische Oberflächenantigene gibt, wird dadurch die Anwendbarkeit von TCBs limitiert.

5.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Testung eines selektiv aktivierbaren TCB. Die Selektivität der T-Zellaktivierung durch den TCB sollte erhöht werden, um dadurch die potenzielle Toxizität für gesunde Zellen mit geringer Zielantigenexpression (on-target off-tumor toxicity) zu verringern. Dies sollte am Beispiel eines Protease-aktivierbare FOLR1 TCB (Prot-FOLR1 TCB) demonstriert werden. Dieser FOLR1 TCB bleibt in gesundem Gewebe maskiert (Abbildung 1, links) und kann dadurch keine T-Zell vermittelte Zellyse induzieren. Im Tumor wird der Linker durch tumorspezifische Proteasen gespalten (Abbildung 1, rechts), wodurch der anti-CD3-Fab an CD3 ϵ binden und dadurch eine T-Zell vermittelte Tumorzellyse induzieren kann.

Für die tumorspezifische Aktivierung macht man sich die erhöhte Aktivität von gewissen Proteasen im Tumor zu Nutze. Die Protease-Aktivierung von sogenannten „Prodrugs“ wurde bereits für verschiedene Formate und Zielantigene beschrieben: Desnoyers *et al.* beschrieben einen EGFR mAb mit Peptid-maskierten EGFR Fabs (Desnoyers et al. 2013), Wüest *et al.* generierten die sogenannte „TNF-Selectokine Prodrug“ ein durch Proteasen aktivierbarer Tumornekrosefaktor (TNF) (Wuest et al. 2002), Watermann *et al.* fusionierten einen CD95L an FAP und Metz *et al.* generierten eine Her3 Antikörper mit einer sterisch blockierten c-Met Einheit (Metz et al. 2012, Watermann et al. 2007). Diese „*prodrugs*“ zeigten verringerte Toxizität bei ähnlicher Wirksamkeit verglichen zu dem Antikörper auf dem sie basieren.

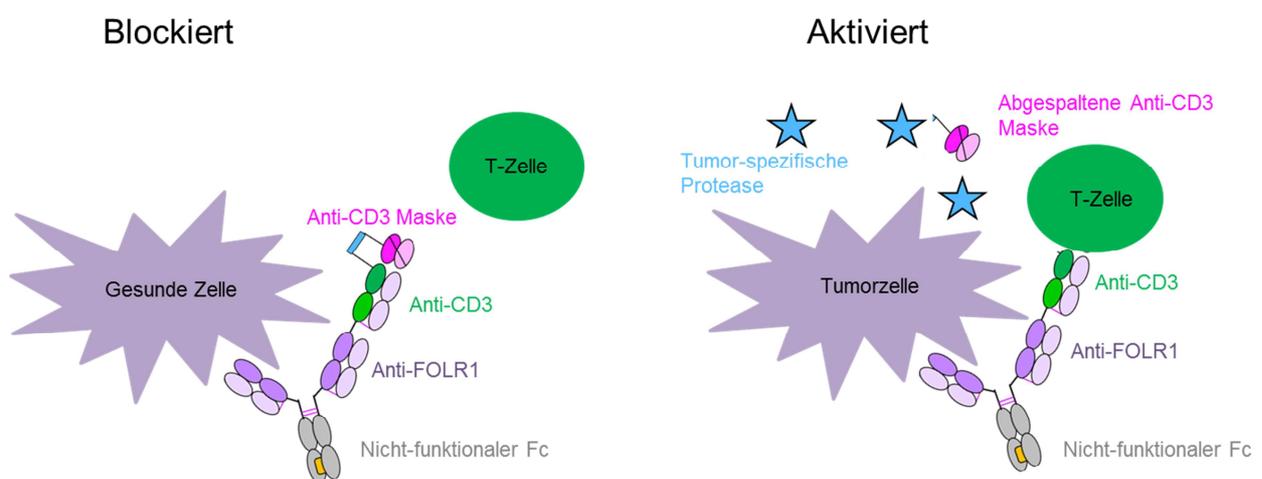


Abbildung 1: Wirkungsmechanismus des Prot-FOLR1 TCB.

Die anti-idiotypische anti-CD3-Maske verhindert die Bindung des anti-CD3-Fabs an CD3ε im T-Zell Rezeptor der T-Zelle (links). In der Tumorumgebung kann der Linker durch Proteasen geschnitten werden, wodurch der anti-CD3-Fab an CD3ε binden kann. Bindet der TCB an das Tumorantigen (FOLR1) und an CD3ε wird die T-Zelle aktiviert und kann die Tumorzelle lysieren.

Folgende Fragstellungen sollten dabei bearbeitet werden: 1) Für die Generierung eines Protease-aktivierbaren TCB sollte eine spezifische anti-idiotypische anti-CD3-Maske generiert werden, die den anti-CD3-Fab blockieren kann. 2) Die Maskierungseffizienz der anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs sollte zunächst im IgG-Format und anschliessend im TCB Format (anti-CD3 IgG, FOLR1 TCB) getestet werden, um eine optimale Maske zu finden. 3) Die Aktivierbarkeit der Antikörper sollte sowohl durch rekombinante Proteasen als auch durch zelluläre Proteasen möglich sein und der maskierte anti-CD3-Fab sollte für mehrere TCBs (verschiedene Zielantigene und verschiedene Formate) gezeigt werden. 4) Die mögliche Reduktion der Toxizität durch die Maskierung des anti-CD3-Fab sollte für primäre Zellen mit geringer FOLR1-Expression untersucht werden.

6. Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Verbrauchsmaterial

6.1.1.1 Plastikware

- 96- Well F-Boden Zellkulturtestplatten (92696, TPP, Schweiz)
- Corning® Erlenmeyer cell culture flasks 125 ml, 500 ml (430421, 430422; Sigma, Schweiz)
- Eppendorf Safe-Lock Tubes (0030121.589, Eppendorf, Schweiz)
- Immunoplates Maxisorp F Boden 400 ml MaxiSorp (10547781, Fisher Scientific, Schweiz)
- Millicell Cell Culture Insert, 12 mm, hydrophilic PTFE, 0.4 µm (PICM01250, Sigma, Schweiz)
- NuPAGE® Novex® 3-8% Tris-Acetate Protein Gels, 1.0 mm, 15 well (EA03755BOX, FisherScientific, Schweiz)
- NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12 well (NP0322PK2, FisherScientific, Schweiz)
- TubeSpin® Bioreactor 600 (87600, TPP, Schweiz)
- Vakuumfilter „rapid“-Filtermax (99255, TPP, Schweiz)
- Weiße 96-Well Platte mit durchsichtigem Boden (655098, Greiner Bio-one, Schweiz)
- Zellkulturflaschen T25, T75, T150 (90025, 90075, 90150; TPP, Schweiz)

6.1.1.2 Enzyme

- AfeI (R0652L, Bioconcept AG, Schweiz)
- AgeI (R0552L, Bioconcept AG, Schweiz)
- BamHI (R0136L, Bioconcept AG, Schweiz)
- BsiWI (R0553L, Bioconcept AG, Schweiz)
- BsmI (R0134L, Bioconcept AG, Schweiz)
- BspEI (R0540L, Bioconcept AG, Schweiz)
- BsrGI (R0575L, Bioconcept AG, Schweiz)
- BstEII (R0162L, Bioconcept AG, Schweiz)
- DraIII-HF (R3510L, Bioconcept AG, Schweiz)
- EcoRI (R0101L, Bioconcept AG, Schweiz)
- MfeI (R0589L, Bioconcept AG, Schweiz)
- NheI (R0131L, Bioconcept AG, Schweiz)
- NotI (R0189L, Bioconcept AG, Schweiz)
- rhMatriptase/ST14 (3946-SE-010, Bio-Techne AG, Schweiz)
- rhMMP-2 (902-MP-010, Bio-Techne AG, Schweiz)
- rhMMP-9 (911-MP-010, Bio-Techne AG, Schweiz)

- SacII (R0157L, Bioconcept AG, Schweiz)
- T4 DNA Ligase (10481220001, Roche, Schweiz)
- XbaI (R0145L, Bioconcept AG, Schweiz)

6.1.1.3 Reagenzien und Puffer

- 2xYT Broth Pulver (6271001, Faust Laborbedarf, Schweiz)
- ACK Lyse Puffer (A1049201, FisherScientific, Schweiz)
- Agarose LE (11685678001, Roche, Schweiz)
- DMSO (D2650-100ml, Sigma, Schweiz)
- DPBS (14190136, FisherScientific, Schweiz)
- Formalinlösung, 10 % Formalin (ca. 4 % Formaldehyde) (HT 501320-9.5L, Sigma, Schweiz)
- Glycin (50046, Sigma, Schweiz)
- HBS-EP+ Buffer 10× (BR100669, GE Healthcare, VWR, Schweiz)
- Heparin-NA Braun 250000 E/5ml 10 Durchst.flaschen 5 ml (Zur Rose Suisse AG, Schweiz)
- Histidin-HCl, 20 mmol/l, pH 6 (Bichsel AG, Schweiz)
- Histopaque®-1077 (10771, Sigma, Schweiz)
- Natriumacetat (S2889, Sigma, Schweiz)
- Natriumazid (S8032, Sigma, Schweiz)
- Natriumchlorid (71376, Sigma, Schweiz)
- Natriumcitrat monobasisch (71497, Sigma)
- Natriumphosphat dibasisch (71643, Sigma, Schweiz)
- Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X) (LC2676, FisherScientific, Schweiz)
- NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) (NP0002-02, FisherScientific, Schweiz)
- NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) (NP0001-02, FisherScientific, Schweiz)
- NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X) (LA0041, FisherScientific, Schweiz)
- ONE-Glo™ Luciferase Assay System (E6120, Promega, Schweiz)
- Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin) (A9576, Sigma, Schweiz)
- Schwefelsäurelösung (Sulfuric acid solution, 1M) (35276, FisherScientific, Schweiz)
- SYBR® Safe DNA Gel Stain (S33102, FisherScientific, Schweiz)
- TMB High Sensitivity Substrate Solution (421501, BioLegend, LUCERNA-CHEM, Schweiz)
- TWEEN® 20 (11332465001, Roche, Schweiz)
- UltraPure™ DNA Typing Grade® 50X TAE Buffer (24710-030, FisherScientific, Schweiz)

6.1.1.4 Säulen und Chips für die Proteinreinigung und –analyse

- HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg, 125ml Säulenvolumen (28-9893-35, GE Healthcare, VWR, Schweiz)
- HiTrap rProtein A FF, 5 ml Säulenvolumen (17-5080-01, GE Healthcare, VWR, Schweiz)
- MabSelect SuRe (11-0034-95, GE Healthcare, VWR, Schweiz)
- Sensor Chip CM5 (BR100012, GE Healthcare, VWR, Schweiz)
- Superdex 200 Increase 10/300 GL (28-9909-44, GE Healthcare, VWR, Schweiz)
- Tosoh TSKgel® G3000SWXL HPLC Column (808541, SUPELCO, Sigma)

6.1.1.5 Proteinstandard

- DNA Gel Loading Dye (6X) (R0611, FisherScientific, Schweiz)
- GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331, FisherScientific, Schweiz)
- HiMark (LC5699, FisherScientific, Schweiz)
- Mark12™ Unstained Standard (LC5677, FisherScientific, Schweiz)

6.1.1.6 Seren

- Fötales Kälberserum (16140-071, FisherScientific, Schweiz)
- Humanes IgG freies Serum (SP1839, TRINA BIOREACTIVES AG, Schweiz)

6.1.1.7 Zellkulturmedien

- BEpiCM Medium (3211, ScienCell, Chemie Brunschwig AG, Schweiz)
- CD CHO Medium (10743029, FisherScientific, Schweiz)
- DMEM Medium (42430-025, FisherScientific, Schweiz)
- EpiCM Medium (4101, ScienCell, Chemie Brunschwig AG, Schweiz)
- EX-CELL® HeLa Serum-Free Medium for HeLa Cells (14591C, Sigma, Schweiz)
- EX-CELL® 293 Serum-Free Medium for HEK 293 Cells (14571C, Sigma, Schweiz)
- RPMI1640 Medium (42401-018, FisherScientific, Schweiz)

6.1.1.8 Medienzusätze

- Ammonium-Fe(III)-Citrate (F5879, Sigma, Deutschland)
- Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, phenol red-free (734-1101, VWR, Deutschland)
- D-(+)-Glukoselösung (G7021, SIGMA, Schweiz)
- Ethanolamine (E0135, Sigma, Schweiz)
- FreeStyle™ F17 Expression Medium (A1383501, FisherScientific, Schweiz)
- G418 (10131027, FisherScientific, Schweiz)
- GlutaMAX™ (35050061, FisherScientific, Schweiz)
- HEPES (15630080, FisherScientific, Schweiz)
- HT supplement (11067030, FisherScientific, Schweiz)
- Hygromycin B (10843555001, Sigma, Schweiz)
- HyPep 1510 (20070715, Kerry Biosciences, Irland)
- L-Asparagin (A7094, Sigma, Schweiz)
- L-Glutamin (G8540, Sigma, Schweiz)
- Natrium Bicarbonat NaHCO₃ (S8761, Sigma, Schweiz)
- Natriumpyruvat (11360070, FisherScientific, Schweiz)
- Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) (M7145, Sigma, Schweiz)
- Poly-L-Lysin (0403, ScienCell, Chemie Brunschwig, Schweiz)
- Puromycin 10mg / ml (ant-pr-1, InvivoGen, LabForce AG, Schweiz)
- TNS Trypsin Neutralization Solution (0113, ScienCell, Chemie Brunschwig, Schweiz)
- Trypsin/EDTA, 0.05 % (25300054, FisherScientific, Schweiz)
- Ultrapep Soy (20070591, Kerry Biosciences, Irland)
- Valproinsäure Natriumsalz (P4543, Sigma, Schweiz)

6.1.2 Kits

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (11644793001, Roche, Schweiz)
- FTA Sample Collection Kit for Human Cell Authentication Service (ATCC® 135-XV-5™, ATCC, LGC Standards GmbH, Deutschland)
- GeneRacer Kit (L1500-01, Fisher Scientific, Schweiz)
- Human IFN-gamma DuoSet ELISA, 15 Plate (DY285, R&D Systems, Bio-Techne AG, Schweiz)
- MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (LT07-118, Lonza, Schweiz)
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (740609.250, MACHEREY-NAGEL, Schweiz)
- NucleoSpin® Plasmid (740588.250, MACHEREY-NAGEL, Schweiz)
- Plasmid Plus Maxi Kit (12965, Qiagen, Schweiz)

- Plasmid Plus Midi Kit (12945, Qiagen, Schweiz)
- QIFIKIT® (K007811-8, Agilent technologies AG, Schweiz)
- QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (210513-5, Agilent technologies AG, Schweiz)
- RNeasy® Mini Kit (74106, Qiagen, Schweiz)
- Taq PCR core kit (201225, Qiagen, Schweiz)

6.1.3 Kommerzielle Antikörper

- Anti-human Fc Antibody (409302, BioLegends, Lucerna-Chem AG, Schweiz), finale Konzentration: 8 µg / ml,
- APC anti-human CD8 Antibody (344722, BioLegend, Lucerna-Chem AG, Schweiz), 0.8µl / 0.025ml / 0.2 mio PBMCs
- Brilliant Violet 421™ anti-human CD25 Antibody (356114, BioLegend, Lucerna-Chem AG, Schweiz), 0.8µl / 0.025ml / 0.2 mio PBMCs
- Brilliant Violet 421™ anti-human CD4 Antibody (317434, BioLegend, Lucerna-Chem AG, Schweiz), 0.8µl / 0.025ml / 0.2 mio PBMCs
- FITC anti-human CD4 Antibody (357406, BioLegend, Lucerna-Chem AG, Schweiz), 0.8µl / 0.025ml / 0.2 mio PBMCs
- PE anti-human CD69 Antibody (310906, BioLegend, Lucerna-Chem AG, Schweiz), 0.8µl / 0.025ml / 0.2 mio PBMCs
- PE anti-human CD8 Antibody (344706, BioLegend, Lucerna-Chem AG, Schweiz), 0.8µl / 0.025ml / 0.2 mio PBMCs

6.1.4 Zelllinien

6.1.4.1 Produktionszelllinie

Tabelle 1: Name, Herkunft, Bestellinformationen und Medien der Expressionszelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Zulieferer	Kultivierungs-Medium
HEK293 EBNA Suspensionszellen	Human, Niere	ATCC, LGC Standards GmbH, Deutschland	EX-CELL [®] GTM3 Medium mit 6 mM L-Glutamine and 250 µg / ml G418

HEK293 EBNA Suspensionszellen wurden zweimal wöchentlich auf ca. 0,3 mio / ml verdünnt und einen Tag vor Transfektion auf 1,5 mio cells / ml in EX-CELL[®] Medium mit 6 mM L-Glutamine eingesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Infors HT Shaker bei 135 rpm inkubiert.

6.1.4.2 Tumorzelllinien

Tabelle 2: Name, Herkunft, Bestellinformationen und Medien der Tumorzelllinien.

Zelllinienname	Herkunft	Bestellnummer und Zulieferer	Kultivierungsmedium
AsPC-1	Human, Pankreas; abgeleitet von Metastase: Aszites, Pankreaskarzinom	96020930, ECACC, USA	RPMI1640, 1 x GlutaMAX [™] , 10 % FKS, 1 x Natriumpyruvat
CellPlayer [™] MDA- MB-231 NucLight Red Zellen	Human, Milchdrüsen/Brust, abgeleitet von Metastase: Pleuraerguss, Mammakarzinom	4487, Essen BioScience, USA	RPMI1640, 1 x GlutaMAX [™] , 10 % FKS, 0,5 µg / ml
HeLa	Human, Cervix, epithelial, Zervixkarzinom	ATCC [®] CCL-2 [™] , ATCC, LGC Standards GmbH, Deutschland	DMEM, 1 x GlutaMAX [™] , 10 % FKS
NCIH596	Human, Lunge, epithelial, Lungenkarzinom	Roche Innovation Center Munich, Deutschland	RPMI1640 (A10491-01), 10 % FKS
Skov-3	Human, Ovar; Aszites, epithelial, Ovarialkarzinom	ATCC [®] HTB-77 [™] , ATCC, LGC Standards GmbH, Deutschland	RPMI1640, 1 x GlutaMAX [™] , 10 % FKS

Alle Tumorzelllinien wurden routinemässig zweimal wöchentlich mit 0,05 % Trypsin/EDTA passagiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und regelmässig mit einem MycoAlert[™] Mycoplasma Detection Kit auf Mycoplasmen untersucht. Nach Beendigung der Versuche wurden diese Tumorzelllinien auf ihre Identität überprüft (FTA cell authentication service; ATCC (Reid et al. 2004)).

6.1.4.3 Primäre Zelllinien

Tabelle 3: Name, Herkunft, Bestellinformationen und Medien der Primärzelllinien.

Zelllinienname	Herkunft	Bestellnummer und Zulieferer	Kultivierungsmedium
Humane Bronchialepithelzellen (HBEPiC)	Human, Bronchien	3210, BEpiCM, ScienCell, Chemie Brunschwig AG, Schweiz	BEpiCM (3211, ScienCell)
Humane Nierenrindenepithelzellen (HrcEPiC)	Human, Niere	4110, EpiCM, ScienCell, Chemie Brunschwig AG, Schweiz	EpiCM (4101, ScienCell)

Alle primären Zelllinien wurden routinemässig zweimal wöchentlich mit einer 1:1 Mischung aus DPBS und 0,05 % Trypsin/EDTA passagiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

6.1.4.4 Jurkat NFAT Reporterzellen zur Messung der CD3 Aktivierung

Tabelle 4: Name, Herkunft, Bestellinformationen und Medien der Reporterzelllinie.

Zelllinienname	Herkunft	Bestellnummer und Zulieferer	Kultivierungsmedium
GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P	Human, immortalisiert, T-Lymphozyten	CS176501, Promega (Schweiz)	RPMI1640 Medium mit 2 g/l D-Glukose, 2 g/l NaHCO ₃ , 10 % FKS, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 x NEAA, 1 x Natrium-Pyruvat, 200 µg / ml Hygromycin B

Die Jurkat-NFAT Reporter Zelllinie ist eine humane akute lymphatische Leukämie Zelllinie mit einem NFAT Promotor vor einem Luziferase Gen. Die Jurkat NFAT Zellen exprimieren CD3ε wodurch die Aktivierung über CD3 mit der Expression von Luziferase korreliert. Nach Zugabe einer Substratlösung (OneGlo, Promega) kann die Lumineszenz gemessen werden. Jurkat NFAT Zellen wurden routinemässig zweimal wöchentlich auf 0,3 mio/ml verdünnt und bei 37 °C und 5 % CO₂ in kultiviert. 200 µg / ml Hygromycin B wurden jeweils frisch dazugegeben, wenn die Zellen passagiert wurden.

6.1.5 Tumorproben

Die anonymisierten Tumorproben wurden bei der Indivumed GmbH (Deutschland) gekauft. Die Firma Indivumed GmbH folgt der Einhaltung „The Declaration of Helsinki and The Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine“.

6.1.6 Geräte

- 8K Zentrifuge (Sigma, Schweiz) Zentrifugation
- Aekta Explorer 10 (GE Healthcare, Schweiz) Proteinreinigung
- Aekta Purifier (GE Healthcare, Schweiz) Proteinreinigung
- Biacore T200 (GE Healthcare, Schweiz) SPR Analysen
- Caliper LabChip GXII System (Caliper Lifescience) Kapillarelektrophorese
- Centifuge 5415D (Eppendorf, Schweiz) Zentrifugation
- Centifuge 5810R (Eppendorf, Schweiz) Zentrifugation
- HeraCell 150 (Thermo Cooperation, Germany) Inkubation adherenter Zellen
- HPLC 1100 (Agilent Technologies AG, Schweiz) Analytische Gelelektrophorese
- IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (EssenBioSciences) Lebendzellanalyse
- Infors HT Shaker (Infors AG, Schweiz) Inkubation von Suspensionszellen
- MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotech, Deutschland) FACS Analysen
- Mastercycler proS (Eppendorf, Schweiz) PCR
- NanoDrop2000 (FisherScientific, Schweiz) Konzentrationsmessung DNS
- Optim2 Gerät (Avacta) Hitzestabilität
- SpectraMax M5 (Bucher Biotech AG, Schweiz) LDH-Analysen
- VERSAmax (Bucher Biotech AG, Schweiz) LDH-Analysen
- Vi-Cell™XR (BECKMAN COULTER™) Zellzahlbestimmung
- WALLAC Victor3 ELISA Reader (PerkinElmer2030) Lumineszenzanalysen

6.1.7 Software

- Biacore T200 Evaluation Software (version 3.1) SPR Analyse
- Clone Manager 9 Klonierungsplanung
- FlowJo VX Software v10 FACS Daten Analyse
- GraphPad Prism6 Graphen, Statistische Berechnungen
- IncuCyte ZOOM 2016A Graphen für Lebendzellanalyse
- LabChip GX Kapillarelektrophoreseanalyse
- Minitab 17 Statistical Software Statistische Berechnungen

6.2 Methoden

6.2.1 Generierung der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper

Für die spezifische Maskierung des anti-CD3-Fabs wurden anti-idiotypische anti-CD3 Antikörper generiert. Die Immunisierung der Mäuse wurde im Roche Innovation Center Munich von Kay-Gunnar Stubenrauch, Mirko Ritter und Michael Schräml durchgeführt. Die Hybridoma Zellen wurden an Manuel Späni, Roche Innovation Center Zurich, übergeben. Manuel Späni hat die Sequenzen der variablen Bereiche der Antikörper mittels RACE ermittelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

6.2.1.1 Charakterisierung der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper

Die Charakterisierung der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper (mit humanem IgG1) erfolgte mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR). Dazu wurden zunächst die Antikörper als humane IgGs kloniert, exprimiert und gereinigt. Die Affinitäten der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper wurden zum anti-CD3-Fab und zum anti-CD3-Fab in den verschiedenen TCB Formaten gemessen und zusammengefasst (Tabelle 5). Die SPR-Analysen wurden im *Roche Innovation Center Zurich* von Anne Freimoser Grundschober durchgeführt.

