
Aus der AMGEN Research Munich GmbH
in Kooperation mit dem
Institut für Immunologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Herstellung und Modifikation bispezifischer Antikörper gegen
humanes Immunglobulin E***

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

vorgelegt von
Franziska Anna Vogel

aus
Bad Wildbad im Schwarzwald

Jahr
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Kufer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Marion Subklewe
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Endres
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Roman Kischel
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2022

Affidavit

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

Vogel, Franziska Anna

Name, Vorname

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

Herstellung und Modifikation bispezifischer Antikörper gegen humanes Immunglobulin E

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.

Franziska Vogel, München, den 15.10.2022

Ort, Datum
Doktorand

Unterschrift Doktorandin bzw.

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungen	XI
1 Einleitung	1
1.1 Allergien und IgE positive B-Zellen	1
1.2 Bispezifische Antikörper, BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte und deren Eigenschaften	5
1.2.1 Bispezifische Antikörper	5
1.2.2 Die Struktur von „Bispecific T cell Engagers“ (BiTE [®] -Antikörper- Konstrukten)	5
1.2.3 Eigenschaften und Wirkmechanismus von BiTE [®] -Antikörper- Konstrukten.....	8
1.2.4 BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte in klinischer Anwendung.....	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	9
2 Material	13
2.1 Chemikalien.....	13
2.2 Verbrauchsmaterial	13
2.3 Puffer und Lösungen	16
2.3.1 kommerzielle Puffer und Lösungen	16
2.3.2 hergestellte Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung	16
2.4 kommerzielle, gebrauchsfertige Reagenzien und Versuchsanordnungen („Kits“).....	19
2.5 Antikörper / Proteine.....	20
2.6 Enzyme	20
2.7 Oligonukleotide und Plasmide	21
2.8 Zellen/ Zelllinien	21
2.8.1 Medien und Zusätze für die eukaryotische Zellkultur	21

2.8.2	hergestellte Medien und Zusätze und deren Zusammensetzung für die eukaryotische Zellkultur	22
2.9	Bakterien	23
2.9.1	Medien und Zusätze für die prokaryotische Zellkultur	24
2.9.2	hergestellte Medien und Zusätze und deren Zusammensetzung für die prokaryotische Zellkultur	24
2.10	Geräte und Messstationen.....	24
2.11	Computersoftware und Datenbanken	25
3	Methoden.....	26
3.1	Zellbiologische Methoden.....	26
3.1.1	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zelllinien	26
3.1.2	Zellzahlbestimmung	26
3.1.3	Klonierung transfizierter Zellen durch limitierende Verdünnung	27
3.1.4	Erythrozytenlyse	28
3.1.5	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) aus humanem Blut.....	28
3.1.6	Stimulation humaner PBMZ.....	29
3.1.7	Anreicherung von CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus humanen PBMZ	30
3.1.8	Durchflusszytometrie	32
3.1.9	Transfektion	35
3.1.10	Präparation kompetenter <i>Escherichia coli XLI Blue</i> Bakterien	38
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	39
3.2.1	DNS-assoziierte Techniken	39
3.3	Immunbiologische Methoden	46
3.3.1	Western Blot (Immunblot)	46
3.3.2	Zytotoxizitätstests	47
3.3.3	Affinitätsbestimmung von BiTE [®] -Molekülen durch Fluoreszenzzytometrie.....	52
3.4	proteinbiochemische Methoden	54
3.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
3.4.2	Coomassie Färbung	55
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen über die Bestimmung der OD ₂₈₀	55
3.4.4	Proteinaufreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC).....	56
3.4.5	Aufkonzentrierung der IMAC-Probenaufreinigungsfractionen	57
3.4.6	Größenauffrennung von Proteinproben durch Gelfiltration.....	58

3.4.7 Messung des Endotoxingehaltes durch den Limulus Amebozyte Lysate (LAL)-Test	59
4 Ergebnisse	60
4.1 Humanes IgE und dagegen gerichtete BiTE [®] -Antikörper.....	60
4.1.1 Struktur von humanem IgE und IgE ⁺ Transfektanten	60
4.1.2 IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte	66
4.1.3 Das IgE-CεmX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukt.....	102
5 Diskussion	116
5.1 Die IgE-B-Zelle als Zielzelle eines BiTE [®] -Moleküls.....	116
5.2 Immunglobulin E – Struktur und Epitope für bispezifische Antikörper- Konstrukte.....	118
5.3 Wirkung der BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte auf die Effektorzellen der allergischen Immunantwort.....	123
5.4 In vivo Aktivität und Kreuzreaktivität der BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte zu den Oberflächenmolekülen des Makaken.....	126
5.5 proteinbiochemische Eigenschaften und Herstellbarkeit.....	128
6 Ausblick	132
7 Zusammenfassung.....	133
8 Anhang	135
8.1 Verwendete Oligonukleotide	135
9 Literaturnachweis.....	136
Danksagung	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Struktur eines BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts und Ursprung der beiden antigenspezifischen Bindungsstellen [34].....	7
Abbildung 2: Lebenszeitprävalenz allergischer und atopischer Erkrankungen Erwachsener in Deutschland [42]	10
Abbildung 3: Struktur des Immunglobulin E im Vergleich zu Immunglobulin G.....	61
Abbildung 4: Schematische Darstellung der strukturellen Domänen und Segmente der kurzen und der langen Isoform des membranständigen IgE (mIgE).	63
Abbildung 5: J558L-Zellen und Expressionskontrolle des humanen IgE	64
Abbildung 6: CHO ^{DHFR} -Zellen, Expressionskontrolle des humanen IgE	65
Abbildung 7: Vergleich der Aminosäuresequenzen der ausgewählten, humanen leichten Ketten zur Weiterentwicklung des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts,	67
Abbildung 8: Vergleich der ähnlichsten humanen Keimbahnaminosäuresequenz (hu V _H 3-53; obere Reihe) zur Aminosäuresequenz der schweren Kette des parentalen IgE-CH3-BiTE [®] (anti IgE V _H , untere Reihe).....	68
Abbildung 9: Darstellung der Aminosäuresequenz der humanisierten schweren Kette des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts	69
Abbildung 10 Vergleich der ähnlichsten, humanen Keimbahnaminosäuresequenz (hu V _H 3-53; obere Reihe) zur Aminosäuresequenz der schweren humanisierten Kette des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts (anti IgE V _H ; untere Reihe).	69
Abbildung 11 schematische Darstellung der Transformation eines antigenbindenden scFv aus dem Phagen-Expression-Vektor in den Säugetier-Expressions-Vektor.....	74
Abbildung 12: FACS Analyse der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte (Zellkulturüberstände)	76
Abbildung 13: beispielhafte Darstellung der Chromatogramme einer IMAC und einer SEC	79
Abbildung 14: SDS-PAGE der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte I.....	81
Abbildung 15: Western Blot der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte I.....	82
Abbildung 16: SDS-PAGE der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte II.....	83
Abbildung 17: Western Blot der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte II.....	84
Abbildung 18: ⁵¹ Chromfreisetzungstest der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte I	86

Abbildung 19: 51 Chromfreisetzungstest der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte II	87
Abbildung 20: 51 Chromfreisetzungstest des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts α IgE ₁ \times CD3.....	88
Abbildung 21: FACS-Analyse des gegen IgE gerichteten α IgE ₁ \times CD3 BiTE [®] -Antikörper-Konstruktes	90
Abbildung 22: 51 Chromfreisetzungstest des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts α IgE ₁ \times CD3 mit CHO ^{DHFR} \times human Fc ϵ RI-Transfektanten ...	92
Abbildung 23: Grafik der Temperaturstabilität der IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukte.....	93
Abbildung 24: Analyse des gemessenen Tumolvolumens der J558L-IgE _{kurz} Transfektanten in NOD/SCID-Mäusen	96
Abbildung 25: FACS-Analyse der Bindung des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts an die Oberflächenmoleküle CD3 ϵ und IgE des Makaken und des Menschen	98
Abbildung 26: Zytotoxizitätstest des IgE-CH3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts α IgE ₁ \times CD3 gegen mit rhIgE transfizierte J558L-Zellen.....	99
Abbildung 27: Lineare und semilogarithmische Darstellung der Bindungskinetik des α IgE ₁ \times CD3-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts an rhesus IgE- und human IgE _{kurz} -transfizierte J558L-Zellen.....	101
Abbildung 28: schematische Darstellung der humanen ϵ -Kette	102
Abbildung 29: FACS-Analyse des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts mit IgE-transfizierten J558L-Zellen.....	105
Abbildung 30: SDS-PAGE und Western Blot des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts	106
Abbildung 31: Grafik der Temperaturstabilität des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts (47H4 \times CD3).....	107
Abbildung 32: Fluoreszenzfärbung des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts auf IgE-beladenen RBL2H3-Zellen	108
Abbildung 33: 51 Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts	109
Abbildung 34: 51 Chromfreisetzungstest des 47H4-BiTE [®] in Anwesenheit von löslichen IgE (slgE)	110
Abbildung 35: 51 Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts mit Fc ϵ RI transfizierten CHO ^{DHFR} -Zellen	111
Abbildung 36: 51 Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts im Vergleich zum IgE-CH3-BiTE	112
Abbildung 37: 51 Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts im Vergleich zum IgE-CH3-BiTE [®] mit U266 Zielzellen in Anwesen-, oder Abwesenheit von slgE.....	113
Abbildung 38: Lineare und semilogarithmische Darstellung der Bindungskinetik des IgE-C ϵ mX-BiTE [®] -Antikörper-Konstrukts	

(47H4 α CD3-BiTE [®]) an human IgE-transfizierte J558LxIgE _{lang} -Zellen, Signal (Y-Achse): Median des Alexa 488-Signals der lebenden Zellpopulation, MFI), X Achse: Konzentration in nM	115
Abbildung 39: räumliche Struktur des Fc-Teils von IgE (adaptiert nach [145])	119
Abbildung 40: schematische Darstellung eines Vergleichs der Exons und homologen Segmente des Menschen (<i>H. sapiens</i>), des Rhesusaffen (<i>M. mulatta</i>) und der Maus (<i>M. musculus</i>).....	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Antikörper gegen IgE auf der Zelloberfläche	33
Tabelle 2: Zusammenfassung der Antikörper zur Überprüfung des Reinheitsgrades isolierter humaner CD8 ⁺ T-Zellen	33
Tabelle 3: Eigenschaften der Maus BD Fc-Block™-Antikörperlösung	34
Tabelle 4: Tabellarische Auflistung der Eigenschaften der elf IgE-CH3-BiTE®-Antikörper-Konstrukte (AbInitio und VectorNTI Advance®)	71
Tabelle 5: Tabellarische Auflistung der Sequenz der IgE-Bindungsregionen des IgE-CεmX-BiTE®-Antikörper-Konstrukts die durch die Programme AbInitio und VectorNTI Advance® ermittelt wurden.	104

Abkürzungen

AS	Aminosäure
BLASTn	<i>Nucleotide-Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
Bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	<i>complementary-DNS</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Region(s)</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Wasser
HKG	<i>housekeeping-gene</i>
IL-2	Interleukin 2
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranosid
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani

M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mIgE	membrangebundenes Immunglobulin E
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
mRNS	<i>messenger RNS</i>
Na ⁺	Natriumion
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	Optische Dichte
Oligo(dT)	Oligodeoxythymidin
ori	<i>origin of replication</i>
p.a.	<i>per analysis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
rhIgE	Rhesus Immunglobulin E
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Size Exclusion Chromatography
slgE	Serum-Immunglobulin E, lösliches Immunglobulin E
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNS-Polymerase
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
ZKÜ	Zellkulturüberstand

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
ε	Epsilon
κ	Kappa
λ	Lambda
μ	Mikro

1 Einleitung

Das therapeutische Konzept der Immuntherapie, körpereigene Immunzellen zu aktivieren und gegen Tumorzellen zu richten, verspricht eine Alternative zu bisherigen Behandlungsformen. Die auf der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen basierende Immuntherapie hat im Dezember 2014 mit der FDA-Zulassung des bispezifischen, monoklonalen Antikörpers Blincyto[®], einen Vertreter in die klinische Anwendung gebracht [1]. Blincyto[®] gehört zur Klasse der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte (BiTE[®], bispecific T-cell Engager), welche durch ihre duale Spezifität Tumorzellen mit zytotoxischen T-Zellen verbinden. Mittels dieser Verbindung wird die T-Zelle aktiviert und setzt daraufhin ihr zytotoxisches Potential gegen die Tumorzelle ein.

BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte richten die körpereigene Immunantwort gegen entartete und krankheitsauslösende Zellen, indem eine der Spezifitäten das CD3 ϵ -Antigen der T-Zelle und die andere Spezifität ein bestimmtes Oberflächenprotein der zu eliminierenden Zellen erkennt. Innerhalb weniger Minuten nachdem das BiTE[®]-Molekül die beiden Zellen in Kontakt gebracht hat, wird die T-Zelle aktiviert und induziert die Perforin- und Granzym-vermittelte Apoptose der Zielzelle [2]. Die hohe Flexibilität von BiTE[®]-Antikörpern, ihr geringes Molekulargewicht von circa 55 kDa und der nachgewiesene klinische Erfolg bei B-zellvermittelten Krankheiten legen nahe, dass IgE-spezifische BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte für Erkrankungen die durch IgE⁺ B-Zellen vermittelt werden, attraktiv sind [3].

Die therapeutischen Erfolge von Blincyto[®] bei der Behandlung von malignen B-Zellerkrankungen belegen den klinischen Nutzen von BiTE[®]-Antikörpern und eröffnen die Perspektive, BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte zur Behandlung weiterer B-Zell-basierter Erkrankungen, auch außerhalb des onkologischen Kontexts, zu entwickeln [4].

1.1 Allergien und IgE positive B-Zellen

Der Begriff „Allergie“ wurde bereits 1907 von Clemens Freiherr von Pirquet geprägt, der den Begriff von den griechischen Wörtern „allos ergon“, was der Übersetzung „andere Tätigkeit“ entspricht, ableitete [5]. Die aktuelle Definition

ist, den immunologischen Erkenntnissen der letzten Jahrhunderte Rechnung tragend, enger gefasst und spricht von einer „symptomatischen Reaktion auf ein normalerweise harmloses Antigen aus der Umgebung“ [6].

Allergien werden vor allem bei der Bevölkerung der Industriegesellschaften diagnostiziert, wobei die Anzahl der Fälle sich in den vergangenen zehn bis fünfzehn Jahren in Nordamerika und Europa verdoppelt hat [6, 7]. Die zunehmende Prävalenz für Asthma bronchiale bei Erwachsenen in Deutschland, Australien und den USA, die damit assoziierten ökonomischen Auswirkungen und die individuellen Einschränkungen der Lebensqualität der Betroffenen, gibt Anlass, eine anhaltend wirksame Behandlungsmethode zu entwickeln [7-10].

Allergien und damit Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ I gehören nach Coombs und Gell zu den Überempfindlichkeitsreaktionen des Soforttyps [11]. Obwohl allergische Reaktionen durch eine Vielzahl von Auslösern wie Nahrungsmittel, Pollen oder Hausstaub hervorgerufen werden können, werden sie alle durch eine Antikörperklasse, die IgE-Antikörper, vermittelt.

Das Immunglobulin E (IgE) ist die antigenerkennende Struktur von IgE positiven (IgE^+) B-Zellen und wird von ihnen in einer Vielzahl von Antigenspezifitäten produziert, wobei jede IgE^+ B-Zelle ein IgE-Antikörper mit einer einzigen Spezifität herstellt. Membrangebundenes Immunglobulin E auf der Zelloberfläche der IgE^+ B-Zellen dient als Antigenrezeptor der Zelle und ist Teil des B-Zellrezeptors (BZR, vgl. auch Kapitel 4.1.1). IgE^+ Plasmazellen, terminal differenzierte IgE^+ B-Zellen, sezernieren Immunglobuline und vermitteln auf diesem Weg die wesentliche Funktion von B-Zellen, welche die Bindung von Pathogenen und toxischen Fremdstoffen ist.

Lösliches IgE (sIgE) wird von Plasmazellen in Lymphknoten, deren Einzugsbereich die Eintrittsstelle des Allergens umfasst, erzeugt. Zudem sezernieren Plasmazellen, die sich aus lokalen Keimzentren im Bereich der allergischen Reaktion entwickeln, IgE-Antikörper. Das von diesen Plasmazellen sezernierte IgE kommt vor allem lokal im Gewebe vor und wird hauptsächlich über den hoch affinen IgE-Rezeptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden.

Eine B-Zelle, die einen Antikörper des IgE-Isotyps synthetisiert, entwickelt sich mit Hilfe von $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen, welche die Interleukine IL-4 und IL-13 sezernieren

und sich wahrscheinlich bevorzugt durch die transmucosale Präsentation geringer Allergendosen bilden. Eine naive B-Zelle präsentiert, nach dem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen, Adhäsionsmoleküle und den niedrig affinen IgE-Rezeptor CD23 auf ihrer Zelloberfläche. Die Adhäsionsmoleküle versetzen Lymphozyten in die Lage, an Endothelzellen zu binden und in das umliegende Gewebe zu transmigrieren. Die aktivierte B-Zelle wird durch die Anhaftung an die Adhäsionsmoleküle des Endothels in T-Zellbereiche in den primären Lymphfollikeln oder Lymphknoten gelenkt. Dort erhält sie durch die T_H2-Zellen ein Überlebenssignal, wenn eine der T_H2-Zellen das von der B-Zelle präsentierte Allergen ebenfalls erkennt. Bis zu diesem Zeitpunkt synthetisiert die B-Zelle einen membranständigen BZR des IgM-Isotyps [12]. Der Isotypwechsel von IgM zu IgE erfolgt nach der klonalen Vermehrung der B-Zelle und der T_H2-Zelle im sogenannten Primärfokus und im Keimzentrum, zu dem sich der Primärfokus weiterentwickelt. Manche der B-Zellen differenzieren zu antikörpersynthetisierenden Plasmablasten des IgE-Isotyps. Diese Plasmablasten können durch unterschiedliche lösliche und komplexierte Fragmente des CD23-Rezeptors zusammen mit membrangebundenem IgE zur IgE-Expression angeregt werden, bevor sie terminal differenziert sind [13]. Plasmablasten sind B-Zellen, die Antikörper freisetzen, sich aber weiterhin teilen und noch viele Merkmale aktivierter B-Zellen aufweisen, wodurch sie weiterhin mit T-Zellen interagieren können. Diese Zellen, die membrangebundenes IgE auf ihrer Oberfläche tragen, hören nach einigen Tagen auf sich zu teilen und sterben entweder ab oder differenzieren sich weiter zu Plasmazellen. Die Entwicklung der B-Zellen im Keimzentrum ist entscheidend für die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, da nur hier die somatische Hypermutation, durch die sich die variablen Regionen der Immunglobulingene verändern, erfolgen kann. Zudem findet hier die Affinitätsreifung statt, bei der B-Zellen, die Antikörper mit hoher Affinität für das Antigen produzieren, selektioniert werden. Dies erfolgt, indem nur B-Zellen mit hoch affinen Antikörpern ein Überlebenssignal bekommen. Eine weitere Charakteristik des Keimzentrums ist die Vermittlung des Isotypwechsels, der es den selektierten B-Zellen ermöglicht, in Form von Antikörpern unterschiedlicher Isotypen eine Vielzahl von Effektorfunktionen bereitzustellen [14].

Die selektierten B-Zellen differenzieren sich später entweder zu B-Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen. Forschungsergebnisse von Talay und Kollegen zeigen, dass naive IgM^+ B-Zellen direkt zu IgE^+ B-Zellen im Keimzentrum differenzieren können und dass diese IgE^+ B-Zellen wiederum zu IgE^+ Gedächtnis-B-Zellen maturieren [15]. B-Gedächtniszellen sind langlebig und teilen sich, wenn überhaupt, nur sehr langsam. Sie exprimieren Immunglobulin auf ihrer Oberfläche und sezernieren keine Antikörper. Eine Immunreaktion, die auf B-Gedächtniszellen zurückgeht, zeichnet sich durch eine hohe Anzahl verschiedener Antikörper, die bereits einen Isotypwechsel vollzogen haben und veränderte Sequenzen in den variablen Ketten nach erfolgter somatischer Hypermutation aufweisen, aus. Die Zellen exprimieren zudem mehr kostimulatorische Rezeptoren und Moleküle zur Antigenpräsentation. Die Immunantwort auf Grundlage von B-Gedächtniszellen ist aus diesen Gründen spezifischer und schneller als die Immunantwort während der ersten Antigenexposition und wird mit jeder neuen Allergenaufnahme weiter optimiert.

Die von Talay und Mitarbeitern beschriebenen IgE^+ Gedächtnis-B-Zellen differenzieren mehrheitlich zu kurzlebigen Plasmazellen und nur ein kleiner Teil zu langlebigen Plasmazellen im Knochenmark, der Milz und den Lymphknoten. Nach 35 Tagen Antigenexposition von Mäusen sind 15-20 % der Zellen in den Lymphknoten CD138 exprimierende ($CD138^{hi}$) Plasmazellen, jedoch befinden sich nur 3% und 1% der Zellen in Milz und Knochenmark [15]. Die Differenzierung zu Plasmazellen geht mit morphologischen Veränderungen wie einer geringen Oberflächenexpression des IgE -BZR einher. Diese Zellen sind auf die Produktion großer Mengen von sezernierten Antikörpern spezialisiert.

IgE -Antikörper werden von IgE^+ Plasmazellen gebildet und sind der Auslöser aller Hypersensitivitätsreaktionen des Typ I. Es liegt nahe, ein gemeinsames Merkmal von IgE^+ Plasmazellen oder deren Vorläufern zu nutzen, um durch neue Therapien allergische Reaktionen zu reduzieren oder zu verhindern. Obwohl sich die IgE^+ B-Zell-Populationen wie IgE^+ Gedächtnis-B-Zellen, IgE^+ Plasmazellen und deren Vorläufer wissenschaftlichen Forschungen lange Zeit entzogen haben, da sie mit bisherigen Methoden in peripherem Blut und lymphatischen Geweben kaum nachzuweisen waren, zeigen die

Forschungsergebnisse der letzten 10 Jahre, dass diese Zellen existieren und dass sie durch die Expression des membrangebundenen IgE (BZR) charakterisiert sind ([16-19], vgl. Kapitel 5.1).

1.2 Bispezifische Antikörper, BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte und deren Eigenschaften

1.2.1 Bispezifische Antikörper

Beginnend mit der Entdeckung der Struktur von Immunglobulinen durch Rodney Porter 1958 und Nisonoffs erstem F(ab')₂-Molekül mit dualer Spezifität, werden bereits bispezifische Antikörper entwickelt [20, 21]. Die Veröffentlichung der Hybridomtechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper durch Köhler und Milstein, die Entwicklung der Molekularbiologie und neuer Methoden zur Humanisierung von Antikörpern und deren Fragmenten erweiterten die Anwendungsgebiete und verbesserten die Eigenschaften von bispezifischen Antikörpern und deren Derivaten [22-25].

Antikörper dualer Spezifität kommen nicht natürlicherweise vor. Eine Ausnahme bilden bestimmte Antikörper des IgG4-Isotyps, welche posttranslational durch einen Austausch der Fab-Arme gebildet werden [26-29]. Die Entwicklung bispezifischer Antikörper und deren Abkömmlinge ging mit der Erweiterung der Kenntnisse rekombinanter DNS- und Zellfusionstechniken einher und beinhaltet spätestens seit Staerzs Forschungsergebnissen von 1984 die gezielte Reorientierung von T-Zellen zur zellvermittelten Toxizität [30, 31]. Eine der ersten Klassen bispezifischer Antikörper sind Konstrukte, die T-Zellen gegen Zielzellen, insbesondere Krebszellen richten [32, 33].

1.2.2 Die Struktur von „Bispecific T cell Engagers“ (BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten)

BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte sind rekombinante bispezifische Einzelketten-Antikörper, die aus zwei Einzelketten-Antikörperfragmenten („scFv“) bestehen. Einzelketten-Antikörperfragmente oder auch „single chain variable fragments“ (scFv) sind künstlich hergestellte Antikörperfragmente, die die antigenerkennenden Strukturen der variablen Regionen einer schweren (V_H)

und einer leichten Kette (V_L) eines klassischen Antikörpers miteinander über eine verbindende Struktur, den Linker, verknüpfen (vgl. Abbildung 1). Der Linker ist ein Oligopeptid, welches zum Beispiel aus den Aminosäuren Glycin und Serin bestehen kann. Durch die molekularbiologische Modifikation werden die selektiven Eigenschaften der antigenerkennenden Strukturen, der variablen Regionen, bewahrt und die Affinität des Fragments zu seiner Zielstruktur nicht beeinträchtigt. Die antikörpervermittelte Zytotoxizität über die Aktivierung des Komplementsystems und die Bindung an F_c -Rezeptoren von Effektorzellen wird durch die Trennung der variablen Regionen vom F_c -Teil des klassischen Antikörpers verhindert. Die molekularbiologische Verbindung von zwei scFv-Fragmenten unterschiedlicher Spezifität, von der eine gegen die CD3 ϵ -Kette von T-Zellen gerichtet ist und die zweite gegen eine beliebig zu bestimmende Zielstruktur, ergibt ein bispezifisches BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt („bispecific T-cell engager“).

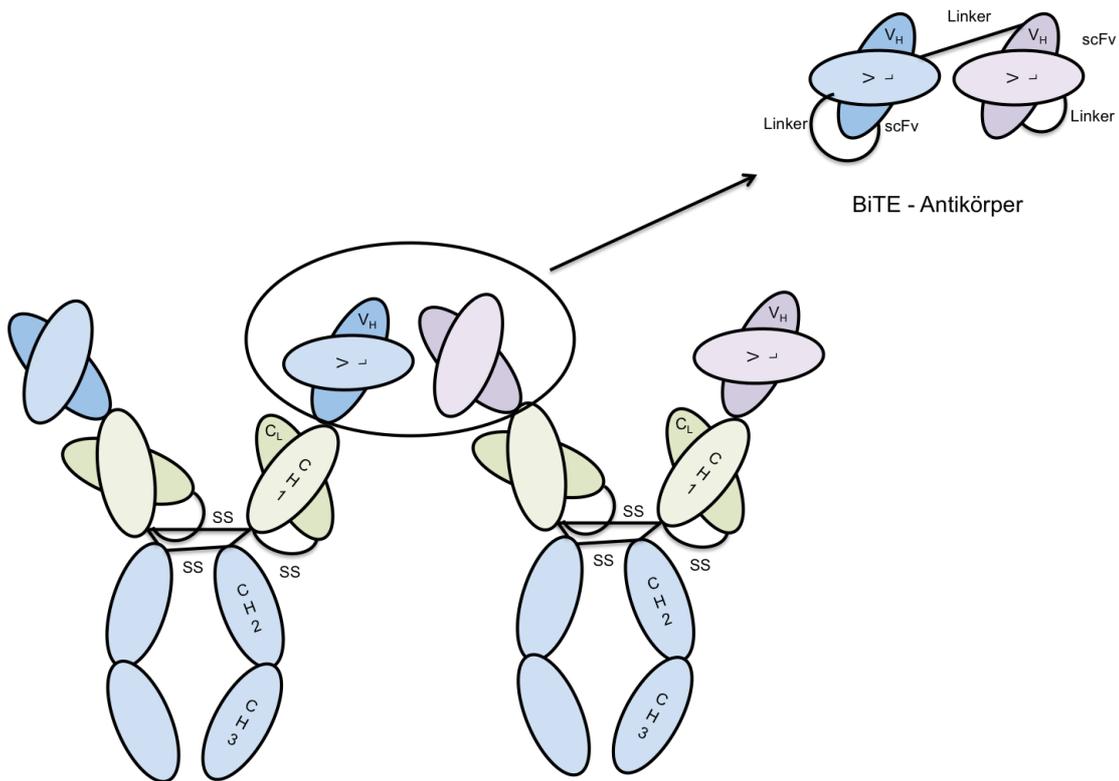


Abbildung 1: Darstellung der Struktur eines BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts und Ursprung der beiden antigenspezifischen Bindungsstellen [34]

Die beiden scFv-Antikörperfragmente sind durch ein kurzes, flexibles Oligopeptid aus den Aminosäuren Glycin und Serin verknüpft, welches die freie Rotation und das Abknicken der beiden Arme ermöglicht (siehe Kapitel 4.1.2.4). Durch die Linkerstrukturen sind die Antikörperfragmente auf einer Polypeptidkette von ca. 55 kDa aufgereiht. Diese spezielle Struktur ist möglicherweise der entscheidende Faktor zur effizienten Induktion der T-Zellaktivierung durch die optimale Interaktion der Epitope der Zielzellen und der T-Zellen auf zwei gegenüberliegenden Zellmembranen. Die geringe Größe erlaubt es BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten, die Zellmembran der Zielzelle und die der T-Zelle nah zueinander zu bringen und damit negativ regulierende Proteine wie CD45 zu verdrängen und eine lytische Synapse zu bilden, die zur Eliminierung der Zielzelle führt [35].

1.2.3 Eigenschaften und Wirkmechanismus von BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten

BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte lösen die apoptoseinduzierenden Wirkmechanismen der zytotoxischen T-Zellen, bei vorübergehendem Zellkontakt mit einer Tumorzelle oder einer anderen Zielzelle aus. Dies erfolgt unabhängig von der Spezifität des T-Zellrezeptors. Die ϵ -Kette des CD3 Moleküls, das zum T-Zellrezeptorkomplex gehört, ist auf allen T-Zellen vorhanden und stellt einen wirkungsvollen Mechanismus zur Stimulation der T-Zellen bereit. Aus diesem Grund ist eine der beiden Spezifitäten der zwei scFv-Moleküle eines BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts gegen diese Oberflächenstruktur der T-Zellen gerichtet. BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte werden als voll funktionsfähiges Molekül effizient in Säugetierzellen produziert. Sie sind zudem in der Lage, ohne die Prä- oder Kostimulation von Effektor-T-Zellen, die T-Zellzytotoxizität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Zielzellen zu richten [29, 33, 36]. BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte vermitteln die serielle Lyse von mehreren Zielzellen durch eine individuelle T-Zelle, was die hohe Effizienz dieses Ansatzes bei niedrigen Zahlenverhältnissen von Effektor- zu Zielzellen erklärt. Der programmierte Zelltod (Apoptose) der Zielzelle wird induziert, wenn durch beide Arme des bispezifischen Antikörpers zytotoxische T-Lymphozyten in Kontakt mit der Zielzelle gebracht werden und die T-Lymphozyten gleichzeitig durch den CD3-bindenden Arm des bispezifischen Antikörpers über den T-Zellrezeptorkomplex (TZR-CD3) stimuliert werden. Die Bindung des BiTE[®]-scFv der für ein Antigen der Zielzellen spezifisch ist, gewährleistet die Selektivität des Antikörpers für die Zielzellen (z.B. Tumorzellen). BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte lösen die Apoptose der Zielzelle durch die Bildung einer immunologischen, zytolytischen Synapse zwischen der Zielzelle und der zytotoxischen T-Zelle aus, die durch die zytotoxischen Granula und durch die Interaktion von Proteinen der TNF-Familie wie Fas und dessen Liganden den Zelltod der Zielzelle herbeiführen. Diese Synapsen sind, bezüglich der Zusammensetzung, der Verteilung der Unterdomänen und ihrer Größe nicht von solchen, die durch physiologische T-Zell-Stimuli herbeigeführt werden, zu unterscheiden [35]. Einige wenige BiTE[®]-Moleküle, die auf der Oberfläche einer Zielzelle gebunden haben, reichen aus, um die Bildung einer Synapse

und damit die Apoptose der Zielzelle auszulösen.

1.2.4 BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte in klinischer Anwendung

Das körpereigene Immunsystem eliminiert entartete Zellen durch CD8⁺ T-Zellen. Trotzdem gelingt es Tumorzellen sich der Eliminierung zu entziehen, indem sie immunsuppressive Signalwege der T-Zellen aktivieren oder die Moleküle zur Antigenpräsentation verändern [37, 38]. BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte sind im Stande, die autologen T-Zellen zu rekrutieren und ihre zytotoxischen Eigenschaften gegen die Tumorzellen zu richten.

Im Dezember 2014 wurde mit Blinatumomab (Blincyto[®]) das erste BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt zugelassen. Blincyto[®] wird zur Behandlung wiederkehrender, Philadelphia-Chromosom negativer Leukämie der B-Zellvorläufer in Europa und in USA zusätzlich bei Philadelphia-Chromosom positiver Leukämie eingesetzt. Blincyto[®] verbindet die beiden Spezifitäten für die ϵ -Kette des CD3 Moleküls des T-Zellrezeptors und für das B-Zell-Oberflächenmolekül CD19 [39]. Die klinische Studie, die zur Zulassung führte, konnte zeigen, dass 32 % der 185 eingeschlossenen Patienten nach der Behandlung für annähernd 6,7 Monate keine Anzeichen der Krankheit aufwiesen [40]. Die Ergebnisse dieser und weiterer klinischer Studien des B-Zellspezifischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts Blinatumomab zeigen die Wirksamkeit und Effizienz der Technologie zur Behandlung bösartiger Erkrankungen der B-Zellreihe [2, 39, 41]. Diese Daten motivieren zur Entwicklung weiterer bispezifischer Antikörper, die spezifisch für Oberflächenmoleküle von krankheitsauslösenden B-Zellen sind.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Prävalenz und damit die Bedeutung von Allergien und atopischen Erkrankungen hat seit den 1970er Jahren in Ländern mit westlichem Lebensstil stark zugenommen. Die Studien des Robert-Koch-Instituts zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland und zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (DEGS I und KiGGS I) zeigen, dass mehr als 20 % der Kinder und mehr als 30 % der Erwachsenen im Laufe ihres Lebens von mindestens einer allergischen Erkrankung betroffen sind [42, 43].

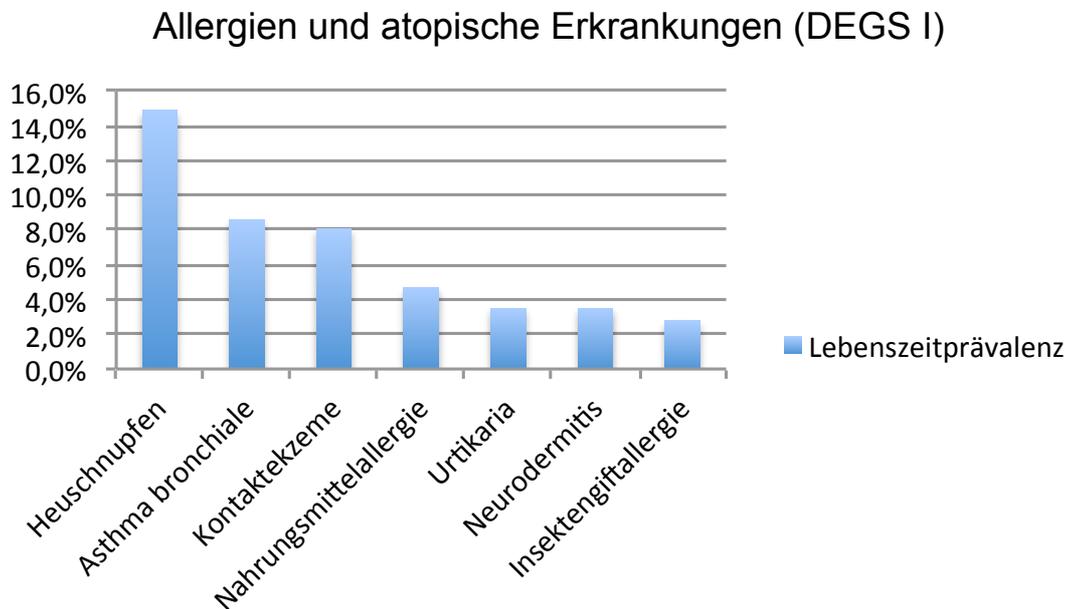


Abbildung 2: Lebenszeitprävalenz allergischer und atopischer Erkrankungen Erwachsener in Deutschland [42]

Die Datenerhebung des Robert-Koch-Instituts von 2008 bis 2012 zeigt, dass Heuschnupfen (allergische Rhinitis) die höchste Lebenszeitprävalenz von 14,9 % hat, gefolgt von Asthma bronchiale mit 8,6 %, dessen Lebenszeitprävalenz als einzige allergische Erkrankung seit 1998 um 3 % zugenommen hat (vgl. Abbildung 2). Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens ein Kontaktekzem zu entwickeln, gleicht in etwa der an Asthma bronchiale zu erkranken, während Nahrungsmittelallergien, Urtikaria, Neurodermitis und Insektengiftallergien weniger häufig auftreten. Die Studie zeigt die volkswirtschaftliche und individuelle Bedeutung von Allergien und atopischen Erkrankungen.

Omalizumab, ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen humanes IgE, ist bereits seit 2005 in Europa zugelassen und bewirkt bei schwerem Asthma und Urtikaria eine Verbesserung der allergischen Symptome. Omalizumab,

von Novartis unter dem Produktnamen Xolair[®] angeboten, bindet an die CH3-Domäne des humanen IgE und verhindert so dessen Bindung an die Rezeptoren der Mastzellen und der Basophilen. Der monoklonale Antikörper Omalizumab bindet dabei genau an der Stelle des IgE-Moleküls, die bei Bindung von IgE an seinen hoch und an seinen niedrig affinen Rezeptor FcεRI bzw. CD23, verdeckt ist. Die beiden IgE-spezifischen Rezeptoren binden ebenfalls an der CH3-Domäne und maskieren so die Bindungsstelle, die Omalizumab zur Erkennung benötigt. Omalizumab bindet freie, lösliche IgE-Moleküle und blockiert dadurch deren Bindung an den FcεRI. Die Antikörperkomplexe aus Omalizumab und körpereigenem IgE werden anschließend abgebaut. Die Mastzellen verarmen zunehmend an gebundenem IgE auf ihrer Zelloberfläche und sind deshalb weniger reaktiv gegenüber spezifischen Allergenen. Sie reduzieren als Folge die Expression des FcεRI [44]. Durch die Behandlung mit Omalizumab können die Symptome der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas früh abgeschwächt werden [45-47]. Obwohl die regelmäßige, subkutane Verabreichung des Medikaments eine Reduktion des IgE-Titers bewirkt, kann er die Produktion von IgE nicht unterbinden. Ein zielgerichteter, bispezifischer Antikörper des BiTE[®]-Formats könnte die Ursache allergischer Reaktionen, die IgE produzierenden langlebigen Plasmazellen und IgE⁺ Gedächtnis-B-Zellen angehen und eliminieren. Den Patienten stünde eine langfristige Befreiung von den Symptomen allergischer Erkrankungen in Aussicht.

Unter Berücksichtigung der klinischen Wirksamkeit des ebenfalls B-Zell-spezifischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts Blinatumomab (Blinicyto[®]), ist es vielversprechend, ein BiTE[®]-Molekül mit der Spezifität für membrangebundenes IgE auf B-Zellen und der CD3ε-Kette auf der Zelloberfläche von T-Zellen zur Therapie allergischer Erkrankungen zu entwickeln. Im Gegensatz zu Omalizumab müsste diese Therapie nicht fortwährend in einem zweiwöchigen Rythmus erfolgen, sondern könnte endlich sein. Die eliminierten B-Zellen würden kein IgE mehr nachproduzieren können.

Wie die Omalizumab-Therapie neue Einblicke in die Regulation der IgE-Immunantwort ermöglichte, so birgt die Entwicklung IgE-spezifischer BiTE[®]-

Antikörper-Konstrukte zusätzlich Potential, die bisherigen Forschungsergebnisse zu IgE⁺ Gedächtnis-B-Zellen und IgE⁺ Plasmazellen zu ergänzen oder zu bestätigen.

2 Material

Im Folgenden werden alle verwendeten Materialien vermerkt. Bei einigen dieser Stoffe handelt es sich um toxische oder gar kanzerogene Agenzien. Eine allgemeine Vorsicht im Umgang mit diesen Stoffen ist angebracht. Grundsätzlich sollte immer mit Handschuhen und Laborkleidung gearbeitet werden und im Speziellen mit zusätzlicher Schutzausrüstung wie einem Mundschutz.

2.1 Chemikalien

Adenosin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Agarose GTG Seakem	Biozym, Hess, Oldendorf
Agarose LE	Biozym, Hess, Oldendorf
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Chrom ⁵¹	Hartmann Analytic, Braunschweig
Citrat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
L-Lysin	Merck, Darmstadt
Lysin	Merck, Darmstadt
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Thymidine 99-100%	Sigma, Deisenhofen
Tris-Puffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt
2'-Deoxyadenosine monohydrat	Sigma, Deisenhofen

2.2 Verbrauchsmaterial

1 ml serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg
---------------------------	------------------------------

1 ml Plastikgefäß Falcon spitz	Becton Dickinson, Heidelberg
1 ml serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg
2 ml serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg
48 Loch Zellkulturplatte	Becton Dickinson, Heidelberg
ml serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg
5 ml Plastikgefäß Falcon spitz	Becton Dickinson, Heidelberg
5 ml serologische Pipette	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Loch-V-Boden-Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch-F-Bode-Mikrotiterplatte, steril	Greiner, Frickenhausen
96-Loch-U-Boden-Mikrotiterplatte, Bakterienkultur	Nunc, Langenselbold
96-Loch-U-Boden-Mikrotiterplatte, steril	Greiner, Frickenhausen
96-Loch-V-Boden-Mikrotiterplatte, steril	Greiner, Frickenhausen
Acrodisk Sterilfilter	PALL, Dreieich
Acrodisk Sterilfilter 13 mm	PALL, Dreieich
C-Chip, Zählkammer	Biochrom, Berlin
Combitips plus für Repeater, 5ml, 10ml, 15ml	Eppendorf, Hamburg
Costar EIA/RIA 96 well Half Area, Flat Bottom,	Corning, Amsterdam, NL
Cryotube Röhrchen, Zell-Einfrierröhrchen	Nunc, Langenselbold
Drygalski-Spatel steril	VWR, Darmstadt
Einmalkanüle Supra 2 x 120 mm	Erhardt Medizinprodukte, Geislingen an der Steige
Erlenmeyerkolben 25 ml, 50 ml, 100 ml und 200 ml	Corning, Amsterdam, NL
Falcon 6 Loch-, 12 Loch-, 24 Loch-Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Genepulser Elektroporations- Küvette	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gilson Diamond Tipack, steril (10-100 µl)	Neolab, Heidelberg
Gilson Diamond Tower(10-100 µl),High Binding, Nummer # 3690	Corning, Wiesbaden
HiLoad 16/600 200 pg Superdex	GE Healthcare, München
iBlot® Transfer stack, nitrocellulose, mini	Life technologies, Darmstadt
Leucosep-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Maxisorp 96-Loch-ELISA-Mikrotiterplatte	Nunc, Langenselbold
Micronic FACS Röhrchen	Lelystad, NL

Mikro-Schraubröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	American National Can, Chicago,IL,USA
PCR Reaktionsgefäße/Strips	Neolab, Heidelberg
Petrischalen Durchmesser 14,5 cm	Greiner, Frickenhausen
Pipettierreservoir für Mehrkanalpipetten	Ratiolab, Dreeich
Reagenzreservoir steril	Neolab, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Roller Bottle Kulturflasche 1700 cm ²	Corning, Amsterdam, NL
Roller Bottle Kulturflasche 850 cm ²	Corning, Amsterdam, NL
Round Bottom Snap cap	Becton Dickinson, Heidelberg
Rundboden-Polystyren-Röhrchen, 10 ml	Nunc, Langenselbold
Safegrip Handschuhe Nitril	SLG, Gauting
Skalpelle	Roth, Karlsruhe
Spitzboden-Polystyren-Röhrchen, 10 ml	Nunc, Langenselbold
Spritzen (2 ml-50 ml);Discardit	Becton Dickinson, Heidelberg
Stericap plus	Millipore, Schwalbach/Ts.
Stericap Plus Filtereinheit	Merck Millipore, Billerica
Vivaspin 20 Aufkonzentrierungseinheit	Sarstedt, Nürnberg
Vivaspin 500 Aufkonzentrierungseinheit	Sarstedt, Nürnberg
Vivaspin turbo 15 Aufkonzentrierungseinheit	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflasche 175 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche 25 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche Suspension 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche Suspension 250 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche Suspension 550 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche Suspension 650 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb 40 µm bis 70 µm Maschenweite	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugationsbecher 500 ml	Corning, Amsterdam, NL

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 kommerzielle Puffer und Lösungen

Aceton	Merck, Darmstadt
Ampuwa® Steriles Wasser	Fresenius, Bad Homburg
BCIP®/ NBT Liquid Substrate System	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin
Bis-Tris Gele, 15 well, 1,5 mm	life technologies, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Eisessig/konzentrierte Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung	Applichem, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
InstantBlue	Expedeon, Cambridge, UK
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard	life technologies, Darmstadt
NuPAGE® 20x MES	life technologies, Darmstadt
NuPAGE® Novex 4-12 %	life technologies, Darmstadt
PBS (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	Biochrom, Berlin
SDS Running Buffer (20x) Darmstadt	life technologies, Darmstadt
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe
UltraPure Water	Biochrom, Berlin
Wasser für die Molekularbiologie, DEPC behandelt	Roth, Karlsruhe
Zytofix/ Zytoperm™	Becton Dickinson, Heidelberg

2.3.2 hergestellte Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung

3 M Natriumacetatlösung:

24,61 g Natriumacetat

auf 100 ml mit sterilem Wasser (Ampuwa®) auffüllen und mit konzentrierter Essigsäure (Eisessig) auf pH 6,0 einstellen

ELISA Bindungs-Puffer:

0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5

Entspricht auf einen Liter:

7,13 g NaHCO₃

1,59 g Na₂CO₃

mit sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen und mit 5 M NaOH/ 5 M HCl auf pH 9,5 einstellen

IMAC Equilibrierungspuffer A:

100 mM NaCl

20 mM Na₂HPO₄

5 % Glycerol

Entspricht auf einen Liter:

5,84 g NaCl

3,56 g Na₂HPO₄

5 ml Glycerol

mit sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen und mit 5 M NaOH/ 5 M HCl auf pH 7,2 einstellen

IMAC Elutionspuffer B:

100 mM NaCl

20 mM Na₂HPO₄

500 mM Imidazol

5 % Glycerol

Entspricht auf einen Liter:

5,84 g NaCl

3,56 g Na₂HPO₄

34,04 g Imidazol

5 ml Glycerol

mit sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen und mit 5 M NaOH/ 5 M HCl auf pH 7,2 einstellen

Erythrozytenlysepuffer :

0,15 M NH_4Cl

10 mM KHCO_3

0,1 mM Na_2EDTA

Entspricht auf einen Liter:

8,29 g NH_4Cl

1 g KHCO_3

37, mg Na_2EDTA

In 800 ml sterilem Wasser (Ampuwa[®]) lösen, den pH mit 5 M NaOH/ 5 M HCl auf pH 7,2-7,4 einstellen und auf 1 L mit sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen, steril filtrieren

Citrat/ Lysin-Puffer (10/ 75 CL):

10 mM Citrat

75 mM Lysin

Entspricht auf einen Liter:

2,1 g Citrat

13,7 g Lysin

mit sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen und mit 5 M NaOH/ 5 M HCl auf pH 7,0 einstellen

Trehalose-Stammlösung (24 %):

1 L Citrat/ Lysin-Puffer

24 g Trehalose

anschließend steril filtrieren (0,2 μm Maschenweite)

50 x Tris-Azetat-EDTA-Puffer (TAE, Gelelektrophoresepuffer):

EDTA-Ausgangslösung:

0,5 M EDTA

400 ml sterilem Wasser (Ampuwa[®])

Das entspricht auf 500 ml Puffervolumen 93,05 g Na_2EDTA .

