

**Identifizierung von Zielmolekülen und Herstellung zweigeteilter
trivalenter T-Zell-aktivierender Antikörperderivate
zur immuntherapeutischen Behandlung von Multiplen Myelom**

Target identification and generation of trivalent T-cell activating antibody
derivatives for multiple myeloma immunotherapy



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Maria Geis
aus Schweinfurt

Würzburg, 2019



Eingereicht am: 11.06.2019

bei der Fakultät für Biologie

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Markus Sauer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gernot Stuhler (Med. Fakultät)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar (Biol. Fakultät)

Tag des Promotionskolloquiums: 11.09.2019

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Dr. Bumm
und
Herrn Prof. Dr. Stuhler

in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik
und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg
angefertigt.

Danksagung

Ich möchte den folgenden Personen meinen aufrichtigen Dank aussprechen:

Meinen beiden Betreuern Dr. Thomas Bumm und Prof. Dr. Gernot Stuhler, die mir die Möglichkeit gegeben haben in ihrer Arbeitsgruppe, an einem ganz besonderen Projekt, meine Dissertation zu verwirklichen. Sie haben mir freie Hand bei der Planung, Durchführung und Verwirklichung gelassen. In keiner anderen Arbeitsgruppe konnte ich so vielfältige Methoden durchführen und mich so weiterentwickeln.

Prof. Dr. Thomas Dandekar, Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, für die Bereitschaft diese Arbeit für die biologische Fakultät zu begutachten und zu prüfen.

Prof. Dr. Volker Kunzmann, Abteilung der internistischen Onkologie des Universitätsklinikums und Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald Vorstand des pathologischen Instituts in Würzburg für die Zusammenarbeit an durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Analysen von primären Multiplen Myelom Patientenproben.

Dr. Boris Nowotny. Die einzige feste Konstante der AG Bumm/Stuhler meiner Dissertationszeit. Du hast mich nicht nur den ganzen langen Weg durch meine Dissertation begleitet, sondern warst mir immer ein Berater, Lehrer, größter Kritiker und ein Freund. Du hast mich ermuntert aufsässig zu sein und oft den Samen gesät den ich brauchte, um meine Arbeit zu hinterfragen und besser zu werden.

Dr. Tim Schnyder, der ein Vorbild an Humor und Gelassenheit ist. Du hast mir nicht nur mit Gesprächen über „Trash-TV“ den Tag versüßt, sondern auch mit deinem messerscharfen Verstand oft den Nagel auf den Kopf getroffen und mir viele schnelle hilfreiche Tipps gegeben.

Dr. Daniele Brännert für ihre vielfältigen Talente und ihren unerschütterlichen Einsatz. Du hattest immer ein offenes Ohr, viele Ratschläge und warst stets die Erste die springt wenn man etwas braucht.

Unseren MTAs: Isabell Störmer dem Ordnungsamt der AG Bumm/Stuhler, Daniel Oppelt mein Mausbegleiter, Dana Wegmann meinem Déjà-vu aus den besten Arbeitsgruppen in Würzburg und Keali Röhm der Lektorin sämtlicher englischer Texte.

Unserer wissenschaftlichen Angestellten und Mädchen für alles Annika Grimmer.

Meinen Doktorandenkollegen Marc-Dominic Bohn, Hannes Gotthardt und Dina Kouhestani für das Teilen der gleichen Lebenslage, einem Büro und den lockeren Gesprächen, mit und ohne wissenschaftlichen Inhalt, neben der PC-Arbeit.

An alle weiteren unzähligen Mitglieder der AG Bumm/Stuhler und der Nachbararbeitsgruppen von 2014-2019 für eure Hilfe, Freundschaft und lustige Arbeits- und Mittagspausenatmosphäre. Ein ganz besonders Danke hierbei an die Menschen der ersten

Stunden, als wir uns noch zu siebt ein halbes Labor teilten. Arbeitstechnisch oft Punkt vieler Kabbeleien, aber menschlich die schönste Zeit meiner Dissertation.

Und schließlich nicht nur meine Dankbarkeit, sondern auch meine Liebe und Respekt an meine Eltern Heribert und Karin Geis, sowie meiner Schwester Sabine Geis, dass sie mich gelehrt haben immer neugierig zu sein und während meiner Dissertation ermunterten durchzuhalten.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	1
1.1	Zusammenfassung.....	2
1.2	Summary.....	3
2	Einleitung	4
2.1	Multiples Myelom	5
2.2	Standardtherapien Multiples Myelom	5
2.3	Immuntherapien	6
2.4	MM Tumorantigene	6
2.4.1	CD138.....	7
2.4.2	CD38.....	8
2.4.3	BCMA.....	9
2.4.4	SLAMF7	9
2.4.5	CXCR4.....	10
2.4.6	CD70.....	10
2.4.7	CD229.....	11
2.4.8	CD28.....	11
2.5	Monoklonale Antikörper für MM.....	12
2.6	Bispezifische Antikörperformate	14
2.6.1	BiTE Antikörper	15
2.6.2	CAR T-Zellen	16
2.7	Hemibodies	17
2.8	Zielsetzung.....	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	22
3.1.1	Eukaryotische Zellen	22
3.1.1.1	Multiple Myelom Zellen.....	22
3.1.1.2	CHO Zellen	23
3.1.1.3	T-Zellen/PBMCs.....	23
3.1.2	Prokaryotische Zellen.....	23
3.1.3	Antikörpersequenzen	24
3.1.4	Oligonukleotide	24
3.1.4.1	Primer für cDNA Analysen.....	25
3.1.4.2	Primer für Klonierungen von Antikörpersequenzen in pColdIV	25
3.1.4.3	Primer für Sequenzierungen.....	26
3.1.5	Vektor pColdIV	26
3.1.6	Vektor pRSF-DUET	26
3.1.7	Antikörper.....	26
3.1.8	Geräte und Software	28
3.1.9	Chemikalien und Reagenzien.....	28
3.1.9.1	Molekularbiologische Methoden	28
3.1.9.2	Proteinbiochemische Analysen	29
3.1.9.3	Durchflusszytometrie.....	30
3.1.9.4	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinater Proteine	30
3.1.9.5	Zellbiologische Methoden.....	30

3.1.9.6 Funktionelle Assays	30
3.1.9.7 Kits.....	31
3.1.10 Lösungen, Puffer und Medien	31
3.1.10.1 Molekularbiologische Methoden.....	31
3.1.10.2 Proteinbiochemische Analysen	31
3.1.10.3 Durchflusszytometrie und ELISA	32
3.1.10.4 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	32
3.1.10.5 Funktionelle Assays.....	33
3.2 Methoden	34
3.2.1 Zellkultur	34
3.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	34
3.2.1.2 Kultivierung von Tumorzelllinien	34
3.2.1.3 Bestimmungen der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	34
3.2.1.4 Aufarbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	34
3.2.2 Genexpressionsanalysen auf cDNA Ebene.....	35
3.2.2.1 cDNA Expressionsanalyse relevanter Zielmoleküle für das MM	35
3.2.2.2 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	35
3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	35
3.2.2.4 Qualitätskontrolle der RNA.....	36
3.2.2.5 Reverse Transkription/cDNA-Synthese aus mRNA	36
3.2.2.6 Polymerasekettenreaktion	36
3.2.3 Proteinexpressionsarray von Tumorantigenen auf gesundem Gewebe	37
3.2.4 Durchflusszytometrie.....	37
3.2.4.1 Zielantigenexpression auf Tumorzellen	37
3.2.4.2 Hemibody-Bindung an Tumorzellen	38
3.2.4.3 Tumormodeling mittels viSNE	38
3.2.5 Immunhistochemische Analysen	39
3.2.6 Klonierung und Transformation rekombinanter Antikörperkonstrukte	39
3.2.6.1 Klonierungsstrategie von Hemibodies	39
3.2.6.2 Amplifikation der Hemibody-Fragmente.....	40
3.2.6.3 DNA-Gelextraktion	40
3.2.6.4 Restriktionsverdau	41
3.2.6.5 Dephosphorylierung des Vektors.....	41
3.2.6.6 Ligation	41
3.2.6.7 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	41
3.2.6.8 Transformation von <i>OneShot Mach1 T1 E.coli</i>	42
3.2.6.9 Transformation von <i>Shuffle T7 Express E.coli</i>	42
3.2.6.10 Selektion positiver Klone durch PCR	42
3.2.6.11 Plasmid DNA-Isolation.....	43
3.2.6.12 Sequenzierung	43
3.2.6.13 Kryokonservierung prokaryotischer Zellen	43
3.2.7 Prokaryotische Expression rekombinanter Antikörper	43
3.2.8 Zellaufschluss mittels Überdruck.....	44
3.2.9 Proteinisolierung mittels Extractor Puffer.....	44
3.2.10 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)	44
3.2.10.1 IMAC mittels Co-Agarose Beads	45
3.2.10.2 IMAC über das Äkta Start Chromatographie System	45
3.2.11 Umpufferung des aufgereinigten Proteins	45

3.2.12	Entsalzen und Pufferaustausch	46
3.2.13	Ionenaustauschchromatographie	46
3.2.14	Gelchromatographie/Größenausschluss Chromatographie	47
3.2.15	Biochemische Charakterisierungen der Hemibodies	47
3.2.15.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.2.15.2	Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen.....	48
3.2.15.3	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D)	48
3.2.15.4	Schmelzpunktbestimmung (ThermoFluor Assay).....	49
3.2.15.5	EC ₅₀ Wert-Bestimmungen.....	50
3.2.16	Funktionelle Assays	50
3.2.16.1	Hemibody-vermittelte Bindung zwischen T- und Tumorzellen.....	50
3.2.16.2	IL-2/IFN- γ ELISA	50
3.2.16.3	Luziferase Viabilitäts-Assay	51
3.2.17	<i>In vivo</i> Mausmodell.....	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Antigenidentifizierung für eine Tumor-spezifische Immuntherapie	54
4.1.1	Identifizierung relevanter MM Antigene	55
4.1.2	cDNA Nachweis ausgewählter Antigene	57
4.1.3	Proteinexpression ausgewählter Antigene auf normalem Gewebe	58
4.1.4	Proteinexpression auf MM Zelllinien und PBMCs/T-Zellen	59
4.1.5	viSNE Darstellung primärer Knochenmarkszellen zur Visualisierung geeigneter MM Zielproteine	61
4.1.6	Antigenexpressionsanalyse neuer potentieller MM Zielmoleküle auf MM Primärmaterial und gesundem Gewebe	63
4.1.7	Geeigneter Antigenkombinationen für eine Hemibody-basierte MM Therapie	64
4.2	Design und Herstellung von Hemibodies.....	66
4.2.1	Design rekombinanter Hemibodies mit geteilter α CD3(VH/VL)-Domäne	66
4.2.2	Antikörper Produktion.....	67
4.3	Screening möglicher Hemibody-Kombinationen	70
4.3.1	Bindungsstudien der Hemibodies und BiTE Antikörper an MM Zellen	70
4.3.2	Funktionalitätsstudien von Hemibody-Kombinationen auf MM Zellen	73
4.4	Funktionalität von Hemibodies auf Effektorzellen	77
4.4.1	Antigenexpression auf T-Zellen.....	77
4.4.2	Hemibody-induzierten T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit der Tumorzelle	79
4.5	Biochemische Charakterisierung von Hemibodies.....	81
4.5.1	Aggregationsstatus und Reinheit von Hemibodies	81
4.5.2	Schmelzpunktbestimmungen von Hemibodies	84
4.5.3	Bestimmungen der Dissoziationskonstanten von Hemibodies.....	86
4.6	Funktionalität potentieller Hemibody-Kombinationen auf Tumorzellen.....	88
4.6.1	Antikörper-vermittelte Rekrutierung von T-Zellen an Tumorzellen	88
4.6.2	Antikörper-induzierte T-Zell-Aktivierung und Tumorzelllyse	90
4.6.3	Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration (EC ₅₀) der Hemibody-induzierten Tumorzelllyse auf Antigen-doppelt positiven CHO Zellen.....	92
4.6.4	Kombinatorische Spezifität von Hemibodies auf Antigen-einfach-positiven CHO Zellen.....	94
4.7	<i>In vivo</i> Komplementierung und Effektivität von Hemibodies.....	96
5	Diskussion	98
5.1	Neue Immuntherapien für eine spezifischere Tumorbehandlung	99

5.1.1	Antigenidentifizierung für eine spezifische MM Therapie	100
5.1.2	Neue Antigene auf MM Zellen – LAX1 und CHR5	100
5.2	Hemibody Produktion	101
5.2.1	Unterschiedliche Produzierbarkeit der einzelnen Hemibody-Konstrukte	102
5.2.2	Aggregationen und Verunreinigungen produzierter Hemibody-Fragmente	103
5.3	Biochemische Eigenschaften von Hemibodies	104
5.4	Funktionalitätsstudien von Hemibodies	106
5.4.1	Hemibodies binden auf humanen MM Zellen an ihr spezifisches Antigen.....	106
5.4.2	Hemibody-Komplementierung zu einem T-Zell-aktivierenden Komplex	107
5.4.3	<i>Off-Tumor</i> Toxizität von Hemibodies und BiTEs auf T-Zellen	108
5.5	Potentielle Hemibody-Kombinationen für eine MM Behandlung	109
5.6	Ausblick – Weiterentwicklung Hemibodies	110
6	Verzeichnisse	112
6.1	Abkürzungsverzeichnis	113
6.2	Literaturverzeichnis	115
7	Anhang.....	127
7.1	Experimentelle Date	128
7.2	Sequenzen	134
7.2.1	Antikörpersequenzen gegen Tumorantigene	134
7.2.2	α CD3 ϵ -Antikörpersequenz	135
7.2.3	Thioredoxin Tag	135
7.2.4	3C-Protease	135
7.2.5	Beispiel BiTE Antikörper – α CD38_V1	135
7.2.6	Beispiel Hemibody Sequenzen.....	136
7.2.6.1	α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv).....	136
7.2.6.2	α CD3(VL)- α CD38(scFv).....	136
7.3	Plasmide	137
7.3.1	pColdIV	137
7.3.2	pRSF-DUET	138

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

T-Zell-aktivierende Formate, wie BiTE (*bispecific T-cell engagers*) Antikörper und CAR T-Zellen haben in den vergangenen Jahren die Therapiemöglichkeiten für Tumorpatienten erweitert. Diese Therapeutika verknüpfen T-Zellen mit malignen Zellen über je ein spezifisches Oberflächenmolekül und initiieren, über eine T-Zell-vermittelte Immunantwort, die Lyse der Tumorzelle. Tumorspezifische Antigene sind jedoch selten. Häufig werden Proteine adressiert, die neben den Tumorzellen auch auf gesunden Zellen exprimiert werden. Die Folgen sind toxische Effekte abseits der Tumorzellen auf Antigen-positiven gesunden Zellen (*on-target/off-tumor*), welche nicht nur die Dosis des Therapeutikums und dessen Effektivität limitieren, sondern zu geringen bis letalen Begleiterscheinungen führen können. Der Bedarf an effektiven Therapieformen mit geringen Nebenwirkungen ist folglich immer noch sehr hoch. Diese Lücke soll durch ein neues Antikörperformat, sogenannten Hemibodies, geschlossen werden. Hemibodies sind eine neue Klasse von T-Zell-aktivierenden Antikörpern, die sich gegen eine Antigenkombination und nicht einzelne Antigene auf Tumorzellen richten. Sie bestehen aus zwei komplementären Molekülen mit je einer Antigen-bindenden Sequenz, die entweder mit der leichten (VL) oder der schweren (VH) Kette eines T-Zell-aktivierenden anti-CD3 Antikörpers fusioniert ist. Nur wenn beide Hemibody-Fragmente gleichzeitig in unmittelbarer Nähe an ihr jeweiliges Antigenepitop auf der Tumorzelle binden, komplementieren die beiden Antikörperkonstrukte über das geteilte anti-CD3 und bilden einen trivalenten T-Zell-aktivierenden Komplex aus. Diese funktionale Einheit rekrutiert T-Zellen zur Tumorzelle und induziert die T-Zell-vermittelte Lyse der malignen Zelle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden geeignete Antigenkombinationen identifiziert und die erste effektive und spezifische Hemibody-basierte Immuntherapie gegen das Multiple Myelom (MM), ohne Nebenwirkungen auf Antigen-einfach-positiven gesunden Zellen, entwickelt. Basierend auf einer umfangreichen Analyse von Kandidaten-Antigenen wurden Kombinationen aus bekannten MM Zielmolekülen, wie BCMA, CD38, CD138, CD229 und SLAMF7, und für das MM unbekannte Oberflächenmolekülen, wie CHR5 und LAX1, untersucht. Gegen die vielversprechendsten Antigene wurden Hemibodies entwickelt und produziert. Im Zusammenhang mit Analysen zur Produzierbarkeit sowie biochemischen und funktionalen Charakterisierungen, konnte aus 75 initialen Hemibody-Kombinationen drei Kombinationen mit geeigneten Eigenschaften identifiziert werden. Die Bindung von zwei Hemibody-Partnern auf der Oberfläche der MM Zelle führte zur Ausbildung eines trivalenten T-Zell-rekrutierenden Komplexes. Dieser initiierte nachfolgend über eine T-Zell-vermittelte Immunantwort die spezifische Lyse der malignen Zellen, ohne die Viabilität von Antigen-einfach-positiven gesunden Körper- oder Effektor-Zellen zu beeinflussen. Zusätzlich führte eine Hemibody-Therapie *in vivo* in einem NOD SCID MM-Mausmodell innerhalb von 7 Tagen zur kompletten Remission der MM Zellen. Diese Daten zeigten Hemibodies als ein neues, sehr

vielversprechendes Antikörperformat für eine effektive und tumorspezifische Immuntherapie mit potentiell geringen Nebenwirkungen.

1.2 Summary

T-cell activating therapies such as BiTEs (bispecific T-cell engagers) and CAR-T-cells have broadened the treatment options for cancer patients in the past years. These therapeutics induce a T-cell mediated immune response by linking T-cells with malignant cells by a specific target on the tumor cell. Tumor-specific antigens are rare and often antigens expressed on malignant and healthy tissues are addressed. Consequently, dosage and efficacy are limited by on-target/off-tumor toxicities, which can cause severe side effects. Efficient therapies with no side effects are still needed. To overcome these limitations and fill the gap of existing cancer immunotherapies, our novel strategy, coined hemibodies, targets an aberrant antigen signature uniquely expressed on tumor cells. Hemibodies are a new class of T-cell engaging antibodies consisting of two complementing molecules. Each hemibody molecule can bind one specific target on a tumor cell using a scFv fused to either the variable heavy (VH) or light (VL) chain domain of a T-cell activating anti-CD3 antibody. When both hemibodies simultaneously bind their specific target, the VL- and the VH-domain reconstitute and form a functional anti-CD3 domain, enabling T-cell recruitment for tumor cell lysis. This way, hemibodies form a trivalent protein complex only on tumor cells for safe cancer immunotherapy.

The following work presents target combinations and the first hemibody-based immunotherapy for a precise multiple myeloma (MM) treatment, without side effects, on target-single-positiv cells. Besides combinations of known and often reported MM targets like CD138, CD38, BCMA and SLAMF7, new targets including CHRM5 and LAX1 are described. Moreover, three hemibody combinations out of 75 promising target combinations were identified that displayed favorable production and purification data as well as biochemical and functional characteristics. We demonstrated that hemibodies are able to recognize and bind MM cells on their specific targets and form a functional trivalent T-cell activating complex for tumor cell lysis. In contrast to BiTE antibodies, hemibody-fragments alone and in combination had no/low effects on the viability of target-single positive cells or on T-cells in the absence of tumor cells. Only in the presence of MM cells, hemibodies recruit T-cells to the tumor site and induce tumor specific lysis. In addition, human T-lymphocytes rejected MM cells after treatment with a hemibody combination for seven days in a murine NOD SCID model. In aggregate, the data reported here identified hemibodies as a promising therapeutic protein format for effective and safe cancer immunotherapy.

2 Einleitung

2.1 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine unkontrollierte Proliferation der Antikörper-produzierenden B-Zellen, den Plasmazellen. Die entarteten Plasmazellen breiten sich im Knochenmark aus und produzieren unkontrolliert Antikörper oder Antikörperbruchteile, die im Blut oder dem Urin angereichert zu Organdysfunktionen führen [1]. Die malignen Plasmazellen stammen von einem Zellklon ab und produzieren folglich identische Antikörper. Vorläufer für das MM ist die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), gefolgt von dem schwelenden Multiplen Myelom als Übergangsstufe [1]. Das MM gehört zu einem der häufigsten Tumore der Knochen und des Knochenmarks. Weltweit macht es etwa 1 % aller Krebserkrankungen und 10-15 % aller hämatologischen Neoplasien aus [2]. Laut Robert-Koch Institut ist das MM, nach der Leukämie und dem Non-Hodgkin Lymphom, die dritthäufigste maligne hämatologische Erkrankung in Deutschland [3]. Das Risiko für eine MM Erkrankung steigt mit höherem Alter an und zeigt hier eine 5-Jahres-Überlebensrate von 47-49 % [3, 4]. Auch nach maximaler Therapie ist hier nicht mit einer dauerhaften Heilung zu rechnen [3].

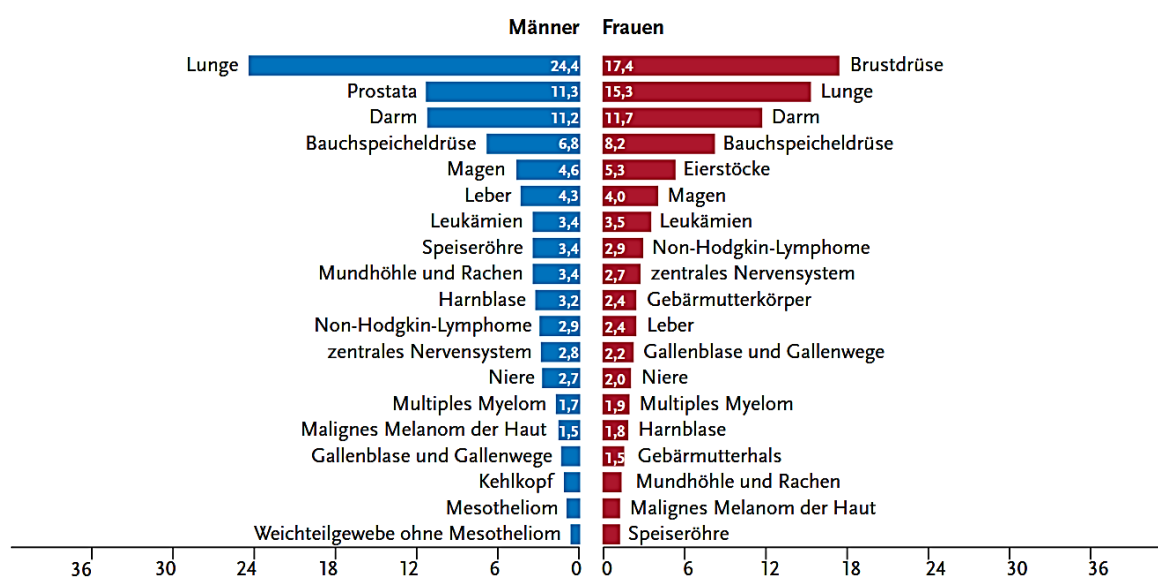


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Nach der Leukämie und dem Non-Hodgkin-Lymphom stellt das MM die dritthäufigste maligne hämatologische Erkrankung in Deutschland dar. Das MM betrifft laut Robert-Koch Institut 1,7 % aller männlichen und 1,9 % aller weiblichen deutschen Einwohner [3].

2.2 Standardtherapien Multiples Myelom

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden in der Behandlung von MM große Fortschritte erzielt. Diese begannen 1996 mit der Veröffentlichung einer randomisierten Studie, die den Einsatz von hohen Dosen des Zytostatikums Mephalan und autologer Stammzelltransplantation beschreibt [5]. Dieser Therapieansatz aus

Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Blutstammzelltransplantation gilt immer noch als Standardbehandlung für MM Patienten unter 70 Jahren und erzielt bei 20-60 % der Patienten eine Remission über mehrere Jahre. Hierbei werden durch eine hochdosierte Chemotherapie möglichst viele im Körper vorhandenen Tumorzellen zerstört [1]. Jedoch schädigt diese Therapie neben den Tumorzellen auch die Zellen des blutbildenden Systems im Knochenmark. Dem Patienten werden daher vor Therapiebeginn Stammzellen aus dem Blut entnommen, die nach dem Abschluss der Behandlung wieder in den Patienten transferiert werden können [1]. Auf diesen Behandlungsdurchbruch folgte der Einsatz immunmodulatorischer Substanzen wie Thalidomid [6], Lenalidomid [7] und Pomalidomid [8] und der Proteasominhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib [9]. Genannte Wirkstoffe sind, neben Steroiden, Histondeacetylase Inhibitoren und Antikörpern, bis heute Teil der Standardtherapie für das MM und werden häufig in Kombination mit Zytostatika eingesetzt [1, 10].

2.3 Immuntherapien

Klassische Behandlungsmethoden des MM, besonders jedoch hochdosierte Chemotherapien, haben erhebliche zytotoxische Nebenwirkungen [1]. Mit dem Versprechen von weniger Nebenwirkungen als existierende Tumorthérapien sind die Immuntherapien in den vergangenen Jahren in den Fokus vieler Forscher, Kliniken und pharmazeutischen Unternehmen gerückt. Eine Immuntherapie soll gezielt Tumorzellen über spezifische Oberflächenmoleküle erkennen und diese durch die Aktivierung des eigenen Immunsystems eliminieren, ohne anderen gesunden Körperzellen zu schaden [11]. Hierfür wird das Immunsystem durch verschiedenste Mechanismen wie Zytokine, Interferone, adoptiver Transfer von modifizierten T-Zellen, Vakzinen oder Antikörper angeregt [11, 12]. Entscheidend für den Erfolg solch einer Immuntherapie ist die Wahl des richtigen Zielmoleküls auf der Tumorzelle. Tumorzellen entstehen aus entarteten gesunden Körperzellen, die sich unkontrolliert und verstärkt teilen [13], und deren Tumorantigene folglich normalen Antigenen immer noch sehr ähnlich sind. Die meisten Tumorantigene unterscheiden sich von den normalen Antigenen häufig lediglich durch Mutationen (meistens Punktmutationen und Frameshift) auf Genebene und einer veränderten Genexpressionsstärke [14]. Ein essentieller Punkt bei der Entwicklung einer neuen Immuntherapie, um Nebenwirkungen zu verhindern, stellt daher die Identifizierung geeigneter Tumorantigene dar.

2.4 MM Tumorantigene

Tumorantigene werden häufig in zwei Kategorien eingeteilt: Den Tumor-spezifischen Antigenen (TSA), die nur auf Tumorzellen zu finden sind, und den Tumor-assoziierten Antigenen (TAA), die sowohl auf Tumorzellen als auch auf gesunden Körperzellen exprimiert

werden [15]. Auf Multiplen Myelomzellen wurden verschiedene TAA Antigene beschrieben. Bei diesen handelt es sich unter anderem um CD138, CD38, BCMA, SLAMF7, CD229, CXCR4, CD70 und CD28 (siehe Abbildung 2). Rekurrente TSA Antigene wurden bislang noch nicht auf der Oberfläche von MM Zellen entdeckt.

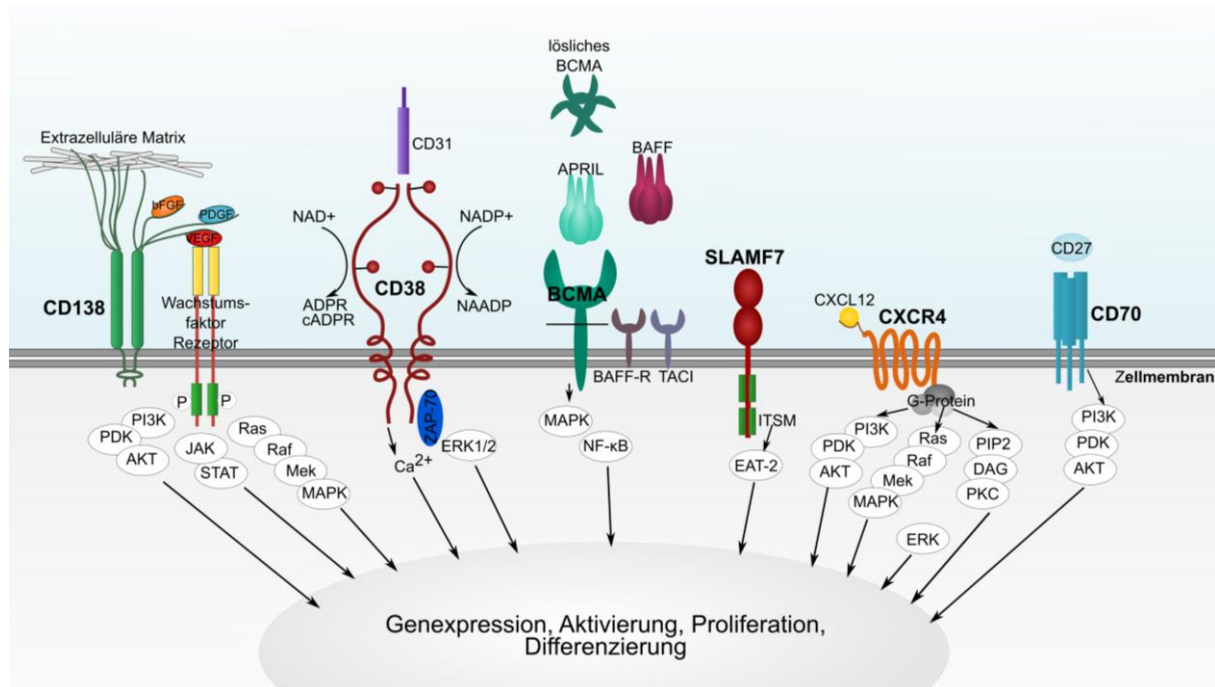


Abbildung 2: Funktionsweise von TAA auf MM Zellen. CD138, CD38, BCMA, SLAMF7, CXCR4 und CD70 werden auf MM Zellen überexprimiert. Diese Rezeptoren besitzen viele nachgeschaltete Signalkaskaden, die auf gesunden Zellen die Genexpression, Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zelle anregen. CD138 stabilisiert intrazellulär das Zytoskelett und agiert extrazellulär als ein Co-Rezeptor, der die Interaktion mit Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren verbessert. CD38-Dimere mobilisieren intrazelluläres Ca^{2+} und aktivieren über die CD31 Bindung ZAP-70 und ERK1/2. BCMA interagiert auf B-Zellen mit APRIL und BAFF zur MAPK und NF- κ B Stimulation. NK-Zellen nutzen zur Initiierung der Proliferation ein ITSM-vermitteltes Signal über SLAMF7 Bindung und EAT2 Aktivierung. CXCR4 wird durch die Bindung von CXCL12 aktiv. Ein nachgeschaltetes G-Protein initiiert vielfältige Signalkaskaden. Eine CD70/CD27 Interaktion startet den PI3K/AKT Signalweg. Diese Signalwege könnten auch in MM Zellen vermehrt aktiv sein und die verstärkte Proliferation sowie das Überleben der malignen Zelle sichern [16-22].

2.4.1 CD138

Syndecan-1 (SDC1, CD138) ist ein transmembranes (Typ I) Heparansulfat Proteoglykan mit einer Molekülgröße von etwa 30 kDa. Es gehört zur Familie der Syndecan Proteoglykane [23] und besitzt eine extrazelluläre Domäne von 232 AS, mit anhängenden Heparansulfat-Glykosaminoglykan-Ketten. Der kurze zytoplasmatische Teil stabilisiert über die Bindung mit Proteinen des Zytoskeletts die Morphologie der Zelle [24-26]. SDC1 wird auf epithelialen und mesenchymalen Zellen sowie in hoher Dichte auf unreifen B-Zellen und Plasmazellen exprimiert [27, 28]. Die SDC1 Expression wird auf Endothelzellen durch den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und auf Epithelzellen über den transformierenden Wachstumsfaktor- β 2 (TGF- β 2) während der Wundheilung hochreguliert [28, 29]. Die

Syndecane fungieren zudem als Co-Rezeptoren für einige Heparin-bindende Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF/FGF2), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), TGF- β und *platelet-derived growth factor* (PDGF) [30, 31]. Die Bindung wird dabei durch die Heparansulfat-Ketten begünstigt [32]. SDC1 wird auch auf einigen malignen Zellen wie MM Zellen exprimiert. Studien haben gezeigt, dass SDC1 in MM Zellen in mehrere zelluläre Prozesse wie Zellproliferation [33, 34], Adhäsion und Angiogenese [35, 36] involviert ist. Hierbei spielt die Bindung von Wachstumsfaktoren und die nachfolgende Aktivierung der PI3K/AKT, Ras/MAPK, Integrin $\alpha\beta$ und Wnt-Signalwege eine große Rolle [25, 37-39].

2.4.2 CD38

Ein weiteres Protein, das auf MM Zellen überexprimiert und in geringen Mengen auf lymphoiden und myeloischen Immunzellen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen sowie Erythrozyten detektiert werden kann, ist CD38 [40-44]. Dieses Antigen ist ein Typ II transmembranes Glykoprotein mit einer molekularen Größe von 78 kDa und vielfältigen Funktionen. Kristallstrukturen zeigen, dass das funktionale Molekül als Dimer vorliegt und so ein katalytisches Zentrum ausbildet [45]. Als Ektoenzym kann CD38 den pH-abhängigen Katabolismus extrazellulärer Nukleotide beeinflussen. Es katalysiert die Synthese von Nicotinsäureadeninindinukleotidphosphat (NAADP), zyklischem Adenosindiphosphatbose (cADPR) sowie ADPR aus Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺) [46]. Diese enzymatischen Produkte wirken auf den Ca²⁺ Spiegel innerhalb der Zelle ein. Eine CD38 Ligation führt zum Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺. Diese veränderten Ca²⁺ Konzentrationen spielen eine Schlüsselrolle in vielen physiologischen Prozessen wie Zellproliferation, Muskelkontraktion, Stammzellregeneration und Hormonausschüttung [47, 48]. Die Bindung von CD38 mit dessen Liganden CD31 führt intrazellulär zur Aktivierung einer Signalkaskade. Über die zytoplasmatische Tyrosin-Phosphorylierung, einer Serie nachgeschalteter Signale über ZAP-70 und dem Proto-Onkogen c-cbl [18], wird über den ERK1/2 Signalweg die Proliferation, Zelladhäsion und Differenzierung der Zelle initiiert [49-51]. Die CD38-CD31 Interaktion ist zudem entscheidend für die Migration von Leukozyten durch das Endothel [52]. Auch auf malignen Zellen wurde CD38 beschrieben. In chronisch lymphatischen Leukämiezellen konnte ein supramolekularer Komplex bestehend aus reorganisierten Zelloberflächen-Rezeptoren wie dimerisiertem CD38, CD31, B-Zell-Rezeptor Bestandteilen, Tetraspaninen und Chemokinrezeptoren (CXCR4) nachgewiesen werden. Dieser Komplex ist intrazellulär mit verschiedenen Kinasen und Adaptermolekülen verschaltet, die das Überleben der Zelle, Zellproliferation und Migration sichern [18, 53].

