

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Konditionale Assemblierung zweier Antikörper-Derivate auf  
Tumorzellen zur gerichteten Aktivierung polyklonaler  
T-Lymphozyten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Steffen Dickopf

aus Andernach

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Marion Subklewe

Prof. Dr. Elfriede Nößner

PD Dr. Christian Kellner

Mitbetreuung durch den  
habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2020

**Eidesstattliche Versicherung**

**Dickopf, Steffen**

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

**Konditionale Assemblierung zweier Antikörper-Derivate auf Tumorzellen zur gerichteten Aktivierung polyklonaler T-Lymphozyten**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13. Mai 2020

Steffen Dickopf

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
3.1 Die physiologische Aktivierung monoklonaler T-Zellen.....	3
3.2 Die Aktivierung polyklonaler T-Zellen durch bispezifische Antikörper .....	3
3.3 Klinische Anwendungen der TCB.....	5
3.4 Klassifizierung potentieller Zielantigene einer TCB-Therapie.....	6
3.5 Parameter, die das therapeutische Fenster eines TCB beeinflussen.....	8
3.6 Ansätze zur Selektivitätssteigerung eines TCB .....	11
3.7 Zielsetzung der Arbeit und Projektplan .....	12
<b>4. Methoden</b> .....	<b>13</b>
4.1 Molekularbiologische Methoden .....	13
4.1.1 Design der Expressionsplasmide .....	13
4.1.2 Parentale Antikörpersequenzen .....	13
4.1.3 Generierung der Expressionsplasmide.....	14
4.2 Proteinproduktion und Analytik.....	14
4.2.1 Transiente Expression in HEK-293-Suspensionszellen.....	14
4.2.2 Chromatographische Proteinaufreinigung .....	14
4.2.3 Proteinanalytik.....	15
4.2.4 Differentielle- <i>Scanning</i> -Fluorometrie (DSF).....	15
4.2.5 CD3-Affinitätschromatographie .....	16
4.2.6 FcRn-Affinitätschromatographie .....	16
4.2.7 Messung biomolekularer Interaktionen .....	16
4.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	17
4.3 Zellbiologische Methoden.....	17
4.3.1 Kultivierung der eukaryotischen Zellen .....	17
4.3.2 Durchflusszytometrische Bindestudien .....	18
4.4 Immunologische Assays.....	19
4.4.1 T-Zellaktivierungsassay.....	19
4.4.2 PBMC Co-Kultivierungsassay .....	19
4.4.3 Laktat-Dehydrogenase-Bestimmung .....	20
4.4.4 Quantifizierung der Zytokine im Überstand.....	20
4.5 Auswertungs-, Statistik- und Darstellungssoftware .....	20

<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
5.1 TriFab: Ein neuartiges, trivalentes, IgG-förmiges TCB-Format .....	21
5.1.1 Architektur und Domänenzusammensetzung des TriFab-TCB .....	21
5.1.2 Produktion und Analytik der TriFab-TCB .....	23
5.1.3 Funktionalität der TriFab-TCB hinsichtlich der Antigenbindung .....	24
5.1.4 TriFab-TCB-induzierte Lyse von Tumorzellen durch T-Lymphozyten .....	27
5.1.5 TriFab-TCB-induzierte Zytotoxizität auf Zellen mit physiologischer Antigen-Expression .....	29
5.2 Das Konzept der konditionalen T-Zell-Aktivierung .....	30
5.2.1 Die thermodynamisch getriebene Assemblierung zweier Eduktmoleküle .....	30
5.2.2 Produktion und Analytik der Eduktmoleküle .....	34
5.2.3 Bestimmung der Antigenbindung auf Tumorzelle und T-Lymphozyt .....	36
5.2.4 Konditionale T-Zell-Aktivierung durch Kombination der Eduktmoleküle .....	38
5.2.5 Eliminierung von Tumorzellen in Anwesenheit primärer T-Lymphozyten. ....	39
5.2.6 Abhängigkeit der Austauscheffizienz von der Antigendichte auf Zielzellen .....	41
5.2.7 Erweiterung des Konzepts zur konditionalen Generierung trispezifischer TCB	43
5.2.8 Die unspezifische Assemblierung zweier Eduktmoleküle in Lösung .....	45
5.2.9 Modulierung der Serumhalbwertszeit durch weitere Formatoptimierungen.....	47
5.2.10 Simultane Immun-Checkpoint-Blockade durch eine funktionale <i>Dummy</i> -Kette	50
5.2.11 Alternative Formate zur Retention des <i>Dummy</i> -Produkts auf der Zielzelle. ....	53
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>55</b>
6.1 TriFab: Ein neuartiges TCB-Format mit besonderer Geometrie.....	55
6.1.1 Relevanz eines neuen Formates für immuntherapeutische Ansätze .....	55
6.1.2 Biochemische Eigenschaften des TriFab-TCB .....	55
6.2 Erweiterung des TriFab-Formates zur konditionalen T-Zell-Aktivierung.....	57
6.2.1 Das Einfügen der <i>Dummy</i> -Kette als Schlüsseltechnologie dieses Konzepts ...	57
6.2.2 Die erste Stufe der Selektivitätssteigerung: Die Antigenzahl .....	59
6.2.3 Die zweite Stufe der Selektivitätssteigerung: Co-Expression zweier Antigene.	60
6.2.4 Assemblierung der Edukte in Lösung und pharmakokinetische Eigenschaften	62
6.2.5 Modifikation der Eduktmoleküle zur Inhibition von Immun-Checkpoints.....	63
6.3 Fazit und Ausblick .....	64
<b>7. Literatur</b> .....	<b>65</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>10. Veröffentlichungen</b> .....	<b>II</b>
<b>11. Lebenslauf</b> .....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

## 1. Zusammenfassung

T-Zell-bispezifische Antikörper (TCB) haben in den letzten Jahrzehnten eine zentrale Rolle in der Krebs-Immuntherapie eingenommen. Diese Antikörper-Derivate zielen auf die MHC-unabhängige Aktivierung polyklonaler T-Zellen durch simultane Bindung an Tumorzellen ab.

Im Zuge der Testung mehrerer TCB-Formate wurde deutlich, dass der molekulare Aufbau und die Geometrie des Moleküls signifikanten Einfluss auf dessen Potenz und die Verträglichkeit nach systemischer Applikation haben.

In einem neuartigen TCB-Format „TriFab“ wurde die CD3-bindende Domäne zentral positioniert und liegt nicht wie überwiegend publiziert in N- oder C-terminaler Fusion vor. IgG-förmige TriFab zeigen in immunologischen Assays Eigenschaften eines klassischen TCB und induzieren eine effiziente T-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen.

Das Sicherheitsprofil eines Immuntherapeutikums ist maßgeblich von der gewebespezifischen Expression des Zielantigens abhängig. Experimente mit Folatrezeptor-gerichteten TriFab bestätigten, dass neben entarteten Zellen auch jene mit physiologischer Expression des Antigens durch T-Lymphozyten eliminiert werden.

Um diesem unerwünschten Effekt entgegenzuwirken, wurde das TriFab-Format durch rationales Proteindesign weiterentwickelt. Ziel war es, die T-Zellaktivierung konditional auf Tumorzellen mit aberrierender Antigenexpression zu begrenzen. Die vertikale Spaltung des Moleküls in zwei Teile hat die Separierung der zentral-gelegenen anti-CD3-Domänen zur Folge. Beide Teile können somit nicht an die T-Zelle binden, jedoch ermöglichen die intakten tumorspezifischen Paratope die Anreicherung der Halbantikörper auf der Membran der entarteten Zelle. Bei hoher lokaler Konzentration assemblieren die Reaktionspartner zu einem aktiven TCB. Immunologische Assays belegten, dass die Effizienz der Reaktion von der Antigenendichte abhängt, sodass Zellen mit physiologischer Antigenexpression von einer Eliminierung durch die T-Zelle verschont werden.

Weitere Modifikationen der Moleküle ermöglichten die Modulation der pharmakokinetischen Eigenschaften sowie die Erweiterung des Konzepts auf eine multispezifische Bindung der Zielzellen. Außerdem konnten weitere Formate entwickelt werden, die die Anwendung als Kombinationstherapie zulassen, beispielsweise um der Inhibition der T-Zelle durch Immunausweichmechanismen entgegenzuwirken.

Die vorliegende Arbeit stellt eine *in vitro* Machbarkeitsstudie für eine neuartige Molekülklasse zur konditionalen Immuntherapie dar.

## 2. Abstract

The application of T cell bispecific antibodies (TCB) that facilitate the redirection of polyclonal T cells to malignant cells is an emerging therapeutic strategy in cancer immunotherapy. Many different TCB formats are currently under investigation in clinical trials. It became apparent that the molecular setup and geometry of a TCB have significant impact on its potency and safety.

A novel IgG-shaped TCB format termed TriFab was generated carrying T cell binding domains incorporated within the Fc domain rather than located N- or C-terminally as found in the majority of published antibody derivatives. The molecule was shown to induce dose-dependent tumor cell killing and displays common TCB characteristics despite its unconventional geometry.

A major challenge in immunotherapy is the selection of tumor specific target antigens which is necessary to prevent on-target off-tumor toxicities. Indeed, the TriFab has been shown to induce a weak but significant lysis of cells with folate receptor expression levels comparable to healthy tissue.

Remodeling of the TriFab format enabled a targeting concept that aims to extend the number of safely druggable targets. The molecule was divided into two parts, separating the variable domains of the CD3 binder while retaining one tumor targeting entity per half-antibody. The latter allows the accumulation of the precursor molecules on the membrane of cells with aberrant antigen expression and reconstitution of the active CD3 binder.

The successful production of the precursor molecules required rational antibody engineering and optimization of different parameters including linker length, binder selection and the introduction of mutations that trigger the assembly reaction. Immunological assays showed that the split antibody approach is superior to the maternal TriFab regarding preferential effector activity on cells with aberrant antigen expression compared to normal cells.

Further protein engineering allowed modulation of pharmacokinetic properties, the conversion into multispecific targeting setups and additional molecular formats for a simultaneous blockade of inhibitory immune checkpoints.

The presented work provides *in vitro* proof-of-concept for a novel conditional immunotherapy approach and might expand the space of druggable tumor antigens.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Die physiologische Aktivierung monoklonaler T-Zellen

Unter physiologischen Bedingungen basiert die Aktivierung einer T-Zelle auf der Interaktion mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie beispielsweise dendritischen Zellen, B-Zellen oder Makrophagen. APC nehmen in der Zirkulation Antigene auf, prozessieren sie zu kurzkettigen Peptiden und exponieren sie auf ihrer Oberfläche über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC). Nach Einwanderung der APC in lymphatische Organe kommt es zum Kontakt mit T-Zellen und einhergehender Antigenpräsentation. Monoklonale T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor (TCR) speziell gegen das präsentierte Epitop gerichtet ist, erkennen die MHC-Peptid Struktur, wodurch eine Signaltransduktion im Zellinneren ausgelöst wird (Germain 1994).

Der endogene TCR besteht aus einem Heterodimer von Proteinuntereinheiten (alpha und beta), die der Immunoglobulin-Superfamilie angehören. Die Interaktion mit dem MHC-Peptid-Komplex erfolgt über variable Sequenzbereiche (CDR), die ihre Vielfalt durch den Prozess der V(D)J-Rekombination bei ihrer Reifung im Thymus erlangen. Die Signaltransduktion zur Aktivierung der intrazellulären Kaskaden erfolgt durch vier assoziierte Proteinketten (gamma, delta, epsilon, epsilon), die als *cluster of differentiation 3* (CD3) zusammengefasst werden (Smith-Garvin et al. 2009).

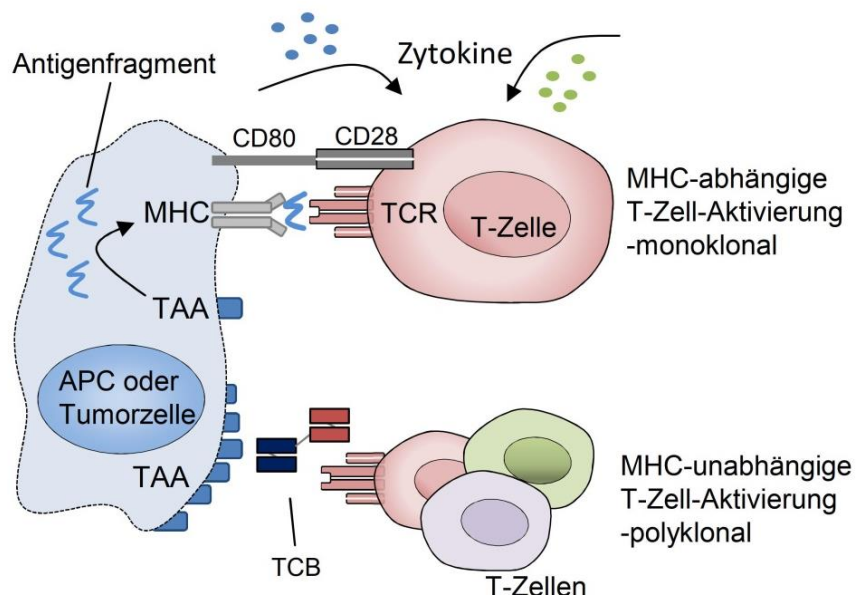
Bei gegebener Erkennung der MHC-Peptid-Struktur bedarf es zudem einer Interaktion zwischen Co-Stimulierungsfaktoren, wie beispielsweise CD28 auf der T-Zelle, mit dessen Liganden CD80 oder CD86 auf APC. Um eine nachhaltige Aktivierung und die Ausprägung der zytolytischen Effektorfunktion der T-Zelle auszulösen, ist zudem der Einfluss aktivierender Zytokine wie Typ-I-Interferone und Interleukin-12 notwendig. Das Zusammenspiel dieser drei Faktoren ist Grundlage der Drei-Signal-Hypothese (Curtsinger und Mescher 2010)(Abbildung 1).

#### 3.2 Die Aktivierung polyklonaler T-Zellen durch bispezifische Antikörper

Ein bispezifischer, T-Zell-rekrutierender Antikörper (TCB) kann den MHC-abhängigen Präsentationsvorgang zwischen T-Zelle und APC zum Zwecke der T-Zell-Aktivierung ersetzen. Die erste Spezifität des Antikörpers erkennt Epitope eines membrangebundenen Tumor-assoziierten Antigens (TAA). Die zweite Spezifität ist gegen die CD3-Untereinheit des T-Zell-Rezeptor-Komplexes gerichtet, der die Signaltransduktion ins Innere der T-Zelle bewerkstelligt. Die T-Zelle wird so direkt mit der Antigen-exprimierenden Zielzelle querverbrückt, aktiviert und induziert deren Eliminierung durch Ausschüttung zytotoxischer



Proteine (Brischwein et al. 2007). Im Gegensatz zum physiologischen Vorgang basiert der Wirkmechanismus des Antikörpers folglich auf der MHC-unabhängigen Aktivierung und Rekrutierung polyklonaler T-Zellen zum gewünschten Zielantigen auf Tumorzellen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Die physiologische, MHC-abhängige und die Antikörper-vermittelte, MHC-unabhängige T-Zell-Aktivierung.** Unter physiologischen Bedingungen (oberer Teil) werden Antigenfragmente über MHC-Komplexe auf antigenpräsentierenden Zellen exponiert. Eine monoklonale T-Zelle mit bindefähigem TCR wird durch Erkennung der MHC-Peptid-Struktur, Ausprägung der Co-Stimulus-Achse (z. B. CD80/CD28) und unter Einfluss von Zytokinen aktiviert. Bei der Antikörper-vermittelten Aktivierung sind weder MHC- noch Co-Stimulus-Komplexe notwendig. Der TCB bindet simultan an das TAA und CD3, was zur Ausprägung der Immunsynapse und zum Auslösen der Effektorfunktion führt. (Eigene Darstellung)

Die zugrundeliegenden molekularen Vorgänge der Antikörper-vermittelten T-Zell-Aktivierung sind bis heute nicht vollends entschlüsselt (Ellerman 2019). Verschiedene Studien konnten jedoch Teilaspekte aufklären.

Toritsu-Itakura *et al.* konnten zeigen, dass die Antikörper-vermittelte Aktivierung nicht der Drei-Signal-Hypothese unterliegt, da eine Co-Stimulation über die CD28-CD80-Achse für die Aktivierung nicht zwingend notwendig ist (Dreier et al. 2002, Toritsu-Itakura et al. 2011). Eine Erklärung könnte die effizientere Formierung der Immunsynapse sein. Während die physiologische Interaktion zwischen TCR und MHC einer Affinität im mittleren mikromolaren Bereich unterliegt, ist die Mehrzahl der TCB so entwickelt, dass sie mit nanomolar Affinität an das Tumorantigen binden. Zudem ist die Anzahl der gewählten Tumorantigene wesentlich höher als die Zahl der MHC-Peptid-Komplexe auf APC, die im dreistelligen Bereich liegt (Harding und Unanue 1990, Purbhoo et al. 2006). Die dadurch zusätzlich wirkenden

interzellulären Aviditätseffekte lassen die Vermutung zu, dass der Kontaktbereich zwischen T- und Tumorzelle verstärkt wird (Offner et al. 2006).

Dazu passt auch die Beobachtung, dass die Gruppierung mehrerer TCR auf geringer Fläche die intrazelluläre Signalkaskade induziert. Durch die Mehrzahl an TAA gegenüber MHC-Komplexen auf APC wird ein *TCR-clustering* stärker forciert, da zur Ausprägung der Immunsynapse mehr Interaktionspartner auf der Zielzelle zur Verfügung stehen. Das *Permissive-Geometry*-Modell bekräftigt diese Hypothese und sieht als molekulare Grundlage die strukturelle Änderung der zytoplasmatischen CD3-Domänen bei Zusammenkunft der TCR (Huehls et al. 2015, Minguet et al. 2007).

Weitere Studien zeigten Anforderungen an das Antikörpermolekül auf, die essentiell für die Transduktion eines aktivierenden Signals in T-Zellen sind. Ein Vergleich bispezifischer Antikörper, die gegen verschiedene Epitope der CD3-Untereinheiten gerichtet sind, zeigte, dass die simultane Bindung an Tumorzelle und CD3 nicht grundsätzlich in einer Aktivierung mündet. Lediglich die Bindung bestimmter Epitope löste die intrazelluläre Signalkaskade aus (Rojo und Janeway 1988). Die Erkenntnisse von Minguet *et al.* zeigen, dass strukturelle Änderungen der Konformation bestimmter Motive im CD3-Protein notwendig sind, die nur durch bestimmte CD3-Binder ausgelöst werden (Minguet et al. 2007).

Hinsichtlich der Effektorfunktion wurde festgestellt, dass sich der Antikörper-induzierte Vorgang kaum von dem einer zytotoxischen T-Zelle unter physiologischen Bedingungen unterscheidet. In beiden Fällen werden Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2 oder TNF- $\alpha$  ausgeschüttet, die die Potenzierung der Immunantwort zur Folge haben. Die vesikuläre Sekretion von Perforin und Granzym in die Immunsynapse bewirkt die Lyse der Zielzelle (Gruen et al. 2004).

### **3.3 Klinische Anwendungen der TCB**

Im Jahr 1985 konnten Forscher um Uwe Staerz erstmals die T-Zell-vermittelte Eliminierung von Tumorzellen infolge des Einsatzes bispezifischer Hybridantikörper beobachten (Staerz et al. 1985). Seither bilden rekombinante Antikörper eine zentrale Säule in der immuntherapeutischen Forschung. Technische Hürden bei der Herstellung bispezifischer Antikörper wurden im Laufe der Zeit durch Protein-*Engineering* und Etablierung rekombinanter Produktionsverfahren gelöst (Brinkmann und Kontermann 2017, Lindhofer et al. 1995).

Als erster CD3-bispezifischer Antikörper wurde Catumaxomab im Jahr 2009 zur lokalen Behandlung von Aszites, einem Krankheitsbild das in Folge ovarialer Karzinome auftritt,

zugelassen. Catumaxomab ist ein trifunktionaler Hybridantikörper der nach Immunisierung von Maus und Ratte durch die Quadroma-Technologie hergestellt wurde (Linke et al. 2010). Neben der Bindung an das Epitheliale-Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) auf der Tumorzelle und CD3, interagiert der Fc-Teil mit Fc-Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Dies löst antikörperabhängige-zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), Komplementaktivierung (CDC) und Phagozytose aus. Catumaxomab zielt darauf ab, die EpCAM-exprimierenden Tumorzellen in der Bauchhöhle abzutöten, die Tumorlast zu verringern und so das Auftreten des Aszites zu minimieren (Seimetz 2011). Die systemische Applikation des Präparats hatte auch ohne Kontakt zum spezifischen Tumorantigen massive Zytokinausschüttung zur Folge (Mau-Sorensen et al. 2015). Aus diesem Grund wurde das Präparat ausschließlich zur intraperitonealen Applikation zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass so weniger als 1 % der Moleküle in die Zirkulation gelangen, wodurch das Sicherheitsprofil des Antikörpers akzeptabel ist (Ruf et al. 2010). Die Vermarktung des Präparats in Europa wurde 2017 aus kommerziellen Gründen seitens des Herstellers eingestellt (Duell et al. 2019).

Als *First-in-Class*-TCB zur systemischen Applikation wurde Blinatumomab im Jahr 2014 zur Behandlung der rezidierten oder refraktären akuten lymphatischen Leukämie zugelassen. Das Molekül bindet simultan CD19 auf B-Zellen und CD3, was die Depletion der B-Zellen zur Folge hat. Das Antikörperformat zeichnet sich durch eine einzelkettige Verknüpfung (*single chain*) der variablen Domänen zweier Binder aus (*tandem scFv*) (Abbildung 1, unten). Durch den fehlenden Fc-Teil interagiert diese Molekülklasse nicht direkt mit akzessorischen Zellen. Infolgedessen ist Blinatumomab gegenüber Catumaxomab deutlich besser verträglich (Bargou et al. 2008). Die Anwendung von Blinatumomab in einer klinischen Phase-II Studie führte in 69% der Patienten zu einer vollständigen Tumorremission (Topp et al. 2014).

Die Mehrzahl der TCB in klinischer Entwicklung zielt auf TAA ab, die bereits Angriffspunkt zugelassener Antikörper sind, beispielsweise HER2 (Trastuzumab), EpCAM (Catumaxomab) oder der Epidermale-Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, Cetuximab) (Wu und Cheung 2018).

### **3.4 Klassifizierung potentieller Zielantigene einer TCB-Therapie**

Im Zuge der (prä-) klinischen Testung diverser TCB-Formate gegen verschiedene Zielantigene wurden trotz des wissenschaftlichen Fortschritts häufig schwerwiegende Nebenwirkungen beobachtet. Die Wahl eines für das Tumorgewebe spezifischen Antigens stellt eine große Herausforderung bei Immuntherapien dar. Selbst Epitope, die nur in geringem Maße in normalem Gewebe vorliegen, können Auslöser einer *On-target-off-tumor*-Toxizität sein. Es handelt sich dabei um die spezifische Bindung des

Antikörpers an das Zielantigen (*on-target*), jedoch nicht ausschließlich im Tumor, sondern auch in gesundem Gewebe (*off-tumor*). Auch wenn ein Antigen im Tumorgewebe überexprimiert ist, kann es bei geringer Expression in essentiellen Gewebe zu ungewollter Aktivierung der T-Zellen kommen.

Potentielle Zielantigene können in drei Klassen unterteilt werden: (I) Antigene, die ausschließlich im Tumorgewebe exprimiert werden. (II) Antigene die sowohl im Tumorgewebe als auch in nicht-essentiellen, gesundem Gewebe exprimiert werden. (III) Antigene, die in Tumor- und essentiellen Gewebe vorliegen.

Neoantigene, wie zum Beispiel eine gekürzte Variante des EGFR (EGFRvIII) in Glioblastom, sind aufgrund ihrer auf den Tumor begrenzten Expression häufig bevorzugte Zielantigene (An et al. 2018). Spezifische Antikörper gegen diese Isoform schließen eine *on-target off-tumor* Reaktion aus. *In vivo* Studien konnten belegen, dass spezifische EGFRvIII-Binder keinerlei Interaktion mit der Wildtyp-Variante in gesundem Gewebe zeigen und eine auf den Tumor begrenzte Immunantwort auslösen (Ellwanger et al. 2017).

Die zweite Klasse wird durch Antigene wie beispielsweise CD19 gebildet. Dieses Membranprotein ist sowohl auf malignen, als auch gesunden B-Zellen exprimiert. Blinatumomab induziert die T-Zell-vermittelte Eliminierung von Neoplasien, aber auch gesunder B-Zellen. Dieser Nebeneffekt hat zunächst jedoch keine schwerwiegenden Folgen und kann toleriert werden. Die Rekonstitution des B-Zell-Kompartiments erfolgt durch Differenzierung CD19-negativer, pluripotenter Stammzellen aus dem Knochenmark (Nagorsen et al. 2012). Allerdings wurde, trotz der exklusiven Expression von CD19 auf B-Zellen, bei der Anwendung von Blinatumomab das *Cytokine-release-Syndrom* häufig als Dosis-limitierender Faktor identifiziert (Topp et al. 2014).

Die dritte Klasse umfasst Antigene, die zwar häufig in Tumorgewebe überexprimiert werden, denen allerdings auch in nicht-malignem Gewebe essentielle Rollen zukommen. Lutterbuese und Kollegen konnten nach Applikation EGFR-gerichteter *tandem scFv* in nichthumane Primaten erhebliche Toxizität in EGFR-positivem Gewebe (Leber, Niere) feststellen. Das aus dieser Studie ermittelte therapeutische Fenster des eingesetzten Moleküls wurde durch die Dosis-limitierenden Nebenwirkungen als sehr eng definiert (Lutterbuese et al. 2010).

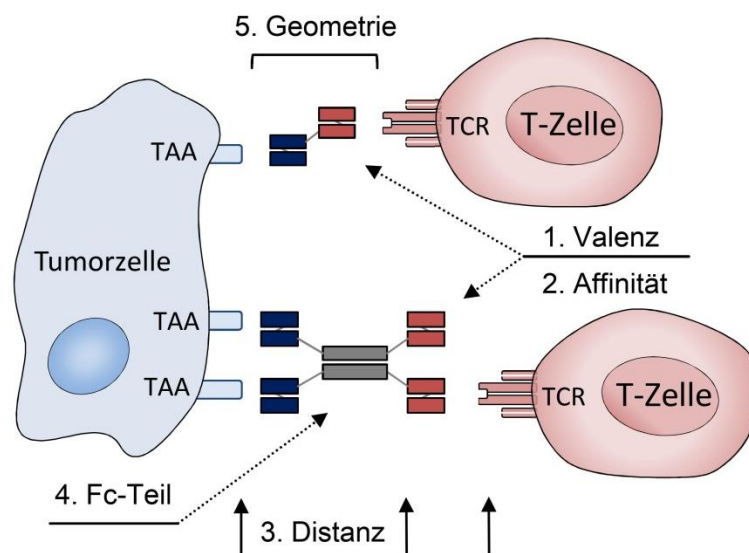
Trotz der Identifikation mehrerer Neoantigene, zeichnet sich nicht jede solide Tumordindikation durch das Vorkommen eines solchen Alleinstellungsmerkmals aus. Zudem zeigt das Beispiel Blinatumomabs, dass selbst eine auf B-Zellen limitierte Expression des TAA zu massiver Zytokinausschüttung führen kann. Um diese klinisch relevanten Antigene dennoch als Ziel nutzen zu können, wurden in den letzten Jahren vermehrt

Antikörper-Engineering Ansätze publik, die das Sicherheitsrisiko der TCB entschärften und damit zusammenhängende Parameter aufzeigten.

### 3.5 Parameter, die das therapeutische Fenster eines TCB beeinflussen

Als erstes Molekül seiner Klasse in klinischer Anwendung wurde Blinatumomab in einer Vielzahl von Studien untersucht und ist daher am besten charakterisiert. Im Zuge der Entwicklung weiterer Formate, die meist mit dem Aufbau Blinatumomabs verglichen wurden, wurden mehrere Parameter bekannt, die die Effizienz eines TCB beeinflussen. Hemmer *et al.* konnten zeigen, dass je nach Stärke der T-Zellaktivierung verschiedene Stufen der Effektorfunktion ausgelöst werden. Für die Ausschüttung des Zytokins IL-2 ist beispielsweise ein stärkerer Stimulus notwendig als für die Sekretion zytotoxischer Moleküle (Hemmer *et al.* 1998). Um eine gute Balance zwischen Effizienz und Sicherheit zu erreichen, muss die Stärke der Antikörper-induzierten T-Zellaktivierung daher möglichst genau austariert werden (Mandikian *et al.* 2018).

In Abbildung 2 sind zwei Formate dargestellt, anhand derer verschiedene Variablen zur Modulation der Aktivierungsstärke aufgezeigt werden.



**Abbildung 2: Parameter, die das therapeutische Fenster eines TCB bei systemischer Applikation beeinflussen.** Gezeigt sind zwei Formate. Ein *tandem scFv* (wie Blinatumomab) und ein 2+2 Antikörper mit funktionalem Fc-Teil. Parameter sind (1) die Valenz des CD3 und TAA-Binders, (2) die Affinität der Binder, (3) die interzelluläre Distanz, (4) das Vorhandensein eines Fc-Teils und die (5) Geometrie des Antikörpers. (Eigene Darstellung)

(1) Die Mehrzahl der TCB in klinischer Testung trägt CD3-Binder in **monovalenter** Weise. Einige Publikationen stellen die These auf, dass ein Molekül mit zwei CD3-Bindern ein Kreuzvernetzen peripherer T-Zellen und somit deren Aktivierung auslösen kann (Sathish et al. 2013). Weiterhin wurde für einige bivalente Moleküle gezeigt, dass eine Antigen-unspezifische Aktivierung der T-Zellen zu einer übermäßigen Zytokinausschüttung (*Cytokine-release-Syndrom*) führen kann (Moore et al. 2011).