Na_2EDTA in 400 ml sterilem Wasser (Ampuwa[®]) lösen, mit 5 M NaOH auf pH 8 einstellen und anschließend auf 500 ml Volumen mit sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen.

50 x TAE-Puffer:

242 g Tris Base

in 750 ml sterilem Wasser (Ampuwa[®]) lösen

57,1 ml reine Essigsäure

100 ml der EDTA-Ausgangslösung pH 8

alle Komponenten vorsichtig mischen und dann mit sterilem Wasser (Ampuwa®) auf 1 L auffüllen, die Lösung soll circa pH 8,5 aufweisen

Arbeitsverdünnung 1 x TAE:

40 mM Tris-Azetat

1 mM EDTA

dazu 50 x TAE 1:50 in Ampuwa verdünnen

10 % Triton-X100-Lösung:

5 ml Triton-X100

45 ml steriles Wasser (Ampuwa®)

über Nacht bei RT lösen und zur Verwendung 1:10 in sterilem Wasser (Ampuwa®) verdünnen

1 M MgCl₂-Lösung

203,3 g MgCl₂*6H₂O

800 ml steriles Wasser (Ampuwa®)

MgCl₂*6H₂O in sterilem Wasser (Ampuwa®) lösen und anschließend auf 1 L mit sterilem Wasser (Ampuwa®) auffüllen, dann autoklavieren.

2.4 kommerzielle, gebrauchsfertige Reagenzien und Versuchsanordnungen („Kits“)

CD8 ⁺ T-cell isolation kit, human	Milteniy Biotech, Bergisch Gladbach
Endosafe®-PTS/MCS	Charles River, Sulzfeld
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
iBlot™, Dry Blotting System	Life Technologies, Darmstadt
Q5® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini it	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas, St.Leon-Rot
Venor®Gem Advance Mycoplasmentest-Kit	Biochrom, Berlin

2.5 Antikörper / Proteine

Ratte IgG1, Kappa, Isotypkontrolle	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti Maus-CD16/ CD32 (Maus BD Fc-Block TM), Klon 2.4G2	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC Hamster IgG2, Lambda 1, Isotypkontrolle	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC Ratte IgG1, Kappa, Isotypkontrolle	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte-Anti-Human IL-6	Becton Dickinson, Heidelberg
FITC polyklonaler Kaninchen anti-Human IgE	Dako, Hamburg
Penta-His TM Antikörper, BSA-frei, monoklonales Maus-IgG	Qiagen, Hilden
Monoklonaler Maus anti FLAG [®] -M2 IgG1	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Chimäres humanes IgE anti TNP, MCA 333B	Serotec, Düsseldorf
PE-Maus-IgG1kappa-anti-Human CD3, UCHT-1	Becton Dickinson, Heidelberg
Ziege anti-Human IgG, Fc-Fragment spezifischer Antikörper	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, GBR
Streptavidin-HRP	Becton Dickinson, Heidelberg
ExtrAvidin [®] -POX	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Muronomab-CD3, (Orthoclone OKT3 [®])	Janssen Cilag, Neuss
Maus-Anti-Human CD28 IgG1 Kappa Antikörper, Klon L293	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus-Anti-Human-Maus-Ratte-Huhn IgG2b Antikörper, Klon RD301	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus-Anti-Human CD56 Antikörper, Klon B159	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus IgG3λ-Anti-Human CD3ε Antikörper, Klon Sp34	Becton Dickinson, Heidelberg
PE-Maus IgG1-Anti-Human CD8 Antikörper, Klon RPA-T8	Becton Dickinson, Heidelberg
Rekombinantes humanes IL-2/ Proleukin	Amgen Research, München
47H4schulgEM1	GeneArt, Regensburg

2.6 Enzyme

BspEI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
BstEII-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EcoRI-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Expand TM High Fidelity DNA Polymerase	Roche, Mannheim

FastAP [®] , alkalische Phosphatase	Fermentas, St.Leon-Rot
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Q5 [®] High Fidelity DNS Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SacI	Roche, Mannheim
Sall	Roche, Mannheim
Sall-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SpeI	Roche, Mannheim
XbaI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
XhoI	Roche, Mannheim
XhoI-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.7 Oligonukleotide und Plasmide

Alle Oligonukleotide (DNA Sequenzen s. Anhang)	metabion, Martinsried
pefADA	Micromet AG, München
pefDHFR	Micromet AG, München
pefNeo	Micromet AG, München
pefPur	Micromet AG, München

2.8 Zellen/ Zelllinien

CHO ^{DHFR} -	DSMZ, Braunschweig
HPB-all	DSMZ, Braunschweig
J558L	DSMZ, Braunschweig
LnPx 4419	Prof. Dr. Helmut Fickenscher, Hygiene Institute and Virology, University of Erlangen-Nuernberg
RBL2H3	DSMZ, Braunschweig
U266	DSMZ, Braunschweig

2.8.1 Medien und Zusätze für die eukaryotische Zellkultur

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Eosin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (Versen) 1% (EDTA)	Biochrom, Berlin
G418-Lösung	PAA, Cölbe
HEPES	Biochrom, Berlin

HyClone	Thermo Fisher Scientific, München
L-Alanosin	Developmental Therapeutics Program NCI/ NIH, Bethesda, MD,USA
Natriumcarbonat	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
NEAA (nicht essentielle Aminosäuren)	Biochrom, Berlin
Nucleoside	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/ Streptomycin- Lösung	Biochrom, Berlin
Pentostatin (dCF), Nipent [®]	Hospira, München
Puromycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
MEM mit Earle's Salzen mit 2,2 g/L NaHCO ₃ , mit stabilem Glutamin	Biochrom, Berlin
Freestyle™ 293 Expression Medium	Gibco, Paisly, GBR
Opti-MEM™ I, reduced serum media	life technologies, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Dialysiertes fötales Kälberserum (diFCS)	Biochrom, Berlin
Methotrexat (MTX)	Hexal, Holzkirchen
Blasticidin	Gibco, Paisly, GBR
Puromycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
293fectin™, Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
FuGene [®] 6, Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Phenolrot	Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.8.2 hergestellte Medien und Zusätze und deren Zusammensetzung für die eukaryotische Zellkultur

RPMI all:

500 ml RPMI 1640

500 µl β-Mercaptoethanol

5 ml HEPES

5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

5 ml Natriumpyruvat

5 ml nicht essentielle Aminosäuren

50 ml Fötale Kälberserum

DMEM all:

500 ml DMEM

500 µl β-Mercaptoethanol

5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

50 ml Fötale Kälberserum

RPMI diFCS, Primärselektion:

500 ml RPMI 1640

500 µl β-Mercaptoethanol

5 ml HEPES

5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

5 ml Natriumpyruvat

5 ml nicht essentielle Aminosäuren

50 ml dialysiertes fötales Kälberserum

bei Amplifikation: entsprechend der Stufe 20 nM MTX bzw. 100 nM MTX

Hyclone Primärselektion:

1000 ml HyClone

2 ml Phenolrot

10 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Bei Amplifikation: entsprechend der Stufe 20 nM bzw. 100 nM MTX

MEM mit Earles Salzen:

500 ml MEM mit Earles's Salzen mit 2,2 g/L NaHCO₃ mit stabilem Glutamin

5 ml Penicillin/ Streptomycin

50 ml Fötale Kälberserum

Nukleosidlösung (200 x):

100 mg Adenosine

100 mg 2'-Deoxyadenosine monohydrat

100 mg Thymidine

in 50 ml PBS lösen, steril filtrieren und bei -20°C lagern

2.9 Bakterien

XLI Blue elektrokompente Zellen

Agilent Technologies, Oberhaching

2.9.1 Medien und Zusätze für die prokaryotische Zellkultur

Ampicillin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Carbenicillin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glucose 40 %	Braun, Melsungen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Pepton	Roth, Karlsruhe

2.9.2 hergestellte Medien und Zusätze und deren Zusammensetzung für die prokaryotische Zellkultur

LB-Medium:

20 g LB-Medium (Lennox) von Carl Roth
mit 1 L sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen und autoklavieren

LB-Agar:

35 g LB-Agar (Lennox) von Carl Roth
mit 1 L sterilem Wasser (Ampuwa[®]) auffüllen und autoklavieren

2.10 Geräte und Messstationen

Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ System	Bio-Rad, Hercules, Ca, USA
Bio-Rad MicroPulser™ Electroporator	Bio-Rad, Hercules, Ca, USA
Bio-Rad Subcell [®] GT System	Bio-Rad, Hercules, Ca, USA
Dynal Magnet MPC-1	Dynal, Hamburg
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge kühlbar 5415 R	Eppendorf, Hamburg
FACS Calibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Canto™	Becton Dickinson, Heidelberg
Heracell CO ₂ -Inkubatoren aus rostfreiem Stahl	Thermo Fisher Scientific, München
Microtek Bio-5000 Professional Gel Scanner	Microtek, Hsinchu, Taiwan
Syngene-Geldokumentationsgerät	Syngene, Cambridge, UK
Automatischer Gammazähler 2470 Wizard 2	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.11 Computersoftware und Datenbanken

Ablnatio	AMGEN, Thousand Oaks, USA
BD CellQuest® Pro 6.0	BD, Heidelberg
BD FACSDIVA™	BD, Heidelberg
FlowJo 10	Treestar, Ashland, USA
Gen5-Software	Biotek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism 6.02	GraphPad, San Diego, USA
Unicorn Control Software	GE lifesciences, Freiburg
Vector NTI Advance® 11.5.0	lifetechnologies, Darmstadt
Vivo Manager	Biosystemes, Couternon, FR
Datenbank der variablen Gene der Keimbahn von Maus und Mensch (VBASE2): http://www.vbase2.org	
Datenbank zur Suche vergleichbarer Nukleotidsequenzen (NCBI-BLAST): http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	
Medizinische Nationalbibliothek der Vereinigten Staaten (PubMed): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zelllinien

Eukaryotische Zellen werden in flüssigem Stickstoff bei -178 °C gelagert. Die Zellen müssen dazu in einem Einfriermedium aus 90 % FCS (Biochrom) mit 10 % DMSO (applichem) resuspendiert werden. Das DMSO verhindert die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses. Eiskristalle würden die Zellmembran permeabilisieren und die Zelle auf diese Weise töten.

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von $2\text{-}5 \cdot 10^6$ in einem ml FCS resuspendiert. Daraufhin gab man 100 μl DMSO unter leichtem Schwenken dazu und überführte die Suspension sofort in ein Plastikeinfrierröhrchen (nunc, 1,5 ml Volumen). Das Röhrchen wurde in einen vorgekühlten (4 °C), mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter gestellt und über Nacht in einen -80 °C kalten Gefrierschrank verbracht. Der Einfrierbehälter (Mr. Frosty™, thermo scientific) ermöglichte einen schonenden, konstanten Einfrierprozess indem er sich ein Grad Celsius pro Minute abkühlt. Im Anschluss wurden die Zellen in einem Stickstofftank, gefüllt mit Stickstoffdampf, gelagert.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank genommen und in einem Wasserbad, das auf 37 °C geheizt war, aufgetaut. Die Zellen wurden mit einer 5 ml-Einmalpipette aus dem Röhrchen in vorbereitetes, 37 °C warmes Kulturmedium (4 ml) überführt. Das 15 ml-Röhrchen mit dem Kulturmedium der Zellen und den aufgetauten Zellen wurde bei $0,1 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann im entsprechenden Kulturmedium der Zellen aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und weiterkultiviert.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Primärzellen und Zelllinien wurde eine Eosin-Vitalfärbung durchgeführt. Der Farbstoff Eosin kann nur die

permeable Membran toter Zellen durchdringen und lässt diese dadurch unter dem Mikroskop rot erscheinen. Einer Zellsuspension wurden dazu 10 µl entnommen und diese bei Bedarf 1:10 oder 1:100 verdünnt. 10 µl der Suspension wurden dann mit weiteren 10 µl der Eosinlösung (Carl Roth) gemischt und in eine C-Chip-Zählkammer (Biochrom) gegeben. Die Zählkammer basierte auf einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 0,1 mm; Kammerfaktor: 10^4) und ließ durch Auszählen aller vier Quadrate (16er-Feld) Rückschlüsse auf die Zellzahl der Ausgangslösung zu. Die untenstehende Formel definierte die Zellzahl pro ml der Ausgangs-Zellsuspension.

$$X = \text{Zellzahl}_{16\text{er-Feld}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.1.3 Klonierung transfizierter Zellen durch limitierende Verdünnung

Die Transfektion einer Zelllinie mit einem Expressionsplasmid zur Expression eines Antigens oder eines BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts resultierte in einigen Fällen in einer variierenden Expressionsstärke. Insbesondere im Falle der Expression eines Oberflächenmoleküls durch die transfizierte Zelllinie war häufig eine konstant starke Oberflächenpräsentation des Moleküls erwünscht. Die konstante Expression konnte durch das Klonen einer transfizierten Zellpopulation erzielt werden. Dazu bediente man sich dem Verfahren der limitierenden Verdünnung. Zunächst wurde die Zellzahl einer Probe der transfizierten, positiv-getesteten Zellpopulation bestimmt (vgl. Kapitel 3.1.2). Nun wurde eine Verdünnung der Kultur hergestellt, in der die zu klonierenden Zellen eine Konzentration von 0,4 Zellen/ 300 µl Kulturmedium aufwiesen. Diese Verdünnung wurde nun auf beliebig viele 96-Loch-Mikrotiterplatten verteilt, wobei jede Vertiefung mit 300 µl der Verdünnung befüllt wurde. Statistisch gesehen folgte das Klonen der Poisson-Verteilung, welche die zufällige Verteilung von Objekten beschreibt. Manche Vertiefungen wurden demnach mit keiner, andere mit einer und wieder andere mit mehreren Zellen befüllt. Das Ziel war, die Vertiefungen auszuwählen, in denen ein Zellklon wuchs und diesen dann auf dessen Oberflächenexpression des Zielantigens zu testen. Die Mikrotiterplatten wurden dann bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Mikrotiterplatten kontrolliert und die Vertiefungen markiert, die lediglich einen Klon beinhalteten. Dieser Klon wurde dann weiterkultiviert, expandiert und bei

entsprechender Zellzahl auf die Expression des Antigens getestet (siehe Kapitel 3.1.8.1).

3.1.4 Erythrozytenlyse

Erythrozyten sind im Vergleich zu Leukozyten und anderen kernhaltigen Zellen empfindlicher gegenüber hypotoner Lyse und können aufgrund dessen aus einem Zellgemisch entfernt werden.

Der Erythrozytenlysepuffer macht die Zellmembran der Erythrozyten durchlässig und lysierte sie. Zum Zellpellet der Zellsuspension wurden 5 ml des Erythrozytenlysepuffers gegeben, das Pellet vorsichtig resuspendiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe von 20 ml RPMI all gestoppt und die Suspension für 5 min bei 4 °C und 0,1 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen noch zwei weitere Male mit RPMI all (15 ml) resuspendiert und wie oben beschrieben, zentrifugiert.

Abschließend wurden die Zellen zur weiteren Verwendung in einem geeigneten Puffer oder einem geeigneten Kulturmedium aufgenommen.

3.1.5 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) aus humanem Blut

Zur Gewinnung von humanen PBMZ wurden diese über einen Ficoll-Dichtegradienten aus heparinisiertem Blut gesunder Spender von Blutplasma und Erythrozyten separiert. Dazu wurden 15 ml Ficoll-Separationsmedium (Biocoll, Biochrom) in ein 50 ml-Leucosep-Röhrchen (greiner) gegeben und beides bei 314 x g für 1 min zentrifugiert. Dabei wechselte das Ficoll von über nach unter die Separations-Fritte des Röhrchens. Das Röhrchen wurde dann mit maximal 20 ml (bis zur 35 ml Marke) humanem Blut befüllt und anschließend bei RT und 423 x g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der dabei entstehende Dichtegradient ermöglichte die Auftrennung der Erythrozyten und Leukozyten. Im oberen Teil der Flüssigkeitssäule des Röhrchens war das Blutplasma zu finden, während direkt darunter die Interphase mit den Leukozyten zu sehen war. Im unteren Teil der Flüssigkeitssäule im Röhrchen unter der Separations-Fritte befanden sich die Erythrozyten.

Die Interphase wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Wurden mehrere Leucosep-Röhrchen verwendet, so wurde jede Interphase der Leukozyten in ein separates 50 ml-Röhrchen überführt und jeweils mit kaltem FACS-Puffer (PBS/ 2 % FCS) aufgefüllt. Nach zweimaligem, leichtem Invertieren des Röhrchens wurden die Zellen bei 4 °C und 423 x g für 5 min zentrifugiert. Verblieben im Zellpellet zu viele Erythrozyten, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.4). Die Zellen eines Spenders wurden schließlich in einem Röhrchen in kaltem FACS-Puffer zusammengeführt und die Zellzahl bestimmt (vgl. Kapitel 3.1.2).

3.1.6 Stimulation humaner PBMZ

Zur Durchführung von Zytotoxizitätstests war bei manchen Experimentansätzen eine Prästimulation der CD3⁺ und CD28⁺ Zellen innerhalb der Zellpopulation der PBMZ erwünscht.

Naive T-Zellen wurden durch die Interaktion ihres spezifischen T-Zellrezeptorkomplexes mit einem Antigenpeptid:MHC-Komplex aktiviert. Der Heterodimer aus einer α - und einer β - Kette des spezifischen T-Zellrezeptors erkennt seinen Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen. Doch erst dessen Verbindung mit dem CD3-Komplex, der aus vier Proteinketten, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ und CD3 ζ besteht, leitet das Aktivierungssignal weiter. Naive CD4⁺ T-Zellen benötigen 10-15 Antigenpeptid:MHC-Komplexe zur Aktivierung, während zytotoxische CD8⁺ Effektorzellen lediglich 1-3 der Komplexe ausreichen [6]. Der CD3-Komplex ist essentiell für den Transport des T-Zellrezeptors an die Zelloberfläche der T-Zelle und für dessen Signalweiterleitung ins Zellinnere. Das Oberflächenprotein CD28 kommt auf naiven T-Zellen vor und vermittelt ein essentielles kostimulatorisches Signal während der Aktivierung dieser T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen [6].

Die Stimulation von T-Zellen über diese beiden T-zellspezifischen Rezeptoren erfolgte mittels immobilisierter Antikörper gegen diese Rezeptoren. Dazu wurde eine Petrischale (Greiner; 14,5 mm Durchmesser) mit 30 ml PBS (Biochrom) in welchem 30 μ l eines anti-human-CD3-Antikörpers (Orthoclone OKT3[®], Janssen-Cilag GmbH; 1 mg/ml) und 30 μ l eines anti-human-CD28-Antikörpers (BD, 1 mg/ml, endotoxinarm) gelöst waren, präpariert. Nachdem

die Lösung zur Immobilisierung der Antikörper in der Petrischale für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde, wurde sie abgezogen und ungebundene Antikörper entfernt, indem die Petrischale einmal mit 30 ml PBS gespült wurde. Nun wurde die Schale mit 100 ml RPMI all-Medium mit 20 U/ml rekombinanten IL-2 (Proleukin, Novartis, 400 µl) befüllt und bis zur Verwendung bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit maximal 72 Stunden gelagert. Interleukin 2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor.

Die isolierten humanen PBMZ wurden nun in der Petrischale für 72 h bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit stimuliert. Je vorbereiteter Petrischale wurden 30 bis maximal 40*10⁶ Zellen kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen in zwei 5 ml Röhrchen überführt und bei 423 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die anschließende erneute Kultivierung der Zellen fand über Nacht bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit statt. Diese wurde in einer T175-Suspensions-Zellkulturflasche (Greiner) in 100 ml RPMI all-Medium mit 20 U/ml IL-2 (400 µl) durchgeführt. Diese zweite Kultivierung, ohne die stimulierenden Antikörper gegen humanes CD3 und CD28 war notwendig, da T-Zellen nach Aktivierung durch ihren Liganden den T-Zell-Rezeptor-Komplex internalisieren. Die Internalisierung wurde bereits von Telerman et al. (1987) und Boyer et al. (1991) belegt und wurde mit der Signaltransduktion ins Zellinnere in Verbindung gebracht [48, 49]. Nach Inkubation der Zellen über Nacht ohne Stimulierung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes wurde dieser wieder an der Zelloberfläche präsentiert. Die stimulierten PBMZ konnten nun eingesetzt werden.

3.1.7 Anreicherung von CD8⁺ T-Lymphozyten aus humanen PBMZ

CD8⁺ T-Lymphozyten sind zytotoxische T-Zellen. Sie erkennen unter anderem virusinfizierte Körperzellen und töten diese ab. Im Gegensatz dazu stehen CD4⁺ T-Zellen die auch als „T-Helferzellen“ bezeichnet werden. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen. Die Anreicherung von humanen CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgt durch negative Selektion der CD4⁺ und CD56⁺ Zellen (siehe Kapitel 3.1.5 und 3.1.6). CD56 ist ein Oberflächenprotein, das auf NK-Zellen vorkommt. Die Entfernung von CD4⁺ T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sollte eine möglichst

reine CD8⁺ T-Zellpopulation zur Folge haben, um einheitliche Ergebnisse eines Chromfreisetzungstests zu erhalten.

Die Depletion von CD4⁺ und CD56⁺ Zellen erfolgte durch die Verwendung von Maus-anti-human-CD4-Antikörpern (BD, 0,5 mg/ml, endotoxinarm) und Maus-anti-human-CD56-Antikörpern (BD, 0,5 mg/ml, endotoxinarm). Dazu wurden die PBMZ bei 423 x g für 6 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend in kaltem FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben bestimmt. Die notwendige Antikörpermenge wurde anhand der Zellzahl bestimmt. Pro 1*10⁷ Zellen wurden 15 µl des anti-human-CD4-Antikörpers und 2,5 µl des anti-human-CD56-Antikörpers eingesetzt. Die Antikörper wurden in 700 µl FACS-Puffer gelöst. Die Suspension wurde 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin bei 423 x g für 6 min zentrifugiert und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Die Zellen (pro 1*10⁷ Zellen) wurden abschließend in 400 µl kaltem FACS-Puffer resuspendiert.

Zur Separation der CD4⁺ und CD56⁺ Zellen von der übrigen Zellsuspension wurden Magnetpartikel eingesetzt (Dynabeads™, Dynal). Die Magnetpartikel mussten vor Verwendung gewaschen werden, indem 100 µl der Magnetpartikelsuspension pro 1*10⁷ Zellen in 1000 µl kaltem FACS-Puffer in einem Reaktionsgefäß gelöst wurden. Die Suspension wurde anschließend für 5 min in den Magneten gespannt, wobei sich die Magnetpartikel an der Stelle sammelten, an der die Anziehung durch den Magneten am stärksten war, so dass die verbleibende Flüssigkeit entfernt werden konnte. Dieser Vorgang wurde noch weiteres Mal wiederholt und die Magnetpartikel anschließend in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Nun wurden die Zellen und die Magnetpartikel zusammengeführt und 30 min bei leichtem Schwenken (200 U/min) und 4 °C auf einem Wipptisch inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Magnetpartikel, die mit einem anti-Maus-Antikörper gekoppelt waren, an die Maus-anti-Human-CD4- und Maus-anti-Human-CD56-Antikörper binden. Die Magnetpartikel-Zell-Suspension wurde anschließend mit adäquatem Volumen (mindestens 2 fach) kaltem FACS-Puffer aufgefüllt und in den Magneten eingespannt. Die Magnetpartikel zogen die gebundenen Zellen an die Wand des Reaktionsgefäßes. Nach 5 min Inkubation konnte die Zellsuspension die im Reaktionsgefäß verblieb,

abgezogen und in ein neues Röhrchen überführt werden. Nun wurde abschließend die Zellzahl der selektionierten Zellen bestimmt.

Um die Reinheit der isolierten Population zu bestimmen, wurden vor und nach der Depletion 100 µl der Zellsuspension entnommen (vgl. Kapitel 3.1.8.1).

3.1.8 Durchflusszytometrie

3.1.8.1 Untersuchung der Expressionseigenschaften von Zelllinien

Die Durchflusszytometrie bot die Möglichkeit die Expression von extra- und intrazellulären Molekülen, sowie das Vorkommen antigenspezifischer Antikörper und deren Derivate zu detektieren. Im Allgemeinen folgte die Durchführung einer Fluoreszenzfärbung immer dem gleichen Muster und wird im Folgenden skizziert. Die eingesetzten Reagenzien wurden je nach Fragestellung und Physiologie des Zielproteins adaptiert.

Die Zellkulturen wurden zunächst in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Adhärente Zellen mussten dazu zuerst durch 2-5 ml PBS/ 0,05 % EDTA bei 37 °C für 5 min, abgelöst werden. Die Suspensionszellen wurden dann, wie die abgelösten adhären Zellen direkt in das 50 ml-Röhrchen überführt und anschließend bei 423 x g für 4 min bei 25 °C zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde erneut bei 423 x g für 4 min bei 25 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in einer adäquaten Menge PBS aufgenommen um sie, bei Bedarf nach erneuter Verdünnung mit PBS, in einer C-Chip-Zählkammer zu zählen (siehe Kapitel 3.1.2). Nachdem die Zellzahl bestimmt war, wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen/ Loch in eine 96-Loch-Spitzbodenplatte (Greiner) überführt. Die Platte wurde nun erneut bei 423 x g für 3 min bei 25 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die vorbereitete Antikörperversdünnung appliziert.

Die Fluoreszenzfärbung von Oberflächenmarkern auf Zellen und intrazellulären Antigenen ermöglichte den Nachweis der Expression dieser Proteine und ließ unter anderem Rückschlüsse auf die Differenzierung und den Zustand der Zellen zu. In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien verwendet, die durch Transfektion, Selektion und Amplifikation in die Lage versetzt wurden Oberflächenmoleküle zu exprimieren, die sie physiologisch nicht produzieren würden. Dazu gehörte unter anderem humanes IgE auf der

Zelloberfläche von CHO^{DHFR}-Zellen, humanes IgE auf J558L-Zellen, sowie die akzessorischen Seitenketten des B-Zellrezeptors CD79a und CD79b. Alle verwendeten Antikörper zur Fluoreszenzmarkierung wurden mit FACS-Puffer (PBS/ 2 % FCS) oder im Falle der intrazellulären Proteinfärbung mit BD Perm/Wash™-Lösung verdünnt. Das Volumen wurde auf 100 µl eingestellt. Die nachfolgenden Tabellen (Tabelle 1 und Tabelle 2) listen die Antikörper auf, die zur Färbung der Oberflächenmoleküle eingesetzt wurden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Antikörper gegen IgE auf der Zelloberfläche

Antigen	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller, Best.-Nr.	Klon
Humanes IgE	Kaninchen	polyklonal	FITC	1:20	Dako, A0094	-
Isotypkontrolle	Ratte	IgG1	FITC	1:100	BD, 559072	-

Tabelle 2: Zusammenfassung der Antikörper zur Überprüfung des Reinheitsgrades isolierter humaner CD8⁺ T-Zellen

Antigen	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller, Best. Nr.	Klon
Humanes CD3	Maus	IgG1,κ	FITC	1:10	BD, 561806	UCHT
Humanes CD8	Maus	IgG1	PE	1:10	BD, 557086	RPA-T8

Die Antikörperverdünnung wurde durch Resuspension der Zellen in die Vertiefungen appliziert und bei 4 °C für 30 min und Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze gewaschen, indem direkt zur Antikörperlösung 100 µl FACS-Puffer gegeben wurden und die Platte wiederum bei 25 °C, 423 x g für 3 min zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets erneut mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Der abschließende Zentrifugationsschritt wurde bei 25 °C, 423 x g für 3 min durchgeführt, die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer

resuspendiert und in geeignete, mit 150 µl FACS-Puffer befüllte, FACS-Probenröhrchen pipettiert.

Die Fluoreszenzfärbung von akzessorischen Effektorzellen wie Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen und B-Zellen, erforderte eine geringe Abweichung von zuvor beschriebenem Versuchsablauf. Die genannten Zellen waren in der Lage über deren Fc-Rezeptoren den konstanten Teil von Immunglobulinen (Fc-Teil) zu binden. Diese Eigenschaft fungiert unter physiologischen Bedingungen als zusätzlicher Abwehrmechanismus der humoralen Immunantwort und ermöglicht die Phagozytose von an Immunglobuline gebundene und neutralisierte Antigene. Da zur Durchflusszytometrie meist fluoreszenzmarkierte ganze Antikörper, deren Fc-Teil durch die Fc-Rezeptoren gebunden werden können, verwendet wurden, wurde eine Vorbehandlung der Zellen durchgeführt. Die freien Fc-Rezeptoren konnten vor der eigentlichen Färbung abgesättigt werden. Dazu wurde der Antikörpermix Maus BD Fc-Block™ (BD) verwendet. Die zentrifugierten Zellen wurden deshalb nicht direkt mit der fluoreszenzmarkierten Antikörperlösung resuspendiert, sondern mit einer 1:100-Verdünnung der Antikörperlösung Maus BD Fc-Block™ (siehe Tabelle 3) in FACS-Puffer gelöst.

Tabelle 3: Eigenschaften der Maus BD Fc-Block™-Antikörperlösung

Antigen	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller, Best. Nr.	Klon
Maus CD16/CD32 (Maus BD Fc-Block™)	Ratte	Ratte IgG2b κ	-	1:100	BD, 553142	2.4G2

Die Blockierlösung wurde 5 min bei 4 °C auf den Zellen inkubiert. Im Weiteren wurde wie bei der Fluoreszenzfärbung von Oberflächenproteinen verfahren, wobei stets darauf geachtet wurde, dass der im zweiten oder dritten Schritt verwendete Antikörper nicht den Antikörper mit dem Isotyp der Maus BD Fc-Block™-Antikörperlösung, also Ratte IgG2bκ, binden konnte.

3.1.9 Transfektion

3.1.9.1 Stabile Transfektion von Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen)

Im Gegensatz zur transienten Transfektion wird das transfizierte Plasmid bei der stabilen Transfektion in das Genom der transfizierten Zellen integriert. Das kodierte Protein wird dann langfristig produzierbar.

Für die Generierung stabiler CHO^{DHFR⁻}-Transfektanten wurden folgende Selektionssysteme verwendet:

- Selektion durch die Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker
- Selektion durch die Adenosindesaminase (ADA) als Selektionsmarker
- Selektion durch Aminoglykosid-Phosphotransferase (APT/NEO) als Selektionsmarker

Eine aus dem Ovarialkarzinom des chinesischen Hamsters isolierte Zelllinie (Chinese Hamster Ovary, CHO) wird seit mehr als 20 Jahren in der biotechnologischen Produktion rekombinanter Proteine verwendet [50, 51]. Eine genetische Variante dieser Zelllinie ist die Dihydrofolatreduktase defiziente CHO-Zelllinie CHO^{DHFR⁻}. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Dihydrofolatreduktase ist ein Schlüsselenzym im C1-Stoffwechsel zahlreicher pro- und eukaryotischer Zellen. Sie katalysiert die Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat und ist damit sowohl für den Stoffwechsel als auch für die *de novo* DNS-Synthese essentiell.

Der erste Selektionsschritt wird durch den Entzug von Nucleosiden umgesetzt. Gegen PBS dialysiertes FCS weist keine ausreichende Menge an Nucleosiden auf und ersetzt herkömmliches, Nucleosid-haltiges FCS. Es stellt damit die für die CHO-Zelllinie essentiellen Nucleoside nicht zur Verfügung. Die Amplifikation der Proteinexpression in diesem System wurde durch die Zugabe von Methotrexat (MTX) erzielt. MTX ist ein Stoff, der die Zellteilung hemmt, indem er als Gegenspieler (Antimetabolit) der für die Zellteilung erforderlichen Folsäure wirkt. Dieser Folsäure-Antagonist wird auch als Zytostatikum in der Krebstherapie eingesetzt. MTX hat eine deutlich höhere Affinität zur DHFR als Folsäure und verhindert so deren Bindung an das Enzym. Durch diese Bindung hemmt MTX die Nucleinsäuresynthese. Der Einsatz von MTX erhöhte den Selektionsdruck auf die erfolgreich transfizierten

Zellen und stellte sicher, dass nur erfolgreich transfizierte Zellen in der Lage waren, trotz MTX, ausreichend Nukleinsäure zu synthetisieren. Die MTX-Konzentration förderte die Erhöhung der DHFR-Produktion und provozierte somit eine erhöhte Transkription des eingebauten Zielgens. Die DHFR und das Gen für das rekombinante Protein standen unter der Kontrolle desselben Promotors (bicistronische Proteinexpression).

Das Enzym Adenosin-Desaminase (ADA) katalysiert am aktivsten in Zellen des lymphatischen Systems die Umwandlung von Adenosin zu Inosin. Die Adenosin-Desaminase ist neben der Funktion im Purinstoffwechsel an der Adenosin-Homöostase und der Lymphozyten-Epithelzellinteraktion beteiligt [52].

Die Selektion transfizierter Zellen wurde durch die Zugabe von 1xAAU und Deoxycoformycin (dCF) initiiert. In der AAU-Lösung war L-Alanosin enthalten, welches die Zellen durch Hemmung alternativer Synthesestoffwechselwege von Adenosinmonophosphat (AMP) zwingt, das in toxischen Konzentrationen vorliegende Adenosin über die Adenosinkinase in AMP umzuwandeln. Deoxycoformycin ist, wie MTX, ein Zytostatikum und wirkt als Purin-Antimetabolit, indem es durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Adenosin das Enzym ADA inhibiert. Die DNS-Synthese der Zelle ist dadurch gehemmt. Die erfolgreich transfizierten Zellen integrieren das Plasmid, welches die ADA kodiert, in ihr Genom. Sie konnten durch die zusätzlich erworbene Kopie des Gens, trotz der Inhibition durch dCF, ausreichende Mengen der ADA synthetisieren.

Die Selektion durch die Aminoglykosid-Phosphotransferase ist weniger komplex, wird jedoch häufig zur Selektion genveränderter eukaryotischer Zellen verwendet. Die Aminoglykosid-Phosphotransferase baut, Geneticin (G418), ein Analog zu Neomycinsulfat ab. G418 interferiert mit den 80S-Ribosomen und hemmt dadurch die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen. Das Gen der Aminoglykosid-Phosphotransferase ist dominant aktiv. Zellen die das Plasmid und damit das kodierte Enzym erfolgreich inkorporierten, sind in der Lage das Antibiotikum abzubauen.

3.1.9.1.1 Transfektion von CHO^{DHFR}-Zellen mit membranständigem, humanem Immunglobulin E durch Elektroporation

Die Herstellung stabiler Transfektanten die humanes membranständiges IgE auf der Zelloberfläche präsentierten, wurde durch das pefDHFR-Plasmid ermöglicht. Humanes IgE wurde in diesem Expressionssystem mit den murinen akzessorischen Ketten des Maus-B-Zellrezeptors und der leichten Kette eines Maus-B-Zellrezeptors gepaart. Die Proteine waren ausreichend homolog um humanes IgE korrekt zu falten und an die Zelloberfläche zu transportieren.

3.1.9.1.2 Transfektion von CHO^{DHFR}-Zellen mit BiTE[®]-Molekülen durch Transfektionsreagenzien (FuGENE[®]6)

Die Elektroporation war ein sehr effektives Verfahren, um Zellen zu transfizieren. Da mindestens 100 µg DNS des Gens von Interesse zur Transfektion nötig waren, wurden zusätzliche Schritte, wie die Maxi-Plasmidpräparation (vgl. Kapitel 3.2.1.4), nötig. Die Transfektion mit nicht-liposomalen Transfektionsreagenzien dagegen erforderte weit weniger DNS (3 µg) und wurde deshalb bei der Transfektion von BiTE[®]-Konstrukten, die durch den pefDHFR-Vektor kodiert waren, verwendet.

Die CHO^{DHFR}-Zellen wurden dazu mindestens drei Stunden vor der Transfektion mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 4 ml RPMI all in einer 6-Loch-Platte ausgesät und bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. In dieser Zeit adhärten die Zellen am Boden der Platte, obwohl sie zuvor in HyClone Medium mit supplementierten Nucleosiden an die Kultur in Suspension adaptiert waren.

Die DNS (3 µg) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Lösung auf 100 µl mit RPMI ohne Zusätze aufgefüllt. Ein zweites Reaktionsgefäß wurde mit 6 µl FuGENE[®]6 und 94 µl RPMI ohne Zusätze versehen. Beide Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit formierten sich Komplexe aus DNS und Transfektionsreagenz, so genannte Mizellen. Dabei formte der lipophile Teil des FuGENE[®]6 den Kern der Mizelle, in welchem die DNS eingeschlossen wurde. Die auf diese Weise verpackte DNS wurde direkt auf die ausgesäten Zellen getropft und über Nacht auf den Zellen inkubiert. Während dieser Zeit verschmolzen die Mizellen mit der

Zellmembran und transportierten die DNS auf diesem Weg in die Zelle hinein. Am Folgetag wurde das Medium entfernt, die adhären Zellen einmal mit PBS gespült und daraufhin das Selektionsmedium hinzugegeben. Im ersten Schritt bestand es lediglich aus HyClone Primärselektionsmedium, welches nach 7 maligem passagieren mit 20 nM MTX ergänzt wurde. Wenn eine weitere Amplifikation erwünscht war, wurde es mit 100 nM MTX supplementiert.

3.1.9.2 stabile Transfektion von J558L-Zellen durch Elektroporation

Die J558L-Zelllinie ist eine Myelom-Zelllinie, die eine leichte λ -Kette synthetisiert und sezerniert. J558L-Zellen haben in Kultur, im Gegensatz zu der Ausgangszelllinie J558 die Fähigkeit zur Herstellung einer schweren Kette verloren [53]. Auf Grundlage von Oktay Kiraks Arbeit wurden J558L-Zellen nochmals mit den von ihm erstellten Konstrukten humanen membranständigen IgE transfiziert (vgl. [54]) und anschließend subkloniert.

3.1.10 Präparation kompetenter *Escherichia coli XLI Blue* Bakterien

Die Amplifikation von DNS in Form von Plasmiden ist eine Grundtechnik der Molekularbiologie. Bestimmte Bakterien haben die natürliche Fähigkeit DNS aus ihrer Umgebung aufzunehmen und durch Rekombination in deren Genom zu integrieren. Diese natürliche Kompetenz gilt im Speziellen für *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* und weitere, jedoch nicht für die in dieser Arbeit verwendeten, *Escherichia coli*. Um Plasmide vermehren zu können, wurde *E. coli XLI Blue*, entgegen seiner Physiologie, in die Lage versetzt DNS aus der Umgebung aufzunehmen [55]. Durch einen unbekanntem Mechanismus kann dieses Darmbakterium über eine Hitzeschockbehandlung und einer vorhergehenden Präparation zur DNS-Aufnahme bewegt werden. Die Transformation der Plasmid-DNS in *E.coli XLI Blue* ermöglichte die schnelle und starke Amplifikation, sowie hohe Sicherheit im Umgang mit dem Bakterium. Kompetente *Escherichia coli XLI Blue* Bakterien wurden folgendermaßen hergestellt:

Am Vortag wurden 5 ml der *Escherichia coli XLI Blue* Bakteriensuspension über Nacht auf einem Rotationsschüttler kultiviert (37 °C, 180 rpm). Am Folgetag wurden 50 μ l der Suspension in 100 ml LB-Medium mit 1 ml 1 M $MgCl_2$ -Lösung überführt. Die Bakteriensuspension wurde bis zu einer

optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6-0,9 kultiviert und nachfolgend bei $1942 \times g$ für 11 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Bakterienpellet in 40 ml eisgekühlter TfBI-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut bei $1066 \times g$ für 10 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde nun in 5 ml TfBII-Lösung resuspendiert und $100 \mu\text{l}$ des Ansatzes wurden jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße waren sofort nach Befüllung in flüssigen Stickstoff in einem vorbereiteten Dewar-Gefäß zu verbringen und daraufhin bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ zu lagern.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNS-assozierte Techniken

3.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNS

Zur Trennung einer Mischung von verschiedenen DNS-Fragmenten eignete sich die Agarose-Gelelektrophorese. Die Porengröße des Agarosegels ermöglichte eine Differenzierung der verschiedenen Bestandteile der DNS-Mischung. Ein 1 % iges Agarosegel wies eine Porengröße von 150 nm auf und wurde in der vorliegenden Arbeit am Häufigsten verwendet. Abhängig von der erwarteten Größe des PCR-Produkts, des Restriktionsverdau-Ergebnisses oder der Präparation eines Plasmids (siehe Kapitel 3.2.1.8) wurde der Agarosegehalt des Gels erhöht (bis zu 1,25 %) oder reduziert (bis zu 0,8 %).

Die negative Ladung von DNS-Fragmenten ermöglichte die Wanderung der Fragmente durch das Agarosegel unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Je nach Größe und Ladung der DNS-Fragmente wanderten sie durch das als Molekularsieb wirkende Gel von der Kathode zur Anode. Die ionische Pufferlösung, mit der sowohl das Gel angefertigt als auch die Gelelektrophorese selbst durchgeführt wurde (Laufpuffer), war 1xTAE.

Zur Anfertigung eines Gels wurde in Abhängigkeit der Gelgröße und des Agarosegehalts, die Agarose in ein 500 ml-Reaktionsgefäß aus feuerfestem Glas (Schott) eingewogen. Das entsprechende Volumen 1xTAE-Puffer wurde dazu gegeben und in einer Mikrowelle aufgekocht. Unter Rühren oder Schwenken wurde darauf geachtet, dass die Agarose vollständig gelöst ist. Nach einer kurzen (3 min) Abkühlphase der Flüssigkeit wurde die

Agaroselösung in die vorbereitete Form aus Kamm und Gelkammer in einem Gelgießstand (BioRad) horizontal gegossen und 50 µl einer 0,07 % igen Ethidiumbromidlösung (0,7 mg/ml, Applichem) auf 50 ml Gelvolumen unter dem Abzug zugefügt. Das Ethidiumbromid interkalierte in die DNS-Fragmente und fluoreszierte nach Anregung mit UV-Licht. Da die Fluoreszenz nach der Interkalation in die DNS stärker war, ermöglichte Ethidiumbromid die Visualisierung der DNS.

Nach dem Erstarren des Gels unter dem Abzug wurde zunächst der Kamm vorsichtig entfernt, um die zu beladenden Taschen im Gel freizulegen und anschließend in eine mit 1xTAE gefüllte Gelelektrophoresekammer (BioRad), überführt. Die zu trennende DNS-Probe wurde mit 6xLadepuffer (6xDNS Loading Dye, Fermentas) versetzt und dann in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Das Glycerin im Ladepuffer ermöglichte das langsame Absinken der DNS-Probe in die anvisierte Geltasche. Das elektrische Feld wurde je nach Größe und Agarosegehalt des Gels mit 120-140 V für 40 min angelegt. Als DNS-Größenstandard diente der DNA-Ladder Mix von Fermentas (10 µl). Das Resultat der Elektrophorese wurde mit dem Syngene-Geldokumentationsgerät festgehalten.

3.2.1.2 Gelisolation von DNS

Die Isolation und Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Herstellerangaben durchgeführt. Das Kit enthielt eine Säule, deren Membran DNS-Fragmente zwischen 70 bp und 10000 bp binden konnte. Das durch die Gelelektrophorese separierte gewünschte DNS-Fragment konnte mit einem sterilen Skalpell nach Sichtbarmachung durch die UV-Lampe ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Die DNS wurde möglichst kurz durch das UV-Licht bestrahlt, da das interkalierte Ethidiumbromid zu Leserasterverschiebungen und das ultraviolette Licht zur Mutation der Basen der DNS führen konnte [56].

3.2.1.2.1 DNS-Isolation aus Restriktions-, Ligations-, oder PCR-Ansätzen

Die Isolation und Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus PCR-, Restriktions-, oder Ligationsansätzen wurde ebenfalls mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

durchgeführt. Die DNS-haltige Lösung wurde mit dem 5 fachen Volumen an PB-Bindungspuffer von Qiagen versetzt und nachfolgend nach den Herstellerangaben behandelt.

3.2.1.3 Amplifikation von Plasmid-DNS mittels Transformation hitzekompetenter *Escherichia coli*

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung freier DNS in kompetente Algen, Pilze, Hefen, Pflanzen und Bakterien, in diesem Fall dem Darmbakterium *Escherichia coli*. Plasmide kommen natürlicherweise in Bakterien vor. Sie tragen unter anderem spezielle Geninformationen, beispielsweise zur Resistenz gegenüber Antibiotika, werden mittels lateralem Gentransfer zwischen Prokaryonten übertragen und werden, unabhängig von den Bakterienchromosomen, vervielfältigt. Innerhalb der Plasmide unterscheidet man zwischen „low copy“-Plasmiden, deren Kopienzahl ein paar Hundert pro Zelle betragen kann und „high copy“-Plasmiden, die bis zu Tausenden pro Zelle vorkommen können. Im Jahr 1996 veröffentlichten Pope *et al.* eine schnelle und effiziente Methode *E. coli* zu transformieren, wozu Avery *et al.*, bereits 1946 den Beweis der Übertragung von Desoxyribonukleinsäure erbrachten [57, 58]. Zur Transformation von zirkulären Plasmiden zur Amplifikation werden die hitzeschockkompetenten *E.coli XLI Blue* verwendet (siehe Kapitel 3.1.10). Die verwendeten Plasmide tragen neben dem zu amplifizierenden Ziel-Gen auch die Information zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber einem Antibiotikum, welches im Weiteren die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterienzellen ermöglicht.

Die hitzeschockkompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, das zu amplifizierende Plasmid wurde mit den 100 µl der aufgetauten Bakteriensuspension gemischt und beides zusammen 5 min auf Eis inkubiert. Die DNS-Menge variierte dabei zwischen 10 und 100 ng. Die Bakterien-DNS-Suspension wurde dann für 1 min bei 42 °C im Heizblock inkubiert, währenddessen die Bakterien den Hitzeschock erhielten und die in der Suspension vorliegende DNS aufnahmen. Daraufhin wurde die Suspension sofort auf Eis gelagert, während 900 µl des auf Raumtemperatur gelagerten sterilen LB-Mediums zugegeben wurden. Die Zellmembran der Bakterien war nach dem Hitzeschock noch empfindlich, weswegen auf eine Resuspension

verzichtet wurde. Nach dem Auffüllen mit Medium wurde der Transformationsansatz für mindestens 20 min bei 37 °C und 800 rpm auf einen beheizbaren Schüttler verbracht. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf eine Hälfte einer LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Carbenicillin als Selektionsmarker ausplattiert, während die verbliebenen 900 µl bei 800 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Das entstandene Pellet wurde dann in 100 µl frischem, sterilem LB-Medium gelöst und auf die andere Hälfte derselben Agarplatte ausplattiert. Die Unterteilung der Platten in zwei Sektoren ermöglichte nach der anschließenden Inkubation der LB-Agar-Platte über Nacht bei 37 °C eine optimale Verteilung der Kolonien und erleichterte die Auswahl von Einzelklonen/ Einzelkolonien mit einer Impföse am Folgetag.