2.4.3 BCMA

B-cell maturation antigen (BCMA, TNFRSF17) ist ein 22-26 kDa Typ III Transmembranrezeptor und Teil der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Dieser Rezeptor wird hauptsächlich auf reifen B-Zellen und Plasmazellen des Knochenmarks exprimiert [54, 55]. Auf naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen wird BCMA dagegen nicht nachgewiesen. BCMA besitzt große Ähnlichkeit zu den Rezeptoren BAFF (*B-cell activation factor*) und TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*). BCMA weist keine intrazellulär nachgeschaltete Signalpeptide auf. Jedoch stimuliert BCMA über die Bindung an BAFF und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) die Aktivierung von NF- κ B und MAPK8/JNK Signalwegen. BCMA und APRIL werden als membrangebundene Proteine exprimiert, können jedoch über Furin-Proteasen von der Membran abgespalten werden und bilden als lösliche Zytokine Trimere [56]. Über die Anlagerung an verschiedene Moleküle der TNF-Rezeptor Superfamilie fördert BCMA das Überleben von B-Zellen, Plasmazellen und Plasmablasten [54, 55, 57]. Genaue molekulare Mechanismen sind bislang noch ungeklärt. Über BCMA werden stimulatorische Signale zur erhöhten Expression von Oberflächenmolekülen und zur Antigenpräsentation von B-Zellen, vermittelt [58]. Die Rolle von BCMA und dessen Rezeptorsystem in der Reifung und dem Überleben von B- und Plasmazellen legt die Vermutung nahe, dass BCMA auch eine entscheidende Rolle in der Homöostase von B-Zell Malignomen zukommt. BCMA RNA wurde bislang bereits in MM Zellen und auch als Protein auf der Oberfläche von Plasmazellen von MM Patienten nachgewiesen [59-61]. Zudem steht eine dauerhaft aktive APRIL/BCMA Signalkaskade im Zusammenhang mit einer erhöhten Anzahl an hyperaktiven malignen Plasmazellen [56].

2.4.4 SLAMF7

Ein bekanntes Glykoprotein der SLAM-Familie auf NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und reifen dendritischen Zellen ist das *Signaling lymphocytic activation molecule F7* (SLAMF7, CS1, CRCC, CD319) [62]. Humane NK-Zellen exprimieren zwei Spleißvarianten des SLAMF7 Rezeptors: CS1-*short* (CS1-S, 55 kDa), dem die intrazelluläre Domäne zur Aktivierung fehlt, und CS1-*long* (CS1-L, 145 kDa), der ein zytoplasmatisches Ende mit ITSMs (*immunoreceptor tyrosine-based switch motifs*) zur Aktivierung der Zelle trägt [63]. Bei einer extrazellulären Interaktion des CS1-L Rezeptors mit Liganden werden die Tyrosine der intrazellulären ITSMs phosphoryliert. Sie binden an Adapter der SLAM-assoziierten Proteinfamilie (SAP) wie EAT-2 (*Ewing's sarcoma-associated transcript 2*). In Anwesenheit von EAT-2 fungiert SLAMF7 als aktivierender und in dessen Abwesenheit als inhibitorischer Rezeptor. Durch diese Signalkaskade wird die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gesteuert [63-65]. Auf B-Zellen wird nur die CS1-L Version exprimiert. Diese induziert die Proliferation und autokrine Sezernierung von Zytokinen wie IL-14 [66]. T-Zellen exprimieren zwar CS1,

jedoch fehlt ihnen das Adapterprotein EAT-2. Hier fungiert CS1 als inhibitorischer Rezeptor [67]. CS1 wird in hochregulierter Form auch auf MM Zellen gefunden [68]. Der Mechanismus für diese Hochregulation als auch die eigentliche Funktion von SLAMF7 auf MM Zellen ist unbekannt. Für die Überexpression wird eine positive Transkriptionsregulation über die Proteine Blimp-1 und PRDM1 vermutet [67, 69]. Als Funktion wird eine Beteiligung bei der Zell-Zell-Adhäsion untersucht [70]. In MM-Patienten existiert das SLAMF7 Protein, neben der membrangebundenen Version, auch in geringen Mengen frei zirkulierend im Serum [70].

2.4.5 CXCR4

Der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) ist ein 40 kDa großes Transmembranprotein aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [71] [72]. Er weist eine heptahelikale Struktur mit sieben membrandurchspannenden helikalen Domänen auf. CXCR4 wird nach der zweistufigen Bindung an dessen Liganden CXCL12 aktiviert [73, 74]. Nachfolgend wird die G_{α} -Untereinheit des CXCR4 Rezeptors durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) in Guanosin triphosphat (GTP) aktiviert. Sie dissoziiert vom Rezeptor, aktiviert die Phospholipase C (PLC) und führt zur Umwandlung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3). Darauf folgt die Freisetzung von Calcium mit Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Phosphorylierung mehrerer Zielproteine. Die $G_{\alpha i}$ und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des G-Proteins aktivieren die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI_3K), die den AKT Signalweg anschaltet. Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit induziert die Ras-Proteinkinase mit nachfolgendem ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) Signalweg [75]. Diese vielfältigen Kaskaden führen zu Aktionsmechanismen wie Veränderung der Genexpression, Aktinpolymerisation, Umlagerung des Zellskeletts, Zellmigration, Proliferation und Zellüberleben [75]. Während der embryonalen Entwicklung wird CXCR4 von mesenchymalen Vorläuferzellen exprimiert, um die Migration dieser Zellen vom Ursprungsort an ihr finales Ziel zu ermöglichen, an dem sie zu Organen und Gewebe ausdifferenzieren [76]. CXCR4 ist initial als einer der Co-Rezeptoren für das Andocken und Eindringen von HIV in menschliche Zellen bekannt [77], kann jedoch auch auf einigen malignen Zellen der Brust, Prostata, Lunge, Colon und Multiplen Myelom detektiert werden. In diesen Tumorzellen sichert CXCR4 das Zellüberleben, die Proliferation und spielt eine Rolle bei der Metastasierung [75].

2.4.6 CD70

CD70 ist ein Typ II Membranglykoprotein mit einer molekularen Größe von 59 kDa. Es gehört zu der Familie der TNF-Rezeptoren [78] und wird hauptsächlich auf T- und B-Zellen exprimiert. CD70 selbst induziert keine zytoplasmatische Signalkaskade, kann jedoch gebunden an CD27, dessen TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAFs) TRAF2 und TRAF5 im Zytoplasma

aktivieren. TRAF2 und TRAF5 werden bei einer Interaktion zwischen CD70 Trimeren und drei CD27 Homodimeren stimuliert und regen den NF κ B und c-Jun-Kinase Signalweg an [78, 79]. CD70 ist so an der Aktivierung von T- und B-Zellen beteiligt. Es unterstützt sowohl die T-Zell Proliferation, die Differenzierung in zytotoxische T-Zellen als auch die Ausbildung von Keimzentren in Lymphknoten [80]. Auf vielen Tumoren hämatologischen Ursprungs und einigen soliden Tumoren konnte die Expression von CD70 nachgewiesen werden [78]. 2005 wurde dieser Rezeptor erstmals auf Multiplen Myelom Zellen beschrieben [81].

2.4.7 CD229

CD229 (SLAMF3, *Lymphocyte antigen 9* (Ly9)) ist ein 100-120 kDa großes Typ I Membranglykoprotein [82]. Es besteht aus vier extrazellulären Ig (Immunglobulin)-Domänen, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne mit zwei Tyrosin-basierenden Aktivierungsmotiven (ITAMs) [83]. Es wurde erstmalig auf Mauszellen detektiert und wird auf Thymozyten, T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und NK-Zellen exprimiert [84]. Die genaue Funktion dieses Rezeptors ist bislang ungeklärt. Vermutet wird, dass CD229 als ein Teil der SLAM Superfamilie eine Rolle in der Aktivierung und Differenzierung verschiedener Immunzellen wie den T-Zellen spielt. Hierfür interagiert CD229 mit dem intrazellulärem Adapterprotein Grb2 [85]. Zudem ist CD229 an Antigen-vermittelte Adhäsionsreaktion zwischen T- und B-Zellen über homophile Interaktionen beteiligt [86]. Während der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen T- und B-Zellen konnte eine Relokalisation von CD229 detektiert werden [86]. CD229 ist auf Multiplen Myelom Zellen hochexprimiert [87].

2.4.8 CD28

CD28 ist ein stimulatorischer Membranrezeptor der Ig-Superfamilie von 44 kDa, der zur Co-Stimulation und Aktivierung von T-Zellen neben dem T-Zell-Rezeptor gebraucht wird [88]. Er wird hauptsächlich auf CD4+ und einem Teil der zirkulierenden CD8+ T-Zellen exprimiert. Die Kontrolle der T-Zell Antwort über ein co-stimulatorisches Signal verhindert eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene und stellt die gegen fremde Proteine sicher [88, 89]. Hierfür besitzen Antigen-präsentierende Zellen (APC) spezifische Rezeptoren, die den T-Zellen Informationen über das präsentierte Antigen vermitteln. Bei einem körperfremden Antigen werden die Rezeptoren CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), den Liganden von CD28, hochreguliert. T-Zellen, die auf solch eine APC treffen, werden über das MHC-präsentierte Antigen und eine CD80/CD86-CD28 Co-Stimulation aktiviert [88, 90]. Diese T-Zellen beginnen zu proliferieren und differenzieren aufgrund der Ausschüttung verschiedener Zytokine in T-Zell Subpopulationen [89]. Ohne eine zusätzliche Co-Stimulation können T-Zellen nur kurzzeitig aktiviert werden. Sie werden resistent gegen weitere Stimulationen oder gehen in Apoptose [91]. Eine Co-Stimulation dagegen alleine über CD28, ohne zusätzliche Bindung des

T-Zell-Rezeptor-Komplexes über MHC-Moleküle, bleibt in der Regel für die T-Zelle folgenlos (Ausnahme CD28 Superagonisten) [90, 92]. CD28 wird auf MM Zellen, aber auch auf Stromazellen in der MM Mikroumgebung, überexprimiert [93]. Auf MM Zellen aktiviert es den NF- κ B Signalweg und verhindert so die Zellapoptose [94]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine Bindung von CD28 an die Liganden CD80/CD86 auf Stromazellen ein Überlebenssignal an die Myelomzellen vermittelt und sie widerstandsfähiger gegenüber Chemotherapien werden [93, 95].

2.5 Monoklonale Antikörper für MM

Eine weitere, sehr vielversprechende Strategie, um gezielt Tumorzellen zu eliminieren, ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern. Diese Antikörper erkennen Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen und markieren diese zur Eliminierung durch komplementvermittelter Zytolyse (*complement dependent cytotoxicity*, CDC), Antikörper-vermittelter Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) oder Antikörper-vermittelter zelluläre Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) [96, 97]. Monoklonale Antikörper sind in manchen Therapien maligner Erkrankungen fest verankert [98]. Diese monoklonalen Antikörper besitzen meistens die symmetrische Grundstruktur eines IgG-Antikörpers (Immunglobulin-G Antikörper) von 146-160 kDa (Abbildung 3). Sie bestehend aus zwei identischen leichten und zwei schweren Ketten, die über kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede dieser Ketten ist aus homologen Sequenzen von etwa 110 Aminosäuren (Ig-Domänen) aufgebaut. Eine leichte Kette besteht aus einer variablen (VL) und einer konstanten Domäne (CL). Eine schwere Kette ist aufgebaut aus einer variablen (VH) und 3 konstanten Domänen (CH1-3). Die beiden variablen Ketten tragen die Antigenbindungsstelle und bilden, zusammen mit den beiden angeschlossenen konstanten Domänen, ein Fab (*antigen-binding fragment*)-Fragment. Die beiden nachfolgenden Ig-Domänen der schweren Kette bilden das Fc (*crystallisable fragment*)-Fragment [99].

Die ersten therapeutischen Antikörper waren meist murinen Ursprungs [100]. Diese murinen Antikörper wurden jedoch vom menschlichen Körper als fremde Proteine erkannt und induzierten Immunreaktionen. Hierbei wurden die murinen Antikörper durch neutralisierende Antikörper eliminiert (human anti-mouse antibody, HAMA). Eine Lösung für dieses Problem kam mit der rekombinanten DNA-Technologie durch die Entwicklung von chimären Antikörpern (humane konstante Domäne) und humanisierten Antikörpern (murine Antigen-erkennenden Domänen (CDRs, komplementaritätsbestimmende Regionen)) [101-103]. Diese zeigten deutlich weniger Immunreaktionen [104-108]. Mit dem Durchbruch der Phagen-Display Technology, oder unter Einsatz von rekombinanten Mäusen, konnten nachfolgend voll-humane Antikörper generiert werden [109-111].

Monoklonale Antikörper wie Avastin (Bevacizumab, anti-VEGF), Herceptin (Trastuzumab, anti-HER2-Rezeptor Antagonist) und Rituximab (anti-CD20) haben sich seit mehr als 15 Jahren in der Klinik bewährt. Gegen das MM existieren wenige monoklonale Antikörper mit FDA-Zulassung. Monoklonale Antikörper in der Entwicklung adressieren Antigene wie CD38, CD138, SLAMF7 oder die Checkpointinhibitoren PD-1 und CTLA-4. Diese Checkpointinhibitoren sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und dem Schutz des Gewebes vor ungewollter T-Zell Aktivität [112]. Sie werden daher vermehrt auf Tumorzellen exprimiert, um aktivierte Immunzellen über die Bindung mit dem Liganden zu inhibieren und einer Immunantwort zu entgehen [113]. Monoklonale Antikörper können diese Inhibition des Immunsystems der Tumorzelle durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren blockieren [114, 115]. MM Antigene sowie deren entsprechenden monoklonalen Antikörper, mit Wirkprinzip und die verschiedenen Phasen der präklinischen und klinischen Entwicklung, führt Tabelle 1 auf.

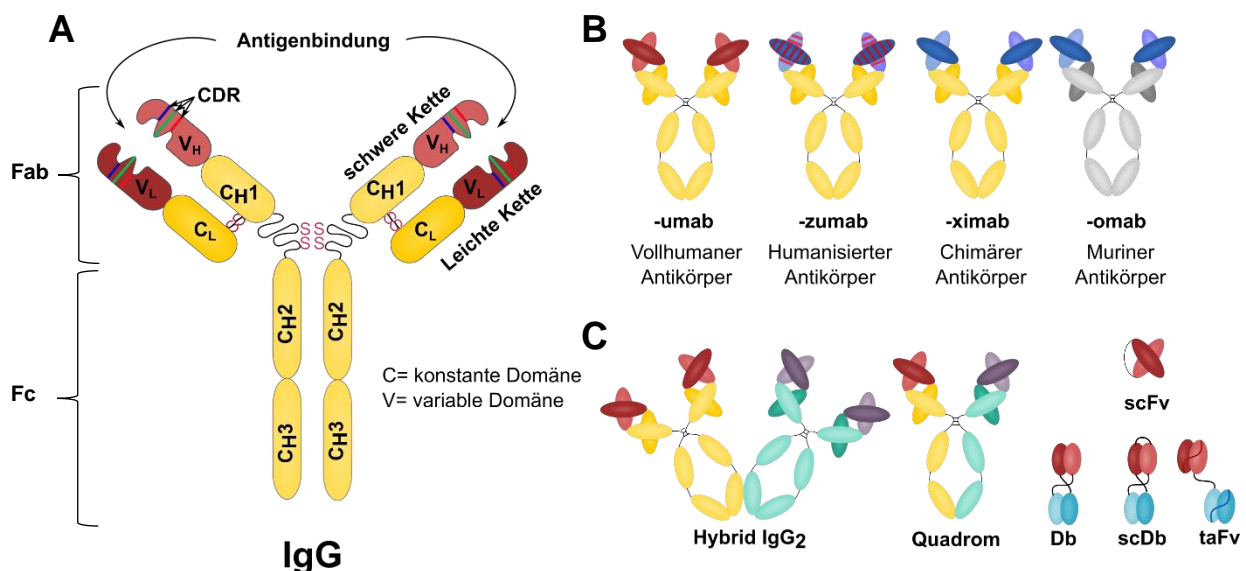


Abbildung 3: Schematische Struktur monoklonaler und bispezifischer Antikörper. Ein Antikörper besteht aus einer symmetrischen, Y-förmigen Grundstruktur aus zwei identischen schweren und leichten Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die schweren und leichten Ketten enthalten konstante (CL, CH) und variable (VL, VH) Domänen. Die Antigenbindung wird über die CDRs (*Complementarity-determining regions*) der benachbarten VH- und VL-Domäne bestimmt. Die konstanten Bereiche der schweren Kette bestimmen die Antikörperklasse (**A**). Monoklonale Antikörper werden je nach Anteil in murine (100 % murin), chimäre (25% murin), humanisierte (10 % murin) und humane (100 % human) Antikörper kategorisiert (**B**). Rekombinante Techniken führten zu neuen bispezifischen Formaten, beginnend mit der chemischen Verknüpfung zweier monoklonaler Antikörper (Hybrid IgG₂), über das Quadrom bis hin zu einem scFv (*single-chain variable fragment*) und daraus entstehenden Formaten (*diabody*, *single-chain diabody* (scDb) und *tandem-scFv* (taFv)) (**C**) [99, 116, 117].

Tabelle 1: Übersicht zugelassener oder sich in der Entwicklung befindliche monoklonale Antikörper gegen MM. Btz = Bortezomib; Dex = Dexamethason; Len = Lenalidomid; NK = natürliche Killerzellen; ADCC = Antikörper-vermittelte Zytotoxizität; ADCP = Antikörper-vermittelte zellulärer Phagozytose, CDC = komplementvermittelte Zytolyse

Antigen	Monoklonaler Antikörper	Typ	Mechanismen	Studien (ClinicalTrials.gov)	Zulassung U.S. FDA
CD38	Daratumumab	Human (IgG1)	ADCC, CDC, ADCP, Inhibierung der enzymatischen Rezeptoraktivität [118, 119] [120]	- Monotherapie (NCT00574288, NCT01985126) - + Btz + Dex (NCT02136134) - + Len + Dex (NCT02076009)	November 2015 für Patienten mit RRMM
	SAR650984 (Isatuximab)	Humanisiert	ADCC, CDC, Apoptose	- Monotherapie (NCT02514668)	-
	MorphoSysAG (MOR202)	Human (IgG1)	ADCC, ADCP	- Monotherapie (NCT01421186)	-
SLAMF7	Elotuzumab	Humanisiert	gesteigerte NK-Zell Aktivität, NK-Zell-vermittelte ADCC [121]	- Monotherapie keine Wirkung [122] - + Len + Dex (NCT000742560)	November 2015, + Len + Dex für Patienten mit RRMM [123]
CD138	BT062 Indatuximab ravtansine	Chimär	Maytansinoide DM4, wird freigesetzt und verursacht den Zelltod [124]	- Monotherapie in RRMM (NCT01001442) - + Len + Dax in Präklinik [124]	-
CD70	SGN-70	Humanisiert	ADCC, ADCP	- Monotherapie (NCT02216890)	-
CTLA4	Ipilimumab	Human (IgG1)	Blockiert CTLA4 und damit die Inhibierung des Immunsystems durch Tumorzellen	- Monotherapie keine Wirkung [125]	-
	Tremelimumab	Human (IgG1)	Blockiert CTLA4 und damit die Inhibierung des Immunsystems durch Tumorzellen	- Monotherapie (NCT02716805)	-
PD-1	Nivolumab	Human (IgG1)	Blockiert PD-1 und damit die Inhibierung des Immunsystems durch Tumorzellen	- Monotherapie (NCT03782064) - +Len (NCT03333746) - +Elo + Pom + Dex (NCT02612779)	-
	Pembrolizumab	Human (IgG1)	Blockiert PD-1 und damit die Inhibierung des Immunsystems durch Tumorzellen	- Monotherapie (NCT02603887)	-

2.6 Bispezifische Antikörperformate

In den vergangenen Jahren wurden neben den monoklonalen IgG-Antikörpern immer mehr Antikörper-basierte Therapieformen entwickelt, die Tumorzellen direkt mit Effektorzellen wie T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen oder dendritische Zellen oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten verknüpfen. Diese Antikörper besitzen hierfür zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen innerhalb eines Moleküls. Sie werden deshalb auch bispezifische Antikörper (BsAbs) genannt. BsAbs wurden das erste Mal in den 1960ern beschrieben und 1985 durch die chemische Verknüpfung zweier monoklonaler Antikörper über deren Fc-Teile (Hybrid-Antikörper) [126, 127], oder über die Fusion zweier Hybridomzelllinien

(Quadrom-Antikörper), entwickelt [128]. Entscheidende Antikörperstudien 1988 führten zu der Entdeckung, dass eine zytotoxische T-Lymphozyten-vermittelte Lyse der Zielzellen allein durch die F(ab)₂-Fragmente mit der Antigen-bindenden Domänen der variablen schweren (VH) und variablen leichten Kette (VL) möglich ist. Hier wurden die Fc-Anteile des Antikörpers entfernt und lediglich die VH- und VL-Ketten über Linker-Sequenzen von 15-20 AS, wie Glycin-Serin-Linker (G₄S)_n, verknüpft (scFv (*single chain variable fragment*), Abbildung 3) [129-131]. Diese Entdeckung führte zu der Entwicklung vielzähliger neuer bispezifischer Antikörperformate. Einige der ersten auf scFv-basierenden Antikörperformate wurden durch Veränderungen der Linker generiert und sind als *diabody* (Db), *single-chain diabody* (scDb) und tandem-scFv (taFv) bekannt [132] [133, 134]. Seither wurden über 60 verschiedene bispezifische Antikörperkonstrukte entworfen, von denen bereits 30 in klinischen Studien untersucht werden [135]. Von diesen Formaten wurden ein BsAbs, Blinatumomab (2014), aufgrund dessen therapeutischen Wirksamkeit, für die Behandlung von Tumorpatienten zugelassen [136, 137].

2.6.1 BiTE Antikörper

BiTE Antikörper sind aufgrund des Erfolgs von Blinatumomab eines der bekanntesten bispezifischen Antikörperformate. Dieses besteht aus den Antigen-erkennenden Fragmenten der variablen schweren und leichten Kette zweier klassischer IgG-Antikörper (Abbildung 4). Diese beiden sogenannten scFv werden über eine Polypeptidkette, in der Regel ein Glycin-Serin-Linker, miteinander in tandem verbunden [138]. Sie besitzen eine Molekülmasse von etwa 55 kDa. Eines der scFv ist gegen ein Oberflächenprotein auf den Tumorzellen gerichtet, während das andere scFv eine Selektivität gegen die CD3 ϵ Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (TCR) auf T-Zellen aufweist. Ein BiTE Antikörper rekrutiert so über dessen zwei scFv-Komponenten T-Zellen zur Tumorzelle [138]. Die T-Zelle wird danach aktiviert. Hierbei wird, mit der Überschreitung einer kritischen Anzahl an gebundenen BiTE Antikörpern, das TCR-gebundene CD3 ϵ -Protein vernetzt. Dies führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse und Aktivierung der T Zelle ohne die Beteiligung von co-stimulierenden Molekülen wie CD28. BiTE-induzierte Synapsen sind in Hinblick auf Größe, Zusammensetzung und Anordnung ihrer funktionellen Bereiche mit natürlichen zytolytischen Synapsen identisch [139-141]. T-Zellen sezernieren nachfolgend aktivierungstypische Zytokine wie IL-2 und IFN- γ , proliferieren und induzieren über das Ausschütten von Perforin und Granzym, die Lyse der Zielzelle [138, 142]. Die Erkennung und Zerstörung der malignen Zelle erfolgt hierbei unabhängig von MHC-Rezeptoren und der CD28 vermittelten Co-Stimulation [138, 143]. Somit können auch Tumorzellen lysiert werden, die aufgrund einer geringen MHC-Expression, dem Immunsystem bislang entgangen sind. Im Jahr 1995 veröffentlichte Mack et al. einen der ersten BiTE Antikörper mit einer Spezifität gegen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) [134]. Bis

heute wurde dieses veröffentliche Antikörperformat vor allem an der CD3-bindenden Domäne weiterentwickelt. Der bekannteste BiTE Antikörper, Blinatumomab, besitzt so eine α CD3- (Klon L2K-07) und eine α CD19-Sequenz [144]. CD19 wird nur auf Zellen der B-Zell-Reihe, mit Ausnahme von Plasmazellen, exprimiert und eignet sich daher ideal zur Behandlung der meisten malignen B-Zell Erkrankungen. Die klinische Wirksamkeit dieses Antikörpers konnte bereits in vielfältigen Studien an Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) [145, 146] und Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) [147] nachgewiesen werden. 2014 wurde Blinatumomab in der USA und 2015 in Europa für die Behandlung von ALL Patienten zugelassen. Dieser Erfolg der BiTE Antikörper hat den Weg geebnet für viele weitere Immuntherapien.

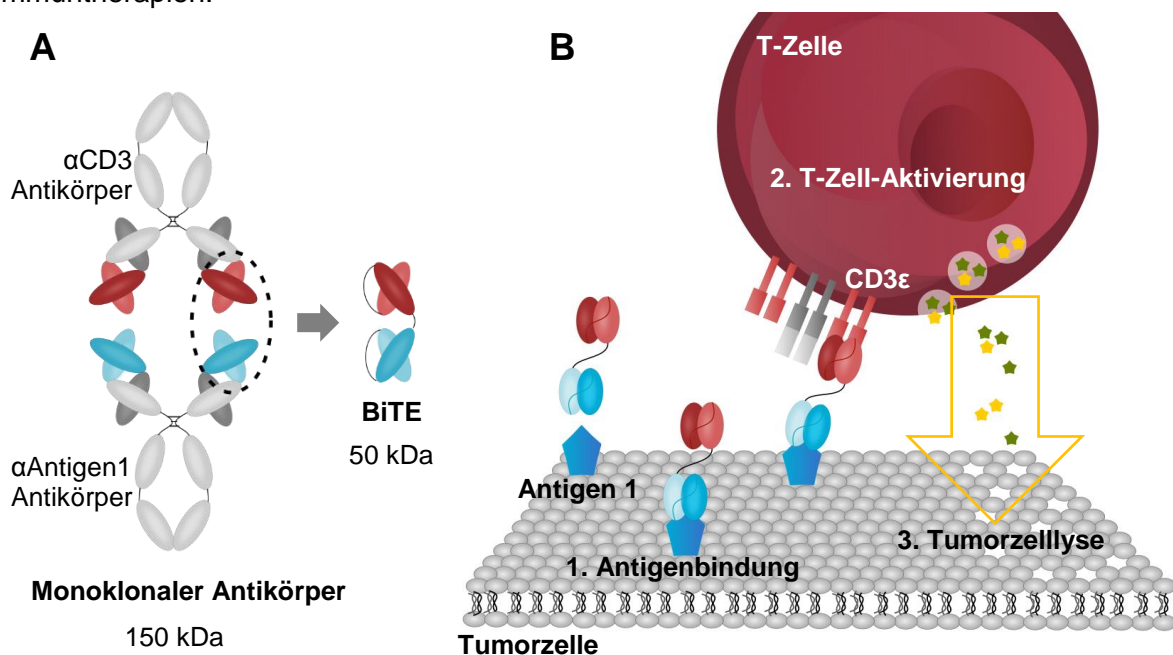


Abbildung 4: Aufbau und Wirkprinzip eines BiTE Antikörpers. BiTE Antikörper bestehen aus den Antigen-bindenden scFv zweier monoklonaler Antikörper. Diese beiden scFv sind gegen das das CD3 ϵ auf T-Zellen und einem Tumorantigen gerichtet und über Peptidlinker miteinander verknüpft (**A**). BiTE Antikörper vernetzen T- und Tumorzelle über eine simultane Bindung an das Tumor- und T-Zell Antigen. Die BiTE-gebundenen T-Zellen werden nachfolgend über die CD3 ϵ Bindung aktiviert. Sie schütten Zytokine und zytotoxische Granula aus, welche die Proliferation und Aktivierung weiterer Effektorzellen und die Lyse der Tumorzellen zur Folge haben (**B**).

2.6.2 CAR T-Zellen

Eine weitere revolutionäre Entwicklung der letzten Jahre im Bereich der gerichteten Immuntherapie sind *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zellen. CAR T-Zellen sind genetisch-modifizierte T-Zellen, die einen synthetischen Rezeptor gegen ein spezifisches Oberflächenantigen von Tumorzellen exprimieren. Für diese Therapie werden dem Patienten eigene T-Zellen entnommen, mit einem CAR-Protein transduziert, und anschließend in den Patienten zurückgeführt. Diese CAR-Proteine bestehen aus einem Fusionsprotein mit bis zu vier Komponenten. Sie besitzen ein extrazelluläres scFv-Fragment, das spezifisch gegen ein Epitop auf der Tumorzelle gerichtet ist. Dieses Protein ist über eine Transmembrandomäne

mit mehreren co-stimulatorischen Domänen im Zytoplasma aus CD28, OX40 und CD137 und anschließend einem ZAP-70-gebundenem T-Zell-Aktivierungsprotein CD3 ζ verknüpft. Wenn die so modifizierte CAR T-Zelle über ihren extrazellulären Teil das Zielepitop auf der Tumorzelle erkennt, wird die T-Zelle aktiviert und die Perforin- und Granzym-vermittelte Tumorzelllyse induziert [148]. Im Gegensatz zur normalen T-Zell Antwort über den TCR-Komplex, ist diese CAR T-Zell-Aktivierung unabhängig von MHC-Molekülen und benötigt keine co-stimulatorischen Signale [149, 150]. 2017 wurden die ersten anti-CD19 CAR T-Zell Therapien von der FDA für die Behandlung von Kindern mit ALL und für Erwachsene mit fortgeschrittenen Lymphomen zugelassen. Bislang laufen 12 verschiedene Studien mit CAR T-Zellen gegen das MM. Sehr vielversprechend sind CAR T-Zelle Studien gegen CD19, das auch in geringen Mengen auf MM Zellen zu finden ist [151], und gegen BCMA (ClinicalTrials.gov: NCT02546167). Weiterhin sind Antigene wie CD38, CD70, CD138 und SLAMF7 Kandidaten für eine CAR T-Zell Therapie [151-154].

2.7 Hemibodies

Die gezielte Lyse von Tumorzellen ohne Schädigung von gesunden Körperzellen ist bei einer Immuntherapie abhängig von der Wahl des Tumorantigens. Viele Antigene, die zunächst als spezifisch für Tumorzellen beschrieben wurden, konnten später dennoch auf gesunden Zellen detektiert werden. Immuntherapien gegen diese Antigene führen häufig zu Dosis-limitierenden Nebenwirkungen. Diese können sich in Form von leichten Schädigungen einzelner gesunder Körperzellen bis hin zum Organversagen äußern, oder durch die unkontrollierte Aktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine von Antigen-tragenden Effektorzellen [155, 156]. Von solchen unerwünschten Begleiterscheinungen wurde vielfach in klinischen Studien berichtet. Beschrieben wurden Nebenwirkungen die reversibel sein können, wie in dem Fall der transienten B-Zell Aplasie, ausgelöst durch eine CD19 CAR T-Zell Behandlung [157-162], oder schwerwiegend. Therapien mit dem BiTE Antikörpern gegen die Antigene EpCAM oder CEA (*carcinoembryonic antigen*) führten zu starken Nebenwirkungen im Bereich des Magen-Darm-Traktes [163, 164]. Die irrtümlich spezifisch geglaubte Antigene EpCAM und CEA wurden auf einigen gesunden Geweben, wie zum Beispiel auf Colon, Magen, Nieren und Pankreas, detektiert [163, 164]. Von einem tödlichen Fall wurde bei einem ERBB2 (Her2) CAR T-Zell behandelten Patienten mit Colonkarzinom und Metastasen in der Lunge und Leber berichtet. ERBB2 CAR T-Zellen reagierten hier mit gesundem Lungengewebe und führten zu Atemstillstand und Multi-Organ-Versagen [165]. Eine Lösung, um solche Nebenwirkungen zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Hier wurde eine gerichtete Immuntherapie gegen eine aberrante Antigenkombination hergestellt und getestet. Diese soll zwei Antigene adressieren, die in Kombination nur auf Tumorzellen exprimiert werden. Zwei geteilte, komplementierende, T-Zell-aktivierende Moleküle namens Hemibodies bilden auf der

Tumorzelle einen trivalenten Protein Komplex. Jedes der zwei Hemibody-Fragmente besteht hierfür aus einem spezifischen Tumorantigen-bindenden scFv, das über einen Glycin-Serin-Linker entweder mit der VH- oder der VL-Domäne eines T-Zell-aktivierenden α CD3-scFv fusioniert ist. Nur wenn beide Hemibodies gleichzeitig an ihr spezifisches Epitop in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander binden, können die geteilten VH- und VL-Ketten die CD3 Bindungsstelle rekonstituieren. Sie rekrutieren so T-Zellen zur Tumorzelle, aktivieren diese und initiieren über die Ausschüttung von Perforin und Granzym die Lyse der Zielzelle (Abbildung 5). Wie bei einem BiTE Antikörper ist die T-Zell-Aktivierung hierbei unabhängig von MHC und co-stimulatorischen Molekülen. Die T-Zellen werden, vermutlich wie bei BiTE Antikörpern, durch Vernetzung der CD3 ϵ Untereinheit aktiviert. Hemibody-induzierte Synapsen sind in Hinblick auf Größe, Zusammensetzung und Anordnung ihrer funktionellen Bereiche bislang noch wenig charakterisiert.