(2) Neben der Valenz spielt auch die **Affinität** der CD3-Binder eine entscheidende Rolle. Beispielsweise führt eine Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich zu einem verstärkten Einwandern des Antikörpers in sekundäres lymphatisches Gewebe und könnte mit dort induzierter Toxizität assoziiert sein. Damit zusammenhängend nimmt die Aufnahme des Antikörpers im Tumorgewebe mit hochaffinen CD3-Bindern stark ab (Mandikian et al. 2018). Eine Studie mit CD3-Bindern ähnlich hoher Affinität musste verfrüht abgebrochen werden, weil nach Injektion Folatrezeptor-gerichteter TCB in Patienten mit Ovarialkrebs eine rasche Bindung der Antikörper an periphere T-Zellen beobachtet werden konnte, was mit einer starken Zytokin-Ausschüttung einherging (Tibben et al. 1996). Durch Minderung der Affinität des CD3-Binders konnte das therapeutische Fenster eines gegen CD38 gerichteten TCB nach anfänglicher Toxizität in nichthumanen Primaten deutlich vergrößert werden. Die dadurch ermöglichte Erhöhung der Dosis führte zu einem besseren therapeutischen Effekt bei niedrigeren Zytokin-bedingten Nebenwirkungen (Moore et al. 2015).

Hinsichtlich der Affinität des TAA-Binders haben Studien gezeigt, dass die Erhöhung der Bindungsstärke um das 187-fache zu einer 410-fach verstärkten Potenz des Antikörpers führt (Root et al. 2016). Jedoch ist eine zu hohe Affinität je nach Tumorantigen häufig mit schnellerer Internalisierung und Degradierung des Antikörpers assoziiert. In HER2-Modellen war die Antikörperaufnahme im Tumor bei einer Affinität von 23 nM deutlich besser als bei jenen Bindern mit 40-fach höherer Affinität (Rudnick et al. 2011).

(3) Die **Distanz** zwischen den beiden Membranen bei der TCR-MHC-vermittelten, physiologischen Ausprägung einer Immunsynapse beträgt circa 14 Nanometer (Garboczi et al. 1996). Bluemel *et al.* konnten unter Verwendung des Diabody-Formats zeigen, dass bei der simultanen Bindung der Membran-proximalen Epitope von EpCAM und des CD3-Rezeptors eine Immunsynapse von 12-15 Nanometer entsteht. Dies entspricht der physiologischen Ausdehnung und hat eine effiziente Eliminierung der Zielzelle zur Folge. Bei Bindung an distale Epitope, die eine größere interzelluläre Entfernung der Membranen zur Folge hat, nimmt die Effizienz signifikant ab (Bluemel et al. 2010). Diese Erkenntnisse konnten für bispezifische Antikörper im IgG-Format und weitere Zielantigene bestätigt werden (Li et al. 2017).

Die Distanz zwischen Tumor- und T- Zellmembranen kann auch durch die Länge des verwendeten Antikörpers beeinflusst werden. Wuellner *et al.* verglichen zwei Formate, in denen die Distanz zwischen Tumorbinder und CD3-Binder um 15 Nanometer abweicht. Das Molekül mit unmittelbarer Nähe der beiden Binder zeigte eine deutlich höhere Potenz als sein Pendant mit weitem Abstand der Bindedomänen (Wuellner et al. 2015).

(4) Da das zugelassene Blinatumomab Molekül keinen **Fc-Teil** trägt und mit einer Größe von 55 kDa unter dem renalen Ausschlussgrenzwert (69 kDa) liegt, sind die Moleküle durch eine sehr kurze Serumhalbwertszeit von circa vier Stunden charakterisiert (Yuraszeck et al. 2017). Es bedarf einer permanenten Infusion der Antikörperlösung, um eine ausreichende Exposition des Tumors zu gewährleisten. Viele Studien streben daher Moleküle mit Fc-Fusionen und somit verlängerter Halbwertszeit an. Beispielsweise konnte die Serumhalbwertszeit eines CD19-BiTE in nichthumanen Primaten auf 210 Stunden erhöht werden, sodass eine wöchentliche Injektion die therapeutische Serumkonzentration des Moleküls aufrechterhalten konnte (Lorenczewski et al. 2017).

Das beschriebene Beispiel Catumaxomab macht deutlich, dass das Vorhandensein eines Fc-Teils pharmakokinetische Vorteile bringt, jedoch auch massive Sicherheitsrisiken bei systemischer Applikation birgt. Das Einfügen der „P329G LALA“-Mutationen in den Fc-Teil, welche ADCC und CDC verhindern, reduzieren den Wirkmechanismus ausschließlich auf die Aktivierung der T-Zelle und bewirken ein deutlich verbessertes Sicherheitsprofil bei verlängerter Serumhalbwertszeit (Bacac et al. 2016).

(5) Ein weiterer Faktor ist die **Geometrie** des Antikörpers. Die Größe von DART (*dual-affinity re-targeting antibody*) Antikörpern entspricht exakt der Größe eines *tandem scFv*. Das DART-Molekül besteht jedoch aus zwei Ketten, in denen die variablen Domänen der beiden Spezifitäten (A und B) alternierend angeordnet sind (VLA-VHB, VLB-VHA). Die Ketten sind zudem durch eine Disulfidverbrückung kovalent miteinander verknüpft. In einer Studie mit Bindern desselben klonalen Ursprungs, aber unterschiedlicher Domänenfusion, wurde gezeigt, dass ein CD19-gerichtetes DART-Format eine 60-fach höhere Potenz als Blinatumomab zeigt. Diese signifikante Effizienzsteigerung wird durch die stabilere und unflexiblere Architektur des Moleküls erklärt (Moore et al. 2011).

Zusammengefasst werden vermehrt Moleküle getestet, die eine moderate (monovalente) Affinität zu CD3 und eine hohe (polyvalente) Affinität zum Tumorantigen besitzen. Weiterhin wird eine geringe Distanz zwischen TAA-Binder und CD3-Binder bevorzugt und es werden vermehrt membranproximale Epitope gewählt (Ellerman 2019).

Unter Einbeziehen der gezeigten wissenschaftlichen Erkenntnisse beim Design eines TCB kann das Sicherheitsprofil des Antikörpers verbessert und die tolerierbare Dosis im Patienten

erhöht werden. Aufgrund des Mangels tumorspezifischer Antigene ist eine ausschließlich auf das Tumorgewebe beschränkte Immunreaktion jedoch nicht vollends sichergestellt, was das Restrisiko ungewollter Nebeneffekte nach sich zieht.

### 3.6 Ansätze zur Selektivitätssteigerung eines TCB

Eine neuere Strategie, die auf die Steigerung der Selektivität des TCB abzielt, ist die konditionale Immuntherapie. Darunter versteht man ein inertes Verhalten der Antikörper im gesunden Gewebe (und in der Zirkulation) und die bedingte Ausprägung der Funktionalität im Tumorgewebe.

Durch rationales Design gelang es Bacac *et al.* einen trivalenten, bispezifischen Antikörper im 2+1 Format zu entwickeln, der dem Konzept der Aviditäts-vermittelten Selektivitätssteigerung (AMSG) unterliegt. Zwei Antigenbindestellen sind dabei gegen das Tumorantigen gerichtet, während die Dritte an CD3 bindet. Dabei wurden die Affinitäten der einzelnen TAA-Binder bewusst niedrig gewählt (~180 nM). Biacore Messungen bestätigten, dass die Affinität des gesamten Moleküls aufgrund des Aviditätseffekts 60-fach stärker ist. Konzeptionell ist es wahrscheinlicher, dass Zielzellen mit hoher Antigendichte (mehr als 10.000 Moleküle pro Zelle) bivalent und Aviditäts-verstärkt gebunden werden. Auf Zellen mit niedriger Antigenzahl tritt vermehrt eine schwach affine, monovalente Bindung und somit rasche Dissoziation des Moleküls ein. Die Wirkung des TCB soll so auf Zellen mit erhöhter Antigenexpression beschränkt werden (Bacac et al. 2016).

Ein zweiter Ansatz strebt die spezifische Aktivierung der CD3 Bindestelle im Tumorgewebe an. In dieser Molekülklasse sind jene Bereiche, die die Bindung an das Antigen bewerkstelligen, auch *complementarity-determining regions* (CDR) genannt, durch Peptide, Domänen oder Polymere sterisch abgeschirmt. Das Molekül kann in der Zirkulation in dieser inaktivierten Form nicht mit der T-Zelle interagieren. Bindet der Antikörper über die ungeschützten, gut zugänglichen TAA-Binder auf der Zielzelle, bewirkt das dort herrschende Tumormilieu die Aufhebung der Blockade des CD3-spezifischen Paratops. Die Aktivierung der T-Zelle erfolgt ausschließlich im Tumorgewebe (Ellerman 2019).

In einem von Boustany *et al.* publizierten Ansatz wurden Peptide, welche schwach an die CD3-spezifischen CDR assoziieren, N-terminal an die Bindedomäne fusioniert. Die Linkerregion zwischen Peptid und Domäne wurde durch eine Protease-Schnittstelle ergänzt. Da einige Proteasen vorwiegend auf Tumorzellen exprimiert werden, geschieht die Spaltung des Linkers präferentiell am Tumor. Der Einsatz EGFR-gerichteter TCB (Probodyes®) in nichthumanen Primaten hat gezeigt, dass die tolerierbare Dosis 60-fach höher als bei der frei



zugänglichen CD3 Variante ist. Zusätzlich konnte in Mausstudien unter Einsatz derselben Moleküle eine vergleichbare Regression des Tumorzellvolumens bestätigt werden (Boustany et al. 2018).

Ähnliche Konzepte verfolgt auch Amunix. In ihrem Molekül wurde ein langkettiges Polymer (XTEN®) an die CD3-Bindestelle assoziiert, welches die Binderegion unspezifisch abschirmt. Das nicht-immunogene Polymer enthält ebenfalls Protease-Schnittstellen, die in der Tumormikroumgebung gespalten werden können. Ein weiterer Nutzen des Polymers ist zudem die Erhöhung der Serumhalbwertszeit des fusionierten TCB (Sim 2017).

Ein Ansatz auf exploratorischer Ebene wurde in der Dissertation von Banaszek vorgestellt. Eine Kombination aus zwei Antikörpern trägt je eine Hälfte der variablen Regionen eines CD3-Binders, welcher dadurch inaktiviert wurde. Kommen beide Moleküle durch ihre intakten TAA-Binder auf der Zielzelle zusammen, assemblieren die anti-CD3-Domänen und aktivieren die T-Zelle (Banaszek 2014).

### 3.7 Zielsetzung der Arbeit und Projektplan

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zunächst die Generierung eines neuartigen TCB-Formats, welches in Aufbau und Geometrie von den publizierten Ansätzen abweicht. Das Molekül soll die Formatlandschaft T-Zell-bispezifischer Antikörper erweitern. Außerdem soll das Format durch rationales Antikörper-*Engineering* so modifiziert werden, dass es eine konditionale T-Zell-Aktivierung induziert. Dadurch soll eine Technologie entwickelt werden, die die Zahl potentieller Zielantigene für den sicheren Einsatz einer systemischen TCB-Therapie erweitert.

Das Projekt wurde in aufeinander aufbauende Blöcke unterteilt. Zunächst erfolgt das Design des neuartigen TCB *in silico*. Mithilfe molekularbiologischer, zellbiologischer und biochemischer Methoden ist die Produktion und Bioanalytik der Proteine geplant. Optimierungen in Methodik und Design werden erwartet. Als erstes Projektziel ist die Eignung des Moleküls zur spezifischen Aktivierung von T-Zelle in immunologischen Assays definiert.

Im zweiten Teil ist der Umbau des Moleküls mit einhergehender Optimierung des Formates und Herstellung der neuartigen Molekülklasse vorgesehen. Den zweiten Projektmeilenstein stellt die erfolgreiche Aktivierung der T-Zelle durch konditionale Assemblierung des Moleküls auf der Tumorzelle dar. Immunologische Assays und gezielte Kontrollversuche sollen die Vorteile des entwickelten Formates gegenüber dem Eingangsmolekül bestätigen und die Finalisierung des Projekts bedeuten.

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Design der Expressionsplasmide

Auf das *Early-enhancer*-Element des humanen Cytomegalievirus (HCMV) und dessen Promotor folgt die codonoptimierte Transkriptionseinheit des Antikörpers. Am N-Terminus wurde das Signal zur Sekretion des Proteins in den extrazellulären Bereich angefügt. Dabei handelt es sich um das Signalpeptid der schweren Kette V Region des murinen Ig (Zuo et al. 2000). Weitere Elemente auf dem Plasmid sind das  $\beta$ -Lactamase Gen zur Selektion in *E. coli* (Ampicillinresistenz) und der Replikationsursprung zur Amplifikation in *E. coli*. Das *in silico* Design der Konstrukte wurde mit dem Programm *Vector NTI* (Thermo Fisher) durchgeführt.

#### 4.1.2 Parentale Antikörpersequenzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörpersequenzen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Alle Sequenzen sind bereits publiziert und mit entsprechender Referenz versehen. Die Basisequenzen der nichtvariablen Domänen (CH1, CH2, CH3, C-kappa, C-lambda) sind vollständig aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörperklone, Referenzen und Sequenzen der konstanten Regionen**

Antigen	Parentalklon - Handelsname	Quelle
LeY	mAb B3	(Brinkmann et al. 1991)
FoIR1	16D5	(Bacac et al. 2016)
EGFR	C225 - Erbitux	(Huang et al. 1999)
PSMA	J591	(Liu et al. 1997)
CD3	40G5	(Chen et al. 2015)
Nada	Nadaceptin ( <i>in silico</i> )	(Brinkmann et al. 2019)
PD-L1	Avelumab	(Nastri et al. 2017)
Domäne	Sequenz	
CH1-wt	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
CH2-wt	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK	
CH3-wt	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG	
C-kappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTK SFNRGEC	
C-lambda	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWVSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	

### 4.1.3 Generierung der Expressionsplasmide

Die Expressionskonstrukte wurden durch modulare Klonierung von codonoptimierten Gensynthese-Fragmenten (Fa. Geneart, Regensburg) in das entsprechende Plasmid mittels Restriktion und Ligation erstellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Die DNA wurde mittels Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, 28704) extrahiert. Die Ligation erfolgte mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche, 11635379001), die Transformation und Kultivierung der Bakterien XL10-Gold (Agilent, 200314) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte durch Anwendung des Plasmid-Maxi-Kits (Qiagen, 12163). Der Austausch einzelner Genfragmente für die Herstellung verschiedener Antikörperformate wurde durch das Prinzip der Gibson-Klonierung (NEB, E5510) bewerkstelligt. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung (Fa. Sequiserve, Vaterstetten) auf deren Richtigkeit überprüft.

## 4.2 Proteinproduktion und Analytik

### 4.2.1 Transiente Expression in HEK-293-Suspensionszellen

Alle Konstrukte wurden nach transienter Transfektion in *FreeStyle™ 293-F* Suspensionszellen (Thermo Fisher, R79007) exprimiert. Die Plasmidkombinationen wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C, 8 % CO<sub>2</sub> und 80 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Transfektion erfolgte bei einer Dichte von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml unter Einhaltung der Herstellerangaben mittels PEIPro® (Polyplus, 115-010). Zellüberstände wurden nach sieben Tagen durch Zentrifugation (3500 g, 45 Minuten) und Sterilfiltration (0,22 µm Porengröße, Merck, S2GPU05RE) geerntet.

### 4.2.2 Chromatographische Proteinaufreinigung

Die Gewinnung des reinen Antikörpers aus dem Zellüberstand erfolgte durch eine Zwei-Schritt Chromatographie-Methode. Zunächst wurden Antikörper durch Bindung der leichten Ketten (kappa oder lambda) an die Säulenmatrix mithilfe der Affinitätschromatographie (GE, HiTrap™Kappa, HiTrap™Lambda Select, 17-5458-12) angereichert. Die Elution erfolgte mit 50 mM Natriumcitrat-Puffer (kappa) oder 100 mM Natriumacetat-Puffer (lambda) bei pH 2,7. Die unmittelbare Neutralisation des Eluats erfolgte mit 1 M TRIS-Lösung (pH 9). Das Eluat wurde nachfolgend filtriert (0,22 µm, Merck, SLGP033RS) und mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) weiter aufgereinigt. Dazu wurde eine HiLoad® 26/600 Superdex 200pg (GE) Säule verwendet. Als Laufpuffer und späterer Probenpuffer wurde eine 140 mM NaCl, 20 mM Histidin-Lösung bei pH 6,0

eingesetzt. Die Chromatogramme der präparativen SEC Läufe wurden mit der Software UNICORN™ (GE) analysiert.

#### 4.2.3 Proteinanalytik

Zunächst wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (NuPAGE System, Invitrogen) analysiert. Dafür wurden 1,8 µg Protein oder 5 µl des Größenstandards (BioRad, 1610374) pro Tasche auf ein 4 bis 12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen, NP0321PK2) geladen und für 30 bis 45 Minuten bei 180 Volt der Größe nach aufgetrennt. Gele wurden anschließend mit 10 ml Coomassie-Lösung (Expediton, ISB1L) eingefärbt und abfotografiert. Die Reinheit des Proteins wurde anhand einer analytischen SEC (HPLC Dionex UltiMate 3000; Superdex™ 200 Increase 10/300 GL, GE) bestimmt (Laufzeit 15 Minuten; 20 µg Protein; Flussrate 0,5 ml/Minute). Bei einem Unreinheiten-Anteil (Aggregate, Einzelketten) von mehr als 5 % wurden die Proteine erneut mittels präparativer SEC nachgereinigt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch in Triplikaten (NanoDrop™ 8000, Thermo Fisher). Alle in immunologischen Assays eingesetzten Antikörperlösungen wurden auf Endotoxingehalt überprüft (nexgen-mcs, Charles River). Bei Werten größer 2 EU/mg Protein wurde das *Endotoxin Removal Kit* (Thermo Fisher, 88274) angewendet und der Wert erneut bestimmt.

#### 4.2.4 Differentielle-Scanning-Fluorometrie (DSF)

Die DSF-Messung wurde in Triplikaten im 384-Well-Format im *LightCycler* (Roche, 05015243001) durchgeführt. Syproorange (Sigma, S5692) liegt als 5000x Lösung in DMSO vor und wurde zunächst 100-fach in bidestilliertem Wasser verdünnt (50x). Je nach Assaypuffer (PBS- oder His-NaCl-Lösung) wurde der Farbstoff erneut 1:10 verdünnt (5x). Der zu untersuchende Antikörper wurde dann auf 1 µM in dem gewünschten Assaypuffer eingestellt. 1 µl 5-fach Syproorange-Lösung wurde mit 4 µl der Antikörperlösung (1 µM) in einer 384-Well-Platte (Roche, 04729749001) kombiniert. Die Platte wurden mit Folie (Roche, 04729757001) versiegelt, im Gerät platziert und die Fluoreszenz (465 nM - 580 nM) bei steigender Temperatur (Gradient 0,06 °C/s von 20 auf 95 °C) gemessen. Die Bestimmung des Schmelzpunktes ( $T_M$ ) erfolgte über das Minimum der ersten Ableitung  $-d((RFU)/dT)$  (entspricht der Temperatur bei halbmaximaler hydrophober Exposition) mit Hilfe der *LightCycler* Software (Roche).

#### 4.2.5 CD3-Affinitätschromatographie

Die Fähigkeit der Moleküle an CD3 zu binden wurde mithilfe einer Affinitätschromatographiesäule (GE, Tricorn 5/50, 28406409) bestimmt. Als Packmaterial wurde ein Streptavidin *Sepharose High Performance Resin* (GE, 17511301) eingesetzt, welcher zur Kopplung des rekombinanten, biotinylierten CD3 diente (Antigendichte: 250 µg/ml). 25 µg des Antikörpers wurden injiziert und mit einer Flussrate von 300 µl/Minute und mit einem pH-Gradienten (Start pH 7,4 → pH 2,0) eluiert. Das Chromatogramm wurde mithilfe der Software Chromeleon™ 7 (Thermo Fisher) ausgewertet.

#### 4.2.6 FcRn-Affinitätschromatographie

Die Bindung des Antikörpers an den neonatalen Fc Rezeptor (FcRn) wurde bei Raumtemperatur auf Basis der Methode von Schlothauer *et al.* durchgeführt (Schlothauer et al. 2013): 35 µg Antikörper wurden zunächst mit 20 mM His/HCl-Puffer (pH 5,5) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl eingestellt und deren Laufverhalten mittels HPLC (*High-performance-liquid-chromatography*) Dionex UltiMate 3000 Anlage (Thermo Fisher) auf einer 1 ml FcRn Säule (XK,GE, 28-9920-23 AF) analysiert. Der leicht saure pH-Wert entspricht den Bedingungen im Endosom nach Internalisierung des Antikörpers und ermöglicht damit die Bindung an den FcRn. Nach Waschen mit einer 20 mM MES, 140 mM NaCl-Lösung (pH 5,5; 5 Säulenvolumina) werden gebundene Antikörper mit einem steigenden pH-Gradienten (20 mM Tris-HCl; 140 mM NaCl pH 8,8; 35 Säulenvolumen) eluiert. Die pH-abhängige Bindung an den FcRn löst sich bei physiologischen, extrazellulären Bedingungen bei pH 7,4. Die Bestimmung der Retentionszeit eines Moleküls erfolgte durch Auftragen der Absorption (mAU) gegen die Zeit (min) nach Injektion unter Verwendung der Chromeleon™ 7 Software. Die Berechnung der relativen Retentionszeit basiert auf Normalisierung mit einem internen Standard, um Schwankungen zwischen verschiedenen Messungen auszugleichen.

#### 4.2.7 Messung biomolekularer Interaktionen

Zur Charakterisierung der Antikörperbindung an das entsprechende Antigen wurde eine Biacore™ T200 Anlage (GE Healthcare) verwendet. Die Immobilisierung des Liganden erfolgte bei 25 °C auf einen Series S Sensor Chip CM3 (GE Healthcare 29104990) durch herkömmliche NHS-Kopplung (*Biacore Sensor Surface Handbook BR-1005-71*). Die Ligandendichte wurde auf circa 500 Resonanzeinheiten (RU) eingestellt. Die Bindestudie wurde anschließend bei 37°C durchgeführt. Als Laufpuffer diente PBS-P+ (20 mM Phosphat;

2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; pH 7,4; 0,05 % *Surfactant* P20). Die Antikörperlösungen wurden mit einer Konzentration von 300 nM für 120 Sekunden eingespült. Die Dissoziation von der Oberfläche wurde nachfolgend 600 Sekunden bei einer Flussrate von 30 µl/ Minute gemessen. Die Oberfläche wurde durch Injektion (60 Sekunden) von 10 mM Glycin pH 1,7 regeneriert. Die Korrektur des Brechungsindex erfolgte durch Subtraktion der Nullwert (Blank)-Injektionen und des RU Wertes aus der Kontrollzelle (ohne Ligand, Ermittlung der Klebrigkeit). Zur Berechnung der Konstanten wurde das Langmuir 1:1 Bindemodell mit Hilfe der Biacore Evaluations-Software herangezogen.

#### **4.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Der zu untersuchende Antikörper wurde zunächst auf eine Konzentration von 5 mg/ml in PBS verdünnt. Ein TEM-Raster (Kohlenstoff-beschichteter, Parlodion-Kupferfilm, Maschenzahl: 400) wurde mit 4 µl der Antikörperlösung beschichtet und mit 30 µl Wasser gewaschen. 3 µl einer Tabakmosaikvirus-enthaltenen Lösung wurden auf das Raster getropft und kurz inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Material mit 2 % Uranyl-Acetat-Lösung gefärbt. Die Proben wurden mit dem Elektronenmikroskop (Tecnai12, FEI) bei 120 kV analysiert. Elektronen-Mikrographen wurden mit einer 2048 x 2048 Pixel CCD-Kamera (Gloor) mit einer nominalen 195.000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die daraus resultierenden Pixel bilden eine Probengröße von 0,296 Nanometer ab. Die Aufnahmen wurden folgend durch referenzfreies *alignment* auf manuell ausgewählte Partikel mit Hilfe der EMAN2 Software prozessiert. Die extrahierten Partikel wurden durch multivariante statistische Analyse angeglichen und klassifiziert (2D-Class-Averaging). Alternativ wurden Rohaufnahmen auch mittels Adobe Photoshop zur Kontrastverstärkung oder Anpassung der Helligkeit nachbearbeitet.

### **4.3 Zellbiologische Methoden**

#### **4.3.1 Kultivierung der eukaryotischen Zellen**

In Tabelle 2 sind die verwendeten Zelllinien und deren Herkunft aufgeführt. Adhärente Zellen wurden durch Accutase (Pan Biotech, P10-21100) abgelöst. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, und 80 % Luftfeuchte kultiviert. Als Basismedium wurde RPMI-1640 (10 % FCS; 2 mM Glutamin) verwendet. Rekombinanten Zelllinien wurden Zusätze nach Herstellerangaben zugeführt. Die genaue Zellzahl wurde automatisch mit dem Vi-CELL XR *Analyzer* (Beckmann Coulter) bestimmt.

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinie und deren Herkunft**

Zelllinie	Quelle/Klon
A-431	ATCC® CRL-1555™
HeLa	ATCC® CCL-2™
HT-29	Roche-interne Zellbank
LNCaP	ATCC® CRL-1740™
MCF-7	Roche-interne Zellbank
MKN-45	DSMZ ACC 409
MKN-45_FOLR1_PD-L1	Roche-interne Zellbank
SK-OV-3	ATCC® HTB-77™
TCR/CD3 Effektor Zellen	Promega, J1601
PD-1 Effektor Zellen	Promega, J1252

#### 4.3.2 Durchflusszytometrische Bindestudien

Alle Messungen wurden am FACS Canto™ II Gerät (BD Biosciences) durchgeführt. Die Rohdaten wurden aus der FACS Diva Software als .fcs Datei extrahiert und mit der Software FlowJo\_V10 (BD Biosciences) analysiert und im Layout Editor dargestellt. Statistische Darstellungen wurden in Graph Pad Prism (GraphPad Software) erstellt.

Die Expressionsanalyse wurde mit Phycoerythrin-gekoppelten Antikörpern (Biolegend, FOLR1 (908303), EGFR (352903), PD-1 (367403)) durchgeführt.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in 95  $\mu$ l FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS) mit je 5  $\mu$ l der Stammlösung für 30 Minuten auf Eis und lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweifach mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert, in PBS resuspendiert und mit dem BD FACSCanto™ II gemessen. Die Spannung der Laser wurde mit Hilfe einer Isotypenkontrolle eingestellt. Je Ansatz wurden mindestens 10.000 Zellen aufgenommen.

Die Bindung der produzierten Antikörper (Erstantikörper) an die Zielzelllinie wurde durch Färbung mit einem Fluorophor-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer mit 200 nM des Antikörpers auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurden 95  $\mu$ l FACS Puffer mit 5  $\mu$ l der anti-LC bzw. anti-His-Tag Antikörper (Biolegend, 362603) addiert und erneut 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden mindestens 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die Einstellung des Lasers erfolgte durch den Kontrollansatz ohne Erstantikörper.

## 4.4 Immunologische Assays

### 4.4.1 T-Zellaktivierungsassay

Zur Bestimmung der Antikörper-vermittelten T-Zellaktivierung wurden rekombinante TCR/CD3 Effektorzellen oder PD-1 Effektorzellen verwendet (siehe Tabelle 2). An Tag 0 wurden  $4 \times 10^4$  Tumorzellen in 96-Well-Platten (Flachboden, weiß, für Lumineszenz Messung) ausgesät und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. An Tag 1 wurden Antikörperverdünnungen in einer separaten Tiefboden-Platte in Assaymedium (RPMI-1640; 1 % FCS; 2 mM Glutamin) angesetzt. Das Medium der vorinkubierten Tumorzellen wurde nachfolgend abgenommen und durch 50  $\mu$ l der Antikörperlösungen ersetzt. Anschließend wurden  $1 \times 10^5$  Jurkat Reporterzellen in 25  $\mu$ l Assaymedium hinzugefügt. Der Ansatz wurde unter Zellkulturbedingungen für 16 h inkubiert. Nach Zugabe von 75  $\mu$ l des Reagenz OneGlo™ (Promega, E6110) wurde der Ansatz für 5 Minuten unter leichtem Schütteln (200 rpm) im Dunklen inkubiert. Die Lumineszenz wurde mit dem Infinite® F200 Photometer (Tecan Trading AG) mit einer Integrationszeit von einer Sekunde bestimmt. Die Experimente mit PD-1 Effektorzellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Promega, J1250). Als Zielzellen wurden lediglich FOLR1-positive MKN-45\_FOLR1\_PD-L1 (Tabelle 2) verwendet.