3.2.1.4 Gewinnung von Plasmid-DNS aus *Escherichia coli*

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden die durch Transformation veränderten Bakterien vermehrt. Während des Wachstums der Bakterien, in diesem Fall *E. coli XLI Blue*, wurden die in den Zellen vorhandenen Plasmide, ebenfalls vervielfältigt und konnten für präparative Zwecke zurückgewonnen werden. Dazu wurden die gewünschten Klone in dem Bedarf entsprechenden Mengen LB-Medium angeimpft, 100 µg/ml Carbenicillin hinzugefügt und bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator (200 rpm) kultiviert. Um die Bakterien zu ernten, wurde die Bakteriensuspension im LB-Medium für 10 min bei 3452 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet weiter verwendet. Die Varianten der Plasmidpräparationstechniken wurden, je nach benötigtem Grad der Reinheit und dem Bedarf an DNS, gewählt. Die DNS wurde durch die Qiagen Produkte Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen Plasmid Plus Midi Kit und Qiafilter Plasmid Maxi Kit gewonnen. Die Versuchsdurchführung folgte dem Herstellerprotokoll.

3.2.1.5 photometrische Bestimmung

Die Absorption bei 260 nm lässt Rückschlüsse auf den DNS-Gehalt einer Lösung zu. Eine optische Dichte (OD) von eins entspricht dabei einem DNS-Gehalt von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS (dsDNS), 30 µg/ml einzelsträngiger DNS (ssDNS) und 40 µg/ml RNS. Der Grad der Reinheit der Nukleinsäuren in Relation zu Proteinen lässt sich aus dem Quotienten aus der

OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm erschließen. Reine Nukleinsäuren sind bei Werten zwischen 1,7 und 1,9 einzugrenzen.

Zur photometrischen Messung wurden die Geräte Nanodrop 2000 von Invitrogen und GeneQuant II von Pharmacia Biotech verwendet.

3.2.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger [59]. Alle DNS-Fragmente und Plasmide wurden von der Firma SequiServe in Vaterstetten als Auftragsarbeit durchgeführt. Herr Dr. Metzger und seine Mitarbeiter verwendeten dazu ein Abi Prism 3730 Kapillarsequenziergerät. Die zugesandten Ergebnisse wurden durch die Programme Vector NTI[®] von Invitrogen geprüft und mit aus der Literatur bekannten, falls vorhandenen, Sequenzen verglichen.

3.2.1.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion stellt seit 1986 ein grundlegendes molekularbiologisches *in vitro* Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von DNS-Abschnitten dar [60]. Der zu amplifizierende DNS-Abschnitt wird durch wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen von einer DNS-Matrize (Template) mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden (Primern) und dem Enzym DNS-Polymerase synthetisiert und nachfolgend vervielfältigt.

Eine typische Reaktionsabfolge einer Polymerase-Ketten-Reaktion besteht aus der Denaturierung der DNS-Matrize bei 95 °C für 5 min und einer anschließenden Anlagerungsphase („Annealing“) der Primer, die durch deren Hybridisierungstemperatur gekennzeichnet ist (52 °C-68 °C). Im Anschluss findet eine Kettenverlängerung durch die DNS-Polymerase, die sich durch deren Temperaturoptimum auszeichnete, statt (72 °C).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Gensynthese und Klonierung ausschließlich mit der Expand[™] High Fidelity Polymerase von Roche oder der Q5[®] Fidelity Polymerase von NEB gearbeitet. Diese zeichneten sich durch ihre Korrekturlesefunktion, durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität und die daraus resultierende geringe Fehlerrate aus. Für die simple Amplifikation von DNS-Abschnitten zur Kontrolle einer Reaktion oder dem Nachweis von beispielsweise Mycoplasmen-DNS wurde die Taq-Polymerase (Sigma) verwendet. Diese Polymerase zeichnete sich durch geringe Sensitivität

gegenüber variablen Reaktionsbedingungen aus, war gleichzeitig aber 3 mal mehr fehleranfällig bezüglich der Sequenzintegrität als die Expand™ High Fidelity-Polymerase. Die Reaktionspuffer wurden vom jeweiligen Hersteller mitgeliefert. Die Desoxynukleotide wurden je nach Reaktionsansatz in einer Endkonzentration zwischen 40 und 100 µM eingesetzt und wurden von Roche bezogen. Die 3'- und 5'-Primer wurden so entworfen, dass sie eine annähernd gleiche Schmelztemperatur aufwiesen. Sowohl 3'- als auch 5'-Primer konnten nicht komplementäre Überhänge aufweisen. Diese Überhänge konnten zur Applikation einer Schnittstelle oder eines komplementären Endes zu einer weiteren DNS-Sequenz dienen. Die Konzentration der Primerlösung lag zwischen 0,2 und 0,4 µM.

Amplifikations- und Fusions-PCR

Die Amplifikations-PCR diente zur Vervielfältigung gewünschter DNS-Abschnitte, aber auch der Einfügung von Schnittstellen oder komplementärer Enden. Der PCR-Ansatz und deren Bedingungen gestalteten sich wie folgt:

PCR Ansatz: x µl DNS-Template (ca. 20 ng)
 2 µl 10xExpand™ High Fidelity Puffer (Roche)
 0,5 µl forward-Primer (8 µM)
 0,5 µl reverse- Primer (8 µM)
 0,16 µl dNTPs (2 mM, Roche)
 1 µl Expand™ High Fidelity DNS Polymerase (3,5 U/µl, Roche)
 Ad 20 µl Wasser

PCR Zyklen:

1. Denaturierung:	5 min	95°C	} 38x
2. Denaturierung:	2 min	95°C	
3. Primerhybridisierung:	2 min	52°C	
4. DNS-Polymerisation:	1,5 min	72°C	
5. DNS-Polymerisation:	7 min	72°C	

3.2.1.8 spezifischer DNS-Verdau durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische palindromische DNS-Basensequenzen erkennen und die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung in einem Polynukleotid katalysieren. Die Hydrolyse führt zu einer Trennung an der palindromischen Erkennungssequenz des dsDNS-Basenstrangs.

Zum Verdau von 1 µg DNS in einer Stunde war üblicherweise 1 Enzymeinheit (U) ausreichend. Im täglichen Gebrauch wurde jedoch mit dem zehnfachem Überschuß des Enzyms gearbeitet. Die Restriktionsansätze wurden bei der Arbeitstemperatur des Enzyms die meist bei 37 °C, im Einzelfall auch bei 56-60 °C liegen konnte, in einem Thermoschüttler durchgeführt. Das Puffersystem des Enzyms, bestehend aus der optimalen Salzkonzentration

und dem optimalen pH-Wert, wurde anhand der Herstellerangaben gewählt. Um eine sequenzunabhängige Aktivität (star-Aktivität) des Enzyms zu vermeiden, wurde darauf geachtet, den Glycingehalt des Ansatzes stets unter 10 % des Gesamtvolumens des Restriktionsverdauansatzes zu halten. Die nach dem enzymatischen Verdau gewonnenen DNS-Fragmente wurden im Anschluss zu präparativen oder analytischen Zwecken über ein Agarosegel aufgetrennt und gegebenenfalls aus diesem extrahiert (siehe Kapitel 3.2.1.2).

3.2.1.9 DNS-Dephosphorylierung durch alkalische Phosphatase

Die Klonierung von DNS-Fragmenten in Vektoren erfordert zueinander kompatible Schnittstellen der beiden Komponenten. Die Schnittstellen ermöglichen eine spezifische Positionierung und Orientierung der in den Vektor einzubringenden DNS-Fragmente. Sind Vektor und DNS-Fragment mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und gereinigt, können sie über eine Ligation mit dem Vektor verbunden werden. Um eine höhere Effizienz bei der Ligation zu erzielen, werden mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (fermentas) die 5'-Phosphatgruppen des Vektors, welche die Phosphodiesterbindung mit den entsprechenden 3'-Phosphatgruppen bilden, abgespalten. Durch diese Maßnahme wird verhindert, dass der Vektor mit seinen zuvor am 5'-Ende und am 3'-Ende vorhandenen Phosphatgruppen mit Hilfe der Ligase religieren kann. Der Vektor kann nach der Abspaltung seiner eigenen 5'-Phosphatgruppe nunmehr nur mit der im einzubringenden DNS-Fragment vorhandenen 5'-Phosphatgruppe ligieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die FastAp[®]-Phosphatase von fermentas laut den Herstellerangaben verwendet.

3.2.1.10 Ligation von DNS

Die Ligation ist eine enzymkatalysierte Verbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphatgruppen und freien 3'-Hydroxylgruppen an den Enden geschnittener dsDNS oder dsRNS. Die T4 DNS-Ligase im verwendeten Rapid DNA Ligation Kit von fermentas katalysiert die Ausbildung der Phosphodiesterbindungen zwischen den dsDNS-Enden. Sie ist in der Lage sowohl glatte („blunt“) als auch überhängende („sticky“) Enden zu verknüpfen. Im Allgemeinen wurden 100 ng des dephosphorylierten Vektors mit dem ein- bis dreifachen molaren Überschuss des DNS-Fragments eingesetzt. Die Ligation wurde üblicherweise

in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt, wovon 4 µl auf den 5xReaktionspuffer (fermentas) entfielen. Zusätzlich wurden dem Ansatz die entsprechenden Mengen DNS-Fragment und dephosphorylierter Vektor zugegeben und abschließend mit Wasser für die Molekularbiologie (Roth) auf 19 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde 1 µl der T4 DNA-Ligase (fermentas) zugefügt und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3 Immunbiologische Methoden

3.3.1 Western Blot (Immunblot)

Der Immunblot bezeichnet ein Verfahren, bei dem Proteine auf eine Trägermembran, in diesem Fall Nitrocellulose transferiert werden (engl. Blotting“). Die Übertragung erfolgt durch ein vertikal zu einem Polyacrylamidgel gerichtetes, elektrisches Feld. Durch die angelegte Spannung können die Proteine vom Polyacrylamidgel auf die darunter liegende Nitrocellulosemembran elektrotransferiert werden. Die Nitrocellulose vermag die Proteine durch ionische und polare Wechselwirkungen zu binden, wobei das Bandenmuster aus der gelelektrophoretischen Auftrennung konserviert wird.

In der vorliegenden Arbeit kam das iBlot™-System von life technologies zum Einsatz. Das ist ein System, das ohne Transferpuffer arbeitet („Dryblotting“) und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

Nach Abschluss des Transfers wurde die Nitrocellulosemembran einmal in vollentsalztem Wasser gewaschen, um verbliebenes SDS von der Membran zu entfernen. Die Proteine konnten dadurch renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur teilweise wieder einnehmen. Um verbliebene freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu besetzen, damit keine unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers an die Membran erfolgen konnte, wurde diese 20 min bei RT auf einem Wipptisch mit PBS/ 2 % BSA (20 ml) inkubiert. Im Anschluss wurde diese Blockierlösung abgekippt und die Membran einmal mit vollentsalztem Wasser gespült.

3.3.1.1 Anti-His Detektion von His₆-markierten scFv

Die Immundetektion von His₆-markierten Proteinen erfolgte durch eine Antikörpermischung aus einem Biotin-konjugierten Anti-Penta-His-Antikörper

(Qiagen) und einer an Streptavidin gekoppelten Alkalischen Phosphatase (AP, von Sigma). Das Reaktionsgemisch wurde in 15 ml PBS/ 0,2 % BSA angesetzt, wobei beide Reagenzien in der Verdünnung 1:10000 verwendet wurden. Der Reaktionsansatz wurde direkt auf den Immunblot gegeben und darauf 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. In dieser Zeit konnte der Biotin-markierte Anti-Penta-HisTM-Antikörper an das His₆-Motiv des scFv binden und wurde gleichzeitig durch das Streptavidin an dessen biotinylierter Domäne erkannt. Ungebundene Reagenzien wurden durch zweimaliges Waschen mit 20 ml WB-Waschpuffer (PBS/ 0,2 % BSA/ 0,05 % Tween[®]20) entfernt. Dabei wurde die Waschlösung auf die Membran gegeben, 10 min bei RT auf dem Wipptisch inkubiert, die Lösung entfernt und gleiches noch einmal wiederholt. Die an die Proteine gebundene Alkalische Phosphatase setzte dann im letzten Schritt das Substrat BCIP/ NBT (Sigma) in circa 15 bis 30 min bei RT auf dem Wipptisch in eine dunkle Färbung auf der weißen Membran um. Der Immunblot wurde durch einen Microtek-Bio5000 Scanner dokumentiert.

3.3.1.2 Anti-FLAG Detektion von FLAG-markierten Proteinen

Zur Detektion FLAG-markierter Proteine, wie zum Beispiel Antigenen, wurde ein Maus-Anti-FLAG-Antikörper (Sigma, Klon M2, 1 mg/ml) verwendet, der direkt an die Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Er wurde ebenfalls 1:10000 in PBS/ 0,2 % BSA verdünnt und mit einem Volumen von 15 ml auf die Membran appliziert. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei RT auf einem Wipptisch inkubiert und anschließend ungebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit WB-Waschpuffer (20 ml, 10 min) entfernt. Nach der Zugabe des Substrats (10 ml) BCIP/ NBT (Sigma) war nach circa 10 min eine deutliche Färbung der FLAG-markierten Proteine auf der Membran sichtbar. Der Immunblot konnte dann durch den Microtek Bio-5000 Scanner dokumentiert werden.

3.3.2 Zytotoxizitätstests

Die zytotoxische Eigenschaft bispezifischer Antikörper gegenüber Zielzellen wurde durch die beiden folgenden Zytotoxizitätstests quantifiziert.

3.3.2.1 Der Chromfreisetzungstest

Lebende, wachsende Zellen nehmen radioaktives Natriumchromat (Na_2CrO_4) im Rahmen ihres Stoffwechsels in die Zelle auf, geben es aber spontan nicht mehr ab. Diese Markierung macht man sich zu Nutze, wenn die Zielzelle durch die CD8^+ T-Zelle getötet wird, die Zellmembran permeabel wird und das Natriumchromat in das umgebende Medium gelangen kann. Die Radioaktivität im umgebenden Medium kann durch einen Gammazähler gemessen werden. Die Markierung der Zellen wurde in einem 15 ml Snap-Cap-Röhrchen durchgeführt, indem $1 \cdot 10^6$ Zielzellen in diesem Röhrchen bei RT und $423 \times g$ für 5 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen in circa 200 μl RPMI all vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann hinter einer Bleiburg mit 100 μCi ^{51}Cr (Hartmann Analytics) versehen. 100 μCi entsprachen in der Regel 50 bis 150 μl der Arbeitslösung. Die Zellsuspension wurde eine Stunde bei 37°C , 7 % CO_2 und 95 % Luftfeuchte mit halb geschlossenem Deckel inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die BiTE[®]-Verdünnungen und die Effektorzellen für den Versuchsansatz vorbereitet. Die Messwerte wurden in Quadruplikaten angesetzt, wobei eine serielle Verdünnungsreihe der BiTE[®]-Konzentration von zwanzig 1:3-Verdünnungen angesetzt wurde.

Im Allgemeinen wurde mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration in der Vertiefung gestartet. Die anderen Vertiefungen wurden mit 100 μl RPMI all befüllt. Zusätzlich wurden 4 Messwerte der BiTE[®]-unabhängigen Lyse (Hintergrundkontrolle mit Effektorzellen) generiert, indem mit 100 μl RPMI all ohne BiTE[®]-Lösung inkubiert wurde. Ein weiteres Quadruplikat wurde zur Bestimmung der Spontanlyse (minimale ^{51}Cr -Freisetzung, Hintergrundkontrolle ohne Effektorzellen) mit 150 μl RPMI all ohne BiTE[®]-Lösung versehen. Für vier Werte der Maximallyse (maximale ^{51}Cr -Freisetzung) wurden ausschließlich radioaktiv markierte Zielzellen und 150 μl einer 1 % igen Triton[™]-X100-Lösung gemessen.

Die Auswahl der Effektorzellen hing von der Art des BiTE[®]-Moleküls ab. Wurde ein Bindermolekül getestet, das humanes CD3 erkannte, so wurden humane Effektorzellen präpariert. Die Stimulation der Effektorzellen war bei BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten mit geringerer Bioaktivität nötig, um aussagekräftige Messergebnisse zu erhalten. Waren die Mikrotiterplatten auf

diese Weise präpariert, wurden sie bis zur Verwendung bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte gelagert. Die Zielzellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit 2 Mal gewaschen, indem das 15 ml-Röhrchen mit 10 ml RPMI all aufgefüllt wurde und die Zellen daraufhin bei 423 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen durch leichtes Schwenken gelöst und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Die Zellen wurden dann in 100 µl RPMI all vorsichtig gelöst und die benötigte Menge Zielzellen entnommen. Pro Mikrotiterplatte waren 1*10⁵ Zielzellen in 5 ml RPMI all vorgesehen. Nun wurden zu jeder BiTE[®]-Verdünnung 50 µl der Zielzellsuspension gegeben. Daraus ergab sich ein Effektorzellen- zu Zielzellen-Verhältnis von 10:1. Die Zielzellen wurden ebenfalls in die Vertiefungen zur Bestimmung der BiTE[®]-unabhängigen Lyse, der Spontanlyse sowie der Maximallyse pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden dann 18 h bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl des Kulturüberstands vom Plattenrand in Polystyren-Röhrchen des Gammazählers überführt. Die Röhrchen wurden zur Bestimmung des Wertes der Gammastrahlung durch das ins Medium freigesetzte ⁵¹Cr in den Gammazähler einsortiert. Für die Auswertung der Daten und zur Berechnung der spezifischen Zielzell-Lyse wurde folgende Formel verwendet:

Spezifische Lyse in % =

$$\frac{[\text{Mittelwert (cpm)} - \text{Mittelwert minimale Freisetzung (cpm)}] / \text{Mittelwert maximal Freisetzung (cpm)} - \text{Mittelwert minimale Freisetzung}] \times 100$$

minimale Freisetzung: Zielzellen ohne Effektorzellen

maximale Freisetzung: Zielzellen in 1 % Triton-X100-Lösung

3.3.2.2 der FACS-basierte Zytotoxizitätstest

Der Chromfreisetzungstest weist Limitationen auf. Manche Zellen nehmen Natriumchromat nur unzureichend auf oder es wirkt bereits in geringen Mengen toxisch. Aus diesem Grund konnte die Laufzeit des Tests nicht beliebig verlängert werden. Um die Zytotoxizität in diesen Fällen zu bestimmen, konnte ein Zytotoxizitätstest auf der Grundlage einer durchflusszytometrischen Messung der Zellviabilität mit Propidiumiodid durchgeführt werden. Propidiumiodid interkaliert in Nukleinsäuren, kann aber

nur die permeable Membran von toten, jedoch nicht die Zellmembran lebender Zellen durchdringen.

Auch bei diesem Zytotoxizitätstest wurde mit einem Effektorzellen- zu Zielzellen-Verhältnis von 10:1 gearbeitet. Für eine BiTE[®]-Bioaktivitätsbestimmung wurden $4 \cdot 10^6$ Effektorzellen eingesetzt. Diese konnten, wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben, CD8⁺ T-Zellen, stimulierte oder unstimulierte PBMZ oder Einzelzellsuspensionen der Milz sein. Zu den Effektorzellen wurden $0,4 \cdot 10^6$ Zielzellen hinzugegeben. In diesem Versuchsansatz wurden Duplikate gemessen.

Zur Markierung der Zielzellen wurde die gewünschte Zellzahl in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei RT und 423 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet mit 50 ml FACS-Puffer (PBS/ 2 % FCS) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand erneut entfernt und die Zellen in FACS-Puffer auf eine Zellzahl von $1,25 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Daraufhin wurden pro $1 \cdot 10^6$ Zellen 5 µl Vybrant[®]DiO-Färbelösung zur Zellsuspension hinzugefügt. Vybrant[®]DiO ist eine Zellfärbelösung, die Zellen einheitlich fluoreszent markiert, um sie später in einer Zellmischung identifizieren zu können. Die Färbelösung verblieb bei 37 °C für 5 min auf den Zellen, anschließend wurde die Zellsuspension auf 50 ml mit FACS-Puffer aufgefüllt und wie bereits oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 25 ml RPMI all-Medium resuspendiert, wiederum zentrifugiert und der Überstand nochmals entfernt. Nun wurde in adäquatem Volumen (je nach Zellzahl, 10 bis 30 ml) RPMI all resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.2). Die BiTE[®]-Verdünnungen wurden in 15 Verdünnungsstufen angesetzt. Zusätzlich wurden die Messwerte der BiTE[®]-unabhängigen, der BiTE[®]-unspezifischen Lyse (Effektorzellen und Zielzellen, ohne BiTE[®]) und der spontanen Lyse (nur Zielzellen) der Zellen bestimmt.

Als Ausgangskonzentration wurde mit 1 µg/ml Endkonzentration im ersten Duplikat gestartet und dann seriell über 15 Verdünnungsschritte vierfach verdünnt. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden Ziel- und Effektorzellen gemischt. Dazu wurden die Zielzellen auf $1,25 \cdot 10^5$ Zellen/ml und die Effektorzellen auf eine Zellzahl von $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit RPMI all eingestellt. Effektor- und Zielzellen wurden dann zu gleichen Teilen vereinigt und 160 µl

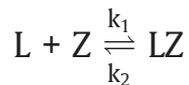
dieser Suspension pro Vertiefung der Mikrotiterplatte ausgesät. Zu den Zellen wurden 40 µl pro Vertiefung der erstellten BiTE[®]-Verdünnungsreihe hinzugegeben. Die beiden Kontrollen, BiTE[®]-unabhängige Lyse und Spontanlyse wurden durch das entsprechende fehlende Volumen (40 µl und 120 µl) auf 200 µl Endvolumen mit RPMI all aufgefüllt. Der Test wurde standardmäßig 48 h bei 37 °C, 7 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte durchgeführt. Die Messung des Tests erfolgte an einem FACS Canto-Gerät (BD). Zur Einstellung des Geräts wurden Proben der gemischten Effektor- und Zielzellpopulation, der gefärbten Zielzellpopulation und der ungefärbten Zielzellpopulation zurückbehalten.

Nach Ablauf der 48 h, in denen die Effektorzellen Zeit hatten die Zielzellen zu lysieren, wurden die Zellen von der F- oder U-Mikrotiterplatte in eine Hartenstein-V-Boden-Mikrotiterplatte überführt. Die zurückbleibenden Zellen wurden mit 50 µl PBS/ 0,05 % EDTA/ 0,05 % Trypsin für 5 min bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte abgelöst. In dieser Inkubationszeit wurden die bereits überführten Zellen in der Mikrotiterplatte für 5 min bei 423 x g zentrifugiert. Die mit Trypsin behandelten abgelösten Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl RPMI all und anschließender Überführung in die entsprechende Vertiefung der Mikrotiterplatte zu dem Testansatz hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde dann ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in jeweils 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Kurz vor der Messung wurde jedem Ansatz 50 µl FACS-Puffer mit 2 µg/ml Propidiumiodid zugegeben. Dies wurde ebenfalls mit 50 µl der zurückbehaltenen Probe der gefärbten Zielzellen durchgeführt, wobei hier zusätzlich noch 50 µl einer 0,5 % igen Saponin-Lösung in Ampuwa[®] hinzugegeben wurde. Saponin permeabilisierte die Zellmembran, ohne die Strukturen im Zellinneren zu zerstören. Alle zurückbehaltenen Proben, sowie die mit Saponin und Propidiumiodid behandelte Probe wurden zur Kompensation des FACS Canto[™]-Geräts herangezogen. Zur Messung der Proben wurden 25 µl pro Vertiefung verwendet. Die Auswertung erfolgte durch die Software FACS Diva[®] und GraphPadPrism.

3.3.3 Affinitätsbestimmung von BiTE[®]-Molekülen durch Fluoreszenzzytometrie

Die Gesetzmäßigkeiten, nach denen ein Ligand an seinen Rezeptor, bzw. ein BiTE[®]-Molekül an seine spezifische Zielstruktur binden kann, sind die gleichen wie in der Chemie der Enzymkinetik.

Die Interaktion zwischen einem Rezeptor und einem Liganden kann durch die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_d) und der Rezeptorenanzahl (B_{max}) näher definiert und quantifiziert werden. Die Dissoziationskonstante (K_d) stellt hierbei ein Maß für die Affinität der Bindungsstelle des Liganden (BiTE[®]) zum betreffenden Rezeptor (Antigen) dar. Die Rezeptorenanzahl B_{max} definiert die maximale Bindungskapazität, das heißt die Menge des exprimierten Antigens. Der Prozess der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor kann gesättigt werden und dadurch Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (K_A) und die Dissoziation (K_D), welche die Affinität von Ligand und Zielstruktur festlegen, definiert werden.



Die Dissoziationskonstante K_D [mol/L oder M] ist definiert als Verhältnis zwischen freien Zielstrukturen [Z], Liganden [L] und gebundenen Ligand-Zielstrukturen-Komplexen [LZ]:

$$K_D = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[L] \cdot [Z]}{[LZ]}$$

Eine errechnete hohe Dissoziationskonstante bedeutet dabei eine niedrige Affinität, da in diesem Fall nur eine hohe Dosis des Liganden (des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts) eine definierte Anzahl von Ligand-Zielstruktur-Komplexen bilden kann. Umgekehrt zeugt eine niedrige Dissoziationskonstante im Bereich von 1 nM von einer hohen Affinität des Liganden für die Zielstruktur. Die Gleichung kann zu einer Funktion in Abhängigkeit der Konzentration des Liganden [L] umgeformt werden, welche die Anzahl der besetzten Zielstrukturen [LZ] beschreibt:

$$[LZ] = [T] \cdot \frac{[L]}{[L] + K_D}$$

[T]= die Gesamtzahl aller Zielstrukturen [Z] und [LZ]

Die semilogarithmische Darstellung der Funktion zeigt einen sigmoidalen Verlauf und ermöglicht die schnelle Erfassung einer Affinitätsveränderung in Form einer Verschiebung der Kurve nach rechts oder links auf der X-Achse, welche die Konzentration des Liganden in Abhängigkeit der linear aufgetragenen Menge der gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe, logarithmisch wiedergibt [61].

Die praktische Durchführung der Erfassung des B_{max} -Wertes in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration des Liganden erfolgte durch eine Fluoreszenzfärbung transfizierter Zellen, welche das Zielantigen eines BiTE[®]-Moleküls exprimieren. Die Einstellung des Gleichgewichts von an IgE gebundenem BiTE[®]-Antikörper erfolgte durch den Einsatz von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte und einer definierten BiTE[®]-Konzentration in einer Lösung aus PBS mit 0,1 %-Natriumazidlösung und 1 % FCS. Das BiTE[®]-Molekül wurde in 12 Verdünnungsschritten in Triplikaten verdünnt und 50 μ l der BiTE[®]-Verdünnung zu den Zellen gegeben, welche in 10 μ l des genannten Puffers gelöst waren. Die Suspension aus BiTE[®]-Molekül (Ligand) und Antigenstruktur (Rezeptor/ Zielstruktur) wurde über Nacht bei 4 °C und leichtem Schwenken (300 rpm) inkubiert. Die 16 stündige Inkubation erlaubte der Rezeptor-Ligand-Reaktion die Einstellung der Gleichgewichtsreaktion. Nach Ablauf der 16 Stunden wurden 100 μ l des vorgenannten Puffers zugegeben und die Mikrotiterplatte bei 423 x g für 2 min zentrifugiert. Die Zugabe von 30 μ l eines fluoreszenzmarkierten anti-CD3-Alexa488-Antikörpers (5 μ g/ml) oder eines anti-His-Fab-Alexa488-Fragmentes, verdünnt in PBS mit 0,1 % Natriumazid und 1 % FCS ermöglichte, nach der Entfernung des Überstands, den Nachweis des gebundenen BiTE[®]-Moleküls. Nach 30 Minuten Inkubation des anti-CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts bei 4 °C wurden die Verdünnungen ein weiteres Mal wie oben beschrieben gewaschen und nach weiterer Zentrifugation und Entfernung des Überstands mit 100 μ l einer Paraformaldehydlösung (PBS mit 3,7 % Paraformaldehyd, säurefrei) für 15 min bei 4 °C fixiert. Ein erneuter Waschschrift komplettierte die Fluoreszenzfärbung und die Messung am Fluoreszenzzytometer FACS Canto™ konnte durchgeführt werden.

3.4 proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Analyse von Proteinen angewendet. Die aktive Komponente des Natriumdodecylsulfats, das Dodecylsulfat, lagert sich bei der Denaturierung der Proteine an die Peptidketten und verleiht dem Komplex eine negative Ladung. Die Zahl der Dodecylsulfat-Moleküle ist dabei annähernd proportional zur Länge der Peptidkette. Die Geschwindigkeit der Proteine im Polyacrylamidgel als Trägermaterial wird dadurch hauptsächlich durch deren Molekülmasse und nicht durch deren Ladung bestimmt [62].

Die Durchführung der SDS-PAGE wird im Folgenden skizziert:

Von der zu untersuchenden Probe wurden 60 µl in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Probe wurden 20 µl des „NuPAGE® 4xLDS sample buffers“ (life technologies) und 10 µl Dithiotreitol (dTT; DL-Dithiotreitol 1 mg/ml, Sigma) hinzugefügt. Das reduzierende Thiol dTT sollte, zusätzlich zur denaturierenden Wirkung des SDS, die Disulfidbrücken der Proteine spalten. Das anschließende Erhitzen der Lösung auf 70 °C für 10 min bei leichtem Schwenken löste die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken auf und ermöglichte die Auftrennung nach der Kettenlänge im Polyacrylamidgel.

Zur Analyse einer Proteinaufreinigung wurden vereinzelt Proben genommen die 300 µl Volumen aufwiesen. Diese Proben wurden mit einer Vivaspin 500-Aufkonzentrierungseinheit (Sartorius) eingeeengt. Dazu wurden die 300 µl Probe in das Gefäß der Vivaspin 500 überführt und dann bei 9,6 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Betrug das Volumen des Retentats 60 µl, wurde die Probe in die SDS-PAGE, äquivalent zu einer normalen Probe, eingesetzt.

Das 4-12 % ige Bis-Tris-Polyacrylamidgel (NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Gel, life technologies) war ein vom Hersteller vorgefertigtes Gel. Es bestand aus einem Sammelgel (4 %), im oberen Gelabschnitt und einem Trenngel (12 %) im unteren Bereich des Gels. Im Unterschied zu herkömmlichen Tris-Glycin Gelen wies dieses einen neutralen pH-Wert in allen Bereichen des Gels auf. Das Gel wurde in eine „X Cell Sure Lock™“-Gelelektrophoresekammer (life technologies) gestellt, fixiert und diese mit 1 x „NuPAGE® MES SDS

Running Buffer“ (life technologies) aufgefüllt. Pro Geltasche wurden 25 µl der denaturierten Proteinprobe geladen. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich in eine separate Geltasche 7 µl eines Größenmarkers (Novex® Sharp pre stained Protein Standard, life technologies), der eine Auswahl an Proteinen bekannter Größe liefert, aufgetragen. Die Proteine migrierten durch ihre negative Ladung bei einer Spannung von 200 V für circa 55 min durch das Polyacrylamidgel. Kleinere Proteine wanderten dabei schneller durch das siebartige Trenngel als größere und können so leicht unterschieden werden.

3.4.2 Coomassie Färbung

Nach der Auftrennung von Proteinproben durch die SDS-PAGE konnten die Proteine durch die Coomassie-Färbung in dem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel einmal in entsalztem Wasser gewaschen und dann mit circa 20 ml „Instant Blue™“ (Expedeon) versehen. Die Färbelösung verblieb auf einem Wipptisch circa 30 min auf dem Polyacrylamidgel und wurde anschließend entsorgt. Nach mehrmaligem Waschen und Entfärben des Gels mit entsalztem Wasser auf dem Wipptisch waren die Proteine blau angefärbt. Auf diese Weise konnten Proteinbanden in der Mindestkonzentration von 5 ng pro Bande nachgewiesen werden.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen über die Bestimmung der OD₂₈₀

Die Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Proteinen erfolgte über die photometrische Bestimmung der Wellenlänge bei 280 nm. Die durch die Software VectorNTI® ermittelte proteinspezifische Extinktionskoeffizienten (1A (280) corr.) erlaubte die Berechnung des Proteingehaltes anhand folgender Formel:

$$c \text{ (mg/ml)} = 1 \text{ A (280) corr.} \times \text{OD}_{280}$$

Für eine möglichst genaue Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zusätzlich die OD₂₆₀ und OD₃₄₀-Werte ermittelt. Als Leerwert fungierte der jeweilige Puffer, in dem das Protein gelöst war (PBS oder Citrat/ Lysin-Puffer). Wurde ein OD₂₈₀/OD₂₆₀-Verhältnis von < 1,5 festgestellt, so musste der OD₂₈₀Wert über folgende Berechnungsformel korrigiert werden:

Berechnung der korrigierten OD₂₈₀:

$$A = (OD_{280}/OD_{260}) - 0,535 / 0,655$$

$$B = (OD_{280}/OD_{260}) / A$$

$$C = OD_{280} / B = \text{korrigierter OD}_{280}\text{-Wert}$$

3.4.4 Proteinaufreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Affinitätschromatographie basiert auf dem Prinzip der reversiblen Interaktion zwischen einem Zielprotein und einem Liganden, der an eine Chromatographiematrix gebunden ist. Bei der immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) nutzt man die unspezifische Interaktion zwischen dem His₆-Anhang der aufzureinigenden Proteine und den Metallionen, in diesem Fall der Zn²⁺-Ionen, die an eine Matrix gebunden sind.

Die gewonnenen Zellkulturüberstände (ZKÜ) wurden dazu im ersten Schritt mit 5 % Glycerol versehen und anschließend sterilfiltriert (Stericap Plus, Millipore). Die Beladung der präequilibrierten IMAC-Säule (1 ml, 10 ml oder 30 ml Volumen, je nach Probenmenge) mit der Probe machte sich die Bindung der His₆-Reste der Proteine an die immobilisierten Zn²⁺-Ionen der Säulenmatrix zu Nutze. Die ZKÜ wurden zusammen mit einem Auftragspuffer appliziert (Puffer A), der kein Imidazol enthält. Abhängig davon ob Antigene mit einem H3G-Anhang oder BiTE[®]-Moleküle mit einem His₆-Anhang aufgereinigt wurden, sind unterschiedliche Bedingungen bezüglich des Probenauftrags und der Probenelution nötig. Proteine mit einem His₆-Anhang wurden mit 2 % des Elutionspuffers B auf die Säulenmatrix aufgetragen und in zwei Schritten, zunächst durch die Addition von 10 % Puffer B und dann durch 100 % Puffer B, eluiert. Der erste Elutionsschritt löste schwach gebundene Histidine von der Säulenmatrix. Die Elution durch Zugabe von 100 % des Puffers B löste den His₆-Anhang an den Proteinen durch kompetitive Bindung vom Interaktionspartner Zn²⁺.

Die Bindung des H3G-Anhangs von Antigenen an die Metallionen war weniger stark. Aus diesem Grund waren die Bedingungen der IMAC leicht modifiziert. Der Probenauftrag wurde ohne zusätzlichen Puffer B durchgeführt, zudem fand der erste Elutionsschritt bereits nach Zugabe von 2 % des Puffers B statt.

Die Elution der H3G-gebundenen Proteine erfolgte ebenfalls bei Zugabe von 100 % des Puffers B.

Die Flussrate und Spezifikationen der Affinitätschromatographie wurden der verwendeten Säule angepasst. Dies betraf vor allem das Volumen des Präequilibrierungsschrittes, der Waschschriffe, der Elution und der Fraktionierung. Die meist verwendete Säule, eine Prosep-Säule mit 10 ml Volumen wurde mit dem 5 fachen Säulenvolumen (CV) des Puffers A mit 2 % bzw. 0 % des Puffers B präequilibriert, die kleinere ProSep[®]-Säule mit 1 ml Volumen mit dem 10 fachen Säulenvolumen. Die Flussrate von 4 ml/min (bzw. 2 ml/min) blieb während dem gesamten Lauf konstant. Nachdem die Probe aufgetragen war, wurde ungebundenes Protein durch einen Spülschritt von 6 Säulenvolumen (CV) mit 10 % bzw. 2 % des Puffers B in Puffer A entfernt. Für die 1 ml-Säule wurden 10 CV eingestellt. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch 5 Säulenvolumen, schrittweise mit 10 % und anschließend mit 100 % des Puffers B. Die Fraktionen des Laufs (3 ml bzw. 0,5 ml) wurden in Plastikröhrchen bei 4 °C in einem Fraktionskollektor gesammelt und die proteinhaltigen Fraktionen wurden abschließend vereinigt.

Die Aufreinigung der Proteine wurde an einem Äkta™ Purifier, einem Äkta™ Explorer oder an einem Äkta™ FPLC-System durchgeführt.

Zur Analyse der Proteinaufreinigung wurden vor dem Probenauftrag 300 µl des filtrierten Zellkulturüberstands, 300 µl des Probendurchlaufs, 60 µl des Eluats bei Zugabe von 10 % bzw. 2 % des Puffers B und 60 µl des Eluats bei Zugabe von 100 % des Puffers B, gesammelt.

3.4.5 Aufkonzentrierung der IMAC-Probenaufreinigungsfractionen

Die der IMAC folgende Gelfiltration (siehe Kapitel 3.4.6) der Proteinproben erforderte im Einzelfall eine Aufkonzentrierung der gesammelten proteinhaltigen Fraktionen, da lediglich ein Volumen von 3 ml auf die Gelfiltrationsmatrix aufgetragen werden konnte. Wurde dieses durch das Volumen der gesammelten Fraktionen überschritten, so wurden je nach Probenmenge Vivaspin[®] turbo 15- oder Vivaspin[®] 20-Säulen (Sartorius) zur Aufkonzentrierung verwendet. Die Säulen wurden zunächst durch 2 bzw. 5 ml PBS/ 0,05 % Tween20 präequilibriert. Dazu wurden sie bei 4 °C für 5 min bei 3452 x g zentrifugiert. Das durchgelaufene Volumen wurde verworfen und die

Prozedur mit dem Puffer, in dem das Protein nach der Gelfiltration gelöst werden sollte, wiederholt (Citrat/ Lysin-Puffer oder PBS). Anschließend wurde die Probe aufgebracht und die Zentrifugation so lange durchgeführt bis lediglich 3 ml des Volumens oberhalb der Filtermembran verblieben. Das Retentat wurde bis zur Gelfiltration auf 4 °C gelagert. Für die Analyse wurden zusätzlich 60 µl des Durchlaufs zurückbehalten und auf 4 °C gelagert.

3.4.6 Größenauffrennung von Proteinproben durch Gelfiltration

Nach der Gewinnung His₆- oder H3G-Anhang gekoppelter Proteine aus einem Proteingemisch durch die immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC, vgl. Kapitel 3.4.4) wurde die gewonnene Proteinprobe weiter aufgereinigt, indem die darin enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Größe separiert wurden.

Die Gelfiltration wurde mit einer HiLoad™ 16/ 600 Superdex Säule (200 µg, GE Healthcare) durchgeführt. Diese Säule bestand aus Dextran, das kovalent an stark quervernetzte Agarose gebunden war. Das dadurch formierte Gel besaß die auftrennenden Eigenschaften von quervernetztem Dextran, bei gleichzeitig hoher physikalischer und chemischer Stabilität durch die quervernetzte Agarose. Die Säule wurde je nach Art der Proteinprobe, für BiTE®-Antikörper-Konstrukte mit Citrat/ Lysin-Puffer, für Antigene mit PBS, präequilibriert. Dazu wurden mindestens 3 Säulenvolumen des Puffers bei einer Flussrate von 1 ml/min über die Säule gepumpt. Die Probe wurde dann mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte durch das 1,5 fache Säulenvolumen, wobei die Fraktionen (2 ml) erneut in einem Fraktionskollektor bei 4 °C gesammelt wurden. Die Fraktion, die den BiTE®-Monomer oder das intakte Antigen enthielt, wurde gesammelt, gegebenenfalls mit weiteren Fraktionen vereinigt und die Proteinkonzentration der Lösung gemessen (siehe Kapitel 3.4.3). Die BiTE®-Monomer-Fraktionen wurden nach der Elution in Citrat/ Lysin-Puffer zur Stabilisierung des Moleküls mit 200 µl/1000 µl Eluat einer 24 % igen Trehalose-Stammlösung versehen. Die Trehalose-Endkonzentration betrug demnach 4 %. Anschließend wurden alle aufgereinigten Proteinlösungen mittels eines Acrodisc®-Filters (PALL, 13 mm oder 25 mm) steril filtriert und in ein neues Probenröhrchen überführt. In Einzelfällen wurde der Endotoxingehalt der Probe durch einen LAL-Test

bestimmt (siehe Kapitel 3.4.7). Nachdem die Proben etikettiert und unter sterilen Bedingungen aliquotiert waren, wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Für die Analyse der Probenaufreinigung wurden 60 µl der Fraktionen gesammelt, die potentiell Aggregat, Multimer, Dimer, Monomer und Abbau des Proteins enthielten. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

3.4.7 Messung des Endotoxingehaltes durch den Limulus Amebozyte Lysate (LAL)-Test

Das Reagenz des LAL-Tests wurde aus den zirkulierenden Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses gewonnen. Der Test basierte auf dem von Dr. Frederick Bang hergestellten Zusammenhang zwischen der Gerinnung des Limulusblutes und der Präsenz von Endotoxin. Der Endosafe™ LAL-Test (Charles River) wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Humanes IgE und dagegen gerichtete BiTE[®]-Antikörper

4.1.1 Struktur von humanem IgE und IgE⁺ Transfektanten

Immunglobuline dienen als sezernierte Effektorantikörper und gleichzeitig als membrangebundene Antigenrezeptoren auf B-Zellen. Immunglobulin E im Speziellen vermittelt als sezerniertes Molekül allergische Reaktionen und kommt membrangebunden auf IgE⁺ B-Zellen, IgE⁺ Plasmazellen und deren Vorläufern vor. Diese Zellen sind in menschlichem, peripherem Blut sehr selten, befinden sich vor allem in Geweben und sind dort schwer zugänglich. Zellen mit konstanter, hoher IgE-Expression der beiden humanen IgE-Isoformen (IgE_{lang} und IgE_{kurz}) wurden durch die Transfektion von CHO^{DHFR}- bzw. J558L-Zellen mit IgE gewonnen. Diese transfizierten Zellen kamen vor allem in fluoreszenzzytometrischen Versuchen und Zytotoxizitätsbestimmungen zum Einsatz.

Immunglobulin E weist schwere Ketten des ϵ -Typs auf. Die schwere Kette hat eine variable Domäne (V_H) und vier konstante Domänen ($C\epsilon$ 1-4 bzw. im Folgenden CH 1-4, vgl. Abbildung 3). Die CH2-Domäne ist lediglich bei den Antikörperklassen des IgE- und IgM-Typs zu finden und bestimmt im Falle von Immunglobulin E dessen physische und Isotyp-spezifische Eigenschaften.

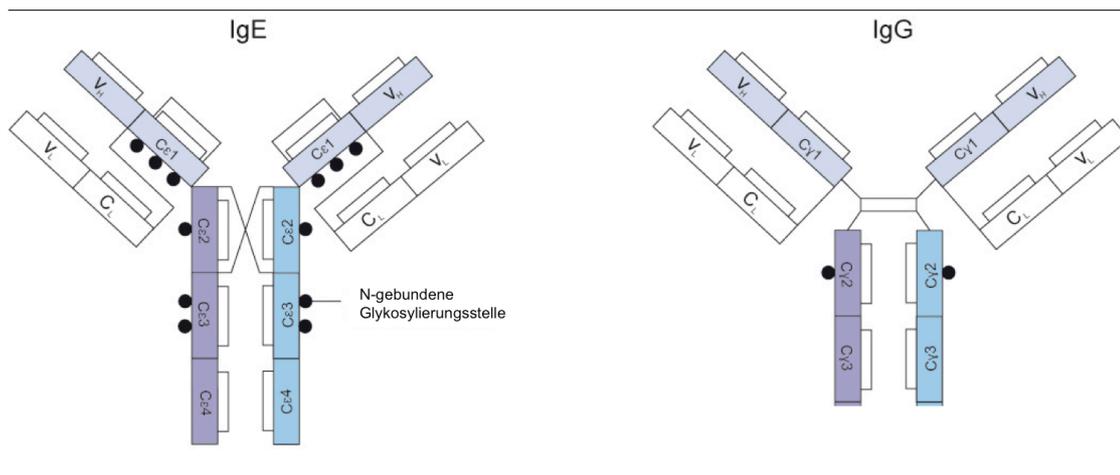


Abbildung 3: Struktur des Immunglobulin E im Vergleich zu Immunglobulin G
Darstellung der schweren (V_H , $C\epsilon$ 1, $C\epsilon$ 2, $C\epsilon$ 3, $C\epsilon$ 4) und leichten Kette (V_L , C_L), sowie der Glykosylierungsstellen (schwarze Punkte), die Disulfidbrücken zwischen und innerhalb der Domänen sind durch schwarze Verbindungslinien gekennzeichnet [63].

Lösliches IgE ist bei gesunden Menschen nur in geringen Mengen im Blutkreislauf zu finden, da es lokal im Gewebe sezerniert wird [64]. Der durchschnittliche Serumspiegel gesunder, nicht atopischer Menschen liegt bei 150 ng/ml, während er bei Atopikern auf das zehnfache ansteigen kann. Bei parasitären Erkrankungen oder dem Hyper-IgE-Syndrom kann der Spiegel dreifach höher liegen, ohne dass Symptome allergischer Erkrankungen auftreten [65]. Die Serumkonzentration von IgE korreliert direkt mit der Anzahl zirkulierender B-Zellen, die den Isotypwechsel zu IgE vollzogen haben [66]. Diese IgE^+ B-Zellen präsentieren, abhängig von ihrem Differenzierungsstatus, den membranständigen IgE-B-Zellrezeptor (mIgE) in unterschiedlichen Mengen auf ihrer Zelloberfläche.

Membranegebundenes IgE weicht in seiner Struktur geringfügig vom sezernierten Molekül ab, indem jede schwere Kette eine zusätzliche „extrazelluläre membran-nahe Domäne“ (extracellular membrane-proximal

domain; EMPD) aufweist. Diese Domäne zwischen der CH4- und der Transmembrandomäne kommt beim Menschen in zwei verschiedenen Formen vor, die sich durch deren Länge (15 Aminosäuren bei EMPD_{kurz} oder auch ϵ -Migis und 67 Aminosäuren bei EMPD_{lang} oder auch C ϵ mX + ϵ -Migis) und deren Assoziation mit dem akzessorischen B-Zellrezeptormolekül Ig α unterscheiden [67]. Die B-Zellen der Maus haben keine unterschiedlichen Formen, sondern eine EMPD von 19 Aminosäuren Länge [68]. An diese schließen sich eine Transmembran- und eine kurze intrazelluläre Domäne an [69, 70].

Die beiden humanen Isoformen werden durch alternatives Spleißen gebildet, wodurch eine kurze und eine lange Isoform des B-Zellrezeptors entstehen. Die bei Menschen und Altweltaffen häufigere Form ist IgE_{lang} [71]. IgE_{lang} zeichnet sich durch einen extrazellulären Anteil von 67 Aminosäuren nach der CH4-Domäne und vor den membranverankernden Domänen M1 und M2 aus (vgl. Abbildung 4). Die ersten 52 Aminosäuren die der CH4-Domäne folgen, treten nur bei der langen Isoform auf und heißen meist C ϵ mX oder M1' [72, 73]. Daran schließen sich weitere 15 Aminosäuren an, die als ϵ -migis bekannt sind. Die membranständig präsentierte Isoform IgE_{kurz} hat keinen C ϵ mX-Abschnitt und ist deshalb 52 Aminosäuren kürzer als die lange Isoform des humanen Immunglobulin E.