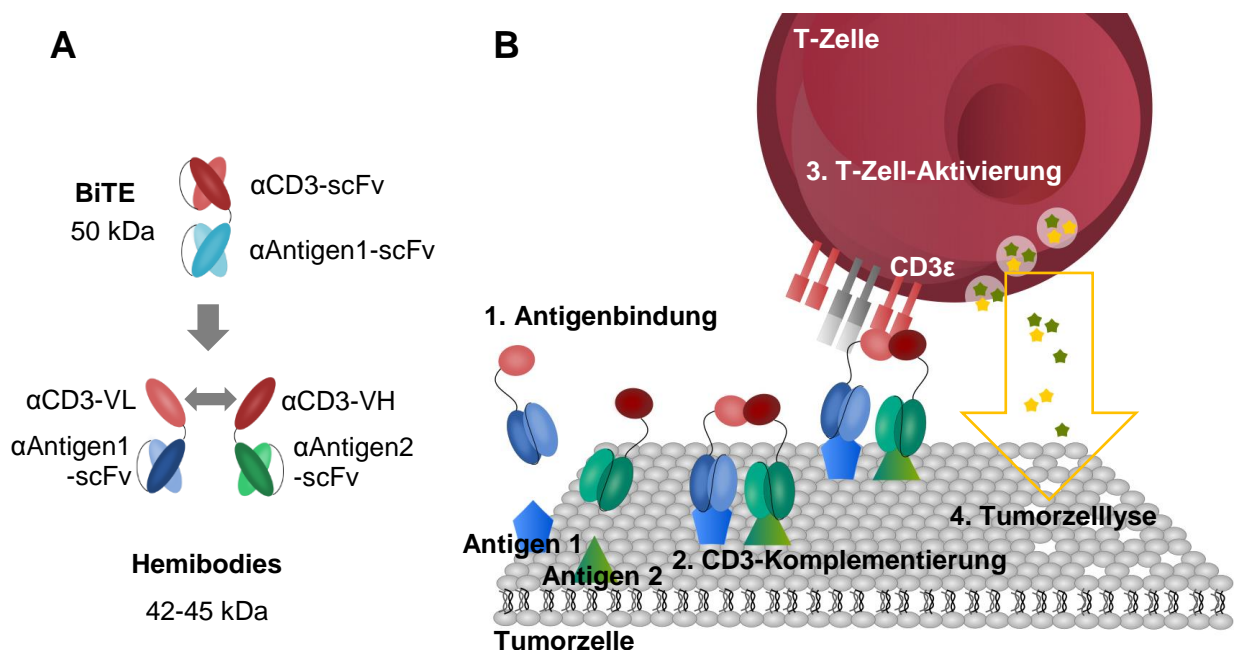


Abbildung 5: Aufbau und Wirkprinzip von Hemibodies. Hemibodies bestehen zur Tumorerkennung aus den Antigen-bindenden scFv zweier verschiedener Antikörper, die jeweils über Peptidlinker mit der VH- oder der VL-Domäne eines anti-CD3 Antikörpers fusioniert sind (A). Über die Bindung an ihr jeweiliges Tumorantigen und anschließender Komplementierung der beiden geteilten anti-CD3 Ketten, bilden Hemibodies auf der Tumorzelle einen trivalenten T-Zell-aktivierenden Komplex aus. Dieser vernetzt die Tumorzelle mit T-Zellen, aktiviert diese und führt über die Ausbildung und Ausschüttung von zytotoxischen Granula zur Tumorzelllyse (B).

Im Gegensatz zu BiTE Antikörpern, von denen Hemibodies abgeleitet wurden, besitzt diese Technologie entscheidende Vorteile. Hier müssen zwei Antikörper-Fragmente eine Antigenkombination aus zwei benachbarten Antigenen erkennen und binden, um sich nachfolgend zu einem aktiven T-Zell rekrutierenden Antikörperkomplex auf der Zielzelle zusammenlagern zu können. Auf diese Weise ist das Risiko von Nebenwirkungen auf Antigen-

einfach-positiven gesunden Zellen sowie Effektorzellen deutlich minimiert. Hemibodies erreichen so eine verbesserte Spezifität der T-Zell rekrutierenden Immuntherapie.

2.8 Zielsetzung

Wie bei jeder anderen Form der Immuntherapie ist auch bei einer Hemibody-basierten Technologie die Wahl der Tumorantigene entscheidend für den Erfolg einer gezielten Tumorzelllyse ohne Schädigung von gesunden Körperzellen. Bislang wurde vielfach von Nebenwirkungen aufgrund von unspezifischen Antigenen berichtet. Um diese zu vermeiden investieren immer mehr Forscher in die Identifizierung und Validierung geeigneter Antigene auf RNA und Protein Ebene. So sollten auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits bekannte MM Zielmoleküle validiert und neue MM Antigene für eine zielgerichtete therapeutische Applikation identifiziert werden. Diese Antigene sollten für eine MM Tumorthherapie in Kombination nur auf malignen, nicht aber auf gesunden Zellen exprimiert werden. Ein weiteres Kriterium das bei der Wahl der Antigene berücksichtigt werden sollte ist die Heterogenität innerhalb eines Tumors. Tumore sind dynamische Erkrankungen, die sich im Verlauf verändern. Es entstehen Tumore aus verschiedenen Subklonen mit unterschiedlichen morphologischen und phänotypischen Eigenschaften wie veränderte Genexpression von zum Beispiel Oberflächenmarkern, Metabolismus, Beweglichkeit, Proliferation und Metastasierungsfähigkeiten [166-169]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften reagieren die einzelnen Tumorklone häufig unterschiedlich sensitiv auf Therapeutika. So wurde in einer CD19 CAR T-Zell Studie an malignen B-Zell Erkrankungen von einer verringerten Antigenexpression bis hin zum Antigenverlust einiger Zellen als Reaktion auf das neue Therapeutikum berichtet [170]. Die weiterentwickelten malignen Zellen waren gegen das CD19 CAR T-Zell Therapeutikum immun [170]. Dieser Resistenzmechanismus entspricht der Darwin'sche Evolutionslehre, bei der unter Selektionsdruck einige Zellen einen Überlebensvorteil entwickeln und zu einer noch heterogeneren Gesamtpopulation führen [167]. Diese intratumorale Heterogenität wird daher auch in Verbindung gebracht mit dem Tumorfortschritt, Therapieresistenz und Tumorrezidiven [171]. Bei der Wahl eines Antigens ist folglich nicht nur die Tumorspezifität entscheidend, sondern auch die Antigenexpression auf allen Zellklonen innerhalb eines heterogenen Tumors. Ein weiteres Kriterium an eine Hemibody-adressierte Antigen-Kombination war folglich, dass sie in einem heterogenen Tumor auf allen malignen Zellen zu detektieren ist, um einen sicheren Therapieerfolg zu ermöglichen und der klonalen Expansion einzelner Tumorzellen vorzugreifen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, angeknüpft an den Erfolg und das große Potential von rekombinanten bispezifischen Antikörperformaten wie BiTEs, die erste Entwicklung und Produktion von zweigeteilten, sich komplementierende und T-Zell rekrutierende Hemibody-

Derivaten zur MM Therapie. Basierend auf den Ergebnissen der Targetidentifizierung sollten neue Hemibody-Fragmente produziert, aufgereinigt, sowie biochemisch und funktional charakterisiert werden. Hierbei sollte die Wirksamkeit auf MM Zellen, also auch das verbesserte Sicherheitsprofil auf Antigen-einfach-positiven Zellen und Effektorzellen erforscht werden. Das finale Ziel der vorliegenden Arbeit war, unter Berücksichtigung aller erhobenen Daten, die Identifizierung einer geeigneten Hemibody-Kombination für eine sichere und effiziente MM Therapie *in vivo*.

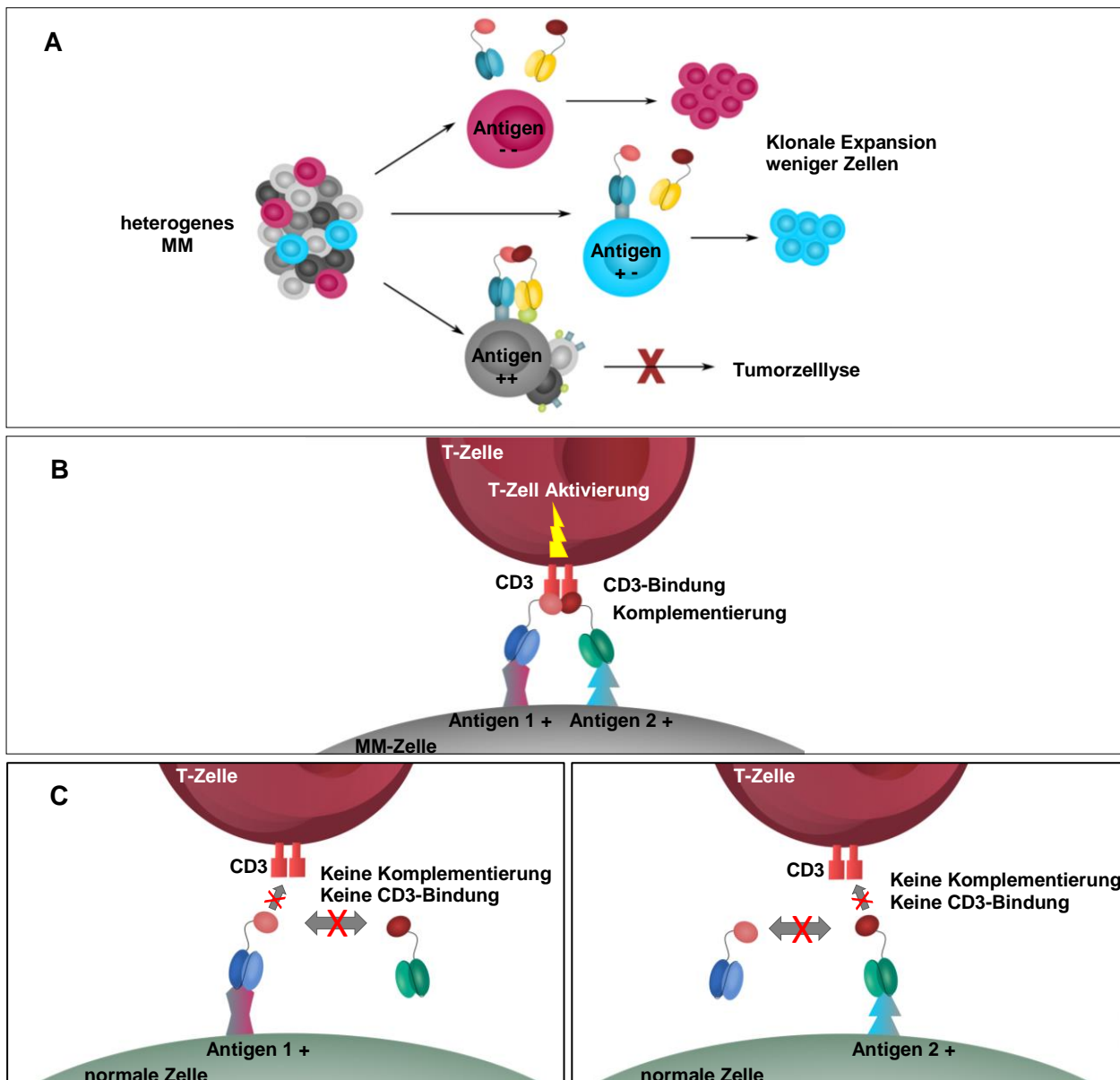


Abbildung 6: Hemibody-Format für eine spezifische MM Therapie. **A)** Das MM besteht aus verschiedenen Zellkolonen. Eine Hemibody-Kombination sollte Antigene adressieren, die innerhalb eines heterogenen Tumors auf allen Zellsubtypen exprimiert wird. Antigen-negative und Antigen-einfach-positive MM Zellen könnten sonst weiter klonal expandieren. **B)** Beide Hemibody-Fragmente binden auf der MM Zelle ihr spezifisches Zielmolekül und komplementieren über die geteilte α CD3-Domäne. Der so gebildete trispezifische Antikörper-Komplex aktiviert T-Zellen über die Bindung an CD3 ϵ . **C)** Hemibodies auf Antigen-einfach-positiven gesunden Zellen induzieren keine T-Zell Antwort.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Eukaryotische Zellen

3.1.1.1 Multiple Myelom Zellen

Alle verwendeten Multiplen Myelom Zelllinien wurden von der AG Bargou bereitgestellt. Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte in RPMI-1640 Medium mit 10 % (v/v) Hitze-inaktivierten FCS und den Supplementen L-Glutamin (1 % (v/v)) und Penicillin/Streptomycin/Neomycin (1 % (v/v)) bei 37 °C und 5 % CO₂. Weitere Informationen über Ursprung, Morphologie, Verdopplungszeit und optimaler Subkultivierung nach Angaben der American Type Culture Collection (ATCC), der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ), der *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank* (JCRB) und eigenen Erfahrungen wurden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Informationen und Wachstumsverhalten verwendeter Multipler Myelom Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Morphologie	Verdopplungszeit	Subkultivierung (alle 4-5 Tage)
AMO-1	Aszites einer 64-jährigen Frau mit Plasmazytom im Duodenum, IgA kappa produzierend, 1984	Einzelne, runde Zellen in Suspension	70-90 h	1:6
MOLP-8	Peripherem Blut eines 51-jährigen Mannes mit Multiplen Myelom, IgD lambda produzierend, 2002	Einzelne, runde Zellen in Suspension, manche leicht adhären	40 h	1:10
MM.1S	Peripherem Blut einer 42-jährigen Frau mit B-Lymphoblast, 1986	Leicht adhärenter Monolayer und einzelne, runde Zellen in Suspension	72 h	1:5
L-363	Peripherem Blut einer 36-jährigen Frau mit Plasmazelleukämie, IgG produzierend, 1977	Einzelne, runde bis ovale Zellen in Suspension	25 h	1:10
U-266	Peripherem Blut eines 53-jährigen Mannes Multiplen Myelom, IgE sezernierend 1968	Runde bis polygone, einzelne oder leicht geclusterte Zellen in Suspension und adhären	55 h	1:4
RPMI-8226	Peripherem Blut eines 61-jährigen Mannes mit Multiplen Myelom bei Erstdiagnose, IgG lambda produzierend, 1966	Einzelne, runde Zellen in Suspension, manche leicht adhären	60 -70 h	1:10
OPM-2	Peripherem Blut einer 56-jährigen Frau mit Multiplen Myelom im Endstadium, IgG lambda produzierend, 1982	Runde bis polygone einzelne Zellen in Suspension	50-60 h	1:6
NCI-H929	Pleuraerguss einer 64-jährigen Frau mit aggressivem Multiplen	Einzelne runde/ovale Zellen in Suspension	70 h	1:6

Zelllinie	Herkunft	Morphologie	Verdopplungszeit	Subkultivierung (alle 4-5 Tage)
	Myelom im Rückfall, IgA kappa produzierend	oder leicht geclustert		
KMS-11	Pleuraerguss einer 67-jährigen Frau mit Multiplen Myelom, IgG lambda+kappa sezernierend, 2006	Kleine runde adhärenente Zellen, zum Teil multinukleäre Zellen	40 h	1:10
KMS-12	Pleuraerguss einer 64-jährigen Frau mit aggressiven Multiplen Myelom im Endstadium nach kombinatorischer Chemotherapie, 1987	Kleine einzelne oder leicht geclusterte Zellen in Suspension	60-80 h	1:8

3.1.1.2 CHO Zellen

Chinese hamster ovary (CHO) Zellen ist eine vom chinesischen Hamster stammende adhärenente epitheliale Zelllinie. Diese Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut DSMZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) bezogen und in Ham's F-12K Nutrient Mixture Kaighans's Modification (1x) mit 10 % (v/v) FCS und den Supplementen L-Glutamin (1 % (v/v)) und Penicillin/Streptomycin/Neomycin (1 % (v/v)) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur weiteren Anwendung wurden die CHO Zellen mit einer *firefly* Luziferase und den verschiedenen humanen Antigenen BCMA (ID: Q02223), CD38 (ID: P28907), CD138 (ID: P18827) und SLAMF7 (ID: Q9NQ25) einzeln oder doppelt stabil transfiziert. Diese Arbeit wurde von Henning Böckhoff im Rahmen einer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe Bumm/Stuhler durchgeführt. Zur Transfektion wurde das PiggyBack Transposon Vektor System mit der Super PiggyBack Transposase von System Biosciences LLC. (Palo Alto, CA, USA) verwendet.

3.1.1.3 T-Zellen/PBMCs

Alle PBMCs, sowie die darin enthaltenen T-Zellen, wurden aus dem Blut von gesunden Spendern gewonnen. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640 oder Ham's F-12K Nutrient Mixture Kaighans's Modification Medium mit 10 % (v/v) FCS und den Supplementen L-Glutamin (1 % (v/v)) und Penicillin/Streptomycin/Neomycin (1 % (v/v)) bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Aufreinigung der T-Zellen erfolgte mittels Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) für humane Zellen nach Herstellerangaben.

3.1.2 Prokaryotische Zellen

Es wurden zwei verschiedene Stämme an Bakterienstämme genutzt (Tabelle 3). Für Klonierungsarbeiten sowie Plasmidpräparationsarbeiten wurden die chemisch kompetente

OneShot Mach1 T1 E.coli Zellen verwendet. Diese wurden in 1x LB-Medium mit Antibiotika gemäß des transformierten Plasmids kultiviert. Zur Produktion von rekombinanten Proteinen dienten die chemisch kompetenten *Shuffle T7 Express E.coli* Zellen. Dieser Bakterienstamm wurde beschrieben als ein System das fähig ist, große Mengen an aktiven Proteinen mit korrekten Disulfidbrücken innerhalb des Zytoplasmas auszubilden, indem reduzierende Wege inhibiert wurden. Zudem wird die zytoplasmatische Form der Isomerase DsbC exprimiert. Diese Isomerase unterstützt die Ausbildung und Umlagerung von vielzähligen Disulfidbrücken für ein richtig gefaltetes Protein. Diese wurden mit dem Plasmiden pColdIV, mit der jeweils tragenden Hemibody-Sequenz, und dem pRSF Duet Plasmid, mit der beinhalteten 3C-Protease, co-transformiert. Die Kultivierung dieses Bakterienstammes erfolgte in 2x YT Medium mit Carbenicillin und Kanamycin im Verhältnis 1:1333 und 0,1 % Glukose (v/v).

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme und deren Besonderheiten

Bakterienstamm	Besonderheit	Hersteller
<i>OneShot Mach1 T1 E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sehr hohe Wachstumsrate - T1- und T5-Phagen-Resistenz (<i>tonA</i>) - Reinere DNA-Präparate durch Beseitigung einer unspezifischen Aufspaltung durch Endonuklease I (<i>endA1</i>) - Effiziente Transformation von unmethylierter DNA aus PCR-Amplifikationen (<i>hsdR</i>) - Genotyp: F-ϕ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ<i>lacX74</i> <i>hsdR</i>(rK-mK+) Δ<i>recA1398</i> <i>endA1</i> <i>tonA</i> 	Invitrogen (Katalognummer: C8620-03)
<i>Shuffle® T7 Express E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - T7 Expression - Entwickelter <i>E. coli</i> Stamm mit Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma - Keine Lon und OmpT Proteasen - Resistent gegen T1 Phagen(<i>fhuA2</i>) - Genotyp: <i>huA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal</i> λ<i>att::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq)ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10—TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10—TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i> 	New England Biolabs (Katalognummer: C3029J)

3.1.3 Antikörpersequenzen

Aminosäuresequenzen der verschiedenen Antikörper wurden durch GeneArt synthetisiert (Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific Inc., Regensburg, Germany). Die Sequenzen wurden hierfür aus veröffentlichten Patenten entnommen und wurden in Tabelle 13 im Anhang aufgeführt.

3.1.4 Oligonukleotide

Die nachfolgenden Primer wurden von Sigma-Aldrich Co. (Merck, Darmstadt, Germany) bezogen.

3.1.4.1 Primer für cDNA Analysen

Zum Nachweis verschiedener cDNA Sequenzen wurden die Primer aus Tabelle 4 verwendet.

Tabelle 4: Primer für cDNA Analysen

Primer	Sequenz forward	Sequenz reverse
CD48	AAGTTCCGTTTTTAGCCCCG	CCGTGACCACTAGCCAACTT
LAMP5	ATCTGATCACAGAACAGGCCG	CAGGGGCAAGTTTCTTCCA
EPOR	CCAAGTTCGAGAGCAAAGCG	AGCCACAGCTGGAAGTTACC
LAX1	AATCAGAGGGAGGACCTTGG	ATAGTCACTGGAGTCTCATTTGAC
ITGA8	CAGTTGCTGCTGGGGAGTTT	CAGTGGTGGGATTTCTGCCT
BTLA	TGGACATCTGGAACATCCATG	CACATATGGATGCATATTTCTGTTG
SLAMF1	CTCCTTGACCTTCGTGCTGT	TGGAGTGGAGACCTGCTCAT
CD38	GGCCAACCTGCGAGTTCAG	TTGTTGCAAGGTACGGTCTG
BCMA	GCAGTGCTCCCAAATGAAT	TCTCCGTAGCACTCAAAGCA
CD229	GTGGCACCAAAGAGTCACAC	ACAGAAGGCAAACCATCAGG
SLAMF7	AACATGCCTCACCTCATCT	GGCAAATAGCCTTGGTGTGT
CD79a	CCAGGAGTCCCTCAAGCTCT	CATCGTTTCTTGAACAGCAG
CD138	CCGCAAATTGTGGCTACT	GTTTGGGTGGGCTTCTGGTAG
EpoR	GCTCCCTTTGTCTCCTGCTC	GAGCACGGTCAGCAGCAC
CLPTM1L	ATACACAGCAGATCGAGGCG	CCAAAGGCATAGACCCCGTT
TXNDC15	GGCAAGTATTGCTGTGGGTG	GTCGGCTTGAGTTACCACCA
GPRC5D	ATACTTGGCATCGTGGTCAC	ATGAGCCTTCCATGCTGCTT
SLC1A4	TCTCCTCGCCTTTCTCGCAC	GCTTCCAACAAGGAACATGATGC
GLRA2	TTGGATCAGTCACAGAAACGA	TGCCCTGGAGACGAAGTTCAC
RNF215	TGAGACTGCCGCGCCAGGACGCTCTGGTCC	AGGCCCTGCGCTGCCCTGCTCAGCCGGCAG
GPR32	AATGGGGTCTCGGAGGGGACCAGAGGCTGC	TGGGCCGGTTGGCATGGACCCAGCCCTCCC
BTNL2	AGATGGCCTGTTCTATGCGG	TGAGCTGTGTTTGAAGCCAATG
CD1B	AGTGAACATGCCTTCCAGGG	TCCAGGGTTGCTCGGAGATA
HTR3B	TCTCCTTTTGGGATCTGCCC	GCACCTGGTTGGACATGTTG
ROS1	TGAACCGTGTATCCAAGGAT	CACATAACAGTTCATCCATG
CHRM5	CACCACCTACATCCTCATGGGACGCTGGGC	GCTGCTGGAGACAGAAGGTAGTTTGGGGTG
OPN1SW	CTACCTCCAGGCAGCTTTCAT	GCTGTTGCAAACAGGCCAAT
GABRA3	AGAGCTCGGTCTCTCCAAGT	TGGTCATGGTAAGCACAGTGG
GAPDH	TCGGAGTCAACGGATTTGGTCTGTA	TGGCATGGACTGTGGTTCATGAGTC

3.1.4.2 Primer für Klonierungen von Antikörpersequenzen in pColdIV

Zur Generierung der benötigten Schnittstellen Sall 3' oder BamHI 5' verwendeter Antikörpersequenzen gegen die Antigene CD38, BCMA und CD138, dienen die Primer aus Tabelle 5. Zur Klonierung aller weiteren Antikörpersequenzen in den pColdIV Vektor wurden diese Schnittstellen bei der Synthetisierung der Aminosäuresequenz der Antikörper mitgeführt.

Tabelle 5: Primer zur Klonierung von scFv

Primer	Sequenz	Schnittstelle
CD38 fwd.	TGATGGATCCCAGGTTTCAGCTGGTTGAAAGC	BamHI
CD38 rev.	ATCAGTCGACCTGACCCAGAACGGTCAGTTT	Sall
BCMA fwd.	TGATGGATCCCAGGTTTCAGCTGGTTTCAGAGC	BamHI
BCMA rev.	ATCAGTCGACTTTGATTTCCAGTTTTGTACCCTGACC	Sall
CD138 fwd.	TGATGGATCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAG	BamHI
CD138 rev.	ATCAGTCGACTTTGATTTCCAGTTTTGTACCACCTCCAAATGTACG	Sall

3.1.4.3 Primer für Sequenzierungen

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der Antikörpersequenz in die *multiple cloning site* des pColdIV Vektors wurden die in Tabelle 6 enthaltenen Primer verwendet. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics GmbH durchgeführt.

Tabelle 6: pColdIV Sequenzierprimer

Primer	Sequenz
pColdIV fwd.	ACGCCATATCGCCGAAAGG
pColdIV rev.	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

3.1.5 Vektor pColdIV

Für die Expression der Hemibodies wurde der Vektor pColdIV von TaKaRa Bio Company (Katalognummer 3364) verwendet (Abbildung 36). Dieser Vektor besitzt neben einer Ampicillinresistenz einen *cspA* (*cold shock protein A*)-Promoter für eine effiziente Expression rekombinanter Proteine bei niedrigen Temperaturen, die über den Lac Operator gesteuert werden kann. Dieser Vorgang wird durch die verstärkte Produktion des Kälteschockproteins CspA (bis zu 10 % aller zellulären Proteine [172]) bei einer Temperaturerniedrigung von 37 °C auf 15 °C ermöglicht, während alle weiteren Proteinsyntheseprozesse stark reduziert werden. Zum Transkriptionsstart besitzen CspA Promotoren 10 Nukleotide stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle eine Konsensussequenz, an die der Sigma-70-Transkriptionsfaktor binden, einen Promoterkomplex ausbilden und die Transkription initiieren kann [173, 174]. Die Proteinproduktion bei geringen Temperaturen soll die Proteinfaltung verlangsamen, zu weniger Abbauprodukten führen und somit das Produktionsergebnis verbessern [175].

3.1.6 Vektor pRSF-DUET

Der pRSF-DUET Vektor der Firma Merck (Darmstadt, Germany, Katalognummer 71341) wurde zur Co-Expression einer spezifischen Protease zum Abspalten von Fusionstags von dem N-Terminus der Hemibodies nach erfolgreicher Produktion verwendet (Abbildung 37). Diese rekombinante, 22 kDa große 3C-Protease aus dem humanen Rhinovirus (HRV 3C) ist bei 4 °C aktiv und erkennt eine spezifische Schnittstelle aus LeuGluValLeuPheGln↓GlyPro. Sie wurde in den pRSF-DUET Vektor kloniert, der neben einer Kanamycin Resistenz, zwei *multiple cloning sites* mit je einem T7-Lac Promoter besitzt.

3.1.7 Antikörper

Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Fluoreszenz-konjugierten Antikörper zum Nachweis verschiedener Tumorantigene sowie deren äquivalenten Isotypen wurden in der Tabelle 7 zusammengefasst. Der unkonjugierte anti-humane LAX1 Antikörper wurde zur

Detektion mit dem Alexa Fluor 546 Antibody Labeling Kit (Tabelle 7) nach Herstellerangaben markiert. Weiter beinhaltet diese Tabelle Sekundärantikörper gegen ein 8x His-Tag zur Detektion der Hemibodies und Antikörper für ELISAs.

Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie und ELISA

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugate	Vol./5x10 ⁵ Zellen	Katalog- nummer	Hersteller
Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie						
α-BCMA/ TNFRSF17	Vicky-1	IgG1, κ	FITC	1 µl	NBP1- 97655	Novus Biologicals
α-CD38	HB-7	IgG1, κ	FITC	2 µl	356610	BioLegend
α-CD70/ TNFSF7	113-16	IgG1, κ	FITC	2 µl	355105	BioLegend
α-CD138	MI15	IgG1, κ	FITC	10 µl	552723	Becton Dickinson
α-SLAMF7 (CD319)	162.1	IgG2b, κ	FITC	2 µl	331817	BioLegend
CD38	LS198- 4-3	IgG1, κ	PE/cy5.5	5 µl	B49199	BC
SLAMF7	162.1	IgG2b, κ	PE/Dazzle	2 µl	331812	BioLegend
BCMA	19F2	IgG2a, κ	APC	2 µl	357506	BioLegend
CD70	113-16	IgG1, κ	PE	2 µl	355112	BioLegend
CD48	MEM- 102	IgG1, κ	PB	2 µl	PB-226	Abcore
BTLA	MIH26	IgG2a, κ	PE/Dazzle	2 µl	344516	BioLegend
Ly9 (CD229)	Hly9.25	IgG1, κ	APC	5 µl	17-2299-42	Thermo Fischer
CD3	OKT3	IgG1, κ	APC	2,5 µl	317318	BioLegend
CD8	SK1	IgG1, κ	APC	10 µl	340584	BD Biosciences
CD28	CD28.2	IgG1, κ	APC	10 µl	559770	BD Biosciences
CD38	HB-7	IgG1, κ	PE	2,5 µl	356604	BioLegend
BCMA/TNFRSF17	Vicky-1	IgG1, κ	PE	1:100	NBP- 97656	Novus Bio
CD229	Hly- 9.1.25	IgG1, κ	PE	2,5 µl	326108	BioLegend
SLAMF7	162.1	IgG1, κ	PE	2,5 µl	331806	BioLegend
CD138	DL-101	IgG1, κ	PE	2,5 µl	352305	BioLegend
CD70	113-16	, κ	PE	2,5 µl	355104	BioLegend
Unkonjugierte Primärantikörper für die Durchflusszytometrie						
LAX1 Aff Pur Pab	-	IgG1, κ	-	5 µl	AF4706	bio-technie
Epo-R	VP-2E8	IgG1, κ	-	1 µl	MABS1287	EMD Millipore
Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie						
Alexa Fluor 546 Antibody Labeling Kit	-	-	Alexa Fluor 546	-	A20183	Thermos Fisher
FITC Streptavidin	-	-	FITC	0,5 µl	405201	BioLegend
6x His tag antibody	-	IgG1, κ	Biotin	1 µl	ab27025	Abcam
6-His Epitope Tag antibody	-	IgG1, κ	FITC	4 µl	DIA 920	Dianova

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugate	Vol./5x10 ⁵ Zellen	Katalog- nummer	Hersteller
ELISA-Antikörper						
6x His tag HRP	-	-	HRP	1:2000	ab1187	Abcam

3.1.8 Geräte und Software

Alle verwendeten Geräte, sowie die dazu benötigte Software wurden in den Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgeführt. Laborgeräte, die als Standardeinrichtung eines Labors zu zählen sind, wurden nicht erfasst.