### 4.4.2 PBMC Co-Kultivierungsassay

An Tag 0 wurden  $1,8 \times 10^4$  Tumorzellen in RPMI-1640 (10 % FCS, 2 mM Glutamin) in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. An Tag 1 wurden PBMC aus humanem Blut gesunder Spender isoliert. Dazu wurde das Blut zunächst 1:1 mit RPMI-1640 verdünnt und in mit 15 ml Ficoll® Paque Plus (GE, 17144003) befüllte Leucosep™ (Greiner, 227290) Zentrifugalröhrchen gegeben. Die Zentrifugations- und Waschschrte wurden nach Herstellangabe (GE, Ficoll®) durchgeführt. Mononukleäre Zellen wurden mit einem Vi-CELL XR Zellzähler (Beckmann Coulter) quantifiziert und mit Assaymedium (RPMI-1640; 1 % FCS; 2 mM Glutamin) auf die entsprechende Zellkonzentration eingestellt und vorübergehend im Inkubator (maximal 2 h) gelagert. In der Zwischenzeit wurden Verdünnungsreihen der Antikörper in Tiefboden-Platten (Eppendorf, 0030504208) angelegt. Anschließend wurde das Medium der vorinkubierten Tumorzellen abgenommen, und die entsprechende Antikörperverdünnung in Assaymedium (150  $\mu$ l) zugegeben. Jede Bedingung wurde in technischen Triplikaten angesetzt. Um Abweichungen durch Evaporation des Mediums zu verhindern, wurden nur die inneren 60 wells zur Auswertung herangezogen, während die äußeren wells mit PBS befüllt wurden. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der PBMC-Suspension (Zellzahl je nach E:T Verhältnis) hinzugefügt. Die Ansätze wurden unter Zellkulturbedingungen für 48 h inkubiert.



#### 4.4.3 Laktat-Dehydrogenase-Bestimmung

Um Antikörper-vermittelte Eliminierung der Tumorzellen zu quantifizieren, wurde das *Cell Cytotoxicity*-Kit (Roche, 11644793001) verwendet. Das Messverfahren beruht auf der Ausschüttung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) in das Kulturmedium nach Einleitung der Apoptose. Zur Bestimmung des maximalen Wertes (100 % Eliminierung) wurden drei *wells* mit Triton™ X-100 (Sigma, T8787) versetzt (Endkonzentration im Medium bei 2 %) und für 5 Minuten inkubiert. 100 µl des Überstandes wurden mithilfe eines Liquidators in 96-*Well*-Platten (weiß, transparenter Boden) zur photometrischen Auslesung überführt. Die LDH-Detektionslösung wurde wie vom Hersteller beschrieben vorbereitet, 100 µl dem zuvor abgenommenen Kulturüberstand zugegeben und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Absorption bei 490 nM wurde folgend photometrisch im Infinite® F200 (Tecan) Gerät bestimmt.

#### 4.4.4 Quantifizierung der Zytokine im Überstand

Weitere 50 µl des Assay-Überstandes der PBMC-Tumorzell-Co-Kultivierung wurden zur Quantifizierung von Zytokinen in eine separate 96-*Well*-Platte transferiert und bei -80 °C bis zur Analyse zwischengelagert. Die Messung erfolgte in einem Durchflusszytometrie-basierten Multiplex-Ansatz unter Verwendung folgender Flex Sets der Firma BD: INF- $\alpha$  (560111), IL-2 (558270), Granzym B (560304) und TNF- $\alpha$  (560112) und dem dazugehörigen Protein Master Buffer Kit (558264). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung wurde in einem FACS Canto II Durchflusszytometer mit Hochdurchsatzeinheit vollzogen.

#### 4.5 Auswertungs-, Statistik- und Darstellungssoftware

Sofern nicht explizit angegeben erfolgte die Analyse der Rohdaten mit Microsoft Excel 2010. Die Darstellung der Daten sowie die statistische Auswertung wurde mit Graph Pad Prism 7 vollzogen. Die dargestellten statistischen Parameter und angewendeten Tests sind in den betreffenden Abbildungslegenden spezifiziert. Alle schematischen Darstellungen wurden mit Microsoft Powerpoint erstellt. Die Darstellung der Proteinstruktur (Abbildung 13) wurde mit Discovery Studio Visualizer v17.2.0 (BIOVIA) angefertigt und im .jpg-Format exportiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 TriFab: Ein neuartiges, trivalentes, IgG-förmiges TCB-Format

#### 5.1.1 Architektur und Domänenzusammensetzung des TriFab-TCB

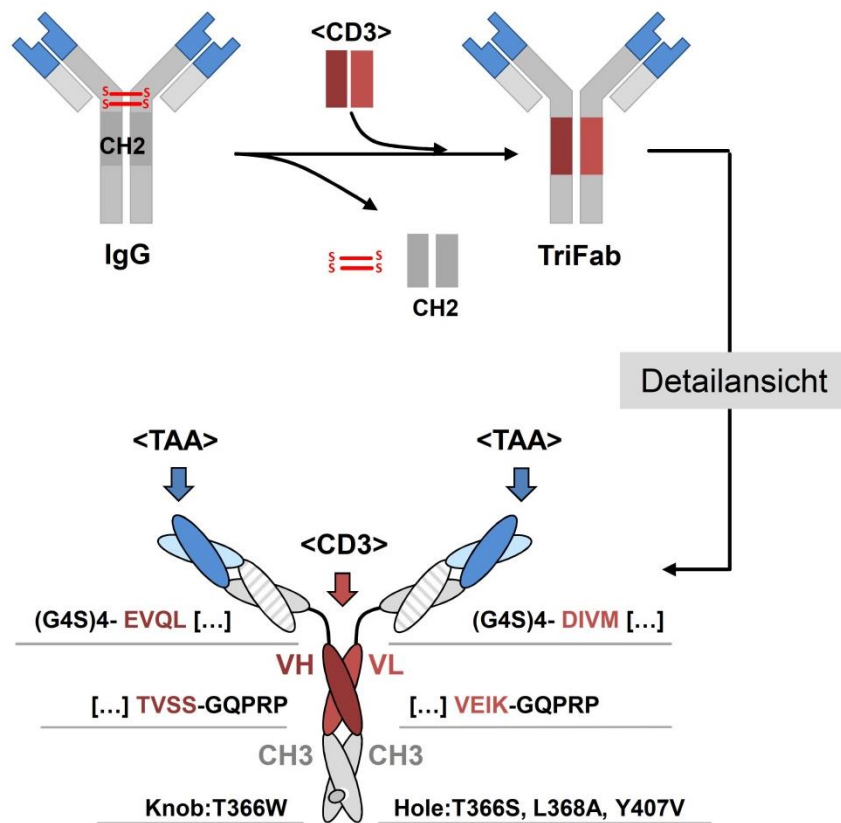
Durch Änderung des molekularen Aufbaus und der Anordnung einzelner Domänen können sich Unterschiede in pharmakodynamischen Eigenschaften eines TCB ergeben (Ellerman 2019). Alle TCB-Formate in klinischer Testung tragen das CD3-spezifische Paratop endständig, was den wesentlichen Unterschied zum TriFab Format darstellt.

Das rationale Design des Formats ist in Abbildung 3 dargestellt. Der gezeigte IgG trägt N-terminal zwei Paratope, die eine bivalente Bindung an tumorassoziierte Antigene (TAA) auf der Zielzelle ermöglichen. Die CH<sub>2</sub>-Regionen des natürlichen IgG wurden durch variable Regionen eines CD3-Binders (rot) substituiert und bildet somit den zentralen Teil des Proteins. Das Molekül enthält somit keine klassische Fc-Region (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) und erinnert durch Einführung der zentralen variablen Region an drei miteinander verknüpfte Fab-Moleküle („TriFab“), die der Größe und Form eines IgG1 Antikörpers ähneln.

Um die Zugänglichkeit des CD3-spezifischen Paratops für das membrangebundene T-Zell Antigen zu ermöglichen, wurden Veränderungen in der Gelenkregion (*hinge*) vorgenommen (Abbildung 3, Detailansicht). Flexible Peptidkette aus vier Glycin(4)Serin(1)-Einheiten ersetzen die natürlichen Aminosäureketten der *Hinge*-Region. Durch diese Substitution wird die Disulfidverbrückung der beiden schweren Ketten aufgehoben, sodass die Interaktion ausschließlich auf nicht-kovalenten Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht.

Die Heterodimerisierung der beiden schweren Ketten wurde durch Einführung der „Knob-into-Hole“-Mutationen in die C-terminal gelegenen CH<sub>3</sub>-Domänen forciert (Ridgway et al. 1996). Die Übergangssequenzen von *hinge* zu VH/VL beziehungsweise VH/VL zu CH<sub>3</sub> sind ebenfalls in der Detailansicht eingezeichnet.

Zunächst wurden TriFab-Moleküle mit Spezifitäten gegen drei verschiedene TAA generiert (Schreibweise: <Spezifität>-TriFab). Das Kohlenhydratantigen Lewis Y (LeY), der Folatrezeptor (FOLR1) und EGFR.



**Abbildung 3: Aufbau des TriFab-TCB mit Sequenzübergängen und eingefügten Mutationen.**

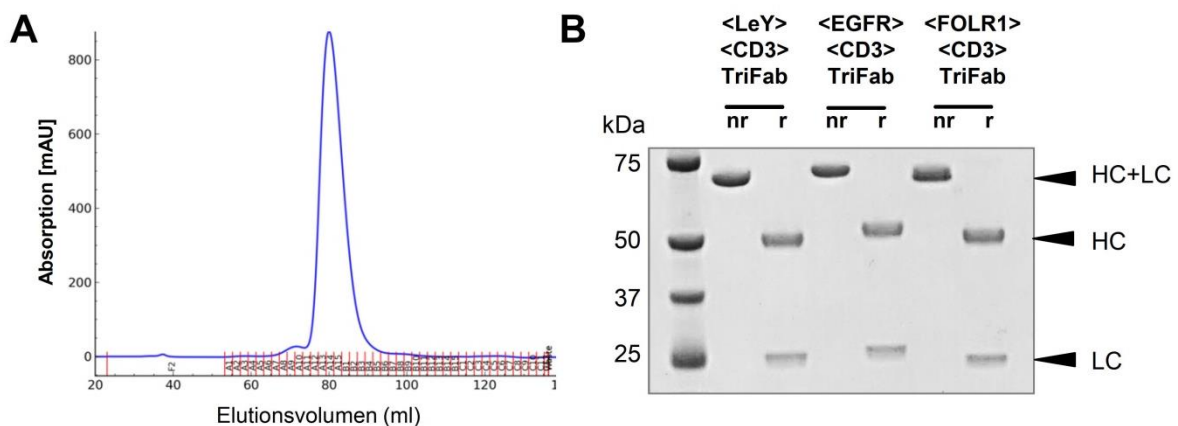
Im Vergleich zum natürlichen IgG wurden die CH2 Domänen durch die variablen Domänen eines CD3-Binders (rot) substituiert. Die disulfidverbrückte (S-S) *Hinge*-Region wurde durch einen flexiblen Linker ohne intermolekulare, kovalente Verbrückung ersetzt. Eine Detailansicht der Domänen zeigt die Sequenzübergänge. Die Heterodimerisierung wird durch *Knob-into-Hole*-Mutationen in den CH3-Domänen getrieben. (Eigene Darstellung)

Nach dem *in silico* Design des neuartigen TCB-Aufbaus waren verschiedene Kernfragen zu adressieren:

Lassen sich die Moleküle durch transiente Expression herstellen und als reines Monomer aufreinigen? Ist die zentrale CD3-Bindestelle für das Antigen zugänglich? Führt die simultane Bindung des Antikörpers an T- und Tumorzelle zu einer spezifischen Aktivierung der T-Lymphozyten. Hat die Antikörper-vermittelte T-Zell-Aktivierung die Eliminierung der Tumorzelle zur Folge?

### 5.1.2 Produktion und Analytik der TriFab-TCB

Die Produktion drei verschiedener Moleküle durch transiente Transfektion lieferte Ausbeuten von mehr als 20 mg pro Liter Expressionsvolumen. Die Aufreinigung mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (SEC) zeigte eindeutige Peaks. Abbildung 4A stellt beispielhaft das Chromatogramm der präparativen SEC des <EGFR>-TriFab dar. Das Zusammenführen der Fraktionen des Hauptpeaks resultierte in einem reinen Monomeranteil von mehr als 97 % (bestimmt durch analytische SEC). Die Zusammensetzung und Größe des Moleküls wurden mittels SDS-PAGE bestätigt (Abbildung 4B). In Anwesenheit von SDS dissoziieren die beiden nicht-kovalent verknüpften schweren Ketten, welche aufgrund ihrer identischen Größe im Gel übereinanderliegen und eine Einzelbande von 75 kDa generieren. In Anwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol wird die Disulfidbrücke zwischen schwerer (HC) und leichter (LC) Kette reduziert. HC (50 kDa) und LC (25 kDa) liegen getrennt voneinander vor.



#### Abbildung 4: Analytik der produzierten TriFab-TCB.

A) Das Chromatogramm der präparativen SEC (am Beispiel des <EGFR>-TriFab) zeigt einen dominierenden Monomer-Peak. Der kleinere Peak mit kürzerer Retentionszeit repräsentiert höhermolekulare Aggregate und ist gut von der Hauptfraktion abzutrennen. B) Eine Analyse verschiedener TriFab-Moleküle, die gegen LeY, EGFR und FOLR1 gerichtet sind, bestätigt die korrekte Molekülgröße unter reduzierenden (r) und nicht-reduzierenden (nr) Bedingungen (schwere Kette (HC) circa 75 kDa, leichte Kette (LC) circa 25 kDa), die der theoretischen Masse entspricht.

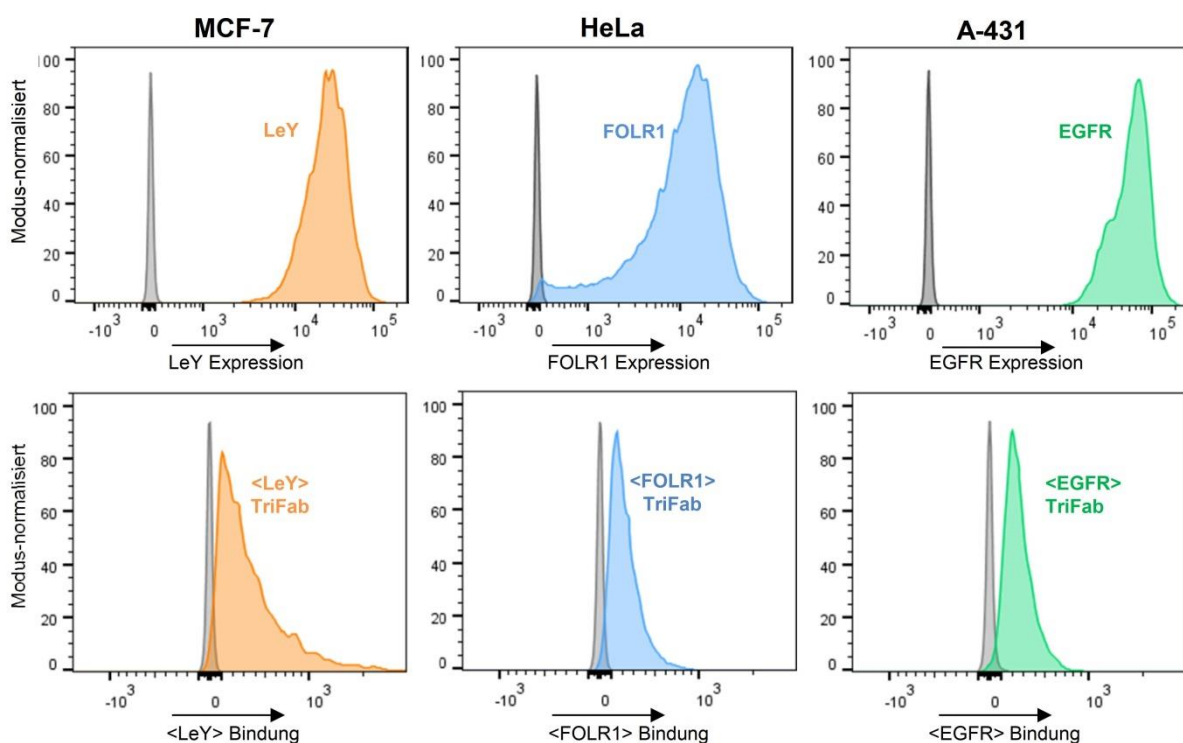
Zur Bestimmung der thermischen Stabilität der TriFab wurde Differentielle-Scanning-Fluorometrie angewendet. Dabei konnten mittlere Schmelztemperaturen von  $75 \pm 1^\circ\text{C}$  (<LeY>-TriFab, <EGFR>-TriFab) beziehungsweise  $74 \pm 1^\circ\text{C}$  (<FOLR1>-TriFab) ermittelt werden. Weiterhin wurde für alle Proteine ein Endotoxin-Wert von weniger als 1 EU pro Milligramm Protein gemessen.

### 5.1.3 Funktionalität der TriFab-TCB hinsichtlich der Antigenbindung

Aus der Literatur wurden immortalisierte Tumorzelllinien ermittelt, die das entsprechende TAA exprimieren. LeY liegt membrangebunden auf MCF-7 (Brustkrebs-Modell) vor. A-431-Zellen (Modell eines epidermoiden Karzinoms) exprimieren EGFR. FOLR1 wird auf der Membran von HeLa-Zellen (Modell des Zervixkarzinoms) exponiert. (Bacac et al. 2016, Brinkmann et al. 1991, Dickopf et al. 2019).

Eine Expressionsanalyse der kultivierten Zellen ist in Abbildung 5 dargestellt und konnte in allen Fällen die Expression des jeweiligen TAA bestätigen.

Für alle drei TriFab-Moleküle konnte die Bindung an die Zielzellen durch Anfärben mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern gezeigt werden. Dies äußert sich in einer Phasenverschiebung gegenüber der Isotypenkontrolle im Histogramm (Abbildung 5, zweite Reihe).

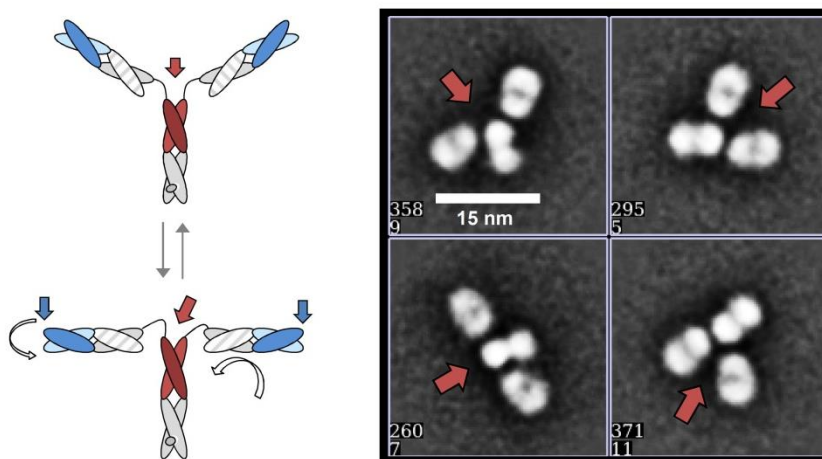


**Abbildung 5: Expression der TAA und Bindung der TriFab-TCB auf ausgewählten Tumorzellen.**

Durchflusszytometrische Expressionsanalyse durch Färbung der Zellen mit spezifischen, Fluorophor-gekoppelten Antikörpern bestätigt die starke Expression von LeY auf MCF-7, FOLR1 auf HeLa und EGFR auf A-431 (obere Reihe). Die Bindung der TriFab-Moleküle an die entsprechende Zielzelle wurde ebenfalls durchflusszytometrisch über Bindung eines Fluorophor-gekoppelte anti-LC Antikörpers ermittelt. Als Isotypenkontrolle (grau) wurde jeweils ein TAA-irrelevanter TriFab eingesetzt (<PSMA> auf MCF-7, <LeY> auf HeLa, <FOLR1> auf A-431)

Die Binfunktionalität der zentralen Domänen des TriFab wurde bereits durch Brinkmann *et al.* für niedermolekulare Substanzen wie Haptene (z. B. Biotin, Digoxigenin) gezeigt (Mayer *et al.* 2015). Für deutlich größere Proteine wie CD3, die zudem aufgrund der Membranverankerung in ihrer Rotation eingeschränkt sind, waren sterische Hinderungen zu befürchten.

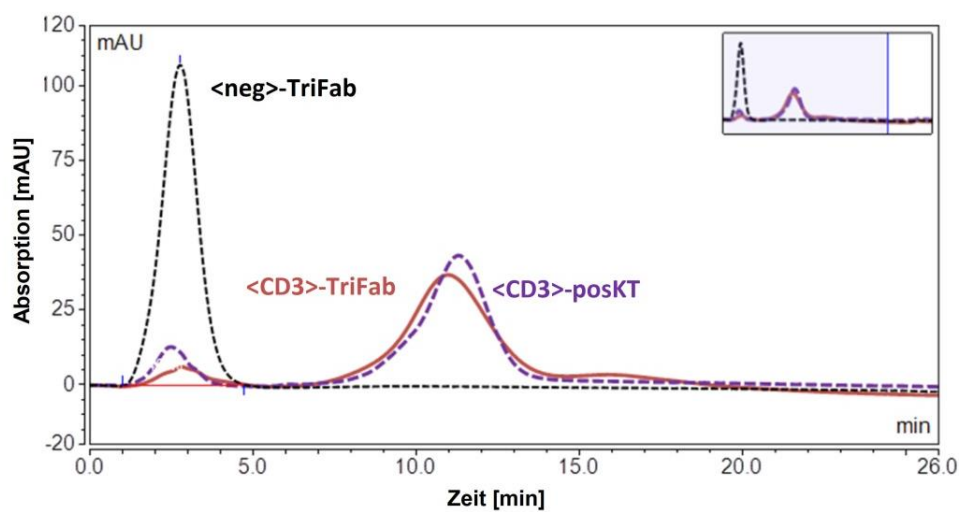
Aufnahmen der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gaben zunächst Aufschluss über die Geometrie des TriFab-Formates (Abbildung 6). Alle Domänen sind durch einen guten Kontrast klar erkennbar, was auf einen rigiden Charakter und eine intramolekulare Stabilität der Domänen schließen lässt. Einzig die glycinreiche Linkerregion ist durch das flexible Design sehr beweglich. Dies führt zu einer Rotation der N-terminalen Bindedomänen und der Zugänglichkeit des CD3-spezifischen Paratops.



**Abbildung 6: TEM-Aufnahmen verdeutlichen den flexiblen Charakter der *Hinge*-Region und die Zugänglichkeit des CD3-spezifischen Paratops.**

Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen des <LeY>-TriFab bestätigen den flexiblen Charakter der *Hinge*-Region und die rigide Form der einzelnen Domänen. Der rote Pfeil deutet auf die variablen, CD3-spezifischen Domänen. Gezeigt sind vier repräsentative Bilder (N = 50) als „class averages“.

Um die Bindekapazität des Antikörpers an CD3 zu messen, wurden die Moleküle auf eine Affinitätschromatographiesäule gegeben. Auf der Säulenmatrix wurde zuvor rekombinantes CD3 immobilisiert. Die Messung der Retention eines Moleküls gibt Aufschluss über das Bindevverhalten an das Antigen. Das Chromatogramm zeigt für den <CD3>-TriFab eine deutlich verlängerte Retentionszeit auf der Säulenmatrix im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (mit zentraler Biotin-Bindestelle (<neg>-TriFab)). Das Signal liegt im Bereich der Positivkontrolle, einem publizierten TCB mit N-terminal lokalisiertem CD3-Paratop (Abbildung 7).



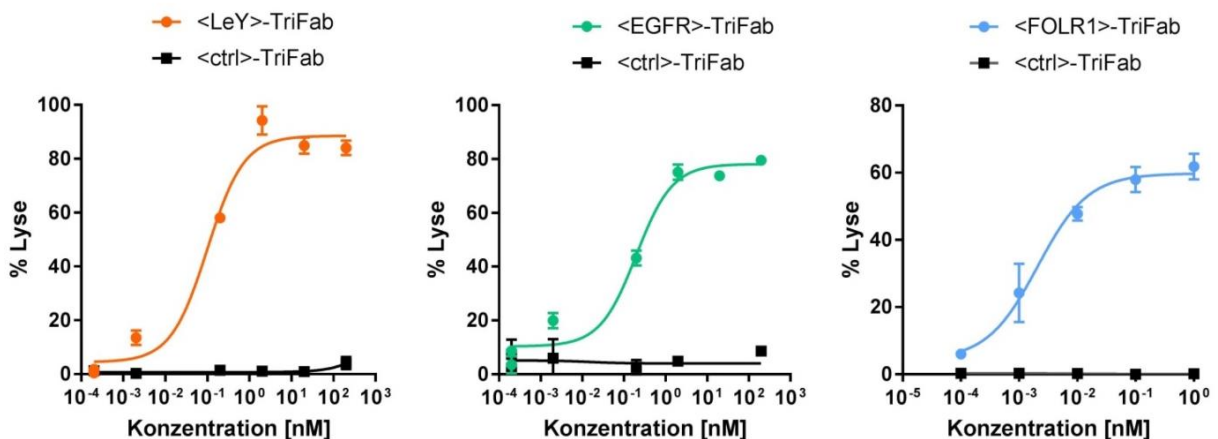
**Abbildung 7: Assoziation der zentralen Binderegion an rekombinantes CD3.**

Eine mit rekombinantisem CD3 beschichtete Säulenmatrix wurde genutzt, um die Bindung der TriFab-TCB an CD3 zu bestimmen. Nach Auftragen auf die Chromatographiesäule wurde eine verlängerte Retentionszeit des <CD3>-TriFab (rot) im Vergleich zum haptenbindenden TriFab (<neg>-TriFab, schwarz gestrichelt) detektiert. Als Positivkontrolle diente ein publizierter Antikörper mit bestätigter CD3-Bindung (<CD3>-posKT) (Bacac et al. 2016).

### 5.1.4 TriFab-TCB-induzierte Lyse von Tumorzellen durch T-Lymphozyten

Die biochemischen Analysen im vorherigen Abschnitt bestätigen, dass die N-terminalen Paratope (Fab-Arme, blau, Abbildung 3) und die zentralen <CD3>-Domänen unabhängig voneinander an ihr Epitop binden können. Die T-Zell-vermittelte Eliminierung einer Tumorzelle setzt die simultane Bindung des Antikörpers an Effektor- und Zielzelle voraus, das zum Ausbilden der Immunsynapse und Ausüben der Effektorfunktion führt.

Co-Kultivierungsassays mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden durchgeführt, um die Antikörper-induzierte Eliminierung der Tumorzellen durch polyklonale zytotoxische T-Zellen zu untersuchen. Die Quantifizierung der Zelllyse erfolgte durch Messung der Laktat-Dehydrogenase, welche bei Verlust der Integrität der Zellmembran in das umgebene Medium entlassen wird. Auch hier zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt bei allen drei Molekülen auf den entsprechenden Zielzellen (Abbildung 8). Die EC50 Werte liegen jeweils im pikomolaren Bereich (<EGFR> = 200 pM, <LeY> = 100 pM, <FOLR1> = 10 pM). Als Negativkontrollen wurden kreuzweise TriFab mit intaktem CD3-Binder, aber irrelevanten TAA-Spezifitäten eingesetzt. Beispielsweise sind <FOLR1>-TriFab inert auf FOLR1-negativen A-431-Zellen und <LeY>-TriFab induzieren keine signifikante Lyse auf LeY-negativen HeLa-Zellen.



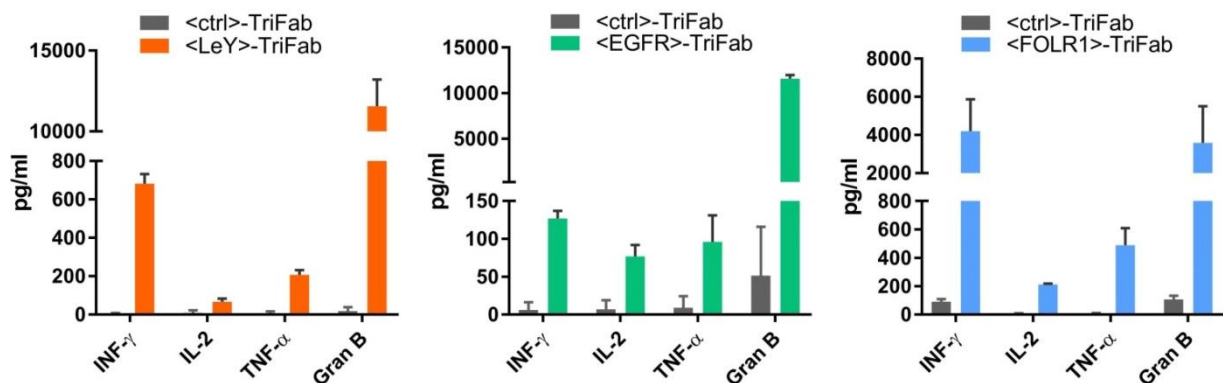
**Abbildung 8: TriFab-TCB induzieren die Lyse von Tumorzellen in Anwesenheit von PBMC.**

Tumorzellen (MCF-7, A-431, HeLa) wurden mit frisch isolierten humanen PBMC (E:T Verhältnis 10:1) in Anwesenheit der entsprechenden TriFab-TCB für 48 Stunden co-kultiviert. Die Experimente mit MCF-7 und A-431 wurden mit drei gesunden Donoren dreifach reproduziert. Die Experimente auf HeLa-Zellen wurden mit fünf verschiedenen Donoren sechsfach reproduziert. Die Darstellung zeigt Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Kurven wurden durch nichtlineare Regression (log [Dosis] versus Antwort) mithilfe der Graph Pad Prism Software modelliert.



Die Überstände aus den Co-Kultivierungsansätzen wurden zudem auf Anwesenheit T-Zell-spezifischer Zytokine untersucht. In allen Reaktionen mit TAA-spezifischen TriFab, der entsprechenden Tumorzelle und PBMC waren erhöhte Konzentrationen der Aktivierungsmarker IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  vorzufinden. Weiterhin war Granzym B, das in Folge der Aktivierung ausgeschüttet wird und die die lysierende Effektorfunktion unterstützt, deutlich angereichert (Abbildung 9).