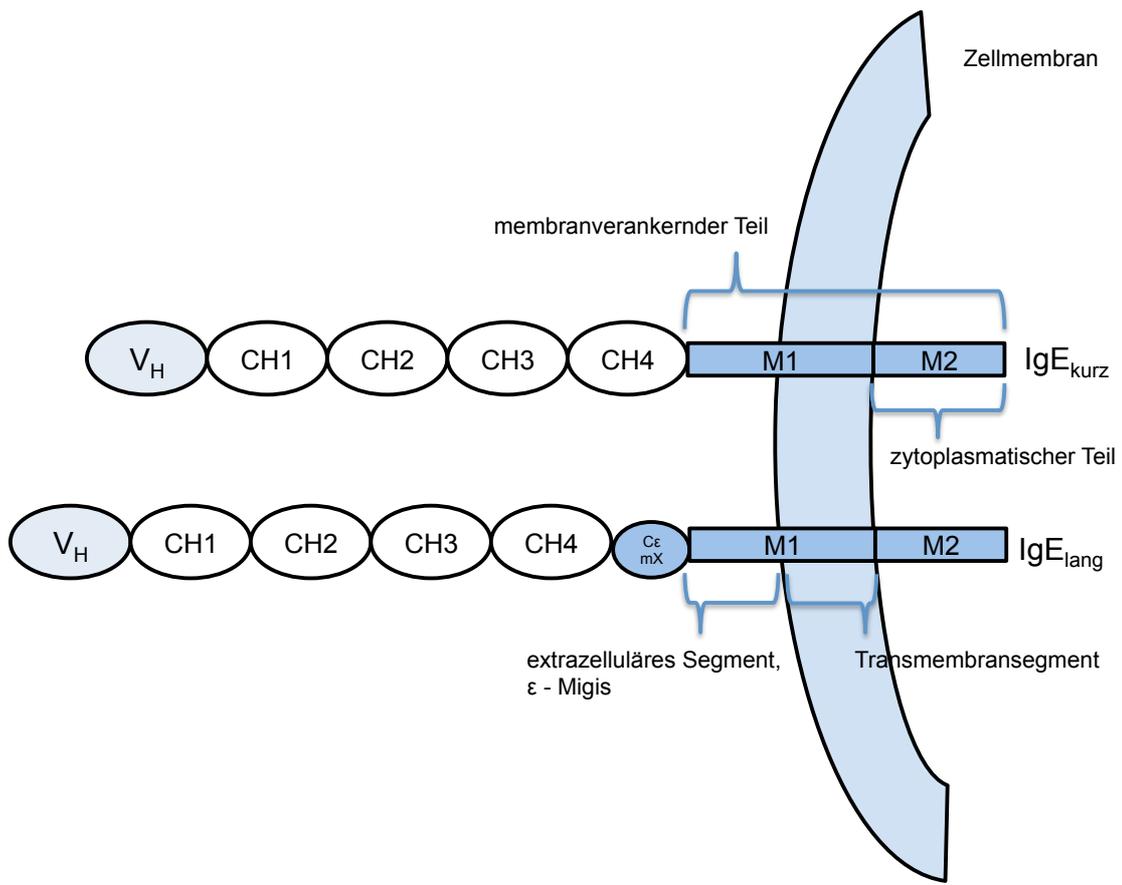


Abbildung 4: Schematische Darstellung der strukturellen Domänen und Segmente der kurzen und der langen Isoform des membranständigen IgE (mIgE).

Die lange Isoform IgE_{lang} weist, im Vergleich zur konventionellen kurzen Isoform IgE_{kurz} eine Cε_{mX}-Domäne auf, die zwischen der CH4-Domäne und den membranverankernden Peptiden liegt [71].

Die DNS-Sequenz von humanem IgE ist bereits seit 1982 bekannt und wurde in den Folgejahren ausführlich charakterisiert [70, 74-76].

Oktay Kirak isolierte die DNS-Fragmente beider Isoformen aus dem Hybridom U266 und klonierte die schwere Kette und den konstanten Teil des humanen IgE in den Säugetier-Expressions-Vektor pefNEO [54]. Diese Ressourcen wurden in der vorliegenden Arbeit als Grundlage verwendet. Nach der Transfektion der J558L-Zelllinie mit der schweren Kette und dem konstanten Teil des humanen B-Zellrezeptors (vgl. Kapitel 3.1.9.2) wurden die transfizierten Zellen subkloniert und die Klone durch Fluoreszenzzytometrie auf mIgE-Expression getestet (vgl. Kapitel 3.1.8.1). Die Histogramme der fluoreszenzgefärbten Zellklone sind in Abbildung 5 gezeigt. Mit den gezeigten Klonen wurden die Antigenbindung von scFvs und die zytotoxische Aktivität nachgewiesen.

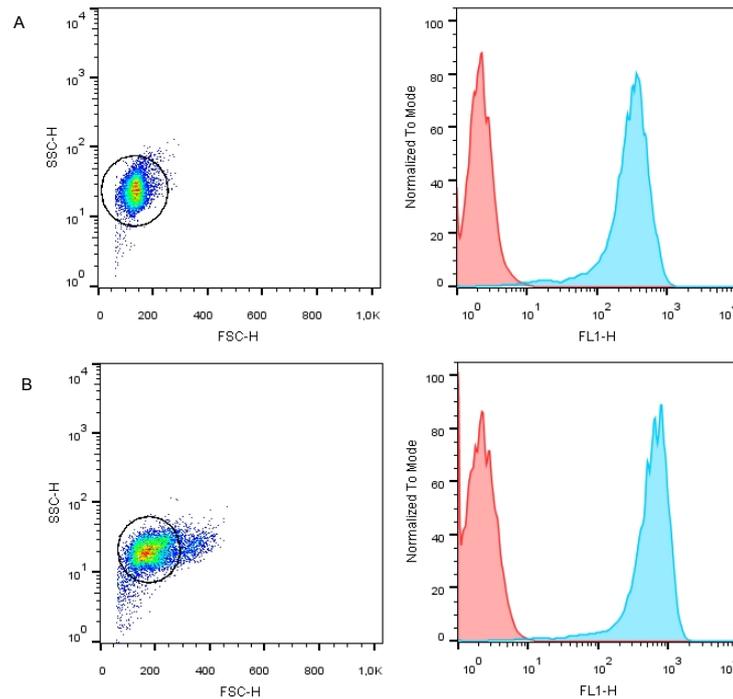


Abbildung 5: J558L-Zellen und Expressionskontrolle des humanen IgE

A: J558L mit dem Plasmid der Isoform pefNEO x human IgE_{lang} transfiziert: links: Populationsverteilung der Zellen, rechts: Histogramm mit dem Nachweis der human IgE-Expression (rot: Negativkontrolle, blau: IgE-Nachweis). B: Analog zu A, die beiden Graphen mit den mit dem Plasmid pefNEO x human IgE_{kurz} transfizierten Zellen.

Zusätzlich zur Transfektion und Subklonierung der J558L-Zellen wurden CHO^{DHFR}-Zellen transfiziert, in denen ein amplifizierbares Expressionssystem verwendet werden konnte (vgl. Kapitel 3.1.9.1 und 3.1.9.1.1). Im Unterschied zur Maus-Plasmazytom-Zelllinie J558L können CHO^{DHFR}-Zellen keine leichte Kette des B-Zellrezeptors und keine akzessorische Seitenketten Ig α und Ig β bilden. CHO^{DHFR}-Zellen müssen diese Eigenschaft durch Transfektion erwerben [77]. Aus diesem Grund wurde die aus J558L-Zellen gewonnene leichte Kette mit der Leadersequenz des humanen IgG-Locus kombiniert und in den Säugetierexpressionsvektor pefADA kloniert. Zudem wurden die beiden DNS-Sequenzen der konstanten Region und der schweren Kette des humanen IgEs in den Expressionsvektor pefDHFR umkloniert. Die beiden Vektoren wurden nacheinander transfiziert, zunächst der pefADA-Vektor mit der leichten Kette des B-Zellrezeptors und anschließend der pefDHFR-Vektor mit der schweren Kette und der konstanten Region des IgEs. Diese

Reihenfolge war notwendig da die alleinige Expression schwerer Antikörperketten für CHO^{DHFR}-Zellen toxisch ist. Die beiden akzessorischen Seitenketten des B-Zellrezeptors Ig α und Ig β wurden durch PCR aus der cDNS von Maus-Milzzellen isoliert und in einen zuvor klonierten bicistronischen pefNEO-Vektor inseriert. Dazu wurde eine zweite interne ribosomale Eintrittsstelle („internal ribosomal entry site“, IRES) in den pefNEO-Vektor eingebracht und die beiden DNS-Sequenzen der akzessorischen Seitenketten jeweils in 3' Orientierung der jeweiligen IRES eingebracht.

Abbildung 6 zeigt die Fluoreszenzfärbung von humanem IgE der transfizierten CHO^{DHFR}-Zellen. Beide Varianten des humanen IgE waren erfolgreich auf der Zelloberfläche anzufärben. Die akzessorischen Seitenketten wurden ebenfalls durch spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

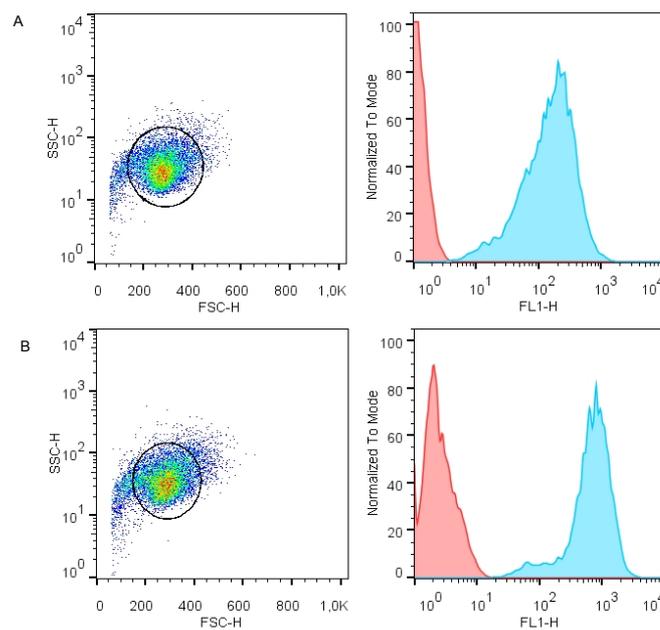


Abbildung 6: CHO^{DHFR}-Zellen, Expressionskontrolle des humanen IgE

A: CHO^{DHFR}- mit dem Plasmid der Isoform pefDHFR x human IgE_{lang} transfiziert: links die Populationsverteilung der Zellen, rechts das Histogramm mit dem Nachweis der human IgE-Expression (rot: Negativkontrolle, blau: IgE-Nachweis).
 B: Analog zu A, die mit dem Plasmid pefDHFR x human IgE_{kurz} transfizierten Zellen.

4.1.2 IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte

Bereits 1989 konnten Beda M. Stadler und seine Mitarbeiter Maushybridome generieren, die Antikörper gegen die CH3-Region des humanen IgEs produzierten [78]. Oktay Kirak konnte aus der cDNA einer dieser Maus-Hybridomzellen einen gegen IgE-CH3 gerichteten BiTE[®] isolieren und charakterisieren [54]. Dieses BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt bildet den Ausgangspunkt für die nachfolgenden Ergebnisse.

4.1.2.1 „Guided Selection“ humaner leichter Ketten im Phagen Display

Therapeutisch einsetzbare Proteine werden heute synthetisch hergestellt oder humanisiert, um eine Immunreaktion des Patienten gegen das Medikament zu vermeiden. Der IgE-bindende Arm des von Oktay Kirak entwickelten BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts stammt von einem Maushybridom und hat deshalb mausspezifische Aminosäuresequenzmotive.

Kiraks parentaler Maus-Anti-IgE-CH3-BiTE[®] wurde humanisiert, um potentiell immunogene Motive zu entfernen. Die leichte murine Kette (V_L) wurde dazu durch eine humane Kette ersetzt, da die variable Region der leichten Kette bei der Spezifität eines Antikörpers nur eine untergeordnete Rolle spielt [79, 80]. Im Gegensatz dazu steht die schwere Kette. Ihr Austausch kann in Kombination mit derselben leichten Kette zu unterschiedlichen Antigen-spezifitäten führen. Behält man hingegen die schwere Kette bei und tauscht die leichte Kette durch verschiedene andere leichte Ketten aus, sind viele Antikörperkombinationen mit derselben Antigen-spezifität möglich. Die schwere Kette der variablen Region (V_H) wurde deshalb als Leitstruktur für die Antigen-spezifität des scFvs beibehalten [81]. Dieses Verfahren ist als „Guided Selection“ bekannt [82].

Das Repertoire humaner leichter Ketten für die Kombination mit der parentalen schweren Kette des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts bestand aus einem humanen IgD-Repertoire. Dieses Repertoire wurde aus peripheren B-Zellen von fünf gesunden Spendern isoliert [83]. Das humane IgD-Repertoire weist wenig somatische Hypermutationen auf und hat deshalb Gensequenzen, die den Genen der Keimbahn besonders ähnlich sind [84].

Nachdem die scFv-Bibliothek und die Strategie des VCSM13-Phagen-Displays etabliert war, konnten elf der leichten Ketten mit der originalen, schweren Kette ein funktionelles, hoch affines scFv-Fragment bilden [81]. Der

Vergleich der isolierten Aminosäuresequenzen der leichten Ketten (Abbildung 7) zeigt, dass acht der insgesamt elf selektierten leichten Ketten aus dem Kappa-Locus stammten, während drei der Ketten dem Lambda-Locus zugeordnet werden konnten. Dieser Vergleich wurde durch die Software Align X VNTI Advance[®] angefertigt und basiert auf der Berechnung der Ähnlichkeit von Aminosäurepositionen anhand der BLOSUM62 Matrix [85].

Selektierte humane, leichte Ketten des Kappa-Locus:

```

MP5160-F6  ELVITQSPATLSVSLGETITLSCRASQANLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5166-B1  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5166-D4  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5166-E10 ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5167-B6  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5167-F7  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQVDNHLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5168-B11 ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5168-G9  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK

```

Selektierte humane, leichte Ketten des Lambda-Locus:

```

MP5159-A6  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5159-E2  ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK
MP5159-F10 ELVITQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIASRRATSIIPRFSGSISGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDFGSIWIFGQGTKVEIK

```

Abbildung 7: Vergleich der Aminosäuresequenzen der ausgewählten, humanen leichten Ketten zur Weiterentwicklung des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts, Die Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung der Aminosäuren (gelb= identisch, blau = konserviert, grün = ähnliche Abschnitte, farblos= keine Ähnlichkeit) [86], - : eingefügte Lücken zur Maximierung der Sequenzähnlichkeit, schwarz gerahmt: CDR 1 bis 3 der leichten Ketten

4.1.2.2 Humanisierung der schweren Kette des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts

Die hoch variablen Regionen (CDR) der schweren Kette eines Antikörpers tragen zu einem größeren Teil an der Antigenbindung bei als die CDR der leichten Kette. Aufgrund der höheren Variabilität von ca. 6000 möglichen Rekombinationen der humanen, schweren Kette und lediglich 320 der leichten Kette, ist der produktive Austausch einer schweren Kette schwieriger [87]. Um die schwere Kette nicht vollständig ersetzen zu müssen, wurde die murine Aminosäuresequenz an die dazu ähnlichste humane Keimbahnsequenz angenähert. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 8 den Vergleich der parentalen schweren Kette des IgE-CH3-BiTE[®] (untere Zeile) mit der dazu ähnlichsten Keimbahnsequenz des Menschen (obere Zeile). Die so genannten

„Framework“-Abschnitte (FR) dienen als Grundlage zur Humanisierung der schweren Kette. Diese Sequenzabschnitte der Keimbahn liegen außerhalb der hoch variablen Regionen (CDR, schwarze Rahmen) und geben den CDR-Abschnitten einen „Rahmen“. Diese FR-Abschnitte dienen als Referenz für die Suche nach der ähnlichsten humanen Keimbahnsequenz. Die drei CDR-Segmente blieben während der Humanisierung unangetastet, da sie die Erkennung des Antigens bestimmen und eine einzige Aminosäureänderung im CDR3-Bereich ausreicht, um die Antikörperspezifität drastisch zu verändern [88].

Das Ziel der Humanisierung war die Annäherung der Aminosäuren mit ähnlichen Abschnitten (grün markiert) und nicht ähnlichen Aminosäuren (farblos markiert) an die humane Aminosäuresequenz.

Vergleich der schweren Kette zur ähnlichsten humanen Keimbahnsequenz (V_HIII/3-53):

hu VH 3-53	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSIAASGFTVSNYMSWVRQAPGKLEWVSIVYSGSTYYANSYKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRFEDTAVYCAAR	hu JH6:	NGQGITITVSS
anti-IgE VH	EVQLVDSGGGFVQPGGSLRLSIVVSGFTVSYVMSWVRQTPERLEWVSSSNIIITYPQWRGRFTISRDNVNTLYLQMSLRFEDTAVYCTGRSTYGGFDH		NGQGITITVSS

Abbildung 8: Vergleich der ähnlichsten humanen Keimbahnaminosäuresequenz (hu V_H 3-53; obere Reihe) zur Aminosäuresequenz der schweren Kette des parentalen IgE-CH3-BiTE[®] (anti IgE V_H, untere Reihe) Die Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung der Aminosäuren (gelb= identisch, grün = ähnliche Abschnitte, farblos = keine Ähnlichkeit) [86], schwarz gerahmt: CDR 1 bis 3 der leichten Ketten, im Bereich des CDRH3 wurde erfasst dass das „Joining Segment“ 6 der schweren Kette der Keimbahn am ähnlichsten ist

Die schwere Kette wurde während des Prozesses in mehrere Abschnitte (FR1, FR2 und FR3) unterteilt, deren Enden mit Restriktionsschnittstellen versehen wurden. Der erste Abschnitt wurde durch die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BsiWI* flankiert (FR1), woran sich direkt die CDR1 anschloss (vgl. Abbildung 9, erste rot markierte Sequenz). Im Folgenden markierten die Schnittstellen *BsiWI* und *BstEII* den zweiten Abschnitt (FR2). Dieser barg sowohl die CDR1 als auch die CDR2 (zweite, rot markierte Sequenz). Die beiden ersten Abschnitte wurden durch spezifische Primer generiert, die gleichzeitig zur Angleichung der DNS-Sequenz an die ähnlichste humane Keimbahnsequenz die gewünschte Schnittstelle einfügten. Der dritte und

Die Humanisierung der schweren Kette ging von einer Ausgangssequenz aus (Abbildung 8), die in etwa zu 73 % der humanen V_{H3-53} Keimbahnsequenz entsprach. Diese Berechnung schließt die Berücksichtigung der antigenerkennenden Bereiche (CDR) und die Abweichung des parentalen J-Segments vom J_{H6} -Segment der humanen Keimbahn ein. Die finale humanisierte Aminosäuresequenz der schweren Kette (Abbildung 10) entsprach unter den gleichen Berechnungskriterien zu 80,5 % der humanen Keimbahnsequenz.

4.1.2.3 Charakterisierung der gegen IgE-CH3 gerichteten BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte

Die IgE-CH3-bindenden Sequenzen der schweren und der leichten Kette wurden zur weiteren Charakterisierung und Entwicklung von IgE-CH3-spezifischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten verwendet. Durch Software-Programme wie „AbInitio“ der Firma AMGEN und VectorNTI[®] (Invitrogen) wurden zunächst „In-Silico“-Analysen durchgeführt (vgl. Tabelle 4). Diese Analyse erlaubte die Diversität der antigenbindenden scFvs zu bestimmen, indem die Rekombinationsereignisse erfasst und mit den Aminosäuresequenzen der CDR3 der schweren Kette verglichen werden konnten.

Auf der folgenden Seite werden die Daten zur „in silico“-Analyse erläutert (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Tabellarische Auflistung der Eigenschaften der elf IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte (AbInitio und VectorNTI Advance[®])

Klon	CDR3 der schweren Kette	CDR3 der leichten Kette	VH Rekombination	VH % Identität	VL Rekombination	VL % Identität	freie Cys	Glykosylierung	pI	N Deamidierung	D Isomerisierung
MP5159-F10	GRSTYGGFDH	GTWGGGLTAGRV	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VL1 1b/JL2	96,3	Nein	Nein	8,85	Nein	DG; DH
MP5159-A6	GRSTYGGFDH	QSYDFSFRV	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VL2 2d/JL1	83	Nein	Nein	6,16	NG	DS
MP5159-E2	GRSTYGGFDH	SSYTGSSSTSLYV	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VL2 2d/JL1	83,8	Nein	CDRL2	8,86	NT	DH
MP5167-B6	GRSTYGGFDH	QQFGDLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 L6/JK1	90,1	Nein	Nein	8,34	Nein	D-T; DH
MP5168-G9	GRSTYGGFDH	QQFGDSLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 L6/JK1	90,1	Nein	Nein	8,36	Nein	D-T; DH
MP5160-F6	GRSTYGGFDH	QQFGDSLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 L6/JK1	88,9	Nein	Nein	8,35	Nein	D-T; DH
MP5166-B1	GRSTYGGFDH	QQFGDTLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 L6/JK1	91,4	Nein	Nein	8,67	Nein	D-T; DH
MP5166-D4	GRSTYGGFDH	QQFGDTLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 L6/JK1	96,3	Nein	Nein	8,35	Nein	D-T; DH
MP5166-E10	GRSTYGGFDH	QQFGDRLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 L6/JK1	92,6	Nein	Nein	8,35	Nein	DH
MP5168-B11	GRSTYGGFDH	QQFGDRLWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 A27/JK1	96,3	Nein	Nein	8,66	Nein	D-T; DH
MP5167-F7	GRSTYGGFDH	QQFGSSMWT	VH3 3-21/D5 5-18 RF3/JH4	80,5	VK3 A27/JK1	91,4	Nein	Nein	8,89	Nein	DH

Das Maß der Ähnlichkeit der Sequenzen der leichten und der schweren Kette zu humanen Keimbahnsequenzen bestimmt die mögliche Immunogenität des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts. Je ähnlicher die Sequenz des Konstrukts zur Keimbahnsequenz ist desto weniger potentielle Immunogenität ist zu erwarten.

Die biochemischen Eigenschaften der Aminosäureabfolgen können Rückschlüsse auf die chemische Stabilität des Proteins geben. Dabei achtet man auf potentielle Glykosylierungs-, Deamidierungs- und Isomerisierungsstellen. Diese Motive können dazu führen, dass das Protein je nach Expressions- und Produktionsbedingungen nicht in gleicher Qualität hergestellt wird, unter bestimmten Pufferbedingungen aggregiert oder im Falle von freien Cysteinen fehlgefaltet wird. Im Besonderen werden die CDR3-Aminosäuresequenzen analysiert, da deren exponierte Lokalisation bei Antikörpern und deren Derivaten, im Gegensatz zu Stellen im Inneren eines Proteins, sie für Modifikationen und im Besonderen Oxidationen zugänglich macht. Die Deamidierung ist ein Säure-/ Basen-katalysierter Prozess, bei dem es unter Abspaltung von Ammoniak zu einer Hydrolyse des Säureamids zur freien Carbonsäure kommt. Die Hydrolyse des Proteinprodukts äußert sich meist in der vermehrten Aggregation und Abbau des Proteins. Die Eigenschaft aller Aminosäuren, außer Glycin, chiral und durch basenkatalysierte Reaktionen in ihr D-Enantiomer umwandelbar zu sein, kann einerseits zum Verlust der biologischen Aktivität oder auch zu höherer Stabilität gegenüber der Spaltung durch proteolytische Enzyme führen und wird über das Vorkommen potentieller D-Isomerisierungsstellen erfasst [89-92].

Die schwere Kette war in allen elf Konstrukten dieselbe. Ihre Ähnlichkeit zur humanen Keimbahnsequenz konnte durch die Humanisierung auf 80,5% gesteigert werden (vgl. 4.1.2.2; VH % Identität).

Die elf leichten Ketten unterschieden sich bereits durch deren Ursprung. Anhand der Verwendung des Lambda- bzw. des Kappa-Locus zur Umordnung der leichten Ketten konnten sie in zwei Gruppen eingeordnet werden (Tabelle 4). Die oberen ersten drei IgE-bindenden scFv-Konstrukte entstanden durch die Umordnung der V λ 1- und V λ 2-Ketten. Während dieses Prozesses wurden die Gene der V-Segmente (1b bzw. 2d) mit passenden J-Segmenten (J λ 1 und J λ 2) des Locus gepaart. Die acht weiteren scFv-Konstrukte bildeten sich aus

leichten Ketten des Kappa-Locus. Die $V\kappa 3$ -Kette schien die bevorzugte Kette zur funktionellen Bindung von IgE zu sein. Davon wurde das Gen L6 als V-Segment sechs Mal rearrangiert und in zwei Fällen das Gen A27. In allen Fällen fügte sich das Kappa-V-Segment mit dem J-Segment Jk1 zusammen. Alle elf leichten Ketten sind mit über 80% (VL % Identität) ähnlich zu humanen Keimbahnsequenzen.

All diese Attribute wurden erfasst, um nach der nun folgenden Klonierung der scFv zu einem BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt Rückschlüsse von den biochemischen Eigenschaften auf die Sequenzmotive ziehen zu können.

4.1.2.4 Vereinigung zweier scFv-Moleküle zu einem BiTE[®]-Molekül

BiTE[®]-Antikörper bestehen aus vier in Tandem-Formation aufgereihten variablen Immunglobulin-domänen. Die funktionelle Antigenbindungsstelle entsteht, wenn sich die leichte und die schwere variable Domäne einer Spezifität in der richtigen Quartärstruktur „zusammenlagern“. Die Quartärstruktur natürlich vorkommender Antikörpermoleküle wird durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den variablen Teilen der leichten und der schweren Kette, weiteren nicht-kovalenten Wechselwirkungen und kovalenten Disulfidbrücken zwischen den beiden variablen Domänen und der CH1- bzw. der C_L-Domäne gebildet [93]. Im Gegensatz zur Entstehung von ganzen Antikörpermolekülen wird die Bildung der Quartärstruktur von BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten durch die räumliche Nähe der variablen Domänen unterstützt. Diese räumliche Nähe wird durch ein flexibles Aminosäureverbindungsstück, einen sogenannten „Linker“, garantiert.

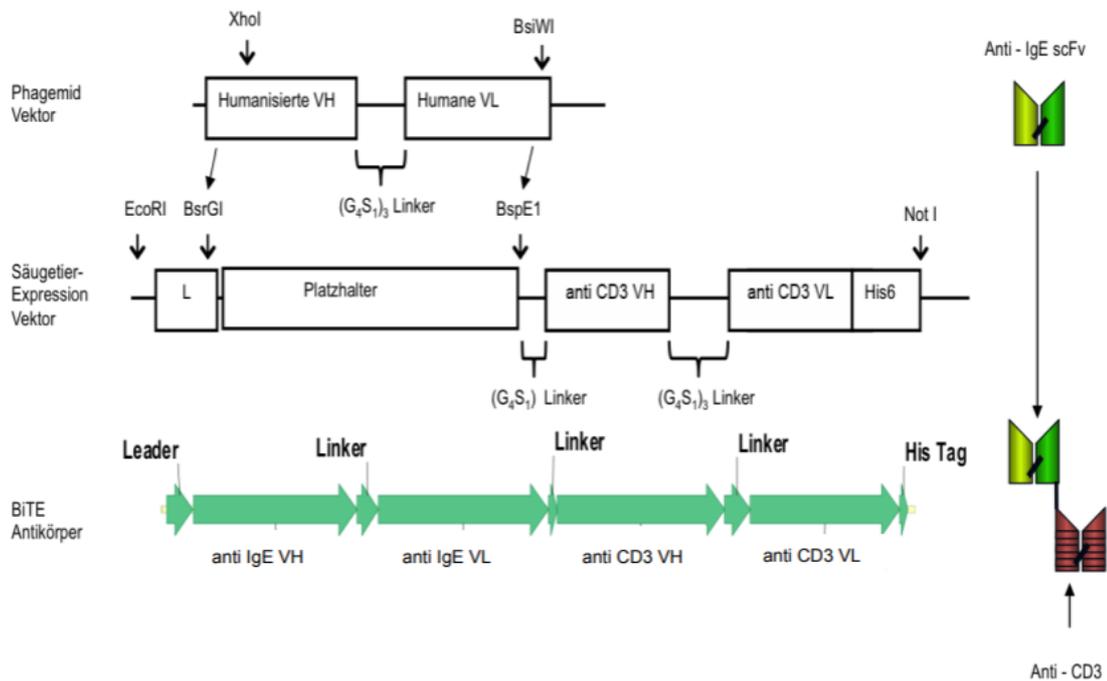


Abbildung 11 schematische Darstellung der Transformation eines antigenbindenden scFv aus dem Phagen-Expression-Vektor in den Säugetier-Expressions-Vektor

Die Verbindung eines IgE-spezifischen scFv-Moleküls mit einem CD3-erkennenden scFv-Molekül zu einem BiTE[®]-Antikörper zeigt Abbildung 11. Beginnend bei der Struktur eines antigen-spezifischen scFv im Phagemid-Vektor führt die Kombination des scFv mit einem CD3-spezifischen scFv im Säugetier-Expressions-Vektorsystem zu einem BiTE[®]-Antikörper mit dualer Spezifität.

Sowohl die Verbindung zwischen den V_L - und den V_H -Domänen einer Spezifität als auch die Verbindung zwischen den variablen Domänen der beiden unterschiedlichen Spezifitäten wird durch einen Aminosäure-Linker hergestellt. Die Linker haben unterschiedliche Längen. Der längere Linker $(G_4S_1)_3$ zwischen den variablen Domänen einer Spezifität zählt 15 Aminosäuren und der kürzere zwischen den Domänen der beiden Spezifitäten besteht aus fünf Aminosäuren (G_4S_1) . Das Verbindungsstück der beiden antigenspezifischen Domänen verhindert ein Fehlarrangement der beiden BiTE[®]-Arme, während der längere Linker die optimale Paarung der V_L und V_H einer Spezifität ermöglicht [33]. Die Glycin-Reste des Linkers sorgen für die

notwendige Flexibilität und der hydrophile Serin-Rest verhindert die Assoziation der hydrophoben variablen Domänen des scFv [93].

Die Antigenbindung der humanisierten schweren Kette der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wurde nach ihrer Paarung mit den elf selektierten leichten Ketten aus dem „Guided Selection“ Phagen-Display getestet (vgl. Kapitel 4.1.2.1). Dazu wurde zunächst die murine, parentale schwere Kette des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts aus dem Phagemid-Vektor durch die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BstEII* isoliert und durch die humanisierte schwere Kette ersetzt. Dieser human-IgE erkennende Teil des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts, das scFv-Fragment im Phagemid-Vektor, wurde zu dem von der Firma Micromet AG (heute AMGEN Research Munich GmbH) entwickelten human-CD3-bindenden scFv (anti CD3-scFv, anti CD3) addiert (vgl. Abbildung 11). Dieser Schritt erfolgte direkt im Säugetierexpressionsvektor, indem der dort befindliche Platzhalter durch Restriktionsenzyme entfernt und durch das antigenbindende scFv-Fragment ersetzt wurde. Der Säugetierexpressionsvektor pefDHFR barg weitere regulatorische Einheiten, wie die Leadersequenz des Maus-V_{K1}-Segments, die Kozak-Erkennungssequenz und ein HIS₆-Motiv. Die schweren und leichten Ketten des IgE-bindenden Teils der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wurden in zwei Orientierungen kloniert. Es wurde die schwere Kette vor der leichten Kette inseriert, wie in Abbildung 11 gezeigt, und in der umgekehrten Reihenfolge.

Anhand dieser Sequenzinformation konnten die transfizierten CHO^{DHFR}-Zellen ein Fusionsprotein aus dem IgE-erkennenden scFv-Fragment (α IgE-scFv, α IgE) und dem CD3 ϵ -erkennenden scFv-Fragment produzieren. Der daran anschließende His₆-Anhang („His-Tag“) machte die Aufreinigung des BiTE[®]-Antikörpers durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie und den Nachweis des Proteins durch Immunfluoreszenz möglich (vgl. Kapitel 3.4.4, 3.4.5).

4.1.2.5 Bindungsaktivität der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte

Die Bindungsaktivität der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wurde direkt aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen getestet. Untransfizierte CHO^{DHFR}-Zellen dienten als negative Kontrolle, die humane T-Zelllinie HPB-all der Überprüfung der CD3-Bindung und die mit humanem-IgE-transfizierten

CHO^{DHFR}-Zellen (CHOxhuman IgE, vgl. Kapitel 4.1.1) der Überprüfung der IgE-Bindung. Die untenstehende Abbildung 12 illustriert die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung (vgl. Kapitel 3.1.8.1) beispielhaft anhand von zwei BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten (αIgE₂αCD3 in Reihe C und αIgE₁αCD3 in Reihe D). Die linke Spalte zeigt die untransfizierten Zellen (CHO^{DHFR}-) im Vergleich zu den mit IgE_{kurz}-transfizierten Zellen in der Mitte und den human-CD3-exprimierenden T-Zelllinie HPB-all in der rechten Spalte. In der ersten Reihe (A) ist die Populationsverteilung der Zellen durch Dot Plots gezeigt. Die human-IgE-transfizierte Zelllinie und die CD3-exprimierende T-Zelllinie waren auf die Expression von IgE bzw. CD3 getestet worden (Reihe B). Die Anzahl der fluoreszenten Zellen wurde linear auf der Y-Achse und deren Fluoreszenzintensität logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen.

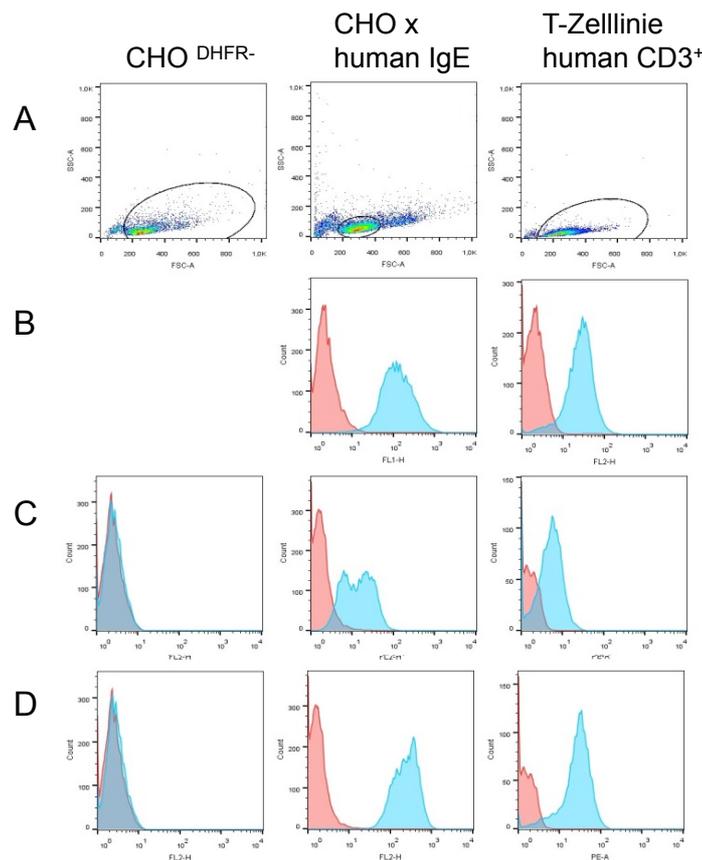


Abbildung 12: FACS Analyse der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte (Zellkulturüberstände)

Linke Spalte: CHO^{DHFR}-Zellen; Mittlere Spalte: transfizierte CHO^{DHFR}-Zellen (IgE_{kurz}); Rechte Spalte: humane T-Zelllinie (HPB-all); A: Zellpopulationsverteilung und Gates, B: Positivkontrollen der Antigenexpression; C: αIgE₂αCD3-scFv BiTE[®] D: αIgE₁αCD3-scFv BiTE[®].

Sowohl CD3, als auch IgE konnten durch die Färbung auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzfärbung der IgE-positiven Zellen, die mit BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten in HL-Orientierung gefärbt worden waren, war etwas stärker als die der Konstrukte in LH-Orientierung. Die Reihen C und D zeigen Histogramme von zwei BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten, die sich durch deren Fluoreszenzintensität unterschieden. Obwohl der $\alpha\text{IgE}_2\alpha\text{CD3}$ -scFv BiTE[®]-Antikörper (Reihe C) sowohl humanes IgE (mittlere Spalte) als auch humanes CD3 (rechte Spalte) erkannte und erwartungsgemäß kein Fluoreszenzsignal auf untransfizierten CHO^{DHFR}-Zellen erkennen ließ, blieb dessen Signal im Vergleich zum $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -scFv BiTE[®]-Antikörper zurück. Die Auswertung der Daten zur Bindungsaktivität (siehe oben) ermöglichten in Kombination mit den *in silico* herausgefundenen potentiellen Eigenschaften eine Auswahl der zehn vielversprechendsten Kandidaten zur weiterführenden Charakterisierung. Positive Auswahlkriterien wie außergewöhnliche CDR3-Aminosäuresequenzen und eine möglichst hohe Variabilität der D- und J-Segmente über das ganze Repertoire wurden genauso berücksichtigt, wie negative Merkmale wie eine geringe Sequenzhomologie zu humanen Keimbahnsequenzen und das Vorkommen von Glykosylierungs-, D-Isomerisierungs- und N-Deamidierungsstellen. Die Bindungseigenschaften der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte, welche sich durch möglichst hohe Fluoreszenzsignale und einem gleichzeitig negativen Signal auf untransfizierten Zellen auszeichneten, waren eine Grundvoraussetzung zur Selektion.

Aus der Gruppe der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte, die den Vk3-Locus und das Gen A27 zur Bildung der leichten Kette verwendeten, wurden die BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte $\alpha\text{IgE}_2\alpha\text{CD3}$ und $\alpha\text{IgE}_3\alpha\text{CD3}$ ausgewählt. Die Konstrukte, die denselben Locus umgeordnet hatten, aber zudem ähnlich zu Gen L6 waren, zeigten die besten Eigenschaften ($\alpha\text{IgE}_4\alpha\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_5\alpha\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_6\alpha\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$, sowie $\alpha\text{IgE}_7\alpha\text{CD3}$ und $\alpha\text{IgE}_8\alpha\text{CD3}$). Diese Gruppe wurde breiter gefasst, da der scFV-Klon #7 und #8 eine Isomerisierungsstelle weniger als die Klone #1 und #6 sowie #4 und #5 aufwiesen und die Bindungseigenschaften bei allen sehr positiv waren. Die Gruppe der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte, die den Lambda-Locus für die leichte Kette verwendeten, führte zu zwei auserwählten BiTE[®]-Antikörper-

Konstrukten. Der $\alpha\text{IgE}_9\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper mit der leichten $\text{V}\lambda 1$ -Kette sowie der $\alpha\text{IgE}_{10}\alpha\text{CD3}$ BiTE[®]-Antikörper mit der leichten $\text{V}\lambda 2$ -Kette. Obwohl $\alpha\text{IgE}_{10}\alpha\text{CD3}$ eine potentielle Deamidierungs- und eine Glykosylierungsstelle aufwies, zeigte dieses Konstrukt gute Bindungseigenschaften und wurde aufgrund seiner alleinständigen Eigenschaften in die weitere Charakterisierung eingeschlossen.

Die weiterführenden Experimente der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte erfolgten nach der Produktion in 500 ml Medium in Rollerflaschen. Nach circa zehn Tagen wurde das Zellkulturmedium gewonnen und das enthaltene BiTE[®]-Molekül durch die in Kapitel 3.4 beschriebenen Methoden für die Proteinreinigung isoliert.

4.1.2.6 Biochemische Eigenschaften und Analyse der Reinigung der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte

Die biochemischen Eigenschaften und besonders die Reinheit der isolierten Proteine wurden unter anderem durch SDS-PAGE und Western Blots überprüft. Während die BiTE[®]-Moleküle aus dem Zellkulturüberstand gewonnen wurden, wurden Proben des Ausgangsmaterials (ZKÜ) und der isolierten Fraktionen des BiTE[®]-Monomers und des BiTE[®]-Dimers (Mono, Di) während der Proteinreinigung gesammelt. Die Reinigung eines BiTE[®]-Antikörpers erfolgte über eine Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) und eine anschließende Größenauftrennung durch Gelfiltration (SEC). Die Chromatogramme, welche durch die Software UNICORN™ Manager erstellt wurden, zeigt beispielhaft Abbildung 13.

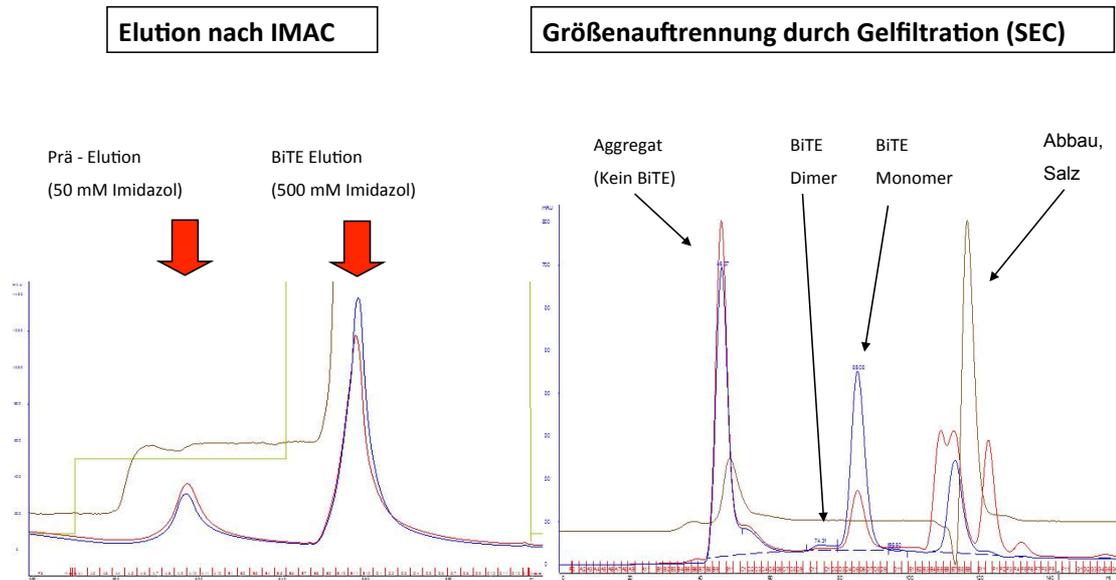


Abbildung 13: beispielhafte Darstellung der Chromatogramme einer IMAC und einer SEC

Das linke Bild zeigt die Auftrennung einer BiTE[®]-haltigen Probe nach der sequenziellen Elution mit zunächst 50 mM Imidazol und im zweiten Schritt 500 mM Imidazol (rote Pfeile). Die beiden Ausschläge der Kurven zeigen die eluierte Proteinmenge in mAU. Das rechte Bild illustriert das SEC-Chromatogramm einer BiTE[®]-haltigen Probe. Die Auftrennung anhand der Molekülmasse eluiert zunächst Aggregate, dann das BiTE[®]-Dimer und schließlich das gewünschte BiTE[®]-Monomer. Abbauprodukte und Salze werden zuletzt angezeigt.

Die IMAC-Reinigung basierte auf der Bindung des His₆-Anhangs des BiTE[®]-Antikörpers an die Zinkionen der IMAC-Säule und immobilisierte das im Zellkulturüberstand enthaltene BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt auf der Säule. Durch die sequenzielle Elution mit zunächst 50 mM Imidazol und anschließend 500 mM Imidazol wurden im ersten Schritt Proteine, die in schwache Wechselwirkung mit den Zinkionen traten, eluiert und im zweiten Schritt das BiTE[®]-Molekül, dessen His₆-Anhang mit den Zinkionen der Säule stark wechselwirkte. Das Äkta-Gerät misst parallel zur IMAC und SEC die Absorption der eluierten Lösung bei 280nm und 260nm. Dabei verzeichnet es bei der Reinigung von BiTE[®]-Antikörpern während der IMAC typischerweise zwei Anstiege (Peaks). Der erste Peak resultiert aus der Elution der unspezifisch gebundenen Proteine aus dem Zellkulturüberstand und der zweite Peak üblicherweise aus der Elution des gewünschten BiTE[®]-Moleküls. Das rechte Chromatogramm zeigt die Auftrennung des konzentrierten IMAC-

Eluats durch eine Gelfiltration. Im Unterschied zur IMAC, in der die Proteine nach deren Bindung an die Zinkionen selektiert wurden, wurden die Proteine während der Gelfiltration auf Grundlage ihrer Größe differenziert. Durch unterschiedliche Retentionszeiten während der Elution wurden sie in Aggregate, BiTE[®]-Dimer, BiTE[®]-Monomer, Abbauprodukte und Salz eingeteilt. Jede Fraktion der IMAC und SEC wurde, sofern sie vorhanden war, gesammelt und zur Analytik verwendet.

Die SDS-PAGE gab Aufschluss über die Menge, die Reinheit, die Glykosylierung, Abbauprodukte und die Laufeigenschaften des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts (vgl. Abbildung 14). Die Proteinmenge wurde mit einer Konzentrationsreferenz (Konz.-Ref.), die aus zwei bis drei aufgereinigten BiTE[®]-Proben mit bekannter Proteinmenge bestand, verglichen (25 ng, 50 ng, 100 ng). Abbildung 14 zeigt die SDS-PAGE von zwei ausgewählten IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukten. Der BiTE[®]-Gehalt des Ausgangsmaterials (Bildunterschrift: ZKÜ) wird im Verhältnis zur Konzentrationsreferenz und der isolierten Fraktionen (Bildunterschrift: Mono, Di) sichtbar. Die Banden des Größenstandards (Marker) weisen auf die Referenzbanden von 50 kDa und 30 kDa hin. Das linke Bild zeigt keine Dimer-Fraktion der BiTE[®]-Proben $\alpha\text{IgE}_2\times\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_9\times\text{CD3}$ und $\alpha\text{IgE}_7\times\text{CD3}$. Die Monomer-Fraktionen wiesen weder Abbaufractionen noch Aggregate der Moleküle auf. Die BiTE[®]-Konzentration lag bei allen Proben unter 25 ng. Das rechte Bild bildet die IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte $\alpha\text{IgE}_4\times\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_8\times\text{CD3}$ und $\alpha\text{IgE}_6\times\text{CD3}$ ab und zeigt einen hohen bzw. nachweisbaren BiTE[®]-Gehalt im Ausgangsmaterial ($\alpha\text{IgE}_4\times\text{CD3}$ bzw. $\alpha\text{IgE}_6\times\text{CD3}$). Die Monomer-Fraktion war von der Fraktion des Dimers bezüglich der Molekülmasse nicht zu unterscheiden, da die Vorbehandlung der Proben durch das Aufkochen auf 70 °C und der Zugabe von dTT die Disulfidbrücken zwischen den BiTE[®]-Monomeren trennte und damit die Dimer-Fraktion auf der Höhe der Monomere erscheinen ließ (55 kDa). Da die Monomer-Fraktionen keine weiteren Verunreinigungen aufwiesen, waren alle in Abbildung 14 gezeigten BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte qualitativ hochwertig aufzureinigen und verhielten sich bezüglich ihrer Masse den Erwartungen entsprechend.