Tabelle 5: SPR Analyse der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper gegen anti-CD3 in verschiedenen Formaten.

Die Dissoziationskonstanten von zwei unabhängigen Läufen wurden gemittelt und sind in der Tabelle angegeben.

Clone ID	Anti-CD3-Fab	Klassischer TCB	Invertierter TCB
4.15	2 nM	20 nM	500 nM
4.24	0,3 nM	3 nM	55±5 nM
4.32	2 nM	10 nM	20 nM

6.2.2 Klonierung der Antikörper

Die variablen Ketten der anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs wurden mit einem (G₄S)₄-Linker verbunden und zwei Cysteine (VH44-VL100) wurden eingefügt, um die scFvs über Disulfidbrücken zu stabilisieren (Reiter et al. 1994, Reiter et al. 1994). Die Gensynthese der scFvs, mit den benötigten Schnittstellen, wurde bei Invitrogen bestellt. Die scFvs wurden in einem Plasmid N-terminal an die VH des anti-CD3-Fabs fusioniert. Alle benötigten Ketten (Fc hole, Fc knob, LC) wurden einzeln in Expressionsvektoren (pSTAN1 und Derivate, Roche Innovation Center Zurich) kloniert. Die Expression erfolgte unter einem chimären MPSV Promotor, bestehend aus einem MPSV core Promotor und einem CMV Verstärker. Die Expressionskassetten enthielten ebenfalls eine synthetische polyA Sequenz am 3'Ende der cDNS und einen EBV-OriP. Um einen möglichst hohen Anteil an korrekt gepaarten Heterodimeren zu erhalten, wurde die "knobs-into-holes" Technologie verwendet (Ridgway et al. 1996). Die Mutationen P329G, L234A und L235A (PG LALA) wurden in die CH3 und CH2 eingefügt, um die Bindung des Fc-Teils an FcγR und C1q zu verhindern (Hessell et al. 2007). Für FOLR1 und anti-CD3 konnte eine gemeinsame leichte Kette verwendet werden. Konnte keine gemeinsame LC verwendet werden (z.B. für Mesothelin TCB), wurde die CrossMAb^{VH-VL} Technologie (anti-CD3) und geladene konstante Ketten (anti-MSLN) angewendet, um die korrekte Paarung der leichten Ketten sicherzustellen (Ast et al. 2016, Klein et al. 2012, Schaefer W 2011). Alle Linker bestanden aus 33 Aminosäuren, die verschiedene Protease Schnittstellen oder nur Glycin und Serin enthielten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Aminosäuresequenzen der verschiedenen Linker.

Die Protease-Erkennungssequenz ist unterstrichen und die Quelle sowohl wie die Linkerlänge sind angegeben.

Name	Aminosäuresequenz	Referenz	Linkerlänge
Matriptase Linker	GGGSGGGGS <u>RQARVVNG</u> GGGSGGGSGGGGS	Merops Datenbank	33
MMP-2,-9-Matriptase Linker	GGGGS <u>VHMPLGFLGPRQARVVNG</u> GGGSGGGGS		33
Nicht-schneidbarer Linker	GGGSGGGSGGGSGGGGGGGSGGGSGGGGS		33
MMP-2,-9 Linker	GGGSGGGGS <u>VHMPLGFLG</u> PGGGSGGGSGGGGS	Patent Veröffentlichung WO 2010/081173 A2	33

6.2.3 Expression

Für die transiente Expression wurden die Plasmide im entsprechenden Verhältnis in HEK293 EBNA Suspensionszellen ko-transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Polyethylenimine (PEI, Polysciences Inc.). Dazu wurden 10 µg Plasmid DNS (1 µg / ml) mit 10 ml CD CHO Medium (mit 6 mM L-Glutamin, 37 °C) gemischt bevor 27 µl PEI (1 mg / ml) dazugegeben wurden. Die Lösung wurde sofort für ca. 15 s gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gezählt und 20 mio Zellen wurden bei 210 rcf für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml CD CHO Medium (mit 6 mM L-Glutamin, 37°C) resuspendiert bevor die Medium/DNS/PEI Mischung dazugegeben wurde. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 135 rpm in einer 125 ml Corning® Erlenmeyer Flasche wurden 80 ml ExCell Medium (mit 6 mM L-Glutamin, 5 g / l PEPSOY und 1,2 mM Valproinsäure) zugegeben. Ca 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit einer Nährlösung (12 % Feed 7 / Volumen, Tabelle 7) und 3 g / l Glukose versorgt. Für grössere Transfektionsvolumina wurden das gleiche Protokoll verwendet und die Mengen entsprechend hochskaliert. Für Volumina ab 200 ml wurden TubeSpin® Bioreactor 600 verwendet. Sechs Tage nach der Transfektion wurden die Antikörper im Überstand durch Zentrifugation bei 210 x g (Sigma 8K Zentrifuge) für 20 bis 30 min geerntet und steril filtriert (0,22 µm Vakuumbfilter „rapid“-Filtermax; TPP). Der Überstand wurde mit einer finalen Konzentration von 0,01 % w/v an Natriumazid bei 4 °C gelagert bis die Reinigung erfolgte.

Tabelle 7: Zusammensetzung Feed 7

Komponente	Firma Bestellnummer	Menge	Einheit	Einwaage
D-(+)-Glukose	Sigma	6,5	g/l	26 g
L-Glutamin	Sigma	3,0	g/l	12 g
L-Asparagin Monohydrat	Sigma	2,0	g/l	8 g
Ethanolamine	Sigma	0,3	ml/l	1,2 mL
Hypep 1510	Kerry Biosciences	30,0	g/l	120 g
Ammonium Fe (III) citrate	Sigma	85,5	mg/l	342 mg
F17	Sigma	ad 4	l	

6.2.4 Reinigung der Antikörper

Die sekretierten Antikörper wurden durch Affinitäts-Chromatographie (Protein A) und anschliessender Grössenausschluss-Chromatographie (SEC) gereinigt. Der filtrierte Überstand wurde entweder auf eine HiTrap Protein A FF Säule (CV = 5 mL, GE Healthcare) oder eine MabSelect SuRe Säule (CV = 5 mL, GE Healthcare) geladen (20 mM Natrium Citrat, 20 mM Natrium Phosphat, pH 7,5). Ungebundenes Protein wurde mit zehn Säulenvolumen (20 mM Natrium Citrat, 20 mM Natrium Phosphat, pH 7,5) ausgewaschen bevor das Protein mit Elutionspuffer (20 mM Natrium Citrate, 100 mM Natrium Chloride, 100 mM Glycine, pH 3) eluiert wurde. Die Elution erfolgte in einem Puffergradienten von 0 – 100 % über 10 - 20 Säulenvolumen. Die Proteinlösung wurde direkt mit 0,5 M Na₂HPO₄ pH 8 (1:10) oder Tris pH 8 (1:10) neutralisiert und mit Amicon®Ultra-15 Ultracel 30K Säulen auf max. 5 ml konzentriert. Für die Grössenausschlusschromatographie wurde eine HiLoad 16/600 S200 , 120 ml Säule mit 0.5 Säulenvolumen 0,5 M NaOH gereinigt und dann mit zwei Säulenvolumen 20 mM Histidine, 140 mM NaCl, pH 6 equilibriert bevor die Proteinlösung injiziert wurde. Die Proteinkonzentration wurde berechnet indem der Wert der optischen Dichte bei 280 nm abzüglich des Wertes bei 320 nm durch den aus der jeweiligen Aminosäurezusammensetzung berechneten Extinktionskoeffizienten geteilt wurde.

$$(A_{280} - A_{320}) / \text{Extinktionskoeffizient} = \text{Proteinkonzentration}$$

Die Reinheit der Antikörper wurde durch analytische Grössenausschluss-Chromatographie und durch Kapillarelektrophorese (reduziert und nicht-reduziert) gemessen. Für die analytische Grössenausschluss-Chromatographie wurde eine TSKgel G3000 SW XL Säule verwendet. Der Puffer enthielt 25 mM K₂HPO₄, 125 mM NaCl, 200 mM L-Arginin Monohydrochloride, 0,02 % (w/v) NaN₃, pH 6,7. Für die Kapillarelektrophorese wurde das Caliper LabChip GXII System nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die TSK- und Kapillarelektrophorese-Proben wurden im *Roche Innovation Center Zurich* von den Abteilungen „*Protein Engineering*“ und „*Process Biochemistry*“ prozessiert.

6.2.4.1 Qualität der Prot-mαCD3 IgGs

Alle Prot-mαCD3 IgGs wurden transient in HEK293 EBNA Suspensionszellen (serumfrei) produziert. Nach Reinigung der Antikörper wurden diese auf ihren Monomergehalt und ihre Reinheit untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Analytische Grössenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Reinheit der verschiedenen Prot-m α CD3 IgGs.

Antikörper- bezeichnung	Verunreinigungen mit hohem Molekulargewicht {%}	Korrekt Antikörper {%}	Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht {%}
m α CD3 IgG	0	100	0
Prot-m α CD3 IgG, 4.15, Matriptase Linker	2,1	96,1	1,8
Prot-m α CD3 IgG, 4.15, Nicht-schneidbarer Linker	6,4	93,6	0
Prot-m α CD3 IgG, 4.24, Matriptase Linker	1,8	95,4	2,8
Prot-m α CD3 IgG, 4.24, Nicht-schneidbarer Linker	0,4	99,0	0,6
Prot-m α CD3 IgG, 4.32, Matriptase Linker	1,3	96,9	1,8
Prot-m α CD3 IgG, 4.32, Nicht-schneidbarer Linker	4,5	95,5	0

6.2.4.2 Qualität der Prot-FOLR1 TCBs

Alle TCBs wurden transient in HEK293 EBNA Zellen (serumfrei) produziert und nach der Reinigung auf ihren Monomergehalt untersucht (Tabelle 9 und Tabelle 10). Die Expression und die Reinigung mancher TCB Antikörper wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von David Wittig und Erwin van Puijenbroek mit ihren Teams unterstützt (Transfektion und Expression Gruppe „*Protein Engineering*“; Martina Carola Birk, Marie Kopp und Reto Gianotti: Reinigung des klassischen FOLR1 TCB; Matthias Herrmann: Reinigung einer Charge des Prot-FOLR1 TCB,4.32 mit MMP-2,-9-Matriptase Linker, Christophe Prince: Reinigung des Prot-FOLR1 TCB, 4.32 mit Matriptase Linker und des Prot-FOLR1 TCB, 4.32 mit nicht-schneidbarem Linker; Catarina Assis: Reinigung der Prot-FOLR1 TCBs im invertierten Format; Irina Ballardt: Reinigung der Prot-MSLN TCBs und des MSLN TCBs). Die Analysen des Monomergehaltes wurden von der Gruppe „*Process Biochemistry*“ durchgeführt.

Tabelle 9: Analytische Grössenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Reinheit der verschiedenen Prot-FOLR1 TCBs

Antikörper- bezeichnung	Verunreinigungen mit höherem Molekulargewicht {%}	Korrekt Antikörper {%}	Verunreinigungen mit niedrigerem Molekulargewicht {%}
Klassischer FOLR1 TCB	1,0	98,6	0,4
Klassischer Prot-FOLR1 TCB, 4.15 Matriptase Linker	0	95	5
Klassischer Prot-FOLR1 TCB, 4.15 Nicht-schneidbarer Linker	3,8	96,2	0
Klassischer Prot-FOLR1 TCB, 4.32 Matriptase Linker	3,3	95,6	1,1
Klassischer Prot-FOLR1 TCB, 4.32 MMP-2,-9- Matriptase Linker	0	100	0
Klassischer Prot-FOLR1 TCB, 4.32 Nicht-schneidbarer Linker	3,4	96,1	0
Klassischer Prot-FOLR1 TCB, 4.32 MMP-2,-9 Linker	2,8	97,2	0
Invertierter Prot-FOLR1 TCB, 4.32 Matriptase Linker	3	97,0	0
Invertierter Prot-FOLR1 TCB, 4.32 Nicht-schneidbarer Linker	3,6	96,4	0

Tabelle 10: Analytische Grössenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Reinheit der verschiedenen Prot-MSLN TCBs

Antikörper- bezeichnung	Verunreinigungen mit höherem Molekulargewicht {%}	Korrekt Antikörper {%}	Verunreinigungen mit niedrigerem Molekulargewicht {%}
Klassischer MSLN TCB	2,0	96,2	1,8
Klassischer Prot-MSLN TCB, 4.32 MMP-2,-9-Matriptase Linker	4,0	96,0	0
Klassischer Prot-MSLN TCB, 4.32 Nicht-schneidbarer Linker	2,1	97,9	0

6.2.4.3 Stabilität der Antikörper

Hitzestabilität der Antikörper

Die Hitzestabilität der Antikörper wurde in einem Optim2 Gerät gemessen. Die Proben wurden auf 1 mg / mL in 20 mM Histidinchloride, 140 mM NaCl, pH 6 eingestellt und von 25 °C auf 85 °C bei einer Erhitzungsrate von 0,1 °C / min erhitzt. Sowohl die Temperatur bei der die Antikörper aggregieren (Tagg), als auch die Schmelztemperatur (Tm) wurde im *Roche Innovation Center Zurich* mit Michaela Ketterer gemessen (Tabelle 11, Tabelle 12).

Tabelle 11: Hitzestabilität der Prot-m α CD3 IgGs.

	Tagg {°C}	Tm {°C}
m α CD3 IgG	65,5 \pm 1	58,5 \pm 1
Prot-m α CD3 IgG, 4.15, Matriptase Linker	57,5 \pm 1	59,5 \pm 1
Prot-m α CD3 IgG, 4.24, Matriptase Linker	61,5 \pm 1	65 \pm 1
Prot-m α CD3 IgG, 4.32, Matriptase Linker	59,5 \pm 1	64 \pm 1

Tabelle 12: Hitzestabilität der Prot-FOLR1 TCBs.

	Tagg {°C}	Tm {°C}
FOLR1 TCB	58,5 \pm 1	63,5 \pm 1
Prot-FOLR1 TCB, Matriptase Linker	58,5 \pm 1	60,5 \pm 1
Prot-FOLR1 TCB, MMP-2,-9-Matriptase Linker	58 \pm 1	59,5 \pm 1
Prot-FOLR1 TCB, Nicht-schneidbarer Linker	58,5 \pm 1	60,5 \pm 1
Prot-FOLR1 TCB, MMP-2,-9 Linker	61,5 \pm 1	63 \pm 1

Serumstabilität der Antikörper

Die Serumstabilität der Antikörper wurde in IgG depletiertem humanen Serum getestet (Lot 16FSP63814). Dazu wurden die Antikörper auf eine Konzentration von ca. 2 mg / ml konzentriert und dann in Puffer oder Serum für 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Affinitätschromatography (Protein A) gereinigt bevor sie mit CE-SDS auf Integrität (Abbildung 2) überprüft wurden. Die Kapillarelektrophorese wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von Martina Carola Birk durchgeführt.

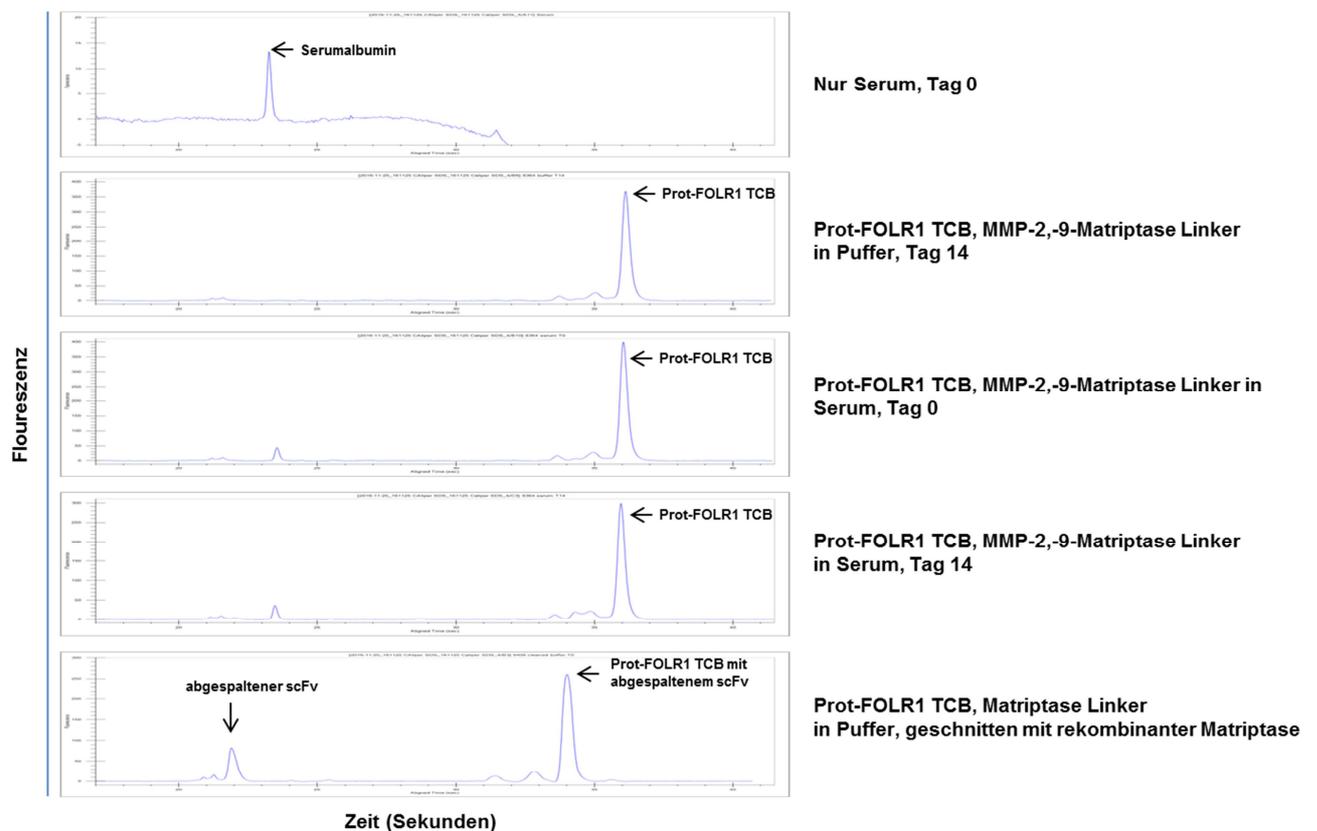


Abbildung 2: Serumstabilität des Prot-FOLR1 TCBS.

Kapillarelektrophorese des Prot-FOLR1 TCB, MMP-2,-9-Matriptase Linker vor und nach Inkubation (14 Tage, 37 °C) in Puffer oder humanem IgG depletiertem Serum. Als Kontrolle ist der geschnittene Prot-FOLR1 TCB gezeigt (n = 1). Die Kapillarelektrophorese wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von Martina Carola Birk durchgeführt.

6.2.5 Funktionale Analyse

6.2.5.1 Jurkat NFAT Reporter Versuch zur Messung der CD3 Aktivierung

8 µg / ml eines anti-human Fc Antikörpers in 25 µl / well DPBS wurden in eine weiße 96-Well Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert. Die Platte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert bevor das DPBS abgesaugt wurde. Das Schneiden des Prot- α CD3 IgGs wurde mit rhMatriptase über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Dafür wurden ca. 0,5 µg rhMatriptase (0,44 mg / ml) zu 1,5 µg Antikörper (in 20 mM Histidin, 140 mM NaCl, pH 6) gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Antikörper wurden in DPBS verdünnt und auf die mit anti-human Fc Antikörper vorbereitete Platte pipettiert. Nach 30 min bei 4 °C wurde das DPBS erneut abgesaugt. Die Jurkat NFAT Zellen wurden gezählt (ViCell) und die benötigte Anzahl wurde bei 350 rcf 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet wurde in Jurkat Medium ohne Hygromycin B (RPMI1640, 2 g/l Glucose, 2 g/l NaHCO₃, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 x NEAA, 1 x Natrium-Pyruvat) resuspendiert. 25.000 Jurkat NFAT Zellen wurden in jedes Well gegeben und die Platte für 5 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Antikörper für die Kontrollplatte ohne anti-human Fc Antikörper wurden in Medium verdünnt und zu den Jurkat NFAT Zellen gegeben. Nach 5 h wurden die Platten für ca. 10 min aus dem Inkubator genommen bevor die ONE-Glo Substrat Lösung im Verhältnis 1:4 zugegeben wurde. Nach 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz mit einem WALLAC Victor3 ELISA Reader gemessen (5 Sekunden / Well Detektionszeit).

6.2.5.2 Jurkat NFAT Reporter Versuch zur Messung der Linker-Spezifität

Die Platte wurde wie in 6.2.5.1 beschrieben mit anti-human Fc Antikörper vorbereitet. Das Schneiden des Prot- α CD3 IgGs wurde mit rhMatriptase über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Dabei wurden ca. 0,5 µg Protease (0,44 mg / ml) und 1,2 µl Medium (RPMI1640, 10 % FKS, 1X GlutaMAX) zu 3 µg Antikörper (in 20 mM Histidin, 140 mM NaCl, pH 6) gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Antikörper wurden in DPBS verdünnt und auf die mit anti-human Fc Antikörper vorbereitete Platte pipettiert. Nach 30 min bei 4 °C wurde das DPBS erneut abgesaugt. Effektorzellzugabe und Lumineszenzanalyse wie in 6.2.5.1 beschrieben.