In Ansätzen ohne gerichtete TriFab-Moleküle (<ctrl>-TriFab) war analog zu der vorher gemessenen Eliminierung der Tumorzellen keinerlei signifikante Anreicherung der Zytokine zu detektieren.



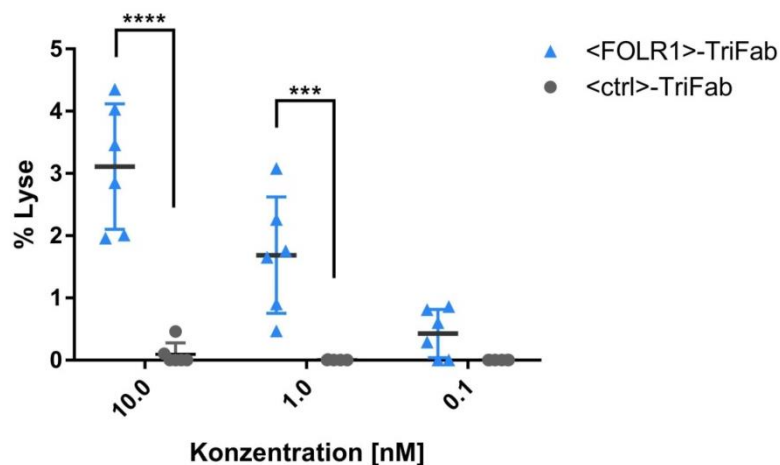
**Abbildung 9: Ausschüttung T-Zell-spezifischer Zytokine als Folge der Co-Kultivierung von TCB, Tumorzellen und PBMC.**

Ein Teil der Kulturüberstände aus dem vorausgehenden Experiment (Abbildung 8) wurde unter Verwendung eines Bead-Assays durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und Granzym B untersucht. Analysiert wurden die Überstände aus Ansätze mit einer TriFab Konzentration von 2 nM (<LeY> oder <EGFR>) oder 0,1 nM <FOLR1>. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten. Das Assay wurde zweifach mit je zwei unterschiedlichen Donoren reproduziert. Gezeigt sind repräsentative Auswertungen je eines Donors.

### 5.1.5 TriFab-TCB-induzierte Zytotoxizität auf Zellen mit physiologischer Antigen-Expression

Der *On-target-off-tumor*-Effekt ist bei der systemischen Applikation von TCB häufig mit Nebenwirkungen verbunden. Die Toxizität ist oft zu beobachten, wenn ein Zielantigen unter physiologischen Bedingungen in gesundem Gewebe exprimiert wird und der TCB dort binden kann.

Um dieses Szenario nachzuahmen, wurden <FOLR1>-TriFab mit huPBMC und MKN-45 Zellen inkubiert. Letztere exponieren circa 800 Moleküle des FOLR1 auf der Membran pro Zelle (Abschnitt 5.2.7). Diese Antigenzahl ist mit der Expression des Folatrezeptors in gesundem Gewebe (Niere, Lunge) vergleichbar (Parker et al. 2005). Nach 48-stündiger Inkubation konnte eine Eliminierung von durchschnittlich 3 % der MKN-45-Zellen ab TriFab Konzentrationen von mehr als 10 nM detektiert werden (Abbildung 10). Eine signifikante Lyse konnte bereits bei Konzentrationen von 1 nM im Vergleich zur Kontrolle (ungerichtetes TriFab Molekül) festgestellt werden. Im Umkehrschluss zeigt sich, dass die Wahl des Zielantigens für eine Therapie mit TCB herausfordernd ist. Die ubiquitäre Expression eines Antigens in essentiellm Gewebe limitiert den Einsatz von T-Zell-rekrutierenden Antikörpern.



**Abbildung 10: TriFab-TCB induzieren T-Zell-vermittelte Lyse auf Tumorzellen mit physiologischer Antigenexpression.**

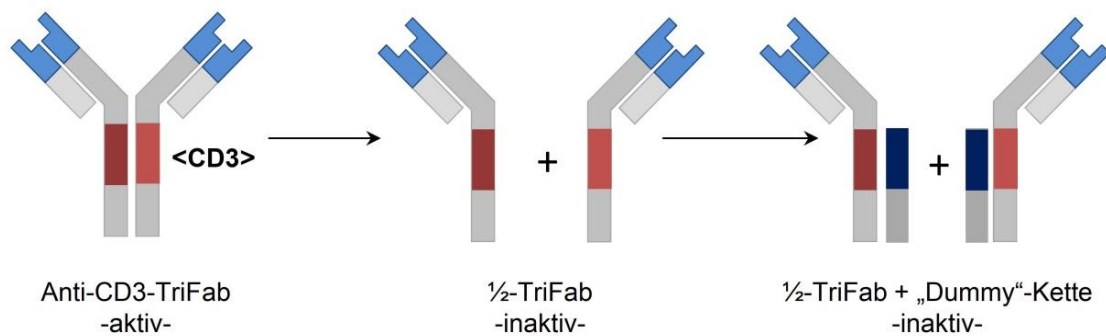
MKN-45-Zellen wurden mit frisch isolierten humanen PBMC (E:T Verhältnis 10:1) in Anwesenheit des <FOLR1>-TriFab-TCB für 48 Stunden co-kultiviert. Die Darstellung zeigt technische Triplikate (pro Datenpunkt) zweier Donoren aus drei Experimenten, normalisiert auf die prozentuale Lyse. Die blauen Werte bilden Ansätze mit <FOLR1>-TriFab ab, die grauen Punkte repräsentieren die ungerichtete Kontrolle (<ctrl>-TriFab). Die graue horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert und SD.

\*\*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p = 0,002$  berechnet anhand ungepaartem Student t-Test.

## 5.2 Das Konzept der konditionalen T-Zell-Aktivierung

### 5.2.1 Die thermodynamisch getriebene Assemblierung zweier Eduktmoleküle

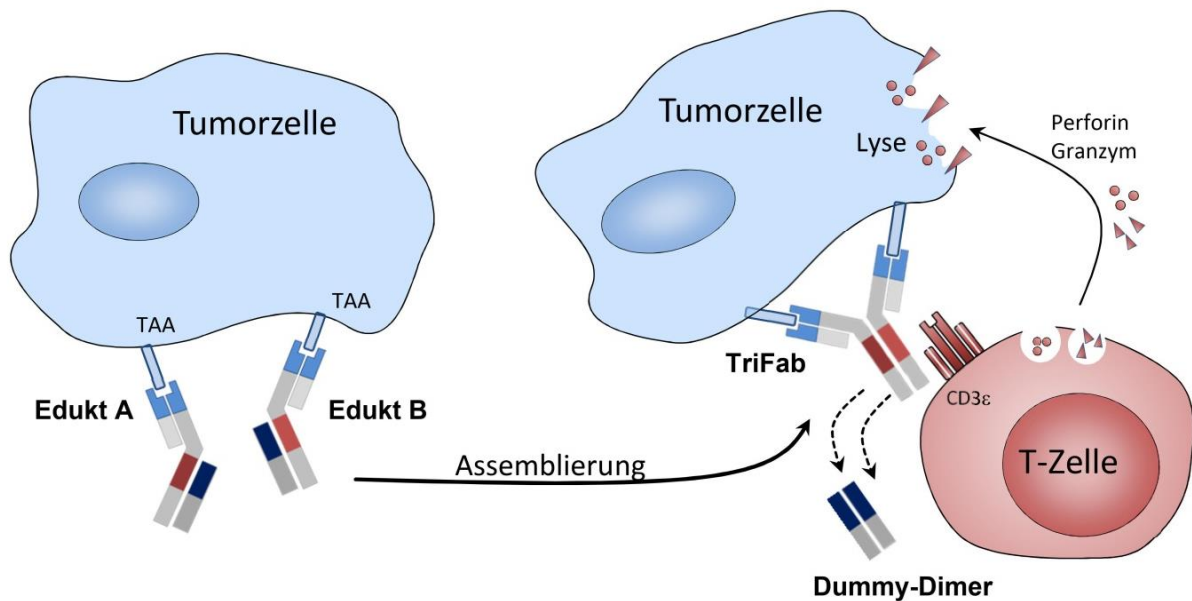
Um die zuvor beschriebene *On-target-off-tumor*-Aktivität des TriFab-TCB zu minimieren, wurde der TriFab-Aufbau durch weitere Veränderungen modifiziert (Abbildung 11). Das aktive Format wurde entlang des TriFab Stammes in vertikaler Weise getrennt. Resultierend sind zwei Moleküle ( $1/2$ -TriFab), die jeweils nur einen Teil des CD3-Binders (rot) tragen und daher separat vorliegend inaktiv sein sollten. Um die ungepaarten CD3-Domänen der Vorläufermoleküle zu stabilisieren, wurden sogenannte *Dummies* (Attrappen) an den TriFab-Stamm assoziiert (Abbildung 11, rechts, dunkelblau). Beide Teile tragen N-terminal einen <TAA> (blau) zum monovalenten Binden an der Zielzelle.



**Abbildung 11: Weiterentwicklung des TriFab-Formates in ein zweiteiliges Konzept zur konditionalen T-Zell-Aktivierung.**

Die Inaktivierung des aktiven CD3-Binders (rot) erfolgte durch vertikale Trennung des Moleküls entlang der schweren Ketten. Das Resultat sind zwei  $1/2$ -TriFab. Zur Steigerung der Expressionsstärke und Senkung der Aggregationstendenz des Antikörpers wurde eine *Dummy*-Kette (dunkelblau) an den Halbantikörper assoziiert. (Eigene Darstellung)

Konzeptionell sollen die beiden Edukte A und B unabhängig voneinander auf der Zielzelle binden und dort miteinander zu einem aktiven TriFab assemblieren (Abbildung 12, rechts). Dabei wird neben dem aktiven TriFab ein *Dummy-Dimer* gebildet, welches aus der Immunsynapse dissoziiert. Die Rekonstitution des CD3-Binders soll folgend polyklonale T-Zellen aktivieren und die Eliminierung der Tumorzelle durch Sekretion zytotoxischer Proteine (Perforin, Granzym) auslösen.



**Abbildung 12: Zwei Eduktmoleküle assemblieren auf der Zielzelle zu einem aktiven TCB und lösen eine konditionale Aktivierung der T-Zelle aus.**

Die beiden inaktivierten Eduktmoleküle binden unabhängig voneinander auf der Tumorzelle (links) und assemblieren dort zu einem aktiven TriFab-TCB (rechts). Letzterer aktiviert über die rekonstituierte CD3-Binderegion eine T-Zelle, welche die Tumorzelle durch Ausschüttung zytotoxischer Proteine (Perforin, Granzym) lysiert. Als Nebenprodukt entsteht ein *Dummy-Dimer* (dunkelblau), welches aus dem Kontaktbereich dissoziiert. (Eigene Darstellung)

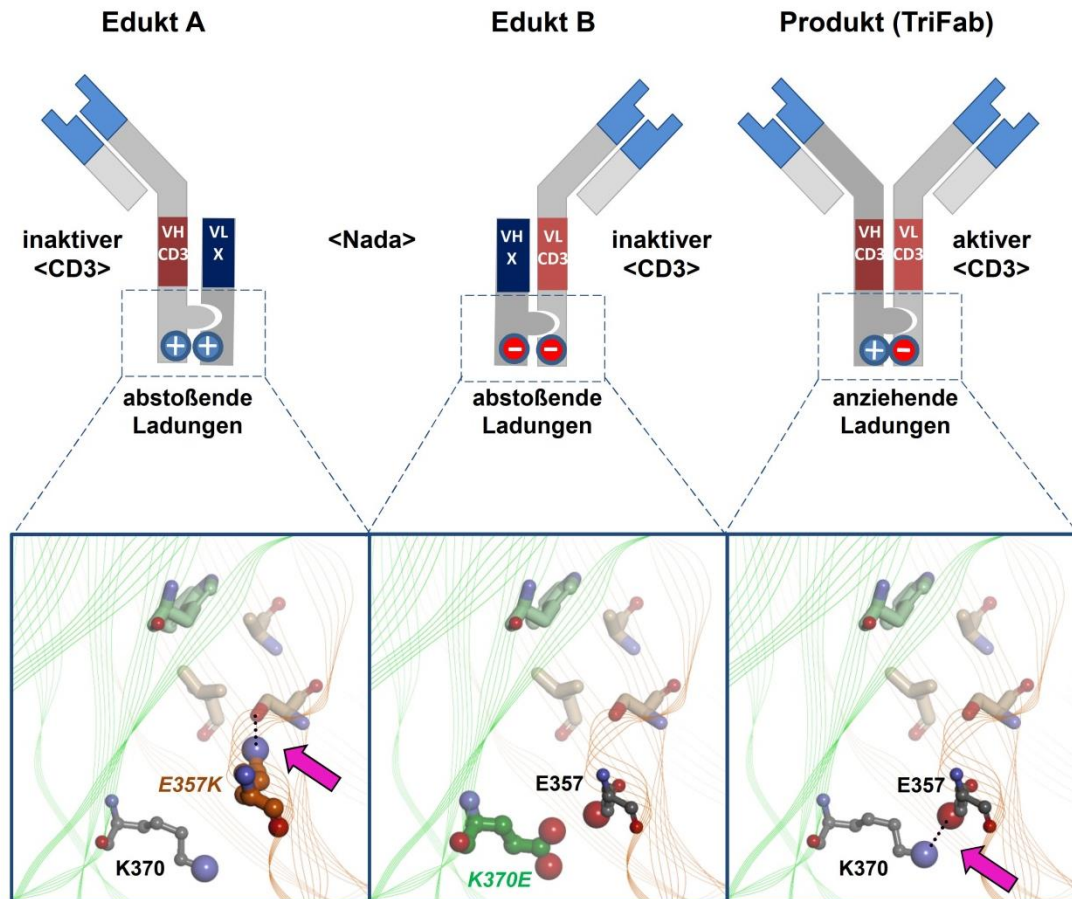
Der modulare Molekülaufbau der Vorläufermoleküle ist in Abbildung 13 detaillierter dargestellt. Das *Dummy*-Molekül besteht aus einer variablen Region (VH oder VL), die jedoch keine Bindefunktion besitzt (<x>), da die CDR in diesen Domänen durch einfache Glycine substituiert wurden. Dieser artifizielle Binder wird auch als Nadaceptin (<Nada>) bezeichnet. Die Paarung der freien variablen Regionen (rot) soll die Expressionsausbeute steigern und die Aggregationstendenz senken. Die CH3 Regionen des Dummies sind ebenfalls mit korrespondierender *Knob-into-Hole*-Mutation, analog zum parentalen TriFab-Format, versehen.

Um die Fusion der beiden Edukte thermodynamisch zu begünstigen, wurden zudem Störmutationen in der CH3-Domäne eingefügt. Edukt A trägt repulsive, positive (++) Ladungen, sein Pendant Edukt B trägt repulsive, negative (- -) Ladungen. Kommen beide Edukte in räumliche Nähe, kommt es zum Austausch der Ketten durch Anziehung der gegensätzlichen Ladungen(+ -). Das entstehende Produktmolekül entspricht dem aktiven TriFab-TCB aus dem vorherigen Abschnitt 5.1 (Abbildung 13, rechts).

Aus strukturebiologischer Sicht wurden im *Dummy*-Teil des Eduktes A das negativ geladene Glutamat an Kabat Position 357 durch ein positiv geladenes Lysin ausgetauscht (E357K) und so die Polarität umgekehrt. Das an Position 370 liegende Lysin im Halbantikörper bewirkt die Abstoßung der gegenüberliegenden Seitenkette, welche sich dadurch von dem Kontaktbereich der beiden Ketten abwendet (Abbildung 13, Pfeil in magenta).

Im *Dummy*-Teil des Eduktes B verhalten sich die Störmutationen umgekehrt. Das Lysin an Position 370 wurde durch ein Glutamat substituiert, die das an Position 357 gelegene Pendant abstößt. Der Kontaktbereich zwischen *dummy* und schwerer Kette ist somit partiell destabilisiert.

Das Produktmolekül (TriFab) trägt die Ursprungssequenz in der die Seitenkette des Lysins (370) und des Glutamats (357) eine Salzbrücke ausbilden und den Kontaktbereich durch anziehende Ladungen verstärken. Diese Konfiguration entspricht dem TriFab-Molekül.



**Abbildung 13: Modularer Aufbau der Eduktmoleküle und des Produkts mit Darstellung des Kontaktbereichs der CH3-Domänen.**

Der *Dummy*-Teil trägt eine nichtbindende variable Region (VL x, VH x) zur Paarung der variablen CD3-Region im Halbantikörper. Die Heterodimerisierung von HC und *dummy* wird durch Einfügen der *Knob-into-Hole*-Mutationen erreicht. Um den Austausch auf der Zielzelle thermodynamisch zu forcieren, wurden die *Dummy*-Ketten durch Störmutationen ergänzt. Edukt A (links) trägt auf der schweren Kette CD3-VH und die Knob Mutation. Der *dummy* trägt eine nichtbindende VL, die Hole-Mutationen und eine positiv geladene Störmutation (E357K). Edukt B (Mitte) trägt auf der schweren Kette CD3-VL und die Hole-Mutationen. Der korrespondierende *dummy* trägt eine nichtbindende VH, die Knob-Mutationen und eine negativ geladene Störmutation (K370E). Das Produkt setzt sich aus den beiden ½ TriFab zusammen. E357 und K370 bilden eine Salzbrücke (magentafarbener Pfeil) aus und stabilisieren den Kontaktbereich der schweren Ketten. (Eigene Darstellung)

Das auf *in silico* Modellierung basierende Konzept eröffnet die folgende **Hypothese**:

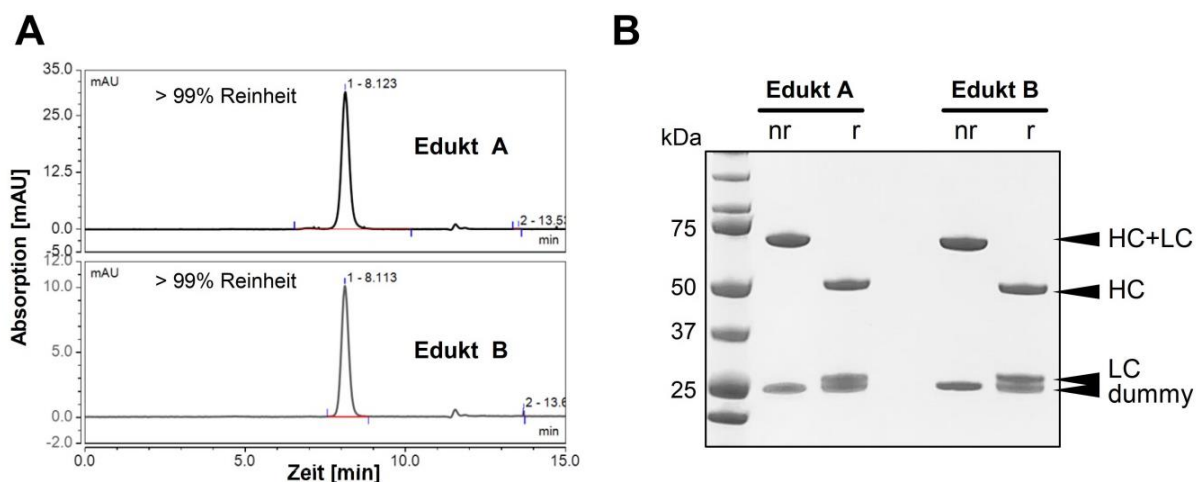
Befinden sich die Eduktmoleküle A und B in räumlicher Nähe, beispielsweise auf der Membran von Zielzellen, kommt es zur Assemblierung der schweren Ketten, einem thermodynamisch begünstigten Zustand. Dies hat zur Folge, dass aktive CD3-Binder präferentiell in Gewebe mit aberrierender Antigenexpression generiert werden. Ziel ist es, die *On-target-off-tumor*-Aktivität des T-Zell-rekrutierenden Antikörpers zu minimieren.

## 5.2.2 Produktion und Analytik der Eduktmoleküle

Als Zielantigene wurden analog zu den initialen TriFab-Molekülen FOLR1, EGFR und LeY gewählt. Vorassemblierte TriFab (Produkt der Austauschreaktion auf der Zelle) dienten als Positivkontrollen. Alle Antikörper wurden in mindestens zwei unabhängigen Chargen produziert und auf Reproduzierbarkeit getestet.

Die Produktion der Antikörper erfolgte wie eingangs beschrieben durch transiente Expression in HEK293F-Zellen. Alle Eduktmoleküle lieferten nach Kodonoptimierung der Plasmidsequenz, sowie Optimierung der Plasmidverhältnisse bei der Transfektion Ausbeuten von mehr als 40 Milligramm pro Liter Expressionsvolumen. Die durchgeführte Analytik ist in Abbildung 14 zusammengefasst. Die Verläufe der analytischen SEC zeigen klare Einzelpeaks, die einer Reinheit von mehr als 99% entsprechen (Reinheiten größer 95% dienten als Kriterium für weitere Assays) (Abbildung 14A).

Die Analyse durch SDS-PAGE (Abbildung 14B) bestätigte die Anwesenheit aller erwarteten Ketten inklusive der nichtkovalent verknüpften *Dummy*-Kette, die bereits unter nichtreduzierenden Bedingungen als Einzelbande bei 22 kDa identifizierbar ist.

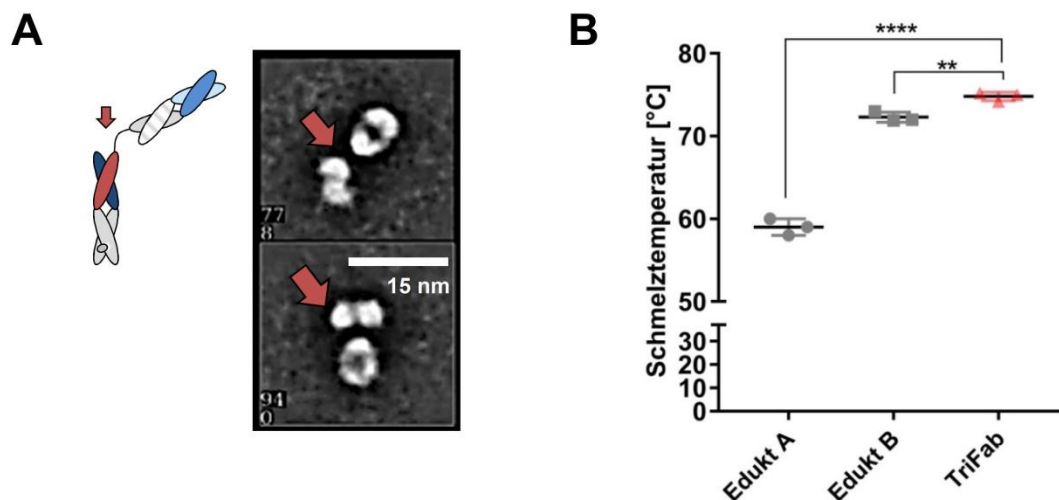


**Abbildung 14: Die Analytik der produzierten Eduktmoleküle bestätigt deren Reinheit und die Anwesenheit aller co-transfizierten Ketten.**

Alle Proteine wurden analog zum vorherigen Abschnitt produziert, aufgereinigt und wie folgt analysiert. A) Die analytische SEC bestätigt, dass sich die disulfidfreien und mit Störmutationen versehenen Eduktmoleküle mit Reinheiten von > 95 % aufreinigen lassen. Gezeigt sind zwei SEC Verläufe der <FOLR1> Eduktmoleküle A und B mit Reinheiten von mehr als 99 %. B) Die Analyse der Molekülzusammensetzung durch SDS-PAGE bestätigt unter nichtreduzierenden (nr) Bedingungen die Anwesenheit des Dummies (~22 kDa) und des HC-LC Konstrukts (~75 kDa). Infolge reduzierender Bedingungen (r) wird die Disulfidbrücke zwischen HC und LC reduziert, es liegen dann drei Ketten mit der erwarteten Größe vor (HC ~50 kDa, LC ~25 kDa, *dummy* ~22 kDa).

TEM-Aufnahmen veranschaulichen die rigide Form der einzelnen Domänen sowie die Flexibilität des Moleküls (Abbildung 15A).

Im Gegensatz zu natürlichen Immunoglobulinen gibt es keine stabilisierenden Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten, sodass die *Dummy*-Kette nur durch Protein-Protein-Interaktionen an die HC assoziiert ist. Dieses neuartige Konzept birgt folglich die Gefahr, dass das Molekül instabil ist, zerfällt und zur Aggregation neigt. Mithilfe Differentieller-*Scanning*-Fluorometrie (DSF) kann die Temperatur bestimmt werden, bei der die innenliegenden hydrophoben Flächen des Moleküls exponiert werden (Schmelztemperatur). Je höher dieser Wert liegt, desto weniger anfällig ist das Molekül für thermisch bedingte Destabilisierung und Aggregation (van der Kant et al. 2017). Für alle Moleküle konnten Schmelztemperaturen von größer 58°C (Edukt-Klasse A) beziehungsweise größer 70°C (Edukt-Klasse B) festgestellt werden. Das Produktmolekül (TriFab) ist durch die anziehenden Ladungen stabilisiert und weist Schmelztemperaturen von mehr als 74°C auf (Abbildung 15B).



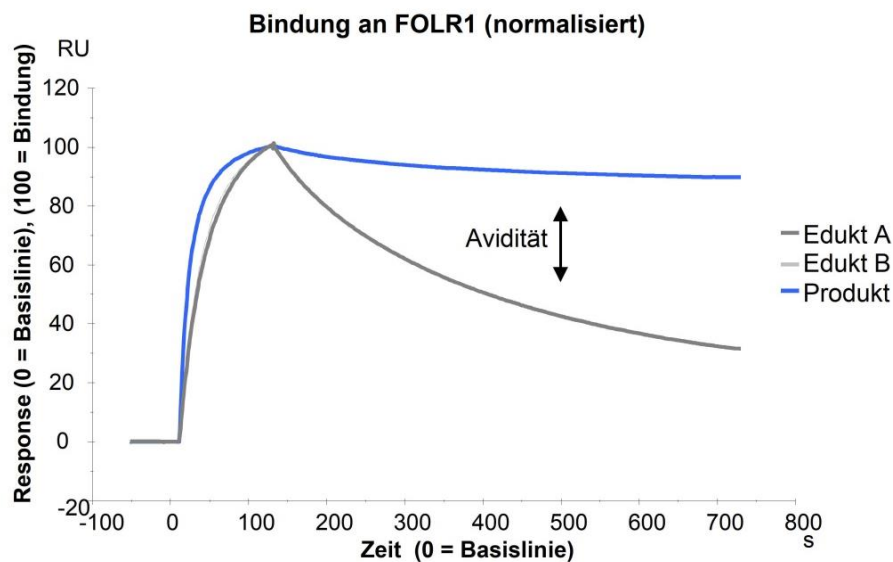
**Abbildung 15: Analyse der Integrität und Stabilität der Eduktmoleküle.**

A) TEM-Aufnahmen des <LeY>-Edukts bestätigen den flexiblen Charakter der *Hinge*-Region und den rigiden Charakter der einzelnen Domänen. Gezeigt sind zwei repräsentative Bilder (N = 30) als „Class Averages“. Legende in Nanometer (nm). B) Die Analyse der thermischen Stabilität durch DSF der Eduktmoleküle (grau) und des TriFab-Produktes (rot) mit Spezifitäten gegen LeY, FOLR1 und EGFR sind als *Box-Plot* aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert den Schmelzpunkt einer Antikörperklasse, welcher in technischen Triplikaten ermittelt wurde. Die schwarze horizontale Linie repräsentiert den Mittelwert und SD. \*\*\*\*p < 0,001, \*\*p = 0,006 berechnet anhand ungepaartem Student t-Test.



### 5.2.3 Bestimmung der Antigenbindung auf Tumorzelle und T-Lymphozyt

Die Mehrzahl klinisch eingesetzter, monospezifischer Antikörper bindet bivalent an die Zielzelle. Die Bindungsstärke wird dabei stark durch Aviditätseffekte beeinflusst. Da die zugrundeliegenden Eduktmoleküle publizierte Sequenzen in monovalentem Aufbau tragen, musste zunächst die Bindungsstärke an das Zielantigen geprüft werden. *Biacore*<sup>™</sup> Messungen bestätigen den Unterschied hinsichtlich der Bindungskinetik zwischen monovalenten Edukten und dem bivalenten Produkt (Abbildung 16). Am Beispiel des FOLR1-Binders zeigt sich, dass die Edukte schneller vom Antigen dissoziieren (graue Kurven), während das Produkt (blaue Kurve) länger dort verbleibt.