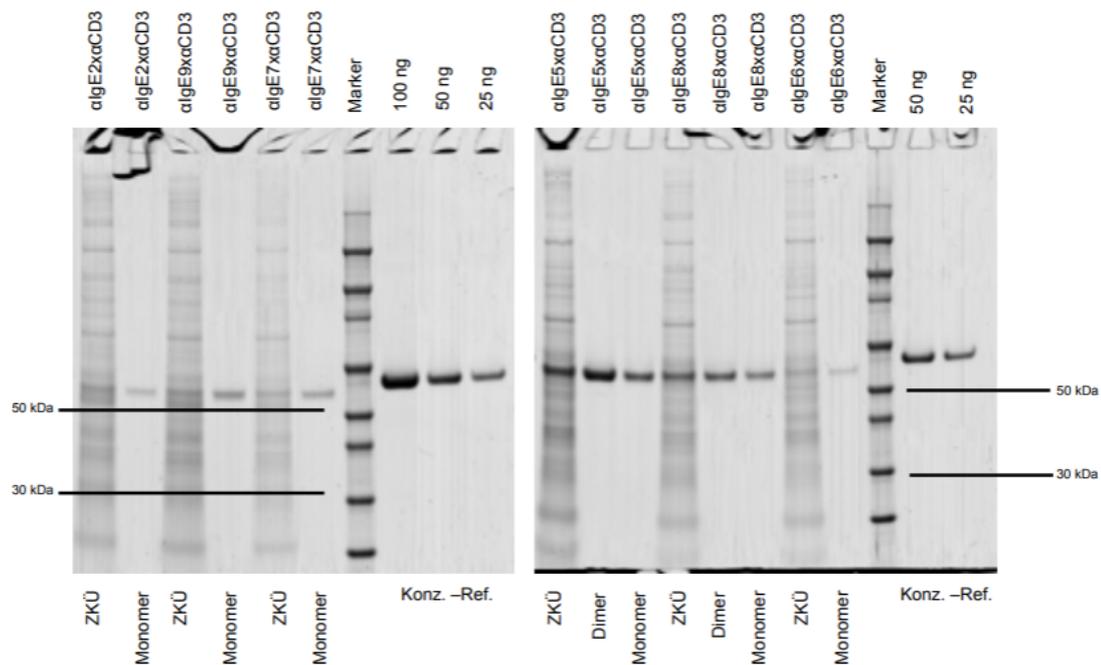


Abbildung 14: SDS-PAGE der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte I

Die transfizierten BiTE[®]-Konstrukte und die Konzentrationen der eingesetzten Konzentrationsreferenz (Konz.-Ref.). Die Bildunterschrift markiert die Spur der aufkonzentrierten Zellkulturüberstände (ZKÜ), der Monomerfraktion nach der Größenausschlusschromatographie (SEC) und der Dimerfraktion nach der SEC. Linkes Bild: BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte α IgE₂ \times α CD3, α IgE₉ \times α CD3 und α IgE₇ \times α CD3 aufgetragen, Rechtes Bild: BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte α IgE₄ \times α CD3, α IgE₈ \times α CD3 und α IgE₆ \times α CD3. Der Größenstandard (Marker) referenziert die Proteingröße in kDa der angefärbten Proteinbanden. Die Größen 30 kDa und 50 kDa sind durch schwarze Linien hervorgehoben.

Da BiTE[®]-Moleküle durch den His₆-Anhang markiert waren, wurden sie mit His₆-spezifischen Antikörpern detektiert. Ein Western-Blot machte die nach ihrer Masse aufgetrennten Proteinbanden sichtbar und ließ das immobilisierte BiTE[®]-Molekül auf der Nitrocellulosemembran durch die Detektion mit Peroxidase und deren Substrat NCIP-BIT schwarz erscheinen. Der in Abbildung 15 gezeigte Western Blot entspricht den Proben, die in Abbildung 14 verwendet wurden.

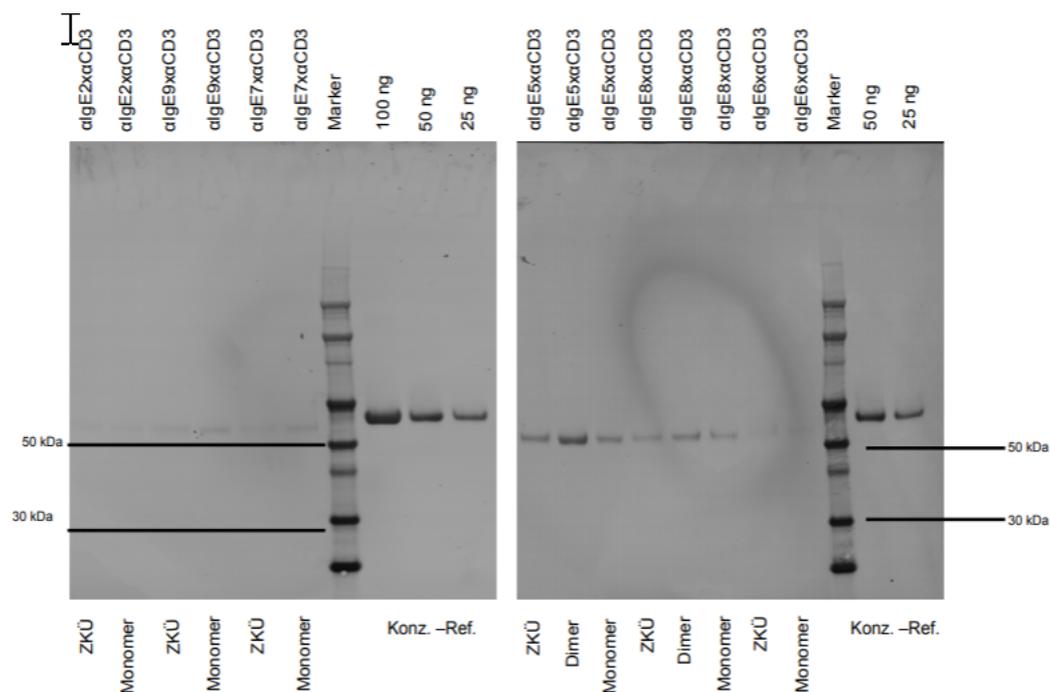


Abbildung 15: Western Blot der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte I

Die transfizierten BiTE[®]-Konstrukte und die Konzentrationen der eingesetzten Konzentrationsreferenz (Konz.-Ref.). Die Bildunterschrift markiert die Spur der aufkonzentrierten Zellkulturüberstände (ZKÜ), der Monomerfraktion nach der Größenausschlusschromatographie (SEC) und der Dimerfraktion nach der SEC. Linkes Bild: BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte $\text{algE}_2\text{x}\alpha\text{CD}_3$, $\text{algE}_9\text{x}\alpha\text{CD}_3$ und $\text{algE}_7\text{x}\alpha\text{CD}_3$ aufgetragen, Rechtes Bild: BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte $\text{algE}_4\text{x}\alpha\text{CD}_3$, $\text{algE}_8\text{x}\alpha\text{CD}_3$ und $\text{algE}_6\text{x}\alpha\text{CD}_3$. Der Größenstandard (Marker) referenziert die Proteingröße in kDa der angefärbten Proteinbanden. Die Größen 30 kDa und 50 kDa sind durch schwarze Linien hervorgehoben.

Beide Membranen waren auf der Höhe von 55 kDa durch schwarze Banden angefärbt. Alle BiTE[®]-Moleküle waren in der Ausgangsprobe vorhanden und ließen sich in den aufgereinigten Monomer- und Dimer-Fractionen wiederfinden. Das linke Bild war durch die geringe Konzentration der BiTE[®]-Konstrukte im Zellkulturüberstand und auch in den Fraktionen geprägt und zeigte deshalb nur schwache graue Banden. Der Westernblot im rechten Bild zeigte vor allem die deutlichen Signale des $\text{algE}_5\text{x}\alpha\text{CD}_3$ BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts.

Die SDS-PAGE der übrigen IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte $\text{algE}_1\text{x}\alpha\text{CD}_3$, $\text{algE}_3\text{x}\alpha\text{CD}_3$, $\text{algE}_{10}\text{x}\alpha\text{CD}_3$ und $\text{algE}_4\text{x}\alpha\text{CD}_3$ zeigt Abbildung 16. Sofort ersichtlich ist, dass das Konstrukt $\text{algE}_1\text{x}\alpha\text{CD}_3$ im linken Bild mehr BiTE[®]-Monomer als -Dimer in den SEC-Fractionen enthielt und im

Zellkulturüberstand die Bande bei 55 kDa deutlich zu sehen war. Der Gehalt des Monomers in der Probe war zudem mit mehr als 100 ng hoch, was auf eine gute Produktivität schließen ließ. Der $\alpha\text{IgE}_3\times\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®] war deutlich geringer konzentriert als Monomer und im Zellkulturüberstand nachweisbar. Der $\text{IgE-CH3-BiTE}^{\text{®}}$ $\alpha\text{IgE}_{10}\times\alpha\text{CD3}$ war im Zellkulturüberstand kaum erkennbar und nach der SEC nur als Abbauprodukt zu isolieren. Dieser BiTE[®]-Antikörper konnte nicht als Monomer gewonnen werden. Obwohl bei diesem Konstrukt ein glykosyliertes Protein zu erwarten gewesen wäre, konnte kein entsprechendes detektiert werden. Das rechte Bild zeigt abschließend den BiTE[®]-Antikörper $\alpha\text{IgE}_4\times\alpha\text{CD3}$. Auch dieses Molekül zeigte eine große Proteinmenge im Zellkulturüberstand. Im Gegensatz zu $\alpha\text{IgE}_1\times\alpha\text{CD3}$ schien die Menge des Dimers jedoch etwas größer als die des Monomers zu sein.

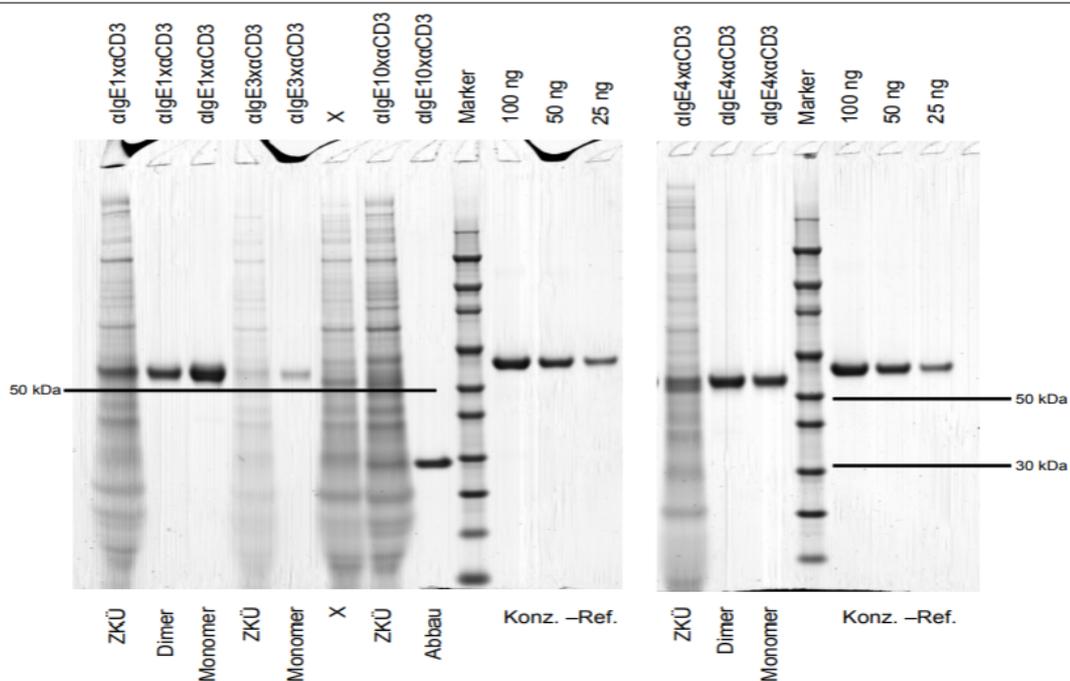


Abbildung 16: SDS-PAGE der $\text{IgE-CH3-BiTE}^{\text{®}}$ -Antikörper-Konstrukte II

Die transfizierten BiTE[®]-Konstrukte und die Konzentrationen der eingesetzten Konzentrationsreferenz (Konz.-Ref.). Die Bildunterschrift markiert die Spur der aufkonzentrierten Zellkulturüberstände (ZKÜ), der Monomerfraktion (Mono) nach der Größenausschlusschromatographie (SEC) und der Dimerfraktion (Di) nach der SEC. Linkes Bild: BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte $\alpha\text{IgE}_1\times\alpha\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_3\times\alpha\text{CD3}$ und $\alpha\text{IgE}_{10}\times\alpha\text{CD3}$, rechtes Bild: $\alpha\text{IgE}_4\times\alpha\text{CD3}$. Der Größenstandard (Marker) referenziert die Proteingröße in kDa der angefärbten Proteinbanden. Die Größen 30 kDa und 50 kDa sind durch schwarze Linien hervorgehoben.

Abbildung 17 zeigt den Western Blot zu oben gezeigtem Bild der SDS-PAGE. Die Bande des Monomers des $\text{algE}_1\alpha\text{CD3-BiTE}^{\text{®}}$ war klar erkennbar und im Vergleich zu der des Dimers und des Proteins im Zellkulturüberstand stärker. Auch das $\text{BiTE}^{\text{®}}$ -Molekül $\text{algE}_3\alpha\text{CD3}$ wurde durch die IMAC und SEC aus dem Zellkulturüberstand angereichert und die Monomerfraktion in geringerer Konzentration isoliert. Daran anschließend wies das $\text{algE}_{10}\alpha\text{CD3-BiTE}^{\text{®}}$, in den beiden Spuren vor dem Größenstandard, etwas $\text{BiTE}^{\text{®}}$ -Monomer oder -Dimer im Zellkulturüberstand und zu einem größeren Teil ein Abbauprodukt des $\text{BiTE}^{\text{®}}$ -Antikörper-Konstrukts auf. Nach der SEC konnte lediglich das Abbauprodukt isoliert und nachgewiesen werden.

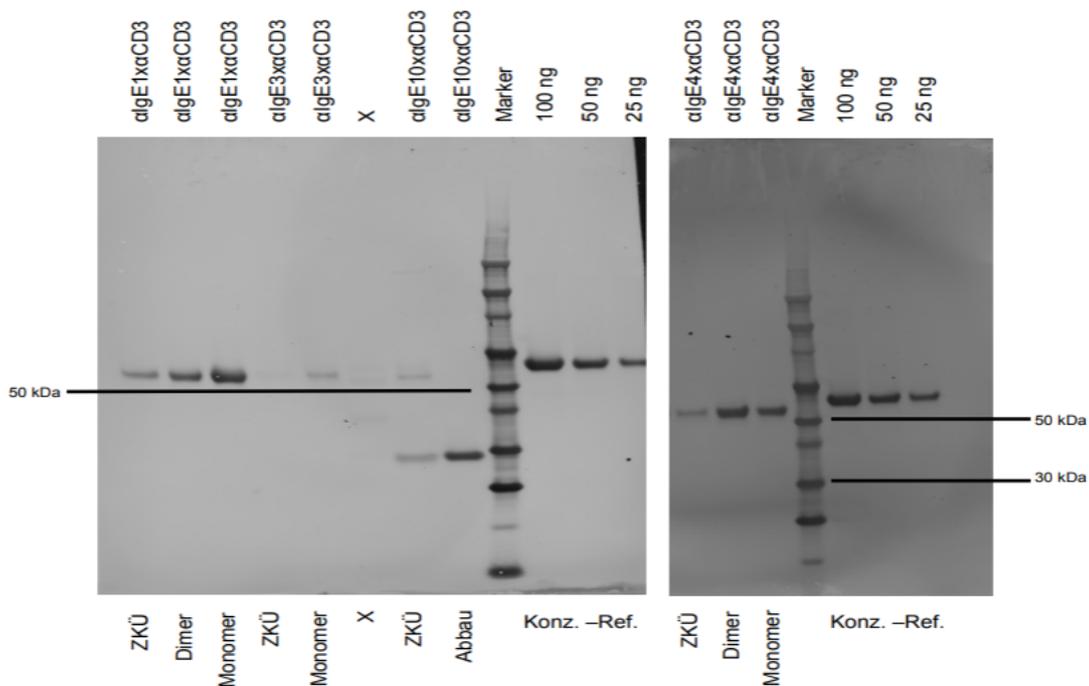


Abbildung 17: Western Blot der $\text{IgE-CH3-BiTE}^{\text{®}}$ -Antikörper-Konstrukte II

Die transfizierten $\text{BiTE}^{\text{®}}$ -Konstrukte und die Konzentrationen der eingesetzten Konzentrationsreferenz (Konz.-Ref.). Die Bildunterschrift markiert die Spur der aufkonzentrierten Zellkulturüberstände (ZKÜ), der Monomerfraktion (Mono) nach der Größenausschlusschromatographie (SEC) und der Dimerfraktion (Di) nach der SEC. Linkes Bild: $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$, $\alpha\text{IgE}_3\alpha\text{CD3}$ und $\alpha\text{IgE}_{10}\alpha\text{CD3}$, rechtes Bild: $\alpha\text{IgE}_4\alpha\text{CD3}$. Der Größenstandard (Marker) referenziert die Proteingröße in kDa der angefärbten Proteinbanden. Die Größen 30 kDa und 50 kDa sind durch schwarze Linien hervorgehoben.

Wie die SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen zeigen, wurden die $\text{BiTE}^{\text{®}}$ -Antikörper durch die Transfektanten hergestellt und in das Kulturmedium abgegeben. In neun von zehn Fällen konnte das $\text{BiTE}^{\text{®}}$ -

Monomer isoliert werden. Durch die gute Reinheit und Ausbeute konnte direkt im Anschluss deren biologische Aktivität geprüft werden.

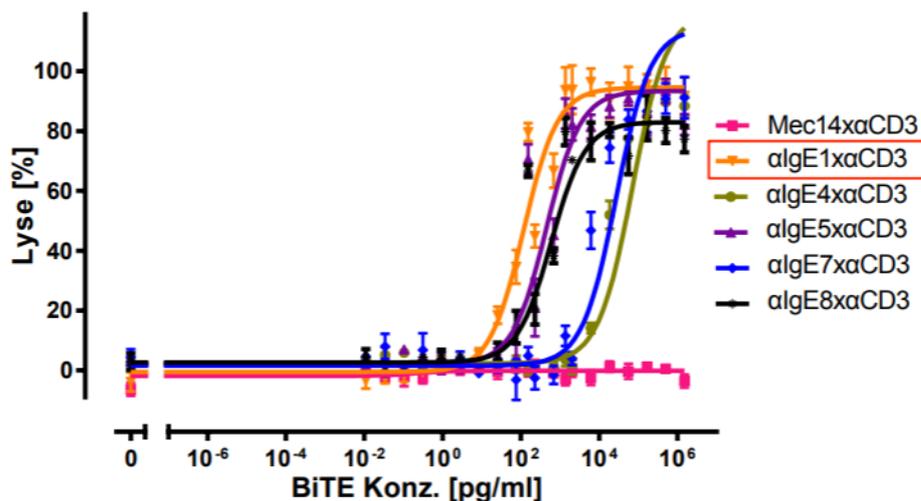
4.1.2.7 Zytotoxische Aktivität der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte

Die zytotoxische Wirksamkeit der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wurde durch einen Chromfreisetzungstest bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.2). Die oben bereits erwähnten J558L-Zellen, die mit humanem IgE_{kurz} transfiziert waren, fungierten als Zielzellen, während humane, stimulierte CD8⁺ T-Lymphozyten als Effektorzellen eingesetzt wurden. Die beiden folgenden Abbildungen (Abbildung 19 und Abbildung 18) zeigen die mit dem Programm GraphPadPrism[®] durchgeführte Auswertung der experimentellen Daten.

Die X-Achse gibt die Konzentration des eingesetzten BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts wieder. Die Y-Achse zeigt die Menge der lysierten Zielzellen in Prozent an. Dieser Wert wurde aus der jeweiligen Kultur aus der BiTE[®]-Verdünnung, den Zielzellen und den Effektorzellen nach 18 Stunden Inkubation ermittelt. Bei Lyse der Zielzelle konnte das frei werdende ⁵¹Chrom im Zellkulturmedium durch dessen Gammastrahlung quantifiziert werden. Die maximale Gammastrahlung wurde gemessen wenn dem Zellkulturmedium eine 10 % igen Triton[™]-X-100-Lösung zugegeben wurde. Das Detergenz permeabilisiert die Zellmembranen und das frei werdende ⁵¹Chrom konnte in den Überstand übergehen und gemessen werden. Dieser Messwert wird als 100 % Lyse gesetzt (Maximallyse). Die BiTE[®]-unabhängige Lyse die sich in einem Grundlevel lysierter Zielzellen äußert und durch das Experiment hervorgerufen wird, wurde ebenfalls bestimmt. Alle Lysewerte werden zu diesen beiden ins Verhältnis gesetzt. Man erfasste dabei die Gammastrahlung, die entsteht wenn stimulierte CD8⁺ T-Zellen ohne die Einwirkung eines BiTE[®]-Antikörpers mit mIgE⁺ Zielzellen für 18 Stunden inkubiert wurden.

Die mIgE⁺ Transfektanten wurden in Abhängigkeit der Konzentration des eingesetzten IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts von den stimulierten CD8⁺ T-Zellen lysiert. Im Vergleich zum Kontroll-BiTE[®], das spezifisch für ein Herbizid ist und keine Apoptose hervorrief, waren die neun BiTE[®]-Kandidaten in der Lage bei Konzentrationen zwischen 1 und 10 ng/ml 90-100 % der Zielzellen zu lysieren.

Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) eines BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts gibt die BiTE[®]-Konzentration an, bei der die Hälfte der Zielzellen im Vergleich zu der maximalen Lyse und der BiTE[®]-unabhängigen Lyse lysiert waren. BiTE[®]-Antikörper erzielen allgemein in einem Chromfreisetzungstest mit unstimulierten T-Zellen eine EC_{50} zwischen 10 und 10000 pg/ml [94]. Die IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wiesen in Verbindung mit stimulierten T-Zellen eine EC_{50} zwischen 70338 pg/ml und 118 pg/ml auf. Das aktivste IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ (roter Rahmen, vgl. Abbildung 18) lag mit einer EC_{50} von 118 pg/ml im mittleren Bereich der zytotoxischen Aktivität publizierter BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte und wurde deshalb weiter charakterisiert [95-98].



	Mec14αCD3	$\alpha IgE_1 \alpha CD3$	$\alpha IgE_4 \alpha CD3$	$\alpha IgE_5 \alpha CD3$	$\alpha IgE_7 \alpha CD3$	$\alpha IgE_8 \alpha CD3$
EC_{50} (pg/ml)	nicht bestimmbar	118	70338	453	27447	596

Abbildung 18: ⁵¹Chromfreisetzungstest der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte I

Effektorzellen: aktivierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen; Zielzellen: J558L Zellen, transfiziert mit humanem IgE_{kurz}; Effektor- zu Zielzell-Verhältnis: (E:Z)10:1. 18 Stunden Inkubation

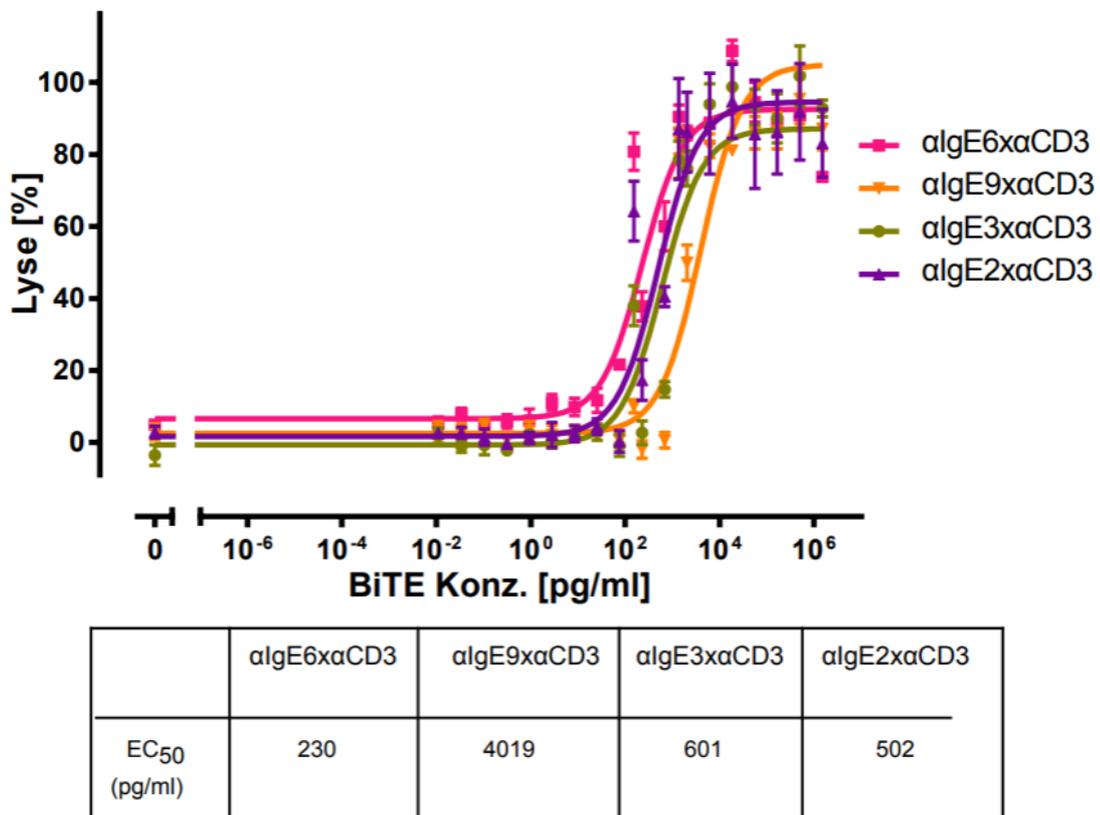


Abbildung 19: ⁵¹Chromfreisetzungstest der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte II
 Effektorzellen: aktivierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen. Zielzellen:
 J558L-Zellen, transfiziert mit humanem IgE_{kurz}. Effektor- zu Zielzell-
 Verhältnis (E:Z): 10:1. 18 Stunden Inkubation

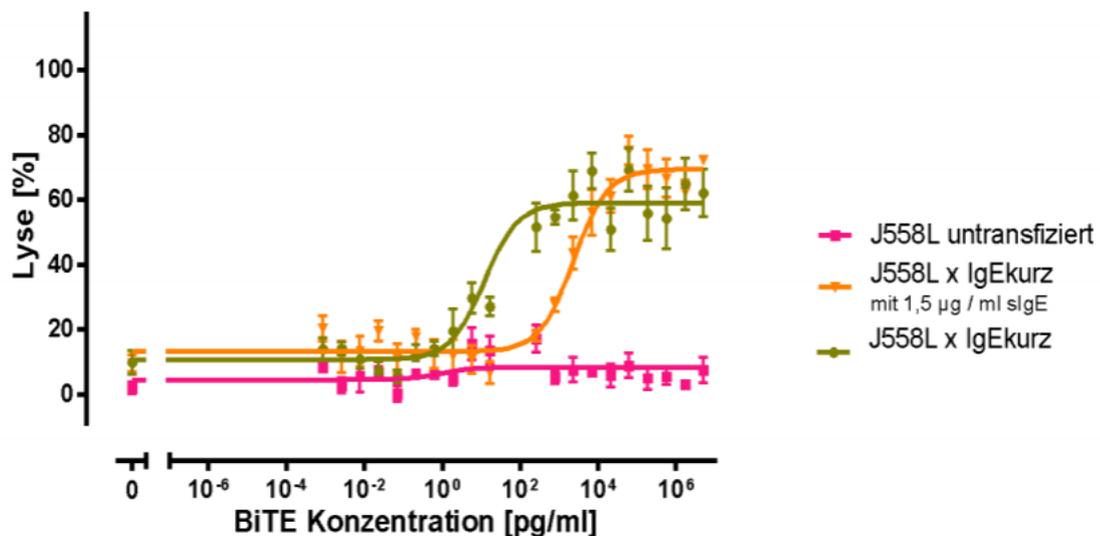
4.1.2.8 Zytotoxische Aktivität des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts algE₁xαCD3 in Anwesenheit von löslichem IgE

Lösliches, im Serum vorkommendes IgE (slgE) kann durch das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt gebunden werden, da die CH3-Domäne von slgE nicht durch die Bindung an die Fcε-Rezeptoren verdeckt ist. Bei gesunden nicht allergischen Menschen liegt die physiologische Serum-IgE-Konzentration bei 150 ng/ml.

Da jedoch mehr als ein Drittel der Bevölkerung der Industrieländer eine Prädisposition zu einer überschießenden IgE-Antwort hat und gegen eine Vielzahl von Umweltantigenen allergisch reagiert, ist mit einer Hemmung des anti-IgE-BiTE[®] algE₁xαCD3 durch die erhöhte slgE-Konzentration im Blut und den Geweben zu rechnen. Die genetische Veranlagung der übertrieben

starken Immunantwort wird als „Atopie“ bezeichnet und wurde von Coca und Cooke bereits 1923 beschrieben [99, 100]. Atopiker haben gegenüber gesunden Menschen einen zehnfach höheren sIgE-Titer in ihrem Blut und neigen dazu Asthma und atopische Dermatitis zu entwickeln.

Da Atopiker als potentielle Patienten für eine mögliche Therapie mit dem IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ in Frage kommen, wurde die Auswirkung von sIgE auf die Aktivität des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts geprüft. In Anlehnung an die sIgE-Titer bei Atopikern wurde den Experimentansätzen 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sIgE zugegeben. Die unspezifische Bindung des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an andere Oberflächenmoleküle der J558L Zelllinie wurde durch den Test von untransfizierten Zellen mitgetestet. Wie Abbildung 20 demonstriert, beeinflusst das zugesetzte sIgE (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) die Aktivität des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®].



	$\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ + mIgE, - sIgE	$\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ + mIgE + sIgE	$\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ - mIgE, - sIgE
EC ₅₀ (pg/ml)	12	2297	nicht bestimmbar

Abbildung 20: ⁵¹Chromfreisetzungstest des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$

Effektorzellen: aktivierte, humane CD8⁺ T-Zellen; Zielzellen: J558L-Zellen, transfiziert mit humanem IgE_{kurz} oder die untransfizierte Ausgangszelllinie J558L; Effektor- zu Zielzell- (E:Z) Verhältnis: 10:1, 18 Stunden Inkubation

Die untransfizierten J558L-Zellen, die weder membranständiges IgE auf der Zelloberfläche exprimierten noch lösliches IgE im Serum hatten, wurden durch den IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper nicht lysiert (rote Kurve, Abbildung 20). Die EC₅₀ der IgE_{kurz}-transfizierten J558L-Zellen war bei einer Konzentration von 12 pg/ml erreicht. Die Lysedaten der J558LxIgE_{kurz}-Zellen unter Zugabe von 1,5 µg/ml löslichem IgE zeigten jedoch, dass die zytotoxische Aktivität des IgE-CH3-BiTE[®] fast um den Faktor 200 verringert wurde.

4.1.2.9 Das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt α IgE₁x α CD3 und rezeptorgebundenes IgE auf Effektorzellen der allergischen Reaktion

Im Folgenden soll geklärt werden, ob das α IgE₁x α CD3-BiTE[®] in der Lage ist, rezeptorgebundenes, lösliches IgE auf der Zelloberfläche der Hauptakteure einer allergischen Reaktion von membranständigem IgE auf B-Zellen zu unterscheiden.

Der antigenerkennende Teil des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts α IgE₁x α CD3 bindet an ein Epiptop der IgE-CH3-Domäne des humanen Immunglobulin E [54]. Dieses Epitop befindet sich im Fc-Teil des IgE-Moleküls und wird bei der Bindung an die IgE-Rezeptoren Fc ϵ RI und Fc ϵ RII blockiert. Es ist dann für das BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt nicht zugänglich.

Mastzellen, Basophile und Eosinophile binden lösliches Serum-IgE (sIgE) über den hoch-affinen Fc ϵ RI auf ihrer Zelloberfläche. Diese Effektorzellen der allergischen Reaktion sind in der Lage, in sehr kurzer Zeit einen systemischen, anaphylaktischen Schock auszulösen und werden durch die Quervernetzung des gebundenen sIgE durch beispielsweise Allergene aktiviert (siehe auch Kapitel 5.2). Diese Reaktion soll nicht durch die Bindung des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts α IgE₁x α CD3 ausgelöst werden.

Die Zelllinie RLB2H3 ist aus einer chemisch induzierten basophilen Leukämie der Ratte isoliert und wurde im Folgenden verwendet, um die Bindung der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte an Fc ϵ RI-gebundenes sIgE auszuschließen. Diese dient als Modellsystem für die Degranulation und Signaltransduktion von Mastzellen, die durch den Fc ϵ RI vermittelt wird [101-104]. Die RBL2H3-Zellen exprimieren, aufgrund ihres Ursprungs den Fc ϵ RI, der für murines IgE, spezifisch ist. Der Fc ϵ RI der Ratten und Mäuse besteht zwar aus drei Ketten, der α -, β -, und der γ -Kette, doch lediglich die α -Kette ist für die Bindung von löslichem IgE entscheidend [105]. Im Unterschied zum humanen Rezeptor

wird der Fc ϵ RI der untransfizierten RBL2H3-Zellen, wie bei allen murinen Zellen, lediglich als Heterotetramer an die Zelloberfläche transportiert, da das Retentionssignal für das endoplasmatische Retikulum in der α -Kette durch die β -Kette und die beiden γ -Ketten maskiert werden muss [106].

Die verwendete RBL2H3-Zelllinie war stabil mit der α -Kette des humanen Fc ϵ RI transfiziert (RBL2H3xFc ϵ RI- α) und vermittelte wie bereits früher nachgewiesen eine effektive Bindung von humanem, löslichem IgE an diesen rekombinanten Fc ϵ RI-Rezeptor [54, 107]. Die RBL2H3-Zellen wurden über Nacht mit 30 μ g/ml löslichem IgE kultiviert und am Folgetag für eine Fluoreszenzfärbung verwendet. Vor der Fluoreszenzfärbung mit α IgE $_1$ \times CD3 bzw. der Kontrolle der IgE-Beladung wurden alle Proben mit dem MausBDFcBlock™-Antikörpercocktail inkubiert. Diese Antikörpermischung blockiert die Fc γ -Rezeptoren der RBL2H3-Zellen, um eine unspezifische Bindung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers zu verhindern. Als Kontrolle fungierte dieselbe Zelllinie ohne die vorherige Inkubation mit humanem IgE. Die Abbildung 21 zeigt die Analyse der Fluoreszenzfärbung.

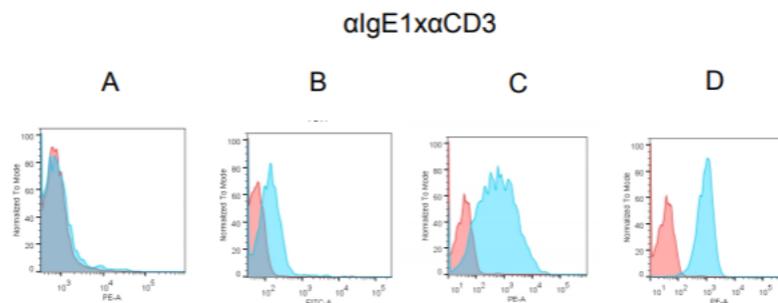


Abbildung 21: FACS-Analyse des gegen IgE gerichteten α IgE $_1$ \times CD3 BiTE[®]-Antikörper-Konstruktes

IgE-beladene Mastzell-Transfektanten und IgE-tragende J558L-Transfektanten; A: Fluoreszenzfärbung des α IgE $_1$ \times CD3-BiTE[®] auf human IgE-beladenen RBL2H3-Transfektanten; B: Kontrolle der IgE-Beladung; C: IgE-Bindung von α IgE $_1$ \times CD3; D: IgE-Expressionskontrolle, jeweils rot: Negativkontrolle, blau: Färbung mit BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt

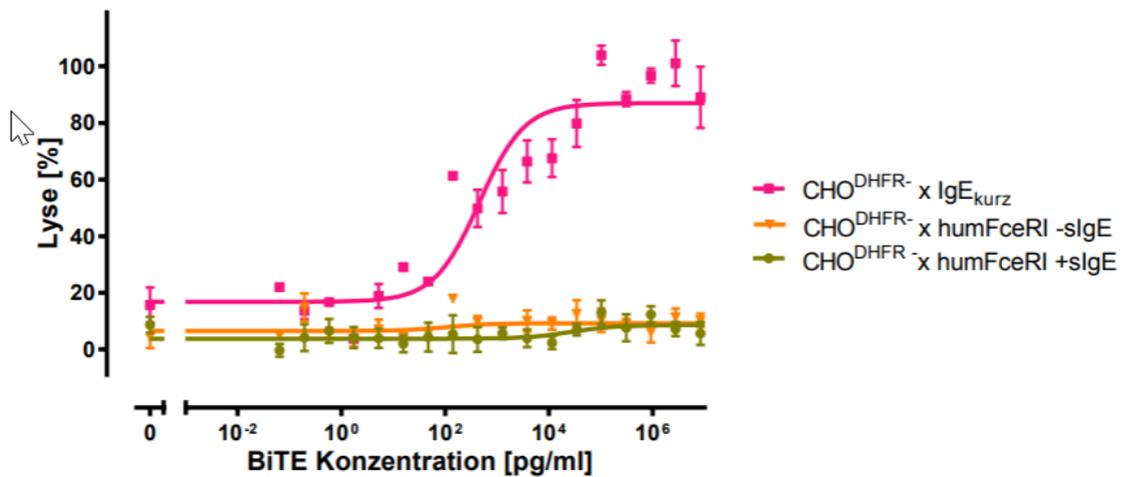
Spalte A zeigt das Histogramm der BiTE[®]-Färbung der IgE-beladenen RBL2H3-Zellen in blau und die der nicht beladenen Zellen in rot. Die erfolgreiche IgE-Beladung wurde durch die in Spalte B dargestellte Kontrolle belegt. Die nicht beladene RBL2H3-Zelllinie wurde gleich gefärbt wie die IgE-

beladene Probe und als Negativkontrolle verwendet. Ein schwaches Signal des Fc ϵ RI-gebundenen humanen löslichen IgE war durch den polyklonalen Kaninchen-anti-human-IgE-FITC-Antikörper im Vergleich zu den unbeladenen RBL2H3-Zellen nachzuweisen. Das α IgE $_1$ \times α CD3 BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt zeigte hingegen keine Bindung des löslichen, an den Rezeptor gebundenen Immunglobulins (Vergleich blauer Kurven in A und B). Eine Bindung sollte durch den mehrstufigen Fluoreszenznachweis von BiTE[®]-Antikörpern klar sichtbar sein und im Vergleich zur Kontrolle in Reihe B ein stärkeres Signal zeigen. Als Referenz der Bindung des membranständigen IgE dienten die J558L-Zellen, die mit humanem IgE transfiziert waren (Spalte C). Das deutliche Fluoreszenzsignal zeigt, dass das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt α IgE $_1$ \times α CD3 an membranständiges IgE auf den J558L-Zellen bindet. Die IgE-Expressionskontrolle der J558L-Transfektante ist in der Spalte D abgebildet.

4.1.2.10 Zytotoxische Aktivität des anti-IgE α IgE $_1$ \times α CD3-BiTE[®] auf Effektorzellen der allergischen Reaktion (Mastzellen, Basophile)

Da die Folgen einer BiTE[®]-vermittelten Apoptose und Lyse der Mastzellen potentiell zu einem anaphylaktischen Schock führen können, musste die Bindung des α IgE $_1$ \times α CD3-BiTE[®] an IgE, welches an den hochaffinen Fc ϵ RI bindet, ausgeschlossen werden. Obwohl das α IgE $_1$ \times α CD3-BiTE[®] keine Bindung an rezeptorgebundenen, löslichen IgE zeigte (vgl. Kapitel 4.1.2.9), sollte der sensitivere Chromfreisetzungstest dieses Ergebnis bestätigen.

Die zur Fluoreszenzzytometrie verwendeten RBL2H3-Zellen erwiesen sich als ungeeignet für den Chromfreisetzungstest. Deshalb wurden CHO^{DHFR}-Zellen mit der α -, der β - und der γ -Kette des humanen hoch-affinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RI transfiziert. Diese Transfektanten wurden am Vortag des Chromfreisetzungstests für ca. 16 h mit 15 μ g/ml sIgE und am Tag des Versuchsansatzes durch eine Fluoreszenzfärbung des Immunglobulins auf die erfolgreiche Rezeptorbindung geprüft (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität des IgE-CH3-BiTE[®] im Bezug auf die T-Zell-Rekrutierung gegen die Fc ϵ RI-Transfektanten zeigt Abbildung 22.



	αIgE ₁ αCD3 + IgE-Beladung - slgE	αIgE ₁ αCD3 + IgE-Beladung + slgE	αIgE ₁ αCD3 + mlgE
EC ₅₀ (pg/ml)	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	455

Abbildung 22: ⁵¹Chromfreisetzungstest des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts αIgE₁αCD3 mit CHO^{DHFR-}xhuman FcεRI-Transfektanten
Effektorzellen: stimulierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen; Zielzellen: CHO^{DHFR-}-Zellen, transfiziert mit der α-, β- und γ-Kette des humanen FcεRI oder mit IgE_{kurz}-transfiziert; Effektor- zu Zielzell- (E:Z) Verhältnis: 10:1, 18 Stunden Inkubation

Wie Abbildung 22 zeigt sind weder die FcεRI-transfizierten CHO^{DHFR-}-Zellen, die mit slgE vorinkubiert wurden, noch dieselben Zellen, die nicht mit slgE vorinkubiert wurden, durch die T-Zellen zu lysieren. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich CHO-Zellen mitgeführt, die mit membranständigem IgE transfiziert waren (humanes IgE_{kurz}, rote Kurve). Bei diesen Transfektanten ist das CH3-Epitop zugänglich und damit die Bindung des αIgE₁αCD3-BiTE[®] möglich. Damit wird deutlich, dass diese Zelllinie prinzipiell durch T-Zellen in die Apoptose geschickt werden kann. Die EC₅₀ lag in diesem Experiment bei 455 pg/ml und bestätigte die zytotoxische Aktivität des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts (siehe auch 4.1.2.7).

4.1.2.11 Temperaturstabilität des IgE-CH3-BiTE[®] (algE₁αCD3) im Vergleich zum Ursprungsmolekül (mulgExdiL2K)

Die thermische Stabilität lässt Rückschlüsse auf die allgemeine Stabilität der Proteinstruktur eines Moleküls zu und wurde durch die 5 minütige Erhitzung des BiTE[®]-Moleküls auf Temperaturen zwischen 4 °C und 95 °C bestimmt.

Das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt algE₁αCD3 wurde im Vergleich zu dem ursprünglich von Oktay Kirak entwickelten Molekül gemessen. Beide BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wurden für jeweils 5 min auf die zu testende Temperatur erhitzt und anschließend im Vergleich zur nicht erhitzten Probe in einer Fluoreszenzfärbung die Bindung an das Zielantigen gemessen.

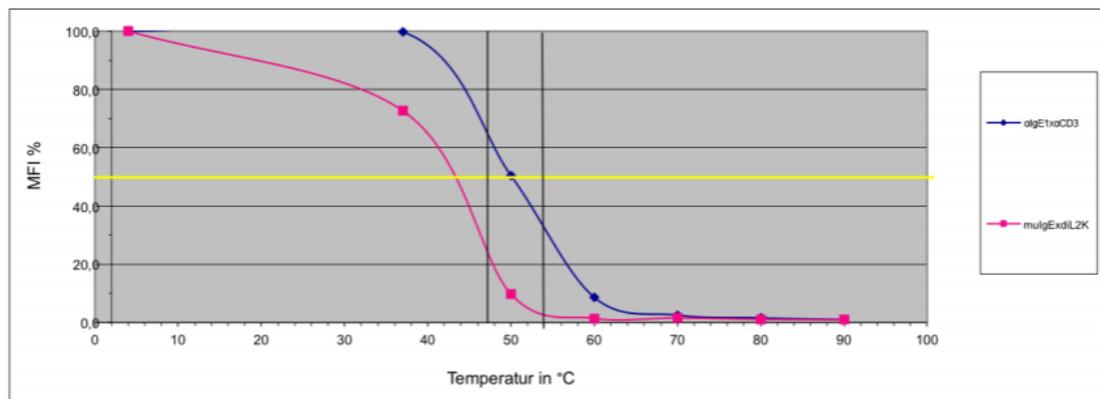


Abbildung 23: Grafik der Temperaturstabilität der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte

Y-Achse: Signalstärke in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) der FACS-Färbung in % in Relation zum Maximalwert bei 4 °C; X-Achse: Temperatur in °C. Rote Kurve: Ursprungs-BiTE[®] mulgExdiL2K, blaue Kurve: IgE-CH3-BiTE[®] algE₁αCD3, gelb: 50% MFI.

Die blaue Kurve für das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt algE₁αCD3 in Abbildung 23 zeigt die Aktivität in Abhängigkeit der Temperatureinwirkung. Die rote Kurve zeigt die des Ursprungsmoleküls mulgExdiL2K. Die maximale mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde mit der Bindungsaktivität der unbehandelten BiTE[®]-Probe gemessen und als 100 % Wert gesetzt. Vergleich man die beiden Kurven, ließ sich bereits nach der Inkubation bei 37 °C eine unterschiedliche Bindungsaktivität der beiden Moleküle beobachten. Das algE₁αCD3-BiTE[®]-Konstrukt zeigte keine Veränderung bei 37 °C, während das Ursprungsmolekül mulgExdiL2K bereits eine reduzierte Bindungsaktivität

aufwies. Im Vergleich war die halbmaximale Aktivität (gelbe Linie) der beiden Moleküle bei $\text{algE}_1\alpha\text{CD3}$ nach einer Inkubation bei 50 °C und die des Ursprungsmoleküls mulgExdiL2K bei ca. 42 °C zu beobachten. Der neu kombinierte, humanisierte BiTE[®]-Antikörper $\text{algE}_1\alpha\text{CD3}$ wies eine höhere Proteinstabilität als sein Ursprungsmolekül mulgExdiL2K auf.

4.1.2.12 Zytotoxische Aktivität des $\text{algE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®] *in vivo*

„In vivo veritas“ – Können Tumorzellen in einem lebenden Organismus durch das $\text{algE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®] lysiert werden?

Viele Daten können „in einem Reagenzglas“ – *in vitro*, erhoben werden. Den Beweis, dass ein erdachtes Konzept in einem lebenden Organismus funktional und effektiv ist, erbringt in vielen Fällen jedoch das *in vivo* Experiment.