6.2.5.3 Jurkat NFAT Reporter Versuch zur Messung der CD3 Aktivierung mit Tumorproben

Um zu zeigen, dass der Prot-FOLR1 TCB auch in Tumoren aktiviert werden kann, wurden Tumorproben von Patienten *ex vivo* analysiert. Für die Analyse wurde eine Methode aufgesetzt bei der unverdaute Tumorproben auf Zielantigenexpression und Proteaseaktivität untersucht werden

konnten. Die Proben wurden nicht verdaut, um Artefakte des Verdaus ausschliessen zu können und möglichst viele Zellen der Tumorumgebung zu behalten, da in der Literatur beschrieben wurde, dass nicht nur Tumorzellen Proteasen wie MMP-2, MMP-9 und Matriptase exprimieren, sondern auch Zellen der Tumorumgebung, wie z.B. Fibroblasten und Tumor assoziierte Makrophagen (Kessenbrock et al. 2010, Koontongkaew 2013, van Kempen et al. 2002). Um die Aktivierung des anti-CD3-Fabs durch Tumorproben zu untersuchen, wurden Jurkat NFAT Reporter Zellen verwendet. Mit Hilfe dieser Zellen kann sowohl die Antigenexpression als auch die Protease Aktivität in den Tumorproben nachgewiesen werden, da die Jurkat NFAT Zellen nur aktiviert werden, wenn sowohl das Tumorantigen als auch CD3 gebunden werden. Die Tumorproben wurden bei Indivumed GmbH in Deutschland gekauft. Die Proben wurden in Transportmedium verschickt und rund 24 h nach Entnahme der Proben in kleine Stückchen geschnitten. Um sowohl Antigenexpression als auch Proteaseaktivität zeigen zu können, wurden die Tumorproben mechanisch zerkleinert und mit den Prot-FOLR1 TCB inkubiert bevor Jurkat NFAT Reporterzellen benutzt wurden, um die Aktivierung über CD3 ϵ zu untersuchen. Für die Aktivierung der Jurkat NFAT Reporterzellen benötigt es sowohl die Bindung des TCB an das Zielantigen als auch die Bindung an CD3 ϵ (siehe 6.1.4.4). Die CD3 ϵ Bindung kann nur erfolgen, wenn der Linker geschnitten und damit der anti-CD3-Fab aktiviert wurde (Abbildung 3).

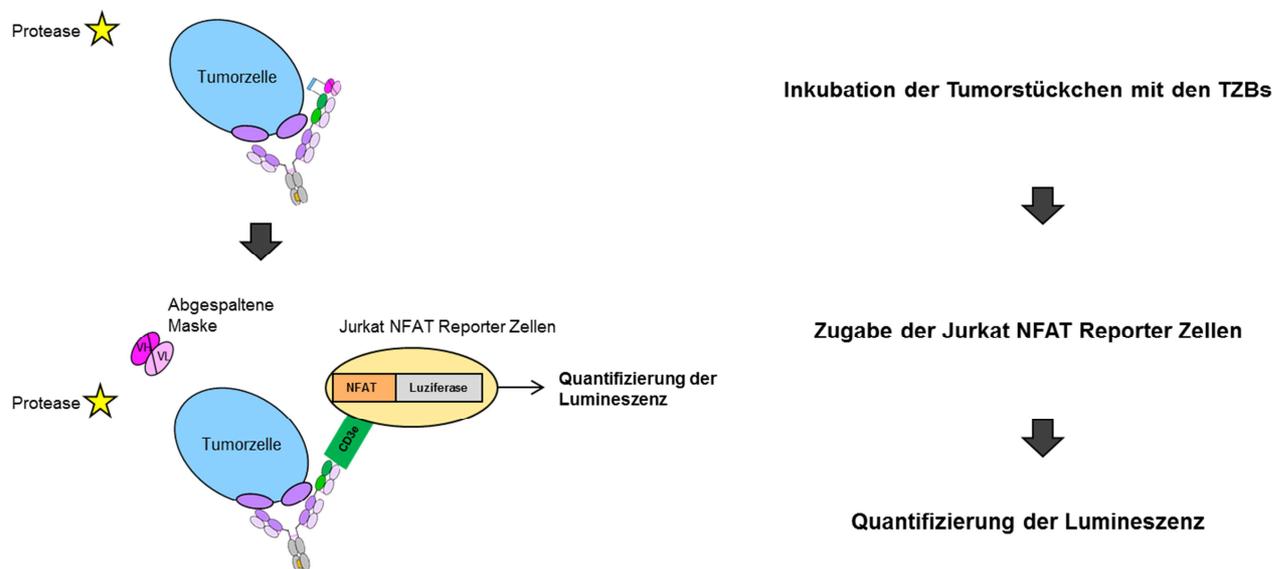


Abbildung 3: Methode zum *ex vivo* Nachweis der Antigenexpression und der Proteaseaktivität in Patiententumorproben.

Die Patiententumorproben wurden mechanisch zerkleinert und mit den TCBs für 48 h inkubiert bevor Jurkat NFAT Reporterzellen dazugegeben wurden. Für die Aktivierung der Jurkat NFAT Reporterzellen benötigt es sowohl die Bindung des TCB an das Zielantigen als auch die Bindung an CD3 ϵ . Die CD3 ϵ Bindung kann nur erfolgen, wenn der Linker geschnitten und der anti-CD3-Fab dadurch aktiviert wurde.

Methode A (nur für die gutartige Probe verwendet): Eine 24-Well Platte wurde mit Millicell Cell Culture Insert, 12 mm, hydrophilic PTFE, 0,4 µm vorbereitet. Die Antikörper wurden in Jurkat Medium (ohne Hygromycin B, aber mit 1,5 X Penicillin/Streptomycin) verdünnt. 600 µl wurden pro Well ausserhalb des Filtereinsatzes, 400 µl ins Innere der Filter gegeben. Die Tumorstückchen wurden 48 h mit den Antikörpern bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Jurkat NFAT Zellen wurden gezählt und die benötigte Anzahl wurde bei 350 rcf 5 min lang zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet wurde in Jurkat Medium ohne Hygromycin B (RPMI1640, 2 g/l Glucose, 2 g/l NaHCO₃, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 x NEAA, 1 x Natrium-Pyruvat) resuspendiert. 500.000 Jurkat NFAT Zellen wurden in jedes Well gegeben und die Platte für 5 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach 5 h wurden die Platten für ca. 10 min aus dem Inkubator genommen. 500 µl der ONE-Glo Substrat Lösung wurde zugegeben. Nach 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz mit einem WALLAC Victor3 ELISA Reader gemessen (5 sek / Well Detektionszeit).

Methode B: Die Wells einer 96-Well Flachboden-Platte wurden mit 18 µl kaltem Matrigel bedeckt und für 2 min bei 37 °C gehärtet bevor die Tumorstückchen platziert wurden. Die Tumorstückchen wurden mit 33 µl Matrigel bedeckt und erneut für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Antikörper wurden in Jurkat Medium (ohne Hygromycin B, aber mit 2 X Penicillin/Streptomycin) verdünnt und 50 µl pro Well wurden dazugegeben. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Jurkat NFAT Zellen gezählt und die benötigte Anzahl wurde bei 350 rcf 5 min lang zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet wurde in Jurkat Medium ohne Hygromycin B (RPMI1640, 2 g / l Glucose, 2 g / l NaHCO₃, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 x NEAA, 1 x Natrium-Pyruvat) resuspendiert. 50.000 Jurkat NFAT Zellen wurden in jedes Well gegeben und die Platte für 5 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach 5 h wurden die Platten für ca. 10 min aus dem Inkubator genommen. Je 80 µl des Mediums wurden in je ein Well einer weissen 96-Well Platte übertragen und 27 µl / Well der ONE-Glo Substrat Lösung wurde zugegeben. Nach 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz mit einem WALLAC Victor3 ELISA Reader gemessen (5 sec / Well Detektionszeit).

6.2.5.4 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Die PBMCs wurden aus Buffy-Coats von gesunden Spendern isoliert. Die Buffy-Coats wurden vom Blutspendezentrum Zürich gekauft und durch Histopaque-1077 Gradient aufgereinigt. Nach einem finalen Waschschrift wurden die PBMCs in RPMI1640 Medium (mit 10 % FKS, 1 x GlutaMAX™ und 10 % DMSO) resuspendiert. 20 mio / ml wurden bei -80 °C in einem CoolCell® Cell Freezing Container eingefroren und nach einem Tag in den Flüssigstickstoff transferriert.

6.2.5.5 Versuch zur Messung der Aktivierung von PBMCs über CD3

Humane PBMCs von verschiedenen gesunden Spendern wurden verwendet, um die Antikörper vermittelte T-Zell-Aktivierung über CD3 zu analysieren. Die PBMCs wurden ca. 24 h vor Versuchsbeginn in RPMI1640 Medium (mit 10 % FKS, 1 x GlutaMAX™) aufgetaut. Die Platte wurde wie in 6.2.5.1 beschrieben mit anti-human Fc Antikörper vorbereitet. Die Behandlung mit rhMatriptase wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Dabei wurden ca. 0,5 µg rhMatriptase (0,44 mg / ml) zu 10 nmol Antikörper (in 20 mmol/l Histidin, pH 6) gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Antikörper wurden in DPBS verdünnt und auf die mit anti-human Fc Antikörper vorbereitete Platte pipettiert. Nach 30 min bei 4 °C wurde das DPBS erneut abgesaugt. Die PBMCs wurden gezählt und die benötigte Anzahl wurde bei 350 rcf 5 min lang zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet wurde in frischem RPMI1640 Medium (mit 10 % FKS, 1 x GlutaMAX™) resuspendiert. 100.000 PBMCs / Well wurden zu den Antikörpern gegeben bevor die Platte für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert wurde. Die Antikörper für die Kontrollplatte ohne anti-human Fc Antikörper wurden in Medium verdünnt und zu den PBMCs gegeben bevor die Platte ebenfalls für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert wurde.

Messung der T-Zell-Aktivierung

Die T-Zell-Aktivierung wurde durch Quantifizierung von CD69 auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen gemessen (Simms et al. 1996). Für die Quantifizierung wurden die Platten zentrifugiert (350 rcf, 6 min), die Zellen in 150 µl FACS Puffer (1 x DPBS, 0,1 % BSA) resuspendiert. Für die Kompensation wurden die PBMCs zum Einen ungefärbt analysiert, zum Anderen mit jeder Farbe einzeln. Die Färbung wurde für 60 min bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt, bevor die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen wurden. Die Fixierung erfolgte in 2 % PFA Formalinlösung (4 %-ige Lösung wurde 1:1 mit FACS Puffer verdünnt). Die Messung erfolgte in einem MACSQuant Gerät. Die Daten wurden mit FlowJo V10 und GraphPad Prism 6 Software ausgewertet. Für die Quantifizierung der Interferon-γ (IFN-γ) Sekretion wurden die Platten zentrifugiert (350 rcf, 6 min)

und der Überstand wurde bei -20 °C eingefroren bevor er mittels eines „human IFN- γ DuoSet ELISA“ nach Angaben des Herstellers analysiert wurde.

6.2.5.6 Zytotoxizitätsmessungen

Die adherenten Tumorzellen wurden mit 0,05 % Trypsin/EDTA trypsiniert und mit einem ViCell Gerät gezählt. 20.000 Tumorzellen pro Well wurden in einer 96-Well F-Boden Zellkulturtestplatte in RPMI1640 Medium (mit 2 % FKS, 1 x GlutaMAX™) ausgesät und für 20 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert bevor die Antikörper und die PBMCs im Effektor:Zielzelle Verhältnis (E:T) 10:1 zugegeben wurden. Das Medium für die Zytotoxizitätsversuche bestand aus RPMI1640 Medium (mit 2 % FKS, 1 x GlutaMAX™). Die Maximallyse (100 %) wurde durch Inkubation der Zielzellen mit 1 % Triton X-100 für 20 h bei 37 °C, 5 % CO₂ gemessen. Die minimale Lyse (0 %) wurde nach Inkubation der Zielzellen mit Effektorzellen (PBMCs) ohne Antikörper für 20 h bei 37 °C, 5 % CO₂ gemessen. Der Prozentsatz der spezifischen (nur durch TCB induziert) Zelllyse wurde wie folgt berechnet:

$$[\text{Probe Lyse} - \text{minimale Lyse}] / [\text{maximale Lyse} - \text{minimale Lyse}] \times 100$$

Als Positivkontrolle wurde der Prot-FOLR1 (MSLN) TCB mit rekombinanter Protease geschnitten. Dazu wurden ca. 10 nmol des Antikörpers (in Formulierungspuffer, 20 mM Histidinchlorid, 140 mM NaCl, pH 6.0) mit ca. 0,5 μ g rhMatriptase für 24 h bei 37 °C inkubiert, anschließend in Medium verdünnt und zu den Zielzellen und PBMCs gegeben. Die Zytotoxizität wurde nach 48 h (wenn nicht anders angegeben) durch die Quantifizierung von Laktatdehydrogenasefreisetzung (LDH detection kit) analysiert. Für die Quantifizierung der Laktatdehydrogenasefreisetzung wurden die Platten zentrifugiert (350 rcf, 6 min). 50 μ l / Well (LDH) und 100 μ l / Well (IFN- γ) wurden in verschiedene frische Platte gegeben. Die Überstände für die Quantifizierung von IFN- γ wurden bei -20 °C eingefroren. Zu den Überständen für die LDH-Quantifizierung wurden 50 μ l/Well Substratlösung gegeben, bevor die LDH-Freisetzung mit einem SpectraMax M5 oder VERSAmax analysiert wurde. Die PBMCs wurden für die Quantifizierung von CD69 auf CD8 positiven T-Zellen, wurden wie bereits beschrieben (6.2.5.5), gefärbt. Für die Berechnung der EC50-Werte wurde eine sigmoidale Dosis-Abhängigkeit mit Hilfe der GraphPad Prism Software berechnet. Die Daten wurden mit einer GraphPad Prism 6 Software ausgewertet.

6.2.5.7 Lebendzellanalyse

Die Hemmung des Tumorzellwachstums in Abhängigkeit von Antikörpern und PBMCs als Effektorzellen wurde mittels Lebendzellanalyse in einem IncuCyte Gerät gemessen. Dazu wurden CellPlayer™ MDA-MB-231 NucLight Red Zellen verwendet. Diese Zelllinie exprimiert FOLR1 und die Zellzahl kann mit Hilfe der rot gefärbten Zellkerne quantifiziert werden. Die adherenten Tumorzellen wurden mit 0,05 % Trypsin/EDTA abgelöst und mit einem ViCell Gerät gezählt. 5.000 Tumorzellen pro Well wurden in einer 96-Well-Flachboden-Zellkulturtestplatte in RPMI1640 Medium (mit 2 % FKS, 1 x GlutaMAX™) ausgesät und für 20 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert bevor die Antikörper und die PBMCs im Effektor:Zielzelle-Verhältnis (E:T) 10:1 zugegeben wurden. Das Tumorzellwachstum wurde an Hand der Zellzahl (rote Zellkerne) bestimmt. Die erste Messung wurde ca. 2 h nach Zugabe der Antikörper und der PBMCs gemacht und wurde als Zeitpunkt „0 h“ angegeben.

6.2.5.8 Statistische Berechnungen

Für die statistische Analyse der Dosis-abhängige T-Zell-Aktivierung wurde die two-way ANOVA Analyse mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen) mit Hilfe der GraphPad Prism 6 Software verwendet.

Für EC50- und Einzelwerte der Zytotoxizität wurde ein „two-sample t-test“ mit einer Minitab 17 Statistik Software verwendet.

P-Werte unter 0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet und sind mit Sternen gekennzeichnet (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,001$; ***; $P \leq 0,001$).

7. Ergebnisse

7.1 Konstruktion und Produktion der Protease-aktivierbaren anti-CD3 Antikörper im IgG Format

Drei anti-idiotypische Antikörper, 4.15, 4.24 und 4.32, wurden als humane IgG Antikörper kloniert, produziert und gereinigt. Die Affinitäten dieser Antikörper gegen anti-CD3-Fab lag im Bereich von 0,07 bis 1,5 nM (Tabelle 5). Die Aminosäuresequenz der CDRs der Klone 4.15 und 4.24 lag bei 91 %, die des 4.32 war deutlich verschieden zu 4.15 und 4.24 mit einer Aminosäuresequenz-übereinstimmung von 52 % bzw. 53 %. Die VH und die VL der anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper (6.2.1) wurden zu einem scFv zusammengefügt und N-terminal an die VH des anti-CD3-Fabs fusioniert. Zunächst wurden monovalente Protease-aktivierbare anti-CD3 IgGs (Prot- α CD3 IgG) generiert (Abbildung 4), um zu prüfen, ob die Aktivierung der T-Zellen durch einen maskierten anti-CD3-Fab verhindert werden kann. Des Weiteren musste geprüft werden, welche der anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs am effizientesten maskiert, aber dennoch nach Spaltung des Linkers wieder abdissoziieren kann. Die anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs wurden N-terminal an die VH eines monovalenten, heterodimeren anti-CD3 IgG fusioniert. Der bivalente CD3 IgG mit zwei fusionierten scFvs konnte nicht gereinigt werden, da diese Antikörper sehr stark aggregierten (nach Affinitätschromatographie). Für diese Antikörper wurde zunächst ein Matriptase Linker bzw. ein GS Linker verwendet (Tabelle 6), da die Über-Expression von Matriptase, eine Typ II Transmembran Serin Protease, für mehrere Karzinome wie z.B. Brust- und Ovarialkarzinome beschrieben wurde (M. Oberst et al. 2001, Tanimoto et al. 2005, Tanimoto et al. 2001, Uhland 2006). Die Substratsequenz für Matriptase wurde aus der MEROPS Datenbank übernommen (Rawlings et al. 2012).

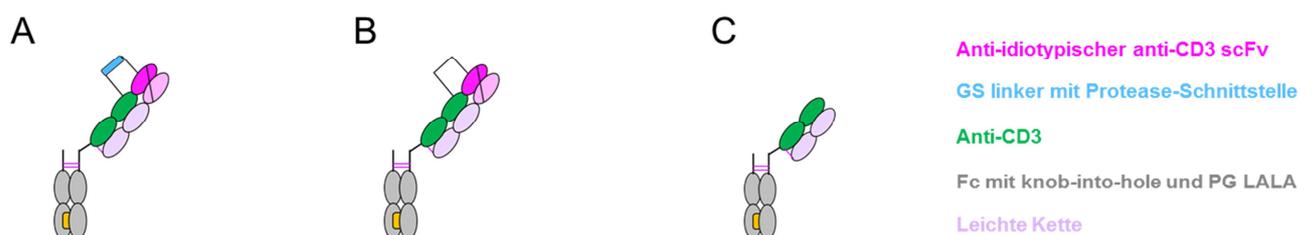


Abbildung 4: Design der Protease-aktivierbaren anti-CD3 Antikörper im IgG Format.

(A) Monovalenter anti-CD3 IgG mit N-terminal fusioniertem anti-idiotypischen anti-CD3 scFv und Matriptase Linker (Prot- α CD3 IgG, Matriptase Linker). (B) Monovalenter anti-CD3 IgG mit N-terminal fusioniertem anti-idiotypischen anti-CD3 scFv und nicht-schneidbarem GS Linker (Prot- α CD3 IgG, Nicht-schneidbarer Linker). (C) Monovalenter anti-CD3 IgG (α CD3 IgG).

Alle Prot-m α CD3 IgGs wurden transient in HEK293 EBNA Suspensionszellen (serumfrei) produziert. Nach Reinigung der Antikörper wurden diese auf ihren Monomergehalt und ihre Reinheit untersucht. Die Prot-m α CD3 IgGs hatten einen Monomergehalt von $\geq 94\%$ (Tabelle 8). Die Ausbeuten der Prot-m α CD3 IgGs waren zwei- bis zehnfach geringer als die Ausbeute des m α CD3 IgGs ohne Maske. Um zu überprüfen, ob die Prot-m α CD3 IgGs stabil sind und durch rhMatriptase geschnitten werden können, wurden sie mittels Kapillarelektrophorese (CE-SDS) für drei verschiedene Bedingungen getestet (4 °C, 37 °C und Behandlung mit rhMatriptase) analysiert. Die Kapillarelektrophoresemessung wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von Christophe Prince durchgeführt. Sowohl das Chromatogramm als auch das elektronische Gel zeigten, dass der Linker des Prot-m α CD3 IgG, 4.32 durch rhMatriptase geschnitten werden konnte. Bei Inkubation in Abwesenheit von rhMatriptase für 48 h bei 4 °C oder bei 37 °C war der Antikörper stabil und wurde nicht geschnitten (Abbildung 5). Zusätzlich wurde die Hitzestabilität der Prot-m α CD3 IgGs untersucht, wobei die Antikörper von 25 °C bis auf 85 °C erhitzt wurden. Die Temperatur, bei der die untersuchten Prot-m α CD3 IgGs zu aggregieren begannen (Tagg) war etwas geringer als die Tagg des m α CD3 IgGs (Tabelle 11), jedoch war die Schmelztemperatur der Prot-m α CD3 IgGs 4.24 und 4.32 etwas höher als die des m α CD3 IgGs (Tabelle 11).

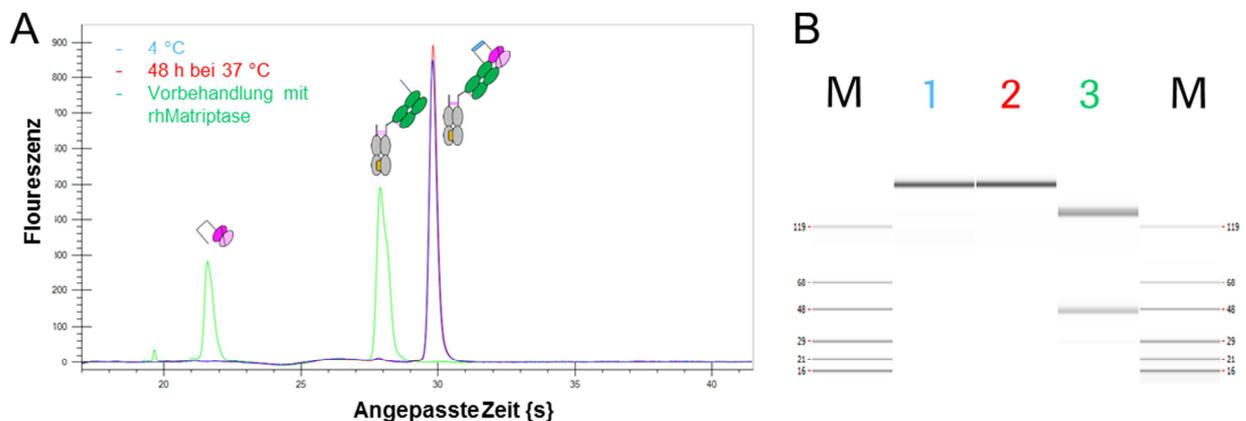


Abbildung 5: Kapillarelektrophorese des Prot-m α CD3 IgGs, 4.32.

(A) CE-SDS Chromatogramm (bei nicht-reduzierten Bedingungen) des Prot-m α CD3 IgGs, 4.32, der entweder bei 4 °C (blau) gelagert war, für 48 h bei 37 °C (rot) inkubiert wurde oder mit rhMatriptase geschnitten (grün) wurde. (B) Elektronische Gelelektrophorese (bei nicht-reduzierten Bedingungen) des Prot-m α CD3 IgGs, 4.32, der entweder bei 4 °C (1) gelagert war, für 48 h bei 37 °C (2) inkubiert wurde oder mit rhMatriptase geschnitten (3) wurde. Dieser Versuch ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die Kapillarelektrophoresemessung wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von Christophe Prince durchgeführt.

7.2 Die Maskierung des anti-CD3-Fab reduziert die Aktivierung von T-Zellen

TCBs aktivieren T-Zellen nur, wenn sie die T-Zelle mit einer Zelle verbinden, die das Zielantigen exprimiert. Um zu zeigen, dass diese Kreuzvernetzung notwendig ist, wurde eine Platte mit einem anti-human Fc Antikörper benetzt, woran die monovalenten anti-CD3 Antikörper binden konnten. Eine Platte ohne anti-human Fc Antikörper diente dabei als Kontrolle. Die T-Zell-Aktivierung wurde für eine Jurkat-NFAT Reporter Zelllinie und für CD8 positive T-Zellen analysiert (Abbildung 6). T-Zell-Aktivierung konnte nur für die kreuzvernetzten Antikörper detektiert werden, wohingegen der α CD3 IgG alleine nicht zu T-Zell-Aktivierung führte (Abbildung 6). Daher wurden die monovalenten anti-CD3 Antikörpern in den folgenden Versuchen immer mit einem anti-human Fc Antikörper kreuzvernetzt.