**Abbildung 16: Das Bindeverhalten der Edukte und des TriFab-Produkts an FOLR1.**

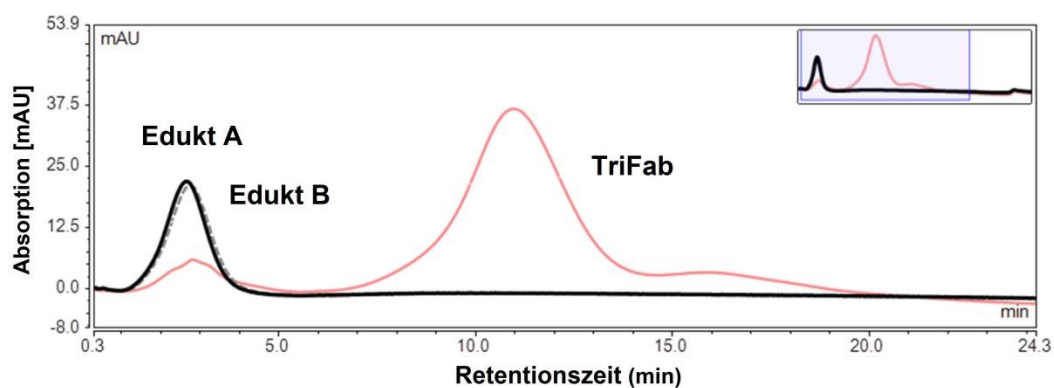
Biacore Messungen zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der monovalenten Eduktmoleküle (hellgrau und dunkelgrau weitgehend überlagert) und des bivalenten Produktmoleküls (blau) am Beispiel des <FOLR1>. Rekombinantes FOLR1 wurde auf dem Biacore Chip immobilisiert und die entsprechenden Antikörper eingespült. Die gesättigte Bindung (Massenzunahme) wurde jeweils auf 100 *response units* (RU) normalisiert. Im Anschluss wurde die Dissoziation vom Antigen (Massenabnahme) über die Zeit ermittelt und aufgetragen.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Bindungskinetiken. Die monovalente Affinität (KD) beträgt beispielsweise für die Edukte 16 nM beziehungsweise 17 nM, während für die aviditätsverstärkte bivalente Bindung des Produkts ein KD-Wert ( $k_d/k_a$ ) von 1 nM errechnet wurde.

**Tabelle 3: Kinetikparameter der Bindung von Edukt- und Produktmolekülen an FOLR1. Assoziations- ( $k_a$ ) und Dissoziationsgeschwindigkeit ( $k_d$ ), sowie Dissoziationskonstante (KD).**

Molekül	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (nM)
<FOLR1>-Edukt A	2.1E+05	3.6E-03	17
<FOLR1>-Edukt B	2.2E+05	3.4E-03	16
<FOLR1>-Produkt	2.1E+05	1.8E-04	1

Die zentrale CD3-Bindestelle des vollständigen TriFab wurde bereits eingangs charakterisiert. Das Auftragen der beiden Eduktmoleküle auf die CD3-Chromatographiesäule bestätigte, dass die vertikale Trennung der <CD3>-Domänen (VH und VL) die Bindung an CD3 eliminiert. Beide Moleküle haben eine deutlich verringerte Retentionszeit im Vergleich zum TriFab-Produkt (Abbildung 17).



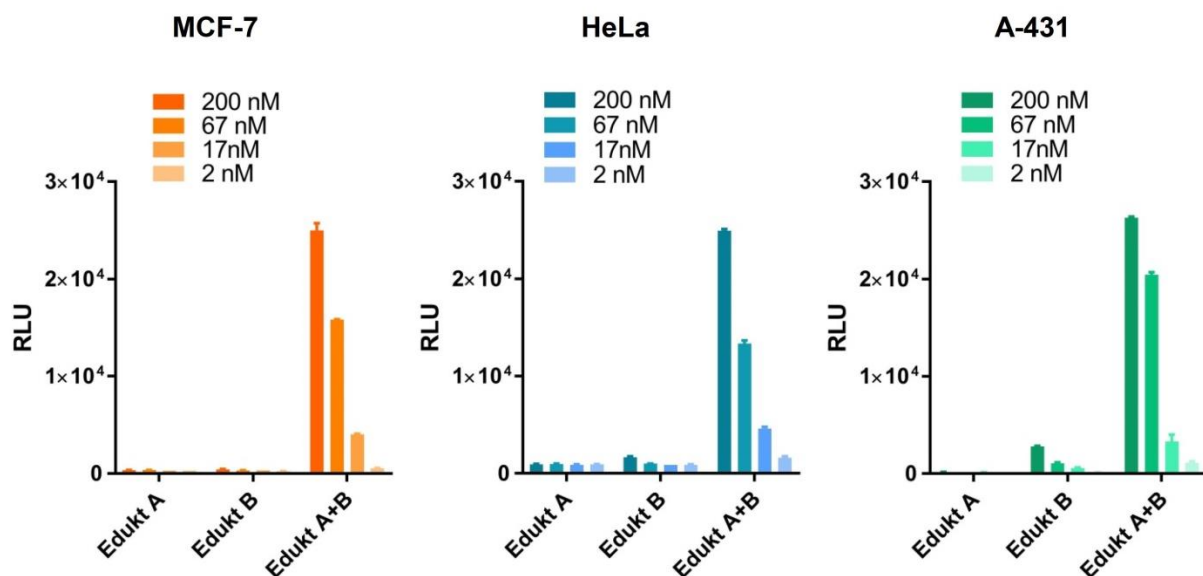
**Abbildung 17: Das Bindeverhalten der Edukte und des TriFab-Produkts an CD3.**

Edukt- und Produktmoleküle wurden auf eine mit rekombinantem CD3 beschichtete Chromatographiesäule appliziert. Die Absorption (mAU) wurde über die Zeit gemessen. Eduktmoleküle A und B (grau gestrichelt und schwarz) haben eine deutlich reduzierte Retentionszeit im Vergleich zum TriFab-Produktmolekül (rot).

### 5.2.4 Konditionale T-Zell-Aktivierung durch Kombination der Eduktmoleküle

Die Austauschfähigkeit der Eduktmoleküle und die Rekonstitution des CD3-Binders auf der Zielzelle wurden unter Verwendung eines Reporterzellassays nachgewiesen. Rekombinante T-Zellen wurden mit Tumorzellen in Anwesenheit verschiedener Antikörperverdünnungen co-kuliviert. Im Falle einer Bindung an CD3 wird über den NFAT-Signalweg die Expression des Enzyms Luciferase eingeleitet. Durch Zugabe von Luciferin kann anschließend über Auslesen der Lumineszenz die T-Zell-Aktivierung quantifiziert werden.

Die Kombinationen der beiden korrespondierenden Edukte führten jeweils zu dosisabhängigen Aktivierungen der Reporterzellen in allen Ansätzen (Abbildung 18). Die Kontrollreaktion der separat eingesetzten Edukte führte im <LeY>-Ansatz zu keiner signifikanten Aktivierung. Im Falle des <FOLR1>- und <EGFR>-Eduktes B ist eine schwache Aktivierung bei hoher Konzentration erkennbar. Die absoluten Lumineszenzwerte variierten zwischen den verschiedenen Ansätzen.

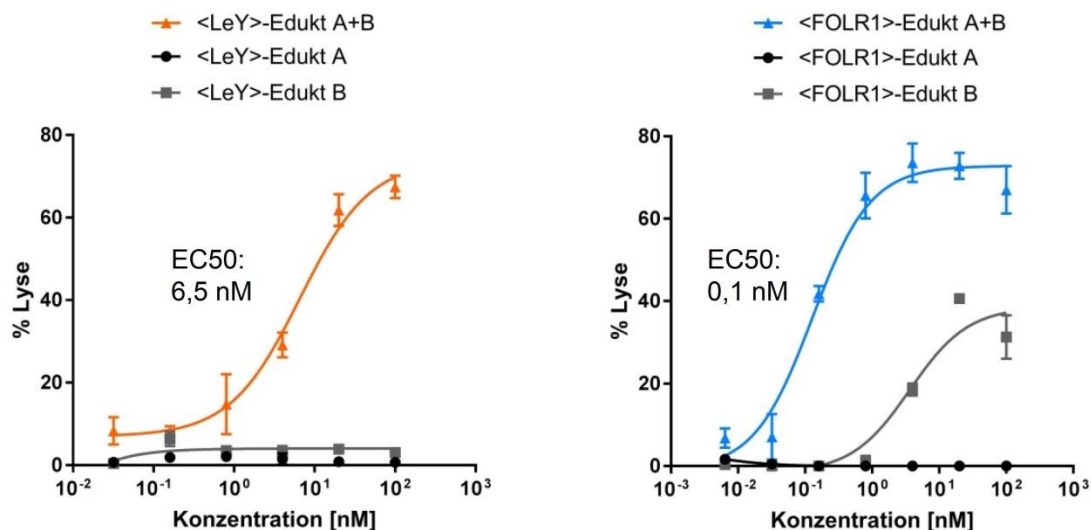


**Abbildung 18: Die simultane Applikation korrespondierender Eduktmoleküle führt zu einer dosisabhängigen Aktivierung von Reporter-T-Zellen.**

16-stündige co-Kultivierung von Jurkat-Reporterzellen mit Tumorzellen in Anwesenheit der spezifischen Eduktmoleküle A und B (<LeY> auf MCF-7, <FOLR1> auf HeLa, <EGFR> auf A-431) oder deren Kombination in vier unterschiedlichen Konzentrationen (200 nM, 67 nM, 17 nM, 2 nM). Die Aktivität der T-Zellpopulation wird als Lichtsignal (RLU = *relative light units*) gemessen.

### 5.2.5 Eliminierung von Tumorzellen in Anwesenheit primärer T-Lymphozyten.

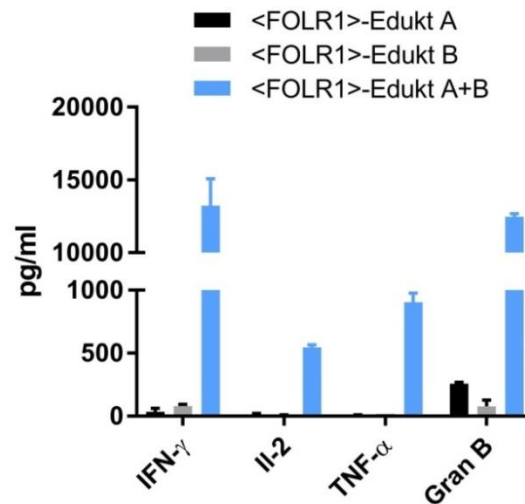
Um zu klären, ob die T-Zellaktivierung eine Eliminierung von MCF-7 oder HeLa-Zellen zur Folge hat, wurden Co-Kultivierungsversuche mit frisch isolierten humanen PBMC durchgeführt. Hierbei wurden Antikörper-Eduktpaare eingesetzt, die den gleichen TAA-Binder tragen (monospezifisch). Die Tumor- und Effektorzellen (E:T Verhältnis 10:1) wurde für 48 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. In Abbildung 19 wird ersichtlich, dass die Kombination beider Edukte in beiden Zelllinien zu einer dosisabhängigen Eliminierung der Tumorzellen führte. Das FOLR1-spezifische Eduktpaar war auf HeLa-Zellen weitaus potenter (EC<sub>50</sub> = 0,1 nM) als das LeY-bindende Paar auf MCF7-Zellen (EC<sub>50</sub> = 6,5 nM). Auffällig ist, dass das <FOLR1>-Edukt B bei hohen Konzentrationen eine Eliminierung (EC<sub>50</sub> = 4 nM) der Zielzellen auslöst.



**Abbildung 19: Die simultane Applikation korrespondierender Eduktmoleküle führt zu einer dosisabhängigen Eliminierung von Tumorzellen in Anwesenheit humaner PBMC.**

Tumorzellen (MCF-7, links; HeLa, rechts) wurden mit frisch isolierten humanen PBMC (E:T Verhältnis 10:1) in Anwesenheit der entsprechenden Edukte für 48 Stunden co-kultiviert. Die Experimente mit MCF-7 wurden mit drei gesunden Donoren je dreifach reproduziert. Die Experimente auf HeLa-Zellen wurden mit sechs Donoren insgesamt achtmal durchgeführt. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Kurven wurden durch nichtlineare Regression (log[Dosis] versus Antwort) mithilfe der Graph Pad Prism Software modelliert. Die EC<sub>50</sub> Werte des betreffenden Ansatzes sind aufgeführt [nM].

Ein Teil des Zellüberstandes wurde zur Quantifizierung der Zytokinkonzentration genutzt. Die Reaktionen mit <FOLR1>-Edukten bei der EC50 Konzentration von 0,1 nM wurden beispielhaft gewählt. Es zeigten sich erhöhte Werte für die T-Zell-Aktivierungsmarker IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Granzym B (Abbildung 20). Die beiden Eduktmoleküle hatten bei separatem Einsatz in dieser Konzentration keine signifikante Erhöhung der Werte zur Folge.



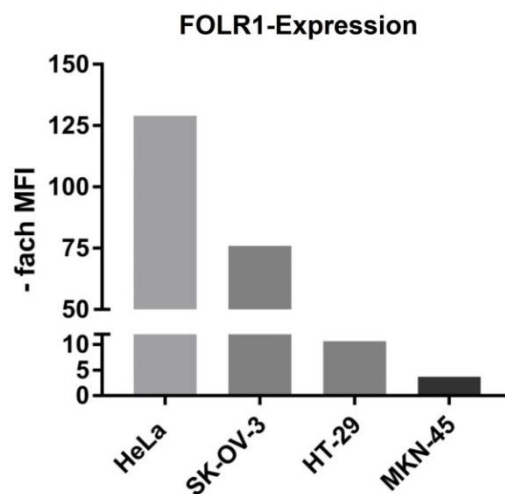
**Abbildung 20: Die simultane Applikation korrespondierender Eduktmoleküle führt zu einer Ausschüttung T-Zell-spezifischer Zytokine ins Zellkulturmedium.**

Ein Teil der Kulturüberstände des <FOLR1>-Ansatzes (Antikörperkonzentration = 0,1 nM) wurde unter Verwendung eines *Bead*-Assays durchflusszytometrisch auf die Konzentration [pg/ml] von IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und Granzym B untersucht. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Das Assay wurde zweifach mit jeweils zwei unterschiedlichen Donoren durchgeführt.

### 5.2.6 Abhängigkeit der Austauscheffizienz von der Antigendichte auf Zielzellen

Ein Bestandteil der eingangs aufgestellten Hypothese war, dass die Assemblierung der beiden Edukte zum TriFab-Produkt ein thermodynamisch begünstigter Zustand ist. Es wurde vermutet, dass die steigende Konzentration positiv mit der Reaktionswahrscheinlichkeit korreliert. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bei steigender Antigenexpression mehr Bindestellen für potentielle Austauschpartner vorliegen und eine lokale Akkumulation der Eduktmoleküle begünstigt wird.

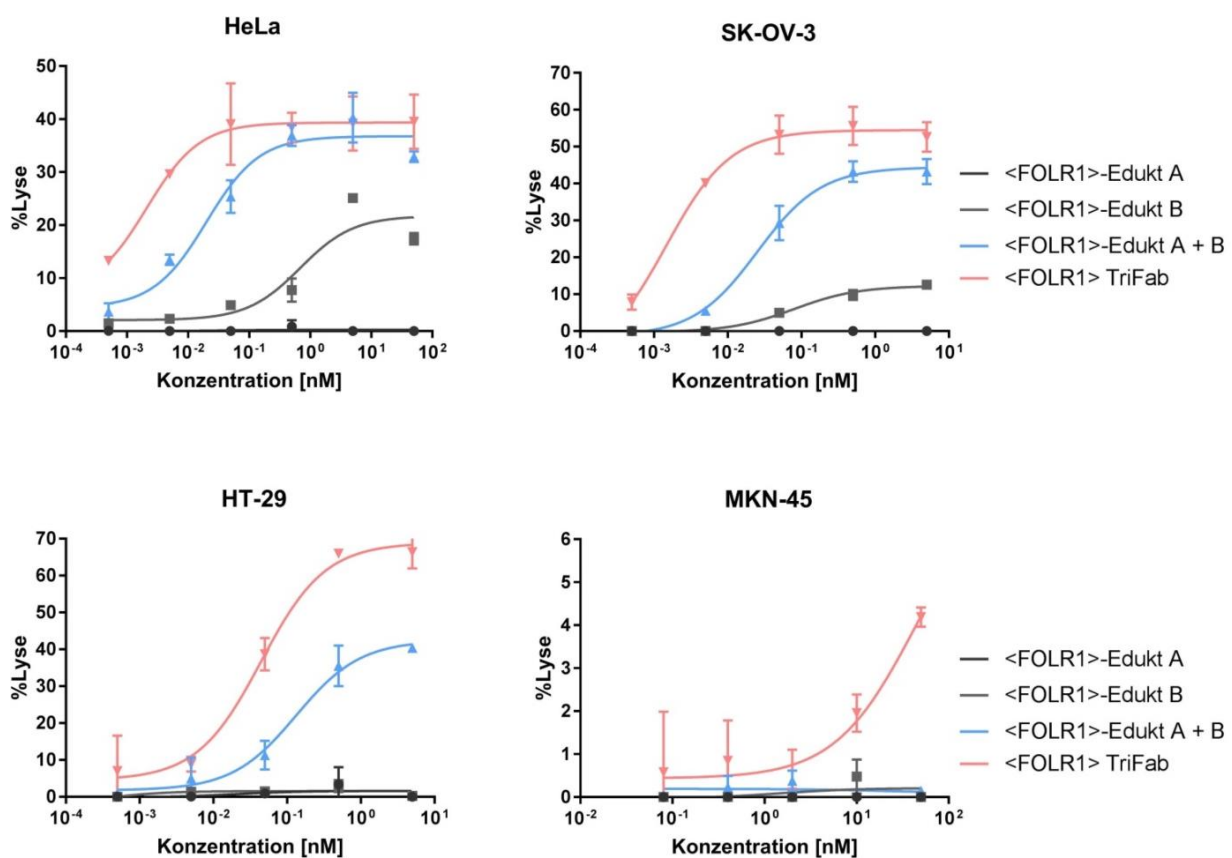
Um diesen Zusammenhang und deren Auswirkung auf die T-Zell-Aktivierung zu testen, wurden vier Zelllinien ausgewählt, die durch verschiedene Expressionsstärken des FOLR1 charakterisiert sind: HeLa (129-fache mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zur Isotypkontrolle) und SK-OV-3-Zellen (76-fache MFI) sind stark FOLR1-positiv, HT-29-Zellen exprimieren mittlere Level (11-fache MFI) und MKN-45-Zellen sind nur schwach FOLR1-positiv (4-fache MFI). Diese Quantifizierung wurde per Durchflusszytometer durchgeführt und ist in Abbildung 21 zusammengefasst.



**Abbildung 21: Analyse verschiedener Tumorzelle hinsichtlich ihrer FOLR1-Expression.**

Durchflusszytometrische Expressionsanalyse der FOLR1-exprimierenden Tumorzelllinien HeLa, SK-OV-3, HT-29 und MKN-45. Expressionsstärke dargestellt als Faktor der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zur Isotypenkontrolle.

Beide <FOLR1>-Edukte wurden separat oder in Kombination in Anwesenheit von PBMC und der entsprechenden Tumorzelle inkubiert. Als Referenzwert für maximale Rekombination wurde jeweils das assemblierte <FOLR1>-TriFab-Produkt parallel eingesetzt. Auf HeLa unterschied sich die maximale Lyse der Zielzellen durch die Edukt-Kombination nicht von der des Produktes. Mit abnehmender Rezeptorzellidichte nahm auch die maximale Lyse im Vergleich zum Produkt ab, wie im Falle der SK-OV-3 und HT-29-Zellen ersichtlich wird. Auf MKN-45-Zellen löste der <FOLR1>-TriFab bei hohen Konzentrationen eine Lyse von etwa 4% der Zielzellen aus, wohingegen die Kombination der Edukte keinerlei Zellyse zur Folge hatte (Abbildung 22). Die residuale CD3-Bindung von <FOLR1>-Edukt B nahm ebenfalls mit der FOLR1-Expression ab und ist auf HT-29-Zellen nicht mehr zu detektieren.



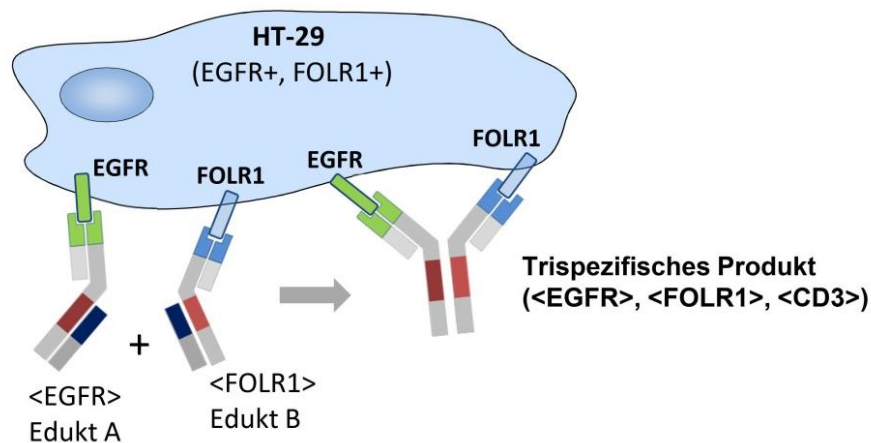
**Abbildung 22: Abhängigkeit der Assemblierungseffizienz von der FOLR1-Expression.**

Tumorzellen wurden mit humanen PBMC (E:T Verhältnis 10:1) in Anwesenheit der entsprechenden Edukte (grau, Kombination blau) oder der Positivkontrolle (rot) für 48 Stunden co-kultiviert. Die Experimente wurden dreifach reproduziert und mit je zwei gesunden Donoren durchgeführt. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Kurven wurden durch nichtlineare Regression (log[Dosis] vs. Antwort) mithilfe der Graph Pad Prism Software modelliert. (Edukte = grau, Kombination = blau, Produkt = rot).

### 5.2.7 Erweiterung des Konzepts zur konditionalen Generierung trispezifischer TCB

Das vorhergehende Experiment mit monospezifischer Bindung der Zielzellen zeigte bereits die Selektivitätssteigerung der Technologie im Vergleich zum aktiven Produktmolekül. Zellen mit niedriger Antigenexpression, wie es bei MKN-45 für FOLR1 der Fall ist, bleiben von einer Eliminierung durch die T-Zelle verschont.

Um eine weitere Spezifitätsstufe zu ergänzen, wurde eine Kombination aus Edukten eingesetzt, die gegen zwei verschiedene TAA gerichtet ist (bispezifisches *targeting*). HT-29-Zellen exprimieren sowohl FOLR1, als auch EGFR. Bei erfolgreicher Rekombination des <EGFR>- und <FOLR1>-Edukte entsteht ein trispezifischer TriFab-TCB (Abbildung 23).



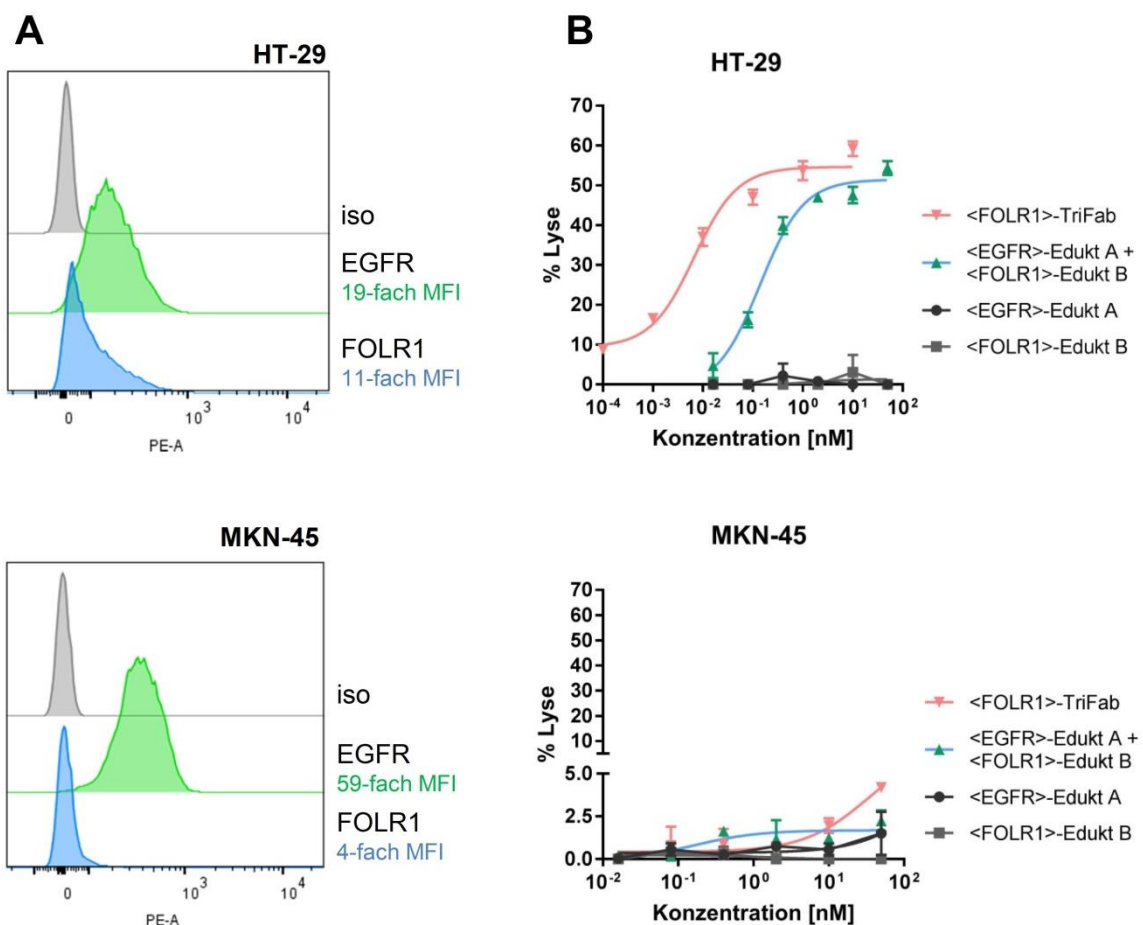
#### Abbildung 23: Eduktmoleküle mit unterschiedlichen TAA-Spezifitäten generieren trispezifische Produktmoleküle auf der Zielzelle.

Konzept der Kombination zweier Eduktmoleküle mit unterschiedlicher TAA-Spezifität. Edukt A ist gegen EGFR, Edukt B gegen FOLR1 gerichtet. HT-29-Zellen exprimieren beide Antigene. Es entsteht ein trispezifisches Produktmolekül, welches an EGFR, FOLR1 und CD3 bindet.

MKN-45-Zellen hingegen exprimieren moderate Mengen EGFR und nur sehr geringe Mengen FOLR1. Die Expressionsstärke der beiden Antigene ist in Abbildung 24A zusammengefasst. Folglich sollte der FOLR1-bindende Edukt-Teil auf den MKN-45-Zellen unterrepräsentiert sein und nicht zur Assemblierung des CD3-Binders beitragen können.



Abbildung 24B bestätigt diese Annahme. Auf HT-29 war eine dosisabhängige Eliminierung der Zellen durch die Antikörper-Kombination (grün-blaue Kurve) in Anwesenheit der huPBMC zu beobachten. Der separate Einsatz der Edukte hatte keine Lyse zur Folge. In rot ist der <FOLR1>-TriFab als Kontrollmolekül gezeigt. Im Gegensatz zum monospezifischen *targeting* (Abbildung 22) wurde im bispezifischen Ansatz die maximale Eliminierung des TriFab erreicht. Die gleichzeitige Applikation der Eduktmoleküle hatte hingegen keinen Einfluss auf die Viabilität der MKN-45-Zellen. Lediglich die TriFab-Kontrolle zeigt einen signifikanten Anstieg bei höheren Konzentrationen.



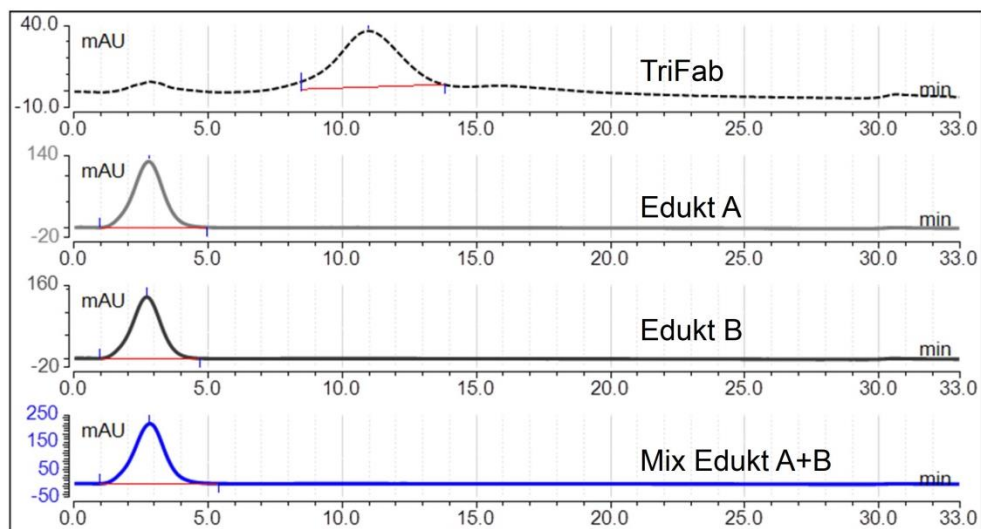
**Abbildung 24: Eine Assemblierung intakter TriFab erfordert die Expression beider Antigene beim Einsatz von Eduktmolekülen mit unterschiedlichen TAA-Spezifitäten.**

(A) Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von FOLR1 und EGFR auf HT-29 und MKN-45-Zellen. Dargestellt ist die Expressionsstärke als Faktor der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) verglichen zur Isotypenkontrolle. B) Tumorzellen (HT-29, MKN-45) wurden mit humanen PBMC (E:T Verhältnis 10:1) in Anwesenheit der entsprechenden Edukte (grau), in Kombination (blau) oder der Positivkontrolle (rot) für 48 Stunden co-kultiviert. Die Experimente wurden zweifach mit je zwei gesunden Donoren reproduziert. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Kurven wurden durch nichtlineare Regression (log[Dosis] versus. Antwort) mithilfe der Graph Pad Prism Software modelliert.