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Designation/ Model	Hersteller
FACSCaliburTM	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
OD600 DiluPhotometerTM	Implen GmbH (München, Deutschland)
Infinite® M200 PRO	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Zürich, Schweiz)
Tecan Spark®	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Zürich, Schweiz)
NanoDropTM 2000	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
EmulsiFlex-C3	AVESTIN Europe, GmbH (Mannheim, Deutschland)
Äkta Pure Chromatography System	GE Healthcare Life Sciences (Chicago, Illinois, USA)
Äkta Start Chromatography System	GE Healthcare Life Sciences (Chicago, Illinois, USA)
Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System	Bio-Rad Laboratories, Inc (CA, USA)
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc (CA, USA)

Tabelle 9: Verwendete Software

Software	Hersteller
ApE (A plasmid Editor v2.0.53c)	M.Wayne Davis, University of Utah (Utah, USA)
ExPASy	SIB Swiss Institute of Bioinformatics (Schweiz)
<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST)	National Center for Biotechnology Information (U.S. National Library of Medicine, MD, USA)
FlowJo V 8.8.6 / V 10	FlowJo LLC (Ashland, OR, USA)
ImageLab	Bio-Rad Laboratories, Inc (CA, USA)
Intas GDS	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, Deutschland)
Tecan SPARKCONTROL Method Editor V2.2	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Zürich, Schweiz)
Genevestigator	Nebion (Zürich, Schweiz)
UniPot	Swiss-Prot, TrEMBL und Protein Information Resource (PIR) (Schweiz)
Unicorn V 6.3	GE Healthcare Life Sciences (Chicago, Illinois, USA)
Cytobank	Cytobank, Inc (CA, USA)
SnapGene	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)
GraphPad Prism V 7	GraphPad Software, Inc.(CA, USA)
Human Protein Atlas	Knut & Alice Wallenberg foundation (Sweden)
Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad Laboratories, Inc (CA, USA)

3.1.9 Chemikalien und Reagenzien

3.1.9.1 Molekularbiologische Methoden

Dimethyl sulfoxide (≥99.5%) (DMSO)	Sigma-Aldrich	D4540-500ML
dNTP Mix (Desoxyribunukleosidtriphosphate) [10 mM]	Thermo Fisher Scientific	RO192

EDTA pH8.0 0,5 M	AppliChem	A3145,0500
Ethanol absolute	Th. Geyer	11647081
FD (FastDigest) Buffer [10x]	Thermo Fisher Scientific	B64
FD Bam H I	Thermo Fisher Scientific	FD0054
FD Xba I	Thermo Fisher Scientific	FD0685
FD Sal I	Thermo Fisher Scientific	FD0644
Rnase A	AppliChem	A3832,0250
H ₂ O (AMPUWA, Aqua ad iniectabilia)	Fresenius Kabi AG	30-29-256
2-Propanol	Roth	T910.1
Nancy-520	Sigma-Aldrich Co.	01494
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM1331
peqGOLD Universal-Agarose	peqLab	35-1020
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 2 U/ml	Biolabs	M0493L
Q5 Reaction Buffer [5x]	Thermo Fisher Scientific	B9027S
Q5 High GC Enhancer	Thermo Fisher Scientific	M0491S
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
NucleoBondR Xtra Maxi	Machery-Nagel	740414.10
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen	28606
Super Script III First-Strand Synthesis System Kit	Thermo Fisher Scientific	18080051
RnaseH (Ribonuclease H) [2U/μl]	Thermo Fisher Scientific	18021014
Borsäure	Roth	6943.1
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	New England Biolabs	EF0651
Fast AP Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific	B64
T4 DNA Ligase	New England Biolabs	M0202L
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs	B0202S
QIAprep 2.0 Spin Columns (100) (für Plasmid Mini-Präp)	Qiagen	27115
RNase Zap	Thermo Fisher Scientific	7002
Ultra Pure DNase/RNase free distilled Water	Thermo Fisher Scientific	10977035
Rneasy Mini Kit	Qiagen	74106
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM1823
2X RNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific	R0641
Agar-Agar	Roth	
Tris ultrapure	AppliChem	A1086
Bromphenolblau	Roth	T116.1
Glycerol	Sigma-Aldrich	G2025-500 ML

3.1.9.2 Proteinbiochemische Analysen

2-Mercaptoethanol XL-10 Gold	Agilent Technologies	200314-43
30% Acrylamide/Bisacrylamid Solution	Sigma-Aldrich	A3699
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth	9592.5
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich	A7030
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich	27815
SDS ultrapure (Sodium Dodecyl Sulfate)	Roth	2326.5
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26634
TEMED	AppliChem	A1148
Tris ultrapure	AppliChem	A1086
Tween 20	Roth	9127.1
Roti-Nanoquant	Roth	K880.2
Essigsäure absolut	Sigma-Aldrich	33209-1L

Glycin	Roth	3790.2
SYPRO Orange Protein Stain	Sigma-Aldrich	S5692-50UL

3.1.9.3 Durchflusszytometrie

CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Roth	A119.1
HEPES	Roth	6763.1
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺	Sigma-Aldrich	D8537-500ML
FACS Flow	BD Biosciences	342003

3.1.9.4 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinater Proteine

0,5 M EDTA-Solution, pH 8,0	AppliChem	A3145,0500
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences	212730
Carbenicillin – Dinatriumsalz	AppliChem	CC56
Imidazol	AppliChem	A1073,0500
IPTG für die Molekularbiologie	AppliChem	A4773,0025
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Roth	T877.1
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Roth	T878.1
Trypton	AppliChem	A1553,1000
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen	31014
NaCl	AppliChem GmbH	131659.1214
Superdex 200 Increase 5/150 GL	GE Life Sciences	28-9909-45
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Life Sciences	28989335
D-Glukose	Sigma-Aldrich	G8270-1KG
E. coli Transformation Kit Mix & Go	ZYMO Research	T3001
HiTrap Q XL	GE Healthcare	17-5158-01
HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare	17508701
HiTrap TALON crude, 5 ml	GE Healthcare	28953767
High Density Cobalt Beads	Agarose Bead Technologies (ABT)	6BCL-QHCo-25
Kanamycin Sulfat	AppliChem	A1493,0025
X-Tractor Buffer	Clontech Laboratories	635656

3.1.9.5 Zellbiologische Methoden

Advanced RPMI-1640 Medium	Gibco	12633-020
CTS™ GlutaMAX™-I Supplement	Gibco	11539876
Dimethyl sulfoxide (≥99.5%) (DMSO)	Sigma-Aldrich	D4540-500ML
HyClone™ Fetal Bovine Serum (FBS)	GE Healthcare	SH3007103
Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) Antibiotic Mixture	Gibco	15640-055
Ham's F-12K Nutrient Mixture Kaighans's Modification (1x)	Thermo Fisher Scientific	21127030
0,05% Trypsin-EDTA (1x)	Gibco	25300-096
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare	17-1440-02
CTS™ GlutaMAX™-I Supplement	Gibco	A1286001
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich	T8154-20ML

3.1.9.6 Funktionelle Assays

IL2 ELISA Kit	Antibodies online	ABIN 1446208
CellTracker™ Deep Red Dye	Thermo Fisher Scientific	C34565
Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution	Thermo Fisher Scientific	V22886
D-Luciferin potassium salt	Biosynth AG	L8220

	2,02 ml Tris-HCl pH 8,8 80 µl TEMED
Coomassie-Färbelösung	45 % v/v Methanol absolut 10 v/v Essigsäure absolut 0,25 % w/v Coomassie Blue G250
Coomassie-Entfärbelösung	45 % v/v Methanol absolut 10 % v/v Essigsäure absolut
APS-Stocks	10 % w/v APS in dH ₂ O lösen
1, 5 M Tris, pH 8,8	1,5 M Tris ultrapure in dH ₂ O pH auf 8,8 mit HCl einstellen
1 M Tris, pH 6,8	1 M Tris ultrapure in dH ₂ O pH auf 6,8 mit HCl einstellen
3.1.10.3 Durchflusszytometrie und ELISA	
10x PBS	95,5 g PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ auf 1L dH ₂ O
1x PBS	10 % v/v PBS (10x)
FACS-Puffer	0,1 % v/v BSA in 1x PBS
K _D ELISA-Waschpuffer	1x PBS 10 % v/v F-12K Nut Mix (1x) culture medium (10 % FBS, 1 % PSN, 1 % GlutaMAX™)
3.1.10.4 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	
LB Medium	1 % v/v NaCl 1 % v/v Trypton 0,5 % w/v Hefe extrakt pH 7,0, autoklaviert
2x YT Medium	1,6 % w/v Tryptone 1 % w/v Yeast extract 0,5 % w/v NaCl pH 7,0, autoklaviert
Co-IMAC-Waschpuffer	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) 300 mM NaCl 1 mM Imidazol (pH 8,0) 0,2 % v/v Triton x 114
Co-IMAC-Ladepuffer	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) 300 mM NaCl 10 mM Imidazol (pH 8,0)
Co-IMAC-Elutionspuffer	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) 300 mM NaCl 150 mM Imidazol (pH 8,0)

Co-IMAC Regenerationspuffer	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) 300 mM NaCl 300 mM Imidazol (pH 8,0)
Entsalzungs- und IEX-Puffer	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) 75 mM NaCl
SEC-Puffer	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) 300 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM Natriumcitrat
IPTG	1 M Imidazol in dH ₂ O
Na-Phosphatpuffer (pH 7,5)	1,6 % v/v NaH ₂ PO ₄ (0,5 M) 8,4 % v/v Na ₂ HPO ₄ (0,5 M)
NaH ₂ PO ₄ -Lösung(0,5 M)	0,5 M NaH ₂ PO ₄ in dH ₂ O
Na ₂ HPO ₄ -Lösung (0,5 M)	0,5 M Na ₂ HPO ₄ in dH ₂ O
Glykerolstockpuffer	65 % v/v Glycerol (100 %) 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 M MgSO ₄
LB-Agar	1 % v/v NaCl 1 % w/v Trypton 0,5 % w/v Hefe 2 % w/v Agar-Agar pH 7,0, autoklaviert
Carbenicillin-Stock	100 mg/ml Carbenicillin in dH ₂ O
Kanamycin-Stock	50 mg/ml Kanamycin in dH ₂ O
3.1.10.5 Funktionelle Assays	
Luziferin	0,1 M in 1x PBS

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Kryoröhrchen in Zellkulturmedium mit 10-20 % DMSO und 10 % FCS im flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zum Auftauen von eukaryotischen Zellen wurden die gefrorenen Kryoröhrchen zügig erwärmt, die flüssige Zellsuspension in 10 ml Kulturmedium überführt und 5 Minuten bei 1200 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Frisch aufgetaute Zellen wurden vor dem Gebrauch mindestens dreimal subkultiviert. Zur Kryokonservierung wurden 5–10 x 10⁶ Zellen, in der exponentiellen Wachstumsphase von 60-80 % Konfluenz, in 1 ml Einfriermedium (90 % (v/v) Vollmedium, 10 (v/v) % DMSO) verdünnt. Die Kryoröhrchen wurden für ein bis zwei Tage bei -80 °C im Cryo -1 °C Freezing Container eingefroren und danach zur Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.1.2 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Kultivierung der verschiedenen Tumorzelllinien erfolgte in RPMI-1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS und den Supplementen L-Glutamin (20 mM) und Penicillin/Streptomycin/Neomycin (1 % (v/v)). Die Zellen wurden in einer Zellkulturflasche bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % im Brutschrank kultiviert. Da sich die Zellen kontinuierlich vermehren, mussten die Zellkulturen alle 2-5 Tage bei 60-80 % konfluentem Wachstum entsprechend der in Tabelle 2 angegebenen Daten subkultiviert werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten hierbei unter sterilen Bedingungen.

3.2.1.3 Bestimmungen der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und dem Vitalfarbstoff Trypanblau.

3.2.1.4 Aufarbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), wurden durch Zentrifugation eines Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymers (Ficoll) aufgereinigt. Hierfür wurde Blut eines gesunden Spenders 1:1 mit 1x PBS verdünnt und auf 20 ml Ficoll Plaque PLUS pipettiert. Die Separation des Blutes in die vier Schichten Erythrozyten, Ficoll Plaque PLUS Lösung, PBMCs und Plasma erfolgte durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 3000 U/min. Anschließend wurden die PBMCs entnommen und mit 1x PBS gewaschen. Die PBMCs wurden entweder bis zur Verwendung in funktionellen Assays in

Vollmedium unter Standardzellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, oder die T-Zellen mittels Pan T Cell Isolation Kit oder CD3-Microbeads weiter isoliert.

3.2.2 Genexpressionsanalysen auf cDNA Ebene

3.2.2.1 cDNA Expressionsanalyse relevanter Zielmoleküle für das MM

Für die Identifizierung relevanter MM Zielantigene wurde ein cDNA Expressionsarray signifikanten Oberflächenproteine mittels Genevestigator erstellt. Dieses Programm ist eine Sammlung aller veröffentlichter Microarrays und RNA-Sequenzierungen, deren Daten nach eigenen Parametern durchsucht werden können. Hier wurden 400 Gene identifizieren. Gezeigt wurden Gene, die im Vergleich zu allen weiteren Basis Kategorien, in MM-Proben überexprimiert sind. Der Wert für jedes Gen wurde hierbei definiert über die Summe der Mittelwerte aller Ergebnisse aus der MM Kategorie dividiert durch die Summe der Mittelwerte aller Ergebnisse der weiteren Basis Kategorien. Ein MM spezifisches Gen, das nicht in der Basis Kategorie exprimiert wird, kann folglich eine maximale Spezifität mit einen Wert annähernd an 1 erzielen. Diese Gene wurden nachfolgend manuell mittels UniProt auf einen Hemibody-adressierbaren extrazellulären Proteinteil hin überprüft. Die isolierten Gene wurden nach der durchschnittlichen Expression in MM Zellen, beginnend mit der durchschnittlich höchsten Expression, sortiert und mit der Expression auf Normalgewebe, sowie Blutzellen, B-Zellen und T-Zellen verglichen. Aus dem ausgegebenen prozentualen Expressionsprofil von Genevestigator wurde ein cDNA Array mittels Excel erstellt.

3.2.2.2 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels Rneasy Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers unter sterilen, Rnase freien Bedingungen. Hierfür wurden 5-10 x 10⁶ eukaryotische Zellen verwendet. Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde mittels Nanodrop 2000 ermittelt.

3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Da Nukleinsäuren an jeder Base negativ-geladene Phosphatgruppen besitzen, wandern diese im elektrischen Feld der Elektrophoresekammer durch ein Gelsieb in Richtung der Anode. Kleine Fragmente bewegen sich aufgrund ihrer geringeren Größe schneller durch das Gelsieb zur Anode als große, sodass unterschiedlich lange Nukleinsäuremoleküle räumlich voneinander getrennt werden können. Für die Auftrennung der DNA-Produkte aus der Polymerasekettenreaktion, zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA, oder zur Aufarbeitung von Klonierungsprodukten wurden 1 %ige Agarosegele mit dem DNA-interkalierendem Farbstoff Nancy-200 verwendet. Die DNA-Proben wurden hierfür mit 6x DNA-Loading Dye versetzt und in die Geltaschen des erstarrten Agarosegels, in eine TBE-Puffer gefüllten

Gelkammern, pipettiert. Als Größenmarker wurde eine DNA-Leiter mit dem Trennbereich von 75-20000 bp mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 50 Minuten. Die Nukleotidprodukte wurden durch die Fluoreszenzaktivität des interkalierenden Farbstoffes Nancy-2000 auf einem UV-Transilluminator visualisiert und dokumentiert.

3.2.2.4 Qualitätskontrolle der RNA

Um die Qualität der RNA zu überprüfen und Degradation durch Ribonukleasen (RNasen) auszuschließen, wurden 500 ng der RNA mit 2x RNA Loading Dye versetzt. Zur Größenbestimmung der RNA-Produkte diente eine RNA Leiter (Trennbereich 200-6000 bp). Die Proben wurden nachfolgend bei 70 °C für 10 Minuten erhitzt, und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Bei erfolgreicher RNA-Aufreinigung wurden zwei klare Banden der 28S- und 18S-Untereinheit ribosomaler RNA ersichtlich.

3.2.2.5 Reverse Transkription/cDNA-Synthese aus mRNA

Um die Genexpression verschiedener Zielmoleküle in den MM-Proben anhand einer PCR nachzuweisen wurde aus der isolierten RNA die *messenger RNA* (mRNA) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das SuperScript® III First-Strand-Synthesesystem nach Herstellerangaben verwendet. Mittels diesen Kits können mRNA-Ziele von 100 bp bis 12 kb durch die Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Zum Nachweis spezifischer MM Antigensequenzen wurden diese aus der synthetisierten cDNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) vervielfältigt und detektiert. Die jeweilige cDNA der verschiedenen Proben wurde hierzu 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und 1 µl in einen PCR-Mastermix eingesetzt. Dieser bestand aus in Tabelle 10 aufgeführten Komponenten.

Tabelle 10: Verwendeter PCR Mastermix für Q5 High-Fidelity DNA Polymerase

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
5 x Q5 Reaction Buffer	5 µl	1 x
5 x Q5 High GC Enhancer	5 µl	1 x
10 mM dNTPs	0,5 µl	200 µM
Forward-Primer	1,25 µl	0,5 µM
Revers-Primer	1,25 µl	0,5 µM
Template	1 µl	< 1 000 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl	0,02 U/µl
dH ₂ O	Auf 25 µl	

Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne cDNA mitgeführt. Die Proben wurden nach den folgenden Bedingungen amplifiziert:

Initiale Denaturierung	30 Sekunden	98 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung	7 Sekunden	98 °C	
Annealing	20 Sekunden	50–72 °C	
Extension	40 Sekunden	72 °C	
Finale Extension	3 Minuten	72 °C	
Halten	4 °C		

Das PCR-Produkt wurde nachfolgend mittels Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und visualisiert.

3.2.3 Proteinexpressionsarray von Tumorantigenen auf gesundem Gewebe

Der humane Proteinatlas (HPA) beinhaltet genomweite Analysen von RNA- und Proteinexpressionen von 90 % aller Proteine und proteinkodierenden Genen aus Zellen, Geweben und Organen [176]. Die Proteindaten dieses Atlas wurden mittels Antikörper-basierter Immunhistochemie generiert. Der HPA wurde verwendet, um die Proteinexpression der favorisierten Zielantigene aus der Genexpressionsanalyse auf 44 gesunden Gewebetypen zu visualisieren. Um Proteine auszusortieren die im Normalgewebe überexprimiert sind, wurden die Daten des HPA zusätzlich mit den Antikörper-basierten immunhistochemischen und massenspektrometrischen Daten der *Human Proteome Map* (HPM) und *Proteomics Database* (PD) verglichen.

3.2.4 Durchflusszytometrie

3.2.4.1 Zielantigenexpression auf Tumorzellen

Mittels einer *Fluorescence-Activated Cell Scanning* (FACS)-Analyse wurde überprüft, welche der untersuchten Antigene aus der Genexpressionsanalyse als Protein auf der Oberfläche von Multiplen Myelom Zellen ausgebildet werden und zu detektieren sind. Hierfür wurde für jeden zu untersuchenden Ansatz 2×10^5 Zellen mit 5 ml FACS-Puffer bei 1200 U/min für 5 Minuten gewaschen und das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die zu detektierenden Rezeptoren wurden nachfolgend über Fluorochrom-gekoppelte Primärantikörper markiert. Die verwendeten Antikörper und deren eingesetzten Konzentrationen wurden in Tabelle 7 aufgelistet. Als Negativkontrolle diente ein korrespondierender Isotyp. Die Zell-Antikörper-Suspension wurde für 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert und nicht gebundene Antikörper durch einen Waschschrift mit 5 ml FACS-Puffer entfernt. Erfolgreiche Antikörperbindung an ihr spezifisches Antigen auf der Oberfläche der Zellen wurde mit dem Gerät FACSCalibur detektiert und mit der Software FlowJo ausgewertet.

3.2.4.2 Hemibody-Bindung an Tumorzellen

Die Durchflusszytometrie wurde zudem zur Überprüfung der Bindung der Hemibodies an ihr adressiertes Antigen herangezogen. 2×10^5 Multiple Myelom oder CHO Zellen/100 μ l Zellkulturmedium wurden mit 500 ng Hemibody bzw. äquivalentem BiTE Antikörper für 1 Stunde (h) bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit allen sekundären Antikörpern ohne Hemibody. Nach vollendeter Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml FACS-Puffer und Zentrifugation gewaschen und in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert. An die Zielzellen gebundene Hemibodies wurden durch 1 μ g Rabbit polyclonal Biotin anti-His-Tag Antikörper (1 mg/ml) für 1 h bei 4 °C gekennzeichnet. Nach einem weiteren Waschschrift mit 5 ml FACS-Puffer wurde der Biotin anti-His-Tag Antikörper für 30 Minuten bei 4 °C mit einem anti-Biotin-Streptavidin-FITC Antikörper fluoreszenzmarkiert. Die erfolgreiche Hemibody-Bindung konnte, nach einem erneuten Waschschrift, mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur detektiert werden.

3.2.4.3 Tumormodeling mittels viSNE

Einzelzelldaten wie FACS Analysen werden oft zweidimensional in Form eines *scatter plots* dargestellt. Mit der Anzahl an untersuchten Parametern erhöht sich auch die Anzahl an möglichen Zweierkombinationen, wird schnell unübersichtlich und kann dazu führen, wichtige biologische Daten zu übersehen, die schwer in zwei Dimensionen zu visualisieren sind. Eine Lösung für dieses Problem bietet viSNE (*visual interactive Stochastic Neighbor Embedding*), ein Visualisierungstool für hochdimensionale Einzelzelldaten die mehr als zwei oder drei Dimensionen erfordern. Es basiert auf dem von Laurens van der Maaten und Geoffrey Hinton entwickeltem t-SNE (*T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) Algorithmus mit der Technik der nichtlinearen Dimensionsreduktion. Hierbei werden Hochdimensionale Objekte in einem zweidimensionalen Raum so angeordnet, dass ähnliche Objekte räumlich nahe beieinander und nichtähnliche Objekte weiter voneinander entfernt liegen. Einzelzelldaten werden basierend auf allen Parametern der durchgeführten FACS-Analyse nach gleichen Charakteristika durchsucht und in einem zweidimensionalen Raum angeordnet [177]. Um die Verteilung von ausgewählten Antigenen im MM und deren Heterogenität im Patienten zu untersuchen wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Kunzmann etwa 30 primäre Knochenmarksproben von MM Patienten mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von 9 Zielmolekülen untersucht. Die Daten wurden nachfolgend mittels der Plattform Cytobank und viSNE ausgewertet und dargestellt. Der t-SNE Algorithmus wurde hierbei auf zufällig ausgewählte 2 000 Zellen/Probe angewendet und die Signalintensität jedes Fluoreszenz Kanals mit dem Cofaktor 5 ($x_transf = \text{asinh}(x/5)$) arcsinh transformiert.

3.2.5 Immunhistochemische Analysen

Alle Immunhistochemischen (IHC) Analysen wurden vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Würzburg auf primären MM-Proben oder Gewebearrays der Firma US Biomax Inc. (Katalog-Nr.: BN00011b) durchgeführt. Hierfür wurden 2 µm dicke Gewebeschnitte auf Objektträger aufgezogen und für 1 h bei 56 °C im Brutschrank getrocknet. Zum Entparaffinieren und Rehydrieren des in Paraffin eingebetteten Schnittes wurden das Gewebe für 25 min mit Xylol (100 %) und einer Alkoholreihe, bestehend aus je 2 x 5 min 100 %, 90 % (v/v) und 70 % (v/v) Ethanollösungen, inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mit dH₂O gewaschen und die Antigene mit einem Zitratpuffer (pH = 8,0) für 8 Minuten im Dampfkochtopf demaskiert. Danach erfolgte die 1-stündige Färbung des Primärantikörpers (CHRM5 1:500) verdünnt in einer BSA-haltigen Lösung (0,5 % BSA in PBS). Die Schnitte wurde dreimal mit 1x PBS gewaschen und im nächsten Schritt mit 100 µl des jeweiligen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers für 30 min inkubiert. Nach der erfolgten Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden das Gewebe mit einer Lösung aus 3,3'-Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid für 10 min im Dunkeln inkubiert und nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser mit Hämatoxylin gegengefärbt (3 min). Die Objektträger wurden nachfolgend für 10 min unter fließendem Wasser gewässert. Im letzten Schritt wurden die Objektträger zur Konservierung mit Alkohol gewaschen, luftgetrocknet und eingedeckt.

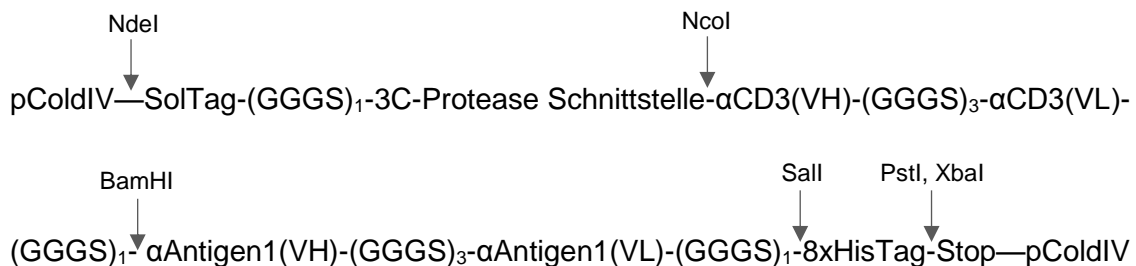
3.2.6 Klonierung und Transformation rekombinanter Antikörperkonstrukte

3.2.6.1 Klonierungsstrategie von Hemibodies

Um Hemibodies gegen die verschiedenen Oberflächenproteine zu entwickeln, wurden Aminosäuresequenzen von bereits bestehenden, patentierten Antikörpersequenzen durch GeneArt synthetisiert (Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific Inc., Regensburg, Germany). Die verwendeten Tumorantigen-Sequenzen wurden im Anhang in Tabelle 13 aufgelistet. Als CD3-spezifisches Antikörperfragment wurde das αCD3(scFv)-Fragment der de-immunisierten Version des CD3ε-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers L2K gewählt [178, 179]. Dieser αCD3 scFv wurde 2002 von Dreier et al. beschrieben, mit dem Hinblick auf dessen Kreuzreaktivität gegen Zellen von Cynomolgus-Affen (Makaken) und dem Ziel die humorale Immunantwort gegen murine Antikörpersequenzen zu verringern [180].

Der Aufbau eines Hemibody-Fragments strukturiert sich in folgende Teile: Zur Steigerung der Produktion und der Löslichkeit der Hemibodies wird N-Terminal ein Fusionstag exprimiert. Dieser dient zur verbesserten Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen innerhalb der Hemibodies und soll die Aggregation des Proteins in unlösliche Einschlusskörperchen verringern. Gewählt wurde das Fusionstag Thioredoxin 1 (Trx1). Trx1 ist ein Teil des *Shuffle T7 Express E.coli* RedOx-Systems und katalysiert die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb

des Zytoplasmas [181]. Daraufhin folgt eine Protease Schnittstelle („LEVLFQGP“), mit deren Hilfe das Fusionstag *in vivo nach* erfolgreicher Hemibody-Produktion durch eine co-exprimierte 3C-Protease enzymatisch abgetrennt wird. An diese Schnittstelle schließt sich die eigentliche Hemibody-Sequenz an. Sie kann unterteilt werden in das α -CD3(VH/VL) gefolgt von dem α Antigen(scFv) Fragment. C-Terminal wird ein 8x Histidin-Tag zur Aufreinigung und Detektion des Hemibodies verwendet. Jede Hemibody-Kassette kann über verschiedene enzymatische Schnittstellen ausgetauscht werden. Die verschiedenen Teile eines Hemibodies werden über GS-Linker verbunden, die die Faltung und Stabilität der Hemibodies unterstützten. Nach dem Zusammenfügen aller einzelnen Fragmente entstand folgendes Konstrukt:



3.2.6.2 Amplifikation der Hemibody-Fragmente

Um die von GeneArt synthetisierten Hemibody-Sequenzen gegen die verschiedenen Antigene zu vervielfältigen, oder um verschiedene Restriktionsschnittstellen einzufügen, wurde eine PCR durchgeführt. Gemäß der Beschreibung unter 3.2.2.6 wurde ein 50 μ l PCR Ansatz mit 4 μ l des Templates angesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 zu finden. Amplifiziert wurde mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	1 Minute	98 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung	20 Sekunden	98 °C	
Annealing	20 Sekunden	50–72 °C	
Extension	2,5 Minuten	72 °C	
Finale Extension	5 Minuten	72 °C	
Halten	4 °C		

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und die DNA-Banden aus dem Gel aufgereinigt.

3.2.6.3 DNA-Gelextraktion

Zur Weiterverarbeitung von einer spezifischen DNA-Sequenz wurde das entsprechende PCR-Produktbande unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem MiniElute Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Dieses Verfahren basiert auf der selektiven Bindung der DNA an eine Membran auf Siliziumdioxid-Basis in Gegenwart chaotropischer Salze.

3.2.6.4 Restriktionsverdau

Mittels Restriktionsverdau wurde das amplifizierte und aufgereinigte PCR-Produkt sowie der Vektor pColdIV mit identischen Enzymen geschnitten, um gleiche überlappende Enden für eine optimale Ligation zu schaffen. Es wurden 2-10 µg der Vektor-DNA und 1-5 µg der Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl für einen Verdau verwendet. Diese Mengen wurden mit 10x FastDigest Buffer versetzt und mit je 0,3 µl Enzym BamHI und XbaI bzw. Sall für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend je nach Enzym durch Hitzeeinwirkung inaktiviert und das verdaute Produkt aus einem 1 %igen Agarosegel aufgereinigt.

3.2.6.5 Dephosphorylierung des Vektors

Um eine spontane Religation des linearisierten Vektors zu verhindern, wurde am 5'-Ende der verdauten pColdIV DNA ein Phosphat abgespalten. Zu 20 µl des verdauten DNA-Vektor wurde 1 µl Alkaline Phosphatase und 2 µl 10x Fast AP Puffer zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert. Das Enzym wurde nach erfolgter Reaktion, durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 80 °C für 10 Minuten inaktiviert.

3.2.6.6 Ligation

Für die kovalente Integration des verdauten Inserts in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor wurde eine T4 DNA Ligase eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde 1 µl der T4 DNA Ligase mit entsprechendem 10x Puffer verwendet, um Insert und Plasmid im Verhältnis von 1:2 zu verbinden. Der Ansatz wurde 2-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde 2,5 µl jedes Ligationsansatzes in chemisch kompetente Bakterien transformiert.

3.2.6.7 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Unter natürlichen Bedingungen besitzen viele Bakterien die Fähigkeit DNA aus der unmittelbaren Umgebung aufzunehmen, jedoch nur mit geringer Effizienz. Eine Methode um die Aufnahme von DNA-Plasmiden in die Zelle zu erhöhen ist die Membran der Bakterien durch chemische Substanzen zu permeabilisieren. Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen der Stämme *OneShot Mach1 T1 E. coli* und *Shuffle T7 Express E. coli* wurde das Mix & Go! E. coli Transformation Kit von ZymoResearch nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Lagerung wurde die Bakteriensuspension in 100 µl aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren. Die Transformationseffizienz wurde über die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien aus 1 µg Plasmid-DNA bestimmt (*colony-forming-units per µg*). Die Transformationseffizienz lag üblicherweise bei 10^6 - 10^8 cfu/µg.

3.2.6.8 Transformation von *OneShot Mach1 T1 E.coli*

Zur Transformation der klonierten DNA-Plasmide in *OneShot Mach1 T1 E. coli* wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Je 10 µl dieser Bakterien wurden mit 2,5 µl der ligierten DNA versetzt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden Zellen zur effizienten Aufnahme der Plasmide bei 42 °C für 45 Sekunden erhitzt und für 5 Minuten auf Eis abkühlen. Die Transformationsansätze wurden in 300 µl LB-Medium pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 200 U/min geschüttelt. Da die transformierten Plasmide eine Ampicillin-Resistenz trugen, konnten erfolgreich transformierte Bakterien über dieses Antibiotikum selektioniert werden. 80 µl eines jeden Bakterienansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte mit Carbenicillin (0,1 mg/ml) ausgestrichen und die gewachsenen Bakterienkolonien, nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C, auf das gewünschte Plasmid untersucht.

3.2.6.9 Transformation von *Shuffle T7 Express E.coli*

Alle Antikörper wurden im Zytoplasma des Bakterienstammes *Shuffle T7 Express* bei niedrigen Temperaturen exprimiert. Neben den pColdIV-Hemibody-Plasmiden wurde ein 3C-Protease-pRSFDUET-Plasmid co-transformiert. Dieses sorgte für die intrazelluläre Abtrennung des Fusionstags. Dafür wurden zuerst kompetente *Shuffle T7 Express E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und 100 µl Bakterien mit 1 µl 3C-Protease Plasmid (100 ng) versetzt. Aus diesem Ansatz wurden 30 µl entnommen und zu je 1 µl pColdIV Hemibody-Plasmid (30-100 ng) pipettiert. Dieser Bakterienansatz wurde zur Transformation 30 Minuten auf Eis inkubiert und zur Plasmidaufnahme für 45 Sekunden bei 42 °C erhitzt. Zum Abschluss der Transformation wurden die Bakterien für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und für 1 h mit 200 µl 2x YT-Medium geschüttelt. Mit diesem Ansatz wurde eine Übernachtskultur von 2 ml 2x YT Medium (+ Carbenicillin/Kanamycin, Verhältnis 1:1333) inokuliert und bei 30 °C und 200 U/min geschüttelt. Bis zur Verwendung der Bakterien in einer Hemibody-Produktion wurden die Zellen bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.6.10 Selektion positiver Klone durch PCR

Um Bakterienklone mit dem richtigen transformierten Klonierungsprodukt zu identifizieren wurde eine PCR der auf der LB-Agarplatte gewachsenen Einzelzellkolonien durchgeführt. Einzelne Bakterienklone wurden in 250 µl LB-Medium mit Carbenicillin (0,1 mg/ml) transferiert und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Anschließend wurde 1 µl Bakteriensuspension in eine 10 µl PCR Reaktion mit Q5 High-Fidelity DNA Polymerase und den Primern pColdIV fwd. und pColdIV rev. nach Protokoll und Programm unter 3.2.2.6 und 3.2.6.2 mit 27 Zyklen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und positiv ligierte Klone, die das Insert beinhalten, aufgrund der Größe ermittelt.

3.2.6.11 Plasmid DNA-Isolation

Zur Vervielfältigung von DNA-Plasmiden wurde eine Übernachtkultur des Plasmid-tragenden Bakterienstammes in LB-Medium und Carbenicillin oder Kanamycin (0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml) angesetzt. Für eine Plasmid Mini-Präparation wurden 3 ml, für eine Midi-Präparation 100 ml und für eine Maxi-Präparation > 250 ml Kultur verwendet. Jeder Ansatz wurde mit 0,1 % des Gesamtvolumens mit einem positiven Bakterienklon inokuliert und dieser über Nacht unter Schütteln hochgezogen. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolierung mittels QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen und bei größeren Mengen mittels NucleoBondR Xtra Maxi Kit von Machery-Nagel nach Herstellerangaben. Die Bakterien wurden durch alkalische Lyse aufgebrochen, das Plasmid an eine Siliziumdioxid-Membran gebunden und RNA und Protein-Kontaminationen mittels Waschschritten entfernt. Die Plasmid-DNA wurde mittels Puffer oder dH₂O von den Säulen eluiert. Die DNA-Konzentrationen wurden im Nanadrop ermittelt und die DNA anschließend bei -20 °C gelagert.

3.2.6.12 Sequenzierung

Mit der DNA-Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde die Firma LGC Genomics GmbH beauftragt. Für die Sequenzanalyse wurde nachfolgend die Programme ApE und SnapGene für Sequenzalignments sowie BLAST und ExpASy für Aminosäurealignments verwendet.

3.2.6.13 Kryokonservierung prokaryotischer Zellen

Zur Kryokonservierung der transformierten, Plasmid-tragenden Bakterienstämme wurden die Bakterien in Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,6 mit Glycerolstockpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. 1 ml dieser Lösung wurde in einem 2 ml Kryogefäß bei -80 °C eingefroren.

3.2.7 Prokaryotische Expression rekombinanter Antikörper

Alle Hemibody-Fragmente wurden in einem prokaryotischen Zellsystem produziert. Die prokaryotische Proteinproduktion bietet im Vergleich zu der eukaryotischen Proteinproduktion einige Vorteile wie einfache Handhabung, schnelle Produktion durch geringe Verdopplungszeit mit sehr dichten Kulturen, einer Vielzahl an gut etablierten Produktionssystemen und geringe Kosten. So war eine sehr schnelle und einfache Produktion einer Vielzahl an Hemibody-Fragmenten möglich. Die Antikörperfragmente wurden im Zytoplasma der *Shuffle T7 Express E.coli* Zellen, unter Verwendung des Expressionsvektors pColdIV, hergestellt. Jedes Antikörperfragment wurde in 2x YT Medium mit 0,1 % v/v Glukose und 75 µg/ml Carbenicillin und 37,5 µg/ml Kanamycin angesetzt. Der Produktionsansatz wurde mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 aus einer Übernachtkultur der transformierten Bakterien inokuliert und unter Schütteln bei 30 °C, 125 U/min auf eine OD₆₀₀ von 1,0 expandiert. Um die Bildung von Einschlusskörperchen

zu verringern wurden die Bakterien, nach dem Erreichen der gewünschten Dichte, für 2 h auf 14 °C heruntergekühlt. Anschließend konnte, durch Zugabe von 1 mM IPTG, über den Lac-Promotor die T7 RNA Polymerase und folglich auch die Proteinexpression gestartet werden. Diese erfolgte bei 14 °C über Nacht für etwa 15-16 h.

3.2.8 Zellaufschluss mittels Überdruck

Die produzierten Antikörperfragmente wurden mittels Überdruck aus dem Zytoplasma der verwendeten Bakterien isoliert. Um während der Aufreinigung die Proteine vor Degradation durch Proteasen zu schützen, erfolgten alle Schritte bei 4 °C. Die *E. coli* Bakteriensuspension von 1-10 l wurde zuerst durch eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 4000 U/min geerntet und das Zellpellet in Co-IMAC Ladepuffer entsprechend der End-OD₆₀₀ und dem aufzureinigenden Gesamtvolumen gelöst. Das Aufbrechen der Bakterienzellen erfolgte durch Druck mittels einer French Press EmulsiFlex-C3 (Avestin Inc.). Für eine komplette Lyse der Bakterienzellen empfiehlt der Hersteller drei Durchläufe der Bakterienlösung durch die French Press bei 10000-15000 psi. Nach diesem Vorgang wurden große bakterielle Bestandteile aus der Probe durch zwei Zentrifugationschritte von 20 Minuten bei 15000 x g und 4 °C und 0,2 µm Syring Filtrationen abgetrennt. Die exprimierten Antikörperfragmente befanden sich in Lösung und konnten von den restlichen Bakterienproteinen über ihr 8x His-Affinitätstag aufgereinigt werden.

3.2.9 Proteinisolierung mittels Extractor Puffer

Zur Isolierung der produzierten Antikörperkonstrukte aus dem Zytoplasma von Bakterien wurde bei Produktionsansätzen < 1 l die Zellwand der *ShuffleT7 Express E.coli* Zellen chemisch mittels Extractor Puffer nach Herstellerangaben lysiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Antikörperkonstrukte über das 8x His-Tag mittels Ni-NTA Spin Columns nach Angaben von Qiagen.