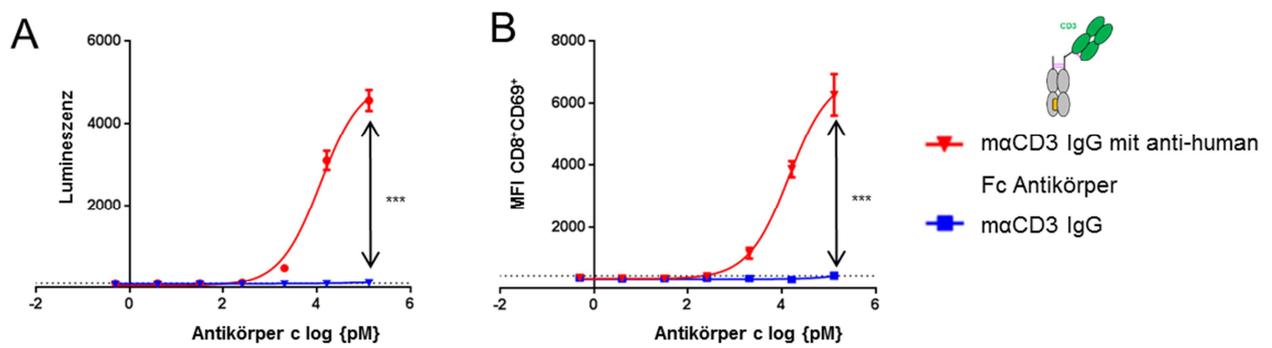


Abbildung 6: T-Zell-Aktivierung in An- oder Abwesenheit eines anti-human Fc Antikörpers zur Kreuzvernetzung.

(A) Quantifizierung der Lumineszenz für Jurkat NFAT Reporter Zellen nach Inkubation mit α CD3 IgG in Anwesenheit (rot) oder Abwesenheit (blau) eines anti-human Fc Antikörpers zur Kreuzvernetzung. (B) Quantifizierung von CD69 für CD8 positive T-Zellen (MFI CD8⁺CD69⁺) nach Inkubation mit α CD3 IgG in Anwesenheit (rot) oder Abwesenheit (blau) eines anti-human Fc Antikörpers zur Kreuzvernetzung. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die gepunktete Linie zeigt die Lumineszenz bzw. den MFI CD8⁺CD69⁺ der T-Zellen, die ohne α CD3 IgG inkubiert wurden. Für die statistische Analyse wurde der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur angewendet.

Weiter war es wichtig zu sehen, ob die anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs die Aktivierung über CD3 verhindern können und ob der anti-CD3-Fab nach Spaltung des Linkers wieder genauso aktiv ist wie der anti-CD3 ohne Maske. Dazu wurden zunächst die verschiedenen Prot- α CD3 IgGs mit nicht-schneidbaren Linkern mit dem α CD3 IgG verglichen. Alle drei anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs (4.15, 4.24 und 4.32) konnten die T-Zell-Aktivierung im Vergleich zum α CD3 IgG deutlich verringern (Abbildung 7).

Der Prot- α CD3 IgG, 4.24 maskierte am effizientesten, die Unterschiede zum 4.15 und 4.32 waren signifikant, aber nur bei den höchsten hier verwendeten Antikörperkonzentrationen durch ein bis drei Datenpunkte erkennbar (Abbildung 7).

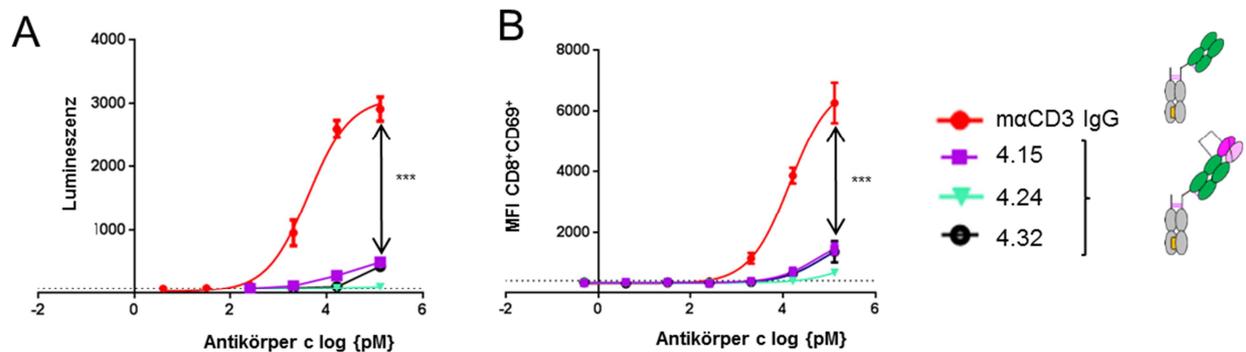


Abbildung 7: Blockierung des anti-CD3-Fabs im IgG Format.

(A) Quantifizierung der Lumineszenz für Jurkat NFAT Reporter Zellen nach Inkubation mit α CD3 IgG oder Prot- α CD3 IgGs (nicht-schneidbarer Linker). (B) Quantifizierung von CD69 für CD8 positive T-Zellen (MFI CD8⁺CD69⁺) nach Inkubation mit α CD3 IgG oder Prot- α CD3 IgGs (nicht-schneidbarer Linker). Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die gepunktete Linie zeigt die Aktivierung der Zellen ohne Antikörper. Für die statistische Analyse wurde der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur angewendet.

Die anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs mussten nicht nur effizient maskieren, sondern sie mussten auch nach Spaltung des Linker wieder abdissoziieren können. Aus diesem Grund wurden die Prot- α CD3 IgGs mit den Masken 4.15, 4.24 und 4.32 und Matriptase Linker mit rhMatriptase inkubiert. Die Antikörper wurden dann ohne Reinigungsschritt direkt auf die mit anti-human Fc Antikörper vorbereiteten Platten gegeben und auf ihre CD3 Bindung analysiert. Der abgespaltene anti-idiotypische anti-CD3 scFv wurde nicht abgereinigt, um zu zeigen, dass dieser die Bindung an CD3 nach Spaltung nicht stört. Alle Prot- α CD3 IgGs mit Matriptase Linker konnten durch die Spaltung des Linkers aktiviert werden und waren bezüglich ihrer Aktivität signifikant unterschiedlich zu den maskierten Prot- α CD3 IgGs (nicht-schneidbare Linker). Die Blockierung des anti-CD3-Fabs war spezifisch, da die N-terminale Fusion eines CEA Fabs die CD3 Bindung/T-Zell-Aktivierung nicht beeinflusste (Abbildung 8).

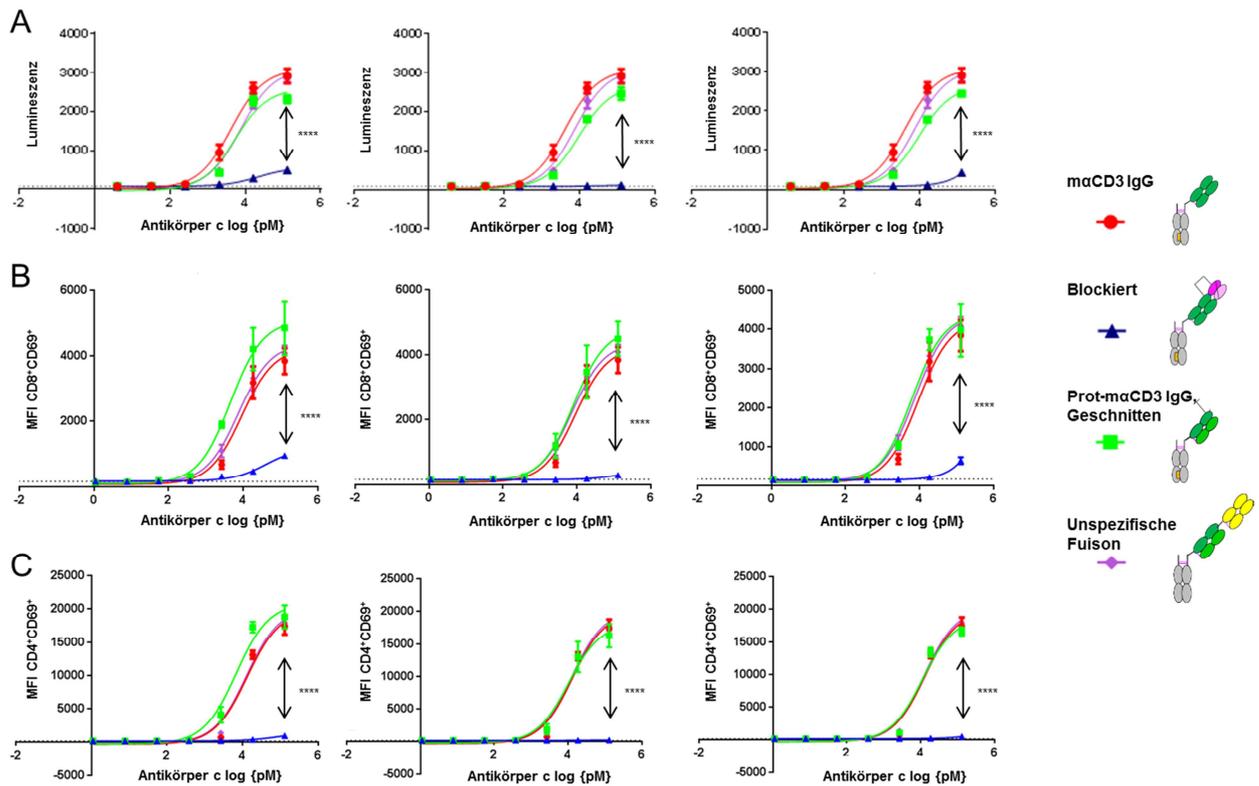


Abbildung 8: T-Zell-Aktivierung der Prot-mαCD3 IgGs.

Linke Spalte Prot-mαCD3 IgG, 4.15, mittlere Spalte Prot-mαCD3 IgG, 4.24, Rechte Spalte Prot-mαCD3 IgG, 4.32. (A) Quantifizierung der Lumineszenz für Jurkat NFAT Reporter Zellen nach Inkubation mit mαCD3 IgG, mαCD3 IgG mit N-terminaler CEA-Fab Fusion oder Prot-mαCD3 IgGs (aktivierbar, nicht-schneidbarer Linker, vorgeschnitten). (B) Quantifizierung von CD69 für CD8 positive T-Zellen (MFI CD8⁺CD69⁺) nach Inkubation mαCD3 IgG, mαCD3 IgG mit N-terminaler CEA-Fab Fusion oder Prot-mαCD3 IgGs (aktivierbar, nicht-schneidbarer Linker, vorgeschnitten). (C) Quantifizierung von CD69 für CD4 positive T-Zellen (MFI CD4⁺CD69⁺) nach Inkubation mαCD3 IgG, mαCD3 IgG mit N-terminaler CEA-Fab Fusion oder Prot-mαCD3 IgGs (aktivierbar, nicht-schneidbarer Linker, vorgeschnitten). Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (Jurkat) bzw. für drei verschiedene PBMC Spender. Die gepunktete Linie zeigt die Aktivierung der Zellen ohne Antikörper. Für die statistische Analyse wurde der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur angewendet.

7.3 Konstruktion und Herstellung der Protease-aktivierbaren anti-CD3 Antikörper im TCB Format

Nachdem die Maskierung und Aktivierung des anti-CD3-Fab im IgG Format gezeigt werden konnte, wurde die Anwendbarkeit des maskierten anti-CD3-Fab im TCB Format untersucht. Dazu wurden zunächst die Protease-aktivierbaren TCBs konstruiert und kloniert. Zuerst wurde ein Protease-aktivierbarer FOLR1 TCB (Prot-FOLR1 TCB) generiert, da dieser in einer Verträglichkeitsstudie in *Cynomolgus fascicularis* „on-target/off-tumor“ Toxizität gezeigt hatte (Daten sind hier nicht gezeigt). Der FOLR1 TCB eignete sich daher gut, um das Konzept der Protease-Aktivierung zur Verringerung der Zytotoxizität für normale Zellen zu testen. Der Protease-aktivierbare FOLR1 TCB (Prot-FOLR1 TCB) wurde in zwei verschiedenen Formaten generiert. Beim klassischen Format wurde der anti-CD3-Fab N-terminal an die anti-FOLR1 VH

fusioniert, beim invertierten Format wurde der anti-FOLR1 Fab N-terminal an die anti-CD3-Fab VH fusioniert (Abbildung 9). Der anti-idiotypische anti-CD3 scFv wurde im klassischen Format N-terminal an die VH des anti-CD3-Fab und im invertierten Format an die VL des anti-CD3-Fab fusioniert. Das invertierte Format ist für Binder notwendig, die keine N-terminale Fusion des anti-CD3-Fabs erlauben. Da das Konzept des maskierten anti-CD3-Fabs für verschiedene Binder verwendet werden können sollte, wurden beide Formate getestet (Abbildung 9). Um das Konzept des Protease-aktivierbaren anti-CD3-Fabs im TCB Format für ein weiteres Zielantigen zu prüfen, wurde auch ein Protease-aktivierbarer Mesothelin TCB (Prot-MSLN TCB) konstruiert (Abbildung 9).

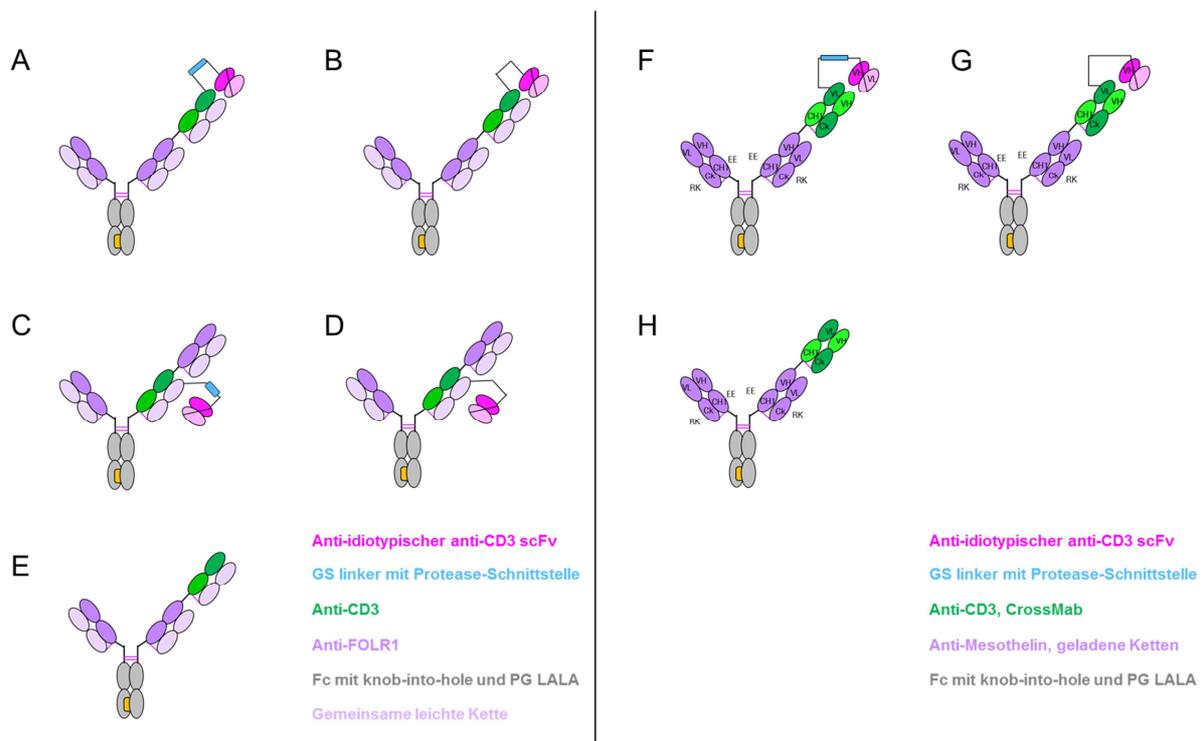


Abbildung 9: Design der Protease-aktivierbaren Antikörper.

(A) Prot-FOLR1 TCB im klassischem Format mit Matriptase Linker. (B) Prot-FOLR1 TCB im klassischem Format mit nicht-schneidbarem Linker. (C) Prot-FOLR1 TCB im invertierten Format mit Matriptase Linker. (D) Prot-FOLR1 TCB im invertierten Format mit nicht-schneidbarem Linker. (E) FOLR1 TCB im klassischem Format. (F) Prot-MSLN TCB im klassischen Format mit Matriptase Linker. (G) Prot-MSLN TCB im klassischen Format mit nicht-schneidbarem Linker. (H) MSLN TCB im klassischen Format. Geladene Ketten (anti-MSLN) und gekreuzte Ketten (anti-CD3) wurden verwendet, um die korrekte Paarung der Ketten zu favorisieren. Alle Antikörper hatten einen nicht-funktionalen Fc-Teil (PG LALA) und knob-into-hole Mutationen für die korrekte Heterodimerisierung.

Alle TCBs wurden transient in HEK293 EBNA Zellen (serumfrei) produziert und nach der Reinigung auf ihren Monomergehalt untersucht. Die Prot-FOLR1 TCBs hatten einen Monomergehalt von $\geq 95\%$ (Tabelle 9) und die Ausbeuten waren vergleichbar zum FOLR1 TCB. Einzig die Ausbeute des invertierten Prot-FOLR1 TCBs war geringer als die des klassischen Prot-FOLR1 TCBs. Alle hier gezeigten Prot-FOLR1 TCBs waren für mindestens 48 h bei 37 °C stabil

und konnten mit rhMatriptase geschnitten werden (Abbildung 10). Die Kapillarelektrophoresemessung wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von Matthias Herrman durchgeführt. Zusätzlich wurde die Hitzestabilität der Prot-FOLR1 TCBs untersucht, wobei die Antikörper von 25 °C bis auf 85 °C erhitzt wurden. Die Temperatur, bei der die untersuchten FOLR1 TCBs zu aggregieren begannen (Tagg) war vergleichbar mit der Tagg des FOLR1 TCBs. Lediglich die Schmelztemperatur des FOLR1 TCBs war etwas höher als die der Prot-FOLR1 TCBs (Tabelle 12). Weiter war es wichtig zu zeigen, dass die Protease-Linker nicht im Serum geschnitten werden. Die Grössenanalyse der Antikörper mittels Kapillarelektrophorese nach Inkubation in humanem Serum (14 Tage, 37 °C) zeigte, dass die Linker (Matriptase oder MMP-2/9-Matriptase) nicht gespalten wurden (Abbildung 2), Daten für FOLR1 TCB und Prot-FOLR1 TCB mit Matriptase Linker sind nicht gezeigt).

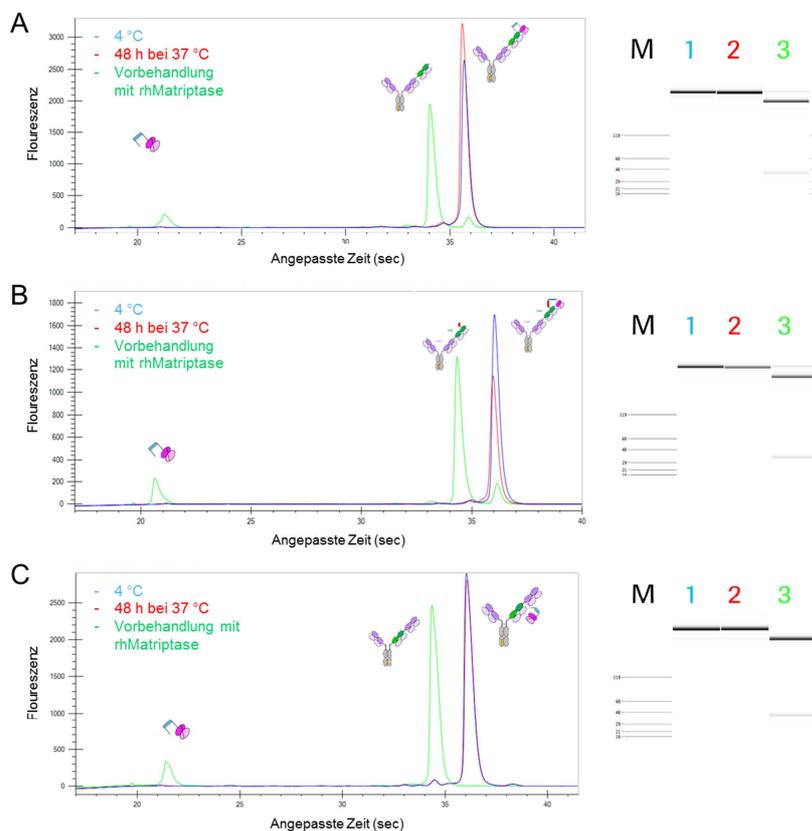


Abbildung 10: Kapillarelektrophorese der Prot-FOLR1 TCBs.

(A) CE-SDS Chromatogramm und Elektronische Gelelektrophorese (bei nicht-reduzierten Bedingungen) des klassischen Prot-FOLR1 TCBs mit Matriptase Linker, der entweder bei 4 °C (blau) gelagert war, für 48 h bei 37 °C (rot) inkubiert wurde oder mit rhMatriptase geschnitten (grün) wurde. (B) CE-SDS Chromatogramm und Elektronische Gelelektrophorese (bei nicht-reduzierten Bedingungen) des klassischen Prot-FOLR1 TCBs mit MMP-2,-9-Matriptase Linker, der entweder bei 4 °C (blau) gelagert war, für 48 h bei 37 °C (rot) inkubiert wurde oder mit rhMatriptase geschnitten (grün) wurde. (C) CE-SDS Chromatogramm und Elektronische Gelelektrophorese (bei nicht-reduzierten Bedingungen) des invertierten Prot-FOLR1 TCBs mit Matriptase Linker, der entweder bei 4 °C (blau) gelagert war, für 48 h bei 37 °C (rot) inkubiert wurde oder mit rhMatriptase geschnitten (grün) wurde (n = 1). Die Kapillarelektrophoresemessung wurde im *Roche Innovation Center Zurich* von Matthias Herrman durchgeführt.