### 5.2.8 Die unspezifische Assemblierung zweier Eduktmoleküle in Lösung

Die bisher dargestellten Daten lassen die Vermutung zu, dass die Reaktion der beiden Edukte von der Konzentration, also der räumlichen Nähe zweier Reaktionspartner, abhängt. Insofern ist zu erwarten, dass der Austausch nicht ausschließlich auf der Zelloberfläche vonstattengeht, sondern möglicherweise (auch) schon in Lösung vollzogen werden kann. Dies hätte zur Folge, dass die Selektivitätssteigerung gegenüber dem bereits assemblierten Produkt hinfällig wäre. Um diese Fragestellung zu adressieren wurden verschiedene Ansätze verfolgt.

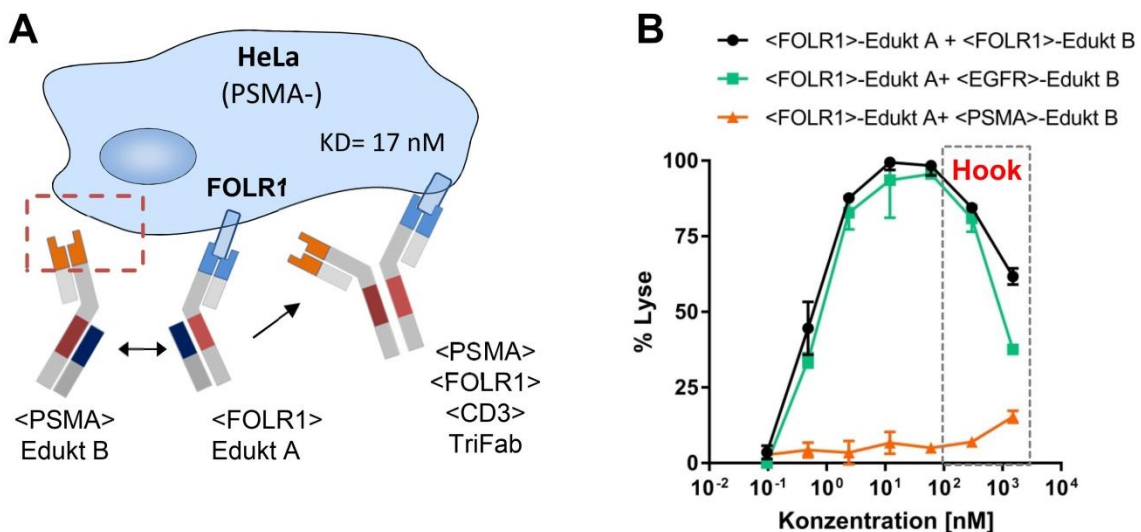
Im ersten Ansatz wurden Eduktmoleküle bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Probenpuffer gemischt und für einen Zeitraum von zwei Tagen (entspricht der Dauer der PBMC-Experimente) bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend auf die eingangs beschriebene CD3-Affinitätschromatographiesäule gegeben und deren Retentionszeit bestimmt. Die Positivkontrolle (TriFab) zeigte eine klare Phasenverschiebung während sowohl für die Eingangsmoleküle, als auch die Mischung keinerlei Interaktion mit der Säulenmatrix detektiert werden konnte (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Eine biochemische Analysemethode zur Ermittlung der unspezifischen Assemblierung zweier Eduktmoleküle in Lösung.**

Mithilfe einer CD3-spezifischen Affinitätschromatographie wurde die Bindung der Positivkontrolle (TriFab), der Eduktmoleküle (A und B) und einer Mischung der Edukte nach 48-stündiger Inkubation bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (in His-NaCl Puffer, pH 6) an das Säulenmaterial untersucht.

In einem zellbasierten Experiment wurden zwei Eduktmoleküle mit unterschiedlichen TAA-Bindern eingesetzt (<FOLR1>, <PSMA>). Eines der Moleküle kann über den FOLR1-Binder an die Zielzelle (HeLa) andocken, das zweite Molekül verbleibt in Lösung, da HeLa-Zellen kein PSMA Antigen exprimieren. Wäre ein Austausch in Lösung möglich, würde ein Produktmolekül mit aktivem CD3-Binder und einer monovalenten Affinität von 17 nM (Abschnitt 5.2.3, Abbildung 16) entstehen (Abbildung 26). Die Co-Kultivierung mit huPBMC zeigte keine signifikante Eliminierung der Zielzelle bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Eine Erhöhung der Konzentration auf 1,5  $\mu\text{M}$  führte zu einer leichten Aktivität. Eine weitere Steigerung der Konzentration war aus technischen Gründen nicht möglich, da eine erhöhte Salzkonzentration (aus Probenpuffer) im Medium die Viabilität der huPBMC beeinträchtigt. Zudem war das Signal der beiden Positivkontrollen bereits durch den „Hook-Effekt“ (gestrichelte Linie) beeinträchtigt. Befinden sich zu viele Eduktmoleküle im Überstand, konkurrieren die Antikörper um die Bindestellen. Diese Konkurrenz äußert sich in einem Abfall der maximalen Lyse (Hoofnagle und Wener 2009).



**Abbildung 26: Ermittlung der unspezifischen Assemblierung zweier Eduktmoleküle in Lösung durch ein zelluläres Assay.**

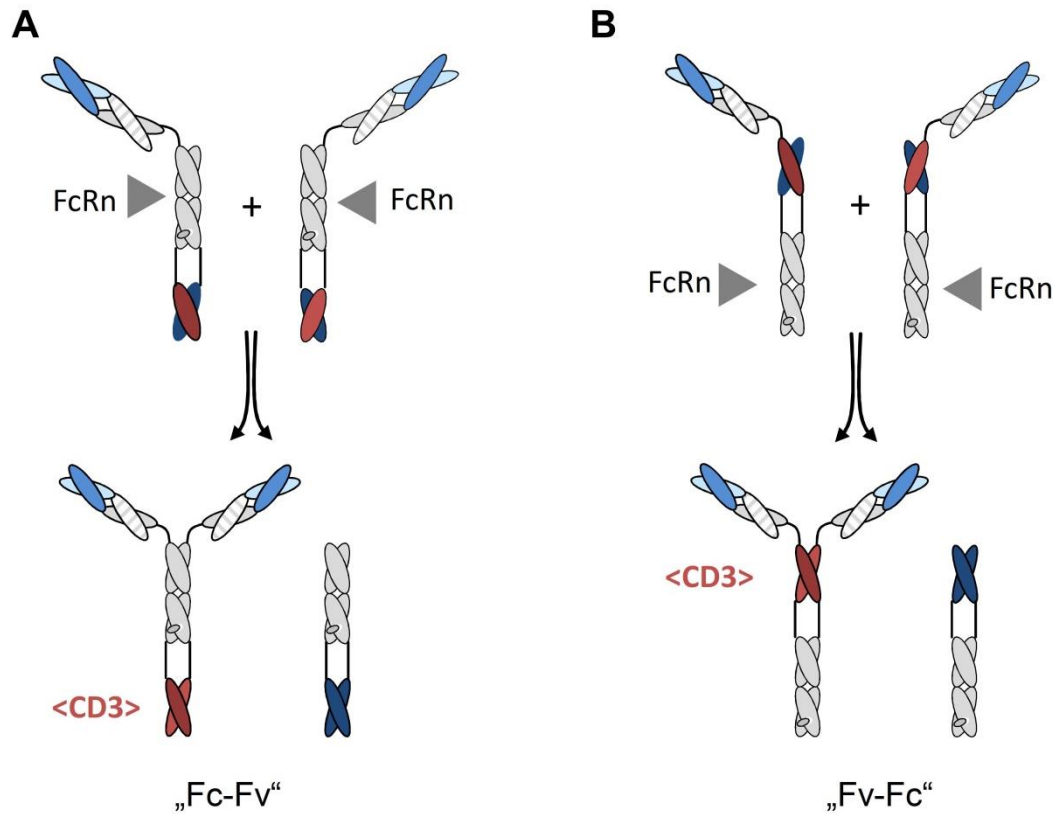
A) HeLa-Zellen (FOLR1+, PSMA-) wurden mit humanen PBMC in Anwesenheit von <FOLR1>-Edukt A und <PSMA>-Edukt B inkubiert. Funktionale Produktmoleküle entstehen nur bei spontanem Austausch in Lösung, da <PSMA>-Edukte nicht auf PSMA-negativen Zellen binden können. B) HeLa-Zellen (FOLR1+, PSMA-) wurden mit humanen PBMC (E:T Verhältnis 10:1) in Anwesenheit von <FOLR1>-Edukt A und <PSMA>-Edukt B (orange) oder den Kontrollen (schwarz: <FOLR1>+<FOLR1>, grün: <FOLR1>+<EGFR>) für 48 Stunden co-kultiviert. Die Experimente wurden dreifach mit insgesamt drei gesunden Donoren reproduziert. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Kurven wurden durch nichtlineare Regression (log[Dosis] versus Antwort) mithilfe der Graph Pad Prism Software modelliert.

### 5.2.9 Modulierung der Serumhalbwertszeit durch weitere Formatoptimierungen

Neben der Größe des Moleküls beeinflusst vor allem die Fähigkeit eines Antikörpers an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) zu binden dessen Serumhalbwertszeit. Auf eukaryotischen Zellen bewirkt der FcRn nach Internalisierung eines Antikörpers dessen Recycling und Sekretion in den extrazellulären Raum und verhindert somit den lysosomalen Abbau des Moleküls. Die Interaktion zwischen FcRn und Antikörper erfolgt über polare Seitenketten beim Übergang von der CH2- zu der CH3-Domäne im Fc-Teil (Canfield und Morrison 1991). Aufgrund der Substitution der CH2-Domänen durch die variablen Regionen des CD3-Binders enthält das klassische TriFab-Format keinen Fc-Teil. Resultierend haben TriFab-Moleküle eine kurze Serumhalbwertszeit und werden vergleichsweise schnell aus der Zirkulation höherer Organismen ausgeschieden.

Abbildung 27 zeigt zwei weitere Formate zur Anwendung der konditionalen Assemblierung. Beide Formate tragen einen vollständigen Fc-Teil, *Knob-into-Hole*-Mutationen und die Störmutation in der CH3-Domäne. Im linken Beispiel wurden die variablen Domänen des CD3- bzw. Nada-Binders C-terminal an den Fc-Teil fusioniert (Abbildung 27A). Im zweiten Beispiel erfolgte die Fusion N-terminal des Fc-Teils (Abbildung 27B).

Beide Formate wurden mit LeY-Spezifität hergestellt. Die Moleküle konnten mit Expressionsausbeuten von mehr als 15 mg pro Liter Expressionsvolumen produziert und wie eingangs beschrieben aufgereinigt werden. Die bioanalytischen Methoden wurden analog zum vorherigen Abschnitt durchgeführt und bestätigten die Zusammensetzung und Integrität der Moleküle.



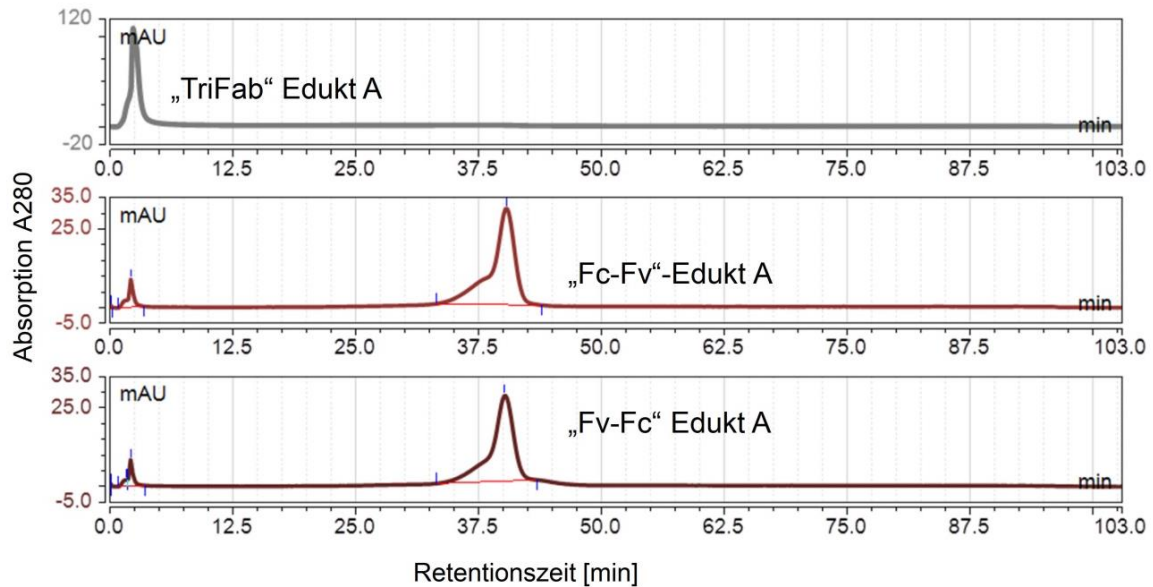
**Abbildung 27: Modifizierung der FcRn-Interaktion durch Formatoptimierungen zum Zwecke einer verlängerten Serumhalbwertszeit.**

Die Einführung eines intakten Fc-Teils in den TriFab-Aufbau lieferte zwei neue Formate:

A) Im „Fc-Fv“-Format (links) wurden die variablen Domänen des CD3-Binders C-terminal an den Fc-Teil fusioniert. B) Im „Fv-Fc“ Format (rechts) liegt der CD3-Binder zwischen den N-terminalen TAA-Bindern und dem Fc-Teil.

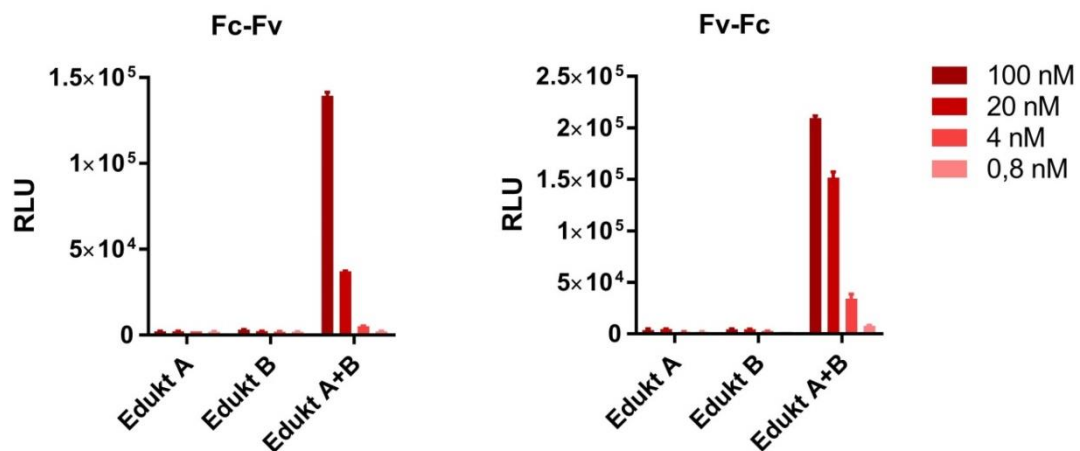
Um die Bindung dieser Moleküle an den Fc-Rezeptor zu bestimmen, wurde eine chromatographische Analyseverfahren gewählt. Die Antikörper wurden auf eine mit rekombinanten Fc-Rezeptor gekoppelten Säule appliziert. Je länger die Retentionszeit, desto stärker ist die Interaktion an die FcRn-Matrix. Beide Moleküle zeigten eine deutliche Verlängerung der Retentionszeit im Vergleich zu der Fc-freien TriFab Kontrolle (Abbildung 28).

Da das *interface* zwischen HC und *dummy* in diesen Formaten aus insgesamt drei Domänen besteht, wurden die Moleküle auf deren Austauschfähigkeit zur Bildung des aktiven Produktes geprüft. In einem Reporterzellassay zeigte sich eine klare dosisabhängige Aktivierung der T-Zellen bei simultaner Applikation jeweils beider Edukte (Abbildung 29).



**Abbildung 28: Messung der Bindung Fc-kompetenter Eduktmoleküle an FcRn.**

Die Auftragung der Eduktmoleküle A (beispielhaft) auf eine mit humanem FcRn-gekoppelten Affinitätschromatographiesäule resultierte in einer deutlich verlängerten Retentionszeit gegenüber der Fc-freien TriFab-Kontrolle.



**Abbildung 29: Die Kombination zweier Fc-kompetenter Eduktmoleküle löst in Anwesenheit von Tumorzellen eine Aktivierung von T-Reporterzellen aus.**

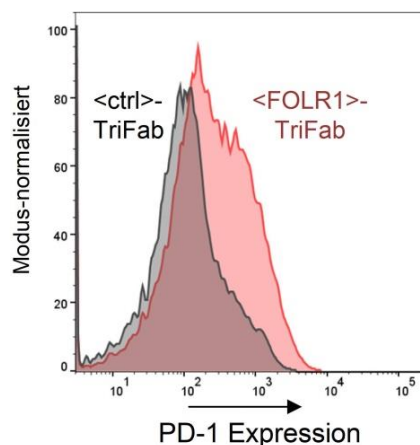
Die 16-stündige co-Kultivierung von Jurkat-Reporterzellen mit MCF-7 in Anwesenheit der <LeY>-Eduktmoleküle A und B oder der Kombination beider in vier unterschiedlichen Konzentrationen (100 nM; 20 nM; 4 nM; 0,8 nM). Die Aktivität der T-Zellpopulation wird als Lichtsignal (RLU = *relative light units*) gemessen.

### 5.2.10 Simultane Immun-Checkpoint-Blockade durch eine funktionale *Dummy*-Kette

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass mit dem Einsatz T-Zell rekrutierender Antikörper, eine Hochregulierung der anti-inflammatorischen *programmed cell death protein 1* (PD-1) / *programmed death ligand 1* (PD-L1)-Achse einhergeht. (Krupka et al. 2016, Wallberg et al. 2017).

Die Expression von PD-1 korreliert mit dem Aktivierungsstatus der T-Zelle. Als natürlicher Regulationsmechanismus des Immunsystems bewirkt dies die Homöostase bei inflammatorischen Ereignissen im Organismus. Die Ausprägung dieser Achse hat die Inhibition der T-Zell-Aktivierung zur Folge. Diese inhibitorische Achse haben einige maligne Indikationen als Immunausweichmechanismus genutzt, indem die Expression des Bindepartners PD-L1 hochreguliert wurde. Dieser Vorgang wird durch äußere Einflüsse gesteuert. Die Aktivierung der T-Zelle durch den CD3-Binder führt zu der Sekretion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  ins umgebene Milieu (Mimura et al. 2018). Krupka *et al.* zeigen in ihrer Arbeit, dass die Expression von PD-L1 zytokinreguliert ist und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  induziert werden kann (Krupka et al. 2016). Wie zuvor beschrieben, führt die Applikation eines TriFab zu einer Sekretion von Zytokinen ins Medium.

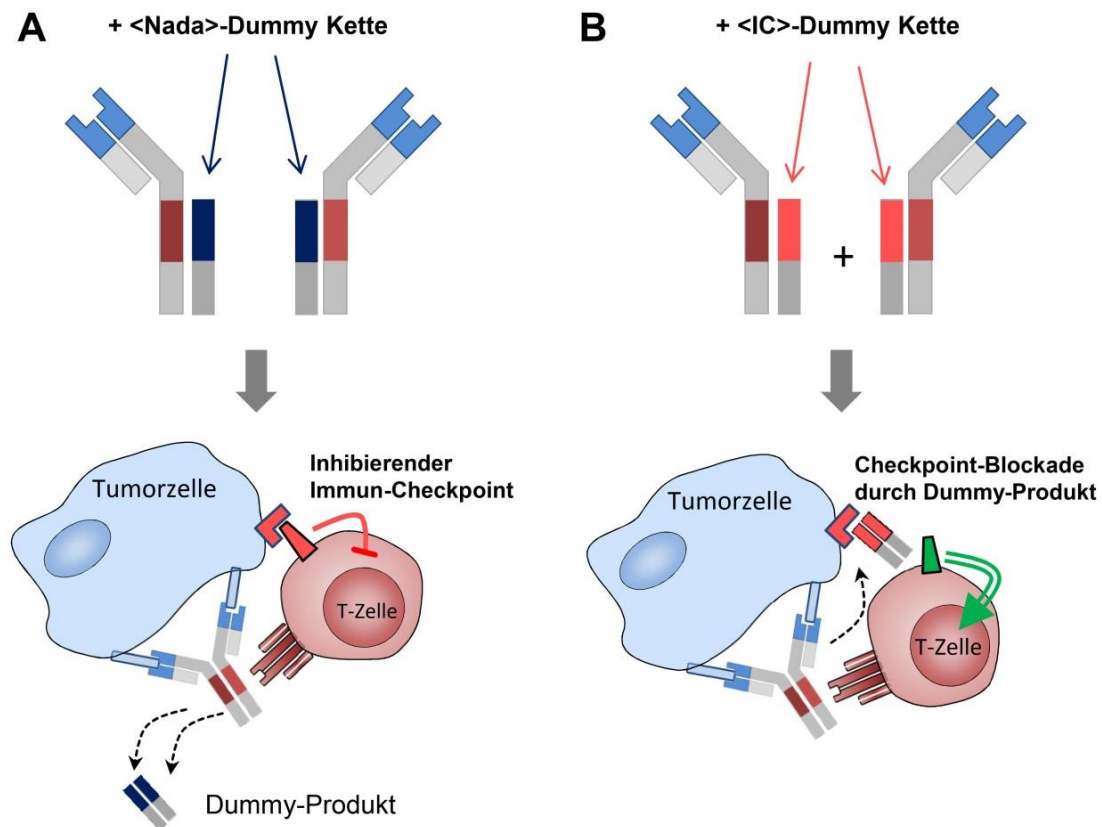
Außerdem wird die PD-1 Expression auf T-Zellen durch den Einsatz des TriFab-TCB in Anwesenheit der Tumorzelle hochreguliert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Hochregulierung des Immun-Checkpoints PD-1 als Folge der gerichteten Aktivierung primärer T-Lymphozyten mit einem TriFab-TCB.**

Eine durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass primäre T-Zellen PD-1 unter Anwesenheit des aktivierenden <FOLR1>-TriFab (Konzentration: 1 nM) und HeLa-Zellen hochregulieren.

Um einer Inhibition der T-Zellaktivierung durch eine Immun-Checkpoint-Interaktion entgegenzuwirken wurde das Konzept um eine Komponente erweitert. Die *Dummy*-Kette besitzt in den bisher beschriebenen Molekülen keine Bindefunktion. Ersetzt man den Nadaceptin-Teil durch variable Regionen eines anti-Immun-Checkpoint-Binders (<IC>, Abbildung 31), bringt die Austauschreaktion neben der <CD3>-Assemblierung einen weiteren Binder hervor: Das *Dummy*-Produkt hat die Größe eines Fabs (50 kDa) und kann beispielsweise einen Immun-Checkpoint blockieren (Abbildung 31).



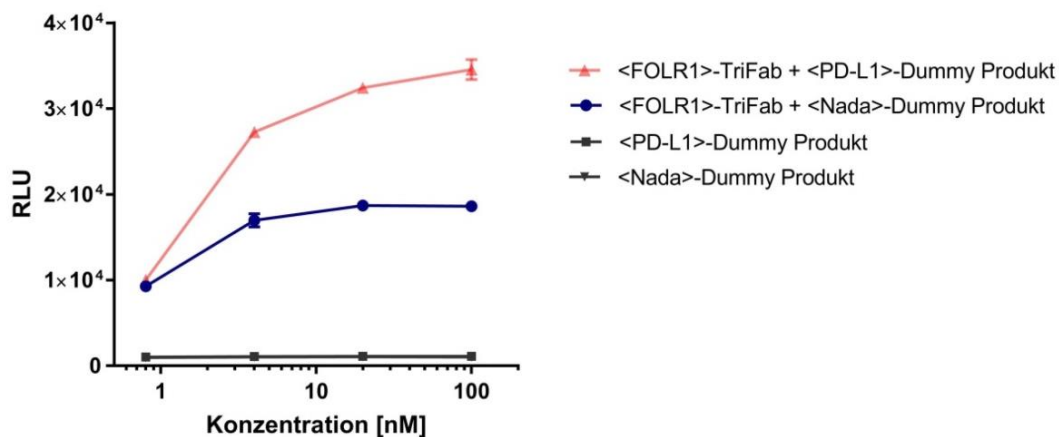
**Abbildung 31: Ein funktionales *Dummy*-Produkt zur simultanen Blockade eines inhibierenden Immun-Checkpoints.**

Die bisher eingesetzte Molekülklasse beinhaltete *Dummy*-Moleküle (dunkelblau) ohne funktionale variable Domänen (<Nada>). Diese Domänen wurden nun durch bindefähige anti-Immun-Checkpoint-Domänen (<IC>, hellrot) substituiert. Konzeptionell kann das entstehende *Dummy*-Produkt einen Immun-Checkpoint binden (rechts), anstatt ohne Bindefähigkeit aus der Immunsynapse zu diffundieren (links). Ein inhibierender Immun-Checkpoint wird so blockiert und die T-Zellantwort verstärkt (grüner Pfeil).



Nachdem die Moleküle mit den etablierten Methoden produziert und analysiert wurden, erfolgte die Testung ihrer Funktionalität. In einem initialen Experiment wurden zunächst die potentiellen Produkte der Austauschreaktion separat getestet. Die Funktionalität des TriFab-TCB wurde in Anwesenheit des <PD-L1>-*Dummy*-Produkts mit einem Ansatz verglichen, in dem kein *Dummy*-Molekül oder das <Nada>-*Dummy*-Produkt eingesetzt wurde. Als Ausleseparameter diente das PD-1/PD-L1 *Blockade Assay*. Darin wird die Expression des NFAT-geschalteten Luciferase-Gens durch Ausbildung der PD-1-/PD-L1 Achse inhibiert. Durch Blockade letzterer wird die Luciferase stärker exprimiert, was einen stärkeren Umsatz des zugegebenen Reagenz Luziferin und eine stärkere Lumineszenz (Ausleseparameter) zur Folge hat.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Co-Kultivierung. Der alleinige Einsatz der *Dummy*-Produkte (<Nada> und <PD-L1>) lieferte keinerlei Aktivierungssignal. Die Kombination aus TriFab-TCB und <Nada>-*Dummy* führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Reporterzellen. In Kombination mit dem <PD-L1>-*Dummy* ist eine signifikante Erhöhung der T-Zellaktivität messbar. Dies lässt auf die antagonistische Bindung des *Dummy*-Produkts und eine Blockade des Immun-Checkpoints schließen.



**Abbildung 32: Verstärkung der T-Zellaktivierung durch simultane Blockade der inhibierenden PD-1/PD-L1-Achse mit einem PD-L1-spezifischen *Dummy*-Dimer.**

Der simultane Einsatz des <FOLR1>-TriFab und eines <PD-L1> *Dummy*-Produkts (rot) hat einen aktivitätssteigernden Effekt im Vergleich zu der Kontrollreaktion mit <Nada>-*Dummy* (blau) in PD-1-exprimierenden Reporterzellen zur Folge. Die Experimente wurden dreifach reproduziert. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Aktivität der T Zellpopulation wird als Lichtsignal (RLU = *relative light units*) gemessen.

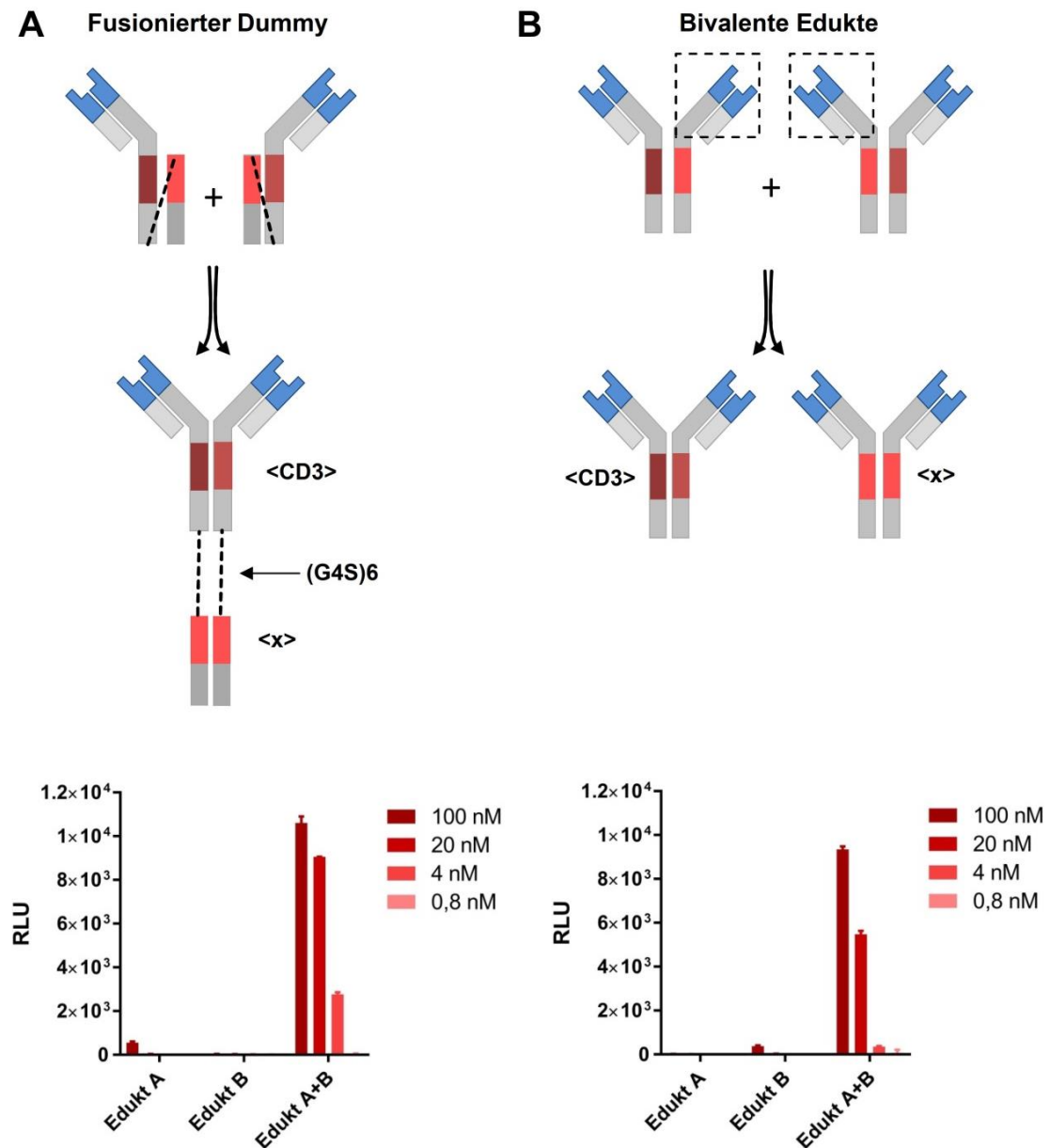
### 5.2.11 Alternative Formate zur Retention des *Dummy*-Produkts auf der Zielzelle.