Aufgrund der Spezifität des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts für humane Oberflächenproteine wurde das Molekül in Mäusen mit einem Immundefekt, der „Severe combined immunodeficiency“ (SCID) getestet, die von einem spezialisierten Züchter (Charles River) bezogen wurden. Dieser Mausstamm weist eine homozygote Mutation des Gens *PKrdc* auf Chromosom 16 auf. Die durch dieses Gen kodierte Proteinkinase ist in die DNS-Doppelstrangreparatur involviert und wirkt unter anderem bei der Umlagerung der Antigenrezeptorgene mit. Bedingt durch die fehlende funktionale Proteinkinase können die Mäuse kein humorales und zelluläres Immunsystem entwickeln, da der Mechanismus der V(D)J-Rekombination während der Reifung der B- und T-Lymphozyten nicht stattfinden kann. SCID-Mäuse weisen daher keine funktionalen T- und B-Zellen auf. Die Mäuse sind weder in der Lage die fremden humanen PBMZ, noch die mit humanem IgE transfizierten J558L-Zellen abzustößen. Sie sind zusätzlich mit dem genetischen Hintergrund eines Mausstammes mit der Bezeichnung „non obese diabetic“ (NOD) rückgekreuzt, wodurch sie deutlich weniger funktionale natürliche Killerzellen bilden können [108]. Die Abbildung 24 zeigt das Ergebnis eines 22 Tage andauernden Behandlungsexperiments, das die Entwicklung von Tumoren in NOD/SCID-Mäusen (NOD.CB17PkrdcScid/NCrHsd) verfolgte. An Tag 0 wurden den Mäusen jeweils $1 \cdot 10^6$ mit IgE_{kurz} -transfizierten Tumorzellen zusammen mit $2 \cdot 10^6$ humanen unstimulierten PBMZ subkutan injiziert. Die Mäuse wurden in

vier Gruppen zu je 10 Tieren separiert. Gruppe 1 erhielt statt des BiTE[®]-Moleküls den Citrat/ Lysin-Puffer, in welchem der BiTE[®]-Antikörper formuliert war. Die Gruppen 2, 3 und 4 wurden mit unterschiedlichen Dosen des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®] behandelt. Die Gruppe 2 erhielt 0,005 mg/kg/d, die Gruppe 3 0,05 mg/kg/d und Gruppe 4 0,5 mg/kg/d. Die BiTE[®]-Behandlung bei den Testgruppen bzw. die Verabreichung des Puffers in der Kontrollgruppe begann bereits eine Stunde nach der Injektion der Tumorzellen und der PBMZ und dauerte weitere neun Tage an. Die Behandlung erfolgte intravenös über die Schwanzvene der Tiere im Abstand von 24 Stunden. In diesem Abstand wurden auch die Tumore der Tiere kontrolliert und durch eine digitale Schublehre vermessen. Das Programm VIVO Manager[®] extrapolierte anhand der ermittelten Länge und Breite der Tumore und der hemi-ellipsoiden Standardformel das Volumen des Tumors:

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = \frac{\text{Tumorlänge [mm]} * \text{Breite [mm]}^2}{2}$$

Nach 10 Behandlungstagen wurden die Tiere weiter beobachtet bis ein Tumolvolumen von mehr als 2000 mm³ erreicht war, um eine potentielle Wachstumsverzögerung der Tumore möglichst lange zu erfassen. Da die Mäuse im Abstand von zwei bis drei Tagen kontrolliert wurden, erreichten manche Tiere der Kontrollgruppe Tumorumfänge über 2000 mm³. Die Analyse der Daten durch einen zweiseitigen Anova-Test zeigte die Signifikanz ($p < 0,0001$) der Effekte des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts gegenüber der Kontrollgruppe. Die Kurve (schwarz) der Abbildung 24 zeigt die Entwicklung des Tumorumfanges der Kontrollgruppe 1 über die Zeit von 22 Tagen. Deutlich im Unterschied dazu stehen die dosisabhängig reduzierten Tumorumfänge in den Gruppen 2 bis 4 zum Tag 22 des Versuchs.

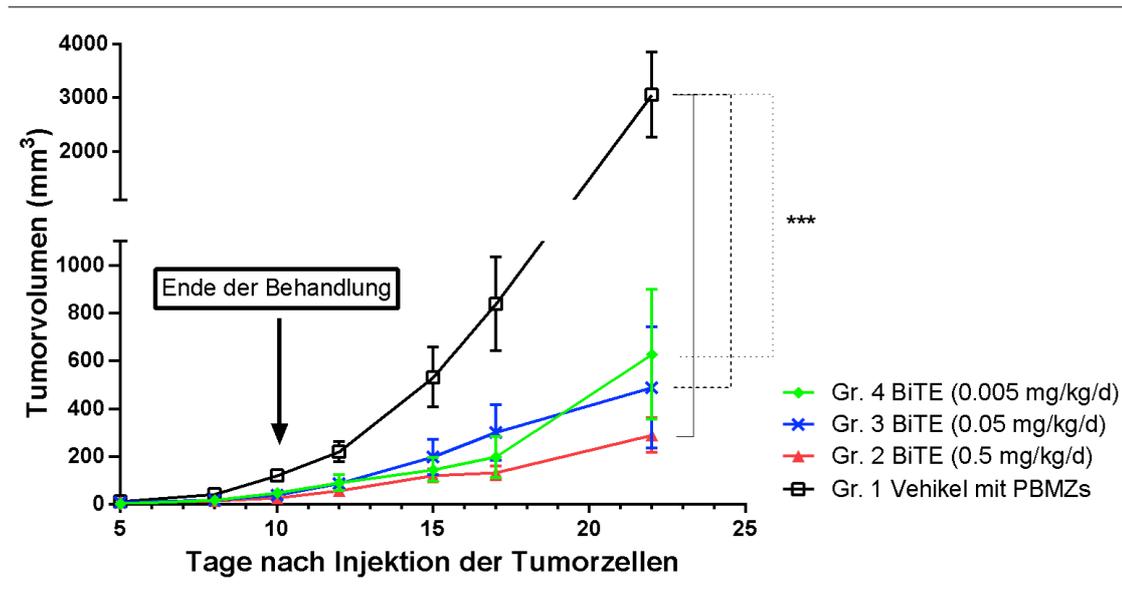


Abbildung 24: Analyse des gemessenen Tumorzvolumens der J558L-IgE_{kurz}

Transfektanten in NOD/SCID-Mäusen

Das Tumorzvolumen ist auf der Y-Achse in mm³ dargestellt, die Zeit auf der X-Achse in Tagen; die Legende zeigt die Zuordnung der Gruppen in verschiedenen Farben und deren Behandlungsdosis. Die Punkte auf den Kurven markieren die am angegebenen Tag gemessenen Tumorzvolumina. Die Fehlerbalken an den Messwerten markieren die Standardabweichung der Tumorzvolumina der 10 Tiere innerhalb einer Gruppe an diesem Messzeitpunkt. Die 3 Sterne weisen auf die statistische Signifikanz zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ und dem errechneten p-Wert von $<0,0001$ (ANOVA) hin.

Trotz der schwankenden Tumorzvolumina innerhalb der Gruppen war das Tumorzvolumen in allen BiTE[®]-behandelten Tieren signifikant kleiner als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Um eine Abhängigkeit des verlangsamten Wachstums durch den Verlust oder die Zunahme der IgE-Oberflächenexpression auszuschließen, wurden nach der Beendigung des Experiments die Tumore der Tiere isoliert und auf die Expression des Antigens (IgE_{kurz}) getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Tumorzellen nach wie vor mIgE exprimierten und demnach anzunehmen ist, dass während der gesamten Zeit der Behandlung das Zielantigen des α IgE₁ \times CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts auf der Zelloberfläche vorhanden war.

Der Versuch zeigt, dass das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt α IgE₁ \times CD3 über die Fähigkeit verfügt, über die Blutzirkulation die IgE-

exprimierenden Tumorzellen mit den Effektoren der PBMZ zu verbinden und das Wachstum des Tumors zu verlangsamen.

4.1.2.13 Kreuzreaktivität des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts gegen IgE und CD3 des Makaken

Das von der AMGEN Research Munich GmbH (vormals Micromet AG) entwickelte CD3 spezifische scFv, das die CD3 ϵ -Kette des humanen T-Zellrezeptors erkennt, bindet auch die CD3 ϵ -Kette von Makaken (*Macaca fascicularis*) [109]. Diese Affen werden, wie auch ihre nahen Verwandten, die Rhesus-Affen *Macaca mulatta*, in der medizinischen Forschung für toxikologische Studien eingesetzt [110, 111].

Um unerwünschte Nebenwirkungen des BiTE[®]-Moleküls in einem dem Menschen sehr ähnlichen Organismus zu untersuchen, müssen beide antigenerkennenden Bindungsstellen des bispezifischen Antikörpermoleküls kreuzreaktiv mit den entsprechenden Antigenen dieses Organismus sein. Die beiden scFvs des α IgE₁ \times CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts wurden hierzu auf ihre Reaktivität gegenüber CD3 ϵ -tragenden T-Zellen des Makaken und gegenüber membranständigem IgE des Makaken getestet. Die J558L-Transfektanten, die mit dem Immunglobulin E des Rhesusaffen transfiziert waren, wurden freundlicherweise von Dr. Ralf Lutterbüse zur Verfügung gestellt. Die FACS-Analyse in Abbildung 25 zeigt im rechten Histogramm der Reihe A, dass die CD3 ϵ -Kette des T-Zellrezeptors des Makaken vom IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt gebunden wurde. Die Expressionskontrolle für das CD3-Antigen des Makaken mit einem monoklonalen Antikörper zeigte ein vergleichbares Signal (linkes Histogramm, Reihe A). Die Histogramme der Reihe C zeigen die Bindung des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an das IgE des Rhesusaffen im Vergleich zur Kontrolle der Oberflächenexpression des Antigens durch einen monoklonalen Antikörper. Das linke Histogramm zeigt das Fluoreszenzsignal des monoklonalen anti Makaken-IgE-Antikörpers (blau) und belegt die Oberflächenexpression des Antigens. Das rechte Histogramm zeigt die Fluoreszenz, die durch die Bindung des rhesus IgE durch das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt (blau) hervorgerufen wurde.

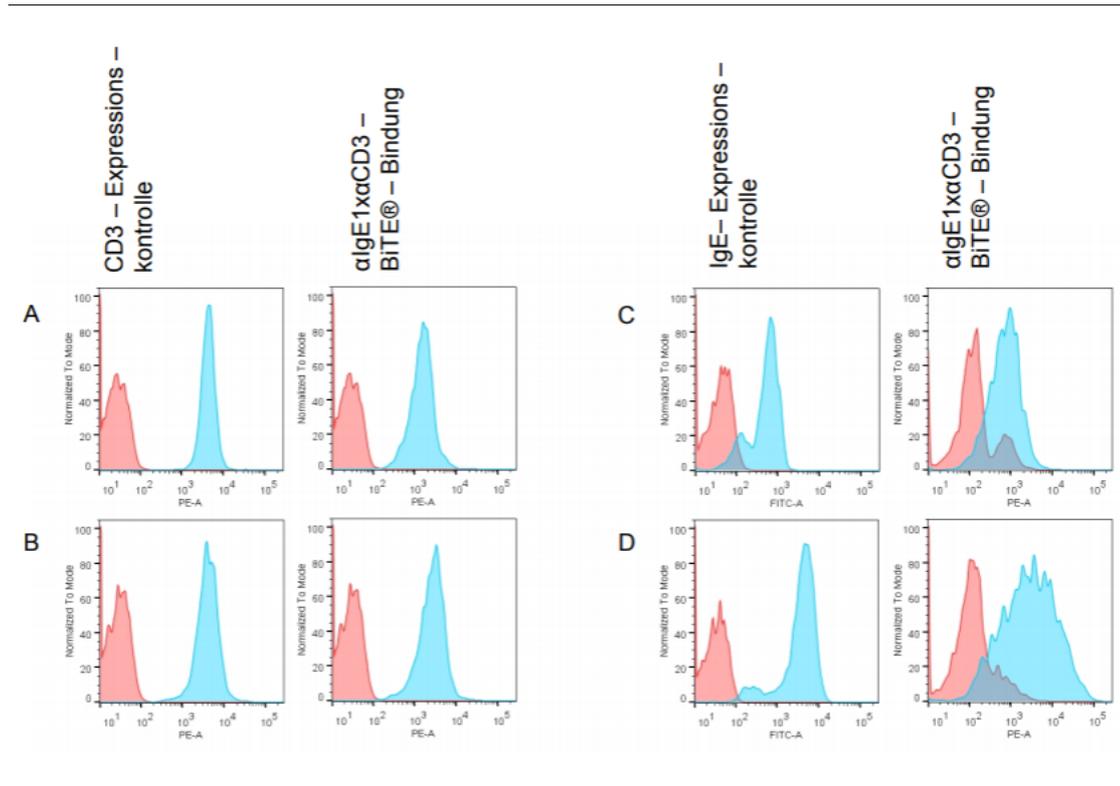


Abbildung 25: FACS-Analyse der Bindung des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an die Oberflächenmoleküle CD3 ϵ und IgE des Makaken und des Menschen

A: linkes Histogramm: CD3-Expressionskontrolle der 4119 LNPx T-Zellen des Makaken (blau), rechtes Histogramm: Bindung des α IgE₁ α CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an CD3 ϵ des Makaken (blau); B: links: CD3-Expressionskontrolle der HPB-all T-Zellen des Menschen (blau), rechts: Bindung des α IgE₁ α CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an CD3 ϵ des Menschen (blau), C: links: IgE-Expressionskontrolle der rhesus IgE-Transfektanten (blau), rechts: Bindung des α IgE₁ α CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an IgE des Makaken (blau), D: links: IgE-Expressionskontrolle der human IgE-Transfektanten (blau), rechts: Bindung des α IgE₁ α CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an IgE des Menschen (blau); alle Isotypkontrollen (rot).

Die Histogramme A und C der Abbildung 25 zeigen, dass das IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt die Oberflächenproteine CD3 ϵ und mIgE des Makaken binden konnte. Vergleicht man die Fluoreszenzsignale der rechten Histogramme der Reihen A und B, so sind sie ähnlich stark.

4.1.2.13.1 Zytotoxische Aktivität des α IgE₁ α CD3-BiTE[®] im kreuzreaktiven Kontext des Makaken

Eine Abschätzung der Verträglichkeit des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts in der therapeutischen Anwendung beim Menschen kann über eine Toxizitätsstudie an Makaken erfolgen. Ein erster Schritt zur Validierung des Makaken als relevante Spezies ist die Bestimmung der biologischen Aktivität

in vitro. Um die zytotoxische Aktivität von $\alpha\text{IgE}_1 \times \alpha\text{CD3}$ gegenüber Zellen des Makaken zu ermitteln, wurden 4119 LnPx T-Zellen als Effektorzellen und J558L-rhesus-IgE-Transfektanten als Zielzellen in einem FACS-basierten Zytotoxizitätstest eingesetzt (vgl. Abbildung 26). Die BiTE[®]-vermittelte Lyse der Zielzellen wurde über die Bestimmung des Anteils abgetöteter Zielzellen über eine Fluoreszenzmarkierung der toten Zellen in einem Zellgemisch aus Zielzellen und Effektorzellen im Vergleich zum Anteil der toten Zellen ohne die Einwirkung eines BiTE[®]-Moleküls ermittelt. Die Aktivität von $\alpha\text{IgE}_1 \times \alpha\text{CD3}$ wurde über die Messung der 16 Verdünnungen bestimmt.

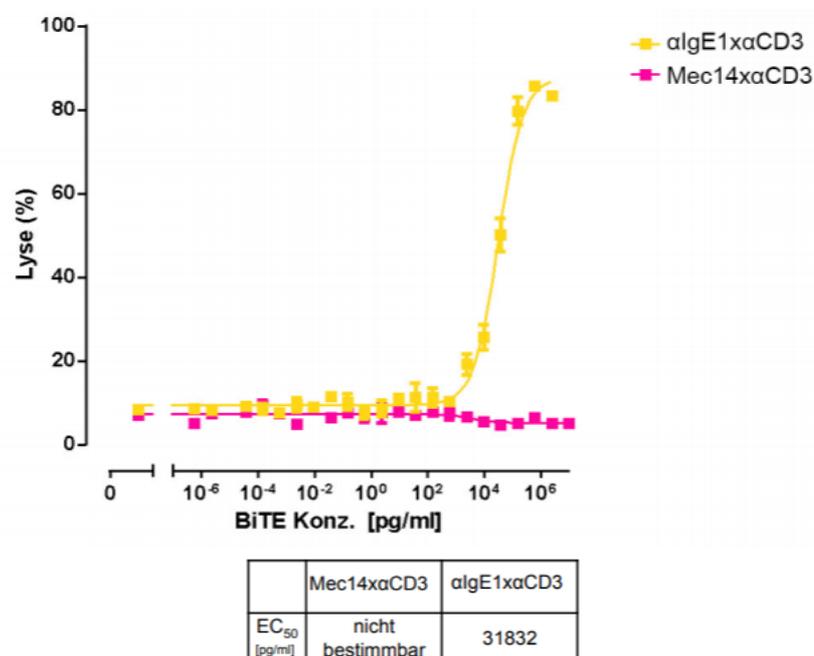


Abbildung 26: Zytotoxizitätstest des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts $\alpha\text{IgE}_1 \times \alpha\text{CD3}$ gegen mit rhlgE transfizierte J558L-Zellen
 Effektorzellen: stimulierte 4119 LnPx-T-Zellen des Makaken, Zielzellen: J558L Zellen, transfiziert mit rhesus IgE (rhlgE). Effektor- zu Zielzell-Verhältnis (E:Z): 10:1, 48 Stunden Inkubation.

Das BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt MEC14xαCD3 diente in diesem Experiment als Negativkontrolle. Erwartungsgemäß konnte das Kontroll-BiTE[®]-Konstrukt keine Lyse der rhlgE⁺ Zellen herbeiführen. Der $\alpha\text{IgE}_1 \times \alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper dagegen erwies sich ab einer Konzentration von 100 pg/ml als zytotoxisch und führte rasch zu einer fast vollständigen Lyse der Zielzellen. Die EC₅₀ des $\alpha\text{IgE}_1 \times \alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörpers lag in diesem Experiment bei 31,8 ng/ml.

Die EC_{50} -Werte dieses FACS-basierten Zytotoxizitätstests sind aufgrund von unterschiedlichen Inkubationszeiten und der Verwendung einer Zelllinie (4119 LnPx) statt einer PBMZ-Population nicht gleich mit denen eines Chromfreisetzungstests zu bewerten, geben jedoch einen Anhaltspunkt bezüglich der $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®]-vermittelten Rekrutierung von Effektorzellen des Makaken gegen Zielzellen des Makaken. Die EC_{50} des $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®] von 0,118 ng/ml im Chromfreisetzungstest lag 270-fach unter der BiTE[®]-Konzentration die nötig war, um die Hälfte der rhesus $CD3^+$ Zielzellen zu lysieren. Es ist somit anzunehmen, dass die zytotoxische Aktivität des $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts bei Effektorzellen und Zielzellen des Makaken weniger stark ist und deshalb eine höhere Dosierung des $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®] im Makaken eingesetzt werden müsste, um prädiktive Annahmen für den Effekt des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts im Menschen zu treffen.

4.1.2.14 Affinität des αIgE -CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ für IgE des Menschen und des Makaken

Die Bindungsaffinität des αIgE -CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts lässt sich fluoreszenzzytometrisch anhand der maximalen Bindungsstärke (B_{max}) bestimmen. Die B_{max} ist die maximale gemessene Fluoreszenz (LZ), die Menge des Liganden (des αIgE -CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts, L) ist durch die eingesetzte Menge $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®] definiert und die freien Zielstrukturen werden über die Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen (Z, vgl. Kapitel 3.3.3).

Der $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®]-Antikörper wurde mit einer Startkonzentration von 20 $\mu g/ml$ eingesetzt und anschließend über 12 Verdünnungsschritte verdünnt. Abbildung 27 zeigt mit zunehmender Verdünnung die Abnahme des Fluoreszenzsignals des $\alpha IgE_1 \alpha CD3$ -BiTE[®] auf J558L-Transfektanten des rhesus IgE und des humanen IgE_{kurz} .

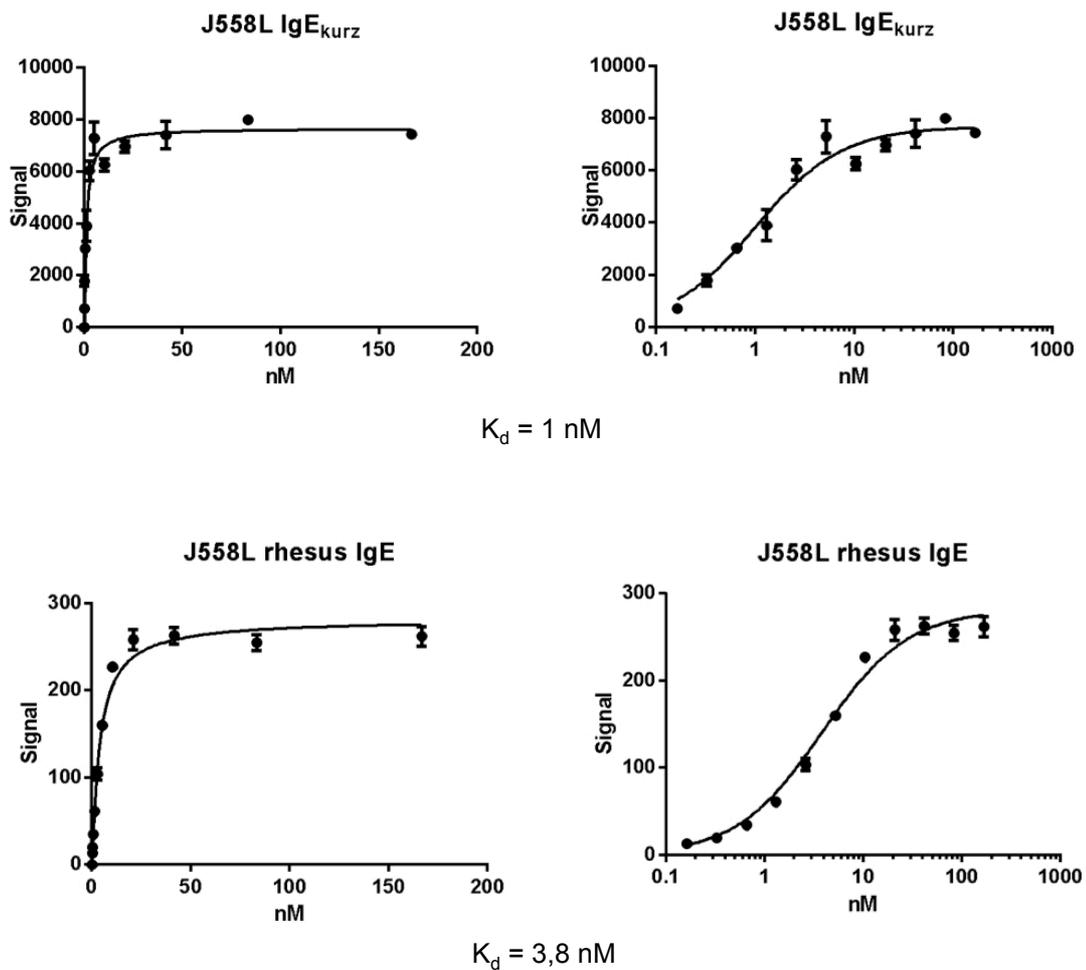


Abbildung 27: Lineare und semilogarithmische Darstellung der Bindungskinetik des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an rhesus IgE- und human IgE_{kurz}-transfizierte J558L-Zellen

Die obere Reihe der Abbildung 27 zeigt die Verteilung der Messpunkte der 11 Verdünnungstriplikate mit IgE_{kurz}-exprimierenden J558L-Zellen. Die linke Grafik stellt die Messpunkte linear dar und macht deutlich, dass die ersten vier Verdünnungsstufen von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts im Sättigungsbereich der Rezeptor-Ligand-Interaktion lagen und damit die maximal mögliche Bildung eines Rezeptor-Liganden-Komplexes erreicht wurde. Das dazu korrespondierende Fluoreszenzsignal (Median des Alexa488-Signals der lebenden Zellpopulation) wurde auf der Y-Achse aufgetragen. Die X-Achse gibt die Konzentration des BiTE[®]-Moleküls in nM an. Der Umkehrpunkt des Gleichgewichts der maximalen IgE-BiTE[®]-Komplexbildung und damit der Dissoziationskonstanten (K_D) des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®] auf J558L IgE_{kurz}-Zellen, liegt bei 1 nM.

Die untere Reihe zeigt die Bindungskinetik des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3-BiTE}^{\text{®}}$ und der rhlgE-J558L-Zellen. Das BiTE[®]-Molekül dissoziierte beinahe vollständig von rhesus IgE und ermöglichte eine präzise Bestimmung der K_D . Die Dissoziationskonstante von 3,8 nM liegt nahe der K_D des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts für humanes IgE_{kurz}. Die Standardabweichung der Messpunkte ist klein und erlaubte eine zuverlässige Bestimmung der Bindungsaffinität des BiTE[®]-Moleküls.

Die abweichende Affinität des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3-BiTE}^{\text{®}}$ -Antikörper-Konstrukts für rhesus IgE_{kurz} und für humanes IgE_{kurz} ist mit dem Faktor 3,8 vergleichbar mit BiTE[®]- Entwicklungskandidaten anderer Indikationen. Der Einsatz des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts in einer ersten Toxizitätsstudie wäre im Bezug auf den Vergleich der Affinitäten demnach repräsentativ.

4.1.3 Das IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt

Humanes IgE wird, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, in zwei verschiedenen Isoformen synthetisiert, wovon eine als IgE_{lang} und die andere als IgE_{kurz} bezeichnet wird. Bei beiden Isoformen kommt das ϵ -Migis Epitop (ϵ -mi, EMPD_{kurz}) vor, das unmittelbar an die Transmembrandomäne (TM) anschließt (vgl. Abbildung 28). IgE_{lang} enthält 52 zusätzliche Aminosäuren, die im Anschluss an die CH4-Domäne und vor der membrandurchgängigen M1-Domäne liegen (vgl. Abbildung 4). Diese 52 Aminosäuren, die als C ϵ mX oder auch M1' bezeichnet werden, kommen nur bei der langen Isoform des humanen IgE vor und nicht bei der Maus (vgl. Abbildung 28).

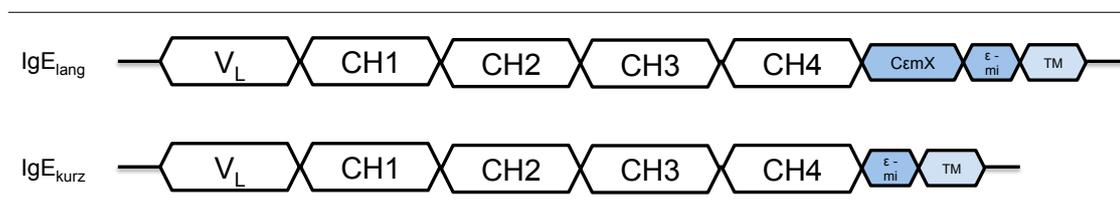


Abbildung 28: schematische Darstellung der humanen ϵ -Kette

Oben: lange Isoform IgE_{lang}, unten: kurze Isoform IgE_{kurz}; die C ϵ mX-Domäne kommt nur bei der IgE_{lang}-Isoform vor, das ϵ -Migis-Epitop (ϵ -mi; EMPD_{kurz}) bei beiden Isoformen. Direkt im Anschluss: Transmembrandomäne (TM) des IgE

Die weiteren Attribute der C ϵ mX-Domäne, wie das Vorkommen bei membranständigem und nicht dem löslichen Immunglobulin E-Isotyp, die hohe Konservierung innerhalb der Spezies der Primaten und die Nachweisbarkeit

des Epitops auf IgE spezifischen B-Zellen, IgE-Myelomen und Plasmablasten, machen dieses Epitop zu einer interessanten BiTE[®]-Zielstruktur [68, 69, 72, 112-121].

Einen C ϵ mX-spezifischen Antikörper zu entwickeln war keine neue Idee, da Antikörper, die an diese Domäne binden – im Gegensatz zur CH3-Domäne - nicht an lösliches IgE binden [68, 72, 122, 123]. Anaphylaktische Reaktionen die durch eine Quervernetzung des löslichen IgE, das an den Fc ϵ RI-Rezeptor auf Mastzellen und Granulozyten gebunden vorliegt, hervorgerufen werden können, werden dadurch vermieden. Die Wissenschaftler um Brightbill konnten im Jahr 2010 einen humanisierten Antikörper herstellen, der für die C ϵ mX-Domäne von humanem IgE spezifisch ist. Die publizierte DNS-Sequenz dieses humanisierten Antikörpers 47H4 ist im Folgenden für die Entwicklung eines C ϵ mX-spezifischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts verwendet worden [72].

4.1.3.1 Charakterisierung des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts

Wie bereits für den IgE-CH3-spezifischen BiTE[®]-Antikörper beschrieben (vgl. 4.1.2.3), wurde auch die Aminosäuresequenz der variablen Regionen des 47H4-Antikörpers *in silico* untersucht. Der Vergleich der Antikörpersequenz zu den humanen Sequenzen der Keimbahn zeigte, dass die leichte und die schwere Kette jeweils 97 % und 98 % Identität zu den Keimbahnsequenzen aufweisen (vgl. Tabelle 5). Beide Ketten haben keine freien, ungepaarten Cysteine und sind damit wenig anfällig für deren Oxidation und einer resultierenden vermehrten Aggregatbildung. Die Sequenzen enthielten auch keine potentielle Glykosylierungsstellen. Da sowohl N-Deamidierungs- als auch D-Isomerisierungsstellen bestimmt werden konnten, bergen die Sequenzen die Möglichkeit zu hydrolysieren und ein D-Enantiomer zu bilden (vgl. Kapitel 4.1.2.3).

Tabelle 5: Tabellarische Auflistung der Sequenz der IgE-Bindungsregionen des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts die durch die Programme Ablnito und VectorNTI Advance[®] ermittelt wurden.

Klon	CDR3 der schweren Kette	CDR3 der leichten Kette	VH Rekombination	VH % Identität	VL Rekombination	VL % Identität	freie Cys	Glykosylierung	N Deamidierung	D Isomerisierung	
47H4	DNWDAMDY	SQNTLVPWT	VH3 3-07/D1 1-20 RF3/JH4	97,70	VK1 O2/JK1	98,77	keine	keine	6,9	NT; NT	DT

Um die schwere und die leichte Kette des 47H4-Antikörpers zu klonieren wurde zunächst die Gensynthese der beiden Ketten durch das Unternehmen GeneArt[®] in Auftrag gegeben. Durch spezifische Primer konnten nach einer PCR die Schnittstellen der Klonierungskassette des pefDHR-Vektors eingebracht und das 47H4-scFv mit dem von AMGEN entwickelten kreuzreaktiven CD3-spezifischen scFv verbunden werden (vgl. Abbildung 11). Das C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt wurde in CHO^{DHFR}-Zellen transfiziert und daraufhin exprimiert.

4.1.3.2 Bindungseigenschaften des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts

Die Bindung des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts wurde durch die bereits beschriebenen J558L-Zellen, welche die IgE_{lang}-Isoform oder die IgE_{kurz}-Isoform exprimierten, getestet (vgl. Abbildung 29).

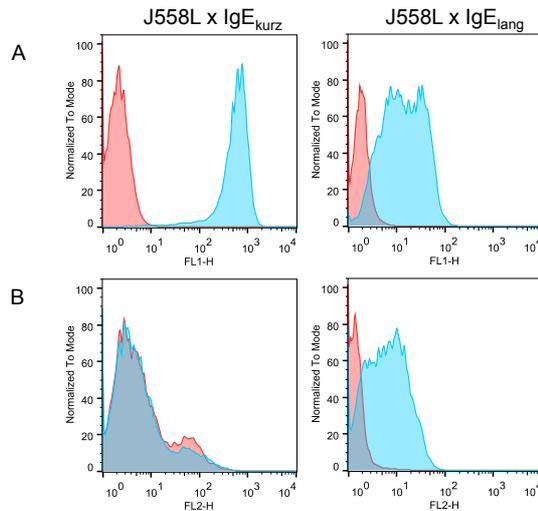


Abbildung 29: FACS-Analyse des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts mit IgE-transfuzierten J558L-Zellen

A: IgE-Expressionskontrollen der Transfektanten mit anti-human-IgE-FITC (blau) und der Isotypkontrolle (rot), B: Fluoreszenznachweis des gebundenen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts aus dem Zellkulturüberstand (ZKÜ) transfizierter CHO^{DHFr}-Zellen gegenüber dem ZKÜ eines nicht bindenden BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts Mec14 α CD3.

Die IgE-Expression ließ sich mit einem polyklonalen, FITC-markierten Antikörper (blau) im Vergleich zu der Isotypkontrolle (rot) nachweisen (Reihe A, Abbildung 28). Erwartungsgemäß differenzierte der im Zellkulturüberstand enthaltene 47H4 α CD3-BiTE[®] das C ϵ mX-Epitop der J558LxIgE_{lang}-Zellen vom IgE der J558LxIgE_{kurz}-Zellen.

4.1.3.3 proteinbiochemische Eigenschaften des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts

Die Reinigung und Analyse des 47H4 α CD3-BiTE[®] ergab, dass das BiTE[®]-Molekül mit guter Ausbeute zu produzieren war und in ausreichender Menge als Monomer aus dem Zellkulturüberstand isolierbar war. Die SDS-PAGE in Abbildung 30 macht deutlich, dass ein Protein der erwarteten Masse des BiTE[®]-Moleküls (ca. 55 kDa) sowohl im Zellkulturüberstand (ZKÜ) als auch im Durchlauf der IMAC-Säule und der Vivaspin-Aufkonzentrierungseinheit nachweisbar war. Nach dem Elutionsschritt der Metall-Affinitätschromatographie bei 50 mM (10 %) bzw. 500 mM Imidazol (100 %)

im Elutionspuffer wurde die angefärbte Bande von 55 kDa angereichert und detektierbar. Das BiTE[®]-Monomer konnte mit großer Reinheit und in hoher Konzentration isoliert werden. Auch der Western Blot, in dem der His₆-Anhang des BiTE[®]-Moleküls detektiert wurde, belegte die Reinheit der Monomerfraktion. Die Reinheit und Ausbeute des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts ermöglichte die weitere Charakterisierung des Proteins bezüglich seiner zytotoxischen Eigenschaften.

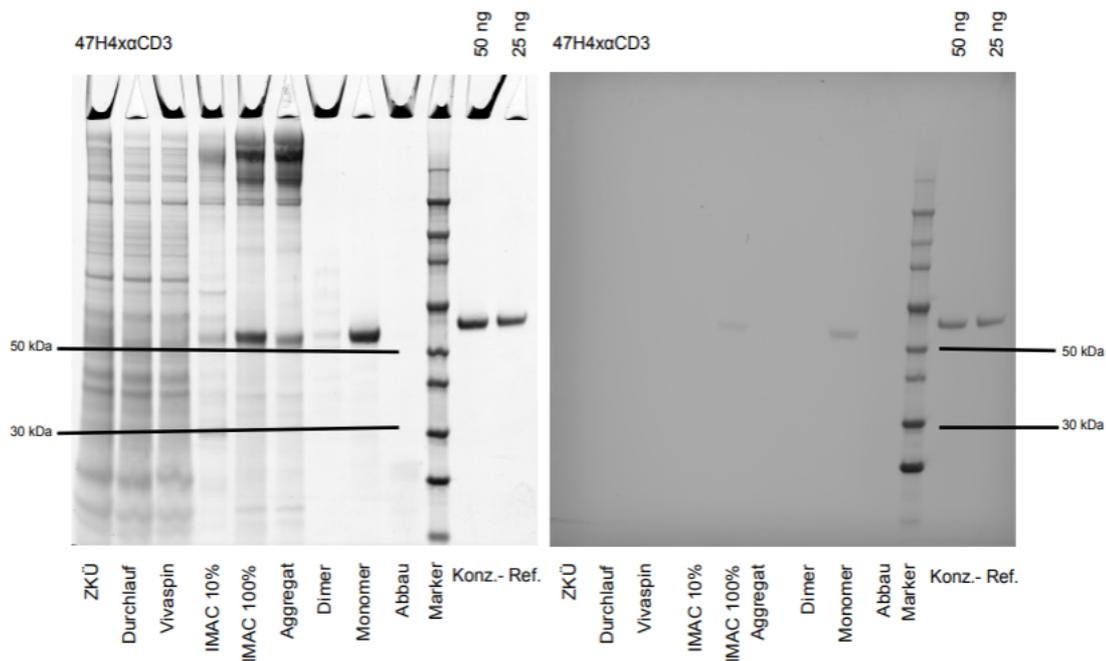


Abbildung 30: SDS-PAGE und Western Blot des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts

Bildunterschrift: Größenstandard (Marker), Konzentrationsreferenz (Konz.-Ref.). Bildunterschrift: Spur des aufkonzentrierten Zellkulturüberstands (ZKÜ), des Durchlaufs (IMAC und Vivaspin), die Präelution bei 10 % Puffer B mit 50 mM Imidazol, die 100 % Elution mit 500 mM Imidazol und die Aggregat-, die Monomer- (Mono), die Dimerfraktion (Di) und die Fraktion des Abbaus nach der SEC. Linkes Bild: SDS-PAGE, rechts: Western Blot; Größenstandard (Marker): Proteingröße in kDa der angefärbten Proteinbanden. Schwarze Linien: 30 kDa und 50 kDa

4.1.3.4 Temperaturstabilität des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts (47H4 α CD3)

Wie bereits der α gE₁ α CD3-BiTE[®]-Antikörper wurde auch das 47H4-BiTE[®] auf seine Stabilität bei verschiedenen Temperaturen getestet, indem es nach der Inkubation bei Temperaturen zwischen 4 °C und 90°C auf die Antigenbindung in einer FACS-Fluoreszenzfärbung geprüft wurde.

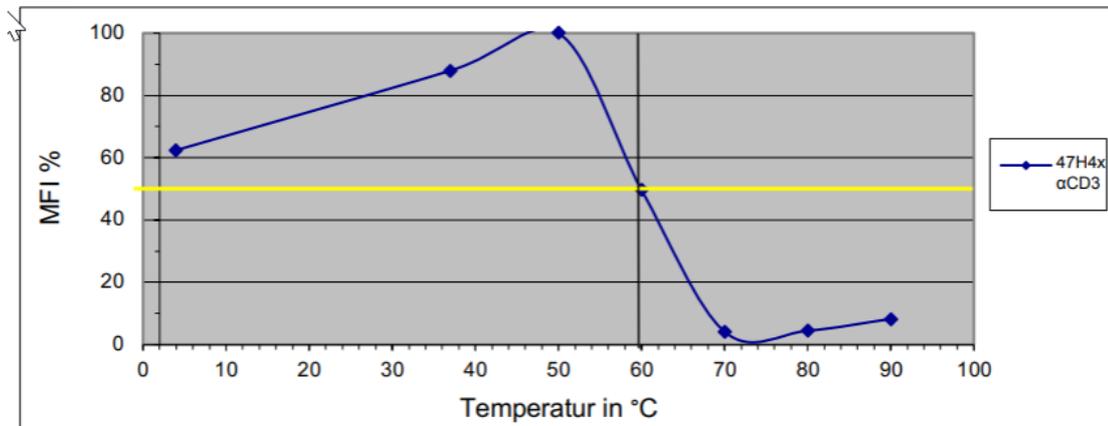


Abbildung 31: Grafik der Temperaturstabilität des IgE-CεmX-BiTE®-Antikörper-Konstrukts (47H4xαCD3)

X-Achse: Signalstärke der FACS-Färbung in % in Relation zum Maximalwert, bei 50 °C; Y-Achse: Temperatur in °C; blaue Linie: Datenpunkte der prozentualen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach der Temperatureinwirkung des IgE-CεmX-BiTE®-Antikörper-Konstrukts 47H4xαCD3

Die maximale Aktivität des IgE-CεmX-BiTE®-Antikörper-Konstrukts konnte anhand der höchsten Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt werden und wurde bei anderen BiTE®-Antikörper-Konstrukten bei der nicht hitzebehandelten Probe oder nach der 5 minütigen Inkubation bei 37 °C der Probe gemessen. Beim 47H4-BiTE® wurde die maximale Aktivität nach der Inkubation bei 50 °C beobachtet (vgl. Abbildung 31). Mit steigender Temperatur nahm die Aktivität schnell ab und zeigte ab 70 °C noch eine minimale Bindung. Die halbmaximale Aktivität des BiTE®-Antikörper-Konstrukts betrug 60 °C.

4.1.3.5 Bindung des IgE-CεmX-BiTE®-Antikörper-Konstrukts an IgE-beladene Mastzellen

Die Spezifität des IgE-CεmX-BiTE® 47H4xαCD3 für die CεmX-Domäne des Immunglobulin E sollte eine Bindung von löslichem und rezeptorgebundenem IgE ausschließen. Um dies praktisch zu verifizieren wurde die bereits in Kapitel 4.1.2.9 verwendete Zelllinie RBL2H3xFcεRI-α in einem FACS-Experiment eingesetzt.

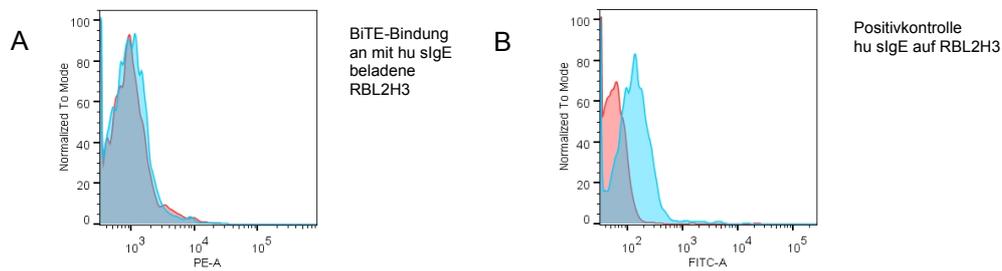


Abbildung 32: Fluoreszenzfärbung des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts auf IgE-beladenen RBL2H3-Zellen

A: BiTE[®]-Färbung (RBL2H3 mit slgE, blau) und Kontrolle (RBL2H3 ohne slgE, rot), B: Kontrolle des slgE-Vorkommens an Fc ϵ RI- α (RBL2H3 mit slgE, blau) und Negativkontrolle (RBL2H3 ohne slgE, rot),

Das Bindungssignal des 47H4 α CD3-BiTE[®] auf slgE-beladenen RBL2H3-Zellen wurde mit dem Signal auf RBL2H3-Zellen, die nicht mit slgE inkubiert wurden, verglichen. Wie erwartet konnte das IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt das rezeptorgebundene slgE nicht binden (Abbildung 32, A). Die beiden Histogramme der Fluoreszenzfärbung überlappen. Das zweite Histogramm (Abbildung 32, B) zeigt, dass sich an den RBL2H3-Zellen, deren Fc ϵ RI mit slgE beladen wurde, detektierbares slgE auf der Zelloberfläche findet. Dieser Nachweis wurde mit einem fluoreszenzmarkierten anti-human-IgE-Antikörper erbracht. Zusammenfassend konnten diese FACS-Analysen die Annahme bestätigen, dass das 47H4 α CD3-BiTE[®] rezeptorgebundenes IgE nicht bindet.

4.1.3.6 Zytotoxische Eigenschaften des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts

Durch einen Chromfreisetzungstest mit IgE_{lang} transfizierten J558L-Zellen als Zielzellen und humanen CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen wurde die zytotoxische Aktivität des 47H4 α CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts bestimmt. Die J558L IgE_{kurz}-Transfektanten konnten in diesem Chromfreisetzungstest als Negativkontrolle eingesetzt werden, da sie keine C ϵ mX-Region exprimieren.

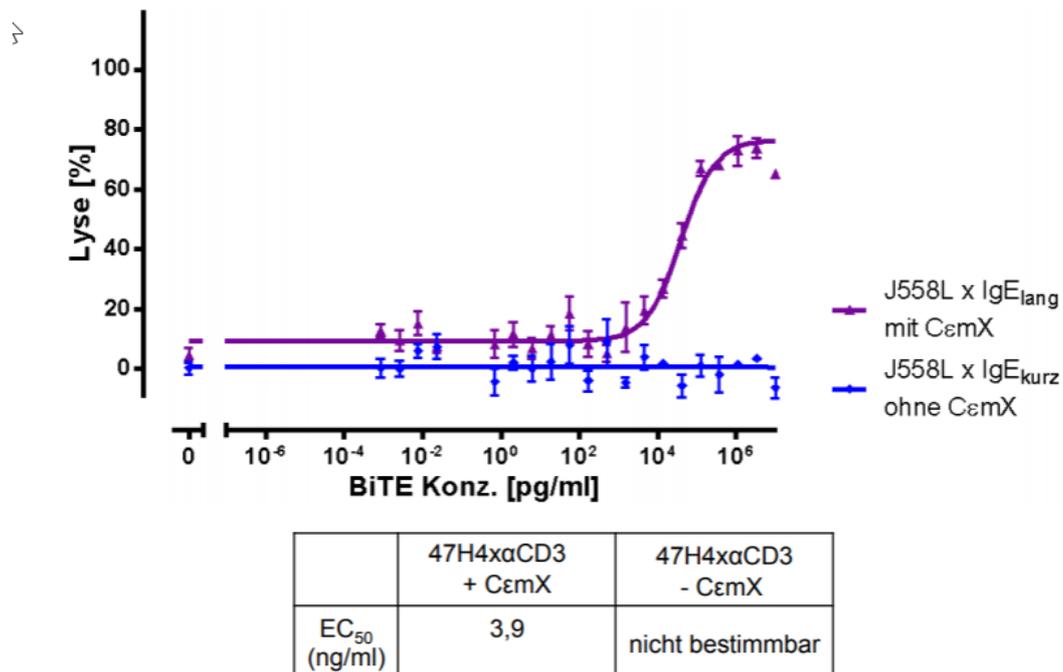


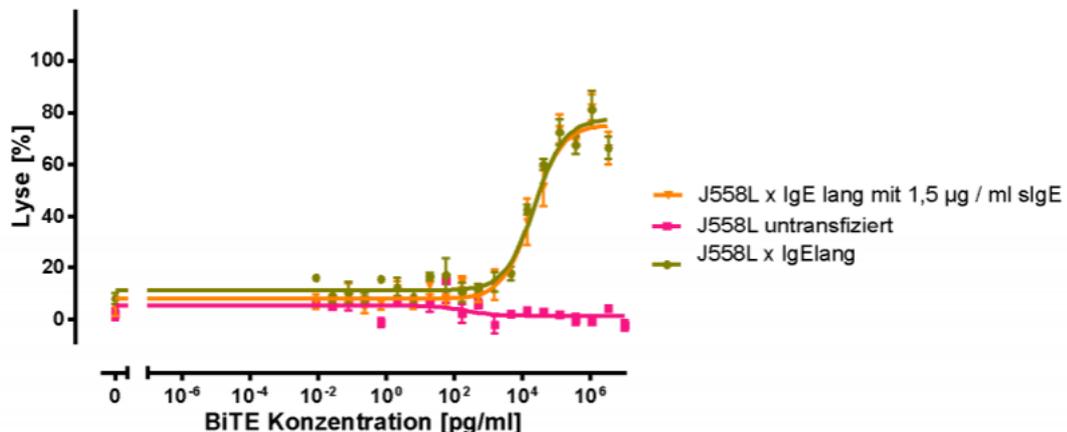
Abbildung 33: ⁵¹Chromfreisetzungstest des IgE-CεmX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts
Effektorzellen: stimulierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen;
Zielzellen: J558L Zellen, transfiziert mit humanem IgE (IgE_{kurz} bzw. IgE_{lang});
Effektor-zu Zielzell-Verhältnis (E:Z): 10:1, Inkubation 18 Stunden

Wie erwartet, konnte der 47H4αCD3-BiTE[®] die zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen IgE_{lang} J558L-Transfektanten rekrutieren und war inaktiv gegenüber den IgE_{kurz} J558L-Transfektanten (siehe Abbildung 33). Die EC₅₀ des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts betrug 3,9 ng/ml und lag damit im Vergleich zum IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt αIgE₁αCD3 mit einer EC₅₀ von 0,118 ng/ml um den Faktor 33 höher. Trotz der schwächeren Aktivität wurde das 47H4αCD3-BiTE[®] aufgrund seiner Selektivität für membranständiges IgE näher charakterisiert.