7.4 Die Maskierungseffizienz der anti-idiotypischen anti-CD3 scFv im TCB Format

Die Maskierungseffizienz der anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs (4.15 und 4.32) war im IgG Format ähnlich. Im TCB Format wurden diese beiden anti-idiotypischen anti-CD3 scFvs (4.15 und 4.32), mit ähnlichen Affinitäten zum anti-CD3-Fab im Bereich von 1 bis 2 nM, ebenfalls untersucht. Die Zytotoxizität der Prot-FOLR1 TCBs mit PBMCs wurde für die beiden Masken auf Tumorzellen mit unterschiedlichem FOLR1-Expressionslevel, HeLa (hohe FOLR1-Expression, ca. 2.000.000 FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) und Skov-3 (mittlere FOLR1-Expression, ca. 100.000 FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) verglichen. Die mit rhMatriptase geschnittenen Prot-FOLR1 TCBs, 4.15 und 4.32 vermittelten beide eine Dosis-abhängige Zytotoxizität, die für beide Zelllinien vergleichbar war. Die Maskierungseffizienz, der beiden Masken 4.15 und 4.32 (nicht-schneidbarer Linker) war jedoch für die höchsten drei Konzentrationen (Zytotoxizität) bei beiden Zelllinien signifikant unterschiedlich (Abbildung 11). Die im TCB Format verwendeten anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörper, 4.15 und 4.32, hatten gegenüber dem anti-CD3-Fab eine ähnliche Affinität, jedoch war die Affinität (Tabelle 5) zum anti-CD3 im TCB Format verringert, was die unterschiedliche Maskierungseffizienz erklärt. Die Affinität des anti-idiotypischen anti-CD3 Antikörpers zum klassischen TCB war für 4.15 um den Faktor zehn und für 4.32 um den Faktor fünf verringert (im Vergleich zum anti-CD3-Fab) (Tabelle 5). Während der Prot-FOLR1 TCB, 4.32 für Skov-3 Zellen mit mittlerer FOLR1-Expression keine Zytotoxizität induzierte, war bei HeLa Zellen mit sehr hoher FOLR1-Expression für die beiden höchsten hier verwendeten Konzentrationen noch ca. 10 bis 25 % Zytotoxizität erkennbar.

Der Prot-FOLR1 TCB, 4.15 induzierte für beide Zelllinien bei den drei höchsten Konzentrationen zwischen 12 % und 38 % Zytotoxizität, war jedoch signifikant unterschiedlich zum geschnittenen Prot-FOLR1 TCB, 4.15. Die EC50 des geschnittenen Prot-FOLR1 TCB, 4.32 war ca. 1700 fach geringer als für den nicht-schneidbaren Prot-FOLR1 TCB, 4.32. Für den Prot-FOLR1 TCB, 4.15 hingegen war die EC50 des geschnittenen TCBs nur ca 20-fach geringer als für den entsprechenden nicht-schneidbaren Prot-FOLR1 TCB, 4.15 (Abbildung 11). Die Zytotoxizität ging mit IFN- γ Freisetzung (T-Zell Aktivierung) einher, einzig beide Prot-FOLR1 TCB, 4.15 und 4.32, mit nicht-schneidbarem Linker führten für Skov-3 Zellen nicht zu detektierbarer IFN- γ Freisetzung. Für die weiteren Versuche wurde der anti-idiotypische anti-CD3 scFv 4.32 verwendet, da er bei guter Maskierungseffizienz voll aktiviert werden konnte.

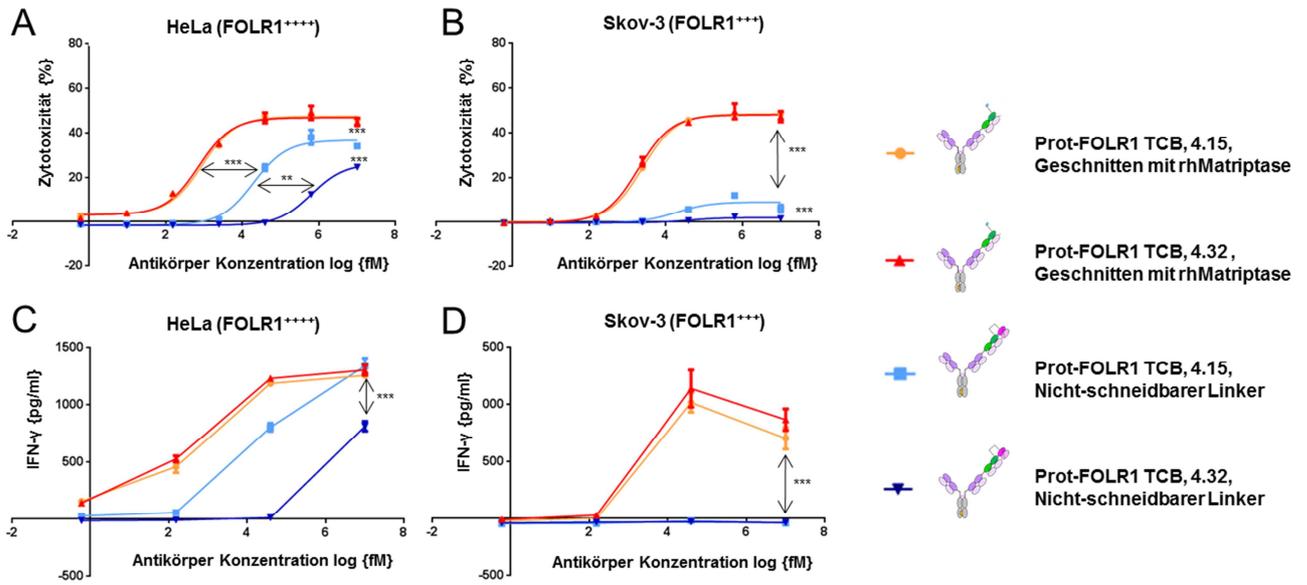


Abbildung 11: Induktion von Tumorzellzytotoxizität und T-Zell-Aktivierung durch Prot-FOLR1 TCB mit verschiedenen Masken.

Dosis-abhängige Tumorzellzytotoxizität und IFN- γ Quantifizierung nach 48 h. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Prot-FOLR1 TCB mit Matriptase Linker und verschiedenen Masken (4.15 und 4.32) wurden mit rhMatriptase geschnitten. (A) Zytotoxizität für HeLa Zellen. (B) Zytotoxizität für Skov-3 Zellen. (C) IFN- γ für vier Konzentrationen, HeLa Zellen. (D) IFN- γ für vier Konzentrationen, Skov-3 Zellen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die Berechnung der EC50-Werte (Zytotoxizität) wurde eine sigmoide Dosis-Abhängigkeit berechnet (GraphPad Prism6). Für die statistische Analyse wurde der two-sample t-test (Zytotoxizität) und der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (IFN- γ) angewendet.

7.5 Prot-FOLR1 TCB, invertiert *versus* klassisch

Da es Zielantigen-Binder gibt, die die N-terminale Fusion des anti-CD3-Fabs nicht erlauben (Verlust oder signifikante Verringerung der Antigenbindung), wurde neben dem klassischen TCB Format (anti-CD3-Fab N-terminal) auch das invertierte TCB Format (anti-FOLR1 Fab N-terminal an anti-CD3) generiert. Das invertierte Format war für bisher untersuchte Binder, bezüglich Induktion der Zelllyse, potenter als das klassische Format (Klein et al. 2017). Die EC50 des klassischen Prot-FOLR1 TCB war für beide Zelllinien ca. fünf- bis sechs-fach höher als die des invertierten Prot-FOLR1 TCB. Die EC50 des invertierten Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker war für HeLa Zellen ca. fünffach niedriger als die des klassischen Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker (Abbildung 12). Die Unterschiede der beiden Formate mit nicht-schneidbarem Linker waren für die Zytotoxizitätsmessung für die höchsten vier Konzentrationen erkennbar, für die Quantifizierung von IFN- γ gab es nur bei der höchsten Konzentration einen Unterschied (Abbildung 12).

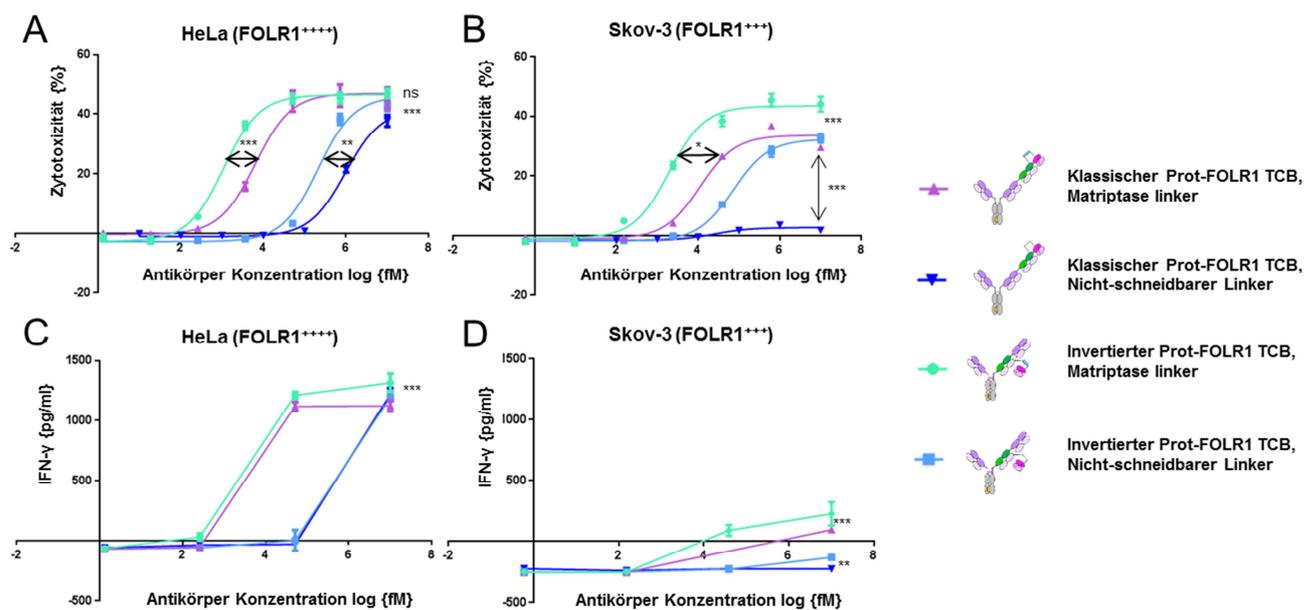


Abbildung 12: Induktion von Tumorzellzytotoxizität und T-Zell-Aktivierung durch Prot-FOLR1 TCB, 4.32 im klassischen oder invertierten Format.

Dosis-abhängige Tumorzellzytotoxizität nach 48 h. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Der invertierte Prot-FOLR1 TCB, 4.32 und der klassische Prot-FOLR1 TCB, 4.32 sind gezeigt. Beide Antikörper wurden jeweils mit Matriptase Linker und mit nicht-schneidbarem Linker getestet. (A) Zytotoxizität für HeLa Zellen. (B) Zytotoxizität für Skov-3 Zellen. (C) IFN- γ für vier Konzentrationen, HeLa Zellen. (D) IFN- γ für vier Konzentrationen, Skov-3 Zellen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die Berechnung der EC50-Werte (Zytotoxizität) wurde eine sigmoidale Dosis-Abhängigkeit berechnet (GraphPad Prism6). Für die statistische Analyse wurde der two-sample t-test (Zytotoxizität) und der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (IFN- γ) angewendet.

7.6 Der Prot-FOLR1 TCB kann durch Linkerspaltung aktiviert werden

Nachdem die Maskierung für verschiedene Masken und Formate getestet wurde, sollte gezeigt werden, ob und wie gut der Prot-FOLR1 TCB aktiviert werden kann. FOLR1 wird sehr häufig in fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinomen (high grade serous carcinoma) überexprimiert (Kobel et al. 2014). Häufig wird für diese Tumore auch eine erhöhte Expression und Aktivität von MMP-2, MMP-9 und Matriptase beschrieben, weshalb diese Proteaseschnittstellen für den Prot-FOLR1 TCB gewählt wurden (Demeter et al. 2005, M. D. Oberst et al. 2002, Santin et al. 2003, Tanimoto et al. 2005). Die Zytotoxizitätsanalyse mit HeLa und Skov-3 Tumorzellen und Prot-FOLR1 TCB mit verschiedenen Schnittstellen, MMP-2,-9, Matriptase oder die Kombination von MMP-2,-9 und Matriptase, sollte zeigen wie effizient der Linker geschnitten wurde. Zunächst wurde die Spezifität der Protease-Linker mit Hilfe des Jurkat NFAT Reporter Versuchs gezeigt. Wird der Linker geschnitten, können die Jurkat NFAT Reporter Zellen über CD3 aktiviert werden. Dadurch konnte die Aktivität der rekombinanten Proteasen analysiert werden. Die Inkubation des Prot-FOLR1 TCB mit MMP-2,-9 Linker mit rekombinanter humaner MMP-2 (rhMMP-2) oder rekombinanter humaner MMP-9 (rhMMP-9) führte zur Aktivierung der Jurkat Zellen über CD3, was bedeutet, dass der Linker von beiden Proteasen geschnitten werden kann, nicht aber von rhMatriptase. Der Matriptase Linker dagegen wurde nur durch Inkubation mit rhMatriptase geschnitten, nicht aber durch rhMMP-2 oder rhMMP-9 (Abbildung 13). Der kombinierte MMP-2, -9-Matriptase Linker konnte sowohl von rhMMP-2, rhMMP-9 und rhMatriptase geschnitten werden. rhMatriptase schien den Linker bei diesen Versuchsbedingungen am effizientesten zu schneiden (Abbildung 13).

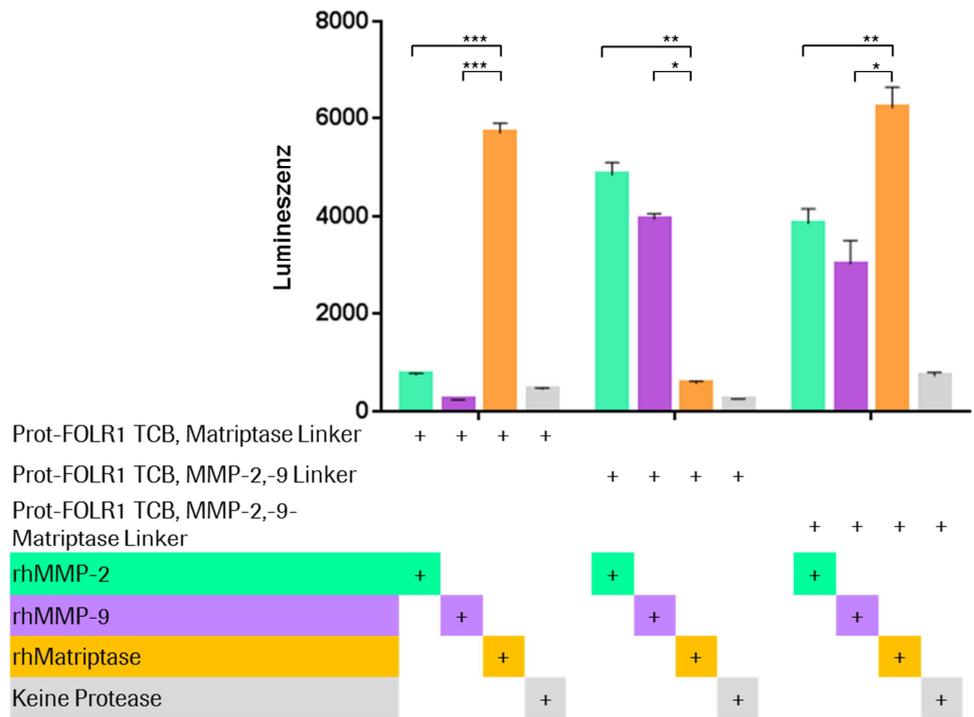


Abbildung 13: Spezifität der Proteasen rhMMP-2, rhMMP-9 und rhMatriptase für die verwendeten Substratsequenzen.

Die entsprechenden TCBs wurden mit der angegebenen rekombinanten Protease inkubiert und anschliessend auf ihre Bindung an CD3 untersucht. Jeder Balken stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt (n = 2). Für die statistische Analyse wurde ein „two-tailed, paired t-test“ verwendet.

Nachdem die Schneidbarkeit und die Spezifität der Linker mit verschiedenen Proteaseschnittstellen gezeigt wurde, wurde die Aktivierung durch zelluläre Proteasen im Zytotoxizitätsversuch analysiert. In diesem Versuch konnten alle Prot-FOLR1 TCBs aktiviert werden, was bedeutet, dass sowohl der MMP-2,-9 Linker als auch der Matriptase Linker geschnitten wurden. Die Kombination von Schnittstellen hatte einen synergistischen Effekt auf die Aktivierungseffizienz. Der Prot-FOLR1 TCB mit MMP-2,-9-Matriptase Linker hatte für HeLa Zellen eine sechs- bis sieben-fach geringere EC50 als die Prot-FOLR1 TCBs mit MMP-2,-9- oder Matriptase Linker (Abbildung 14). Für Skov-3 Zellen war der Unterschied der EC50- Werte geringer, aber für Matriptase Linker und MMP-2,-9-Matriptase Linker ebenfalls signifikant (Abbildung 14).

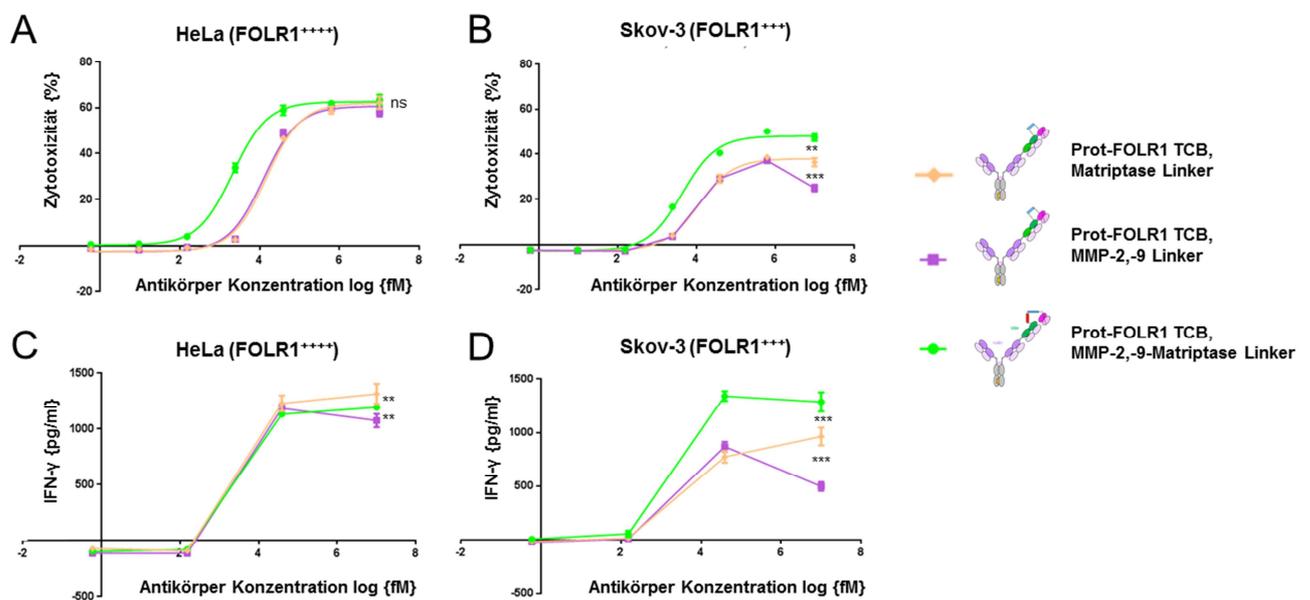


Abbildung 14: Induktion von Tumorzellzytotoxizität und T-Zell-Aktivierung durch Prot-FOLR1 TCB, 4.32 mit verschiedenen Linkern.

Dosis-abhängige Tumorzellzytotoxizität nach 48 h. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Der Prot-FOLR1 TCB mit Matriptase Linker, mit MMP-2,-9 Linker oder mit einem kombinierten MMP-2,-9-Matriptase Linker wurde verwendet. (A) Zytotoxizität für HeLa Zellen. (B) Zytotoxizität für Skov-3 Zellen. (C) IFN- γ für vier Konzentrationen, HeLa Zellen. (D) IFN- γ für vier Konzentrationen, Skov-3 Zellen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die Berechnung der EC50-Werte (Zytotoxizität) wurde eine sigmoidale Dosis-Abhängigkeit berechnet (GraphPad Prism6). Für die statistische Analyse wurde der two-sample t-test (Zytotoxizität) und der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (IFN- γ) angewendet.

Um zu untersuchen, ob die Aktivität des Prot-FOLR1 TCBs nach Linkerspaltung vergleichbar zum FOLR1 TCB ist, wurde der Prot-FOLR1 TCB mit rhMatriptase vorgeschnitten und bezüglich Tumorzellzytotoxizität analysiert. Für HeLa-Tumorzellen mit sehr hoher FOLR1-Expression (ca. 2 mio FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) erreichten sowohl der vorgeschnittene Prot-FOLR1 TCB als auch der unbehandelte Prot-FOLR1 TCB die Aktivität des FOLR1 TCBs (Abbildung 15). Für Skov-3 Tumorzellen mit mittlerer FOLR1-Expression (ca. 0,1 mio FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) waren der vorgeschnittene Prot-FOLR1 TCB und der FOLR1 TCB vergleichbar, der Prot-FOLR1 TCB, der nur von zellulären Proteasen geschnitten wurde, war weniger potent, induzierte aber dennoch Zellyse der Skov-3 Zellen mit einer EC50 von ca. 7,7 pM (EC 50 des vorgeschnittenen Prot-FOLR1 TCB: 3,3 pM). Die Maskierung des anti-idiotypischen anti-CD3 scFv konnte mit Hilfe eines Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker gezeigt werden. Die EC50 war zwischen 3000 bis 4000 mal höher als die des Prot-FOLR1 TCB für HeLa-Zellen. Für Skov-3 Zellen induzierte dieser maskierte

FOLR1 TCB keine Zellyse (Abbildung 15). Zusätzlich zur Zytotoxizitätsmessung der TCBs mit PBMCs als Effektorzellen wurde der Aktivierungsmarker CD69 für CD8 positive T-Zellen und IFN- γ quantifiziert. Die Tumorzellyse ging mit T-Zell-Aktivierung (CD8⁺CD69⁺, IFN- γ) einher (Abbildung 15 Abbildung 15).