3.2.10 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Prinzip der hier durchgeführten IMAC basiert auf der Affinität von Proteinen mit Histidin-Resten an Metallionen. Histidin zeigt eine hohe selektive Affinität zu zweiwertigen Metallionen wie Ni²⁺ oder Co²⁺. Diese Metallionen können über vier ihrer insgesamt sechs Ligandenbindungsstellen, über einen Chelator wie Nitrilotriessigsäure (NTA), an das Chromatographiematerial immobilisiert werden. Über die restlichen zwei Ligandenbindungsstellen bindet das Metallion das His-Tag über dessen Elektronendonorguppen des Imidazolrings. Das His-Tag bildet einen Chelatkomplex mit dem Metallion (K_D 1 µM). Diese Bindung kann durch hohe Konzentrationen an freiem Imidazol, das mit dem Protein um die Bindung an dem Metallion konkurriert, wieder aufgebrochen werden.

Nach der Bindung der His-Tag-Proteine können Verunreinigungen von anderen Proteinen durch Puffer mit geringer Imidazolkonzentration gewaschen und anschließend das Protein durch steigende Imidazolkonzentration eluiert werden [182, 183].

3.2.10.1 IMAC mittels Co-Agarose Beads

Zur Aufreinigung der exprimierten Proteine aus dem E. coli Bakterienlysat von 1-5 l Produktionen wurde eine manuelle Aufreinigung über Cobalt-Agarose Beads durchgeführt. Alle Schritte erfolgten hierbei bei 4 °C. Je Ansatz wurden 500 µl Cobalt-Agarose Beadlösung (50 % Aufschwemmung), durch Waschen mit 10 ml dH₂O und Equilibration mit 10 ml Co-IMAC Ladepuffer, vorbereitet. Anschließend wurden die Beads in je 500 µl Co-IMAC Ladepuffer/Ansatz resuspendiert. Zu dem filtrierten Bakterienlysat wurde 500 µl Beadlösung pipettiert und zur Bindung der Hemibodies mit His-Tag, die Lösung für 1 h auf dem Drehrad inkubiert. Die Bead-Protein Verbindungen wurden bei 1000 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert und in 5 ml Co-IMAC Ladepuffer resuspendiert. Die Probenlösung wurde durch Gravitation über die Säule getropft und die Beads hierbei auf einem Filter am Ende der Chromatographiesäule aufgefangen. Dieses Beadbett von 250 µl wurde nachfolgend, durch Zugabe von 5 Säulenvolumen (SV) an Co-IMAC Ladepuffer, 50 SV Co-IMAC Waschpuffer und weiteren 10 SV Co-IMAC Ladepuffer, von unerwünschten Proteinen und Endotoxinen gereinigt. Das gewünschte Produkt wurde mit 5 SV Co-IMAC Elutionspuffer von den Beads eluiert.

3.2.10.2 IMAC über das Äkta Start Chromatographie System

Die Aufreinigung von 5-10 l Antikörper Produktionsansätzen erfolgte mittels Äkta Start Chromatographie System (GE healthcare). Das E. coli Lysat wurde hier auf eine 5 ml HiTrap Talon crude IMAC-Säule mit einer Flussrate von 2-5 ml/min aufgeladen. Unreinheiten und Endotoxin wurden durch Waschen mit 5 SV IMAC Ladepuffer, 50 SV IMAC Waschpuffer und 10 SV IMAC Ladepuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min entfernt. Das gebundene Protein wurde mit 5 SV IMAC Elutionspuffer bei 3 ml/min von der Säule eluiert. Das Eluat wurde bei 4 °C für ein bis zwei Tag gelagert und anschließend weiter mittels Entsalzung, Ionenaustausch und Größenausschlusschromatographie aufgearbeitet.

3.2.11 Umpufferung des aufgereinigten Proteins

Für Analysen der produzierten Hemibodies (> 5 l Produktionsansätzen), bezüglich Bindung und Funktionalität, mussten diese in 1x PBS umpuffered werden, da das Imidazol bereits bei geringen Konzentrationen zytotoxische Effekte auf eukaryotische Zellen besitzt. Die Umpufferung erfolgte über Ultrazentrifugationseinheiten mit einem Größenausschluss von 30 kDa nach Herstellerangaben bis zu einer finalen Imidazolkonzentration in der Lösung von

< 1 mM. Die Probe wurde mit einem 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.12 Entsalzen und Pufferaustausch

Da bei dem Eluieren des Proteins in der IMAC der Salzgehalt in der Probe für eine direkt anschließende Ionenaustauschchromatographie zu hoch ist, wurde die Probe entsalzt und der Puffer ausgetauscht. Dieser Schritt ist eine effektive Methode um Verunreinigungen mit geringer Molekulargröße schnell zu entfernen und im selben Schritt das gewünschte Protein in einen geeigneten Puffer für nachfolgende Aufreinigungen zu überführen. Diese Methode basiert auf einer Gelfiltration. Hierbei werden die in der Probe enthaltenen Substanzen nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Polymere der Gelfiltrationssäule bilden eine Porenstruktur, in die kleine Moleküle eindringen können. Je kleiner das Molekül, desto weiter kann es in die Gelmatrix eintreten. Proteine, die größer sind als die Porengröße, verhalten sich gleich zueinander (Ausschlussgröße). Sie können nicht in die Gelmatrix einwandern und treten zuerst aus der Säule. Die kleineren Moleküle und Salze brauchen daher länger und eluieren erst nach dem Durchlauf von etwa einem Säulenvolumen. Entsalzung ist auch über Dialyse möglich, birgt jedoch, neben dem längeren Zeitaufwand, die Gefahr, dass die Aktivität des gewünschten Produkts verringert wird. Zur Aufreinigung der produzierten Antikörper wurde eine Entsalzung mittels einer HiPrep 26/10 Desalting Säule (GE Healthcare©) unter Verwendung des Äkta Pure Systems gewählt. Hierbei wurde die Säule mit dH₂O und dem Puffer Entsalzungs- und IEX-Puffer gewaschen und equilibriert. Aus dem IMAC-Eluat wurden Präzipitate ≥ 0,2 µl filtriert und dann in 10 ml Schritten, bei einer Flussrate von 5 ml/min, auf die Säule geladen. Zur ausreichenden Trennung zwischen Proteinen und Salz sollte das Probenvolumen 10 % des Säulenvolumens nicht übersteigen. Mit dem 1,7-fachen SV wurden die größeren Moleküle mit dem Entsalzungs- und IEX-Puffer aus der Säule gespült und aufgefangen. Kleinere Moleküle und Salz wurden verworfen. Die fertigen Eluate wurden zusammengefügt und in einer Ionenaustauschchromatographie weiter aufgearbeitet.

3.2.13 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX, *ion exchange chromatography*) trennt Moleküle basierend auf ihrer Nettoladung bei einem bestimmten pH-Wert. Proteinladungen sind abhängig von der Anzahl und Art der ionisierbaren AS-Seitengruppen. Jedes Protein besitzt einen spezifischen isoelektrischen Punkt (PI), einen pH an dem die Gesamtheit aller negativen und positiven Ladungen gleich Null ist. In einem gepuffertem System mit einem pH unterhalb des Proteins PI, ist das Protein positiv geladen, in einem gepuffertem System mit einem pH oberhalb des Proteins PI ist das Protein negativ geladen. Die Wahl der richtigen Chromatographie-Säule ist hierbei abhängig von der pH-Stabilität eines Proteins. Die

produzierten Antikörper besaßen im IEX- und Entsalzungspuffer eine positive Gesamtladung. Unter der Verwendung eines Anionenaustauschers mit kovalent gebundenen positive-Gruppen wurden negativ-geladenen Verunreinigungen gebunden und produzierte Hemibodies im Durchfluss gesammelt und aufgereinigt. Dieser Schritt erfolgte unter Verwendung einer 1 ml HiTrap Q XL Säule (GE Healthcare©). Nach dem Equilibrieren der Säule wurde die entsalzte Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Der Durchfluss mit dem gewünschten Protein wurde in Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden mit 7,5 SV die gebundenen Proteine bei einer Salzkonzentration von 3 M NaCl eluiert. Die Säule wurde anschließend mit 10 SV dH₂O gewaschen und in 20 % EtOH gelagert. Die Antikörper-enthaltenden Fraktionen wurden zusammengeführt und die Salzkonzentration mit einer 3 M NaCl Lösung auf 300 mM ausgeglichen. Diese Lösung konnte bis zur weiteren Aufarbeitung durch einen Größenausschluss bei 4 °C gelagert werden.

3.2.14 Gelchromatographie/Größenausschluss Chromatographie

Die Größenausschluss Chromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) ist eine chromatographische Methode, bei der Moleküle in einer Gelmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Die Vorteile dieser Methode bestehen in der Abtrennung von Mono-, Di-, und Multimeren. Um die Molekülmasse der SEC-aufgereinigten Antikörperkonstrukts einzuordnen, wurden alle Säulen mit Standardproteinen von Sigma Aldrich kalibriert. Die Auftrennung erfolgte mit HiLoad 16/600 Superdex 200 µg Säule (GE Healthcare©) bei einer Flussrate von 1 ml/min unter Verwendung des Äkta Pure Chromatographie Systems. Die verwendete Säule wurde vor der Proben-trennung mit 5 SV dH₂O gewaschen und anschließend mit 5 SV SEC-Puffer equilibriert. Die auf 5 ml eingeeingte und filtrierte Probe wurden auf die Säule aufgetragen. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. Alle aufgereinigten Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die verwendete Säule wurde mit dH₂O gewaschen und in 20 % EtOH gelagert. Für erste biochemische Analysen des monomeren Gehalts jedes Antikörperkonstrukts, wurde je 50 µl eines IMAC-Eluats aus einem 1 l Antikörperproduktionsansatzes nach gleichem Protokoll auf eine Superdex 5/150 Increase Säule mit einer Flussrate von 0,3 ml/min aufgeladen und untersucht.

3.2.15 Biochemische Charakterisierungen der Hemibodies

3.2.15.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die von Ulrich K. Laemmli entwickelte SDS-PAGE durchgeführt. Die Auftrennung von Proteinen erfolgt hierbei durch eine vertikale Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel. Die Hemibodies wurden unter Verwendung der SDS-PAGE im Hinblick auf Konzentration, Reinheit und möglicher Degradation charakterisiert. Die Analyse erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Hierfür wurden

die Proteine mit 4x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und zum Aufbrechen der intramolekularen Tertiär- und Sekundärstruktur für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Dieses Vorgehen garantiert, dass Proteine nur aufgrund ihrer Größe und nicht ihrer Ladung durch eine angelegte elektrische Spannung durch ein Gelsieb zur Kathode der Elektrode wandern. Kleine Proteine wandern schneller durch das Polyacrylamidgel als größere Proteine. Das verwendete Gel besteht aus einem Sammelgel, in dem die Proteine aufkonzentriert werden, und einem Trenngel, in dem die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das Gel wurde nach dem Schema aus Tabelle 11, zwischen zwei Glasplatten mit der Schichtdicke von 1,5 mm gegossen.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE

Bestandteil	5 % Sammelgel	12 % Trenngel
30 % Polyacrylamid-Mix	1,0 ml	4,0 ml
Ampuwa	4,1 ml	3,3 ml
1,0 M Tris, pH 6,8	750 µl	-
1,5 M Tris, pH 8,8	-	1,3 ml
10 % APS	60 µl	50 µl
TEMED	6 µl	2 µl

Als Laufpuffer wurde 1x SDS-PAGE-Puffer verwendet. Die vorbereiteten Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert, für 20 Minuten bei 90 V im Sammelgel ankonzentriert und für etwa 60 Minuten bei 125 V aufgetrennt.

3.2.15.2 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurde das SDS-Gel für 30 min mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Hierbei lagert sich das verwendete Coomassie-Brilliant-Blau an die basischen Seitenketten der Aminosäuren des Proteins an. So können Antikörperkonstrukte, als auch mit aufgereinigte Proteinverunreinigungen, detektiert werden. Nach der Färbung wird unspezifisch gebundene Färbelösung durch Inkubation mit Coomassie-Entfärbelösung aus dem Polyacrylamidgel gewaschen. Die Dokumentation der SDS-PAGE-Gele erfolgte mit dem Imaging System ChemiDoc der Firma BioRad. Die Proteinkonzentration wurde über die Relation mitgeführter BSA-Standards bestimmt.

3.2.15.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D)

Der K_D -Wert beschreibt als Konstante die Affinität eines Antikörpers (A) gegenüber seinem Paratop (B). Die Affinität eines Antikörpers ist dabei umgekehrt proportional zu dessen K_D -Wert. Der K_D -Wert setzt sich aus der Assoziationsrate (k_{on}) und der Dissoziationsrate (k_{off}) zusammen:

$$K_D = k_{on} / k_{off} = (A) * (B) / (AB)$$

Um Hemibodies biochemisch zu charakterisieren und sie mit anderen Antikörpern wie BiTE-Antikörpern zu vergleichen, wurde mittels eines CHO-zellbasierten ELISAs der K_D -Wert der Hemibodies bestimmt. Die verwendeten CHO Zellen trugen bis auf das stabil exprimierte Zielantigen kein weiteres humanes Protein. 15.000 CHO Zellen/100 μ l F12-K Zellkulturmedium wurden pro Well in einer transparenten 96-Wellplatte für 24 h bei 37 °C unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Überstand verworfen und die adhärennten CHO Zellen mit einer Antikörperverdünnungsreihe von 0,2-0,0008 μ M (Verdünnungsfaktor 1:2 und 1:10) in K_D -ELISA-Waschpuffer für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 250 μ l K_D -ELISA-Waschpuffer gewaschen. Gebundene Hemibodies wurde mit 50 μ l 6x His-Tag HRP Antikörper, in einer Verdünnung von 1:20000 in ELISA Puffer, für 1 h bei Raumtemperatur markiert. Nachfolgend wurden nichtgebundene 6x His-Tag HRP Antikörpern von den Zellen durch zweimalige Zugabe von 250 μ l K_D -ELISA-Waschpuffer und 300 μ l 1x PBS gewaschen und der gebunden Antikörperkomplex durch 50 μ l TMB Lösung detektiert. Die Reaktion wurde mit 50 μ l 1M H_2SO_4 Lösung abgestoppt und die Farbentwicklung bei einer Absorption von 450 nm im Tecan Spark Reader quantifiziert. Die K_D -Werte von Hemibodies bzw. von äquivalenten BiTE Antikörpern wurden mittels Graphpad Prism über nichtlineare Regression an die einzelnen Messpunkten (*one-site binding curve (hyperbole)*) und folgender Formel berechnet:

$$y = B_{\max} * x / (K_D + x)$$

y= y-Wert des Bindungsdiagramms

x= x-Wert des Bindungsdiagramms

K_D = Dissoziationskonstante (selbe Einheit wie x)

B_{\max} = erreichte Maximalwert an spezifischer Antikörperbindung (selbe Einheit wie y)

3.2.15.4 Schmelzpunktbestimmung (ThermoFluor Assay)

Eine Eigenschaft, die zur Beschreibung von Proteinen herangezogen wird, ist deren thermische Stabilität. Der Schmelzpunkt wurde mittels ThermoFluor Assays über SYPRO Orange ermittelt. SYPRO Orange ist ein Fluoreszenzfarbstoff der eine hohe Affinität zu hydrophoben Bereichen besitzt. In wässriger Lösung ist die Fluoreszenz von SYPRO Orange blockiert (Fluoreszenzlöschung). Entfaltet sich jedoch das Protein mit steigender Temperatur und exponiert hydrophobe Regionen, bindet SYPRO Orange an diese Domänen und fluoresziert. Die entstehende Fluoreszenz kann im qPCR Cycler detektiert werden und ist am höchsten, wenn der Antikörper komplett entfaltet ist. Wenn das Protein nachfolgend bei steigender Temperatur unspezifisch aggregiert oder zerfällt löst sich das SYPRO Orange von den zerfallenden hydrophoben Bereichen und dessen Fluoreszenz wird wieder gelöscht [184]. 1-5 μ g des zu untersuchenden Antikörpers wurden in 22,5 μ l SEC-Puffer mit 2,5 μ l 2,5 % SYPRO Orange-Lösung versetzt und die Fluoreszenzveränderung im qPCR Cycler bei einem

Temperaturgradienten von 25 °C auf 95 °C mit einer Erhöhung von 1 °C/Minute gemessen. Für die Fluoreszenzaufzeichnung wurde das qPCR CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager verwendet, welches den Schmelzpunkt über die spezifischen SYPRO Orange Fluoreszenzkurve mittels folgender Formel bestimmt.

$$T_m = -d(RFU)/dT$$

T= Temperatur (°C)

T_m = Schmelzpunkt bei einer gewissen Temperatur (°C)

RFU= relative gemessene Fluoreszenz

3.2.15.5 EC₅₀ Wert-Bestimmungen

Als mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) wird die Konzentration bezeichnet, bei der an einer Dosis-Wirkungs-Kurve ein halbmaximaler Effekt gemessen werden kann. Er wird üblicherweise bestimmt, um die Wirksamkeit eines Medikaments einzuschätzen. Die Dosis-Wirkungskurven wurden mit Antikörperkonzentrationen von 20 nM in einer seriellen 1:3 Verdünnung mittels Luziferase-Assays (3.2.16.3) von Zielantigen-positiven CHO Zellen und MM.1S Multiplen Myelomzellen erstellt. Anhand der interpolierten Messwerte wurde eine sigmoidale Funktion erstellt auf deren Basis, über Graphpad Prism, der EC-50 Wert berechnet wurde.

3.2.16 Funktionelle Assays

3.2.16.1 Hemibody-vermittelte Bindung zwischen T- und Tumorzellen

Hemibody-Fragmente sollen sich auf Tumorzellen komplementieren, ein funktionales αCD3-Molekül ausbilden und so T-Zellen mit der malignen Zelle vernetzen. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen wurden 2 x 10⁵ MM.1S Zellen in 100 µl Medium resuspendiert und mit 1 µl Vybrant DiO Zellfarbstoff für 20 Minuten bei 37 °C unter Lichtausschluss angefärbt. Gleichzeitig wurden 2 x 10⁵ T-Zellen in 100 µl Zellkulturmedium mit 0,25 µl Cell Tracker Deep Red rot markiert. Anschließend wurden Ziel- und Effektorzellen zweimal mit 15 ml Medium gewaschen, im Verhältnis 1:1 zusammen pipettiert und mit 500 ng Hemibody oder BiTE Antikörper für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Antikörper-vermittelte Aggregation von Tumor- zu Effektorzellen im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.16.2 IL-2/IFN-γ ELISA

IL-2 und IFN-γ sind Zytokine, die von T-Zellen nach deren Aktivierung sezerniert werden, um weitere T-Zellen zu aktivieren und deren Differenzierung in T-Zell Subtypen einzuleiten [185, 186]. Über die Sezernierung von IL-2 und IFN-γ wurde der Aktivierungsstatus der T-Zellen nach der Hemibody-vermittelten Rekrutierung an die Tumorzelle überprüft. 1 × 10⁵ Tumorzellen wurden mit 5 × 10⁵ PBMCs von gesunden Spendern in 100 µl pro Well in eine

96-Well-Platte (Tumor- zu T-Zell Ratio 1:5) pipettiert und mit Hemibodies bzw. BiTE Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen versetzt. Die Zellen wurden für 12-20 h bei 37 °C und 5 % CO₂ co-kultiviert. Die Konzentration der Zytokine im Überstand wurde anschließend mittels ELISA (IL-2 ELISA Kit, IFN- γ ELISA Kit nach Herstellerangaben) quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen mit 0,5 μ g des T-Zell-aktivierenden Mitogens Concanavalin A (*ConA*) behandelt.

3.2.16.3 Luziferase Viabilitäts-Assay

1 $\times 10^3$ *firefly*-Luziferase-positive (fLuc+) Tumorzellen wurden mit 5 $\times 10^3$ PBMCs in 100 μ l pro Well einer weißen 96-Well-Platte (Tumor- zu T-Zell Ratio 1:5) pipettiert und mit 20 μ l Hemibodies bzw. BiTE Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen versetzt. Die Platte wurde für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach erfolgter Inkubation wurde die intrazelluläre Luziferase-Aktivität der vitalen Zellen durch die Zugabe von 0,5 mM D-Luziferin und Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C ermittelt. Die Lichtemission, die bei der Umsetzung von Luziferin in Oxiluziferin von vitalen Zellen entsteht, wurde mit dem Infinite M200 pro ELISA Reader quantifiziert und die prozentuale Rate der Tumorzelllyse anhand der Kontrollen ermittelt.

Bei Luziferase Viabilitäts-Assays mit rekombinanten CHO Zellen wurden 15.000 CHO Zellen in 50 μ l F12-K Vollmedium pro Well einer weißen 96-Well-Platte für 1 h bei RT und anschließend 25 h bei Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Nachfolgend wurden 75.000 PBMCs in 50 μ l F12-K Medium und 20 μ l Hemibodies in einer seriellen Verdünnungsreihe zupipettiert. Weiter wurde nach gleichem Protokoll, wie für Tumorzellen beschrieben, verfahren.

3.2.17 *In vivo* Mausmodell

Immundefiziente NOD SCID Mäuse wurden von Charles River bezogen und in einer Zertifizierten Einrichtung (Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM), Uniklinikum Würzburg) nach europäischen Richtlinien gehalten. 17 weiblichen Mäusen im Alter von 14 Wochen wurden 2 $\times 10^6$ fLuc+ MM.1S Zellen in die Schwanzvene injiziert. Nach 14 Tagen und einer erfolgreichen Tumorentwicklung wurden 2 $\times 10^7$ PBMCs durch die Schwanzvene appliziert. Ab diesem Tag (Tag 0) wurde den Mäusen für 7 Tage täglich 8 μ g Hemibody α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38(scFv) einzeln und in Kombination und zur Positivkontrolle 8 μ g BiTE Antikörper α CD3(scFv)- α SLAMF7(scFv) subkutan verabreicht. Als Negativkontrolle wurde drei Mäusen steriles 1x PBS injiziert. Von Tag 7 bis Tag 13 wurde die Antikörperapplikation der BiTE und Hemibody Mausgruppe beendet und das Tumorwachstum weiter beobachtet. Um das Wachstum der fLuc+ MM.1S Zellen zu detektieren wurde jeder Maus an Tag 0, Tag 4, Tag 7 und Tag 13 400 μ l Anästhesie Cocktail bestehend aus 200 μ l Luziferin (30 mg/ml) und 200 μ l Anästhesiemix (Ketavet 8 mg/ml

und Xylavet 1,6 mg/ml) intraperitoneal verabreicht. Nach einer 5-Minütigen Inkubation wurde das Luziferase Signal der MM.1S Zellen mittels IVIS Lumina XR Real-Time Bioluminescence Imaging System detektiert und ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Antigenidentifizierung für eine Tumor-spezifische Immuntherapie

Die Grundlage für eine erfolgreiche Immuntherapie besteht neben dem Antikörperformat in der Wahl des richtigen Zielmoleküls auf der Tumorzelle. Bislang sind nur wenige tumorspezifische Antigene bekannt. Viele Antikörperformate stoßen an ihre Grenzen, da das adressierte Tumorantigen häufig auch auf gesunden Körperzellen zu finden ist. Um *on-target/off-tumor* Effekte zu reduzieren und eine sicherere Immuntherapie zu gewährleisten, adressieren Hemibodies eine aberrante Antigen-signatur aus zwei Antigenen auf der Tumorzelle. Um geeignete Antigenkandidaten zu identifizieren wurde der in Abbildung 7 dargestellte Algorithmus durchgeführt.

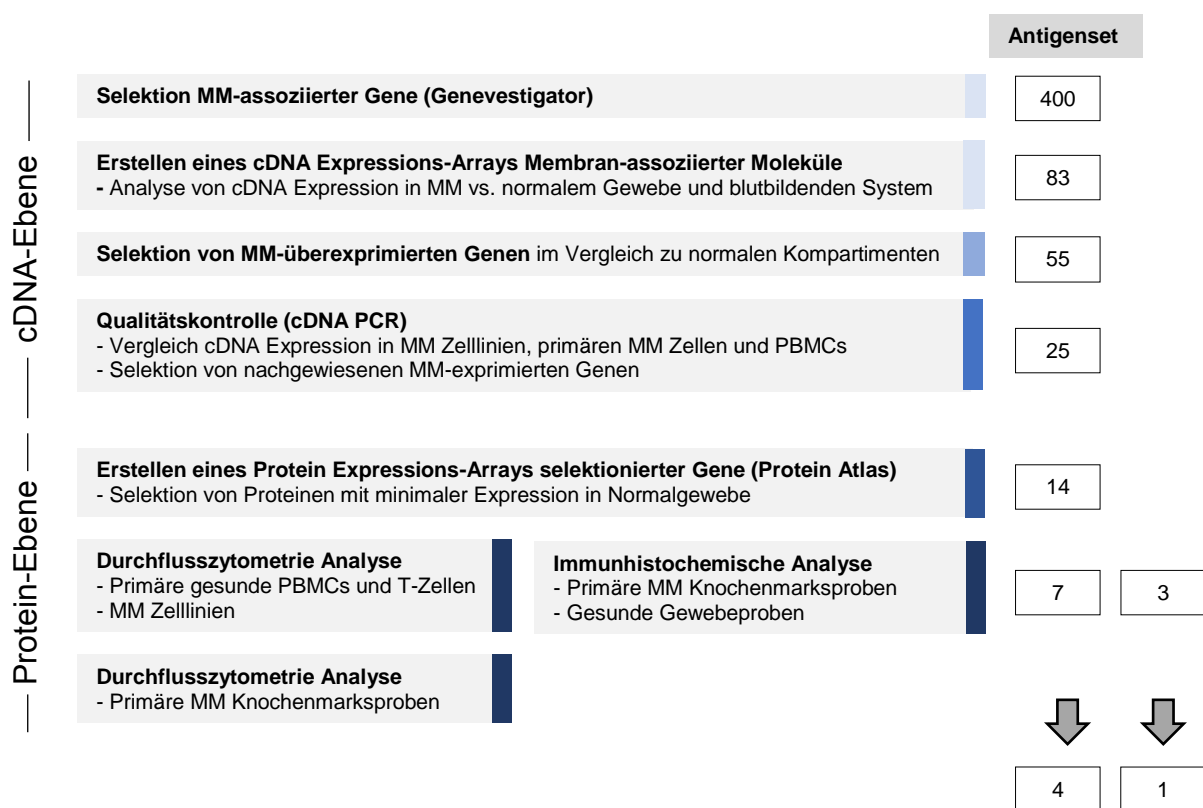


Abbildung 7: Algorithmus zur Identifizierung von MM Antigenkandidaten. Einzelne Schritte zur Definition von geeigneten Tumorantigenen mit hoher Expression auf MM Zellen aber niedriger Expression auf normalen Zellen. Die Antigenauswahl erfolgte beginnend mit einem Screening auf cDNA-Ebene, gefolgt von Analysen auf Protein-Ebene. Die Anzahl der selektionierten Gene ist in den weißen Kästen (rechts) aufgeführt.

4.1.1 Identifizierung relevanter MM Antigene

Um Moleküle zu identifizieren, die auf MM Zellen hoch exprimiert werden, wurde die Datenbank Genevestigator durchsucht. Diese listet cDNA-Expressionsdaten relevanter Kandidaten-Antigene auf. Aus den identifizierten cDNA Sequenzen wurde ein Array erstellt (Abbildung 8), der die Expressionsintensität ausgewählter Antigene in primären MM-Proben, Normalgewebe, sowie Blutzellen, B- und T-Zellen vergleicht. Die Antigene wurden von links nach rechts mit abfallender durchschnittlicher cDNA Expression innerhalb der MM Probengruppe geordnet. In der Kategorie Multiples Myelom wurde die Expression von oben nach unten nach der durchschnittlichen Expression von BCMA (TNFSRF17) sortiert, beginnend mit den Proben mit der höchsten BCMA Konzentration. BCMA wurde als Antigen mit der durchschnittlich höchsten cDNA Expression in den meisten Primärproben identifiziert. Es wurde daher als Standard zum Vergleich der anderen Gene gewählt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass die durchschnittliche Expression aller ausgewählten Gene in Normalgewebe gering ist. In der Kategorie Blut, B- und T-Zellen ist das cDNA Signal einiger Antigene wie CD48, ICAM3, ICAM2 usw. erhöht. Das angegebene prozentuale Expressionspotential dieser Gene liegt in den Kontrollgruppen zwischen 60-85 %. Um Gene zu definieren, die nur in den MM-Proben hochexprimiert sind, wurden alle Gene mit einem prozentualen Expressionspotential von > 50 % in den Kontrollgruppen aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Bei der Betrachtung der Expression der ausgewählten Gene wurden in den MM-Proben zwei Cluster mit unterschiedlichem Immunphänotyp ersichtlich. Diese wurden als Gruppe 1 und Gruppe 2 gekennzeichnet. Gruppe 1 enthält bekannte Zielmoleküle wie CD138, CD38, BCMA, SLAMF7 und betrifft etwa $\frac{3}{4}$ aller Patienten-Proben. Hier zeigen alle Gene ein zu BCMA vergleichbares Expressionsprofil. Mit der Zunahme der BCMA Genexpression ist ein erhöhtes Expressionspotential der weiteren Gene zu detektieren. Gruppe 2 ist durch eine geringere Expression der Gruppe 1 Gene, wie BCMA, gekennzeichnet und erstreckt sich auf etwa $\frac{1}{4}$ aller Proben. Diese zweite Gruppe beinhaltet Antigene, die bislang nicht auf MM beobachtet wurden.

4.1.2 cDNA Nachweis ausgewählter Antigene

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse wurde RNA aus verschiedenen MM Zelllinien, Primärmaterial und PBMCs von drei gesunden Spendern aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Auf Grundlage dieser Templates wurde eine cDNA PCR durchgeführt, um das Vorhandensein spezifischer Genabschnitte zu überprüfen. Das Ergebnis dieser PCR ist in Abbildung 9 dargestellt. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne cDNA, als Positivkontrolle wurde eine PCR gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt, das als Haushaltsgen in allen Zellen exprimiert sein sollte. Anhand dieser Analyse konnte die Anwesenheit fast aller Gene aus Gruppe 1 aus dem cDNA Array bestätigt werden. Eine einheitliche Expression in allen Proben zeigten die bekannten Antigene CD38, BCMA, CD229 und CD138. Jedoch wiesen auch bislang weniger bekannte Moleküle für das MM wie der Erythropoietin-Rezeptor (EPOR, NCBI-ID: 2057), das *Cleft lip and palate transmembrane protein 1-like protein* (CLPTM1L, NCBI-ID: 81037), *Thioredoxin domain containing 15* (TXNDC15, NCBI-ID: 79770), *Solute carrier family 1 member 4* (SLC1A4, NCBI-ID: 6509) und *Lymphocyte transmembrane adaptor 1* (LAX1, NCBI-ID: 54900) eine ubiquitäre Expression auf. Nicht nachgewiesen werden konnte in allen untersuchten Proben die Gene *B and T lymphocyte associated* (BTLA, NCBI-ID: 151888), *Signaling lymphocytic activation molecule family member 1* (SLAMF1, NCBI-ID: 6504), *Lysosomal associated membrane protein family member 5* (LAMP5, NCBI-ID: 24141) und *integrin subunit alpha 8* (ITGA8, NCBI-ID: 8516). Aus Gruppe 2 wurden 10 Gene aus dem cDNA Array untersucht, die in den MM-Proben, verglichen zu den Kontrollgruppen, überexprimiert wurden. Hier konnten nur die Gene *Ring finger protein 215* (RNF215, NCBI-ID: 200312), *G protein-coupled receptor 32* (GPR32, NCBI-ID: 2854) und *cholinergic receptor muscarinic 5* (CHRM5, NCBI-ID: 1133) detektiert werden.

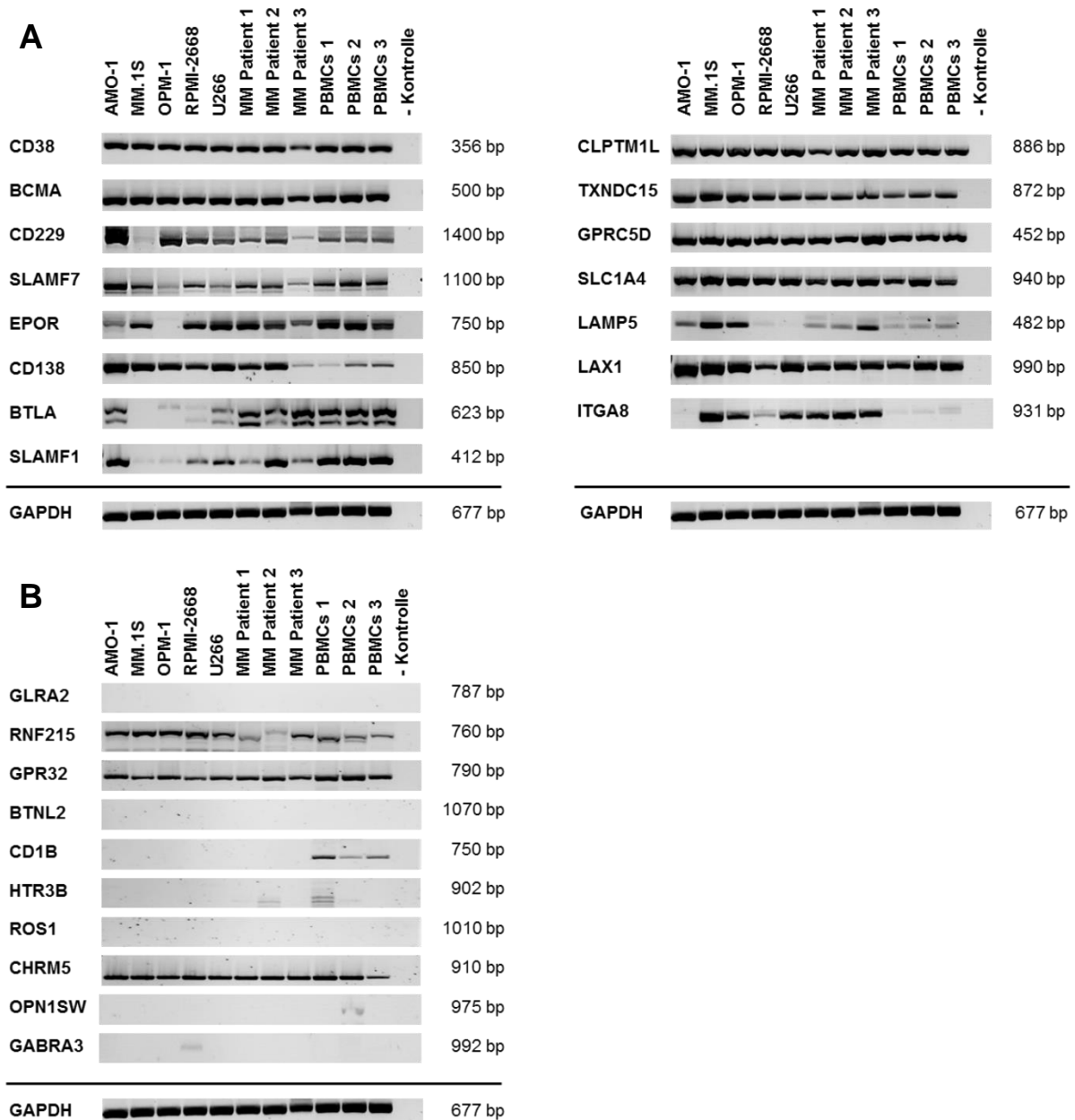


Abbildung 9: cDNA Expression ausgewählter Gene in MM Zelllinien, MM Primärproben und PBMCs. A) Zielgene Gruppe 1, B) Zielgene Gruppe 2 des Expressionsarrays. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne cDNA mitgeführt, als Positiv- und Beladungskontrolle wurde jede cDNA auf GAPDH untersucht. Aus Gruppe 1 wurden 10 Gene und in Gruppe 2 wurden 3 cDNA Abschnitte in allen untersuchten Proben detektiert.