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass als Nebenprodukt ein funktionales *Dummy*-Dimer verwendet werden kann, welches die Form eines Fab-Moleküls hat. Im Gegensatz zu dem <CD3>-Produkt enthält das *Dummy*-Dimer-Produkt N-terminal keine zusätzlichen Antigenbindestellen, die eine aviditätsgetriebene Retention in der Immunsynapse sicherstellen. Das kleine Fab-ähnliche Molekül kann daher leichter wegdissoziieren. Dies hätte zur Folge, dass die zusätzliche Immun-Checkpoint-Blockade nur ineffizient vonstattengehen kann.

Um dieser Dissoziation entgegenzuwirken, wurden zwei weitere Formate entwickelt, die in Abbildung 33 gezeigt sind. Im linken Beispiel ist die *Dummy*-Kette durch einen Glycin-Serin Linker (6x) C-terminal an die schwere Kette fusioniert. Bei erfolgreichem Austausch mit dem Schwestermolekül wird der *Dummy*-Dimer-Teil C-terminal am <CD3>-Produkt fixiert.

Im rechten Beispiel wurde die *Dummy*-Kette N-terminal durch einen zusätzlichen TAA Binder ergänzt. Das Edukt-Molekül kann nun bivalent an der Zelloberfläche binden und assembliert zu zwei TriFab-förmigen Produktmolekülen. Das *Dummy*-Produkt kann so ebenfalls am Tumorantigen binden, was die Dissoziation aus der Immunsynapse minimieren soll.

Beide Molekülformate wurden im T-Zell-Aktivierungsassay auf deren Fähigkeit den Austausch mit dem zweiten Eduktpartner zu vollziehen, getestet. Dort war eine dosisabhängige Aktivierung der Reporterzelle nachweisbar (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Weitere Formatoptimierung zur Retention des *Dummy*-Produktes in der Immunsynapse.**

A) In dem gezeigten Format wurde der *Dummy*-Teil mit einem (G4S)<sub>6</sub>-Linker (gestrichelte Linie) C-terminal an den zentralen TriFab-Stamm fusioniert. Es entsteht ein tetravalentes Produkt. B) Die *Dummy*-Teile der beiden Edukte wurden durch eine <TAA>-Bindedomäne (blau) ergänzt. Beide Edukte sind somit bivalent. Neben dem <CD3>-TriFab wird auch das <x> *Dummy*-Dimer Produkt auf der Tumoroberfläche gehalten und die Dissoziation (siehe Abbildung 18B) verringert. Beide Formate lösen in Kombination eine dosisabhängige Aktivierung in Jurkat Reporterzellen aus. Eine 16-stündige co-Kultivierung von Jurkat-Reporterzellen mit MCF-7 Zellen in Anwesenheit der <LeY> Eduktmoleküle A und B oder der Kombination beider in vier unterschiedlichen Konzentrationen (100 nM; 20 nM; 4 nM; 0,8 nM) ist abgebildet. Die Darstellung zeigt Mittelwert und SD aus technischen Triplikaten eines repräsentativen Ansatzes. Die Aktivität der rekombinanten T-Zellen wird als Lichtsignal (RLU = *relative light units*) gemessen.

## 6. Diskussion

### 6.1 TriFab: Ein neuartiges TCB-Format mit besonderer Geometrie

#### 6.1.1 Relevanz eines neuen Formates für immuntherapeutische Ansätze

In vielen Studien klinischer und präklinischer Art wurde festgestellt, dass das Format eines TCB wesentlichen Einfluss auf dessen Potenz und die Dimension des therapeutischen Fensters hat. Eine generalisierbare Definition des perfekten Aufbaus ist allerdings nicht möglich, da die Anforderungen an das Format von der Antigenbeschaffenheit abhängt und auch von Epitop zu Epitop abweichen kann. Nach Identifikation eines geeigneten Antigens folgt daher meist die experimentell getriebene Suche nach dem *Best-in-Class*-Antikörper.

In den letzten Jahren nahmen sich Wissenschaftler vermehrt dieser Herausforderung an und haben Hochdurchsatzverfahren zur Produktion bispezifischer Antikörper (Spiess et al. 2013) und *in vitro Screening*-Methoden zur Vorhersage der Effizienz und Sicherheit von Immuntherapeutika entwickelt (Harper et al. 2018, Sugiyama et al. 2017). Diese und weitere Technologien ebnen den Weg in Zukunft schnellere und breiter angelegte Verfahren zur Formatfindung anzuwenden.

Das in diesem Projekt erstellte und bereits publizierte neuartige TCB-Molekül erweitert die Formatlandschaft und steht für die künftige Suche nach dem geeigneten molekularen Aufbau eines therapeutischen Antikörpers als weitere Option zur Verfügung (Dickopf et al. 2019). Der TriFab-TCB stellt aufgrund seiner zentralen CD3-Binderegion und der flexiblen Domänenverknüpfung hinsichtlich der Geometrie eine neue Molekülklasse dar (Brinkmann und Kontermann 2017).

#### 6.1.2 Biochemische Eigenschaften des TriFab-TCB

Aus den Elektronenmikroskopieaufnahmen geht hervor, dass der TriFab der Größe und Form eines natürlichen IgG ähnelt. Das Aufheben der kovalenten Bindungen in der *Hinge*-Region des TriFab ließ die Vermutung zu, dass die Integrität der Molekülstruktur beeinträchtigt wird (Brinkmann und Kontermann 2017).

Für klinische Anwendungen ist eine möglichst hohe thermische Stabilität des Antikörpers wünschenswert, da diese negativ mit der Aggregationstendenz des Proteins korreliert (Igawa et al. 2010). Die mittlere Schmelztemperatur der TriFab-TCB beträgt  $74 \pm 1$  °C. Zum Vergleich liegt die Schmelztemperatur des ersten zugelassenen, bispezifischen und disulfidverbrückten Antikörpers Catumaxomab bei etwa 65 °C (Chelius et al. 2010). Zudem unterstreicht ein gleichbleibender Monomeranteil von mehr als 95 % nach mehrwöchiger Lagerung bei 4°C

die intramolekulare Stabilität des TriFab-TCB. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Modifikationen vorgenommen, die auf die Erhöhung der Schmelztemperatur und Stabilität abzielen. Sollte es dennoch zu unerwarteter Dissoziation der schweren Ketten *in vivo* kommen, kann durch das Einfügen stabilisierender Disulfidbrücken im Kontaktbereich der <CD3>-Domänen (VH44C-VL100C) oder in den CH3-Domänen (*knob* S354C, *hole* Y349C) eine Stabilisierung des Konstrukts erfolgen (Mayer et al. 2015).

Die Substitution der physiologischen IgG-*Hinge*-Region durch Glycin-Serin Einheiten hat eine erhöhte Rotationsbewegung und Flexibilität der beiden <TAA>-Binder zur Folge, was anhand der TEM-Aufnahmen ersichtlich ist. De Michele und Kollegen konnten zeigen, dass die Flexibilität des IgG die bivalente Bindung eines Antikörpers an die Zelloberfläche begünstigt (De Michele et al. 2016). Somit hat die Notwendigkeit einer guten Zugänglichkeit der CD3-Bindestelle auch Vorteile für die Ausprägung der simultanen Bindung zweier TAA auf der Zielzelle (Stingaciu et al. 2016).

Die Ausbeuten nach transienter Transfektion in eukaryotischen Expressionssystemen lassen mit mehr als 20 mg pro Liter Expressionsvolumen eine ressourcensparende Herstellung des Formates zu und eignen sich daher zur *Small-Scale*-Produktion, die im Zuge der Entwicklung automatisierter Hochdurchsatzcharakterisierungen an Bedeutung gewinnt. Im Vergleich dazu sind Fc-freie Konstrukte auf *scFv*-Basis, wie beispielsweise Blinatumomab, häufig durch sehr niedrige Expressionsmengen gekennzeichnet. Weiterhin sind bakterielle Systeme aufgrund der Abwesenheit von Co-Faktoren, Chaperonen und posttranslationaler Modifikationen anfällig für unvollständige Faltung und mangelhafte Protein-Integrität des Antikörper-Derivates (Wang et al. 2013).

Ein weiterer Vorteil des TriFab-Formates ist, dass die Heterodimerisierung der schweren Ketten neben den *Knob-into-Hole*-Mutationen in der CH3-Region zusätzlich durch die VH/VL Interaktion des CD3-Binders getrieben wird. Für die Assemblierung unerwünschter *Hole-Hole*-Dimere würde beispielsweise eine gleichzeitige VL/VL Paarung des CD3-Binders notwendig sein, die aus thermodynamischer Sicht wesentlich ungünstiger ist (Igawa et al. 2010). Die Analytik der TriFab-Moleküle bestätigte Ausbeuten gewünschter Heterodimere von mehr als 99 %. Eine einfache Interaktion durch *Knob-into-Hole*-Mutation hat meist eine größere Fraktion an Homodimeren zur Folge (Zhang et al. 2017). Diese forcierte Heterodimerisierung begünstigt zudem die Erweiterung des TriFab in ein trispezifisches Molekül mit zwei verschiedenen <TAA>. Die korrekte Assemblierung der leichten Ketten kann durch die etablierte CrossMab-Technologie bewerkstelligt werden (Schaefer et al. 2011).

Beim Design des TriFab-TCB wurden einige der eingangs beschriebenen Parameter, die die Effizienz und Sicherheit eines TCB beeinflussen, berücksichtigt.

Der Abstand zwischen den N-terminalen TAA-Bindern und dem zentralen CD3-Binder ist im TriFab-Format sehr gering, sodass eine effiziente Ausprägung der Immunsynapse durch die kurze Distanz zwischen Tumor- und T-Zelle begünstigt wird.

Um die unspezifische Aktivierung der T-Zelle in Abwesenheit der Tumorzelle zu verhindern, wurde die Affinität des monovalenten CD3-Binders bewusst schwach gewählt (dreistellig nanomolarer Bereich) (Bacac et al. 2016). Die Kontrollexperimente, in denen beispielsweise PSMA-negative Zellen mit einem <PSMA>-TriFab und Reporter-T-Zellen inkubiert wurden, bestätigen das gewünschte neutrale Verhalten des TriFab-TCB in Abwesenheit des Zielantigens.

Durch die Substitution der CH2 Domänen, interagiert das Format zudem nicht mit Fc $\gamma$ RIII, weshalb die Initiation von ADCC und CDC verhindert wird. Dies minimiert das Risiko von Nebenwirkungen, wie sie bei der systemischen Applikation von Catumaxomab beobachtet wurden (Mau-Sorensen et al. 2015).

Letztlich ist ein großer Vorteil des TriFab-Formates, dass sich durch vertikale Trennung zwei Moleküle ergeben, welche jeweils <CD3>-inaktiviert sind, aber dennoch ihre Fähigkeit beibehalten, monovalent an das Tumorantigen zu binden. Dies hat die Idee der Weiterentwicklung des Formates für die Anwendung zur konditionalen T-Zell-Aktivierung hervorgebracht.

## **6.2 Erweiterung des TriFab-Formates zur konditionalen T-Zell-Aktivierung**

### **6.2.1 Das Einfügen der *Dummy*-Kette als Schlüsseltechnologie dieses Konzepts**

Die Trennung entlang der zentralen CD3-Bindeeinheit in ein zweiteiliges System hat in den resultierenden Halbantikörpern zunächst ungepaarte variable anti-CD3-Domänen zur Folge. Dadurch werden hydrophobe Cluster, welche normalerweise durch die gegenüberliegende Domäne abgeschirmt werden, exponiert. In wässriger Lösung neigen diese Moleküle zur Aggregation, die sich bereits während der Produktion in einer geringen Antikörperausbeute und Stabilität äußert (Dudgeon et al. 2009, Perchiacca et al. 2011). Diese *aggregation hotspots* galt es durch rationales Design der Eduktmoleküle und Einfügen einer *Dummy*-Kette abzuschirmen. Die dazu gewählte variable Region des „Nadaceptin“-Binders ermöglichte die Expression in etablierten eukaryotischen Expressionssystemen mit unerwartet hohen Ausbeuten (teilweise über 100 mg/l Expressionsvolumen). Die Ausbeuten

und die Eignung für standardisierte Aufreinigungsmethoden qualifizieren das Format für die Hochdurchsatzproduktion und Charakterisierung in kleinem Maßstab.

Die nicht-kovalente Interaktion zwischen der schweren Kette des Halbantikörpers mit der *Dummy*-Kette basiert folglich auf der VH/VL Paarung und dem Kontaktbereich in den CH3-Domänen. Um das Reaktionsgleichgewicht beim Austausch der Ketten auf der Zielzelle in Richtung des TriFab-Produktes zu verschieben und gleichzeitig die VH/VL Interaktion beizubehalten, wurden die Störmutationen im CH3-Bereich eingeführt. Diese partielle Destabilisierung äußerte sich in einer sinkenden Schmelztemperatur der entstehenden Eduktmoleküle im Vergleich zu dem durch Salzbrücken stabilisierten TriFab. Für künftige Optimierungen des Kontaktbereichs könnte folglich die Bestimmung der Schmelztemperatur ein hilfreicher Parameter sein, um die Austauscheffizienz der Eduktmoleküle abzuschätzen.

Der separate Einsatz der Eduktmoleküle auf Zellen mit erhöhter Antigendichte (z. B. FOLR1 auf HeLa) zeigt, dass Edukt B in hohen Konzentrationen eine Teilaktivierung der T-Zellen auslöst. Es ist bekannt, dass einzelne VH oder VL Domänen auch isoliert mit dem entsprechenden Antigen interagieren können (Hussack et al. 2012). Beispielsweise produzieren Lamas sogenannte Nanobodies, die nur aus VH Regionen bestehen und vollständig bindekompetent sind (Muyldermans 2013).

Die Tatsache, dass durch Biacore und Chromatographie die Bindung an CD3 nicht detektiert werden konnte, deutet darauf hin, dass die residuale Bindung einer sehr schwachen Affinität unterliegt. Dies spricht für eine aviditätsverstärkte interzelluläre Bindung zwischen T- und Tumorzelle, und das ineffiziente, aber mögliche Ausbilden einer Immunsynapse. Da der Effekt lediglich auf Zellen mit einer TAA-Expression größer 10.000 Moleküle/Zelle (HT-29) beobachtet wurde, ist auf eine weitere Optimierung der Formate verzichtet worden.

Eine mögliche Änderung zur Verringerung der residualen Aktivität wäre die Wahl einer alternativen variablen Domäne im *Dummy*-Teil, welche die exponierten CDR der CD3-Domäne besser abschirmt. Dies ist beispielsweise beim Einsatz des <PD-L1>-Dummies zu beobachten, der die residuale Aktivität der Einzeldomänen im Reporterzellassay senkt (Abbildung 33). Weiterhin kann das rationale Einfügen von polaren Aminosäuren zu einer Ausprägung weiterer Salzbrücken führen und so die Interaktion zwischen CD3-Fv und *Dummy*-Fv stärken (Koenig et al. 2017). Dabei ist zu beachten, dass die Anziehung der Ketten sorgfältig gewählt werden sollte. Eine zu starke Interaktion minimiert zwar das Risiko einer Restaktivität der zentralen, variablen Bereiche. Sie minimiert allerdings auch die Tendenz der Moleküle mit dem Pendant auf der Zielzelle zu assemblieren.

### 6.2.2 Die erste Stufe der Selektivitätssteigerung: Die Antigenzahl

Risiken beim Einsatz der TCB sind vor allem dadurch bedingt, dass die Expression der Antigene nicht ausschließlich auf den Tumor beschränkt ist. Der FOLR1 wird signifikant in Kolorektalkarzinomen (CRC) (Shia et al. 2008) und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) (O'Shannessy et al. 2012) überexprimiert, liegt jedoch auch in Lunge, Niere und Speicheldrüse vor (Cheung et al. 2016). Bisher gibt es keinen klinisch zugelassenen Antikörper, der gegen FOLR1 gerichtet ist. Publierte Studien mit <FOLR1>-TCB berichteten schwerwiegende Nebenwirkungen, die auf *On-target-off-tumor*-Toxizität zurückzuführen waren (Tibben et al. 1996). FOLR1 eignete sich daher hervorragend als Modellantigen für den vorliegenden konditionalen Aktivierungsansatz.

Betrachtet man die Werte maximaler Lyse, so erreicht die Eduktkombination im PBMC-co-Kultivierungsassay den Wert des Produktmoleküls (Effizienz entspricht 1) auf HeLa-Zellen mit starker FOLR1-Expression. Mit abnehmender Antigendichte sinkt auch die Effizienz der Reaktion, wie auf SK-OV-3 (0,8) und HT-29 (0,6) gezeigt werden konnte. MKN-45-Zellen sind durch eine geringe Expression des FOLR1 charakterisiert, die in etwa der Prävalenz des Rezeptors in Lungengewebe entspricht. Das aktive TriFab-Molekül löste auf MKN-45-Zellen eine geringe aber signifikante Lyse aus. Im Vergleich dazu hatte die Edukt-Kombination keinerlei Eliminierung der Zelllinie zur Folge (Effizienz = 0). Dieses Ergebnis zeigt, dass es zwischen einer Rezeptordichte von  $10^3$  bis  $10^4$  eine Grenze geben muss, ab der die durch FOLR1-vermittelte Austauschreaktion effizient vonstattengeht. Das Experiment lieferte den ersten Beweis für eine Selektivitätssteigerung gegenüber dem vorassemblierten TriFab-Molekül und könnte auch für andere TAA mit vergleichbarer Expressionsverteilung auf normalen Zellen anwendbar sein.

Eine Erklärung dieser Beobachtung ist, dass die Assemblierungsreaktion auf der Zelloberfläche der Stokes-Einstein-Beziehung folgt (Saffman und Delbrück 1975). Auf MKN-45-Zellen reicht die niedrige lokale Konzentration und die laterale Diffusion der membrangebundenen Reaktionspartner offenbar nicht aus, um TriFab-Moleküle in wirksamen Mengen assemblieren zu können. Damit zusammenhängend unterliegt das Konzept zusätzlich der eingangs beschriebenen Aviditäts-vermittelten Selektivitätssteigerung (AMSG). Auf Zellen mit hoher Antigendichte (HeLa) kommt es aufgrund der räumlichen Nähe gebundener Edukte zu einer schnellen Reaktion und folglich zu einem bivalent bindenden TriFab, der 16-fach stärker an die Zelle bindet als das monovalente Eduktmolekül. Infolge der geringen Antigendichte auf MKN-45-Zellen ist eine Dissoziation der schwächer bindenden Eduktmoleküle ohne Assemblierung also wahrscheinlicher, da die Moleküle nicht gleichzeitig in räumlicher Nähe vorliegen und somit nicht zum Produkt konvertiert werden können.



### 6.2.3 Die zweite Stufe der Selektivitätssteigerung: Co-Expression zweier Antigene

Auf der Suche nach einem zweiten Antigen mit ähnlichen Charakteristika wurde EGFR ausgewählt. Der Rezeptor wird als Folge massiver Genamplifikation in verschiedenen Indikationen überexprimiert. In NSCLC ist die Überexpression von EGFR mit reduzierter Überlebenswahrscheinlichkeit und steigendem Risiko zur Lymphknotenmetastasierung assoziiert (Bethune et al. 2010, Sigismund et al. 2018). Ähnlich verhält sich die Prognose bei Darmkrebspatienten, in denen die Prävalenz einer Überexpression bei 60 bis 80% liegt (Cohen 2003). Trotz der Zulassung dreier, gegen EGFR gerichteter Antikörper (Cetuximab, Panitumumab, Necitumumab) kann der Therapieerfolg nur bei einem Teil der Patienten eintreten. Die Wirkungsweise von Cetuximab beruht auf der Inhibition des Rezeptors, wodurch die Signalkaskade und das damit verbundene Zellwachstum gehemmt werden. KRAS und BRAF Mutationen, die in 45% der Patienten mit CRC manifestiert sind, führen jedoch zu einer Resistenz gegen die Cetuximab-Therapie (Lièvre et al. 2006). Aus diesem Grund wäre ein Therapiekonzept hilfreich, das unabhängig von genetischen Prädispositionen (z. B. KRAS-Mutationen) wirkt.

Tabelle 4 zeigt eine Expressionsanalyse von FOLR1 und EGFR und bildet für beide Rezeptoren die fünf Gewebe mit der höchsten physiologischen Expression ab. Die Farbskala zeigt, dass die Rezeptoren keine erhöhte Co-Expression zeigen.

**Tabelle 4: Expressionsanalyse von FOLR1 und EGFR in gesundem Gewebe.** Die Daten stammen aus dem GTEx Datensatz (TheHumanProteinAtlas 2019). Werte repräsentieren RPKM (*Reads per kilobase per million mapped reads*), (rot = hoch, blau = niedrig).

Gewebe	GTEx Score [RPKM]	
	FOLR1	EGFR
Lunge	44	9
Speicheldrüse	33	13
Niere	30	5
Schilddrüse	15	9
Eileiter	6	10
Speiseröhre	1	12
Fettgewebe	0	14
Brust	5	14
Haut	1	30

Diese unterschiedliche Verteilung der beiden Antigene, verbunden mit deren Co-Expression in NSCLC und CRC, macht sie zu interessanten TAA für die Testung eines bispezifischen *Targeting*-Ansatzes (Nunez et al. 2012).

Die HT-29 Zelllinie hat ihren Ursprung im CRC und exprimiert sowohl EGFR und FOLR1, was die Expressionsanalyse in Abbildung 23 verdeutlicht. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinie aufgrund ihrer BRAF-Mutationen resistent gegen EGFR-Antagonisten ist (Napolitano et al. 2015). Hingegen sorgt die Kombination aus FOLR1- und EGFR-bindenden Edukten in Anwesenheit humaner T-Zellen für eine effiziente Eliminierung der HT-29-Zellen. Obwohl MKN-45-Zellen im Vergleich zur HT-29-Zelllinie weitaus mehr EGFR exprimieren, hat die Anwendung der gleichen Edukt-Kombination keinen lytischen Effekt zur Folge.

Daraus folgt, dass die erfolgreiche Austauschreaktion sowohl die Anwesenheit beider Antigene, als auch deren hinreichende Exposition auf der Zellmembran voraussetzt. Dies könnte die dosis-limitierenden Nebenwirkungen in Lunge (durch <FOLR1>-TCB) und Haut (durch <EGFR>-TCB oder Cetuximab) deutlich minimieren und das therapeutische Fenster erweitern (Lutterbuese et al. 2010).

Somit bilden FOLR1 und EGFR ein TAA-Paar, das eine effiziente Assemblierung zulässt, was auch auf die Größe der extrazellulären Domänen der Rezeptoren zurückzuführen ist. Bei der Wahl zweier verschiedener Zielantigene könnte die Lage der gebundenen Epitope eine entscheidende Rolle spielen. Das vom <EGFR>-Edukt gebundene Epitop ist in Domäne III des Rezeptors lokalisiert, welche etwa in sieben Nanometer Entfernung von der Membran liegt (Needham et al. 2016). FOLR1 ist als GPI-Ankerprotein in der Membran eingebettet und kann stark rotieren, weshalb die genaue Distanz des Epitops und des gebundenen Edukt A zur Membran variiert. Die Betrachtung der Kristallstruktur (pdb5izq) lässt auf eine ungefähre Entfernung von 7 bis 10 Nanometer schließen. Nach lateraler Diffusion der antikörpergebundenen Rezeptoren durch die Membran könnte die ähnliche Entfernung zur Zellmembran eine Austauschreaktion begünstigen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wäre ein Vergleich mit einem Epitop großer Membrandistanz, wie beispielsweise das in Melanomen exprimierte Melanom-Chondroitin-Sulfat-Proteoglycan (MCSP) mit einer Membrandistanz von circa 100 Nanometer (Bluemel et al. 2010) hilfreich und für weiterführende Studien zu testen. Die Kenntnis darüber könnte die richtige Wahl zweier co-exprimierter Antigene erleichtern und deren Eignung für die Assemblierung auf der Zielzelle vorhersagen.

Letztlich zeigen die Formaterweiterungen in Abschnitt 5.2.11, dass die Herstellung von Eduktmolekülen zur Assemblierung tetraspezifischer Produktmoleküle möglich ist. Dies könnte für weitere Anwendungsgebiete, in denen polyspezifische Antikörper zusätzliche Spezifitätssteigerungen bedeuten, von Relevanz sein.

#### 6.2.4 Assemblierung der Edukte in Lösung und pharmakokinetische Eigenschaften

In einem zellulären Assay bei physiologischem pH-Wert konnte gezeigt werden, dass es ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer partiellen Interaktion von Eduktmolekülen kommt. Daraus folgt, dass die Austauschreaktion bei hohen Konzentrationen in der Zirkulation *in vivo* erfolgen könnte, was aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der Assemblierungsreaktion schon vorab erwartet wurde.

Da die Testung der Moleküle *in vivo* noch nicht erfolgt ist, wird an dieser Stelle eine Abschätzung der realistischen Maximalkonzentrationen in der Zirkulation vorgenommen. Bei intravenöser Applikation eines Antikörpers wird die maximale Serumkonzentration unmittelbar nach der Infusion erreicht (Matucci et al. 2018). Die intravenöse Injektion von 1,4 mg/kg TCB im IgG Format in nicht-humane Primaten hat gezeigt, dass die maximale Serumkonzentration (cMax) circa 250 nM beträgt und einem linearen Zusammenhang folgt (Ferl et al. 2018). Ausgehend von dieser Konzentration könnte also die maximale Dosis der Eduktmoleküle auf jeweils 5,5 mg/kg eingestellt werden. Fraglich ist allerdings, ob TCB in derart hohen Dosen verabreicht werden können. In einer klinischen Dosis-Eskalationsstudie (NCT01284231) betrug die maximal tolerierbare Dosis eines *tandem scFv* (MEDI-565) 5 mg pro Injektion. Die ermittelte maximale Serumkonzentration nach der ersten Injektion lag bei circa 500 ng/ml (Pishvaian et al. 2016), was einer molaren Konzentration von weniger als 10 nM entspricht. Würden die beiden Eduktmoleküle bei dieser Konzentration eingesetzt, wäre folglich kein spontaner Austausch im Serum zu erwarten.

Geht man jedoch davon aus, dass die inaktiven Eduktmoleküle in deutlich höheren Dosen verträglich sind, könnte es ratsam sein, die beiden Moleküle zeitlich versetzt zu injizieren. Dies würde ein Zusammentreffen bei hohen Konzentrationen in der Injektionslösung und bei cMax am Ort der Injektion verhindern.

Die Anreicherung der Moleküle in soliden Tumoren hängt auch von der Serumhalbwertszeit des Antikörpers ab. Mit verlängerter Zirkulationszeit erhöht sich die Aufnahme im Tumor (Thurber et al. 2008). Da die Eduktmoleküle (100 kDa) der zugrundeliegenden Technologie keinen Fc-Teil tragen, ist die mittlere Serumhalbwertszeit mit der eines TandAbs (105 kDa) vergleichbar und auf circa 20 Stunden zu schätzen (Reusch et al. 2015).

Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden die TriFab-Moleküle um einen Fc-Teil ergänzt. Dadurch entstanden zwei neue Formate, deren Austauscheffizienz und die Bindung an FcRn *in vitro* bestätigt wurden. In publizierten Formaten mit Fc-Teil wurde eine Serumhalbwertszeit von 210 Stunden festgestellt, die im Bereich natürlicher IgG einzuordnen ist (Lorenczewski et al. 2017, Schaefer et al. 2011). Durch diese Formatanpassung könnte

das Problem einer zu kurzen Exposition des Tumors infolge rapider Eliminierung der Edukte aus der Zirkulation verhindert werden.

### 6.2.5 Modifikation der Eduktmoleküle zur Inhibition von Immun-Checkpoints

Maligne Zellen können bestimmte Immunausweichmechanismen ausprägen, um der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen. Beispiele sind das Herunterregulieren der MHC-Expression oder co-stimulierender Faktoren, sowie fehlerhaftes Prozessieren von Antigenen für den Präsentiervorgang. TCB haben *per se* den Vorteil, dass sie durch die MHC-unabhängige Aktivierung von T-Zellen gegenüber dieser Art von Ausweichmechanismen resistent sind.