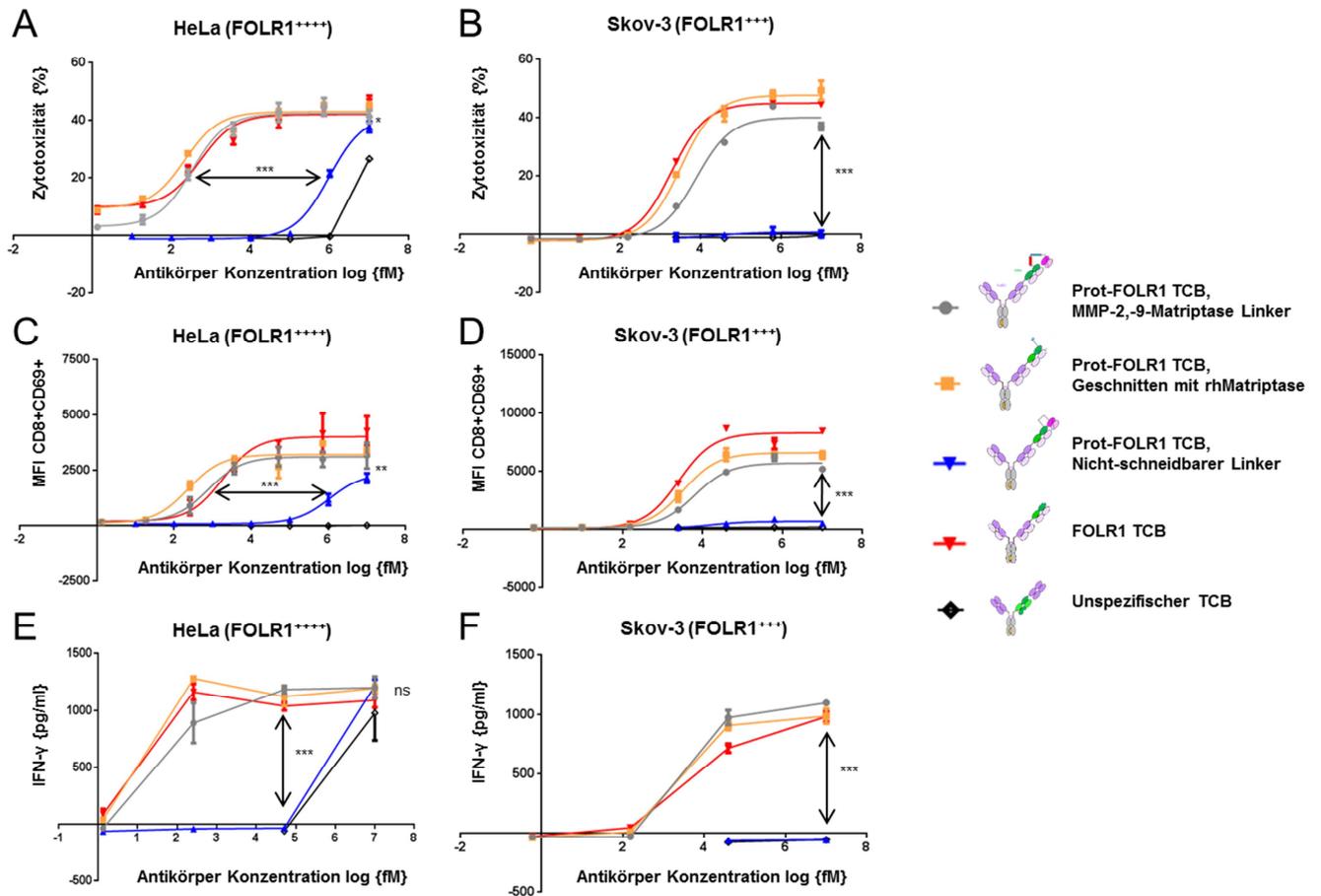


Abbildung 15: Induktion von Tumorzellzytotoxizität und T-Zell-Aktivierung durch Prot-FOLR1 TCB, 4.32 mit MMP-2,-9-Matriptase Linker.

Dosis-abhängige Tumorzellzytotoxizität und T-Zell-Aktivierung (CD8⁺CD69⁺ und IFN- γ) nach 48 h. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Der Prot-FOLR1 TCB (mit rhMatriptase geschnitten oder durch zelluläre Proteasen geschnitten), der FOLR1 TCB und der Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker wurden verwendet. (A) Zytotoxizität für HeLa Zellen. (B) Zytotoxizität für Skov-3 Zellen. (C) Quantifizierung von CD8⁺CD69⁺, HeLa Zellen. (D) Quantifizierung von CD8⁺CD69⁺, Skov-3 Zellen. (E) Quantifizierung von IFN- γ , HeLa Zellen. (F) Quantifizierung von IFN- γ , Skov-3 Zellen. Der unspezifische TCB und der Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem linker wurden nur in den höchsten Konzentrationen verwendet. Die Quantifizierung von IFN- γ wurde für jeweils vier Konzentrationen (unspezifischer TCB und Skov-3 Prot-FOLR1 TCB, nicht-schneidbarer Linker: zwei Konzentrationen) durchgeführt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die Berechnung der EC50-Werte (Zytotoxizität) wurde eine sigmoidale Dosis-Abhängigkeit berechnet (GraphPad Prism6). Für die statistische Analyse wurde der two-sample t-test (Zytotoxizität und MFI CD8⁺CD69⁺) und der two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur (MFI CD8⁺CD69⁺ und IFN- γ) angewendet.

Um zusätzlich zu den Endpunktmessungen eine Kinetik der Tumorzellzytotoxizität zu sehen, wurden MDA-MB-231 NucLight red Tumorzellen (FOLR1 positiv) mit verschiedenen TCBs und PBMCs inkubiert. Die Tumorzellzahl konnte anhand der rot gefärbten Zellkerne quantifiziert

werden. Die Tumorzelllyse durch den Prot-FOLR1 TCB (durch rhMatriptase bzw. durch zelluläre Proteasen geschnitten) und FOLR1 TCB war vergleichbar. Die Tumorzellen, die mit dem nicht-schneidbaren Prot-FOLR1 TCB und PBMCs inkubiert wurden, wurden dagegen nicht beeinträchtigt (Abbildung 16).

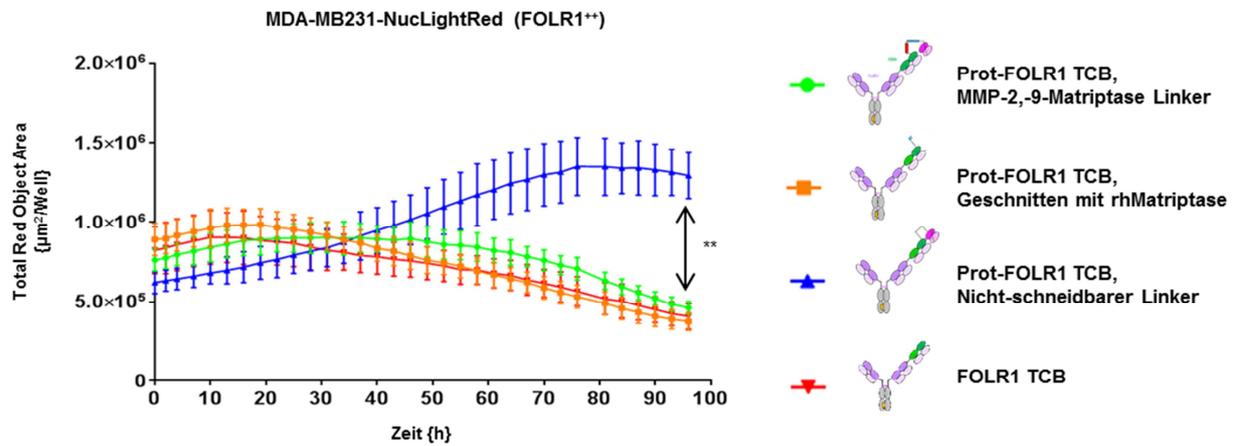


Abbildung 16: Inhibierung des Tumorzellwachstums durch PBMCs und Prot-FOLR1 TCB.

Tumorzellwachstum (CellPlayer™ MDA-MB-231 NucLight red, FOLR1 positiv) in Anwesenheit verschiedener TCBs und PBMCs als Effektorzellen („Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1). Jeder Punkt stellt den Mittelwert Zielzellzahl (Mittelwert vs Zeit) von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und der Graph ist repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die statistische Analyse wurde der „two-sample t-test“ verwendet.

7.7 Anwendbarkeit des maskierten anti-CD3-Fab für weitere TCBs

Ein grosser Vorteil der Maskierung des anti-CD3-Fabs sollte die Anwendbarkeit für TCBs mit verschiedenen Zielantigenen sein. Um zu zeigen, dass das Konzept auch für andere TCBs einsetzbar ist, wurde ein Protease-aktivierbarer Mesothelin TCB (Prot-MSLN TCB) generiert und für zwei Tumorzelllinien mit verschieden hoher MSLN Expression getestet. Wie für den Prot-FOLR1-TCB wurde auch für den Prot-MSLN TCB untersucht, ob die Aktivität des Prot-MSLN TCBs nach der Linkerspaltung vergleichbar zum MSLN TCB ist und ob die Maskierung die Tumorzelllyse verringern kann. Dafür wurde der Prot-MSLN TCB mit rhMatriptase vorgeschnitten und bezüglich Tumorzellzytotoxizität analysiert.

Für NCIH596 Tumorzellen mit mittlerer MSLN Expression (ca. 0,08 mio MSLN Antigenbindestellen pro Zelle) und für AsPC-1 Tumorzellen mit mittlerer MSLN Expression (ca. 0,05 mio MSLN Antigenbindestellen pro Zelle) waren die EC50-Werte der vorgeschnittenen Prot-MSLN TCB und der unbehandelte Prot-MSLN TCB, der von zellulären Protease geschnitten wurde, vergleichbar mit dem MSLN TCB (Abbildung 17). Die Maskierung des anti-idiotypischen anti-CD3 scFv konnte die Tumorzelllyse für beide MSLN positiven Tumorzelllinien verhindern (Abbildung 17).

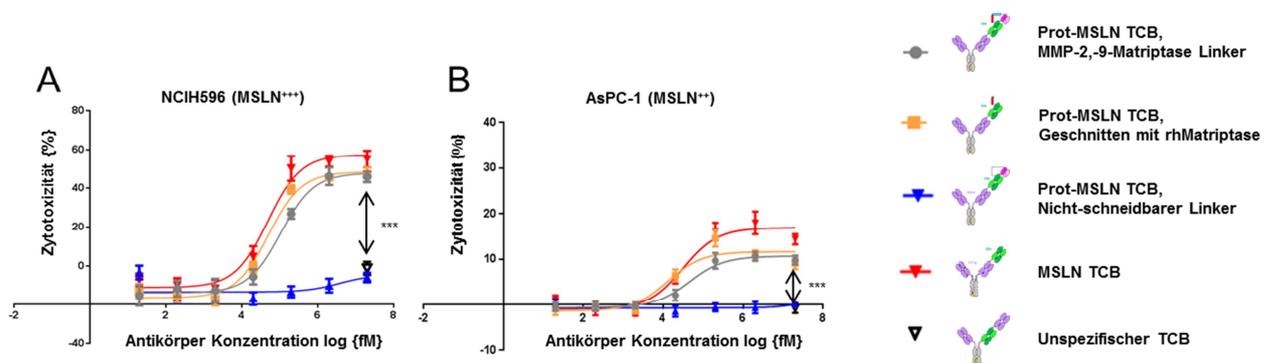


Abbildung 17: Dosisabhängige Tumorzellzytotoxizität induziert durch Prot-MSLN TCB.

Dosis-abhängige Tumorzellzytotoxizität nach 48 h. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Der Prot-MSLN TCB (mit rhMatriptase geschnitten oder durch zelluläre Proteasen geschnitten), der MSLN TCB, der Prot-MSLN TCB mit nicht-schneidbarem Linker und ein unspezifischer TCB wurden verwendet. (A) Zytotoxizität für NCIH596 Zellen. (B) Zytotoxizität für AsPC-1 Zellen. Der unspezifische TCB wurde jeweils nur in der höchsten Konzentration verwendet. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die Berechnung der EC50-Werte (Zytotoxizität) wurde eine sigmoidale Dosis-Abhängigkeit berechnet (GraphPad Prism6). Für die statistische Analyse wurde der two-sample t-test (Zytotoxizität) angewendet.

7.8 Reduktion der Zytotoxizität für primäre Zellen mit geringer FOLR1-Expression durch Maskierung des anti-CD3-Fabs

Eine der wichtigsten Fragen war, ob die Maskierung des anti-CD3-Fabs im FOLR1 TCB die Zytotoxizität für gesunde Zellen mit geringer FOLR1-Expression verringern kann. In der Literatur wurde beschrieben, dass FOLR1 nicht nur in Tumoren, sondern auch in der Lunge oder der Niere exprimiert wird (Parker et al. 2005). Aus diesem Grund verwendeten wir primäre humane Bronchialepithelzellen (HBepiC, < 1000 FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) und primäre humane Nierenrindeneithelzellen (HrcEpiC, < 1000 FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) um die Toxizität des Prot-FOLR1 TCB mit der des parentalen FOLR1 TCB zu vergleichen. Die eingesetzte Konzentration war 10 Mal höher (100 nM) als die höchste Konzentration, die in den beiden Tumorzelllinien HeLa und Skov-3 verwendet wurde (10 nM). Während der FOLR1 TCB nach 72 h deutlich Zelllyse (> 50 %) für HBepiC und HrcEpiC induzierte, war die Zytotoxizität für den Prot-FOLR1 TCB signifikant geringer (Abbildung 18). Für HBepiC war der Unterschied bereits nach 48 h deutlich, für HrcEpiC erst nach 72 h. Die Freisetzung von IFN- γ ging mit der Zytotoxizität einher.

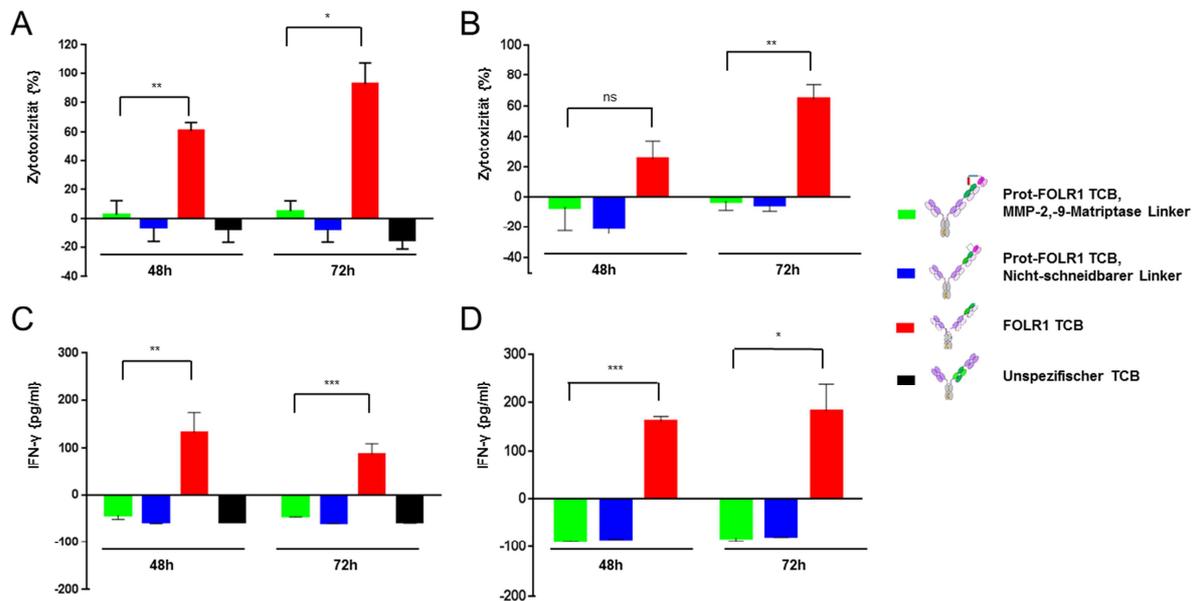


Abbildung 18: Zytotoxizität des Prot-FOLR1 TCB für primäre humane Epithelzellen (HBepiC und HrcEpiC). Zytotoxizität und IFN- γ Quantifizierung des FOLR1 TCBs und des Prot-FOLR1 TCBs 48 h und 72 h nach Inkubation mit HBepiC bzw. HrcEpiC und PBMCs. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Die Konzentration der eingesetzten TCBs war 100 nM. Der Prot-FOLR1 TCB (durch zelluläre Proteasen geschnitten), der FOLR1 TCB und der Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker wurden verwendet. (A) Zytotoxizität für HBepiC Zellen. (B) Zytotoxizität für HrcEpiC Zellen. (C) IFN- γ Quantifizierung für HBepiC Zellen. (D) IFN- γ Quantifizierung für HrcEpiC Zellen. Der unspezifische TCB wurde nur für HBepiC Zellen verwendet. Jeder Balken stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die statistische Analyse wurde der „paired, two-tailed t-test“ (Zytotoxizität) und der „two-sample t-test“ (IFN- γ) verwendet.

Als zusätzliche Kontrolle wurden MKN-45 Tumorzellen (< 1000 FOLR1 Antigenbindestellen pro Zelle) untersucht. Auch hier war eine Reduktion der Zytotoxizität durch die Maskierung des anti-CD3-Fab erkennbar (Abbildung 19). MKN-45 Zellen exprimieren viel CEA weshalb der CEA TCB als Positivkontrolle verwendet wurde.

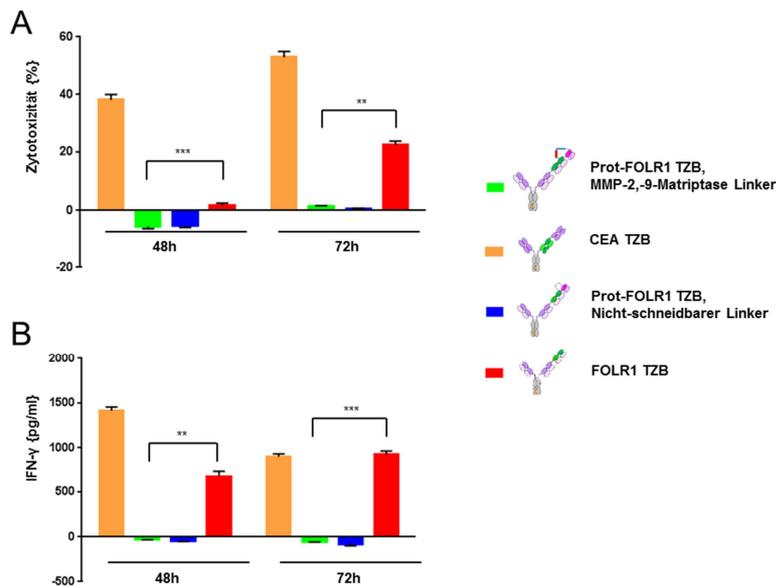


Abbildung 19: Zytotoxizität für Tumorzellen mit geringer FOLR1-Expression.

Zytotoxizität verschiedener TCBs nach 48 h und 72 h für MKN-45 Tumorzellen mit geringer FOLR1-Expression. PBMCs wurden als Effektorzellen verwendet mit einem „Effektor zu Zielzelle“ Verhältnis von 10:1. Die Konzentration der eingesetzten TCBs war 100 nM. Als Positivkontrolle wurde der CEA TCB verwendet. Der Prot-FOLR1 TCB (durch zelluläre Proteasen geschnitten), der FOLR1 TCB und der Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker wurden verwendet. Jeder Balken stellt den Mittelwert von Triplikaten dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt und die Graphen sind repräsentativ für drei verschiedene PBMC Spender. Für die statistische Analyse wurde der „paired, two-tailed t-test“ (Zytotoxizität) und der „two-sample t-test“ (IFN- γ) verwendet.

7.9 Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB durch Patientenproben

Um zu zeigen, dass der Prot-FOLR1 TCB auch in Tumoren aktiviert werden kann, wurden Tumorproben von Patienten *ex vivo* analysiert. Für die Aktivierung der Jurkat NFAT Reporterzellen benötigt es sowohl die Bindung des TCB an das Zielantigen als auch die Bindung an CD3 ϵ (siehe 6.1.4.4). Die CD3 ϵ Bindung kann nur erfolgen, wenn der Linker geschnitten und damit der anti-CD3-Fab aktiviert wurde (Abbildung 3). Für alle drei Ovarialtumorproben konnte FOLR1-Expression nachgewiesen werden (FOLR1 TCB) (Abbildung 20). Die Prot-FOLR1 TCBs waren sowohl für die gutartige Probe (gutartiges Fibrom des Ovars) als auch für die Darmkrebsprobe (Muzinöses Adenokarzinom des Darmes) vergleichbar mit dem blockierten Prot-FOLR1 TCB (nicht-schneidbarer Linker). Die Inkubation mit Tumorproben an sich führte also nicht zur Aktivierung des Prot-FOLR1 TCBs. Die Analyse der beiden malignen Proben zeigte eine

deutliche Aktivierung des Prot-FOLR1 TCBs mit MMP-2,-9-Matriptase Linker vergleichbar zum FOLR1 TCB (Abbildung 20).

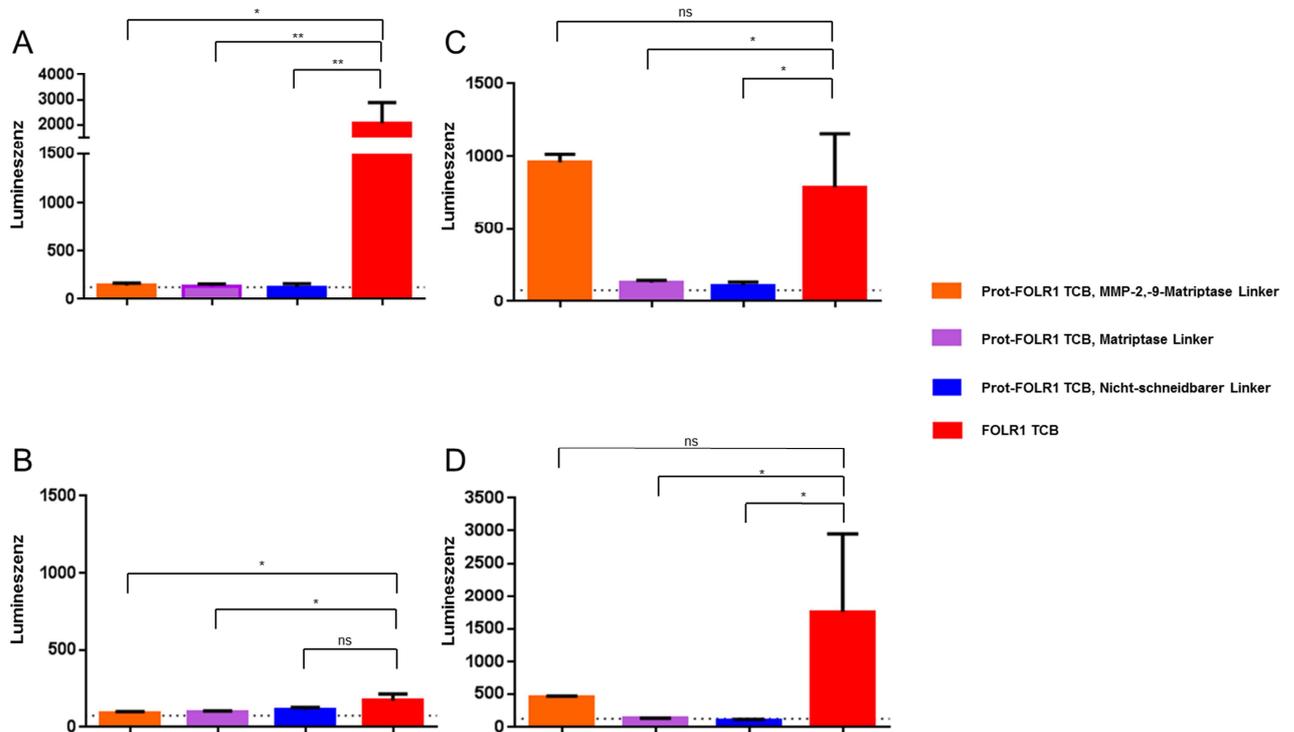


Abbildung 20: Ex vivo Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB durch Patientenproben.