4.1.3 Proteinexpression ausgewählter Antigene auf normalem Gewebe

Vor dem Nachweis der untersuchten und ausgewählten cDNA Sequenzen auf Proteinebene wurde eine Datenbankanalyse der Antigene in Normalgewebe durchgeführt. Hierfür diente der Humane Protein Atlas. Dieser Atlas wurde verwendet, um die Expression der bisher ausgewählten Zielmoleküle auf den Zelloberflächen von 44 gesunden Hauptgewebetypen des menschlichen Körpers zu veranschaulichen. Die angegebenen Daten wurden in der Abbildung 10 zusammengefasst. Aus dieser geht hervor, dass einige der Proteine wie SLAMF7, CD38,

wurde dagegen in mittleren Konzentrationen und gegen CD138, CD38, CD229 und SLAMF7 in sehr hohen Konzentrationen auf allen Tumorzellen gemessen. Auf normalen hämatopoetischen Zellen wie T-Zellen konnte ein sehr hohes CD38, CD229 und EPOR Signal detektiert werden. PBMCs zeigten dagegen nur eine mittlere BCMA und SLAMF7 Antikörperbindung. Die Antigene CD138 und LAX1 waren auf der Zellmembran von hämatopoetischen Zellen nicht messbar.

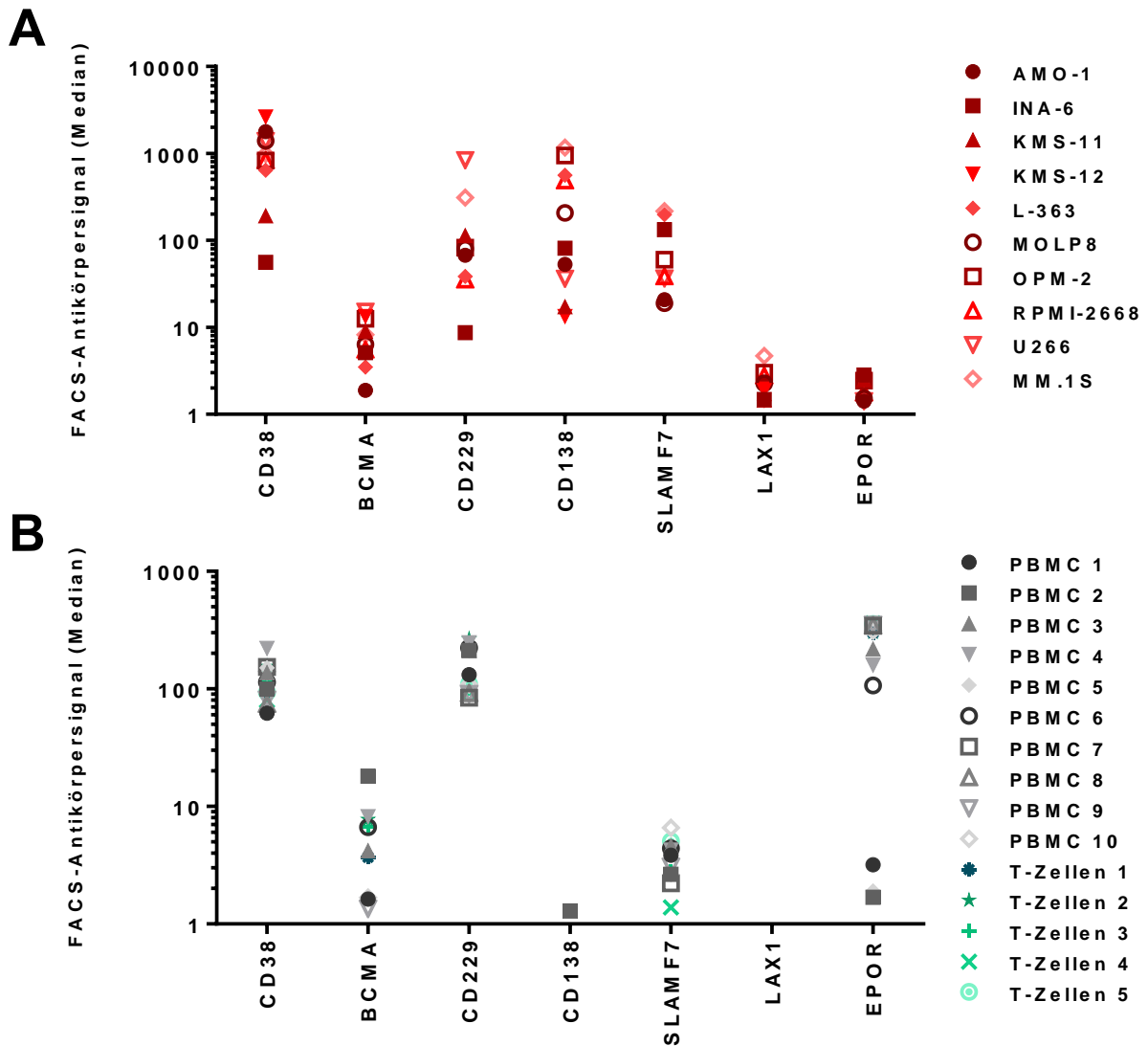


Abbildung 11: Durchflusszytometrieanalyse ausgewählter Antigene auf MM-Zelllinien und PBMCs und T-Zellen. Die Expression von 7 Antigenkandidaten wurde auf 10 MM Zelllinien (A), 10 PBMCs und 5 T-Zell-Proben gesunder Spender (B) im Durchflusszytometer untersucht. Als Negativkontrolle dienen zu den eingesetzten FACS-Antikörpern äquivalente Isotypen. Die Proteine CD138, BCMA und SLAMF7 zeigten auf MM im Vergleich zu T-Zellen ein erhöhtes Signal.

4.1.5 viSNE Darstellung primärer Knochenmarkszellen zur Visualisierung geeigneter MM Zielproteine

T-SNE ist eine Methode, um Zellen innerhalb einer Probe mit ähnlichem Immunphänotyp zu gruppieren und in einem zweidimensionalen Raum darzustellen. Der Abstand zwischen zwei Punkten repräsentiert hier den Grad an Ähnlichkeit den beide Zellen zueinander haben. Diese Methode wurde anhand des Visualisierungstool viSNE verwendet, um die Heterogenität eines Tumors zu veranschaulichen und um zu verstehen, welche Oberflächenproteine nur auf MM Zellen, aber nicht auf normalen Knochenmarkszellen, exprimiert werden. So sollten ideale Zielstrukturen für eine Immuntherapie identifiziert werden. Mittels Durchflusszytometer wurden Knochenmarksproben von über 30 MM Patienten auf ausgewählte Antigene vorangegangener Analysen und drei weiteren Proteinen CD70, BTLA und CD48 untersucht. Zur vereinfachten Durchführung der FACS-Analyse wurden zwei FACS-Ansätze erstellt. Im Ansatz 1 wurden die Proben auf die Existenz und Verteilung bereits bekannter MM Antigene hin untersucht. Ansatz 2 enthält dagegen potentielle neue MM Oberflächenmarker. Die Expressionshöhe eines Antigens ist anhand eines Wärmediagramms dargestellt. Hohe Antigenexpressionsraten sind dunkelrot gezeigt, niedrige dunkelblau. Zur Identifizierung von MM Zellen wurden in jedem Ansatz eine CD138 und CD38 Doppelfärbung mitgeführt. Sie zeichnen sich durch eine dunkle Rotfärbung vom Rest des Knochenmarks ab und sind aufgrund der individuellen Ähnlichkeitsanordnung innerhalb jeder Probe unterschiedlich lokalisiert. Als Negativkontrolle wurde das Knochenmark eines gesunden Spenders auf die Expression der gleichen Proteine untersucht und den MM-Proben gegenübergestellt.

Die Auswertung wurde in der Abbildung 12 am Beispiel dreier MM Patienten zusammengefasst. Gezeigt wird hier, dass das Knochenmark aller Patienten aus verschiedenen Subpopulation diverser Zellen mit unterschiedlichen Phänotypen besteht. Im Vergleich der MM Zellpopulation mit der Expression der weiteren Zielproteine, zeigt nur SLAMF7 und CD229 eine komplette MM Zellfärbung in allen drei MM Patienten. BTLA, CD48 und CD70 sind zum Teil auf weiteren Subpopulationen des Knochenmarks, jenseits der MM Zellen, zu finden. Weitere Antigene wurden dagegen nur auf einem Teil der MM Zellen detektiert. Alle untersuchten Antigene, bis auf eine breite CD38, CD48 und BTLA Expression, konnten hier im Knochenmark eines gesunden Spenders nicht detektiert werden.

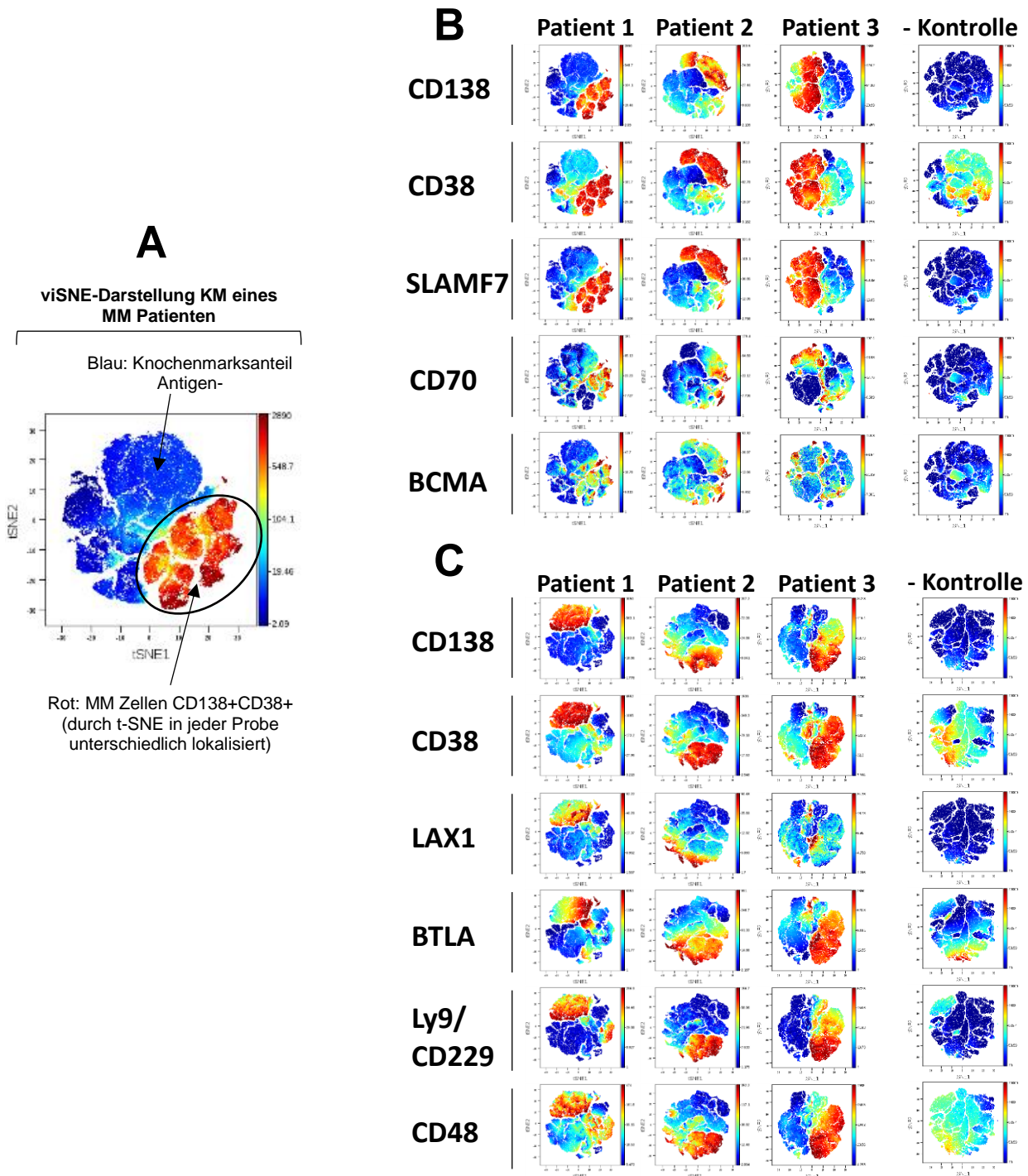
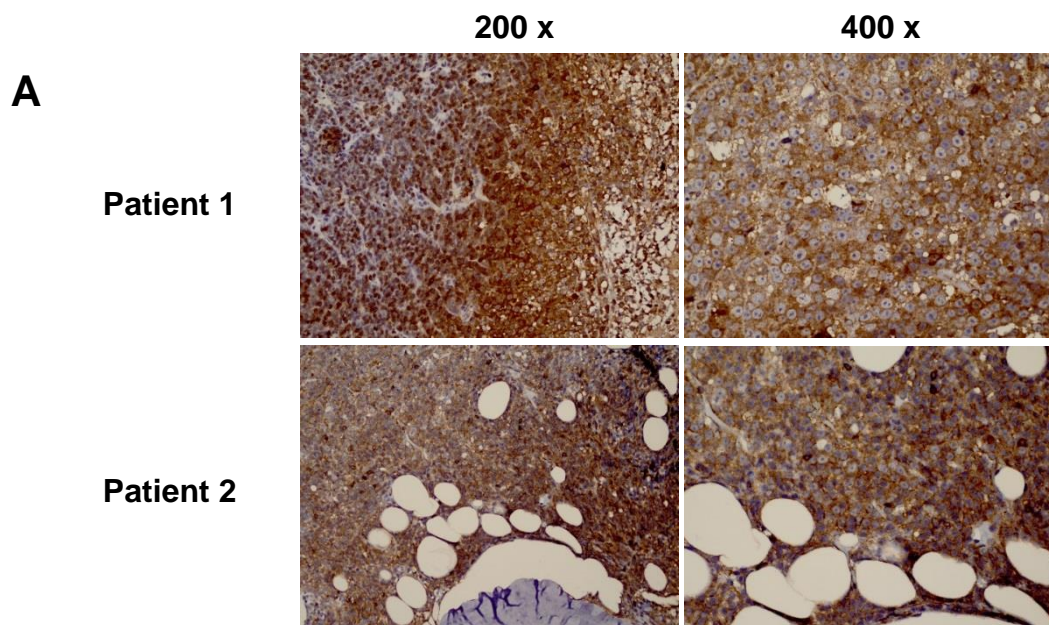


Abbildung 12: t-SNE Charakterisierung primärer Knochenmarksproben von Multiplen Myelom Patienten auf die Expression von Tumorantigenen. A) viSNE Zellkarte von 5000 Zellen nach untersuchter Expressionsintensität der einzelnen Zielantigene. Rot = hohe Expression, dunkel blau = keine Expression. **B)** Ansatz 1, beinhaltet bekannte und etablierte Antigene für das MM. **C)** Ansatz 2, zeigte mögliche neue Antigene für das MM neben CD138 und CD38. Als Negativkontrolle diente eine viSNE Analyse einer gesunden Knochenmarksprobe. Alle MM Zellen exprimieren CD38, CD138, SLAMF7 und CD229. (Die Rohdaten für diese viSNE Darstellung wurden in einer FACS-Analyse in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Kunzmann erhoben)

4.1.6 Antigenexpressionsanalyse neuer potentieller MM Zielmoleküle auf MM Primärmaterial und gesundem Gewebe

Aufgrund des Mangels an kommerziell erhältlichen FACS-Antikörpern wurde die Expression der Proteine der cDNA Gruppe 2 über IHC-Studien an MM Primärproben und gesunden Gewebe eines Arrays überprüft. Die Antigenexpression von CHRM5, RNF215 und GPR32 wurde hierbei auf 10 MM Patienten und 8 verschiedenen gesunden Gewebetypen (Ösophagus, Colon, Magen, Leber, Rektum, Lunge, Niere und Brust, n=6) durch das Pathologische Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Rosenwald, untersucht (Abbildung 13). Die Proteine GPR32 und RNF215 wurden auf allen untersuchten MM Primärproben, jedoch auch auf allen normalen Geweben ubiquitär exprimiert. Dagegen wurde das CHRM5 Oberflächenprotein nur bei 2 von 10 untersuchten primären MM-Proben in sehr hohen Konzentrationen im Zytoplasma detektiert. In den weiteren 8 untersuchten MM-Proben, lag CHRM5 nur in geringen Mengen vor. Jedoch konnte dieses, bislang als neuronal beschriebenes Antigen, auch im Zytoplasma der meisten untersuchten Normalgewebe detektiert werden.



B	Speiseröhre	Colon	Magen	Leber	Rektum	Lunge	Niere	Brust
CHRM5	Plattenepithel +	+/-	Schleimhaut +	+	+	+	+	+
GPR32	+	+	+	+	+	+	+	+
RNF215	+	+	+	+	+	+	+	+

Abbildung 13: IHC-Analysen von CHRM5, GPR32 und RNF215 auf MM Primärproben und gesundem Gewebe. IHC-Färbungen von Paraffinschnitten von 10 MM-Proben und 8 Typen von normalem Gewebe. **A)** CHRM5 IHC-Färbungen von 2 aus 10 MM Patienten mit hoher CHRM5 Expression im Zytoplasma. Braun= Antikörperfärbung, Blau= Zellkerne. Originalvergrößerung x200, x400. **B)** Übersicht IHC-Färbung mit CHRM5, GPR32 und RNF215 auf 8 gesunden Gewebetypen von insgesamt 48 untersuchten Proben. (IHC-Studien wurden vom Pathologischen Institut Würzburgs unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rosenwald angefertigt)

4.1.7 Geeigneter Antigenkombinationen für eine Hemibody-basierte MM Therapie

Hemibody-basierte Therapien besitzen den großen Vorteil, dass sie eine Kombination aus zwei Antigenen erkennen müssen, um eine Immunantwort zu initiieren. Um Antigenkombinationen mit spezifischem MM- Expressionsmuster zu identifizieren, wurden die ausgewählten Antigenkandidaten auf 44 Normalgeweben mittels HPA analysiert und via Durchflusszytometrie auf 10 primäre MM-Proben untersucht (Abbildung 14). Gezeigt werden die Antigene BCMA, CD38, CD138, CD229 (LY9) und SLAMF7 einzeln und in Kombination. Aus den erhobenen Daten des HPA wird deutlich, dass eine Antigenkombination aus CD38 und SLAMF7 oder CD38 und CD229 auf wenig Normalgewebe detektiert wird. Diese beiden Antigene waren gleichzeitig nur auf Zellen des Blinddarms, Knochenmarks, Lymphknoten und der Milz zu finden. Das Antigen CD138 wurde dagegen auf 25 von 44 Gewebetypen exprimiert. Dennoch war CD138 in Kombination mit SLAMF7, CD38 und LY9 nur auf 6 Gewebetypen messbar (Blinddarms, Knochenmarks, Lymphknoten, Rektum, Magen und Mandelgewebe). Expressionsdaten des Antigens BCMA waren im HPA nicht verfügbar. Jedoch wurde BCMA bislang nur als ein B-Zell spezifisches Antigen beschrieben. Knochenmarksproben von 10 MM Patienten mit einer durchschnittlichen Tumorlast von 21 % zeigten CD38 und SLAMF7 als beste Antigenkombination. Diese Antigene wurden in Kombination auf 97 % aller MM Zellen detektiert, waren jedoch außerhalb dieser Population nur in geringen Mengen auf gesunden Knochenmarkszellen zu finden. Eine Kombination aus CD138 und SLAMF7 wurde dagegen auf weniger MM Zellen (90 %) detektiert. CD38, CD138 und SLAMF7 in Kombination mit BCMA wurden in 10 Patienten auf bis zu 31 % aller gemessener MM Zellen detektiert.

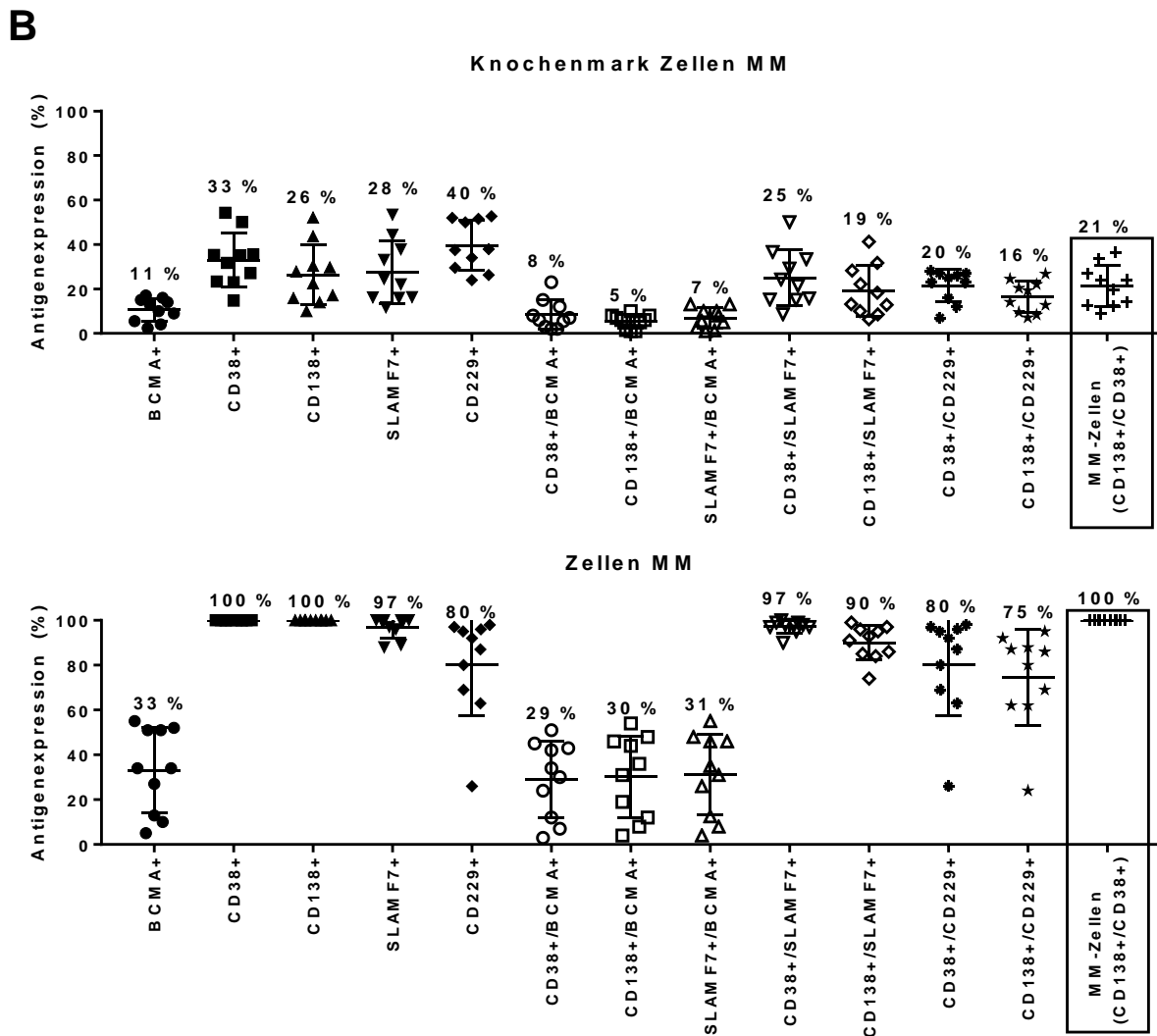
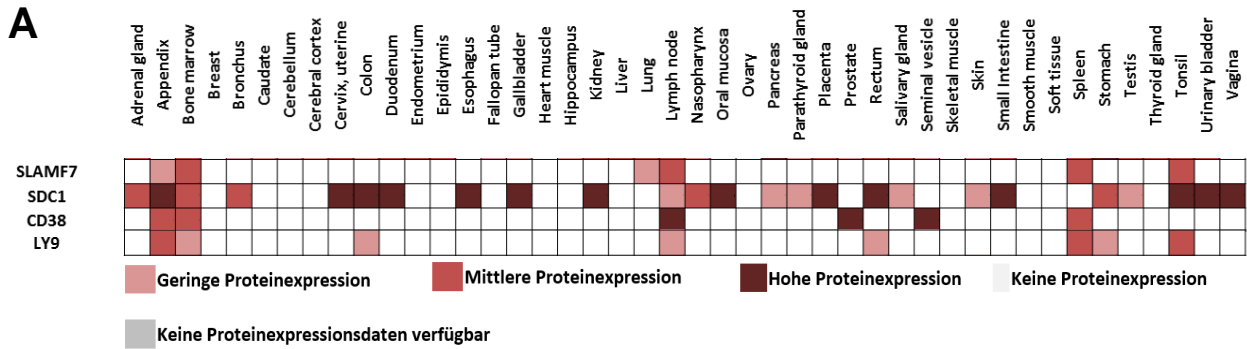


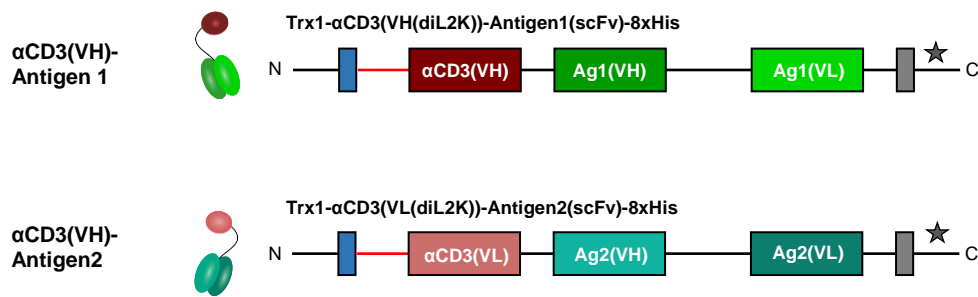
Abbildung 14: Kombinationsstudie zur Identifizierung von zwei Antigenen für eine Hemibody-basierte MM Therapie. A) Antigenexpression ausgewählter Kandidaten auf 44 Normalgewebe laut immunhistochemischen Daten des HPA. B) Kombinatorische Expression von BCMA, SLAMF7, CD229, CD38 und CD138 aus FACS-Analysen auf primären Knochenmarkspalten von 10 MM Patienten mit durchschnittlichen prozentualen Expressionswerten. KM=Knochenmark, MM= CD38+/CD138+ Multiple Myelom-Population von durchschnittlich 21 % aller Knochenmarkszellen. (Gezeigte FACS-Analyse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Kunzmann erhoben)

4.2 Design und Herstellung von Hemibodies

4.2.1 Design rekombinanter Hemibodies mit geteilter α CD3(VH/VL)-Domäne

Neben der Antigenidentifizierung für eine MM Immuntherapie war das zweite Ziel dieser Arbeit, basierend auf den vorhergegangenen Daten, die Herstellung, Testung und Identifizierung der besten Hemibody-Kombination für eine MM Therapie. Das Antikörperformat basiert auf zwei scFvs, welche auch in der BiTE-Technologie Anwendung finden [134]. Ein BiTE-Antikörper besteht aus zwei unterschiedlichen scFv, dem Effektormolekül und dem Tumorantigenmolekül, welche über einem Glycin-Serin-Linker verbunden sind. Der eine scFv besitzt hierbei eine Spezifität gegen die ϵ -Kette des humanen CD3-Rezeptors. Hierfür wurde das α CD3(scFv)-Fragment der de-immunisierten Version des CD3 ϵ -spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers L2K gewählt [178, 179]. Diese wurde bei dem Hemibody-Format in zwei Teile getrennt, der α CD3(VH)- und der α CD3(VL)-Kette. Jedes dieser geteilten α CD3-Effektormoleküle wurde C-Terminal über einen flexiblen GS-Linker (4 AS) mit einem zweiten Tumor-spezifischen scFv verknüpft. Zum Adressieren der Tumorzellen wurden bekannte scFv aus bestehenden Patenten verwendet (Tabelle 13). Gegen einige Tumorantigene wurden verschiedene Sequenzvarianten (V1-4) untersucht. Die VH- und VL-Ketten innerhalb eines scFv wurden über einen 15 AS langen, flexiblen GS-Linker verbunden. Dieser Aufbau, bestehend aus einer α CD3(VH)- oder α CD3(VL)-Kette fusioniert mit dem Tumor-spezifischen scFv-Fragment, bildet die Grundstruktur eines Hemibodies. N-Terminal besitzen alle Hemibodies ein Fusionstag, das die Löslichkeit und Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des rekombinanten Proteins während der Produktion verbessert. Hier wurde das Tag Thioredoxin1 (Trx1) verwendet. Dieses wurde in Vorversuchen aus 10 verschiedenen Fusionstags aufgrund verbesserter Produktionsausbeuten ausgewählt (siehe Anhang Abbildung 30). Trx1 wird nach der Produktion intrazellulär durch eine humane Rhinovirus 3C-Protease an einer spezifischen Schnittstelle, die auf die Trx1-Sequenz folgt, abgeschnitten. Zur Aufreinigung und Detektion der Hemibodies wurde C-Terminal ein 8x His-Tag angefügt. Als Positivkontrolle wurde zu jedem Hemibody der äquivalente BiTE entwickelt. Der Architektur der einzelnen Konstrukte ist in Abbildung 15 dargestellt.