Andere Vorgänge mindern jedoch auch die Effizienz von TCB, beispielsweise die Hochregulierung inhibierender Immun-Checkpoints wie PD-L1. Präklinische Experimente zeigten bereits eine erhöhte T-Zellaktivierung und Effektorfunktion bei Kombination von TCB und Immun-Checkpoint-Antagonisten (Kobold et al. 2018, Krupka et al. 2016).

Der Austausch der <Nada>-Domänen durch PD-L1-spezifische Domänen in der *Dummy*-Kette könnte eine ähnliche Kombinationswirkung ermöglichen. Hervorzuheben ist dabei, dass der intakte PD-L1 Binder ebenfalls erst bei Assemblierung des *Dummy*-Dimers als Nebenprodukt der Austauschreaktion zustande kommt. Potentielle Nebenwirkungen, wie sie etwa bei der Monotherapie mit Avelumab (<PD-L1>) beobachtet wurden, könnten so ebenfalls minimiert werden (Kelly et al. 2018). Die Kombination des TriFab mit dem <PD-L1>-*Dummy* konnte bereits in ersten Experimenten mit Reporterzellen die potenzierende Wirkung der Kombination aufzeigen.

Assays mit primären Lymphozyten, beispielsweise unter Einbezug der Formate zur Retention des Dummies in der Immunsynapse (Abschnitt: 5.2.11), stehen noch aus.

Ein weiterer Immunausweichmechanismus ist die klonale Selektion von Tumorzellen mit reduzierter Expression des TAA (Vinay et al. 2015). Da das zugrundeliegende Konzept aus zwei Eduktmolekülen besteht und der funktionale Antikörper erst auf der Zielzelle assembliert, kann die Wahl der beiden TAA je nach Expressionsprofil flexibel gestaltet werden. Dies könnte für künftige Ansätze in der personalisierten Medizin eine entscheidende Rolle spielen, um Antigen-Loss und heterogener Expression im Individuum selbst, und Patienten-übergreifend, entgegenzuwirken.

### 6.3 Fazit und Ausblick

Im Zuge dieses Projektes wurde eine Technologie entwickelt, die die Assemblierung einer neuartigen TCB-Klasse präferentiell auf entarteten Zellen ermöglicht. Durch *Protein-Engineering* und damit erreichter Überwindung technischer Hürden konnten die gewünschten Moleküle hergestellt und deren biologische Wirksamkeit gezeigt werden.

Die bisherigen Forschungsbestrebungen basieren auf der Testung der Moleküle *in vitro*. Zwar gibt es Hinweise, die auf die biochemische Eignung der Antikörperderivate für deren Einsatz im Organismus sprechen, letztlich bedarf es dennoch entsprechender *in vivo* Studien, die die Vor- und Nachteile der Technologie aufzeigen. Notwendige Punkte, die es dort zu adressieren gilt, sind die Stabilität und Halbwertszeit der Moleküle, die Effizienz des Austauschs in Zirkulation und im Tumorgewebe, sowie die Verträglichkeit der Moleküle bei wirksamen Dosen.

In Zukunft könnte die Technologie die Zahl der therapierbaren (*druggable*) Zielantigene erweitern und durch die Kombinationsmöglichkeit verschiedener Tumorantigen- und Immun-Checkpoint-Binder personalisierte Therapieansätze hervorbringen.

Das Konzept der konditionalen Assemblierung eines funktionalen Antikörpers auf der Zielzelle ist allerdings nicht ausschließlich auf die Aktivierung von T-Lymphozyten beschränkt. Die Translation auf andere Bereiche zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken ist naheliegend.

Die vorliegende Arbeit begründet einen molekularen Baukasten, der für künftiges Moleküldesign zur konditionalen Aktivierung der Wirkmechanismen rekombinanter Antikörper genutzt werden kann.

## 7. Literatur

- An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* 2018; 37:1561-75.
- Bacac M, Bruenker P, Freimoser-Grundschober A, Hosse R, Klein C, Moessner E, Umana P, Weinzierl T. T cell activating bispecific antigen binding molecules against folr1 and cd3. Patent WO2016079076A1. 2016. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016079076>.
- Bacac M, Fauti T, Sam J, Colombetti S, Weinzierl T, Ouaret D, Bodmer W, Lehmann S, Hofer T, Hosse RJ, 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; 22:3286-97.
- Banaszek A. Dual antigen-restricted complementation of a two-part trispecific antibody for targeted immunotherapy of blood cancer: Julius Maximilians Universität Würzburg 2014. Dissertation
- Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, Noppeney R, Viardot A, Hess G, Schuler M, Einsele H, Brandl C, Wolf A, Kirchinger P, Klappers P, Schmidt M, Riethmuller G, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kufer P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008; 321:974-7.
- Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: An overview and update. *J Thorac Dis* 2010; 2:48-51.
- Bluemel C, Hausmann S, Fluhr P, Sriskandarajah M, Stallcup WB, Baeuerle PA, Kufer P. Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59:1197-209.
- Boustany LM, Wong L, White CW, Diep L, Huang Y, Liu S, Richardson JH, Kavanaugh WM, Irving BA. Abstract A164: EGFR-CD3 bispecific probody™ therapeutic induces tumor regressions and increases maximum tolerated dose >60-fold in preclinical studies. *Mol Cancer Ther* 2018; 17:A164-A.
- Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *MAbs* 2017; 9:182-212.
- Brinkmann U, Mayer K, Dickopf S. Method for in vivo generation of multispecific antibodies from monospecific antibodies. Patent WO2019086362. 2019. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019086362>.
- Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, Pastan I. B3(fv)-pe38kdel, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:8616-20.
- Brischwein K, Parr L, Pflanz S, Volkland J, Lumsden J, Klinger M, Locher M, Hammond SA, Kiener P, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. *J Immunother* 2007; 30:798-807.
- Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *J Exp Med* 1991; 173:1483-91.

- Chelius D, Ruf P, Gruber P, Plösch M, Liedtke R, Gansberger E, Hess J, Wasiliu M, Lindhofer H. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *mAbs* 2010; 2:309-19.
- Chen X, Dennis MS, Ebens Jr AJ, Junttila TT, Kelley RF, Mathieu MA. Anti-CD3 antibodies and methods of use. Patent EP3083689A1. 2015. <https://patents.google.com/patent/EP3083689A1>.
- Cheung A, Bax HJ, Josephs DH, Ilieva KM, Pellizzari G, Opzoomer J, Bloomfield J, Fittall M, Grigoriadis A, Figini M, Canevari S, Spicer JF, Tutt AN, Karagiannis SN. Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget* 2016; 7:52553-74.
- Cohen RB. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2003; 2:246-51.
- Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:333-40.
- De Michele C, De Los Rios P, Foffi G, Piazza F. Simulation and theory of antibody binding to crowded antigen-covered surfaces. *PLoS Comput Biol* 2016; 12:e1004752.
- Dickopf S, Lauer ME, Ringler P, Spick C, Kern P, Brinkmann U. Highly flexible, IgG-shaped, trivalent antibodies effectively target tumor cells and induce T cell-mediated killing. *Biol Chem* 2019; 400:343-50.
- Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, Hoffmann P, Syring U, Hanakam F, Kufer P, Riethmuller G, Bargou R, Baeuerle PA. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer* 2002; 100:690-7.
- Dudgeon K, Famm K, Christ D. Sequence determinants of protein aggregation in human VH domains. *Protein Eng Des Sel* 2009; 22:217-20.
- Duell J, Lammers PE, Djuretic I, Chnyk AG, Alekar S, Jacobs I, Gill S. Bispecific antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Clin Pharmacol Therap* 2019:(doi.org/10.1002/cpt.1396).
- Ellerman D. Bispecific T-cell engagers: Towards understanding variables influencing the in vitro potency and tumor selectivity and their modulation to enhance their efficacy and safety. *Methods* 2019; 154:102-17.
- Ellwanger K, Reusch U, Fucek I, Knackmuss S, Weichel M, Gantke T, Molkenthin V, Zhukovsky EA, Tesar M, Treder M. Highly specific and effective targeting of EGFRvIII-positive tumors with TandAb antibodies. *Front Oncol* 2017; 7:100.
- Ferl GZ, Reyes A, Sun LL, Cheu M, Oldendorp A, Ramanujan S, Stefanich EG. A preclinical population pharmacokinetic model for anti-CD20/CD3 T-cell-dependent bispecific antibodies. *Clin Translat Sci* 2018; 11:296-304.
- Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996; 384:134-41.
- Germain RN. Mhc-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76:287-99.

Gruen M, Bommert K, Bargou RC. T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19xCD3 bispecific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:625-32.

Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990; 346:574-6.

Harper J, Adams KJ, Bossi G, Wright DE, Stacey AR, Bedke N, Martinez-Hague R, Blat D, Humbert L, Buchanan H, Le Provost GS, Donnellan Z, Carreira RJ, Paston SJ, Weigand LU, Canestraro M, Sanderson JP, Botta Gordon-Smith S, Lowe KL, Rygiel KA, Powlesland AS, Vuidepot A, Hassan NJ, Cameron BJ, Jakobsen BK, Dukes J. An approved in vitro approach to preclinical safety and efficacy evaluation of engineered T cell receptor anti-CD3 bispecific (ImmTAC) molecules. *PloS one* 2018; 13:e0205491-e.

Hemmer B, Stefanova I, Vergelli M, Germain RN, Martin R. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* 1998; 160:5807-14.

Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Meth* 2009; 347:3-11.

Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59:1935-40.

Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2015; 93:290-6.

Hussack G, Keklikian A, Alsughayyir J, Hanifi-Moghaddam P, Arbabi-Ghahroudi M, van Faassen H, Hou ST, Sad S, MacKenzie R, Tanha J. A V(L) single-domain antibody library shows a high-propensity to yield non-aggregating binders. *Protein Eng Des Sel* 2012; 25:313-8.

Igawa T, Tsunoda H, Kikuchi Y, Yoshida M, Tanaka M, Koga A, Sekimori Y, Orita T, Aso Y, Hattori K, Tsuchiya M. VH/VL interface engineering to promote selective expression and inhibit conformational isomerization of thrombopoietin receptor agonist single-chain diabody. *Protein Eng Des Sel* 2010; 23:667-77.

Kelly K, Infante JR, Taylor MH, Patel MR, Wong DJ, Iannotti N, Mehnert JM, Loos AH, Koch H, Speit I, Gulley JL. Safety profile of avelumab in patients with advanced solid tumors: A pooled analysis of data from the phase 1 JAVELIN solid tumor and phase 2 JAVELIN Merkel 200 clinical trials. *Cancer* 2018; 124:2010-7.

Kobold S, Pantelyushin S, Rataj F, Vom Berg J. Rationale for combining bispecific T cell activating antibodies with checkpoint blockade for cancer therapy. *Front Oncol* 2018; 8:1-8.

Koenig P, Lee CV, Walters BT, Janakiraman V, Stinson J, Patapoff TW, Fuh G. Mutational landscape of antibody variable domains reveals a switch modulating the interdomain conformational dynamics and antigen binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114:E486-E95.

Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Lichtenegger FS, Kohnke T, Vick B, Jeremias I, Metzeler KH, Altmann T, Schneider S, Fiegl M, Spiekermann K, Bauerle PA, Hiddemann W, Riethmuller G, Subklewe M. Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: Reversing a T-cell-induced immune escape mechanism. *Leukemia* 2016; 30:484-91.



- Li J, Stagg NJ, Johnston J, Harris MJ, Menzies SA, DiCara D, Clark V, Hristopoulos M, Cook R, Slaga D, Nakamura R, McCarty L, Sukumaran S, Luis E, Ye Z, Wu TD, Sumiyoshi T, Danilenko D, Lee GY, Totpal K, Ellerman D, Hotzel I, James JR, Junttila TT. Membrane-proximal epitope facilitates efficient T cell synapse formation by anti-FcRH5/CD3 and is a requirement for myeloma cell killing. *Cancer Cell* 2017; 31:383-95.
- Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, Côté J-F, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:3992-5.
- Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, Thierfelder S. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol* 1995; 155:219-25.
- Linke R, Klein A, Seimetz D. Catumaxomab: Clinical development and future directions. *MAbs* 2010; 2:129-36.
- Liu H, Moy P, Kim S, Xia Y, Rajasekaran A, Navarro V, Knudsen B, Bander NH. Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Res* 1997; 57:3629-34.
- Lorenczewski G, Friedrich M, Kischel R, Dahlhoff C, Anlahr J, Balazs M, Rock D, Boyle MC, Goldstein R, Coxon A, Chapman-Arvedson T. Generation of a half-life extended anti-CD19 BiTE® antibody construct compatible with once-weekly dosing for treatment of CD19-positive malignancies. *Blood* 2017; 130:2815-.
- Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D, Schaller E, Herrmann I, Wolf A, Urbig T, Baeuerle PA, Kufer P. T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:12605-10.
- Mandikian D, Takahashi N, Lo AA, Li J, Eastham-Anderson J, Slaga D, Ho J, Hristopoulos M, Clark R, Totpal K, Lin K, Joseph SB, Dennis MS, Prabhu S, Junttila TT, Boswell CA. Relative target affinities of T-cell-dependent bispecific antibodies determine biodistribution in a solid tumor mouse model. *Mol Cancer Ther* 2018; 17:776-85.
- Matucci A, Vultaggio A, Danesi R. The use of intravenous versus subcutaneous monoclonal antibodies in the treatment of severe asthma: A review. *Respir Res* 2018; 19:154-.
- Mau-Sorensen M, Dittrich C, Dienstmann R, Lassen U, Buchler W, Martinius H, Tabernero J. A phase I trial of intravenous catumaxomab: A bispecific monoclonal antibody targeting EpCAM and the T cell coreceptor CD3. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 75:1065-73.
- Mayer K, Baumann AL, Grote M, Seeber S, Kettenberger H, Breuer S, Killian T, Schafer W, Brinkmann U. Trifabs--trivalent IgG-shaped bispecific antibody derivatives: Design, generation, characterization and application for targeted payload delivery. *Int J Mol Sci* 2015; 16:27497-507.
- Mimura K, Teh JL, Okayama H, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, Smoot DT, Ashktorab H, Oike T, Suzuki Y, Fazreen Z, Asuncion BR, Shabbir A, Yong WP, So J, Soong R, Kono K. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci* 2018; 109:43-53.
- Minguet S, Swamy M, Alarcon B, Luescher IF, Schamel WW. Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity* 2007; 26:43-54.

- Moore GL, Lee S-H, Schubert S, Miranda Y, Rashid R, Pong E, Phung S, Chan EW, Chen H, Endo N, Ardila MC, Bennett MJ, Chu S, Leung IWL, Muchhal U, Bonzon C, Szymkowski DE, Desjarlais J. Tuning T cell affinity improves efficacy and safety of anti-CD38 x anti-CD3 bispecific antibodies in monkeys - a potential therapy for multiple myeloma. *Blood* 2015; 126:1798-.
- Moore PA, Zhang W, Rainey GJ, Burke S, Li H, Huang L, Gorlatov S, Veri MC, Aggarwal S, Yang Y, Shah K, Jin L, Zhang S, He L, Zhang T, Ciccarone V, Koenig S, Bonvini E, Johnson S. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *Blood* 2011; 117:4542-51.
- Muyldermans S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 2013; 82:775-97.
- Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: A historical perspective. *Pharmacol Ther* 2012; 136:334-42.
- Napolitano S, Martini G, Rinaldi B, Martinelli E, Donniacuo M, Berrino L, Vitagliano D, Morgillo F, Barra G, De Palma R, Merolla F, Ciardiello F, Troiani T. Primary and acquired resistance of colorectal cancer to anti-EGFR monoclonal antibody can be overcome by combined treatment of regorafenib with cetuximab. *Clin Cancer Res* 2015; 21:2975-83.
- Nastri HG, Iffland C, Leger O, An Q, Cartwright M, McKenna SD, Sood VD, Hao G. Anti-PD-L1 antibodies and uses thereof. Patent WO2013079174A1. 2017. <https://patents.google.com/patent/WO2013079174A1/en>.
- Needham SR, Roberts SK, Arkhipov A, Mysore VP, Tynan CJ, Zanetti-Domingues LC, Kim ET, Losasso V, Korovesis D, Hirsch M, Rolfe DJ, Clarke DT, Winn MD, Lajevardipour A, Clayton AH, Pike LJ, Perani M, Parker PJ, Shan Y, Shaw DE, Martin-Fernandez ML. EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms. *Nat Commun* 2016; 7:13307.
- Nunez MI, Behrens C, Woods DM, Lin H, Suraokar M, Kadara H, Hofstetter W, Kalhor N, Lee JJ, Franklin W, Stewart DJ, Wistuba, II. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and EGFR [corrected] mutation. *J Thorac Oncol* 2012; 7:833-40.
- O'Shannessy DJ, Yu G, Smale R, Fu YS, Singhal S, Thiel RP, Somers EB, Vachani A. Folate receptor alpha expression in lung cancer: Diagnostic and prognostic significance. *Oncotarget* 2012; 3:414-25.
- Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P, Baeuerle PA. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immunol* 2006; 43:763-71.
- Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem* 2005; 338:284-93.
- Perchiacca JM, Bhattacharya M, Tessier PM. Mutational analysis of domain antibodies reveals aggregation hotspots within and near the complementarity determining regions. *Proteins* 2011; 79:2637-47.
- Pishvaian M, Morse MA, McDevitt J, Norton JD, Ren S, Robbie GJ, Ryan PC, Soukharev S, Bao H, Denlinger CS. Phase 1 dose escalation study of MEDI-565, a bispecific T-cell engager that targets human carcinoembryonic antigen, in patients with advanced gastrointestinal adenocarcinomas. *Clin Colorectal Cancer* 2016; 15:345-51.

Purbhoo MA, Sutton DH, Brewer JE, Mullings RE, Hill ME, Mahon TM, Karbach J, Jager E, Cameron BJ, Lissin N, Vyas P, Chen JL, Cerundolo V, Jakobsen BK. Quantifying and imaging NY-ESO-1/LAGE-1-derived epitopes on tumor cells using high affinity T cell receptors. *J Immunol* 2006; 176:7308-16.

Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenthin V, Gall FL, Topp M, Little M, Zhukovsky EA. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19(+) tumor cells. *MAbs* 2015; 7:584-604.

Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 1996; 9:617-21.

Rojo JM, Janeway CA, Jr. The biologic activity of anti-T cell receptor V region monoclonal antibodies is determined by the epitope recognized. *J Immunol* 1988; 140:1081-8.

Root AR, Cao W, Li B, et al. Development of pf-06671008, a highly potent anti-p-cadherin/anti-CD3 bispecific DARTmolecule with extended half-life for the treatment of cancer. *Antibodies* 2016; 5:6.

Rudnick SI, Lou J, Shaller CC, Tang Y, Klein-Szanto AJ, Weiner LM, Marks JD, Adams GP. Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Res* 2011; 71:2250-9.

Ruf P, Kluge M, Jager M, Burges A, Volovat C, Heiss MM, Hess J, Wimberger P, Brandt B, Lindhofer H. Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catumaxomab intraperitoneally administered to cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69:617-25.

Saffman PG, Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Acad Nat Sci USA* 1975; 72:3111-3.

Sathish JG, Sethu S, Bielsky MC, de Haan L, French NS, Govindappa K, Green J, Griffiths CE, Holgate S, Jones D, Kimber I, Moggs J, Naisbitt DJ, Pirmohamed M, Reichmann G, Sims J, Subramanyam M, Todd MD, Van Der Laan JW, Weaver RJ, Park BK. Challenges and approaches for the development of safer immunomodulatory biologics. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:306-24.

Schaefer W, Regula JT, Böhner M, Schanzer J, Croasdale R, Dürr H, Gassner C, Georges G, Kettenberger H, Imhof-Jung S, Schwaiger M, Stubenrauch KG, Sustmann C, Thomas M, Scheuer W, Klein C. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc Acad Nat Sci USA* 2011; 108:11187-92.

Schlothauer T, Rueger P, Stracke JO, Hertenberger H, Fingas F, Kling L, Emrich T, Drabner G, Seeber S, Auer J, Koch S, Papadimitriou A. Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies. *MAbs* 2013; 5:576-86.

Seimetz D. Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: The trifunctional antibody catumaxomab (removab). *J Cancer* 2011; 2:309-16.

Shia J, Klimstra DS, Nitzkorski JR, Low PS, Gonen M, Landmann R, Weiser MR, Franklin WA, Prendergast FG, Murphy L, Tang LH, Temple L, Guillem JG, Wong WD, Paty PB. Immunohistochemical expression of folate receptor alpha in colorectal carcinoma: Patterns and biological significance. *Hum Pathol* 2008; 39:498-505.

Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 2018; 12:3-20.

- Sim B-C. Abstract 3638: AMX-168, a long-acting, tumor protease-sensitive bispecific precursor for the treatment of solid malignancies. *Cancer Res* 2017; 77:3638-.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Ann Rev Immunol* 2009; 27:591-619.
- Spiess C, Merchant M, Huang A, Zheng Z, Yang NY, Peng J, Ellerman D, Shatz W, Reilly D, Yansura DG, Scheer JM. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. *Nat Biotechnol* 2013; 31:753-8.
- Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985; 314:628-31.
- Stingaciu LR, Ivanova O, Ohl M, Biehl R, Richter D. Fast antibody fragment motion: Flexible linkers act as entropic spring. *Sci Rep* 2016; 6:22148.
- Sugiyama A, Umetsu M, Nakazawa H, Niide T, Onodera T, Hosokawa K, Hattori S, Asano R, Kumagai I. A semi high-throughput method for screening small bispecific antibodies with high cytotoxicity. *Sci Rep* 2017; 7:2862.
- Gtex datensatz. 2019. (Accessed 16.06.2019, at <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110195-FOLR1/tissue> ; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/tissue>.)
- Thurber GM, Schmidt MM, Wittrup KD. Antibody tumor penetration: Transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:1421-34.
- Tibben JG, Boerman OC, Massuger LF, Schijf CP, Claessens RA, Corstens FH. Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')<sub>2</sub> in ovarian carcinoma patients. *Int J Cancer* 1996; 66:477-83.
- Topp MS, Gokbuget N, Zugmaier G, Klappers P, Stelljes M, Neumann S, Viardot A, Marks R, Diedrich H, Faul C, Reichle A, Horst HA, Bruggemann M, Wessiepe D, Holland C, Alekar S, Mergen N, Einsele H, Hoelzer D, Bargou RC. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2014; 32:4134-40.
- Toritsu-Itakura H, Schoellhammer HF, Sim MS, Irie RF, Hausmann S, Raum T, Baeuerle PA, Morton DL. Redirected lysis of human melanoma cells by a MCSP/CD3-bispecific bite antibody that engages patient-derived T cells. *J Immunother* 2011; 34:597-605.
- van der Kant R, Karow-Zwick AR, Van Durme J, Blech M, Gallardo R, Seeliger D, Aßfalg K, Baatsen P, Compennolle G, Gils A, Studts JM, Schulz P, Garidel P, Schymkowitz J, Rousseau F. Prediction and reduction of the aggregation of monoclonal antibodies. *J Mol Biol* 2017; 429:1244-61.
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 2015; 35 Suppl:S185-S98.
- Wallberg M, Recino A, Phillips J, Howie D, Vienne M, Paluch C, Azuma M, Wong FS, Waldmann H, Cooke A. Anti-CD3 treatment up-regulates programmed cell death protein-1 expression on activated effector T cells and severely impairs their inflammatory capacity. *Immunology* 2017; 151:248-60.
- Wang R, Xiang S, Feng Y, Srinivas S, Zhang Y, Lin M, Wang S. Engineering production of functional scFv antibody in E. coli by co-expressing the molecule chaperone Skp. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3:72.

Wu Z, Cheung NV. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. *Pharmacol Ther* 2018; 182:161-75.

Wuellner U, Klupsch K, Buller F, Attinger-Toller I, Santimaria R, Zbinden I, Henne P, Grabulovski D, Bertschinger J, Brack S. Bispecific CD3/HER2 targeting FynoMab induces redirected T cell-mediated cytotoxicity with high potency and enhanced tumor selectivity. *Antibodies* 2015; 4:426-40.

Yuraszeck T, Kasichayanula S, Benjamin JE. Translation and clinical development of bispecific T-cell engaging antibodies for cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2017; 101:634-45.

Zhang H-M, Li C, Lei M, Lundin V, Lee HY, Ninonuevo M, Lin K, Han G, Sandoval W, Lei D, Ren G, Zhang J, Liu H. Structural and functional characterization of a hole-hole homodimer variant in a "knob-into-hole" bispecific antibody. *Anal Chem* 2017; 89:13494-501.

Zuo Z, Jimenez X, Witte L, Zhu Z. An efficient route to the production of an IgG-like bispecific antibody. *Protein Eng* 2000; 13:361-7.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AMSG	<i>Avidity-mediated specificity gain</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
AU	<i>Arbitrary units</i>
BiTE	<i>Bi-specific T cell engager</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CDR	<i>Complementarity-determining region</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSF	Differentielle-Scanning-Fluorometrie
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC50	<i>Half-maximal effective concentration</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
EU	<i>Endotoxin units</i>
E:T	<i>Effector-to-target cell ratio</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
Fv	<i>Fragment variable</i>
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FOLR1	<i>Folate receptor 1</i>
GranB	Granzym B
HC	<i>Heavy chain</i>
HCl	Hydrochlorid
HEK293F	<i>Human embryonic kidney cell 293 FreeStyle™</i>
His	Histidin
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IC	<i>Immun-Checkpoint</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
kDa	Kilodalton
ka	Assoziationsgeschwindigkeit

kd	Dissoziationsgeschwindigkeit
KCl	Kaliumchlorid
KD	Dissoziationskonstante
LC	<i>Light chain</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LeY	Lewis Y
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexe
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PSMA	<i>Prostate-specific membrane antigen</i>
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RU	<i>Response units</i>
<i>scFv</i>	<i>Single-chain fragment variable</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCB	<i>T cell bispecific antibody</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF $\alpha$	<i>Tumor-Necrosis-Faktor-<math>\alpha</math></i>
VH	<i>Variable heavy</i> (variable Domäne der schweren Kette)
VL	<i>Variable light</i> (variable Domäne der leichten Kette)
<x>	x-spezifischer Antikörper

## 9. Danksagung

Dr. Ulrich Brinkmann möchte ich herzlich für die hervorragende Betreuung meines Promotionsprojektes danken. Anregende Diskussionen, seine innovative Denkweise und Offenheit für Projektideen jeder Art bereiteten mir ein exzellentes Forschungsumfeld. Ein weiterer Teil dessen waren meine direkten Kollegen bei der Roche Diagnostics GmbH, denen ich an dieser Stelle für das tolle Arbeitsklima danken möchte.

Für den wissenschaftlichen Beitrag, verbunden mit kritischen und motivierenden Anmerkungen danke ich Dr. Christian Klein, Dr. Guy Georges und Dr. Can Buldun.

Dankend hervorheben möchte ich die wertvollen Diskussionen mit Herrn Prof. Sebastian Kobold. Sein kritisches Hinterfragen der Daten half mir, die Ergebnisse aus anderen Blickwinkeln zu betrachten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Stefan Endres für die Betreuung meiner Doktorarbeit, seine Begeisterung für neue Technologien und die Einschätzung des Projektes aus medizinischer Sicht. Die durch ihn initiierte Angliederung an das *i-Target*-Graduiertenprogramm ermöglichte mir eine wertvolle wissenschaftliche und soziale Interaktion mit anderen Promovierenden.

Herzlich danken möchte ich schließlich meinen Eltern, die mich während meines Studiums hervorragend unterstützt und mich auf dem bis dato familienuntypischen Weg in die Wissenschaft interessiert begleitet haben.



## 10. Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation sind in folgenden Veröffentlichungen verwendet worden:

### TriFab-TCB-Format

1. **Dickopf S**, Lauer ME, Ringler P, Spick C, Kern P, Brinkmann U. Highly flexible, IgG-shaped, trivalent antibodies effectively target tumor cells and induce T cell-mediated killing. *Biological Chemistry* 2019; 400(3):343-350
2. Brinkmann U, **Dickopf S**, Georges G, Thorey I (2019). TriFab contorsbody. Patentanmeldung WO/2019/086395

### Konditionale Immuntherapie

3. Brinkmann U, **Dickopf S**, Mayer K (2019). Method for *in vivo* generation of multispecific antibodies from monospecific antibodies. Patentanmeldung WO/2019/086362

Weitere Publikationen, die im Zuge des Promotionsprojektes veröffentlicht wurden, aber thematisch nicht in dieser Dissertation behandelt werden:

4. Knott SRV, Wagenblast E, Khan S, Kim SY, Soto M, Wagner M, Turgeon MO, Fish L, Erard N, Gable AL, Maceli AR, **Dickopf S**, Papachristou EK, D'Santos CS, Carey LA, Wilkinson JE, Harrell JC, Perou CM, Goodarzi H, Poulogiannis G, Hannon GJ. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. *Nature* 2018;554:378-81.
5. Weidle UH, **Dickopf S**, Hintermair C, Kollmorgen G, Birzele F, Brinkmann U. The Role of micro RNAs in Breast Cancer Metastasis: Preclinical Validation and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Genomics Proteomics* 2018;15:17-39.
6. Killian T, **Dickopf S**, Haas AK, Kirstenpfad C, Mayer K, Brinkmann U. Disruption of diphthamide synthesis genes and resulting toxin resistance as a robust technology for quantifying and optimizing CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Scientific Reports* 2017;7:15480.