Jurkat NFAT Reporter Versuch mit verschiedenen Patiententumorproben zum Nachweis FOLR1-Expression und der Proteaseaktivität. Die Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB korreliert mit der Lumineszenz, da die Aktivierung der Jurkat NFAT Reporterzellen nur erfolgt, wenn der Linker geschnitten wurde und das Zielantigen exprimiert wird. Der Prot-FOLR1 TCB mit Matriptase Linker (durch zelluläre Proteasen geschnitten), Prot-FOLR1 TCB mit MMP-2,-9-Matriptase Linker (durch zelluläre Proteasen geschnitten), der FOLR1 TCB und der Prot-FOLR1 TCB mit nicht-schneidbarem Linker wurden verwendet. (A) Gutartiges Fibrom des Ovars. (B) Muzinöses Adenokarzinom des Darmes, Stadium IV B (C) Malignes Ovarialkarzinom, seröser Typ, Stadium III B. (D) Malignes Ovarialkarzinom, seröser Typ, Stadium III C. Jeder Balken stellt den Mittelwert von Triplikaten dar (Duplikate für A und D, vier Werte aus zwei Messungen), die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt. Die gepunktete Linie zeigt die Aktivierung der Jurkat NFAT Reporter Zellen mit Tumorprobe, ohne TCB. Für die statistische Analyse wurde der „two-tailed t-test“ verwendet.

8. Diskussion

8.1 Erkenntnisse dieser Arbeit

Ein Protease-aktivierbarer TCB, der durch die tumorspezifische Aktivierung weniger Zellyse für gesunde Zellen mit geringer Zielantigenexpression (on-target aber off-tumor Toxizität) induzieren soll, stellt den Kern der vorliegenden Arbeit dar. Das grundlegende Prinzip der tumor-spezifischen Protease-Aktivierung wurde bereits beschrieben und zeigte eine erhöhte Sicherheit, während die anti-tumorale Wirksamkeit nicht beeinträchtigt wurde (Desnoyers et al. 2013, Watermann et al. 2007). Ein Protease-aktivierbarer anti-CD3-Fab wurde für die Anwendung im TCB Format generiert. Es konnte gezeigt werden, dass der anti-CD3-Fab spezifisch blockiert und durch Proteasen vollständig aktiviert werden kann. Der Prot-FOLR1 TCB induzierte signifikant weniger Zytotoxizität für primäre Zellen mit geringer FOLR1-Expression als der FOLR1 TCB.

8.2 Ansätze zur Reduktion von Nebenwirkungen therapeutischer Antikörper

Antigene, die nur von Tumorzellen exprimiert werden (Neoantigene) sind optimale Zielantigene für therapeutische Antikörper, allerdings ist die geringe Zahl solcher Antigene limitierend. Aus diesem Grund gibt es verschiedene Ansätze zur Erhöhung der Selektivität von bispezifischen Antikörpern gegen tumorassoziierten Zielantigene. Bispezifische T-Zell Antikörper (anti-CD3 und anti-Zielantigen) beispielsweise benötigen für die Aktivierung von T-Zellen über CD3 die Kreuzvernetzung mit einer Zelle, die das Zielantigen exprimiert (Huehls et al. 2015). Der TCB (anti-CD3 und zwei Fabs gegen Zielantigen) hat durch seine Avidität zum Zielantigen eine bessere Diskriminierung zwischen Zellen mit hoher Zielantigenexpression (Tumorzellen) und gesunden Zellen mit geringer Zielantigenexpression (Klein et al. 2017) Des Weiteren ist das Risiko einer ungewollten Aktivierung von NK-Zellen oder Zellen des Komplementsystems durch die Verwendung eines nicht-funktionalen Fc-Teils verringert (Hessell et al. 2007). Auch die Humanisierung von Antikörpern (z. B. aus Immunisierung) oder die Verwendung humaner Antikörper (z. B. aus Phagen) kann das Risiko einer Immunogenitätsreaktion verringern (Harding et al. 2010). Die Aktivierung von Antikörpern durch tumorspezifische Proteasen kann die Selektivität von Antikörpern ebenfalls erhöhen. Der hier beschriebene Prot-FOLR1 TCB beinhaltet vier Ansätze (Avidität, humaner Antikörper, nicht-funktionaler Fc, tumorspezifische Aktivierung) zur Vermeidung von Nebenwirkungen.

8.3 Anti-idiotypische anti-CD3-Maske

Desnoyers *et al.* beschrieben einen sogenannten ProbodyTM, ein auf Cetuximab basierender, monoklonaler IgG Antikörper dessen anti-EGFR Fabs N-terminal mit je einem Peptid blockiert werden. Ein durch tumor-spezifische Proteasen schneidbarer Linker verbindet das blockierende Peptid mit der LC des anti-EGFR Fab (Desnoyers *et al.* 2013). Im Gegensatz zum Probody von Desnoyers *et al.* wurde nicht der Zielantigen-Binder maskiert, sondern der anti-CD3-Fab, um diese Einheit generisch für verschiedene TCBS verwenden zu können. Ausserdem wurde zur Blockierung kein Peptid verwendet, sondern eine anti-idiotypische anti-CD3 scFv Maske. Anti-idiotypische Antikörper sind Antikörper gegen die variable Region eines Antikörpers. Sie können im Körper beispielsweise nach Verabreichung eines therapeutischen Antikörpers produziert werden (Harding *et al.* 2010). Die anti-idiotypische scFv Maske bindet ein Epitop des anti-CD3-Fab. Sie kann humanisiert werden, um das Risiko einer Immunogenitätsreaktion und damit mögliche Nebenwirkungen zu verringern (Harding *et al.* 2010). Zusätzlich kann die Affinität so moduliert werden, dass eine optimale Maskierung und Aktivierung möglich ist. Die Maske sollte effizient maskieren, aber nach Linkerspaltung auch abdissoziieren können.

8.4 FOLR1

FOLR1 ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-gebundenes Membranprotein, das Folsäure bindet und die Endozytose für die Aufnahme in die Zelle induziert (Leamon *et al.* 2001). In dieser Arbeit wurde ein Protease-aktivierbarer FOLR1 TCB (Prot-FOLR1 TCB) generiert, da FOLR1 z. B. sehr häufig in Ovarial- und Lungenkarzinomen überexprimiert wird (Kessenbrock *et al.* 2010, Kobel *et al.* 2014, Parker *et al.* 2005). Farletuzumab, ein monoklonaler anti-FOLR1 (FR α) IgG wurde bereits in klinischen Studien getestet. Farletuzumab hatte nur geringe Nebenwirkungen, war aber leider nicht ausreichend wirksam (Konner *et al.* 2010). KHK2805, ein humanisierter anti-FR α Antikörper mit einem modifizierten Fc-Teil, zeigte präklinisch anti-tumorale Wirkung (Ando *et al.* 2017), wurde allerdings bisher noch nicht klinisch getestet. Eine erhöhte Konzentration von CA125, häufig bei Ovarialkarzinompatienten, kann sich negativ auf die NK-Zell Aktivität auswirken (Konner *et al.* 2010), weshalb für diese Patienten die Therapie mit einem (Prot-)FOLR1 TCB vorteilhaft sein könnte (Farrell *et al.* 2012). IMGN853, ein FOLR1 (FR α) Antikörper-Wirkstoff Konjugat zeigte Sicherheit und Wirksamkeit in Platin-resistentem Ovarialkrebs, allerdings wurden Nebenwirkungen beispielsweise in den Augen (getrübte Sicht) von 42 % der behandelten Patienten beobachtet (Ab *et al.* 2015, Armstrong *et al.* 2013, Konner *et al.* 2010, Moore *et al.* 2017, Ponte *et al.* 2016). Da der FOLR1 TCB noch potenter ist als ein Antikörper-

Wirkstoff Konjugat, könnte dieser zu stärkeren Nebenwirkungen führen. Einen Hinweis darauf gab eine Verträglichkeitsstudie in nicht-menschlichen Primaten bei der die Tiere bereits nach 24 h bei einer Dosis von 10 µg / kg FOLR1 TCB (invertiertes Format) Atemprobleme hatten (Giusti 2016). In ihrer Lunge wurde eine starke T-Zell Infiltration festgestellt, was sich damit erklären lässt, dass FOLR1 unter anderem auch in der Lunge exprimiert wird (Giusti 2016, Parker et al. 2005). Dieser FOLR1 TCB induziert die Tumorzelllyse durch T-Zellen, wenn das Zielantigen (FOLR1) auf den Tumorzellen exprimiert wird und ist mit EC50 Werten im einstelligen pM Bereich, so potent, dass er auch gesunde Zellen mit geringer FOLR1-Expression (weniger als 1000 Antigenbindestellen pro Zelle) lysieren kann, was zu „on-target/off-tumor“ Toxizität führen kann. Während FOLR1 für die alleinige klinische Entwicklung als TCB ungeeignet war, stellte es daher ein geeignetes Zielantigen, um das Konzept der Protease-Aktivierung zur Reduktion von Zytotoxizität in gesundem Gewebe zu testen.

8.5 Blockierung des anti-CD3-Fab

Die Blockierung des anti-CD3-Fab im TCB Format war abhängig vom anti-idiotypischen anti-CD3 scFv und vom Antigenexpressionslevel der Zielzellen. Je nach blockiertem Epitop, das der anti-idiotypische anti-CD3 scFv erkennt, wird die Bindung des anti-CD3 an CD3ε im T-Zell Rezeptor mehr oder weniger beeinflusst. Bei die beiden höchsten hier verwendeten Konzentrationen (10 nM und 0,63 nM) konnte mit dem Prot-FOLR1 TCB, 4.32 mit nicht-schneidbarem Linker für HeLa Zellen Zytotoxizität detektiert werden. Es ist möglich, dass die Bindung an CD3ε durch den anti-idiotypischen anti-CD3 scFv erschwert, aber nicht gänzlich verhindert wird. Die Wahrscheinlichkeit der Bindung des anti-idiotypischen anti-CD3 an den anti-CD3-Fab sollte durch den Linker erhöht sein (on-/off-rate), dennoch bindet die Maske nicht kovalent an anti-CD3. Bei hoher Antigendichte könnte es daher durch die Beweglichkeit der Maske zu T-Zell-Aktivierung kommen. Die Abhängigkeit der Maskierung von der Affinität des anti-idiotypischen anti-CD3 scFv bestätigt diese Vermutung. Die geringe Maskierung konnte nur für HeLa Zellen mit sehr hoher FOLR1-Expression, nicht aber für Zellen mit mittlerer (Skov-3) oder geringer FOLR1-Expression (HBepiC, HrcEpiC, Mkn-45) detektiert werden. Der anti-idiotypischen anti-CD3 4.32 maskierte dennoch so, dass die EC50 der Tumorzelllyse für HeLa Zellen mit hoher FOLR1-Expression ca. 3000-fach reduziert wurde. Für Skov-3 Zellen konnte die Tumorzelllyse sogar gänzlich verhindert werden, wenn die Maske mit einem nicht-schneidbaren Linker fusioniert wurde. Desnoyers *et al.* zeigten eine Erhöhung der EC50 um das 400-fache für den intakten Probody (maskierter

Cetuximab) im Vergleich zu Cetuximab (Desnoyers et al. 2013). Da es sich beim Probody allerdings um einen IgG handelt, kann er nicht direkt mit dem TCB verglichen werden.

8.6 Prot-FOLR1 TCB: Formatvergleich

Vorangegangene Versuche zeigten, dass der invertierte TCB (anti-CD3-Fab innen) potenter ist als der analoge klassische TCB (anti-CD3 aussen) (Klein et al. 2017) und dass manche Zielantigenbinder keine N-terminale Fusion des anti-CD3-Fabs erlauben. Daher wurde das Konzept der Protease-Aktivierung für das invertierte Format ebenfalls getestet. Auch der Prot-FOLR1 TCB, im invertierten Format, induzierte für HeLa und Skov-3 Zellen eine bessere Lyse, allerdings war die Maskierungseffizienz signifikant geringer im Vergleich zum Prot-FOLR1 TCB, im klassischen TCB Format. Die SPR Analyse des anti-idiotypischen anti-CD3 4.32 Antikörpers gegen anti-CD3 im klassischen und im invertierten TCB zeigte eine geringere Affinität zum anti-CD3 im invertierten Format, was für die verringerte Maskierungseffizienz verantwortlich sein könnte. Das Epitop, das der anti-idiotypische anti-CD3 Antikörper erkennt könnte im invertierten Format schlechter zugänglich sein. Die Maskierung sollte jedoch für Zellen mit geringem Antigen-Expressionslevel, also gesunde Zellen, ausreichend sein.

8.7 Stabilität der Prot-FOLR1 TCBs

Die Halbwertszeit von IgG-Antikörpern beträgt ungefähr 20 - 21 Tage (Keizer et al. 2010). Im Vergleich dazu ist die Halbwertszeit von Fc-freien Antikörper-Formaten (z.B. BiTE) sehr viel geringer (ca. 1 bis 2 h) (Portell et al. 2013). Die Stabilität des Prot-FOLR1 TCB wurde *ex vivo* in humanem Serum (14 Tage, 37 °C) getestet. Die Kapillarelektrophorese des Prot-FOLR1 TCB nach Inkubation in humanem Serum ergab keinen Hinweis auf geschnittenen Antikörper. Die eingefügten Mutationen (PG LALA) (Hessell et al. 2007) im Fc-Teil des Prot-FOLR1 TCB verhindern nicht die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), wodurch der Abbau dieses Antikörpers verzögert werden sollte (Keizer et al. 2010). Desnoyer *et al.* berichteten eine verdoppelte Halbwertszeit des Probody im Vergleich zu Cetuximab (in *Macaca fascicularis*) (Desnoyers et al. 2013). Die Verlängerung der Halbwertszeit könnte damit zusammenhängen, dass der maskierte Probody in der Peripherie nicht binden kann. Der Prot-FOLR1 TCB dagegen kann an FOLR1 binden, induziert aber keine Lyse, da der anti-CD3-Fab maskiert ist. Die Halbwertszeit des Prot-FOLR1 TCB sollte daher nicht höher sein als die des FOLR1 TCB. Bisher wurde die Serumstabilität noch nicht in Serum von Patienten analysiert. Laut Literatur kann MMP-2,-9 im Serum von Patienten vorhanden sein, allerdings konnte keine Aktivität dieser Proteasen im Serum nachgewiesen werden (Demeter et al. 2005, Desnoyers et al. 2013, List et al. 2006).

8.8 Tumor-assoziierte Proteasen und Proteaseaktivierung des Prot-FOLR1 TCBS

Die erhöhte Expression verschiedener Proteasen, wie Serin Proteasen (z.B. Matriptase), Cystein Proteasen (z.B. Cathepsin S) und Matrix Metalloproteinasen (z.B. MMP-2, MMP-9), wurde für mehrere solide Tumorarten beschrieben (Duffy 1996, Weidle 2014). Die Expression kann sowohl in Tumorzellen als auch in Zellen der Tumorumgebung, beispielsweise Tumor-assoziierte Makrophagen und Fibroblasten, stattfinden. In gesundem Gewebe sind Proteasen, wie MMP-9, wichtig für die Wundheilung, wo sie die Extrazelluläre Matrix abbauen können und Wachstums- und Angiogenesefaktoren (EGFR, VEGF) aktivieren können (Coussens et al. 2000). In Tumoren können sie das Wachstum und die Metastasierung fördern (Joyce et al. 2009). Matriptase, eine Typ II Transmembran Serin Protease, wird in mehreren Karzinomen wie Brust- und Ovarialkarzinomen überexprimiert. Ihre Aktivität in normalen Gewebe ist im Vergleich zum Tumor minimal, da im Tumor häufig das Verhältnis von Matriptase zu ihrem Inhibitor, Hepatozyten-Wachstumsfaktor I (HAI-I) and Hepatozyten-Wachstumsfaktor II (HAI-II), erhöht ist (M. Oberst et al. 2001, Tanimoto et al. 2005, Tanimoto et al. 2001, Uhland 2006). Weitere Beispiele sind Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2, Gelatinase A) und Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9, Gelatinase B), die in fortgeschrittenen Ovarial- und Brust-Karzinomen überexprimiert und aktiv sind (Hu et al. 2012, McGowan et al. 2008, Schmalfeldt et al. 2001, Sillanpaa et al. 2007, Thant et al. 2000, Yousef et al. 2014, Yu et al. 2009). In Zervix-, Brust- und Ovarialkarzinomen sowie in Asziten von Patienten mit Epitheliale Ovarialkarzinom konnte Aktivität von MMP-2- und MMP-9 detektiert werden, nicht aber im Serum dieser Patienten (Demeter et al. 2005, Hu et al. 2012, Roomi et al. 2010, Schmalfeldt et al. 2001, Yousef et al. 2014). Dies macht die Verwendung solcher Proteasen als Aktivatoren von Antikörpern zur Krebstherapie möglich und kann damit dazu beitragen ein Zielantigen, das normalerweise nicht in Frage käme, zu adressieren.

Für die Protease-Aktivierung mussten Proteasen gewählt werden, die in FOLR1 positiven Tumoren wie Ovarialkarzinomen exprimiert werden und aktiv sind, aber weder im Serum noch in gesundem Gewebe aktiv sind. Für die Protease-Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB wurden MMP-2, MMP-9 und Matriptase gewählt, da alle drei Proteasen diese Kriterien laut Literatur erfüllen (Demeter et al. 2005, Desnoyers et al. 2013, List et al. 2006, M. Oberst et al. 2001, M. D. Oberst et al. 2002, Tanimoto et al. 2005, Tanimoto et al. 2001). Für die Aktivierung schien es einen synergistischen Effekt der Kombination von Schnittstellen (MMP-2,-9-Matriptase Linker) zu geben. Desnoyers *et al.* verwendeten ebenfalls einen kombinierten Linker mit Schnittstellen für Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), Matriptase und Legumain (Desnoyers et al. 2013). Watermann *et al.*

kombinierten eine MMP-2- und eine uPA-Schnittstelle (Watermann et al. 2007). Der Prot-FOLR1 TCB mit MMP-2,-9-Matriptase Linker konnte sowohl in Zytotoxizitätsversuchen durch Tumorzellen (HeLa, Skov-3) als auch *ex vivo* durch unverdaute, bösartige Ovarialkarzinomproben von Patienten aktiviert werden und erreichte eine zum FOLR1 TCB vergleichbare Aktivität. Der Probody (uPA-Legumain-Matriptase Linker) war bezüglich Wirksamkeit in H292 Xenografts vergleichbar zu Cetuximab und konnte ebenfalls *ex vivo* durch Patiententumorproben (Darm- und Lungenkrebs) aktiviert werden (Desnoyers et al. 2013). Die Aktivierung des Prot-FOLR1 TCB erfolgte nur durch bösartige Ovarialkarzinomproben (2/2) für den Prot-FOLR1 TCB mit MMP-2,-9-Matriptase Linker. Eine Darmkrebsprobe sowie eine gutartige Ovarialtumorprobe konnten den Prot-FOLR1 TCB nicht aktivieren. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, Tumoren mit geringem malignen Potential und Metastasen höher ist als in gutartigen Tumoren (Demeter et al. 2005, Sillanpaa et al. 2007). Die Tumorproben wurden nicht verdaut, da beschrieben wurde, dass MMP-2, MMP-9 und Matriptase nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Zellen der Tumorumgebung wie Fibroblasten und Tumor-assoziierte Makrophagen exprimiert werden können (Condeelis et al. 2006, Hanahan et al. 2011, Menen et al. 2012, Pollard 2004). Tumor-assoziierte Proteasen können durch den Abbau der Extrazellulären Matrix den Tumorzellen helfen zu invasieren (List et al. 2006). Ausserdem können die Proteasen Wachstumsfaktoren oder Angiogenesefaktoren wie z.B. VEGF aktivieren und dadurch das Wachstum des Tumors begünstigen (Giraud et al. 2004, Weidle 2014).

8.9 Verringerte Zytotoxizität des Prot-FOLR1 TCBS für Zellen mit geringer FOLR1-Expression

Um die mögliche Reduktion der „on-target/off-tumor“ Toxizität zu zeigen, wurde die Zytotoxizität des Prot-FOLR1 TCB im Vergleich zum FOLR1 TCB auf primären Zellen mit geringer FOLR1-Expression (HBepiC und HrcEpiC) untersucht. Die Zytotoxizität mit dem Prot-FOLR1 TCB war gegenüber dem FOLR1 TCB signifikant reduziert und dass bei einer 10-fach höheren Konzentration als sie für Tumorzellen verwendet wurde. Desnoyer *et al.* zeigten mit dem Probody (maskierter Cetuximab) reduzierte Nebenwirkungen auf der Haut von nicht-menschlichen Primaten im Vergleich zu Cetuximab (Desnoyers et al. 2013). Für die weitere Analyse des Protease-aktivierbaren TCBS wird die Reduktion der Toxizität zusätzlich zu den Versuchen mit primären gesunden Zellen (HBepiC und HrcEpiC) noch auf einem „Organ-on-a-chip“ analysiert. Es bleibt allerdings zu klären, ob im Tumor aktivierter Prot-FOLR1 TCB, gesunde Zellen lysieren kann bevor er abgebaut wird. Dies kann nicht in Verträglichkeitsstudien in Primaten getestet werden, da

die Aktivierung ohne Tumor nicht stattfindet. Da der Prot-FOLR1 TCB nicht kreuzreaktiv zum murinen FOLR1 ist, würde auch eine Studie in Mäusen nichts über die Sicherheit aussagen. Die Sicherheit müsste daher in einer klinischen Studie gezeigt werden. Wie für den bereits erwähnten CEA TCB gezeigt wurde, könnte für die Berechnung der Dosis zur ersten Verabreichung im Menschen der MABEL Ansatz verwendet werden (Dudal et al. 2016).

8.10 Ausblick

Da die Expression von FOLR1 nicht auf Tumorzellen beschränkt ist, könnte die Therapie mit dem hier beschriebenen Prot-FOLR1 TCB sicherer sein als mit einem FOLR1 TCB. Die Aktivität der Proteasen, MMP-2 und MMP-9, wurde beispielsweise für Ovarialkarzinomproben (Tumor und Asziten) beschrieben (Demeter et al. 2005). Wenn der hier beschriebene Prot-FOLR1 TCB Sicherheit und Wirksamkeit auch in klinischen Studien zeigen kann, dann könnte er für Patienten mit FOLR1-positiven, soliden Tumoren (z. B. Lungen- oder Ovarialkarzinom) für die Immuntherapie verwendet werden. Vor allem für Patienten mit hohem CA125 Wert könnte der Prot-FOLR1 TCB im Vergleich zu FOLR1 mAbs (wie z. B. Farletuzumab) besser geeignet sein (Konner et al. 2010).

TCBs können die Infiltration von CD3 positiven T-Zellen in den Tumor bewirken (Bacac et al. 2016), wo diese MHC-unabhängig die Tumorzellyse induzieren können. Tumorzellen können sich allerdings vor den T-Zellen schützen, indem sie beispielsweise PD-L1 exprimieren und damit die durch T-Zellen induzierte Lyse inhibieren (Ribas 2015). Die Kombination des Prot-FOLR1 TCBs mit Immun-Checkpoint Inhibitoren könnte daher evtl. bessere Wirksamkeit zeigen als die Monotherapie mit dem Prot-FOLR1 TCB (Schreiner et al. 2016). Bei dem bereits erwähnten CEA TCB wird die Kombination mit Tecentriq® (NCT02650713) derzeit untersucht und zeigte bereits bessere Wirksamkeit als die Monotherapie mit CEA TCB (NCT02324257) (Bacac et al. 2016, ClinicalTrials.gov).

Im Hinblick auf die personalisierte Medizin könnte eine Patienten-Biopsie zunächst auf FOLR1-Expression und Protease Aktivität untersucht werden. Dazu könnten TCBs mit verschiedenen Proteaseschnittstellen getestet werden und somit der am besten geeignete Prot-FOLR1 TCB für den jeweiligen Patienten ausgewählt werden.