Hemibodies:



BiTEs:

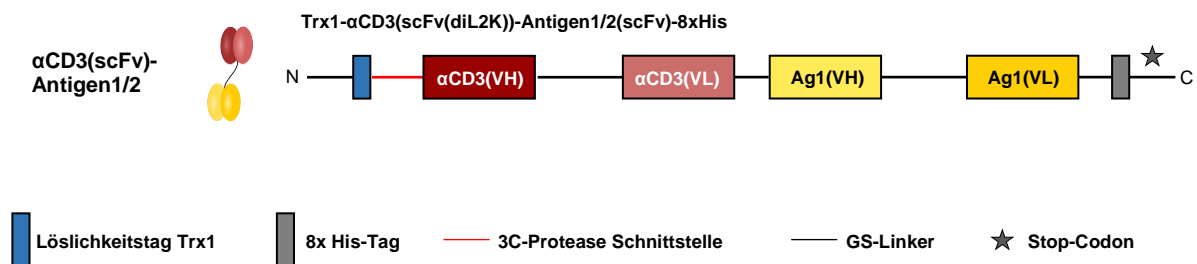


Abbildung 15: Schematischer Aufbau von BiTE Antikörpern und Hemibodies. BiTEs: Bestehend aus je zwei scFv gegen CD3ε und ein Tumorantigen. Hemibody: Aufgebaut aus einer VH- bzw. VL-Kette eines αCD3ε scFv und einem Tumorantigen-scFv. BiTE als auch Hemibody scFv-Fragmente werden über flexible GS-Linker verknüpft. Sie besitzen zudem N-Terminal ein Fusionstag (Trx1), das die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen innerhalb des Proteins während der Produktion verbessert und nach der Produktion über eine 3C-Protease abgeschnitten wird, C-Terminal enthalten alle Antikörper ein 8x His-Tag. Ag=Antigen, N=N-Terminus, C=C-Terminus

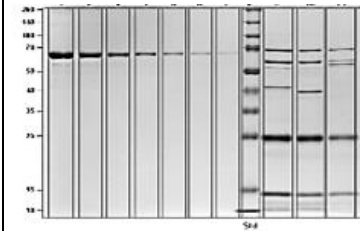
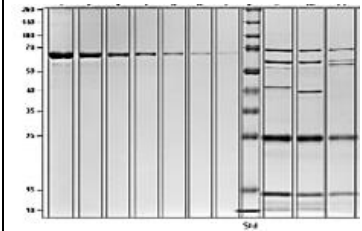
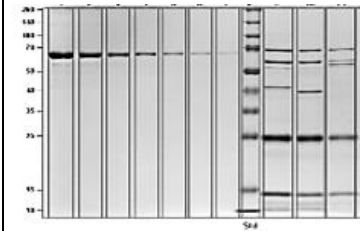
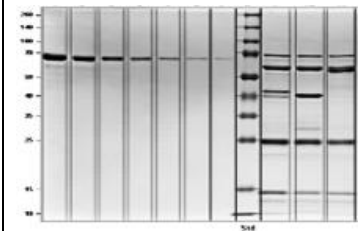
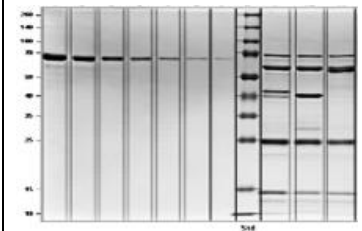
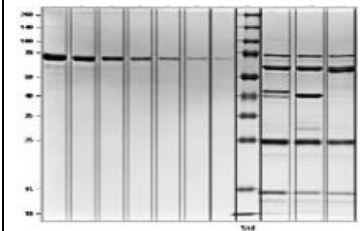
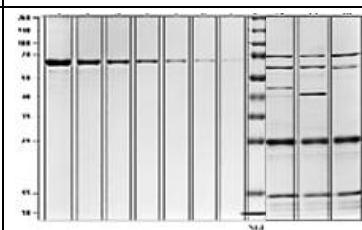
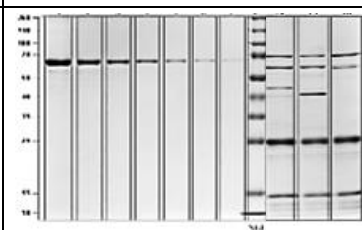
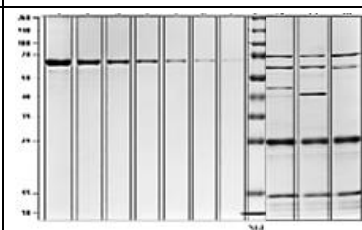
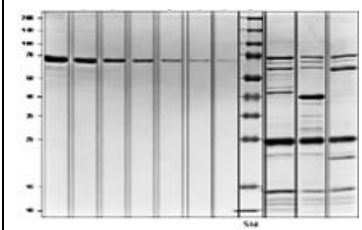
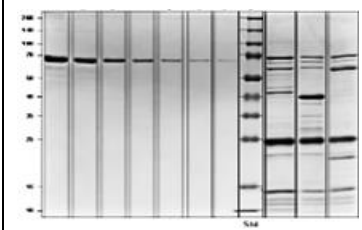
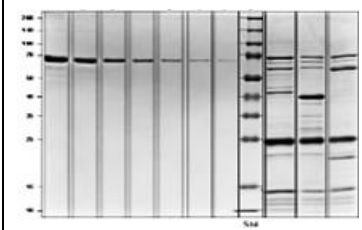
4.2.2 Antikörper Produktion

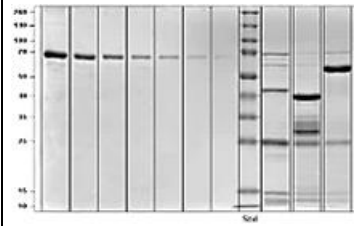


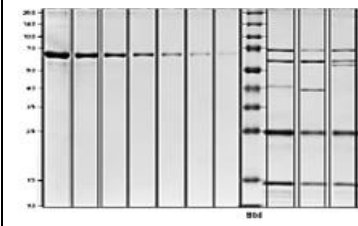


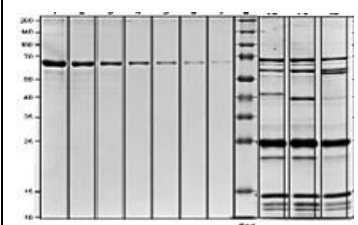


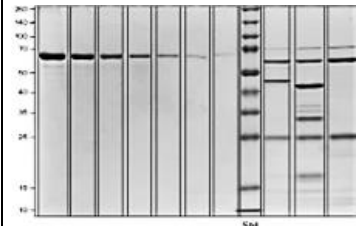
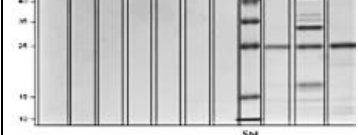

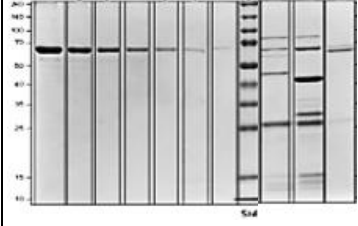
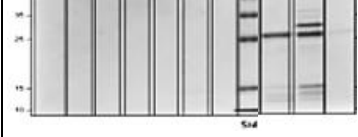

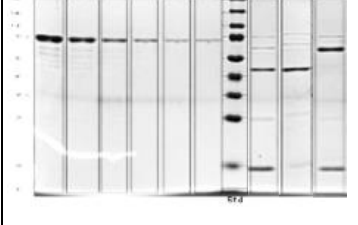
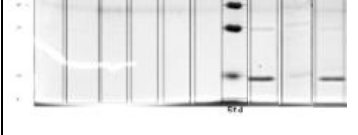

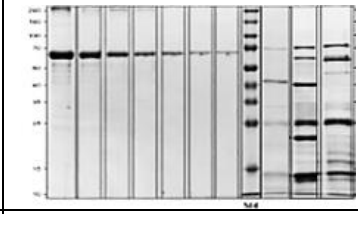

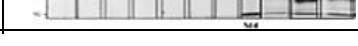
Alle in dieser Arbeit beschriebenen Antikörper, sowie deren Kontroll-BiTEs, wurden im Zytoplasma von *Shuffle T7 Express E.coli* Zellen produziert und nachfolgend über IMAC-aufgereinigt. Die Proteinkonzentration sowie Reinheit wurden über BSA-Standards in einem 12 % SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen mit Coomassie-Färbung bestimmt. BiTE Antikörper besitzen eine molekulare Größe von etwa 55-60 kDa, Hemibodies mit αCD3(VH)-Kette 42-45 kDa und Hemibodies mit αCD3(VL)-Kette 40-42 kDa. Um Hemibodies mit optimalen Eigenschaften bezüglich Produktion, Biochemie, Bindungsanalyse und Funktionalität zu identifizieren, wurden gegen einige Tumorantigene mehrere Hemibody-Varianten (V1-4) hergestellt, die über unterschiedliche Antikörpersequenzen verschiedenen Epitope des Antigens erkennen. Insgesamt wurden 39 Hemibodies und BiTE Antikörper hergestellt und getestet. Die Ergebnisse der verschiedenen Konstruktproduktionen aus 1 l Bakterienkultur sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Hier wird für jedes Konstrukt anhand eines 12 % SDS-PAGE-Gels die Molekülgröße, Konzentration an produzierten Antikörpern und deren Reinheit aufgeführt. Die durchgeführten SDS-PAGE-Gele zeigten neben dem

Hauptprodukt der Antikörper weitere Banden unter- und oberhalb der Antikörperbande. Insgesamt wurden alle Proteine in sehr unterschiedliche Konzentrationen und Reinheit produziert. Geringe Ausbeuten wurden bei Konstrukten der Sequenz α CXCR4_V1, α CXCR4_V2, α CD138_V3, α CD138_V4 und α CD28 erzielt. Alle weiteren Antikörper wurden in mittleren bis hohen Konzentrationen von bis zu 0,3 mg/l exprimiert.

Weiterhin wurde mittels Western Blot-Analysen der lösliche Anteil an produzierten Proteinen in der Bakteriensuspension vor und nach der IMAC-Aufreinigung bestimmt (siehe Anhang Abbildung 31). Diese Daten sowie weitere mikroskopische Untersuchungen der Bakterienzellen ließen großer Mengen an unlöslichen Proteinen in den prokaryotischen Zellen während der Produktion erkennen. Nur ein Bruchteil des Gesamtprodukts konnte löslich im Zytoplasma über IMAC-aufgereinigt werden.

Tabelle 12: Übersicht aller produzierter Antikörperkonstrukte aus 1 | Shuffle T7 Express E.coli Kultur. Gezeigt ist in jedem SDS-PAGE-Gel ein BSA Standard von 2000-31,25 ng (1:2 Verdünnung), eine Proteinleiter mit 10 Standardproteinen von 10, 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140, 260 kDa, sowie die Hemibodies in der Reihenfolge α CD3(VH)-, α CD3(VL)- und α CD3(scFv)-Konstrukt. V=Variante

Hemibody	SDS-PAGE	MW (kDa)	C= (μ g/l)	Reinheit (%)
α CD3(VH)- α CXCR4_V1(scFv)		42	5,5	7,0
α CD3(VL)- α CXCR4_V1(scFv)		40	16,5	11,5
α CD3(scFv)- α CXCR4_V1(scFv)		56	5,9	10,8
α CD3(VH)- α CXCR4_V2(scFv)		42	16,7	13,9
α CD3(VL)- α CXCR4_V2(scFv)		40	64,8	20,7
α CD3(scFv)- α CXCR4_V2(scFv)		55	37,2	24,3
α CD3(VH) α CXCR4_V3(scFv)		43	2,9	7,7
α CD3(VL) α CXCR4_V3(scFv)		41	21,9	19,4
α CD3(scFv) α CXCR4_V3(scFv)		59	12,9	13,3
α CD3(VH)- α CD138_V1(scFv)		42	8,9	9,5
α CD3(VL)- α CD138_V1(scFv)		40	81,1	28,5
α CD3(scFv)- α CD138_V1(scFv)		58	47,9	18,9

Hemibody	SDS-PAGE	MW (kDa)	C= (µg/l)	Reinheit (%)
α CD3(VH) α CD138_V2(scFv)		42	40,0	21,8
α CD3(VL) α CD138_V2scFv		40	243,1	38,5
α CD3(scFv) α CD138_V2(scFv)		56	262,4	73,8
α CD3(VH)- α CD138_V3(scFv)		42	3,2	6,0
α CD3(VL)- α CD138_V3(scFv)		40	11,1	12,2
α CD3(scFv)- α CD138_V3(scFv)		56	5,4	9,0
α CD3(VH)- α CD138_V4(scFv)		42	8,7	7,5
α CD3(VL)- α CD138_V4(scFv)		40	24,4	14,2
α CD3(scFv)- α CD138_V4(scFv)		56	12,7	10,4
α CD3(VH)- α CD38_V1(scFv)		45	50,5	30,1
α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv)		42	57,9	17,9
α CD3(scFv)- α CD38_V1(scFv)		61	112,7	46,3
α CD3(VH) α CD38_V2(scFv)		45	24,8	19,1
α CD3(VL) α CD38_V2(scFv)		42	156,8	34,4
α CD3(scFv) α CD38_V2(scFv)		61	34,2	67,9
α CD3(VH)- α BCMA(scFv)		44	13,6	61,8
α CD3(VL)- α BCMA(scFv)		42	69,1	68,7
α CD3(scFv)- α BCMA(scFv)		59	46,4	72,9
α CD3(VH)- α CD28(scFv)		42	4,5	7,1
α CD3(VL)- α CD28(scFv)		40	19,4	8,7
α CD3(scFv)- α CD28(scFv)		57	14,8	7,6

Hemibody	SDS-PAGE	MW (kDa)	C= (µg/l)	Reinheit (%)
α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv)		43	131,4	69,6
α CD3(VL)- α SLAMF7(scFv)		41	306,6	45,4
α CD3(scFv)- α SLAMF7(scFv)		55	299,3	61,6
α CD3(VH)- α CD70(scFv)		44	177,4	32,0
α CD3(VL)- α CD70(scFv)		42	162,8	63,7
α CD3(scFv)- α CD70(scFv)		58	90,7	64,1

4.3 Screening möglicher Hemibody-Kombinationen

4.3.1 Bindungsstudien der Hemibodies und BiTE Antikörper an MM Zellen

Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Hemibodies an Tumorzellen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden MM.1S Zellen mit 0,5 µg Antikörper für 2 h bei 37 °C inkubiert und die gebundenen Hemibodies über einen 6x His-Tag Biotin Antikörper und FITC-konjugiertem Streptavidin im Durchflusszytometer untersucht. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit anti-His-Tag und FITC-konjugiertem Streptavidin Antikörpern inkubiert. Diese Daten der Antikörperbindung sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei fast allen produzierten Antikörperkonstrukten konnte eine Bindung an die MM Zellen gemessen werden. Ausnahmen waren alle Antikörperkonstrukte gegen CXCR4 mit der Sequenzvariante1, sowie die Hemibodies α CD3(VL)- α CD138_V1(scFv), α CD3(VL)- α CD138_V4(scFv) und α CD3(VH)- α CD70(scFv). Hier konnte keine Bindung der Konstrukte an die Zielzellen detektiert werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Bindung der Hemibodies auf orthologe Antigene aus *Mus musculus* und *Macaca fascicularis* untersucht. Hierfür wurden CHO Zellen verwendet, die stabil Maus- und Makaken-Antigene exprimierten. Die FACS-Daten dieser Analyse zeigten, dass keine der gegen humane Antigene gerichteten Hemibodies eine Kreuzreaktivität gegen Antigene murinen Ursprungs aufweisen. Die Hemibodies α CD3(scFv/VH/VL)- α CD38_V1(scFv) und α CD3(scFv/VH/VL)- α BCMA(scFv) waren jedoch in der Lage, an Makaken-Antigenen zu binden. Die Daten sind im Anhang Abbildung 32 aufgeführt. Zudem konnte an einfach-Antigen-positiven CHO Zellen die spezifische Bindung der Hemibodies an nur ihr jeweiliges Tumorantigen nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 33).

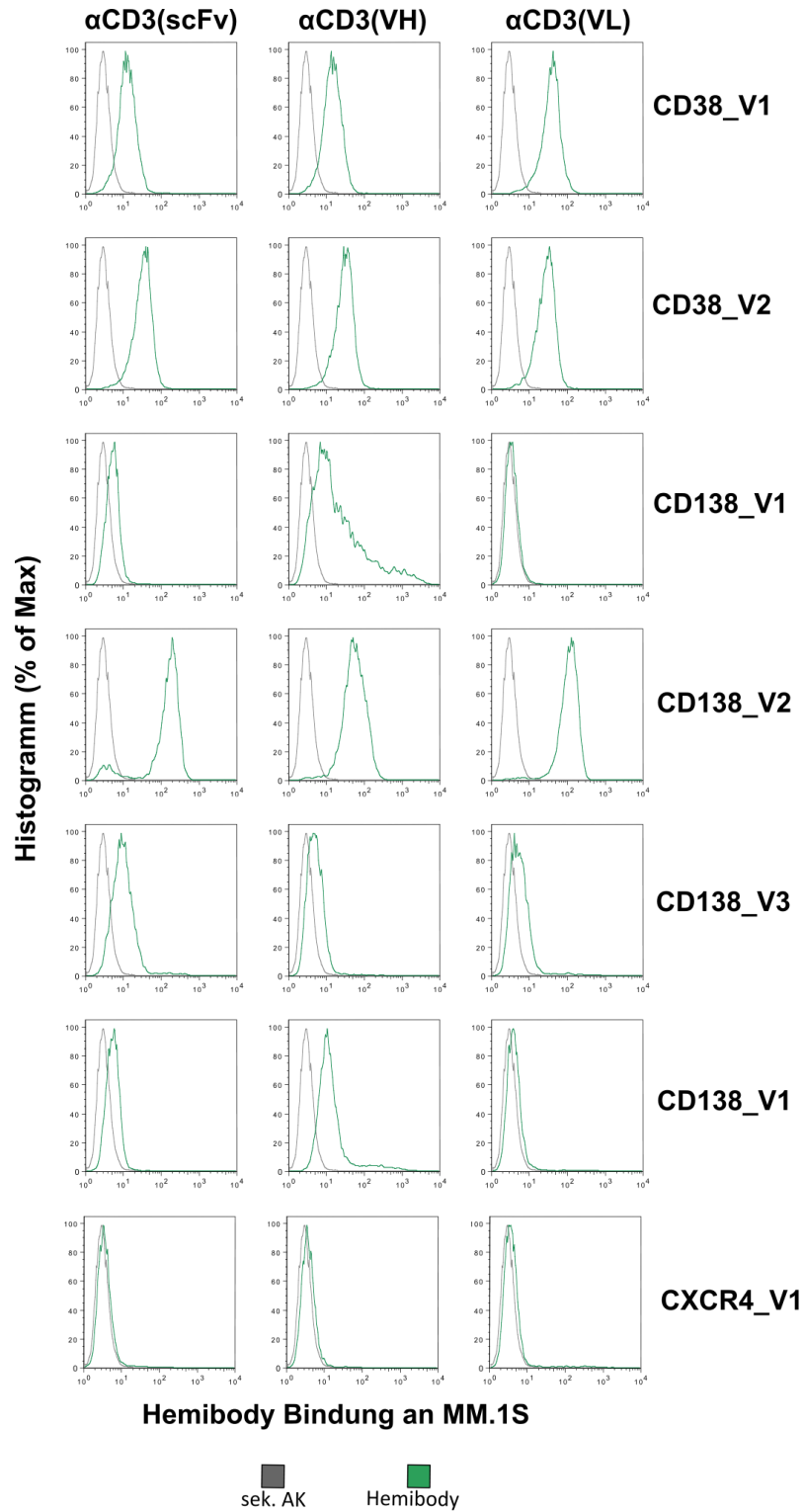


Abbildung 16_1: Bindung der Hemibodies und BiTE Antikörper an Multiplen Myelom Zellen MM.1S. Erfolgreiche Antikörperbindung der Hemibodies und BiTEs wurde über anti-His-Tag Biotin und FITC-gekoppelten Streptavidin-Antikörper im FACS detektiert. Grau: MM.1S Bindung sekundär Antikörper, Grün: MM.1S Bindung Hemibodies und BiTEs. BiTE Antikörper und Hemibodies zeigen ähnliche Bindungsintensitäten zu ihrer Zielstruktur auf MM.1S Zellen.

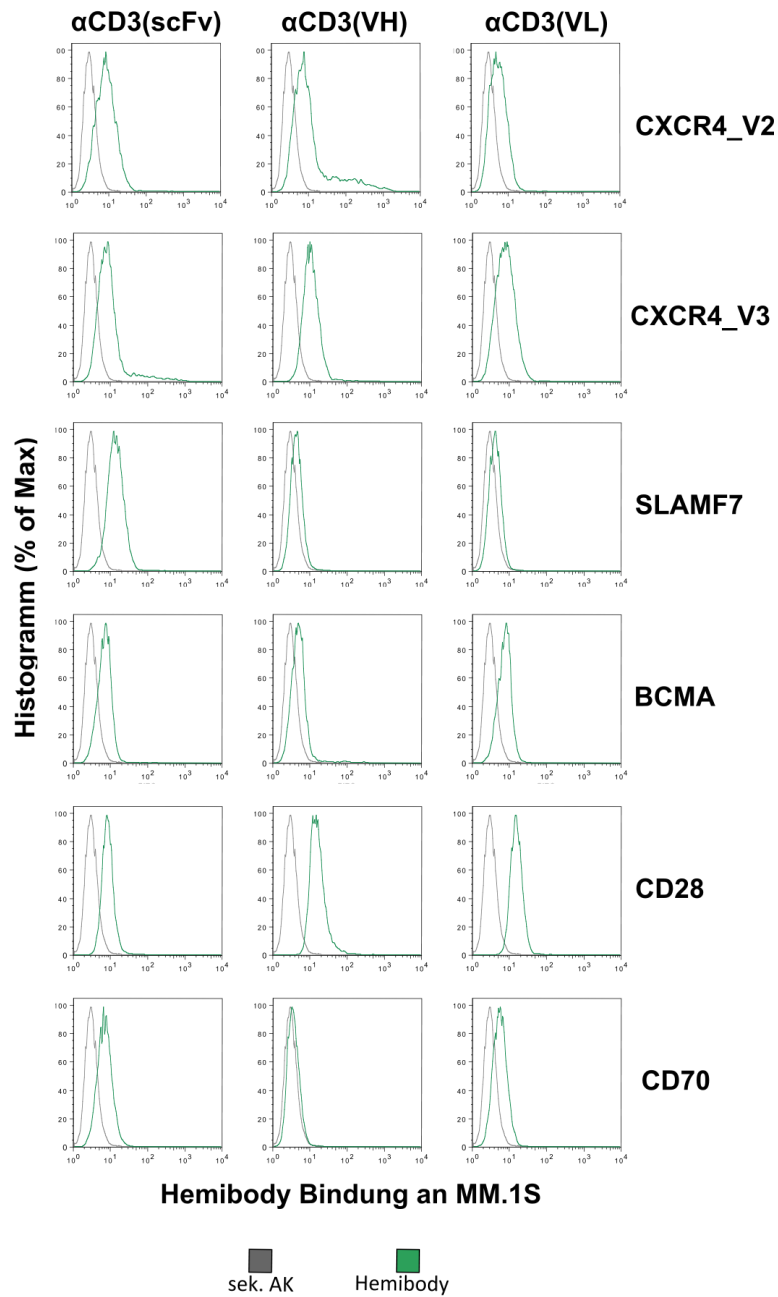


Abbildung 16_2: Bindung der Hemibodies und BiTE Antikörper an Multiplen Myelom Zellen MM.1S. Erfolgreiche Antikörperbindung der Hemibodies und BiTEs wurde über anti-His-Tag Biotin und FITC-gekoppelten Streptavidin-Antikörper im FACS detektiert. Grau: MM.1S Bindung sekundär Antikörper, Grün: MM.1S Bindung Hemibodies und BiTEs. BiTE Antikörper und Hemibodies zeigen ähnliche Bindungsintensitäten zu ihrer Zielstruktur auf MM.1S Zellen.

4.3.2 Funktionalitätsstudien von Hemibody-Kombinationen auf MM Zellen

Die Fähigkeit produzierter Hemibodies, die T-Zell-induzierte MM Zellyse einzuleiten, wurde in verschiedenen Luziferase-basierten Viabilitäts-Assays analysiert. In allen Ansätzen wurden 10 000 fLuc+ MM.1S Zellen mit 50 000 PBMCs gesunder Spender, sowie verschiedenen Antikörperkonzentrationen, für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde über die intrazelluläre Luziferaseaktivität die Konzentration der Antikörper-vermittelten Tumorzellyse bestimmt. Als Kontrollen dienten, neben unbehandelten Zellen, Inkubationen mit einzelnen Hemibody-Fragmente und korrespondierenden BiTE Antikörpern. Zur Bestimmung benötigter Hemibody-Konzentrationen und zur ersten Funktionalitätsbewertung wurden zunächst Hemibodies in Konzentrationen von 50 nM in einer 1:2 Verdünnungsreihe alleine und mit ihrem komplementären Partner eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Abbildung 17 zusammengefasst. Aus dieser wurde ersichtlich, dass Hemibodies sowie BiTE Antikörper in der Lage sind Tumorzellen zu lysieren. Bereits bei geringen Antikörperkonzentrationen von < 5 nM waren große Veränderungen der Zellviabilität messbar. Es ließ zudem Hemibodies mit einem idealen Profil erkennen, wie zum Beispiel CD70-gerichtete Antikörper, die nur in Kombination mit einem komplementären Partner die spezifische Tumorzellyse induzieren. Jedoch wurden auch einige Antikörper identifiziert, bei denen weder der BiTE noch die Hemibodies einen lysierenden Effekt auf die Tumorzellen besaßen, oder Hemibody-Fragmente alleine eine substantielle Tumorzellyse induzierten. Solche Antikörper waren: alle αCD138 Antikörper der Sequenzvariante 4, αCD3(VH)-αCD138_V3(scFv), αCD3(VH)-αCXCR4_V3(scFv) und αCD3(VH/VL)-αCXCR4_V1(scFv). Genannte Konstrukte wurden aus weiteren Analysen ausgenommen.

Als weiterer Schritt wurden Viabilitäts-Assays von 75 Hemibody-Kombinationen auf MM.1S Zellen mit PBMCs von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. So sollten geeignete Kombinationen unter Berücksichtigung der Varianz primärer Proben identifiziert werden. Ein repräsentatives Beispiel zeigt Abbildung 18. Aus diesen wurde deutlich, dass nicht alle Hemibody-Fragmente kombiniert werden können, um eine Tumorzellyse zu induzieren. Aus 75 Kombinationen waren nur 39 in der Lage, ohne Effekte der Fragmente alleine, mit allen drei Spender PBMCs, die Vitalität von MM.1S Zellen substantiell zu beeinflussen.

Um Kombinationen mit einer hohen Wirksamkeit auf einen heterogenen Tumor zu identifizieren, wurden die lytischen Effekte der ausgewählten 39 Kombinationen auf drei weiteren MM Zelllinien U-266, OPM-2 und RPMI-8226 bestätigt (nicht gezeigt).

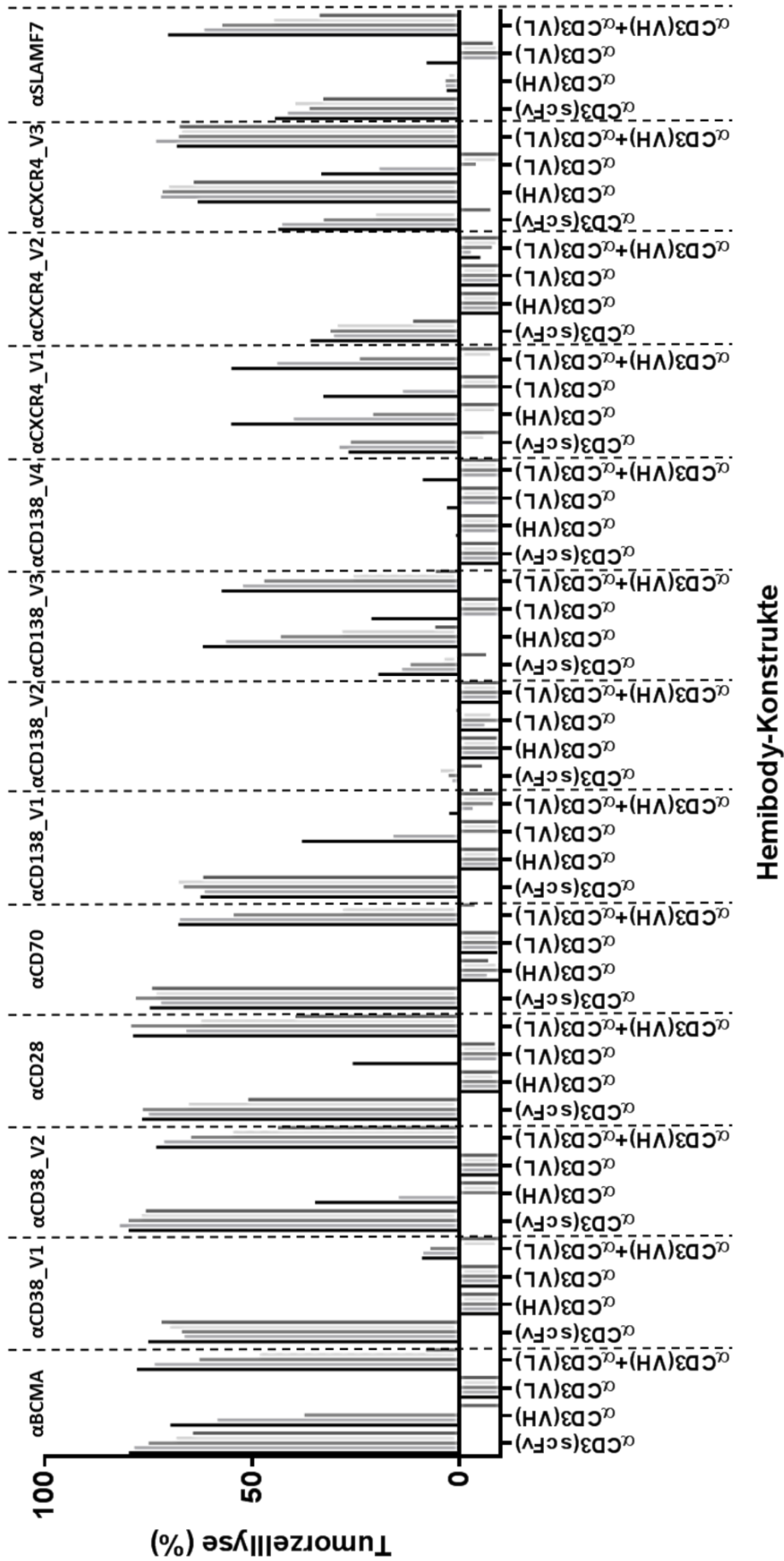


Abbildung 17: Hemibody-vermittelte Tumorzelllyse von MM.1S Zellen im Luziferase Viabilitäts-Assay. 10 000 fLuc+ MM.1S Zellen wurden für 24 h mit 50 000 PBMCs und Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen (Verdünnungsreihe 1:2) inkubiert. Die Vitalität der Zellen bzw. der Effekt der Zellyse wurde anhand der Luziferaseaktivität der Tumorzellen bestimmt. 0 % Lyse entspricht dem Effekt von PBMCs alleine auf Tumorzellen.

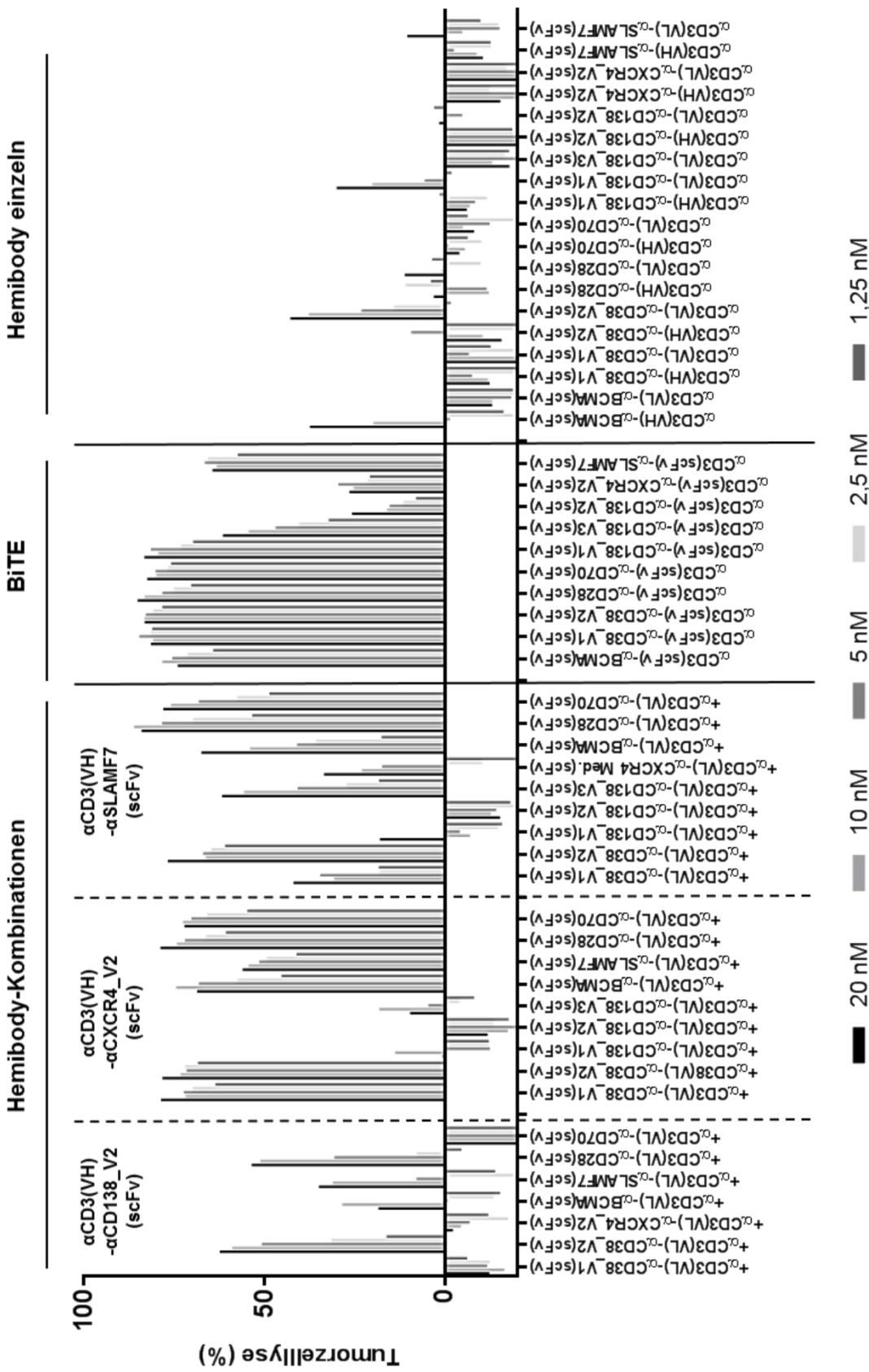


Abbildung 18_2: Luziferase Viabilitäts-Assay verschiedener Hemibody-Kombinationen auf MM.1S Zellen. *firefly* Luc+ MM.1S Zellen wurden mit PBMCs im Verhältnis 1:5 co-kultiviert und mit Hemibody-Kombinationen (Höchstkonzentration 20 nM) für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienten äquivalente BiTE Antikörper. Als Negativkontrolle und 0 % Antikörper vermittelter Tumorzelllyse diente ein Ansatz aus PBMCs und MM.1S Zellen. Aus 75 getesteten Hemibody-Kombinationen waren 39 funktional.

4.4 Funktionalität von Hemibodies auf Effektorzellen

4.4.1 Antigenexpression auf T-Zellen

Das Prinzip der Hemibody-Technologie basiert darauf, dass zwei Hemibodies je ein spezifisches Antigen auf den Tumorzellen binden müssen, um über die geteilten α CD3 Domänen zu komplementieren und so nachfolgend T-Zellen zur Tumorzell-Lyse zu rekrutieren. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob eines der verwendeten MM Zielproteine auf den Effektor T-Zellen exprimiert wird und das Testsystem beeinflusst. Hemibodies könnten hier T-Zellen zur gegenseitigen Lyse vernetzen.

Die Expression der verwendeten Antigene auf T-Zellen wurde im Durchflusszytometer untersucht. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ PBMCs gesunder Spender für 30 Minuten bei 4 °C mit 250-500 ng Fluorochrom-markierten FACS-Antikörper gegen das zu detektierende Protein und CD3 bzw. CD8 inkubiert. Anschließend wurde das Vorhandensein verschiedener Antigene auf CD3⁺ und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen von drei gesunden Spendern im FACS gemessen. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 19 aufgeführt. Diese Analyse zeigt die positive Expression der Antigene CD28 und CXCR4 auf T-Zellen. Diese Moleküle konnten auf allen CD3⁺ Zellen und mindestens 20 % der CD8⁺ T-Zell-Subpopulation detektiert werden. Weiterhin ist eine Subpopulation der T-Zellen positiv für CD38 und SLAMF7. Lediglich die Antigene BCMA, CD70 und CD138 waren auf der Oberfläche von T-Zellen nicht messbar. Diese Daten stimmten mit den bereits erhobenen Daten aus Abbildung 11 überein. Jedoch wurde eine CD70 Expression bereits mehrfach bei aktivierten T-Zellen beschrieben [187-190].