4.1.3.7 Zytotoxische Aktivität des IgE-CεmX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts in Anwesenheit von löslichem IgE

Im Gegensatz zum Epitop IgE-CH3 im Fc-Teil von IgE ist das CεmX-Epitop ausschließlich bei Zellen mit mIgE-Oberflächenexpression vorhanden. Die Anwesenheit von löslichem IgE im Serum sollte demnach für ein CεmX-spezifisches BiTE[®]-Molekül nicht relevant sein. Die folgende Analyse eines Chromfreisetzungstests zeigt die Unabhängigkeit des 47H4αCD3-BiTE[®]-

Antikörper-Konstrukts von der sIgE-Serumkonzentration. Während des zytotoxischen Tests wurden zu den mIgE⁺ Zielzellen in einem Ansatz 1,5 µg/mL sIgE zugegeben und dies mit Ansätzen ohne sIgE, sowie mit der untransfizierten Ausgangszelllinie verglichen (vgl. Abbildung 34).



	47H4αCD3 + mIgE, - sIgE	47H4αCD3 + mIgE + sIgE	47H4αCD3 - mIgE, - sIgE
EC ₅₀ (ng/ml)	22,6	19,0	nicht bestimmbar

Abbildung 34: ⁵¹Chromfreisetzungstest des 47H4-BiTE[®] in Anwesenheit von löslichen IgE (sIgE)
Effektorzellen: stimulierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen; Zielzellen: J558L Zellen, transfiziert mit humanem IgE_{lang}; Effektor- zu Zielzell-Verhältnis (E:Z): 10:1, Inkubation 18 Stunden

Die untransfizierten J558L-Zellen wurden wie erwartet nicht lysiert und bestätigten die Spezifität des 47H4αCD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts. Wurden IgE_{lang} J558L-Transfektanten als Zielzellen eingesetzt, konnte man eine EC₅₀ von 22,6 ng/mL bestimmen. Die EC₅₀ der IgE_{lang} J558L-Transfektanten war annähernd identisch, wenn 1,5 µg/mL sIgE zugegeben wurde. Dieser Vergleich zeigte, dass die Aktivität des 47H4αCD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts durch lösliches IgE nicht beeinflusst wurde.

4.1.3.8 Zytotoxische Aktivität des IgE-CεmX-BiTE[®] 47H4αCD3 gegenüber sIgE-beladenen FcεRI-Transfektanten

Wie in Kapitel 4.1.3.5 beschrieben, konnte keine Bindung des 47H4αCD3-BiTE[®] an rezeptorgebundenes sIgE festgestellt werden. Das sollte durch den sensitiveren Chromfreisetzungstest bestätigt werden. Vergleichbar mit dem

bereits gezeigten Experiment in Kapitel 4.1.2.10 wurden CHO^{DHFR}-Zellen, die mit der α - der β - und der γ -Kette des humanen hoch-affinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RI transfiziert waren, verwendet. Diese Transfektanten wurden am Vortag des Chromfreisetzungstests für ca. 16 h mit 15 μ g/ml sIgE inkubiert und die Aktivität des 47H4 α CD3-BiTE[®] im Bezug auf die T-Zell-Rekrutierung gegen die Fc ϵ RI-Transfektanten geprüft (vgl. Abbildung 35).

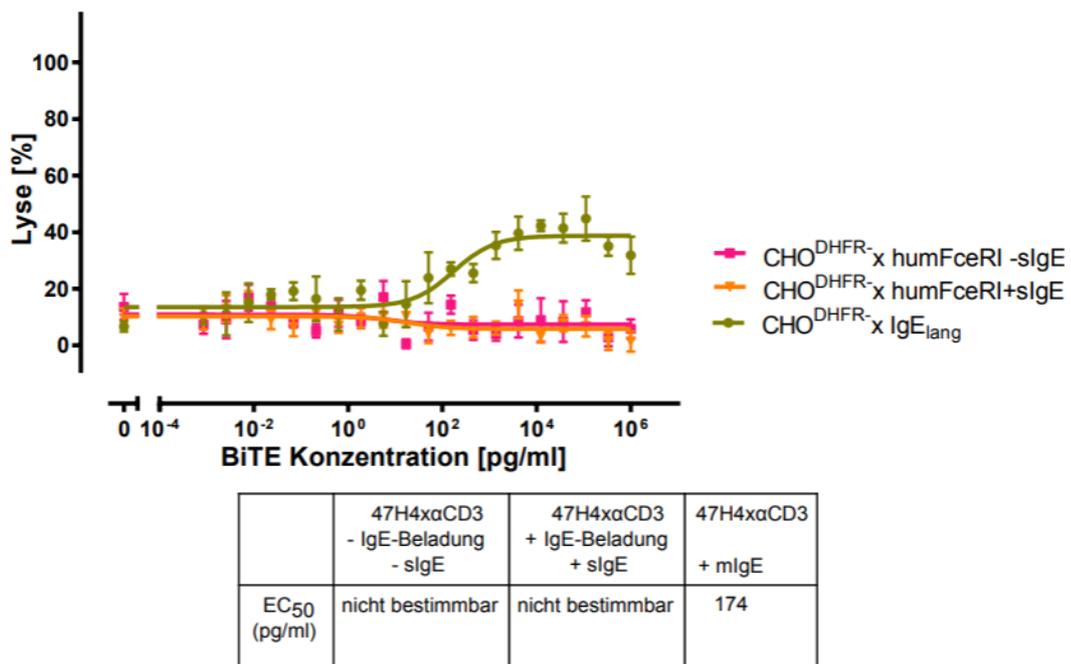
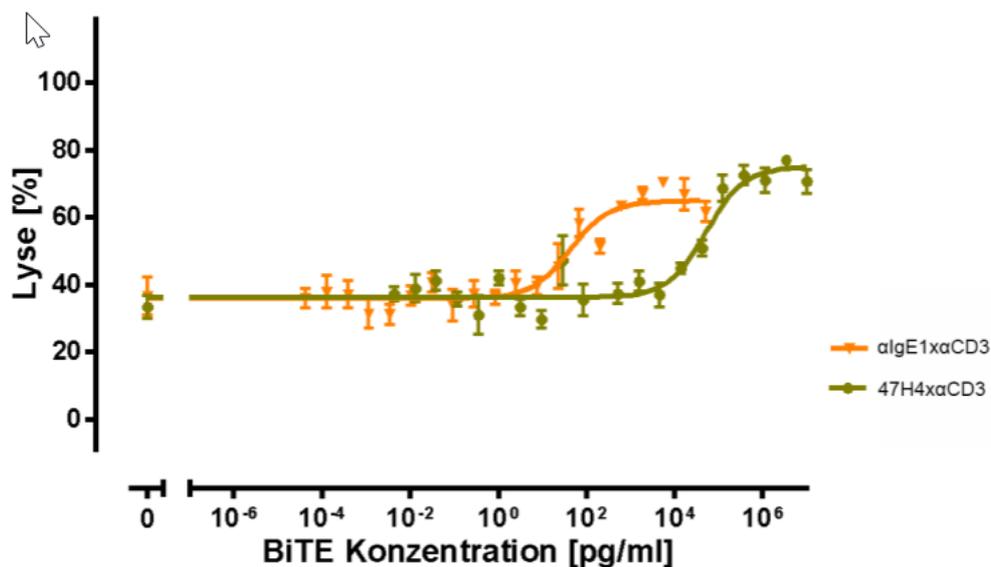


Abbildung 35: ⁵¹Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts mit Fc ϵ RI transfizierten CHO^{DHFR}-Zellen
Effektorzellen: stimulierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen;
Zielzellen: CHO^{DHFR}-Zellen, transfiziert mit der α -, β -, und γ -Kette des humanen Fc ϵ RI; Effektor- zu Zielzell-Verhältnis (E:Z): 10:1, Inkubation 18 Stunden

Wie bereits für das α IgE₁ α CD3-BiTE[®] wurde auch für das IgE-C ϵ mX-spezifische BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt keine Bindung an rezeptorgebundenes sIgE gemessen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da lösliches IgE kein IgE-C ϵ mX-Epitop aufweist und damit rezeptorgebundenes Epitop auf den CHO^{DHFR}-xFc ϵ RI-Transfektanten nicht vorhanden sein konnte. Im Gegensatz dazu präsentierte die CHO^{DHFR}-xhumIgE_{lang}-Transfektante C ϵ mX auf der Zelloberfläche und wurde durch das 47H4 α CD3-BiTE[®] lysiert. Die EC₅₀ betrug in diesem Experiment 174 pg/ml.

4.1.3.9 Zytotoxische Aktivität des 47H4 α CD3-BiTE[®] im Vergleich zur Aktivität des α IgE₁ α CD3-BiTE[®] auf einer humanen Myelomzelllinie die IgE synthetisiert (U266)

Um die zytotoxische Aktivität der beiden human-IgE-spezifischen BiTE[®]-Antikörper 47H4 α CD3 und α IgE₁ α CD3 trotz ihrer unterschiedlichen Epitope vergleichen zu können, wurde das humane IgE-Myelom U266 als Zielzelle eingesetzt. U266-Zellen exprimieren membranständiges IgE auf ihrer Zelloberfläche und werden vielfach bei unterschiedlichsten Experimenten als physiologische mIgE⁺ Zelllinie verwendet [72, 124]. Der Chromfreisetzungstest in Abbildung 36 zeigt die Daten der beiden BiTE[®]-Moleküle, die einen deutlichen Unterschied in ihrer Lyseaktivität zeigen.



	α IgE ₁ α CD3	47H4 α CD3
EC ₅₀ (pg/ml)	42	50552

Abbildung 36: ⁵¹Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts im Vergleich zum IgE-CH3-BiTE
 Effektorzellen: stimulierte, angereicherte, humane CD8⁺ T-Zellen;
 Zielzellen: humanes IgE Myelom U266; Effektor- zu Zielzell-Verhältnis (E:Z): 10:1, Inkubation 18 Stunden

Die Spontanlyse dieser Zellen ist mit 40 % vergleichsweise hoch und damit die Reaktionsbreite des Chromfreisetzungstests eingengt. Der Test zeigt jedoch,

dass beide BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte die autochton IgE exprimierende U266-Zelllinie lysieren.

Da der 47H4 α CD3-BiTE[®] im Gegensatz zum α lgE₁ α CD3-BiTE[®] kein Epitop von löslichem IgE zu binden vermochte, wurde die zytotoxische Aktivität der beiden BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte unter dem Einfluss von slgE auf den U266-Myelomzellen in einem Experiment verglichen. Die zytotoxische Aktivität der IgE-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte wurde mit einem Kontroll-BiTE[®] verglichen (MEC14x α CD3, vgl. Abbildung 37).

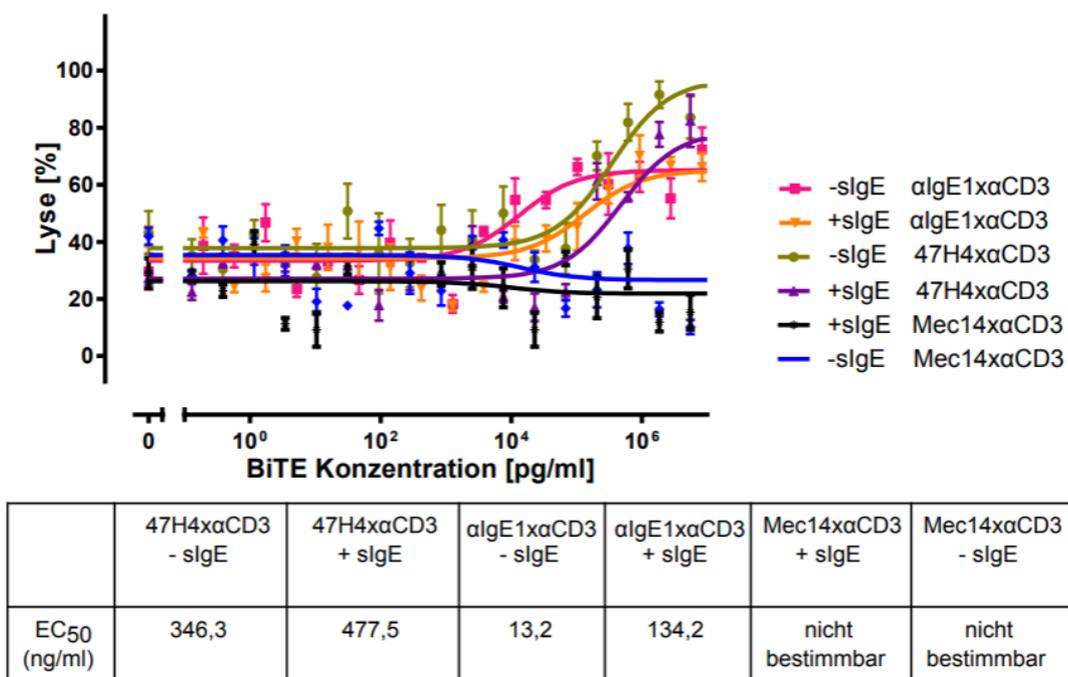


Abbildung 37: ⁵¹Chromfreisetzungstest des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts im Vergleich zum IgE-CH3-BiTE[®] mit U266 Zielzellen in Anwesen-, oder Abwesenheit von slgE

Effektorzellen: stimulierte, humane CD8⁺ T-Zellen; Zielzellen: humanes IgE Myelom U266; E: Z: 10:1; slgE-Konzentration 1,5 μ g/ml, Inkubation 18 h

Die EC₅₀ des IgE-CH3-spezifischen BiTE[®]-Antikörpers verschob sich durch die Zugabe von slgE von 13,2 ng/ml auf 134,2 ng/ml. Dies lässt sich durch einen kompetitiven Effekt von löslichem IgE gegenüber dem membranständigen IgE erklären. Die EC₅₀ des 47H4 α CD3-BiTE[®] hingegen veränderte sich erwartungsgemäß kaum und stieg von 346,3 ng/ml auf 477,5 ng/ml, wenn slgE zugefügt war.

Das humane U266-Myelom exprimiert in geringen Mengen membranständiges IgE auf der Zelloberfläche und ist die einzige Tumor-Zelllinie die das IgE-Epitop beider BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte unter annähernd physiologischen Bedingungen bereitstellen kann [72]. Da das IgE-Myelom zudem lösliches IgE sezerniert, war es erstaunlich festzustellen, dass das IgE-CH3-BiTE[®] zytotoxischer war als das IgE-C ϵ mX-BiTE[®]. Der Einfluss von löslichem IgE wurde auch für das Myelom getestet und zeigte, dass auch unter der Anwesenheit von definierten sIgE Konzentrationen (1,5 μ g/ml) das IgE-CH3-BiTE[®] doppelt so aktiv war wie das IgE-C ϵ mX-BiTE[®]. Nichts desto trotz zeigte sich ein deutlicher, etwa 100 facher Unterschied der EC₅₀ aufgrund der Bindung des IgE-CH3-BiTE[®] an sIgE. Es ist möglich, dass die 30 fach höhere Affinität des IgE-CH3-BiTE[®] und die leichtere Zugänglichkeit des IgE-CH3-Epitops in Summe zu einer höheren Zytotoxizität führte. Besonders auffällig und Gegenstand weiterer Untersuchungen ist in diesem Experiment, dass der IgE-C ϵ mX-BiTE[®] ohne sIgE-Einfluss eine annähernd 90 %ige Lyse der U266-Zellen erzielte, unter sIgE-Einfluss aber nur eine 78 %ige Lyse. Der Grund für diese Unterschiede ist unklar, da das Vorkommen von sIgE keinen Unterschied bei diesem BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt machen sollte. Der IgE-CH3-BiTE[®] zeigte 65 % Lyse im Experiment mit U266-Zellen und bleibt damit gegenüber seinem Pendant zurück. Das könnte auf das Vorhandensein von sIgE, das durch das Myelom produziert wurde, zurückzuführen sein.

4.1.3.10 Affinität des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts 47H4 α CD3 für mIgE des Menschen

Die Affinität des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts wurde wie bereits in Kapitel 4.1.2.14 beschrieben bestimmt.

Der 47H4 α CD3-BiTE[®]-Antikörper wurde mit 20 μ g/ml Startkonzentration in der ersten Verdünnung eingesetzt und anschließend über 12 Verdünnungsschritte verdünnt. Das Fluoreszenzsignal, welches durch die Bindung des IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts an die J558LxIgE_{lang}-Transfektanten erzeugt wurde, wurde gemessen. Die linke Grafik (vgl. Abbildung 38) stellt die Messpunkte linear dar und macht deutlich, dass die ersten zwei Verdünnungsstufen von 20 μ g/ml bis 5 μ g/ml des 47H4 α CD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts im Sättigungsbereich der Rezeptor-Ligand-

Interaktion lagen und damit die maximal mögliche Bildung eines Rezeptor-Liganden-Komplexes erreicht wurde.

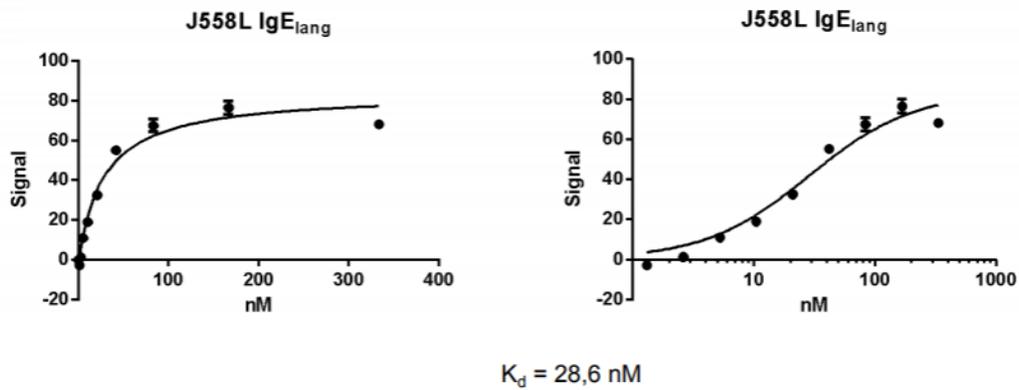


Abbildung 38: Lineare und semilogarithmische Darstellung der Bindungskinetik des IgE-CεmX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts (47H4αCD3-BiTE[®]) an human IgE-transfizierte J558LxIgE_{lang}-Zellen, Signal (Y-Achse): Median des Alexa 488-Signals der lebenden Zellpopulation, MFI), X Achse: Konzentration in nM

Die Affinität des 47H4αCD3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts für humanes IgE_{lang} mit 28,6 nM war erwartungsgemäß geringer als die des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts αIgE₁αCD3 für IgE_{kurz}. Für den IgE-CεmX-spezifischen Antikörper 47H4αCD3 wurden eine etwa 30 fach niedrigere Affinität als für den IgE-CH3-spezifischen BiTE[®] errechnet. Diese Bestimmung deckte sich mit den Daten der zytotoxischen Experimente gegenüber den J558L-Transfektanten, in denen 47H4αCD3 um den Faktor 33 geringer war αIgE₁αCD3-BiTE[®].

5 Diskussion

Nach einer beinahe zwanzig Jahre währenden Entwicklungszeit wurde das bispezifische, ebenfalls gegen B-Zellen gerichtete, BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt Blinatumomab (BLINCYTO[®]) im Juni 2018 zur Behandlung von akuter lymphatischer B-Zell-Leukämie (Philadelphia-Chromosom-negativ, rezidiert oder refraktär) zugelassen [125]. Blinatumomab aktiviert körpereigene T-Zellen und rekrutiert diese, um Leukämiezellen zu zerstören [126].

5.1 Die IgE-B-Zelle als Zielzelle eines BiTE[®]-Moleküls

Die Entwicklung eines BiTE[®]-Antikörpers gegen den membranständigen IgE-B-Zellrezeptor verspricht eine effektive Eliminierung der IgE⁺ B-Zellpopulation durch cytotoxische T-Zellen ohne die B-Zellpopulationen der anderen vier Immunglobulinklassen einzuschließen. In Analogie zu Plasmazellen anderer Immunglobuline kann davon ausgegangen werden, dass im Laufe der IgE-Immunantwort B-Zellen gebildet werden, die den membranständigen B-Zellrezeptor des Immunglobulin E-Isotyps aufweisen und die Expression des IgE-B-Zellrezeptors während aller Stadien der Entwicklung von der Prä-B-Zelle bis zur Gedächtniszelle stattfindet [127].

Das seltene Vorkommen der IgE⁺ B-Zellen innerhalb der gesamten B-Zellpopulation und die zahlreichen Zelltypen, die sezerniertes IgE auf ihrer Zelloberfläche binden, wie Mastzellen, basophilen Zellen und naiven B-Zellen, erschwerten die experimentelle Untersuchung [128]. Nachdem drei voneinander unabhängige Forschergruppen Mausstämme entwickeln konnten, welche die endogene, membranassoziierte IgE-Expression an die Expression eines fluoreszenten Proteinreportergens gekoppelt hatten und zudem eine alternative Methode zur Detektion von IgE⁺ B-Zellen etabliert werden konnte, wurden in den vergangenen Jahren wichtige Ergebnisse zur Entwicklung und Verteilung der IgE⁺ B-Zellen publiziert [15-17, 19, 129].

IgE determinierte B-Zellen scheinen keine klassische Entwicklung naiver B-Zellen zu Plasma- und Gedächtniszellen zu durchlaufen. Da im Keimzentrum der untersuchten Mäuse kaum IgE⁺ B-Zellen nachgewiesen werden konnten, ein Klassenwechsel und die somatische Hypermutation bei

manchen produzierten IgE-Antikörpern jedoch nachweisbar war, scheint anhand der Untersuchung der genveränderten Mäuse wahrscheinlich, dass die Frequenz der IgE⁺ B-Zellen im Keimzentrum durch mehrere Mechanismen limitiert wird und dadurch die Entwicklung von hoch-affinen, langlebigen Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen restringiert wird [130]. Plasmazellen werden gemeinhin während der primären Immunantwort durch zwei verschiedene Entwicklungswege gebildet; zunächst durch extrazelluläre Foci, deren Plasmazellen keimbahnkodierte Antikörper mit niedriger bis mittlerer Affinität sezernieren und im späteren Verlauf der Immunreaktion in den Keimzentren [131, 132]. Dies scheint auch für IgE⁺ Plasmazellen zu gelten, wobei sich die beiden Populationen im zeitlichen Verlauf der IgE-Antwort überschneiden und die Zahl der Plasmazellen, die aus B-Zellen des Keimzentrums evolvieren, stetig abnimmt. Da man annimmt, dass langlebende Plasmazellen in Keimzentren späterer Stadien gebildet werden, ist wahrscheinlich, dass die frühe Differenzierung der IgE⁺ Plasmazellen, zusammen mit deren schnellem Verschwinden aus sekundären lymphoiden Geweben nach dem Maximum der Immunantwort und deren Abwesenheit im Knochenmark, mit einer kurzen Überlebensdauer assoziiert ist [15, 16, 19, 132, 133].

Die Entwicklung einer IgE⁺-Gedächtnis-Immunantwort wird bis zum Zeitpunkt der Publikation der vorliegenden Arbeit kontrovers diskutiert. Der Immunglobulinklassenwechsel zu IgE könnte einerseits direkt vom IgM-Isotyp andererseits sequenziell über eine Übergangsform, die den IgG1-Isotyp exprimiert, erfolgen. Aus diesem Grund ist sowohl eine Gedächtniszellpopulation mit IgG1⁺ B-Zellrezeptor, der bei Aktivierung den Klassenwechsel zu IgE vollzieht, als auch die Existenz einer kleinen Population IgE⁺ Gedächtnis-B-Zellen in Diskussion [15, 18, 134-137].

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre geben Einblick in die Komplexität der IgE-Immunantwort und lassen erahnen, dass die Verletzung einer der Regulationsmechanismen, wie dem restringierten Klassenwechsel zu IgE, der transienten Präsenz der IgE⁺ B-Zellen im Keimzentrum, der Prädisposition der IgE⁺ B-Zellen kurzlebige Plasmazellen zu bilden und der potentiellen Notwendigkeit eines *de novo*-Klassenwechsels zu IgE bei sekundären Immunantworten, zu einer Disregulation der IgE-Produktion führen kann [130].

Die möglicherweise transiente mIgE-Expression der B-Zellen könnte die Eliminierung des IgE-determinierten B-Zellkompartiments durch einen bispezifischen BiTE[®]-Antikörper erschweren. Die Daten einer klinischen Phase I-Studie eines humanisierten anti-IgE-Antikörpers zeigen, dass eine einzige Injektion von 100 mg des Antikörpers den Serumspiegel von freiem IgE auf ein nicht nachweisbares Niveau reduzieren kann. Zudem können, im Anschluss an die Injektion und für den hier verfolgten Ansatz der Eliminierung der mIgE-tragenden Gedächtniszellen entscheidender, erst nach dem Ablauf von 70 Tagen IgE-Titer gemessen werden, die denen vor der Behandlung entsprechen [138]. Eine selektive Eliminierung scheint deshalb durchaus möglich zu sein. Die graduelle Regeneration der IgE-produzierenden B-Zellen über mehrere Wochen würde der Kinetik der Rückkehr normaler B-Zellen nach der letzten Behandlung durch einen anti-CD20-Antikörper bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen entsprechen [139]. Ergänzend dazu zeigen die Ergebnisse von Omalizumab-behandelten Asthma-Patienten, bei welchen eine signifikante Reduktion der Anzahl von B-Zellen im Allgemeinen [140] und mIgE⁺ B-Zellen im Speziellen [141] zu beobachten war, dass eine erfolgreiche therapeutische Verwendung eines mIgE-spezifischen BiTE[®]-Moleküls möglich sein könnte.

Nicht zuletzt dürfte die Anwendung eines BiTE[®]-Moleküls als therapeutisches Molekül die Mechanismen der Entwicklung, Differenzierung und des Schicksals von B-Zellen, die zum IgE-Isotyp gewechselt sind, weiter aufklären und eventuell fehlende Einblicke zur Ergänzung des Gesamtbildes liefern.

5.2 Immunglobulin E – Struktur und Epitope für bispezifische Antikörper-Konstrukte

Das Immunglobulin E hebt sich aufgrund seines Vorkommens, seiner Struktur, seiner ungewöhnlichen Bindungseigenschaften an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI und der strengen Regulation seiner Synthese und Effektormechanismen von anderen Immunglobulinen ab.

Beginnend mit der Veröffentlichung der Struktur von Immunglobulin E in Lösung und an den FcεRI gebunden durch die Arbeiten von Baird, Holowka und deren Mitarbeitern vor über 20 Jahren, ist anhand der Analyse von Kristallstrukturen, Neutronenstreuung, Förster-Resonanzenergietransfer-

Experimenten und Röntgenstrukturen davon auszugehen, dass Immunglobulin E im Gegensatz zu anderen Immunglobulinen keine Y-förmige Struktur aufweist. IgE nimmt eine kompakte, stark gekrümmte Form an, indem die beiden CH₂-Regionen auf die CH₃-Regionen zurückgefaltet werden und dabei in nächste Nähe zu den CH₄-Regionen treten (vgl. Abbildung 39, CH₂-4 entspricht C ϵ 2-4) [142-144]).

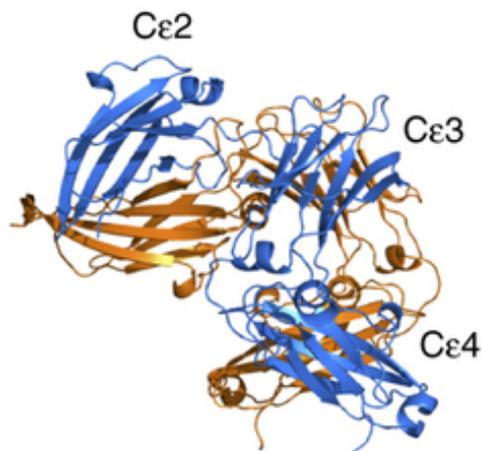


Abbildung 39: räumliche Struktur des Fc-Teils von IgE (adaptiert nach [145])

Gekrümmte Struktur des freien IgE-Fc-Teils, das (C ϵ 2)₂-Domänenpaar kommt dabei in Kontakt mit den Domänen C ϵ 3 und C ϵ 4. Blau: IgE-Fc^A, Orange: IgE-Fc^B

Trotz dieser kompakten Form ermöglicht die Struktur eine asymmetrische Krümmung des Moleküls und lässt so zwei unterschiedliche Konformationen der CH₃-Regionen entstehen, eine „offene“ und eine „geschlossene“ Form [63]. Die Krümmung der CH₂- und der CH₃-Domäne des Fc-Teils ist verantwortlich dafür, dass der Antikörper eine konkave und eine konvexe Seite ausbildet und führt zusammen mit einer Konformationsänderung des Fc-Teils bei der Bindung an Fc ϵ RI zu der monovalenten Bindung des Moleküls an den Fc ϵ RI. Aufgrund dieses monomeren Engagements findet keine Rezeptoraggregation und Mastzellaktivierung in Abwesenheit des Antigens statt [146].

Beide IgE-Rezeptoren, der hoch affine Fc ϵ RI und der niedrig affine IgE-Rezeptor CD23, welcher unter anderem auf B-Zellen zu finden ist und eine Verstärkung der allergischen Reaktion bewirken kann, binden IgE trotz ihrer unterschiedlichen Struktur und Funktionsweise an der CH₃-Domäne. Der hochaffine IgE-Rezeptor bindet über die zweite Immunglobulin-ähnliche

extrazelluläre Domäne der FcεRIα-Kette an die CH3-Domänen des IgE. Die Bindung des niedrig affinen CD23-Rezeptor ist nicht exakt bestimmt, kann jedoch auf der CH3-Region unterschiedlich von der des FcεRI kartiert werden [63, 147].

Die Struktur und Konformation des rezeptorgebundenen IgE erklärt die verschiedenen Eigenschaften bezüglich der zytotoxischen Aktivität der beiden vorgestellten IgE-spezifischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte. Insbesondere der IgE-CH3-BiTE[®], welcher im Bereich der CH3-Domäne des IgE-Fc-Teils bindet, macht den Konformationswechsel und damit die wechselnde Zugänglichkeit des CH3-Epitops des rezeptorgebundenen IgE zu dem im Serum vorliegendem IgE deutlich.

Bereits die erste Beschreibung eines monoklonalen Antikörpers gegen humanes IgE, der keine Histaminausschüttung durch Basophile auslöste, führte zu der Schlussfolgerung, dass die IgE-Zielstruktur des Antikörpers durch die FcεRI-Interaktion verdeckt sein muss [148]. Da Immunglobulin E unabhängig von seiner flexiblen Quartärstruktur durch Bereiche der CH3-Domäne an die beiden IgE-spezifischen Fcε-Rezeptoren gebunden wird [139], liegt die Entwicklung eines Antikörpers gegen die IgE-Bindungsstelle des FcεRI, in der die sechs Aminosäuren Arg408, Ser411, Lys414, Glu452, Arg465 und Met469 eine kritische Rolle spielen, nahe [149, 150].

Der therapeutische Einsatz des humanisierten Antikörpers Omalizumab, der genau diese Struktur des humanen, sezernierten und membrangebundenen IgE erkennt, macht deutlich, dass die Bindung von freiem IgE, bei gleichzeitiger Inhibition der Reaktionen IgE sensibilisierter Mastzellen und Inhibition der Produktion von Zytokinen wie IL-13, möglich ist [151, 152]. Omalizumab vermag bei entsprechender Dosierung den IgE-Serumspiegel auf ein nicht detektierbares Niveau zu senken und es lässt sich daraufhin eine graduelle Rückkehr des IgE-Levels innerhalb von vier Monaten beobachten [153]. Ein zusätzlicher Effekt ist die Reduktion der FcεRI-Expression auf den Effektorzellen und dendritischen Zellen [154, 155]. Diese zellulären Effekte könnten die klinische Effekte, dass Omalizumab die durch ein Allergen ausgelösten frühen und späten Phasen einer allergischen Reaktion mindern kann, erklären [156, 157]. Ein bispezifisches Antikörpermolekül, das gegen die CH3-Domäne des IgE-Moleküls gerichtet ist, könnte somit therapeutisch

erfolgreich sein. Da die Behandlung mit Omalizumab, abgesehen von den hohen Kosten [158], die Ursache des hohen IgE-Spiegels nicht dauerhaft beseitigen kann, ist das BiTE[®]-Molekül zudem potentiell in der Lage die IgE-sezernierenden Zellen durch die T-Zell-vermittelte Lyse zu zerstören und damit eine Therapie mit kurativem Potential für Atopiker und Asthmatiker anzubieten.

Die Spezifität für ein Epitop der IgE-CH3-Domäne des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts bedingt, dass auch lösliches IgE im Serum von Patienten gebunden werden kann und damit die Verfügbarkeit des therapeutischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts zur Bindung und Vermittlung der Apoptose von mIgE^+ B-Zellen reduziert werden kann. Erwartungsgemäß nahm die mittlere effektive Konzentration des $\alpha\text{IgE}_1\alpha\text{CD3}$ -BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts gegenüber mIgE -transfizierten Zellen um den Faktor 190 zu, wenn 1,5 $\mu\text{g/ml}$ sIgE während eines vergleichenden Experiments anwesend war. Folgerichtig würde der IgE-Titer im Serum von atopischen Patienten eine bedeutende Rolle bei der Ermittlung der erforderlichen therapeutischen BiTE[®]-Dosis für die effektive Behandlung spielen. Für das CD19-spezifische BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt Blinatumomab konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Blinatumomab einen Abfall der Serum-Immunglobulin-Spiegel während und nach der Behandlung hervorrief und vor allem die Rückkehr von Immunglobulinen, die von Gedächtnis-B-Zellen produziert werden, verzögert war [159]. Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch die Serum-IgE-Titer von Patienten, die mit einem IgE-CH3-spezifischen BiTE[®]-Antikörper behandelt werden, bereits während der Behandlung zurückgehen und eine Anpassung der Dosis nach der initialen Gabe des therapeutischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts möglich machen könnten.

Zielstrukturen des membrangebundenen Antikörperrezeptors von IgE-B-Zellen, die sich nicht bei löslichem IgE wiederfinden, finden sich in einem Peptidsegment, das sich am C-Terminus der schweren Kette des Immunglobulins befindet und das Immunglobulin mit der Zellmembran verbindet. Diese Region besteht aus drei Domänen: der intrazellulären Domäne, die Aufgaben der Signaltransduktion erfüllt, der Transmembranregion (TM) und der membranahen extrazellulären Region (Migis, von Membrane Immuno Globulin Isotype Specific). Die Bereiche der

intrazellulären Domäne und der Migis-Region sind für jeden Immunglobulinisotyp spezifisch, wohingegen die Transmembranregion über alle Immunglobuline sehr ähnlich ist [113, 160]. Unter den fünf membrangebundenen Immunglobulinen ist membranständiges IgE (mIgE) das einzige, das in zwei Spleißvarianten vorkommt. Eine alternative Spleißstelle ermöglicht die Produktion zweier unterschiedlicher schwerer Ketten. Die kurze Isoform weist die konstanten Domänen CH1-CH4 der schweren Kette und ein kurzes, membrannahes, 15 Aminosäuren langes Migis-Peptid (ϵ -Migis) auf. Die lange Isoform hingegen weist zwischen dem ϵ -Migis-Peptid und der CH4-Domäne der konstanten Region der schweren Kette ein 52 Aminosäuren langes Segment auf, welches als C ϵ mX Region der membranbindenden Domäne bezeichnet wird [121, 161]. Brightbill und Kollegen konnten durch den Einsatz des von ihnen entwickelten Antikörpers gegen die C ϵ mX-Domäne, von ihnen als M1'-Domäne benannt, nachweisen, dass der IgE-Serumspiegel und die Anzahl IgE-produzierender Plasmazellen M1'-transgener Mäuse reduziert werden kann [72]. Des Weiteren sind humane und murine Antikörper gegen die N-terminale Region und die mittlere Region des C ϵ mX-Peptids entwickelt worden, die ebenfalls Potential zur Minderung der IgE-Sekretion und der antikörpervermittelten, zellulären Zytotoxizität aufweisen [73, 122].

Der von Brightbill und Kollegen entwickelte 47H4-Antikörper wurde in ein bispezifisches BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt umgewandelt und zeigte, dass er wie erwartet die IgE-Variante mit der C ϵ mX-Domäne (IgE_{lang}) band und die Variante ohne C ϵ mX-Domäne (IgE_{kurz}) nicht. Die zytotoxische Aktivität war durch die Anwesenheit von löslichem IgE nicht beeinflussbar.

Die hier charakterisierten human IgE-spezifischen BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte unterscheiden sich in erster Linie durch die Spezifität für unterschiedliche Epitope des Immunglobulin E. Die Experimente mit der humanen IgE-Myelomzelllinie U266 in Kapitel 4.1.3.9 zeigen zusammenfassend, dass beide IgE-spezifische BiTE[®]-Antikörper ein großes Potential zur therapeutischen Behandlung von allergischen Erkrankungen bergen. Der IgE-CH3-spezifische BiTE[®]-Antikörper scheint zytotoxisch aktiver zu sein, bindet jedoch auch an lösliches IgE. Das IgE-C ϵ mX-spezifische BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt erkennt ausschließlich das Epitop des

membranständigen IgE-Moleküls, ist jedoch etwas weniger affin für IgE und erfordert deshalb eventuell eine höhere Dosierung.

5.3 Wirkung der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte auf die Effektorzellen der allergischen Immunantwort

Sezerniertes IgE hat mit einer Konzentration von 150 ng/ml im peripheren Blut die geringste Serumkonzentration aller fünf humanen Immunglobulinklassen. Es liegt vor allem an Mastzellen und basophile Granulozyten gebunden vor. Die Halbwertszeit von löslichem, rezeptorgebundenem IgE ist hoch, da sie durch die Bindung an den hoch affinen IgE-Rezeptor FcεRI auf diesen Zellen von zwei Tagen auf mehrere Wochen verlängert wird [162, 163]. Die Bindungskinetik der Interaktionspartner ist durch die sehr hohe Affinität (10^{-10} M^{-1}) des Rezeptors für IgE und die sehr langsame Dissoziation ($\approx 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) des Antikörpers von diesem Rezeptor charakterisiert [164-166]. Die FcεRI-exprimierenden Zellen, vor allem basophile Granulozyten (Basophile), Leukozyten und Mastzellen, sind daher praktisch ständig mit IgE beladen und werden sehr rasch aktiviert, wenn sie auf ein Antigen treffen.

Die Granula der Mastzellen enthalten eine Reihe von Mediatoren, wie zum Beispiel Histamin, Chymase, Tryptase und Serinesterasen, die nach Aktivierung der Mastzelle innerhalb von Sekunden ausgeschüttet werden [167]. Histamin ist kurzlebig und führt zur sofortigen Erhöhung der lokalen Durchblutung und Gefäßdurchlässigkeit. Die anderen Komponenten sind Enzyme, die Metalloproteasen der Bindegewebematrix aktivieren und auf diesem Weg zu Gewebeschäden führen. Die Granula enthalten zudem TNF-α, das die Zellen des Endothels aktiviert, welches daraufhin die Expression von Zelladhäsionsmolekülen steigert. Diese Moleküle erlauben den inflammatorischen Leukozyten und Lymphozyten in das betroffene Gewebe einzuwandern. Im weiteren Verlauf einer allergischen Reaktion produzieren die aktivierten Mastzellen zusätzliche Faktoren, die Kontraktionen der glatten Muskulatur, erhöhte Gefäßpermeabilität und die Freisetzung von Schleim zur Folge haben. Diese Symptome sind unter dem Begriff der „Sofortreaktion“ einer allergischen Reaktion zusammengefasst. Der Zustrom und die Aktivierung von Leukozyten werden zusätzlich gefördert. Auf diese Art wird die „Spätreaktion“ der allergischen Reaktion vermittelt. Diese ist mit einer zweiten

Kontraktionsphase der glatten Muskulatur, anhaltenden Ödemen und morphologischen Veränderungen des Gewebes verbunden. Die sich daran langfristig anschließende Folgereaktion wird als chronische allergische Entzündung bezeichnet.

Eosinophile Granulozyten (Eosinophile) enthalten, ebenso wie Mastzellen, Granula. Eosinophile exprimieren im nicht aktivierten Zustand keine hoch affinen IgE-Rezeptoren. Nach ihrer Aktivierung wird die hohe Schwelle der Granula-Ausschüttung abgesenkt, indem sie den Fc ϵ RI, die Komplement- und die Fc γ -Rezeptoren exprimieren. Zudem gewinnen sie den Status einer antigenpräsentierenden Zelle, indem sie T-Zellen Antigene präsentieren und T_H2-Zytokine ausschütten können. Sie halten sich vornehmlich im Bindegewebe direkt unter den Epithelien der Atemwege, des Darms und des Urogenitaltrakts auf. Die Granula der Eosinophilen enthalten sehr wirksame Mediatoren wie hoch toxische Granulaproteine und freie Radikale, die Mikroorganismen und Parasiten töten, aber bei allergischen Reaktionen beträchtliche Gewebeschäden hervorrufen. Eosinophile verstärken nachdem sie aktiviert wurden die Entzündungsreaktion. Ihnen eigen ist die Freisetzung des basischen Hauptproteins, das zur Degranulation von Mastzellen und Basophilen führt. Aufgrund der starken Effektormechanismen dieser Zellen unterliegen sie einer strengen Regulation. Besteht keine Infektion oder anderweitige Stimulation des Immunsystems, so werden nur sehr wenig Eosinophile im Knochenmark gebildet. Dies ändert sich, wenn T_H2-Zellen spezifische Zytokine, wie IL-5, ausschütten. Zusätzlich müssen Eosinophile durch „Lockstoffe“ in das betroffene Gewebe gelockt werden, die so genannten „Eotaxine“. Diese Stoffe locken nicht nur diese Zellen, sondern auch Mastzellen und Basophile an.

Im Unterschied zu den Eosinophilen, mit denen Basophile ansonsten sehr viele Charakteristika teilen, exprimieren sie den Fc ϵ -Rezeptor I konstitutiv auf ihrer Oberfläche. Sie kommen wie Eosinophile in sehr geringer Zahl im Blut vor und die Stammzellen des Knochenmarks werden durch sehr ähnliche Zytokine wie bei den Eosinophilen zur vermehrten Produktion von Basophilen animiert. Nach der Aktivierung wird aus ihren Granula Histamin freigesetzt und sie sezernieren IL-4 und IL-13.

Mastzellen, Eosinophile und Basophile haben als Effektorzellen einer allergischen Immunreaktion sehr potente Wirkmechanismen, die als Folge einer krankhaften Aktivierung gravierende Gewebeschäden, chronische Entzündungen und sogar einen tödlichen allergischen Schock hervorrufen können. Es muss demnach ausgeschlossen werden, dass Antikörper und deren Derivate, die für Immunglobulin E spezifisch sind, diese Effektormechanismen aktivieren.

Es gibt zwei unterschiedliche Strategien, die IgE-Serumspiegel bei Allergikern und Atopikern zu senken und gleichzeitig keine allergische Immunantwort auszulösen. Die bereits 1981 mit Hook und Kollegen initiierte Strategie, die mit der Entdeckung monoklonaler, IgE-spezifischer Antikörper begann, basiert auf dem Einsatz neutralisierender Antikörper [168]. Obwohl sie, wie auch weitere Autoren, nicht anaphylaktogene Antikörper, die für murines und humanes IgE spezifisch sind, isolieren konnten, ist es bis heute nur den Pharmaunternehmen Novartis und Genentech gelungen, auf Basis des murinen Antikörper MAE-11 den therapeutisch eingesetzten Antikörper Omalizumab zu entwickeln. Omalizumab (rhuMAb-E25) ist ein neutralisierender Antikörper, der mit freiem, löslichem IgE Komplexe bildet, die über die Niere und das retikuloendotheliale System der Leber abgebaut werden. Der Antikörper konkurriert erfolgreich mit den IgE-Rezeptoren und hemmt auf diesem Weg die Degranulation der Mastzellen [169]. Wissenschaftler können zudem zeigen, dass die anhaltende Entfernung des löslichen IgE durch Omalizumab eine Minderung der IgE-Rezeptorexpression und eine Hemmung der IgE-Produktion zur Folge haben kann [155, 170]. Dieser Ansatz entfernt sIgE als auslösendes Element der allergischen Immunantwort aus der Reaktionskaskade.

Die zweite Strategie verfolgt die Eliminierung der Zellen, die sIgE produzieren und setzt damit einen Schritt früher in der Reaktionskaskade der allergischen Reaktion als Omalizumab an. Die Affinität von Omalizumab für sIgE beträgt je nach Experiment zwischen 0,02 und 7,7 nM [171]. Für das IgE-CH3-BiTE[®] konnten 1 nM für humanes IgE_{kurz} gemessen werden. Obwohl der IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper sIgE in Konkurrenz zu FcεRI binden kann, wirkt er nicht neutralisierend und würde demnach im Gegensatz zu Omalizumab ausschließlich die Lyse der mIgE⁺ B-Zellen vermitteln. Gleiches gilt für den

IgE-C ϵ mX-BiTE[®], der mit 28,6 nM für IgE_{lang} ebenfalls eine hohe Affinität für das auf der Membran der B-Zellen vorkommende mIgE hat.

Da sich der Wirkmechanismus von Omalizumab deutlich von dem eines BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts unterscheidet, musste gezeigt werden, dass eine sichere Anwendung möglich ist. Die voran beschriebenen Experimente zeigen, dass keines der beiden Konstrukte eine unspezifische Lyse von Zellen, die sIgE durch den hochaffinen Rezeptor gebunden haben, vermitteln kann (vgl. Kapitel 4.1.2.9, 4.1.2.10, 4.1.3.5 und 4.1.3.7). Für den niedrig affinen IgE-Rezeptor CD23 kann ähnliches angenommen werden, da auch CD23 sIgE in der CH3-Region bindet und deshalb wahrscheinlich ist, dass das Epitop des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörpers ebenfalls verdeckt ist [63, 147].

5.4 In vivo Aktivität und Kreuzreaktivität der BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte zu den Oberflächenmolekülen des Makaken

Die Aktivität eines therapeutischen BiTE[®]-Antikörper Konstrukts lässt sich in *in vitro* Experimenten bis zu einem bestimmten Grad messen, jedoch lassen sich nicht alle Einflussfaktoren eines komplexen Organismus nachstellen. Aus diesem Grund wurde der IgE-CH3-BiTE[®] in Mäusen getestet und auf die Kreuzreaktivität mit den Oberflächenmolekülen des Makaken geprüft.