9. Referenzen

- 1 Ab, O., Whiteman, K. R., Bartle, L. M., Sun, X., Singh, R., Tavares, D., LaBelle, A., Payne, G., Lutz, R. J., Pinkas, J., Goldmacher, V. S., Chittenden, T. & Lambert, J. M.
IMGN853, a Folate Receptor-alpha (FRalpha)-targeting antibody-drug conjugate, exhibits potent targeted antitumor activity against FRalpha-expressing tumors
Mol Cancer Ther 2015; 14:1605-1613.
- 2 Ando, M., Nagata, K., Nihira, K., Suzuki, Y., Kanda, Y., Adachi, M., Kubota, T., Kameyama, N., Nakano, M., Ando, H., Yamano, K., Ishii, T., Nakai, R. & Nakamura, K.
Potent therapeutic activity against peritoneal dissemination and malignant ascites by the novel anti-Folate Receptor Alpha antibody KHK2805
Transl Oncol 2017; 10:707-718.
- 3 Armstrong, D. K., White, A. J., Weil, S. C., Phillips, M. & Coleman, R. L.
Farletuzumab (a monoclonal antibody against folate receptor alpha) in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer
Gynecol Oncol 2013; 129:452-458.
- 4 Arndt, C., von Bonin, M., Cartellieri, M., Feldmann, A., Koristka, S., Michalk, I., Stamova, S., Bornhauser, M., Schmitz, M., Ehninger, G. & Bachmann, M.
Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33-CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells
Leukemia 2013; 27:964-967.
- 5 Ast, O., Bacac, M., Imhof-Jung, S., Jaeger, C., Klein, C., Klostermann, S., Molhoj, M., Regula, J. T., Schaefer, W. & Umaña, P.
Bispecific t cell activating antigen binding molecules.
WO2016020309 A1, CA2951599A1, US20160075785 (2016).
- 6 Bacac, M., Fauti, T., Sam, J., Colombetti, S., Weinzierl, T., Ouaret, D., Bodmer, W., Lehmann, S., Hofer, T., Hosse, R. J., Moessner, E., Ast, O., Bruenker, P., Grau-Richards, S., Schaller, T., Seidl, A., Gerdes, C., Perro, M., Nicolini, V., Steinhoff, N., Dudal, S., Neumann, S., von Hirschheydt, T., Jaeger, C., Saro, J., Karanikas, V., Klein, C. & Umana, P.
A novel Carcinoembryonic antigen T-cell bispecific antibody (CEA TCB) for the treatment of solid tumors
Clin Cancer Res 2016; 22:3286-3297.
- 7 Bacac, M., Klein, C. & Umana, P.
CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors
Oncoimmunology 2016; 5:e1203498.
- 8 ClinicalTrials.gov
A study of RO6958688 in participants with locally advanced and/or metastatic Carcinoembryonic antigen positive solid tumors
<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02324257>> (2014).

- 9 Condeelis, J. & Pollard, J. W.
Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis
Cell 2006; 124:263-266.
- 10 Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D. & Werb, Z.
MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis
Cell 2000; 103:481-490.
- 11 Demeter, A., Sziller, I., Csapo, Z., Olah, J., Keszler, G., Jeney, A., Papp, Z. & Staub, M.
Molecular prognostic markers in recurrent and in non-recurrent epithelial ovarian cancer
Anticancer Res 2005; 25:2885-2889.
- 12 Desnoyers, L. R., Vasiljeva, O., Richardson, J. H., Yang, A., Menendez, E. E., Liang, T. W., Wong, C., Bessette, P. H., Kamath, K., Moore, S. J., Sagert, J. G., Hostetter, D. R., Han, F., Gee, J., Flandez, J., Markham, K., Nguyen, M., Krimm, M., Wong, K. R., Liu, S., Daugherty, P. S., West, J. W. & Lowman, H. B.
Tumor-specific activation of an EGFR-targeting probody enhances therapeutic index
Sci Transl Med 2013; 5:207ra144.
- 13 Dudal, S., Hinton, H., Giusti, A. M., Bacac, M., Muller, M., Fauti, T., Colombetti, S., Heckel, T., Giroud, N., Klein, C., Umana, P., Benincosa, L., Bachl, J., Singer, T. & Bray-French, K.
Application of a MABEL Approach for a T-Cell-Bispecific Monoclonal Antibody: CEA TCB
J Immunother 2016; 39:279-289.
- 14 Duffy, M. J.
Proteases as prognostic markers in cancer
Clin Cancer Res 1996; 2:613-618.
- 15 Farrell, C., Schweizer, C., Wustner, J., Weil, S., Namiki, M., Nakano, T., Nakai, K. & Phillips, M. D.
Population pharmacokinetics of farletuzumab, a humanized monoclonal antibody against folate receptor alpha, in epithelial ovarian cancer
Cancer Chemother Pharmacol 2012; 70:727-734.
- 16 Giraud, E., Inoue, M. & Hanahan, D.
An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis
J Clin Invest 2004; 114:623-633.
- 17 Giusti, A. M., Hinton, Heather, Bray-French, Katharine, Lechmann, Martin, Funk, Jurgen, Jacobsen, Bjoern, Richardson, Marion, Husar, Elisabeth, Woltz, Erich, Bruenker, Peter, Freimoser Grundschober, Anne, Weinzierl, Tina, Sam, Johannes, Umaña, Pablo, Klein, Christian
Safety assessment of monoclonal antibodies targeting FOLR1 in cynomolgus monkeys
14th European Congress of Toxicologic Pathology (ESTP) Adverse or not adverse – assessment and consequences 2016.

- 18 Haas, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbuse, R., Schlereth, B., Kufer, P. & Baeuerle, P. A.
Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110
Immunobiology 2009; 214:441-453.
- 19 Hanahan, D. & Weinberg, R. A.
Hallmarks of cancer: the next generation
Cell 2011; 144:646-674.
- 20 Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridg, R. B.
The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions
MAbs 2010; 2:256-265.
- 21 Harries, M. & Smith, I.
The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin)
Endocr Relat Cancer 2002; 9:75-85.
- 22 Hessell, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E. G., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M. S., Landucci, G., Forthal, D. N., Parren, P. W. H. I., Marx, P. A. & Burton, D. R.
Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV
Nature 2007; 449:101-104.
- 23 Hinrichs, C. S. & Restifo, N. P.
Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy
Nat Biotechnol 2013; 31:999-1008.
- 24 Hoffmann, P., Hofmeister, R., Brischwein, K., Brandl, C., Crommer, S., Bargou, R., Itin, C., Prang, N. & Baeuerle, P. A.
Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct
Int J Cancer 2005; 115:98-104.
- 25 Hoy, S. M.
Obinutuzumab: a review of its use in patients with chronic lymphocytic leukaemia
Drugs 2015; 75:285-296.
- 26 Hu, X., Li, D., Zhang, W., Zhou, J., Tang, B. & Li, L.
Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion
Arch Gynecol Obstet 2012; 286:1537-1543.
- 27 Huehls, A. M., Coupet, T. A. & Sentman, C. L.
Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy
Immunol Cell Biol 2015; 93:290-296.
- 28 Humblet, Y.
Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours

- Expert Opin Pharmacother* 2004; 5:1621-1633.
- 29 Joyce, J. A. & Pollard, J. W.
Microenvironmental regulation of metastasis
Nat Rev Cancer 2009; 9:239-252.
- 30 Keizer, R. J., Huitema, A. D., Schellens, J. H. & Beijnen, J. H.
Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies
Clin Pharmacokinet 2010; 49:493-507.
- 31 Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z.
Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment
Cell 2010; 141:52-67.
- 32 Klein, C., Neumann, C., Fauti, T., Weinzierl, T., Freimoser-Grundschober, A., Waldhauer, I., Fahrni, L., Herter, S., van Puijenbroek, E., Colombetti, S., Sam, J., Lang, S., Dudal, S., Schäfer, W., Regula, J. T. R., Moser, S., Ast, O., Hosse, R., Mössner, E., Brünker, P., Bacac, M. & Umana, P.
Abstract 3629: Engineering a novel asymmetric head-to-tail 2+1 T-cell bispecific (2+1 TCB) IgG antibody platform with superior T-cell killing compared to 1+1 asymmetric TCBs
Cancer Research 2017; 77:3629-3629.
- 33 Klein, C., Sustmann, C., Thomas, M., Stubenrauch, K., Croasdale, R., Schanzer, J., Brinkmann, U., Kettenberger, H., Regula, J. T. & Schaefer, W.
Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies
MAbs 2012; 4:653-663.
- 34 Kobel, M., Madore, J., Ramus, S. J., Clarke, B. A., Pharoah, P. D., Deen, S., Bowtell, D. D., Odunsi, K., Menon, U., Morrison, C., Lele, S., Bshara, W., Sucheston, L., Beckmann, M. W., Hein, A., Thiel, F. C., Hartmann, A., Wachter, D. L., Anglesio, M. S., Hogdall, E., Jensen, A., Hogdall, C., Kalli, K. R., Fridley, B. L., Keeney, G. L., Fogarty, Z. C., Vierkant, R. A., Liu, S., Cho, S., Nelson, G., Ghatage, P., Gentry-Maharaj, A., Gayther, S. A., Benjamin, E., Widschwendter, M., Intermaggio, M. P., Rosen, B., Bernardini, M. Q., Mackay, H., Oza, A., Shaw, P., Jimenez-Linan, M., Driver, K. E., Alsop, J., Mack, M., Koziak, J. M., Steed, H., Ewanowich, C., DeFazio, A., Chenevix-Trench, G., Fereday, S., Gao, B., Johnatty, S. E., George, J., Galletta, L., Group, A. S., Goode, E. L., Kjaer, S. K., Huntsman, D. G., Fasching, P. A., Moysich, K. B., Brenton, J. D. & Kelemen, L. E.
Evidence for a time-dependent association between FOLR1 expression and survival from ovarian carcinoma: implications for clinical testing. An Ovarian Tumour Tissue Analysis consortium study
Br J Cancer 2014; 111:2297-2307.
- 35 Kobold, S., Duewell, P., Schnurr, M., Subklewe, M., Rothenfusser, S. & Endres, S.
Immunotherapy in tumors
Dtsch Arztebl Int 2015; 112:809-815.

- 36 Konner, J. A., Bell-McGuinn, K. M., Sabbatini, P., Hensley, M. L., Tew, W. P., Pandit-Taskar, N., Vander Els, N., Phillips, M. D., Schweizer, C., Weil, S. C., Larson, S. M. & Old, L. J.
Farletuzumab, a humanized monoclonal antibody against folate receptor alpha, in epithelial ovarian cancer: a phase I study
Clin Cancer Res 2010; 16:5288-5295.
- 37 Koontongkaew, S.
The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas
J Cancer 2013; 4:66-83.
- 38 Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., Long, G. V., Callahan, M. K., Postow, M. A., Grossmann, K., Sznol, M., Dreno, B., Bastholt, L., Yang, A., Rollin, L. M., Horak, C., Hodi, F. S. & Wolchok, J. D.
Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma
N Engl J Med 2015; 373:23-34.
- 39 Le Jeune, C. & Thomas, X.
Potential for bispecific T-cell engagers: role of blinatumomab in acute lymphoblastic leukemia
Drug Des Devel Ther 2016; 10:757-765.
- 40 Leamon, C. P. & Low, P. S.
Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery
Drug Discov Today 2001; 6:44-51.
- 41 List, K., Bugge, T. H. & Szabo, R.
Matriptase: potent proteolysis on the cell surface
Mol Med 2006; 12:1-7.
- 42 Maloney, D. G.
Mechanism of action of rituximab
Anticancer Drugs 2001; 12 Suppl 2:S1-4.
- 43 McGowan, P. M. & Duffy, M. J.
Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database
Ann Oncol 2008; 19:1566-1572.
- 44 Menen, R. S., Hassanein, M. K., Momiyama, M., Suetsugu, A., Moossa, A. R., Hoffman, R. M. & Bouvet, M.
Tumor-educated macrophages promote tumor growth and peritoneal metastasis in an orthotopic nude mouse model of human pancreatic cancer
In Vivo 2012; 26:565-569.

- 45 Metz, S., Panke, C., Haas, A. K., Schanzer, J., Lau, W., Croasdale, R., Hoffmann, E., Schneider, B., Auer, J., Gassner, C., Bossenmaier, B., Umana, P., Sustmann, C. & Brinkmann, U.
Bispecific antibody derivatives with restricted binding functionalities that are activated by proteolytic processing
Protein Eng Des Sel 2012; 25:571-580.
- 46 Moore, K. N., Martin, L. P., O'Malley, D. M., Matulonis, U. A., Konner, J. A., Perez, R. P., Bauer, T. M., Ruiz-Soto, R. & Birrer, M. J.
Safety and activity of Mirvetuximab Soravtansine (IMGN853), a Folate Receptor Alpha-targeting antibody-drug conjugate, in platinum-resistant ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer: a phase I expansion study
J Clin Oncol 2017; 35:1112-1118.
- 47 Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R. B. & Lin, C. Y.
Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo
Am J Pathol 2001; 158:1301-1311.
- 48 Oberst, M. D., Johnson, M. D., Dickson, R. B., Lin, C. Y., Singh, B., Stewart, M., Williams, A., al-Nafussi, A., Smyth, J. F., Gabra, H. & Sellar, G. C.
Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters
Clin Cancer Res 2002; 8:1101-1107.
- 49 Offner, S., Hofmeister, R., Romaniuk, A., Kufer, P. & Baeuerle, P. A.
Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells
Mol Immunol 2006; 43:763-771.
- 50 Paoluzzi, L., Cacavio, A., Ghesani, M., Karambelkar, A., Rapkiewicz, A., Weber, J. & Rosen, G.
Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas
Clin Sarcoma Res 2016; 6:24.
- 51 Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S. & Leamon, C. P.
Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay
Anal Biochem 2005; 338:284-293.
- 52 Pollard, J. W.
Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis
Nat Rev Cancer 2004; 4:71-78.
- 53 Ponte, J. F., Ab, O., Lanieri, L., Lee, J., Coccia, J., Bartle, L. M., Themeles, M., Zhou, Y., Pinkas, J. & Ruiz-Soto, R.
Mirvetuximab Soravtansine (IMGN853), a Folate Receptor Alpha-targeting antibody-drug conjugate, potentiates the activity of standard of care therapeutics in ovarian cancer models
Neoplasia 2016; 18:775-784.

- 54 Portell, C. A., Wenzell, C. M. & Advani, A. S.
Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia
Clin Pharmacol 2013; 5:5-11.
- 55 Prendergast, G. C. J., Elizabeth M.
Cancer immunotherapy, 456-457 (Elsevier Inc., 2007).
- 56 Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A.
MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors
Nucleic Acids Research 2012; 40:D343-D350.
- 57 Reid, Y., Storts, D., Riss, T. & Minor, L.
in *Assay Guidance Manual*; (eds Sittampalam, G. S. *et al.*) (2004).
- 58 Reiter, Y., Brinkmann, U., Kreitman, R. J., Jung, S. H., Lee, B. & Pastan, I.
Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions
Biochem 1994; 33:5451-5459.
- 59 Reiter, Y., Brinkmann, U., Webber, K. O., Jung, S. H., Lee, B. & Pastan, I.
Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv
Protein Eng 1994; 7:697-704.
- 60 Ribas, A.
Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack
Cancer Discov 2015; 5:915-919.
- 61 Ridgway, J. B. B., Presta, L. G. & Carter, P.
'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization
Protein Eng 1996; vol.9 no.7 pp.617-621.
- 62 Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M. & Niedzwiecki, A.
In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors
Oncol Rep 2010; 23:605-614.
- 63 Roskopf, C. C., Braciak, T. A., Fenn, N. C., Kobold, S., Fey, G. H., Hopfner, K. P. & Oduncu, F. S.
Dual-targeting triplebody 33-3-19 mediates selective lysis of biphenotypic CD19+ CD33+ leukemia cells
Oncotarget 2016; 7:22579-22589.
- 64 Sanford, M.
Blinatumomab: first global approval
Drugs 2015; 75:321-327.

- 65 Santin, A. D., Cane, S., Bellone, S., Bignotti, E., Palmieri, M., De Las Casas, L. E., Anfossi, S., Roman, J. J., O'Brien, T. & Pecorelli, S.
The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-15 (matriptase/MT-SP1) is highly overexpressed in cervical carcinoma
Cancer 2003; 98:1898-1904.
- 66 Schaefer W, R. J., Bähler M, Schanzer J, Croasdale R, Dürr H, Gassner C, Georges G, Kettenberger H, Imhof-Jung S, Schwaiger M, Stubenrauch K, Sustmann C, Thomas M, Scheuer W and Klein C
Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies
PNAS 2011; 108 (27):11187-11192.
- 67 Schlothauer, T., Herter, S., Koller, C. F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P. & Mossner, E.
Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions
Protein Eng Des Sel 2016; 29:457-466.
- 68 Schmalfeldt, B., Prechtel, D., Harting, K., Spathe, K., Rutke, S., Konik, E., Fridman, R., Berger, U., Schmitt, M., Kuhn, W. & Lengyel, E.
Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer
Clin Cancer Res 2001; 7:2396-2404.
- 69 Schreiner, J., Thommen, D. S., Herzig, P., Bacac, M., Klein, C., Roller, A., Belousov, A., Levitsky, V., Savic, S., Moersig, W., Uhlenbrock, F., Heinzelmann-Schwarz, V. A., Umana, P., Pisa, P., von Bergwelt-Baildon, M., Lardinois, D., Muller, P., Karanikas, V. & Zippelius, A.
Expression of inhibitory receptors on intratumoral T cells modulates the activity of a T cell-bispecific antibody targeting folate receptor
Oncimmunology 2016; 5:e1062969.
- 70 Sillanpaa, S., Anttila, M., Voutilainen, K., Ropponen, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Puistola, U., Tammi, R., Tammi, M., Sironen, R., Saarikoski, S. & Kosma, V. M.
Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer
Gynecol Oncol 2007; 104:296-303.
- 71 Simms, P. E. & Ellis, T. M.
Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation
Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3:301-304.
- 72 Smits, N. C. & Sentman, C. L.
Bispecific T-cell engagers (BiTEs) as treatment of B-cell lymphoma
J Clin Oncol 2016; 34:1131-1133.

- 73 Staerz, U. D., Kanagawa, O. & Bevan, M. J.
Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells
Nature 1985; 314:628-631.
- 74 Tanimoto, H., Shigemasa, K., Tian, X., Gu, L., Beard, J. B., Sawasaki, T. & O'Brien, T. J.
Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer
Br J Cancer 2005; 92:278-283.
- 75 Tanimoto, H., Underwood, L. J., Wang, Y., Shigemasa, K., Parmley, T. H. & O'Brien, T. J.
Ovarian tumor cells express a transmembrane serine protease: a potential candidate for early diagnosis and therapeutic intervention
Tumour Biol 2001; 22:104-114.
- 76 Thant, A. A., Nawa, A., Kikkawa, F., Ichigotani, Y., Zhang, Y., Sein, T. T., Amin, A. R. & Hamaguchi, M.
Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells
Clin Exp Metastasis 2000; 18:423-428.
- 77 Uhland, K.
Matriptase and its putative role in cancer
Cell Mol Life Sci 2006; 63:2968-2978.
- 78 van Kempen, L. C., Rhee, J. S., Dehne, K., Lee, J., Edwards, D. R. & Coussens, L. M.
Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment
Differ 2002; 70:610-623.
- 79 Wang, X., Teng, F., Kong, L. & Yu, J.
PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes
Onco Targets Ther 2016; 9:5023-5039.
- 80 Watermann, I., Gerspach, J., Lehne, M., Seufert, J., Schneider, B., Pfizenmaier, K. & Wajant, H.
Activation of CD95L fusion protein prodrugs by tumor-associated proteases
Cell Death Differ 2007; 14:765-774.
- 81 Weidle, U. H. T., Georg, Georges, Guy
Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy
Cancer Genomics Proteomics 11 2014:67-80
- 82 Wuest, T., Gerlach, E., Banerjee, D., Gerspach, J., Moosmayer, D. & Pfizenmaier, K.
TNF-Selectokine: a novel prodrug generated for tumor targeting and site-specific activation of tumor necrosis factor
Oncogene 2002; 21:4257-4265.
- 83 Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y. & Gaboury, L. A.
MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer
BMC Cancer 2014; 14:609.

- 84 Yu, W., Liu, J., Xiong, X., Ai, Y. & Wang, H.
Expression of MMP9 and CD147 in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix
and their implication
Pathol Res Pract 2009; 205:709-715.

10. Danksagung

Besonderen Dank

möchte ich meinen Betreuern Dr. Christian Klein, Dr. Peter Brünker, PD Dr. med. Sebastian Kobold, Pablo Umaña und Prof. Dr. med. Stefan Endres aussprechen. Vielen Dank für eure tolle Unterstützung, den wissenschaftlichen Austausch und das Korrekturlesen meiner Manuskripte.

Vielen Dank,

an Ramona Murr. Du hast mich immer aufgemuntert und motiviert, auch, wenn es dir selbst nicht gut ging. Du hast mich abgelenkt, obwohl du selbst den Kopf voll hattest. Du bist einfach eine tolle Freundin und die beste „PhD-Kollegin“, die man sich wünschen kann. Ich bin sehr froh, dass wir diese Zeit gemeinsam erleben konnten!

Vielen Dank,

an meine Töchter Jana und Line und meinen Mann Christian. Vielen Dank, ihr habt mich immer unterstützt und mir ermöglicht Familie und Doktorarbeit unter einen Hut zu bringen.

Vielen Dank,

an meine Familie. Ihr habt mir mein Studium ermöglicht und damit den Grundstein gelegt, dass ich überhaupt meine Doktorarbeit machen konnte. Ihr habt mich immer unterstützt, egal ob mit seelischem Beistand oder mit Kinderbetreuung.

Vielen Dank,

an Andres Buser. Vielen Dank für die tolle Patent-Zusammenarbeit!

Vielen Dank,

an Kay-Gunnar Stubenrauch, Mirko Ritter und Michael Schräml (Immunisierung), Manuel Späni (RACE PCR), Fabian Birzele (RNA Sequenzierung), David Wittig und Erwin van Puijenbroeck mit Team (Proteinreinigung), Sandra Grau-Richards (Serumstabilität), Anne Freimoser-Grundschober (SPR) für die Unterstützung. Vielen Dank auch an Matthias Lauer, Philippe Ringler und Jörg Benz für die spannenden Bilder (NS-Elektronenmikroskop und AF Mikroskopie).

Vielen Dank,

an mein „Büroteam“ Ylva, Alexandra und Lukas für euer offenes Ohr, wenn z.B. mal wieder Stromausfall im Labor war oder meine Schokoladenvorräte aufgebraucht waren. Vielen Dank an Alexandra für die vielen „PhD-products“, die du bestellt hast.

Vielen Dank,

an meine PhD-Kollegen Steffen Dickopf und Diana Darowski für euer Anfeuern bei Vorträgen vor der Konkurrenz (;-) und den Zusammenhalt!!

11.Roche's Scientific Knowledge Repository

Diese Arbeit wurde im „Roche's Scientific Knowledge Repository“ geprüft und zur Einreichung zugelassen. RDR Report Nr.: 1081177