Das subkutane Tumormodell mit IgE_{kurz}-positiven Transfektanten in immundefizienten Mäusen zeigte, dass sich in unbehandelten Tieren nach 22 Tagen ein Tumolvolumen von mehr als 2000 mm³ bildete. Im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren wurde das Tumorwachstum bei den behandelten Tieren mit IgE-CH3-BiTE[®] verlangsamt. Die Tiere wurden an den zehn anfänglichen Tagen der Studie im Abstand von 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,005 mg/kg/d bis 0,5 mg/kg/d) des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts bzw. mit dem BiTE[®]-Formulierungspuffer behandelt. Obwohl die höchste BiTE[®]-Dosis auch den stärksten Effekt auf das Tumorwachstum erzielte, war bereits die Behandlung mit der niedrigsten Dosis statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Die BiTE[®]-Behandlung mit der hundertfachen Dosis (0,5 mg/kg/d) bewirkte ein durchschnittlich um circa die Hälfte reduziertes Tumolvolumen nach 22 Tagen. Die CD3-exprimierenden T-Zellen und das BiTE[®]-Molekül konnten somit das Wachstum des Tumors effektiv verlangsamen.

Der Versuchsaufbau war durch den Einsatz der Faktoren, wie humanen PBMZ als Effektoren, transfizierten Zellen als Zielzellen und der punktuellen Lokalisation der Zielzellen in der Maus, sowie dem immundefizienten Mausstamm selbst, sehr artifiziiell. Eine Ermittlung der BiTE[®]-Aktivität *in vivo* unter physiologischeren Bedingungen in einem intakten Immunsystem und den tatsächlichen Zielzellen, den mlgE⁺ B-Zellen, ist deshalb vor einer therapeutischen Anwendung des BiTE[®]-Moleküls erforderlich und könnte durch eine toxikologische Studie mit Makaken realisierbar sein.

Im Unterschied zur Maus ist die IgE-EMPD-Region (vgl. Abbildung 40) von Altweltaffen mit der des Menschen sehr homolog. Die toxikologische Studie mit Makaken bietet damit die Möglichkeit, abgesehen von der Charakterisierung der Verträglichkeit des BiTE[®]-Moleküls, zusätzliche Erkenntnisse zu dessen therapeutischer Anwendung zu gewinnen.

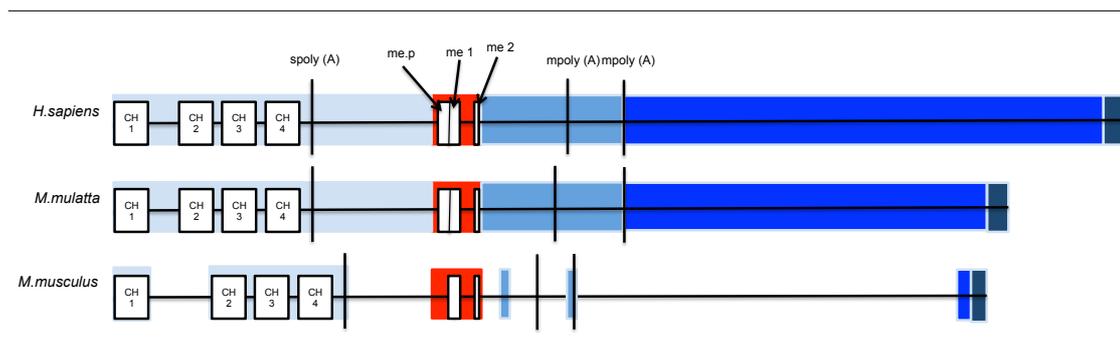


Abbildung 40: schematische Darstellung eines Vergleichs der Exons und homologen Segmente des Menschen (*H.sapiens*), des Rhesusaffen (*M. mulatta*) und der Maus (*M. musculus*).

Schwarze vertikale Linien: mögliche Polyadenylierungssignale des sezernierten und des mlgE; weiße Rechtecke: Exons; schwarze, horizontale Linien: Introns. Hellblau: Gensegment ab Exon CH1 bis Intron strängaufwärts des Segments, das die membrannahen Region kodiert (me.p); rot: Exons der EMPD-Region und der Transmembrandomäne (me.1 und me.2); Mittelblau: 3'-untranslatierte Region mit poly-A-Signal. Dunkelblau: Intron strängabwärts der Poly-A-Stelle des ε-Gens; schwarzblau: eingreifende Promotorregion der IgH α-Kette (I_α)

Während die membrannahen IgE-Domäne der Maus lediglich durch eine Form mit 19 Aminosäuren Länge repräsentiert ist, variiert die des Menschen und die der Altweltaffen zwischen einer langen Isoform mit 67 Aminosäuren Länge, die beim Menschen vornehmlich verwendet wird und einer kurzen Isoform mit 15 Aminosäuren Länge. Altweltaffen, wozu die Rhesusaffen (*M. mulatta*) und Cynomolgusaffen (*M. fascicularis*) gehören, weisen beide Isoformen des membranständigen IgE auf [71]. Die Ergebnisse einer Toxizitätsstudie in

Makaken könnten aus diesem Grund, dem menschlichen Regulations-, Expressions- und Differenzierungssystem der mIgE⁺ B-Zellen, sehr ähnliche Mechanismen aufzeigen.

Da der CD3-bindende scFv bekannterweise eine ähnliche Affinität zu humanem CD3, wie zum CD3-Molekül des Makaken hat, ist es von Vorteil, dass auch der IgE-bindenden Teil des IgE-CH3-BiTE[®]-Moleküls mit 1 nM zu humanem IgE und 3,8 nM zu IgE des Makaken sehr ähnliche Bindungsstärken aufweist [172]. Die Durchführung einer aussagekräftigen Toxizitätsstudie an Makaken wäre somit möglich.

5.5 proteinbiochemische Eigenschaften und Herstellbarkeit

Die Entwicklung eines Wirkstoffes zur Vermarktung hängt nicht ausschließlich von der Wirksamkeit und Sicherheit des Präparates ab. Wesentliche Faktoren sind außerdem die Herstellbarkeit und die proteinbiochemische Stabilität des Produktes.

Die *in silico*-Analyse von Aminosäuresequenzen ermöglicht die potentiellen Eigenschaften von Proteinen vorherzusagen und im Falle von Antikörperderivaten Rückschlüsse auf den Ursprung der Sequenz aus der Keimbahn und ihre mögliche Immunogenität zu ziehen. Im Falle des Biotechnologieunternehmens AMGEN wird die Analyse durch firmeneigene Datenbanken (AbInitio) berechnet und durch Sequenzanalyseprogramme wie VectorNTI[®] ergänzt.

Der IgE-CH3-BiTE[®] wurde durch einen gerichteten Phagen-Display entwickelt und führte von einer ursprünglich murinen schweren Kette und anfänglichen 81,6 % Sequenzhomologie zur humanen Keimbahnsequenz, zu einer humanisierten Sequenz und einer Ähnlichkeit von 95,4 % zur humanen Keimbahnsequenz [81]. Wenn bei der Berechnung berücksichtigt wird, dass die CDR murin belassen wurden, so ergibt sich eine Ähnlichkeit von 80,5 % zur humanen Keimbahnsequenz. Die strukturbildenden Sequenzen sind demnach einer Antikörpersequenz, die dem humanen Rekombinationsprozess entspringen würde, sehr ähnlich, lediglich die hoch variablen Regionen blieben murin. Dies kann potentiell zu Immunreaktionen des menschlichen Immunsystems führen [173, 174]. Die leichte Kette des IgE-CH3-BiTE[®] wurde aus einer Gesamtzahl von elf verschiedenen leichten Ketten ausgewählt. Drei

der elf leichten Ketten gingen aus Umlagerungen des Lambda-Locus und die acht weiteren Ketten aus Umlagerungen des Kappa-Locus hervor. Die Verteilung der leichten Ketten des Kappa- bzw. des Lambda-Locus der scFv-Konstrukte ist nicht überraschend, da der menschliche Kappa-Locus dem Lambda-Locus bei der Genumlagerung vorgezogen wird und deshalb dreimal häufiger funktionelle B-Zellrezeptoren mit leichten Ketten des Kappa-Locus gegenüber denen des Lambda-Locus beobachtet werden [175]. Die Wahl der Gene des Vk3-Locus entspricht ebenfalls den Erwartungen, da auch in Proben von B-Zellen aus Nabelschnurblut lediglich neun Gene oder nicht unterscheidbare Genpaare (O2/O12, O8/O18, L9, L12(L12a), A3/A19, A27, L2, L6 und B) zu 75 % die Basis aller Vk-Sequenzen bilden [176]. Ähnlich verhält es sich bei Erwachsenen, wo bevorzugt die Gene/Genpaare O2/O12, O8/O18, A17, L12, A3/A19 A27, L2, L6 und B3 verwendet werden. Die J-Segmente des Kappa-Locus scheinen je nach Vk-Subgruppe häufiger verwendet zu werden als die des Lambda-Locus, wobei die Segmente Jk3 und Jk5 selten rearrangiert werden [177]. Die gewählte leichte Kette des αIgE_1 Klons hat eine Sequenzähnlichkeit von 90,1 % zur humanen Keimbahnsequenz und hebt damit die Gesamtähnlichkeit des IgE-CH3-BiTE[®] zu 85,3 % Keimbahnidentität an.

Für den IgE-C ϵ mX-BiTE[®] mit der DNS-Sequenz des humanisierten 47H4-Antikörpers konnte eine Sequenzidentität zwischen 97 % und 98 % der leichten und der schweren Kette zur Keimbahnsequenz des Menschen festgestellt werden. Die große Ähnlichkeit des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts zur humanen Keimbahnsequenz macht eine Immunreaktion unwahrscheinlicher und spricht für eine sehr effiziente Humanisierung des ursprünglichen murinen Antikörpers durch Brightbill und Kollegen.

Setzt man sich im Folgenden mit den Aminosäuresequenzen und möglichen posttranslationalen Modifikationen wie potentielle N-Deamidierungs-, D-Isomerisierungs- und Glykosylierungsstellen, dem isoelektrischen Punkt, sowie dem Vorkommen freier Cysteine der beiden BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte auseinander, so zeigt sich, dass in beiden sowohl in der schweren Kette als auch in der leichten Kette der IgE-spezifischen scFv-Sequenzen Tyrosin oder Tryptophan in den CDR3 zu finden sind. Beide Aminosäuren sind, zusammen mit Methionin und Histidin oxidationsempfindlich und können

die Stabilität des Proteins beeinflussen [89-92]. Freie Cysteine, die oxidiert werden können und inter- und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können, sind in keinem der beiden IgE-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte vorhanden [92]. Ebenso hat keines der Moleküle Glykosylierungsstellen, die je nach Expressionssystem unterschiedlich modifiziert werden können und damit zu einem uneinheitlichen Proteinprodukt führen können.

Während für den IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper keine potentiellen N-Deamidierungsstellen in den CDR angegeben werden, weist sein Pendant zwei solche Stellen auf. Beide IgE-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte enthalten potentielle D-Isomerisierungsstellen, der IgE-CH3-BiTE[®] zwei davon und der IgE-C ϵ mX-BiTE[®] eine.

Beide BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte haben Aminosäuremotive in ihren CDR, die durch Hydrolyse, durch die Umwandlung in Enantiomere oder durch die Oxidation ihrer Tryptophane und Tyrosine verändert werden können. Diese Stellen sind ein Faktor potentieller Variabilität während der Produktion der Proteine und können zu einer verminderten Monomerausbeute in Abhängigkeit vom Proteinreinigungsprozess führen. Im Rahmen eines therapeutischen BiTE[®]-Entwicklungsprogrammes würde an diesem Punkt eine Sequenzoptimierung zur Eliminierung der modifizierbaren Aminosäuremotive anschließen. Dabei würden die Motive durch andere, möglichst die Bindung des BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts nicht beeinflussende Aminosäuren ersetzt. Ist dies jedoch nicht möglich, ohne die Konformation und damit auch die Bindung zu beeinträchtigen, so bleibt es Aufgabe der Formulierungsentwicklung eine mögliche Veränderung der Konstrukte durch den Herstellungs- und Lagerungsprozess zu verhindern.

Trotz der potentiell veränderlichen Aminosäuremotive haben beide Konstrukte gezeigt, dass sie durch eine Standard-BiTE[®]-Expressions- und Reinigungsmethode ohne eine Anpassung des Prozesses mit guter Aubeute zu produzieren sind. Eine genauere Charakterisierung der chemischen Eigenschaften zur Stabilität und Integrität der beiden Konstrukte muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Abschließend zeigte die Bestimmung der thermischen Stabilität der IgE-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte positive Ergebnisse. Die Weiterentwicklung des IgE-CH3-spezifischen mulgExdiL2K führte nicht nur zu einem humanisierten,

sondern auch zu einem stabileren BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt α lgE₁ α CD3. Das parentale Molekül wies eine TS₅₀ von 42 °C auf wohingegen für den Nachfolger 50 °C gemessen werden konnten. Die TS₅₀ für den IgE-C ϵ mX-BiTE[®] konnte auf 60 °C bestimmt werden. Damit ist der IgE-C ϵ mX-BiTE[®] das temperaturstabilste der drei BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte.

6 Ausblick

Die Humanisierung eines murinen BiTE[®]-Moleküls, das für die CH3-Domäne von humanem IgE spezifisch ist, führte zu einem zytotoxisch aktiven, stabilen, gut produzierbaren BiTE[®]-Antikörper. Zudem eröffnet die Kreuzreaktivität des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts zu dem IgE-Oberflächenmolekül des Makaken die Möglichkeit der Validierung der Zielstruktur im Tiermodell. Die Wirkung eines IgE-CH3-BiTE[®] auf den Serum-IgE-Spiegel des Makaken und die Verteilung von IgE⁺ B-Zellen vor und nach der Behandlung des Makaken mit dem BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt können, abgesehen von der Verträglichkeit des Moleküls, entscheidende Erkenntnisse zur Entwicklung und Differenzierung IgE⁺ B-Zellen erbringen.

Der IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper erkennt ein mIgE-spezifisches IgE-Epitop und rundet das Portfolio human IgE-spezifischer BiTE[®]-Antikörper ab. Dieses Konstrukt ist mit guten zytotoxischen und proteinbiochemischen Eigenschaften ein alternativer Kandidat zum IgE-CH3-BiTE[®] für die weitere Entwicklung. Im Unterschied zu diesem ist aber die Kreuzreaktivität des IgE-C ϵ mX-BiTE[®] zum IgE des Makaken nicht belegt und muss in zukünftigen Untersuchungen mit einem rekombinanten IgE des Makaken, das die C ϵ mX-Domäne beinhaltet, geprüft werden.

Für beide BiTE[®]-Moleküle gilt es, die mögliche, aber nicht zu erwartende Degranulation von Mastzellen, die mit humanem IgE beladen sind, bei der BiTE[®]-Behandlung auszuschließen. Dieses Experiment würde klären, ob ein potentiell Risiko bei der Anwendung am Menschen unwahrscheinlich wäre. Da beide BiTE[®]-Antikörper-Konstrukte Deamidierungsstellen und Isomerisierungsstellen aufweisen, kann die Stabilität dieser Proteine potentiell verbessert werden, indem diese durch gezielte Veränderung der DNS-Sequenz in diesem Bereich mutiert werden.

7 Zusammenfassung

Vor mehr als 50 Jahren, im Februar 1968, wurde der Name der fünften und letzten humanen Antikörperklasse IgE offiziell festgelegt, nachdem mehrere Wissenschaftler zuvor beobachteten, dass diese Antikörperklasse die Sensitivität gegenüber Allergenen übertragen [63]. Hatte IgE in der Vergangenheit eine Funktion als erste Verteidigungslinie gegen fremde Pathogene wie Parasiten, so tritt es in der heutigen Zeit häufiger im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen auf.

Der Fokus der aktuell angewandten Behandlung von Allergien liegt hauptsächlich auf der Milderung der Symptome. Neue Therapieansätze, wie die beschriebene Entwicklung bispezifischer Antikörper gegen IgE-determinierte B-Zellen, wecken jedoch die Hoffnung auf eine dauerhafte Heilung. Das bispezifische BiTE[®]-Antikörperformat, kurz für „Bispecific T-cell Engager“, bewirkt aufgrund seiner ersten Spezifität für CD3 auf T-Zellen und seiner zweiten Spezifität für das Zielantigen auf den zu eliminierenden Zellen die polyklonale Rekrutierung körpereigener T-Zellen und die gezielte Eliminierung der Zielzelle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren zwei bispezifische Antikörper gegen verschiedene Epitope des humanen Immunglobulin E, die spezifisch membranständiges IgE (mIgE) erkennen und rezeptorgebundenen, lösliches IgE auf Mastzellen und Eosinophilen unberührt lassen. Membranständiges Immunglobulin E wird von Gedächtnis IgE⁺ B-Zellen, deren Vorläufern und, in sehr geringem Maß, von IgE-Plasmazellen auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese verschiedenen Differenzierungsstadien von IgE⁺ B-Zellen sind für die Produktion und Aufrechterhaltung einer IgE-Immunantwort gegen Allergene verantwortlich und stellen das Ziel der hier betrachteten BiTE[®]-vermittelten Immuntherapie dar. Durch die Wahl dieser IgE-Epitope kann eine unkontrollierte Ausschüttung von Histamin durch degranulierende Effektorzellen umgangen werden und eine sichere therapeutische Anwendung der IgE-BiTE[®]-Antikörper möglich werden.

Während eines der gepaarten scFv-Fragmente, aus V_H und V_L der beiden BiTE[®]-Antikörper, die CD3ε-Kette des humanen T-Zellrezeptorkomplexes

erkennt, so ist der jeweilige andere Arm des human IgE-spezifischen BiTE[®]-Moleküls für die Erkennung des IgE-Epitops verantwortlich.

Die Bindung des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts von mIgE auf IgE⁺ B-Zellen wird durch die Spezifität von einem der scFv-Fragmente für eine Region der CH3-Domäne des humanen IgE realisiert, die bei rezeptorgebundenem IgE nicht zugänglich ist. Die Entwicklung des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts führt, beginnend bei der Humanisierung eines bekannten murinen BiTE[®]-Moleküls, über die Selektion des BiTE[®]-Kandidaten anhand biochemischer und Charakteristika der Bioaktivität, zu einem *in vitro* und *in vivo* zytotoxischen BiTE[®]-Antikörper. Eigenschaften, wie die Kreuzreaktivität des Moleküls gegenüber Immunglobulin E und CD3 des Makaken, machen den IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper zudem zu einem wichtigen Instrument der Forschung. Unabhängig von der auf diesem Weg möglichen Evaluierung des Zielantigens und der Ermittlung der Verträglichkeit des therapeutischen BiTE[®]-Kandidaten an Makaken, kann der Einsatz des Moleküls neue Erkenntnisse zur Entwicklung der Immunglobulin E-Immunantwort und der Differenzierung mIgE⁺ B-Zellen liefern.

Das zweite BiTE[®]-Molekül, das IgE-C ϵ mX-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukt, verwendet eine Besonderheit des membranständigen Immunglobulin E des Menschen und der Altweltaffen als Zielstruktur. Die Struktur des humanen mIgE unterscheidet sich von der anderer Spezies durch ein 52 Aminosäuren langes Segment, C ϵ mX, zwischen der CH4- und der ϵ -Migis-Domäne. Basierend auf den Forschungsergebnissen von Brightbill und Kollegen wurde ein C ϵ mX-spezifischer BiTE[®]-Antikörper entwickelt, der den Eigenschaften des IgE-CH3-BiTE[®]-Antikörper-Konstrukts ähnelt. Die bereits humanisierte DNS-Sequenz, die zytotoxische Wirksamkeit und die gute Ausbeute des Moleküls nach der Expression in Säugetierzellen, legen, zusammen mit der Exklusivität des C ϵ mX-Segments auf mIgE⁺ B-Zellen, nahe, dass dieses Konstrukt zu einem Therapeutikum weiterentwickelt werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen zwei Kandidaten zur therapeutischen Anwendung bei allergischen Erkrankungen vor. Basierend auf der erfolgreichen Anwendung des bispezifischen Antikörpers Blincyto[®] versprechen diese ebenfalls B-Zell-spezifischen BiTE[®]-Antikörper einen neuen immuntherapeutischen Ansatz für atopische Patienten.

8 Anhang

8.1 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'
5'humIgEseq 900bp	CCACCTCCGTGACTCTGGGCTGC
5'LspEco 2006	AGGAATTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCC
3'murlgbetaSall	GTCGACTCATTCTGGCCTGGATGCTCTCC
5'murlgbetaXbaIKozak	TCTAGACACCATGGCCACACTGGTGCTGTCTTCC
5'murlgalphaEco	AGGAATTCACCATGCCAGGGGGTCTAGAAGCC
3'murlgalphaSpeI	ACTAGTTCATGGCTTTTCCAGCTGGGCATCTCC
5'LspEco47H4Vh	GAGGAATTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCT CTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACTCCG AAGTGCAGCTGGTGGGAATCTGG
3'47H4VHLinker	CCTGAACCACCGCCACCTGATCCTCCGCCTCCGCT AGACACGGTCACGAGGGTGC
5'47H4VLLinker	GGTGGCGGTGGTTCAGGCGGAGGGGGCTCTGATA TCCAGATGACCCAGTCCC
3'47H4VLBspEI	CCTCCGGACTTGATTTCCACCTTGGTGCCCTGTCC
5'IRESpFL/Spe	CCTCTTCAATACATAGGTCCTGGAGGTCTAGCTCAA GGCTTGTGGATATTGTTTTCTCC
5'IgLeaderJ558LLC	AGGAATTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATC CTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTACTCTCC CAGGCTGTTGTGACTCAGG
3'IRESpFLXba/Sal	CCACTGTCGACGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCTCTA GAAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGC
5'IRESpFLEco/Spe	AGGAATTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACTAGTC CCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGA AGCCGCTTGG
3'murlgalphaSal	CCACGTGCGACTCATGGCTTTTCCAGCTGGGCATCTCC

9 Literaturnachweis

1. Administration, U.S.F.a.D., *Blinatumomab*. 2014, U.S Department of Health and Human Services.
2. Topp Max S., K.P., Gökbüget Nicola, Goebeler Mariele, Klinger Matthias, Neumann Svenja, Horst Heinz-A., Raff Thorsten, Viardot Andreas, Schmid Mathias, Stelljes Matthias, Schaich Amrkus, Degenhard evelyn, Köhne-Volland Rudolf, Brüggemann Monika, Ottmann Oliver, Pfeifer Heike, Burgmeister Thoman, Nagorsen Dirk, Schmidt Margit, Lutterbuese Ralf, Reinhardt Carsten, Baeuerle Ptrick A., Kneba Michael, Einsele Hermann, Riethmüller Gert, Hoelzer Dieter, Zugmaier Gerhard, Bargou Ralf C., *Targeted Therapy With the T-Cell–Engaging Antibody Blinatumomab of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results in High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival* Journal of clinical oncology, 2011. **29**: p. 6.
3. Gökbüget, N., et al., *Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2018.
4. Kantarjian, H., et al., *Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(9): p. 836-847.
5. Pirquet, *Klinische Studien über Vaccination und vaccinale Allergie*. Internationale klinische Rundschau, 1907.
6. Kenneth Murphy, P.T., Mark Walport, *Janeway Immunologie*. Vol. 7. 2009.
7. Robert-Koch-Institut, *Prävalenz von Asthma bronchiale*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2009, Robert-Koch-Institut: GEDA 2009.
8. AMAC, *Australian asthma indicators: Five-year review of asthma monitoring in Australia*, A.C.f.A.M. 2007, Editor. 2007, Australian Institute of Health and Welfare: Canberra.
9. Pleis, J.R., J.W. Lucas, and B.W. Ward, *Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2008*. Vital and health statistics. Series 10, Data from the National Health Survey, 2009(242): p. 1-157.
10. Wahn, U., Wichmann H.-E., *Spezialbericht Allergien*, Metzler-Poeschel, Editor. 2000, Statistisches Bundesamt: Stuttgart.
11. Coombs, R., Gell, P., *Clinical Aspects of Immunology*. Vol. 3. 1968, London: Blackwell.
12. Murphy, K.M.T., Paul Walport, Mark, *Janeway Immunologie*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag. 1-1092.
13. Sutton, B.J. and H.J. Gould, *The human IgE network*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 421-8.
14. Przylepa, J., C. Himes, and G. Kelsoe, *Lymphocyte development and selection in germinal centers*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **229**: p. 85-104.
15. Talay, O., et al., *IgE(+) memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 396-404.

16. He, J.S., et al., *The distinctive germinal center phase of IgE+ B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response*. J Exp Med, 2013.
17. Ota, T., et al., *Suppression of IgE B cells and IgE binding to Fc(epsilon)RI by gene therapy with single-chain anti-IgE*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 8110-7.
18. Xiong, H., et al., *Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies*. J Exp Med, 2012. **209**(2): p. 353-64.
19. Yang, Z., B.M. Sullivan, and C.D. Allen, *Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 857-72.
20. Nisonoff, A. and M.M. Rivers, *Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity*. Arch Biochem Biophys, 1961. **93**: p. 460-2.
21. Porter, R.R., *Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites*. Nature, 1958. **182**(4636): p. 670-1.
22. Hoogenboom, H.R. and P. Chames, *Natural and designer binding sites made by phage display technology*. Immunol Today, 2000. **21**(8): p. 371-8.
23. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
24. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
25. Soderlind, E., A.C. Simonsson, and C.A. Borrebaeck, *Phage display technology in antibody engineering: design of phagemid vectors and in vitro maturation systems*. Immunol Rev, 1992. **130**: p. 109-24.
26. Aalberse, R.C., *Monoclonal antibodies in allergen standardization*. Arb Paul Ehrlich Inst Georg Speyer Haus Ferdinand Blum Inst Frankf A M, 1983(78): p. 137-40.
27. Aalberse, R.C., et al., *IgG4 as a blocking antibody*. Clin Rev Allergy, 1983. **1**(2): p. 289-302.
28. Aalberse, R.C., R. van der Gaag, and J. van Leeuwen, *Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response*. J Immunol, 1983. **130**(2): p. 722-6.
29. Loffler, A., et al., *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2098-103.
30. Riethmuller, G., *Symmetry breaking: bispecific antibodies, the beginnings, and 50 years on*. Cancer Immun, 2012. **12**: p. 12.
31. Staerz, U.D., O. Kanagawa, and M.J. Bevan, *Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells*. Nature, 1985. **314**(6012): p. 628-31.
32. Kufer, P., et al., *Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer*. Cancer Immunol Immunother, 1997. **45**(3-4): p. 193-7.
33. Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7021-5.

34. Wolf, E., et al., *BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(18): p. 1237-1244.
35. Offner, S., et al., *Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells*. Mol Immunol, 2006. **43**(6): p. 763-71.
36. Mack, M., et al., *Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3965-70.
37. Ferrone, S. and T.L. Whiteside, *Tumor microenvironment and immune escape*. Surg Oncol Clin N Am, 2007. **16**(4): p. 755-74, viii.
38. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
39. Nagorsen, D., et al., *Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(6): p. 886-91.
40. Administration, U.S.F.a.D., *FDA aproves Blincyto to treat a rare form of acute lymphoblastic leukemia, in First anti-CD19 drug to receive agency approval*, S. Yao, Editor. 2014, U.S. Food and Drug Administration FDA news release.
41. Topp, M.S., et al., *Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL*. Blood, 2012. **120**(26): p. 5185-7.
42. Langen U., S.R., Steppuhn H., *Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt 2013, 2013. **56**: p. 8.
43. Schmitz R, T.M., Ellert U., Kalcklösch M., Schlaud M., KiGGS Study Group, *Verbreitung häufiger Allergien bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt 2014, 2014. **57**: p. 7.
44. Beck, L.A., et al., *Omalizumab-induced reductions in mast cell FcεR1 expression and function*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(3): p. 527-30.
45. Adelroth, E., et al., *Recombinant humanized mAb-E25, an anti-IgE mAb, in birch pollen-induced seasonal allergic rhinitis*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(2): p. 253-9.
46. Busse, W., et al., *Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(2): p. 184-90.
47. Soler, M., *Omalizumab, a monoclonal antibody against IgE for the treatment of allergic diseases*. Int J Clin Pract, 2001. **55**(7): p. 480-3.
48. Boyer, C., et al., *T cell receptor/CD3 complex internalization following activation of a cytolytic T cell clone: evidence for a protein kinase C-independent staurosporine-sensitive step*. European journal of immunology, 1991. **21**(7): p. 1623-34.
49. Telerman, A., et al., *Internalization of human T lymphocyte receptors*. European journal of immunology, 1987. **17**(7): p. 991-7.
50. Wurm, F.M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. Nature biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1393-8.
51. Hacker, D.L., M. De Jesus, and F.M. Wurm, *25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here?* Biotechnology advances, 2009. **27**(6): p. 1023-7.

52. Gines, S., et al., *Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 2): p. 203-9.
53. Oi, V.T., et al., *Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983. **80**(3): p. 825-9.
54. Kirak, O., *Eliminierung IgE-positiver B-Lymphozyten mit Hilfe eines rekombinanten bispezifischen Anti-IgE-, Anti-CD3-Antikörpers*. 2010. p. 110.
55. Bullock, W.O., Fernandez, J. M., & Short, J. M. , *XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection*. Biotechniques, 1987. **5**(4): p. 3.
56. Carty, M.P., et al., *Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 533-42.
57. Pope, B. and H.M. Kent, *High Efficiency 5 Min Transformation of Escherichia Coli*. Nucleic Acids Research, 1996. **24**(3): p. 536-537.
58. Avery, O.T., C.M. Macleod, and M. McCarty, *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii*. J Exp Med, 1944. **79**(2): p. 137-58.
59. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
60. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
61. Herdegen, T., *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 3. 2013: Georg Thieme Verlag. 704.
62. Karlson, P., *Biochemie*. Vol. 12. 1984.
63. Gould, H.J. and B.J. Sutton, *IgE in allergy and asthma today*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(3): p. 205-17.
64. Ilio, A., T.A. Waldmann, and W. Strober, *Metabolic Study of Human IgE: Evidence for an Extravascular Catabolic Pathway*. The Journal of Immunology, 1978. **120**(5): p. 1696-1701.
65. Patterson, R., et al., *In vitro production of IgE by lymphocytes from a patient with hyperimmunoglobulinemia E, eosinophilia and increased lymphocytes carrying surface IgE*. Clin Exp Immunol, 1975. **20**(2): p. 265-72.
66. Lanzavecchia, A. and B. Parodi, *In vitro stimulation of IgE production at a single precursor level by human alloreactive T helper clones*. Clin Exp Immunol, 1984. **55**(1): p. 197-203.
67. Batista, F.D., et al., *The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2197-205.
68. Feichtner, S., et al., *Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5499-505.
69. Batista F.D., E.D.G., Tkach T. and Burrone O.R., *Characterization of the human immunoglobulin epsilon mRNAs and their polyadenylation sites*. Nucleic Acids Research, 1997. **23**(23): p. 6.

70. Flanagan J.G., R.T.H., *The sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non- allelic genes*. The EMBO Journal, 1982. **1**(5): p. 5.
71. Wu, P.C., et al., *The IgE gene in primates exhibits extraordinary evolutionary diversity*. Immunogenetics, 2012. **64**(4): p. 279-87.
72. Brightbill, H.D., et al., *Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 2218-29.
73. Chowdhury, P.S., et al., *Targeting the junction of C ν arepsilon μ X and varepsilon-mi μ is for the specific depletion of mIgE-expressing B cells*. Mol Immunol, 2012. **52**(3-4): p. 279-88.
74. Nishida Y., M.T., Hisajima H., Honjo T., *Cloning of human immunoglobulin epsilon chain genes: Evidence for multiple Cepsilon genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**: p. 4.
75. Seno M., K.T., Ono Y., Onda H., Sasada R., Igarashi K., Kikuchi M., Sugino Y., Nishida Y., Honjo T., *Molecular cloning and nucleotide sequence of human immunoglobulin epsilon chain cDNA*. Nucleic Acids Research, 1983. **11**(3): p. 7.
76. Karlin S., G.G., Foulser D.E., *DNA sequence comparisons of the human, mouse and rabbit Immunoglobulin Kappa gene*. Molecular Biology and Evolution, 1985. **2**: p. 17.
77. Oi V.T., M.S.L., Herzenberg L.A., Berg P., *Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983. **80**: p. 4.
78. Stadler, B.M., et al., *Potential role of anti-IgE antibodies in vivo*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989. **88**(1-2): p. 206-8.
79. Sidhu, S.S., et al., *Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions*. J Mol Biol, 2004. **338**(2): p. 299-310.
80. Steinberger, P., et al., *Generation and characterization of a recombinant human CCR5-specific antibody. A phage display approach for rabbit antibody humanization*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36073-8.
81. Ebert, E., et al., *Cross-species-specific bispecific binders*. 2008, Google Patents.
82. Jespers, L.S., et al., *Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(9): p. 899-903.
83. Peter Kufer, M.B., Patrick Baeuerle, Christian Itin, *Bispecific antibodies*. 2003, Micromet Gesellschaft für Biomedizinische Forschung mbH Germany.
84. Raum, T., et al., *Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: a novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens*. Cancer Immunol Immunother, 2001. **50**(3): p. 141-50.
85. Henikoff, S. and J.G. Henikoff, *Amino acid substitution matrices from protein blocks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10915-9.
86. Lu, G. and E.N. Moriyama, *Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite*. Brief Bioinform, 2004. **5**(4): p. 378-88.
87. Kabat, E.A. and T.T. Wu, *Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-*

- determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*, 1991. **147**(5): p. 1709-19.
88. Xu, J.L. and M.M. Davis, *Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities*. *Immunity*, 2000. **13**(1): p. 37-45.
89. Banga, A.K., *Stability of Therapeutic Peptides and Proteins, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*. 1995. 3 - 28.
90. Manning, M.C., K. Patel, and R.T. Borchardt, *Stability of protein pharmaceuticals*. *Pharm Res*, 1989. **6**(11): p. 903-18.
91. Schoneich C., H.M.J., Borchardt R.T., *Stability of Peptides and Proteins, in Controlled Drug Delivery - Challenges and Strategies*, K.Park, Editor. 1997, ACS Washington. p. 205-228.
92. Willmann, M., *STABILISIERUNG VON PHARMAZEUTISCHEN PROTEINLÖSUNGEN DURCH VAKUUMTROCKNUNG*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. 2003, Ludwig - Maximilians - Universität München: München.
93. Lutterbüse, R., *Die Zeta - Kette des T - Zell - Rezeptors*, in *Institute of Immunology*. 2001, LMU München: München.
94. Dreier, T., et al., *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**(6): p. 690-7.
95. Bluemel, C., et al., *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**(8): p. 1197-209.
96. Brischwein, K., et al., *MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors*. *Mol Immunol*, 2006. **43**(8): p. 1129-43.
97. d'Argouges, S., et al., *Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells*. *Leuk Res*, 2009. **33**(3): p. 465-73.
98. Lutterbüse, R., et al., *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**(28): p. 12605-10.
99. Coca, A.F. and R.A. Cooke, *On the Classification of the Phenomena of Hypersensitiveness*. *The Journal of Immunology*, 1923. **8**(3): p. 163-182.
100. Coca, A.F. and E.F. Grove, *Studies in Hypersensitiveness: XIII. A Study of the Atopic Reagents*. *The Journal of Immunology*, 1925. **10**(2): p. 445-464.
101. Passante, E., et al., *In vitro inhibition of rat basophilic leukaemia mast cell (RBL-2H3) degranulation by novel indane compounds*. *Inflamm Res*, 2008. **57 Suppl 1**: p. S15-6.
102. Passante, E., et al., *RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release*. *Inflamm Res*, 2009. **58**(9): p. 611-8.
103. Passante, E., et al., *Toll-like receptors and RBL-2H3 mast cells*. *Inflamm Res*, 2009. **58 Suppl 1**: p. 11-2.
104. Passante, E. and N. Frankish, *The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell*. *Inflamm Res*, 2009. **58**(11): p. 737-45.

105. Hulett, M.D., et al., *Fine structure analysis of interaction of FcepsilonRI with IgE*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13345-52.
106. Kinet, J.P., *The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 931-72.
107. Ladics, G.S., et al., *Assessment of three human FcepsilonRI-transfected RBL cell-lines for identifying IgE induced degranulation utilizing peanut-allergic patient sera and peanut protein extract*. Regul Toxicol Pharmacol, 2008. **51**(3): p. 288-94.
108. Johansson, S.E., et al., *Broadly impaired NK cell function in non-obese diabetic mice is partially restored by NK cell activation in vivo and by IL-12/IL-18 in vitro*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 1-11.
109. Kufer, P., *CROSS-SPECIES-SPECIFIC PSMAxCD3 BISPECIFIC SINGLE CHAIN ANTIBODY*. 2011, Google Patents.
110. Arnold, D.L., et al., *Toxicological consequences of feeding PCB congeners to infant rhesus (Macaca mulatta) and cynomolgus (Macaca fascicularis) monkeys*. Food Chem Toxicol, 1999. **37**(2-3): p. 153-67.
111. Euler, A.R., et al., *Evaluation of two monkey species (Macaca mulatta and Macaca fascicularis) as possible models for human Helicobacter pylori disease*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(10): p. 2285-90.
112. Batista, F.D., D.G. Efremov, and O.R. Burrone, *Characterization and expression of alternatively spliced IgE heavy chain transcripts produced by peripheral blood lymphocytes*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 209-18.
113. Davis, F.M., L.A. Gossett, and T.W. Chang, *An Epitope on Membrane-Bound But Not Secreted IgE: Implications in Isotype-Specific Regulation*. Nat Biotech, 1991. **9**(1): p. 53-56.
114. Diaz-Sanchez, D., et al., *Differential regulation of alternative 3' splicing of epsilon messenger RNA variants*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 1930-41.
115. Haba, S., Z. Ovary, and A. Nisonoff, *Clearance of IgE from serum of normal and hybridoma-bearing mice*. J Immunol, 1985. **134**(5): p. 3291-7.
116. Hellman, L., *Characterization of four novel epsilon chain mRNA and a comparative analysis of genes for immunoglobulin E in rodents and man*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 159-67.
117. Hirano, T., C. Hom, and Z. Ovary, *Half-life of murine IgE antibodies in the mouse*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1983. **71**(2): p. 182-4.
118. Ishida N., U.S., Hayashida H., Miyata T., Honjo T., *The nucleotide sequence of the mouse immunoglobulin epsilon gene, comparison with the human epsilon gene sequence*. The EMBO Journal, 1982. **1**(9): p. 6.
119. Katona, I.M., et al., *Induction of an IgE response in mice by Nippostrongylus brasiliensis: characterization of lymphoid cells with intracytoplasmic or surface IgE*. J Immunol, 1983. **130**(1): p. 350-6.
120. Saxon, A., et al., *Alternative RNA of epsilon transcripts produces mRNAs encoding two membrane and four secreted IgE isoforms*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **107**(1-3): p. 45-7.
121. Zhang, K., A. Saxon, and E.E. Max, *Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 233-43.
122. Chen, J.B., et al., *Unique epitopes on C epsilon mX in IgE-B cell receptors are potentially applicable for targeting IgE-committed B cells*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1748-56.

123. Poggianella M., B.M., Burrone O.R., *The extracellular membrane proximal domain of human membrane IgE controls apoptotic signaling of the b-cell receptor in the mature b-cell line A20*. The Journal of Immunology, 2006. **177**: p. 8.
124. Sherr, E., et al., *Binding the low affinity Fc epsilon R on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 481-9.
125. Agency, E.M. *An overview of Blincyto and why it is authorised in the EU*. 2018; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003731/human_med_001921.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
126. Administration, U.S.F.a.D., *FDA approves Blincyto to treat a rare form of acute lymphoblastic leukemia, in First anti-CD19 drug to receive agency approval*, S. Yao, Editor. 2014, U.S Department of Health and Human Services.
127. Brown, S.L. and S.L. Morrison, *Regulation of the production of secretory and membrane immunoglobulin during lymphocyte development*. Clin Immunol Immunopathol, 1989. **50**(2): p. 155-70.
128. Xiong, H., M.A. Curotto de Lafaille, and J.J. Lafaille, *What is unique about the IgE response?* Adv Immunol, 2012. **116**: p. 113-41.
129. Wesemann, D.R., et al., *Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct Smu to Sepsilon recombination*. J Exp Med, 2011. **208**(13): p. 2733-46.
130. Yang, Z., M.J. Robinson, and C.D. Allen, *Regulatory constraints in the generation and differentiation of IgE-expressing B cells*. Curr Opin Immunol, 2014. **28C**: p. 64-70.
131. MacLennan, I.C., et al., *Extrafollicular antibody responses*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.
132. Shlomchik, M.J. and F. Weisel, *Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells*. Immunol Rev, 2012. **247**(1): p. 52-63.
133. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
134. Mandler, R., et al., *IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching*. J Immunol, 1993. **150**(2): p. 407-18.
135. Siebenkotten, G., et al., *The murine IgG1/IgE class switch program*. Eur J Immunol, 1992. **22**(7): p. 1827-34.
136. Yoshida, K., et al., *Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with Nippostrongylus brasiliensis: evidence for successive class switching from mu to epsilon via gamma 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7829-33.
137. Akdis, M. and C.A. Akdis, *IgE class switching and cellular memory*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 312-4.
138. Corne, J., et al., *The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects: efficacy, safety, and pharmacokinetics*. J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 879-87.
139. Chang, T.W., *The pharmacological basis of anti-IgE therapy*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 157-62.

140. Hanf, G., et al., *Omalizumab decreased IgE-release and induced changes in cellular immunity in patients with allergic asthma*. *Allergy*, 2006. **61**(9): p. 1141-4.
141. Djukanovic, R., et al., *Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(6): p. 583-93.
142. Zheng, Y., et al., *Conformations of IgE bound to its receptor Fc epsilon RI and in solution*. *Biochemistry*, 1991. **30**(38): p. 9125-32.
143. Beavil, A.J., et al., *Bent domain structure of recombinant human IgE-Fc in solution by X-ray and neutron scattering in conjunction with an automated curve fitting procedure*. *Biochemistry*, 1995. **34**(44): p. 14449-61.
144. Wan, T., et al., *The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 681-6.
145. Drinkwater, N., et al., *Human immunoglobulin E flexes between acutely bent and extended conformations*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014. **21**(4): p. 397-404.
146. Sutton, B.J., R.L. Beavil, and A.J. Beavil, *Inhibition of IgE-receptor interactions*. *Br Med Bull*, 2000. **56**(4): p. 1004-18.
147. Garman, S.C., et al., *Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilon RI alpha*. *Nature*, 2000. **406**(6793): p. 259-66.
148. Hook, W.A.B., E. Basciano, L.A. Fox, P.C. Siratanian, R.P., *Monoclonal antibodies to human IgE*. *Federation proceedings*, 1981. **40**.
149. Nissim A., S.S., Siraganian R., Eshhar Z., *Fine specificity of the IgER Interaction with the low and high affinity Fc receptor*. *The Journal of Immunology*, 1993. **150**: p. 9.
150. Presta, L., et al., *The binding site on human immunoglobulin E for its high affinity receptor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(42): p. 26368-73.
151. Mirkina, I., T. Schweighoffer, and F. Kricek, *Inhibition of human cord blood-derived mast cell responses by anti-Fc epsilon RI mAb 15/1 versus anti-IgE Omalizumab*. *Immunol Lett*, 2007. **109**(2): p. 120-8.
152. Shields, R.L., et al., *Inhibition of allergic reactions with antibodies to IgE*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **107**(1-3): p. 308-12.
153. Casale, T.B., et al., *Use of an anti-IgE humanized monoclonal antibody in ragweed-induced allergic rhinitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. **100**(1): p. 110-21.
154. MacGlashan, D., *Loss of receptors and IgE in vivo during treatment with anti-IgE antibody*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(6): p. 1472-4.
155. MacGlashan, D.W., Jr., et al., *Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody*. *J Immunol*, 1997. **158**(3): p. 1438-45.
156. Fahy, J.V., et al., *The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **155**(6): p. 1828-34.
157. Ong, Y.E., et al., *Anti-IgE (omalizumab) inhibits late-phase reactions and inflammatory cells after repeat skin allergen challenge*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(3): p. 558-64.
158. Vichyanond, P., *Omalizumab in allergic diseases, a recent review*. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2011. **29**(3): p. 209-19.

159. Zugmaier, G., et al., *Long-term follow-up of serum immunoglobulin levels in blinatumomab-treated patients with minimal residual disease-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. Blood Cancer J, 2014. **4**: p. 244.
160. Major, J.G., Jr., et al., *Structural features of the extracellular portion of membrane-anchoring peptides on membrane-bound immunoglobulins*. Mol Immunol, 1996. **33**(2): p. 179-87.
161. Peng C., D.F.M., Sun L.K., Liou R.S., Kim Y.-W., Chang T.W., *A new isoform of human membrane-bound IgE*. The Journal of Immunology, 1992. **148**(1): p. 7.
162. Geha, R.S., B. Helm, and H. Gould, *Inhibition of the Prausnitz-Kustner reaction by an immunoglobulin epsilon-chain fragment synthesized in E. coli*. Nature, 1985. **315**(6020): p. 577-8.
163. Tada, T., et al., *Half-lives of two types of rat homocytotropic antibodies in circulation and in the skin*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1975. **48**(1): p. 116-31.
164. Keown, M.B., et al., *Basis of the 1:1 stoichiometry of the high affinity receptor Fc epsilon RI-IgE complex*. Eur Biophys J, 1997. **25**(5-6): p. 471-6.
165. Maenaka, K., et al., *The human low affinity Fc gamma receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44898-904.
166. McDonnell, J.M., et al., *The structure of the IgE Cepsilon2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor Fc epsilon RIalpha*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(5): p. 437-41.
167. Ehrlich, P., *Beiträge zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung, in Medizin*. 1878, Universität Leipzig: Leipzig.
168. Hook, W.A.B., E.; Basciano, L.A; Fox, P.C; Siratanian, R.P, *Monoclonal antibodies to human IgE*. Federation proceedings, 1981. **40**(986).
169. Ames, S.A., C.D. Gleeson, and P. Kirkpatrick, *Omalizumab*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(3): p. 199-200.
170. Saavedra, M.C. and S. Sur, *Down regulation of the high-affinity IgE receptor associated with successful treatment of chronic idiopathic urticaria with omalizumab*. Clin Mol Allergy, 2011. **9**(1): p. 2.
171. EMEA, *Scientific Discussion - Xolair*. 2005. p. 34.
172. Matthias Klinger, T.R., Doris Rau, Susanne Mangold, Roman Kischel, Ralf Lutterbüse, Patrick Hoffmann, Peter Kufer *Cross-species-specific cd3-epsilon binding domain*. 2007, Micromet Gesellschaft für Biomedizinische Forschung mbH
173. Harding, F.A., et al., *The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions*. MAbs, 2010. **2**(3): p. 256-65.
174. Hwang, W.Y. and J. Foote, *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. **36**(1): p. 3-10.
175. Katzmann, J.A., et al., *Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains*. Clin Chem, 2002. **48**(9): p. 1437-44.
176. Feeney, A.J., G. Lugo, and G. Escuro, *Human cord blood kappa repertoire*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3761-8.

177. Zachau, H.G., *The human immunoglobulin K genes*. 2nd edition ed. Immunoglobulin genes, ed. A.F. Honjo T. 1995, New York: Academic press. 18.

Danksagung

Über die Jahre der Anfertigung dieser Arbeit hinweg haben mich viele Personen begleitet und Unterstützung geleistet.

Meine Kollegen und Vorgesetzten von AMGEN Research Munich GmbH hatten immer ein offenes Ohr für meine Anliegen und konnten mir stets fachliche, wissenschaftliche und mentale Unterstützung geben.

Meine Familie und Freunde waren eine konstante, tatkräftige Unterstützung und haben großen Anteil am Abschluss dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt Herrn Prof. Riethmüller, seinem Wissensdurst und seiner besonderen Gabe Menschen zusammenzuführen, ein besonderer Dank.

Herzlichen Dank

Franziska Vogel