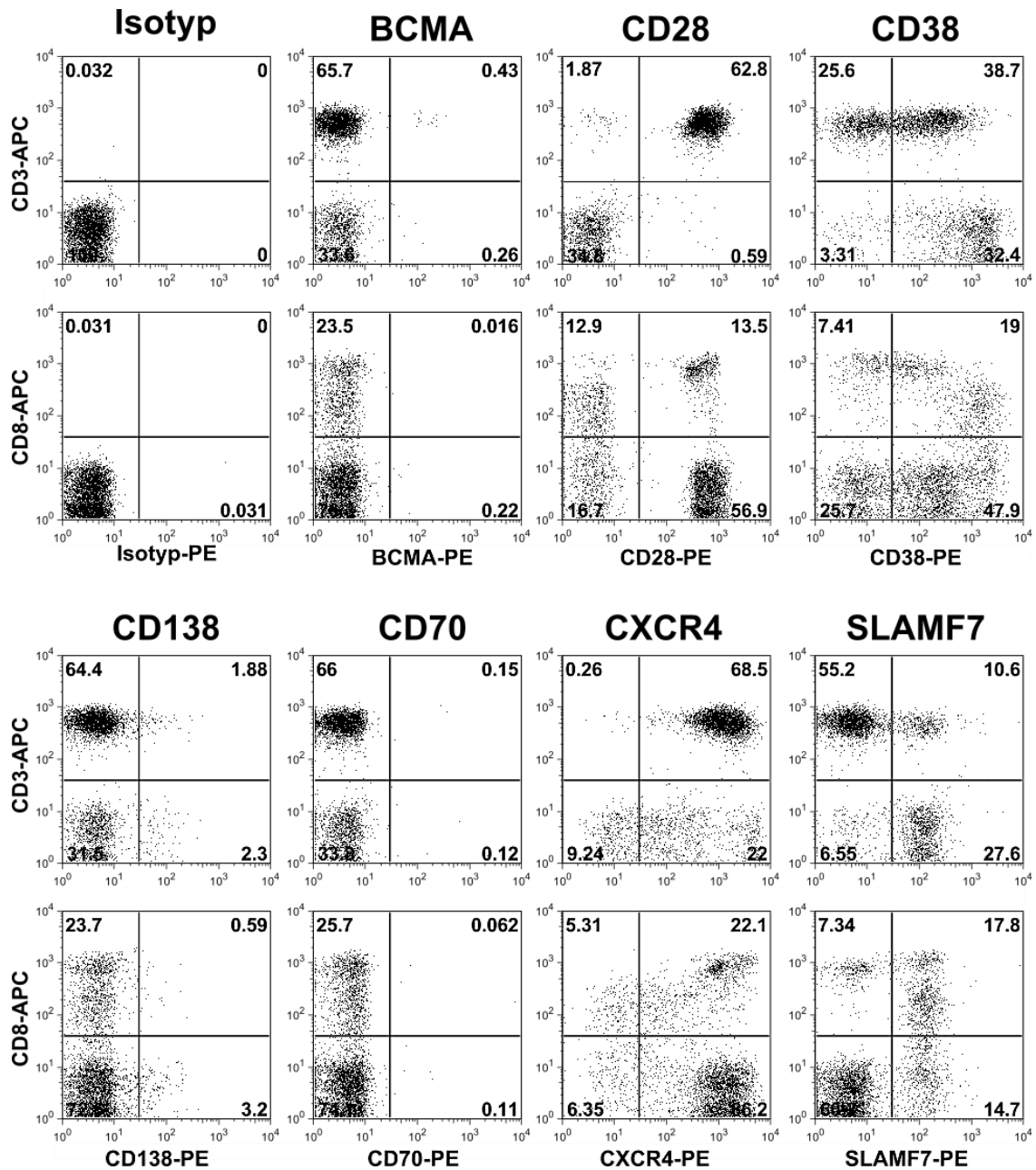


Abbildung 19: Antigenexpression auf T-Zellen. Die Expression 7 verschiedener MM relevanter Oberflächenmarker wurde auf CD3+ und CD8+ T-Zellen von drei gesunden Spender untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein äquivalenter Isotyp zu den eingesetzten FACS-Antikörpern mitgeführt. Alle T-Zellen sind positiv für CD28 und CXCR4.

4.4.2 Hemibody-induzierten T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit der Tumorzelle

Aufgrund der Tatsache, dass BiTE Antikörper in der Lage sind, in Abwesenheit der Tumorzelle, T-Zellen über das Effektor- und Tumorantigen-Fragment zu erkennen und sich gegenseitig zu aktivieren [191], wurde hier der Hemibody-induzierte T-Zell-Aktivierungsstatus überprüft. In vorangegangenen Versuchen wurde bereits gezeigt, dass T-Zellen einige der MM Zielantigene auf ihrer Oberfläche tragen. Um zu untersuchen, ob zwei Hemibodies in Kombination, in Abwesenheit der malignen Zelle, T-Zellen aktivieren, wurde ein IL-2 ELISA durchgeführt. Wenn T-Zellen aktiviert werden, sezernieren diese Botenstoffe wie IL-2 und IFN- γ . Sie übermitteln so ein autokrines bzw. parakrines Signal zur Proliferation und Differenzierung. Hierfür wurden je Ansatz 50 000 PBMCs über 24 h mit ausgewählten Hemibody-Kombinationen bei einer Konzentration von 5 nM und 1 nM unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Freisetzung von IL-2 überprüft. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen mit aktivierendem Detergenz ConA (0,5 μ g) inkubiert. Dieser Versuch wurde mit PBMCs von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Die Ergebnisse aus Abbildung 20 sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche gezeigt. In diesem Versuch wurden ausgewählte Hemibody-Kombinationen aus den vorangegangenen Versuchen auf ihre aktivierende Wirkung hin mit BiTEs und Einzel-Hemibody-Konstrukten verglichen. Es wurde festgestellt, dass fast alle BiTE Antikörper bereits in Abwesenheit der Tumorzellen T-Zellen aktivieren und eine IL-2 Ausschüttung induzieren. Nur die BiTEs α CD3(scFv)- α CD138_V2(scFv) und α CD3(scFv)- α BCMA(scFv) zeigten keine T-Zell-aktivierenden Effekte. Im Vergleich zu BiTEs waren Hemibody-Konstrukte alleine, ohne komplementären Partner, nicht in der Lage T-Zellen zur IL-2 Produktion anzuregen. Wurden Hemibodies jedoch mit einem komplementären Partner kombiniert, konnte eine Antikörper-induzierte IL-2 Sezernierung bei einigen Kombinationen beobachtet werden. Hemibody-Kombinationen mit einer induzierten IL-2 Produktion > 100 pg/ml bei drei verschiedenen PBMCs wurden vor weiteren Versuchen aussortiert. Insgesamt konnten so 16 Hemibody-Kombinationen ohne T-Zell-Aktivierenden Effekt, in Abwesenheit der Zielzelle, bestimmt werden (blau markiert, Abbildung 20).

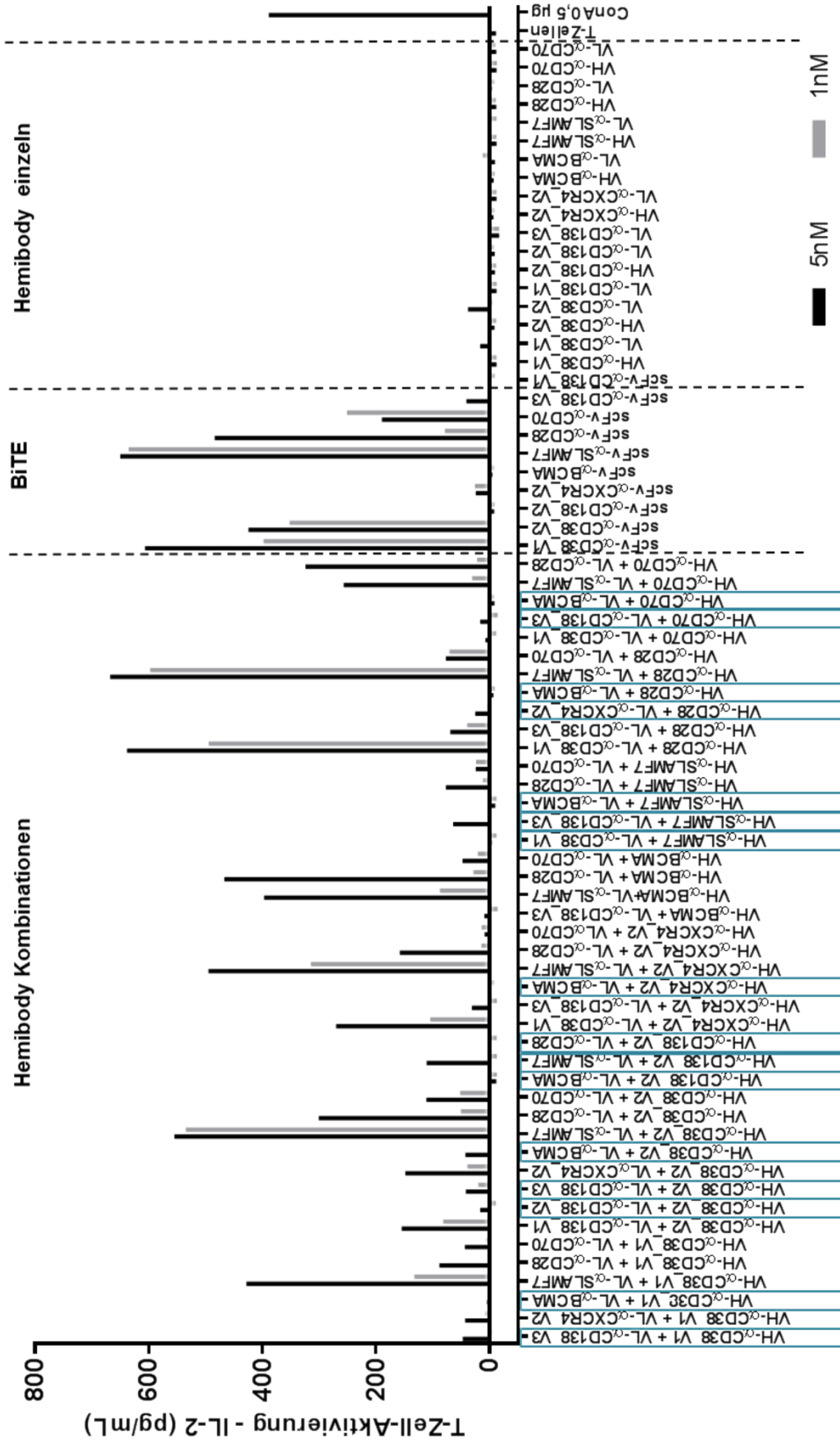


Abbildung 20: ELISA der Hemibody-basierten IL-2 Ausschüttung aktivierter T-Zellen in Abwesenheit von Tumorzellen. PBMCs wurden mit Hemibody-Kombinationen, Einzel-Hemibody-Molekülen und BiTE Antikörpern in einer Konzentration von 5 nM und 1 nM für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der T-Zell Aktivierungsstatus über einen IL-2 ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen mit aktivierendem Detergenz ConA (0,5 µg) behandelt. VH=αCD3(VH), VL=αCD3(VL), scFv=αCD3(scFv). Blau, Hemibody-Kombinationen ohne T-Zell Aktivierung bei n=3 verschiedenen PBMCs.

4.5 Biochemische Charakterisierung von Hemibodies

4.5.1 Aggregationsstatus und Reinheit von Hemibodies

Der Hemibody-Technologie liegt ein komplexer Wirkmechanismus zugrunde, in dem jede Einheiten alleine als auch zusammen mit einem komplementären Partner perfekt funktionieren muss um eine sichere Immuntherapie zu gewährleisten. Verunreinigungen und Proteinaggregate können Auswirkungen auf die Wirksamkeit der Therapie haben indem sie die Funktionsweise von Hemibodies beeinträchtigen, oder alleine Immunantworten auslösen und so Nebenwirkungen verursachen. Diese Aspekte werden seit der Veröffentlichung der ersten Immuntherapien theoretisiert [192]. IMAC-aufgereinigte Eluate wurden daher auf ihren Gehalt an Monomeren sowie Di- und Multimeren und Verunreinigungen untersucht. Hierfür wurden 50 µl eines IMAC-Eluats einer 1 l Bakterienkultur über eine SEC-Säule aufgetrennt. Über spezifische Proteinstandards konnten monomerische Hemibodies im heterogenen Proteingemisch identifiziert werden (Abbildung 21). Aus den Elutionsprofilen wurde deutlich, dass die produzierten und IMAC-aufgereinigten rekombinanten Proteine zwar zu einem großen Teil aus Monomeren bestehen, aber auch immer ein Anteil als Di- und Multimere oder weiteren Nebenprodukten vorliegt. Hemibodies, die in hoher Konzentration und vor allem in monomerischer Form produziert wurden sind α CD3(scFv/VH/VL) α BCMA(scFv), α CD3(scFv/VH/VL)- α CD38_V1(scFv), α CD3(scFv/VH/VL)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(scFv/VH/VL)- α CD138_V2(scFv). Jedoch lagen auch einige Hemibodies hauptsächlich aggregiert oder als Spaltprodukte vor. So zum Beispiel alle CD138 Antikörper der Sequenzvarianten 1 und 3. Diese Hemibodies wurden aufgrund ihrer geringen Produktionskonzentration, ihrem Aggregationsstatus und ihrer geringen Funktionalität von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Aufgrund möglicher Effekte von Proteinaggregaten und Verunreinigungen auf die Wirksamkeit und Sicherheit von Therapeutika wird für deren medizinische Verwendung eine sehr hohe Produktreinheit gefordert. Zur Abtrennung von unerwünschten Nebenprodukten und zur Isolierung von monomerischen Hemibodies wurde daher standardmäßig eine IEX mit anschließender SEC durchgeführt. Die SEC-Elutionsprofile einer 10 l Produktion vor und nach Aufreinigung, 12 % SDS-PAGE-Gele der einzelnen Fraktionen, sowie die finalen Antikörperkonzentration und Reinheit sind in Abbildung 22 für alle relevanten Hemibodies und BiTE Antikörper zusammengefasst. Die Hemibodies α CD3(scFv/VH)- α CD38_V2(scFv) und α CD3(VH)- α CD70(scFv) konnten in keiner hinreichenden Konzentration, Reinheit und Monomergehalt produziert werden (Produktionsausbeute < 50 µg/10 l Bakterienkultur) und wurden folglich von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Alle weiteren produzierten und aufgereinigte monomerischen Hemibodies und BiTEs wurden in Konzentrationen zwischen 150-2000 µg/10 l Bakterienkultur und einer Reinheit von 30-70 % produziert. Um Einflüsse von

multimerisierten Hemibodies auf die Analysen auszuschließen, wurden alle nachfolgenden Versuche mit vollständig aufgereinigten Antikörperkonstrukten durchgeführt.

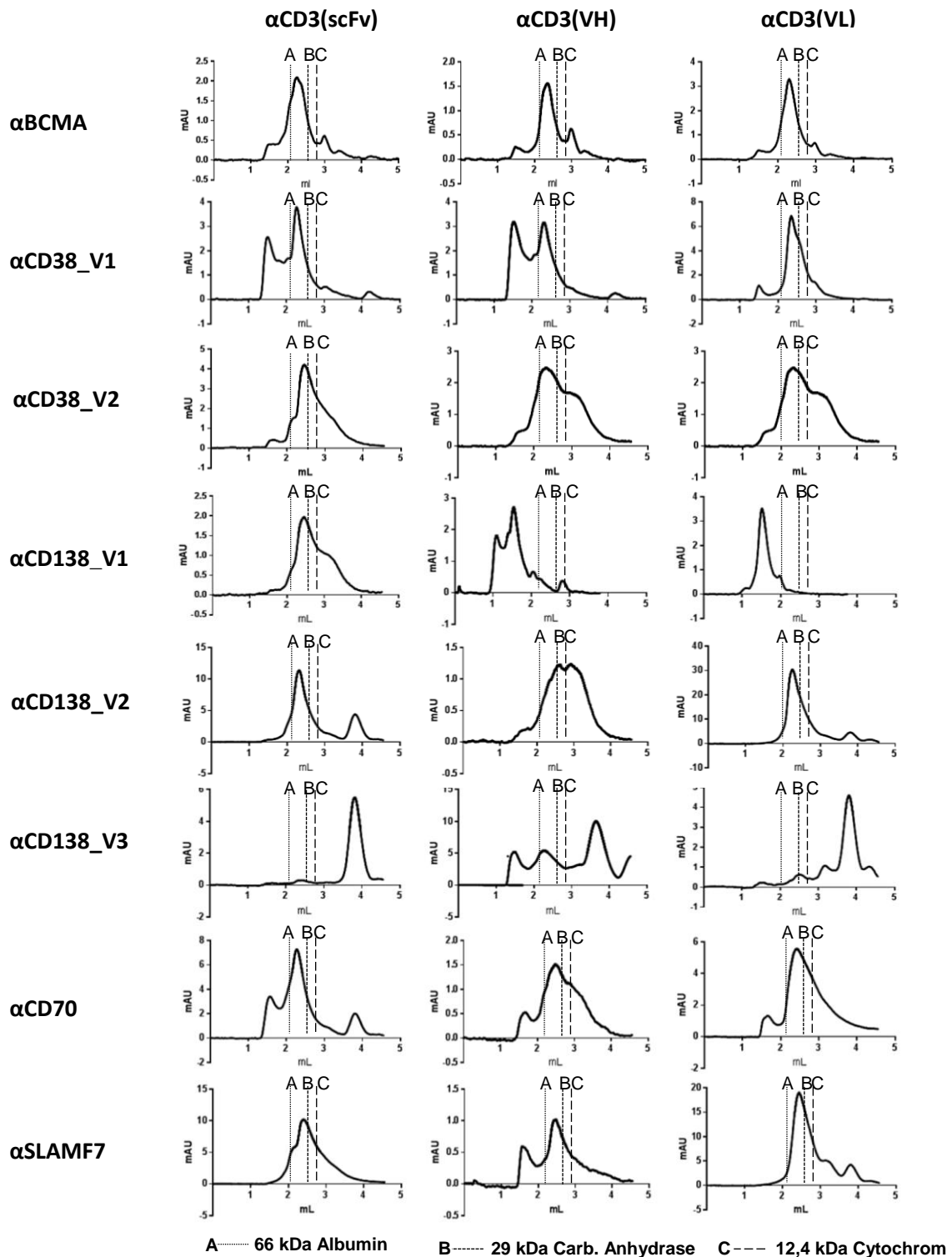


Abbildung 21: Monomergehalt rekombinanter Hemibodies aus 1 l Shuffle T7 Express E.coli Produktion. Analytisches SEC Elutionsprofile von 50 µl IMAC Eluat über eine Superdex 200 Increase 5/150 GL Säule. Zur Größenbestimmung dienten Standardproteine.

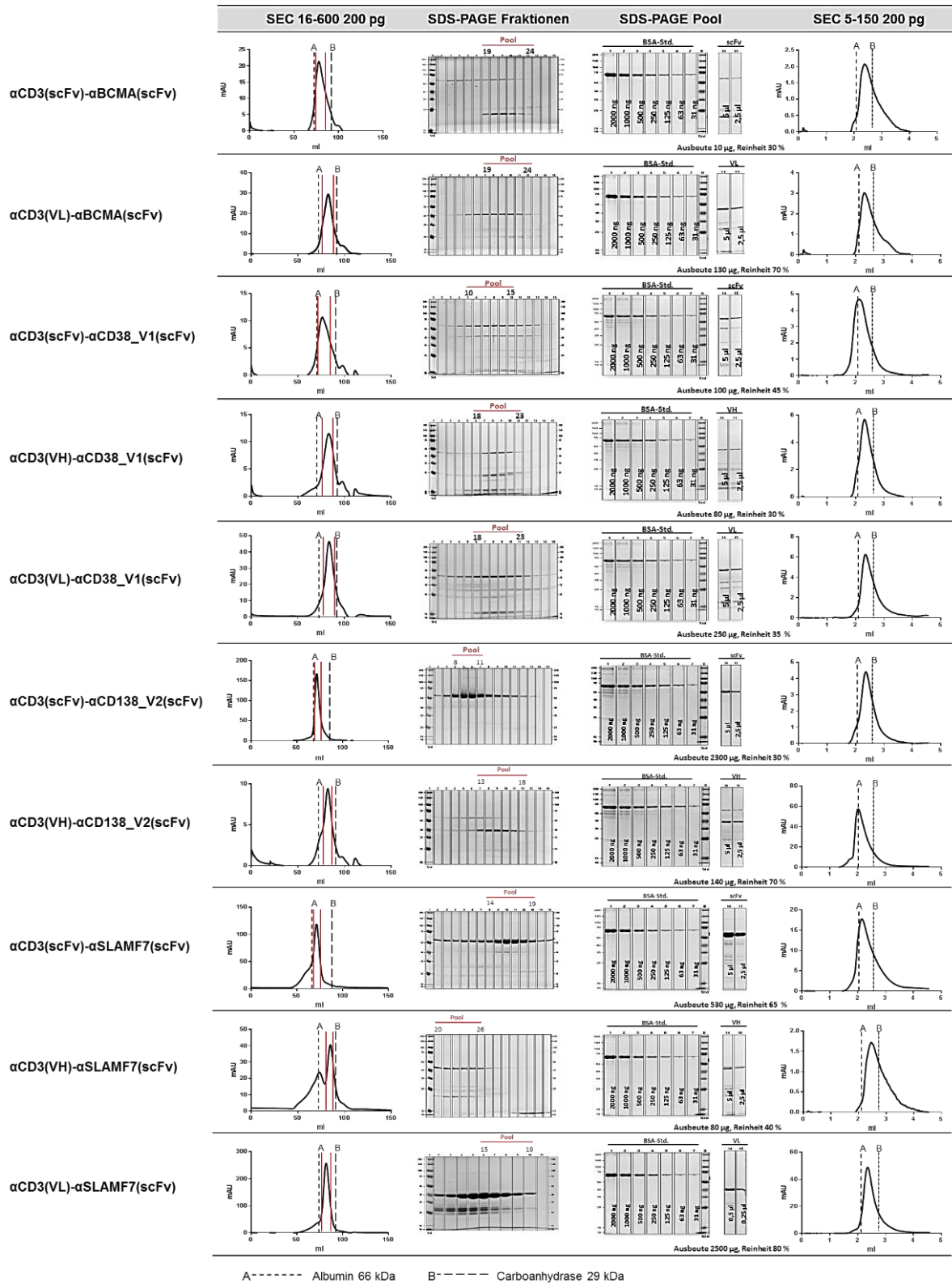


Abbildung 22: Produktions- und Aufreinigungsanalyse ausgewählter Hemibodies und BiTE Antikörper hinsichtlich Monomergehalt, Konzentration und Reinheit mittel Superdex 16/600 200pg, Superdex 5/150 200pg und SDS-PAGE. Die ausgewählten und vereinten Fraktionen der Initialen-SEC sind im Elutionsprofil rot markiert. Die meisten monomeren Hemibodies und BiTEs wurden in Konzentrationen zwischen 150-2000 μ g/10 l Bakterienkultur und einer Reinheit von 30-70 % produziert.

Aus allen möglichen Hemibody-Kombinationen ergaben sich aus den vorherigen Versuchen aus Bindungsanalysen, Funktionalitätsstudien auf T-Lymphozyten und Tumorzellen, sowie der Produktionsanalysen, 5 Hemibody-Kombinationen mit erfolgsversprechendem Profil: $\alpha\text{CD3(VH)}\text{-}\alpha\text{CD138_V2(scFv)}\text{+}\alpha\text{CD3(VL)}\text{-}\alpha\text{BCMA(scFv)}$, $\alpha\text{CD3(VH)}\text{-}\alpha\text{CD138_V2(scFv)}\text{+}\alpha\text{CD3(VL)}\text{-}\alpha\text{SLAMF7(scFv)}$, $\alpha\text{CD3(VH)}\text{-}\alpha\text{CD38_V1(scFv)}\text{+}\alpha\text{CD3(VL)}\text{-}\alpha\text{BCMA(scFv)}$, $\alpha\text{CD3(VH)}\text{-}\alpha\text{SLAMF7(scFv)}\text{+}\alpha\text{CD3(VL)}\text{-}\alpha\text{CD38_V1(scFv)}$ und $\alpha\text{CD3(VH)}\text{-}\alpha\text{SLAMF7(scFv)}\text{+}\alpha\text{CD3(VL)}\text{-}\alpha\text{BCMA(scFv)}$.

4.5.2 Schmelzpunktbestimmungen von Hemibodies

Um die thermische Stabilität der verschiedenen Konstrukte zu untersuchen, wurde der jeweilige Schmelzpunkt mittels eines Fluoreszenz-basierten Thermal-Shift Assays (Thermofluor) bestimmt. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange verwendet, der nur gebunden an freie hydrophobe Bereiche fluoresziert und detektiert werden kann. In rein wässriger Lösung ist keine SYPRO Orange Fluoreszenz messbar (Fluoreszenzlöschung). Die Stabilität der Antikörper kann so, über die freiwerdenden hydrophoben Bereiche bei einer Temperatur-basierten Entfaltung der Proteine, bestimmt werden.

Je Ansatz wurde 1-5 μg rekombinantes Protein eingesetzt. Die Proteine wurden mit einer 2,5 % Lösung aus SYPRO Orange versetzt und innerhalb eines Temperaturgradienten von 25 °C auf 95 °C erhitzt. Die berechneten Schmelzpunkte wurden über ein Boltzmann Model bestimmt [193]. Die aufgenommenen Schmelzkurven, wie auch die daraus berechnete Schmelzpunkte (Abbildung 23), zeigten eine vergleichbare thermische Stabilität von Hemibodies und BiTEs. Die Schmelzpunkte der Antikörper gegen BCMA, CD38 und SLAMF7 lagen in einem Temperaturbereich von 55-71 °C. Hierbei zeigten alle Hemibodies einen um 3-5 °C höheren Schmelzpunkt als ihre korrespondierenden BiTE Antikörper. Lediglich der Hemibody gegen CD138 besaß mit 49 °C einen um 10 °C niedrigeren Schmelzpunkt gegenüber dem CD138 BiTE.

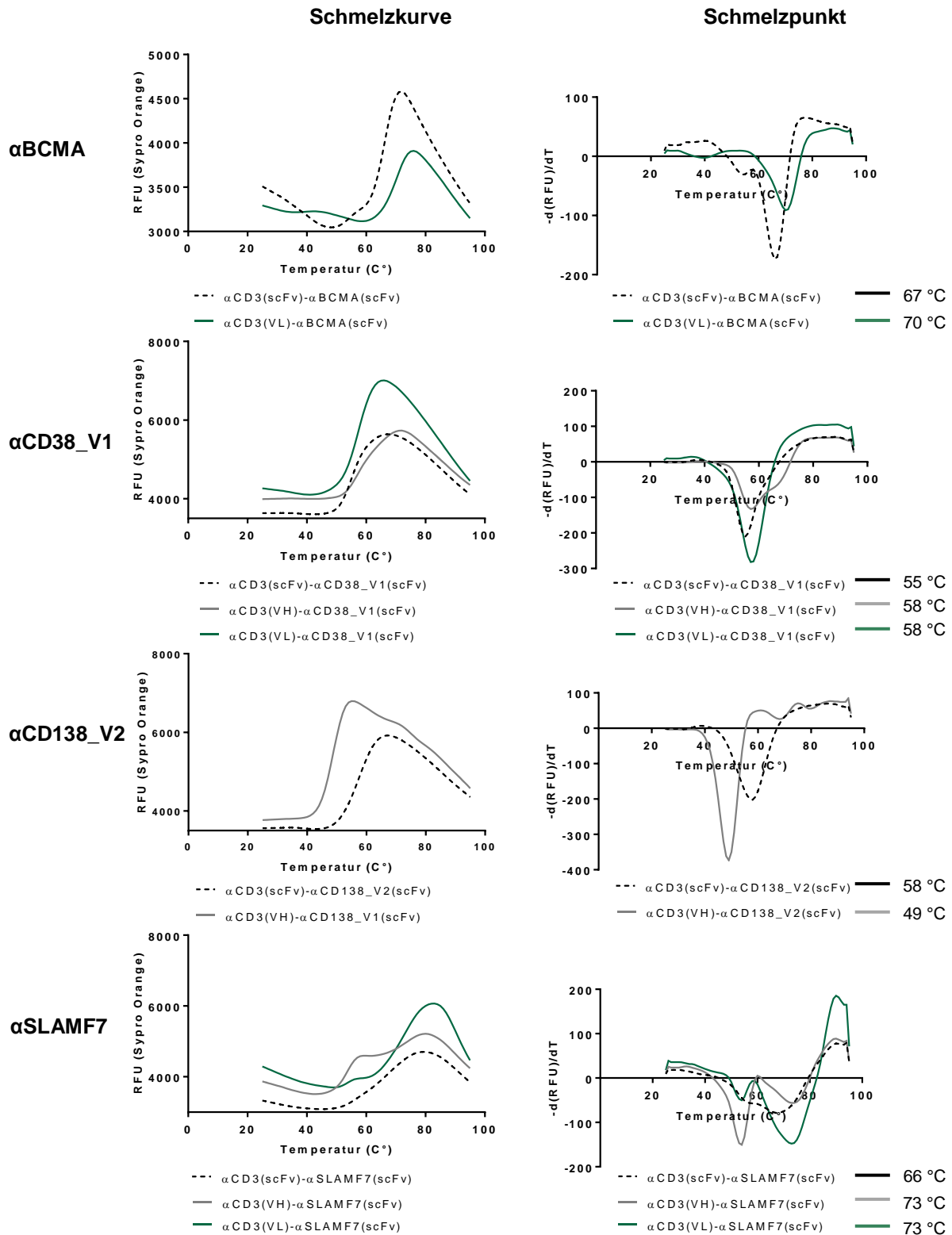


Abbildung 23: Denaturierungskurven von Hemibodies und äquivalenten BiTE Antikörpern. Thermofluor-basierte Schmelzkurve von 1-5 µg rekombinanten Proteins + 2,5 % SYPRO Orange. Die Schmelzkurve wurde von 25 bis 95 °C mit einer Erhöhung von 1 °C/Minute durchgeführt. Schwarz = BiTE, Grau = Hemibody αCD3(VH), Grün = Hemibody αCD3(VL). Hemibodies besaßen einen ähnlichen Schmelzpunkt wie äquivalente BiTEs.

4.5.3 Bestimmungen der Dissoziationskonstanten von Hemibodies

Um die Affinität und die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) von Hemibodies zu ihrem Antigen zu bestimmen wurden ein zellbasierter Bindungs-ELISA von Hemibodies an ihr spezifisches Epitop auf stabil transfizierten CHO Zellen durchgeführt. Hierfür wurden adhärente, Antigen-exprimierende CHO Zellen mit steigenden Hemibody-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Menge an gebundenen Hemibodies über ihren His-Tag, anhand einer kolorimetrischen HRP-Reaktion, detektiert. Die gemessenen Antikörperbindungen wurden in einem Graphen der Abbildung 24 aufgeführt. K_D -Werte wurden über Graphpad Prism über eine nichtlineare Regressionskurve der einzelnen Messpunkte berechnet.

Antikörperbindungen mit einer hohen Affinität besitzen in der Regel K_D -Werte im pM-Bereich, mit einer mittleren Affinität im nM-Bereich und einer niedrigen Affinität im μ M-Bereich. Hemibodies und BiTE Antikörper zeigten mit K_D -Werten im pM-nM Bereich von 10^{-7} - 10^{-10} mittlere bis gute Affinitäten zu deren Tumorantigenen. Von allen untersuchten α CD3(VH)-Molekülen zeigte der Hemibody α CD3(VH)- α CD38_V1(scFv) den besten K_D -Wert von 2,3 nM und war mit dem getesteten α CD38 BiTE Antikörper vergleichbar. Der komplementäre α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) Hemibody besaß dagegen mit einem K_D -Wert von 61 nM eine schlechtere Affinität zum humanen CD38. Den besten K_D -Wert aller α CD3(VL)-Konstrukte zeigte der Hemibody α CD3(VL)- α SLAMF7(scFv) mit 29,9 nM. Die Affinität des Hemibody α CD3(VH)- α CD138_V2(scFv) konnte nicht gemessen werden. Dieses Antikörper-Fragment wurde aus weiteren Studien aussortiert.

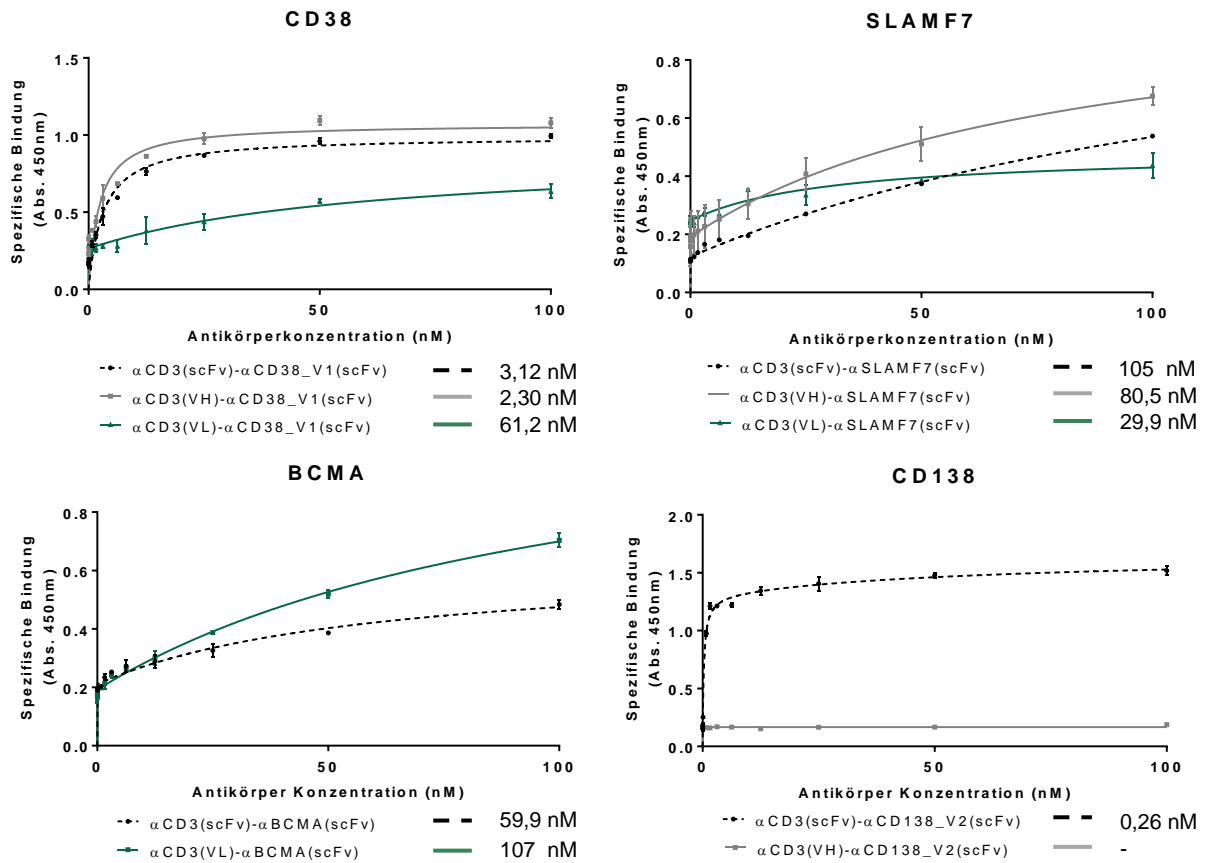


Abbildung 24: Bindungskurven mit Dissoziationskonstanten von Hemibodies an ihr Tumorantigen. Je 15 000 CHO Zellen wurden mit Antikörperkonzentrationen zwischen 0,08-100 nM inkubiert und über die Menge an gebundenem Antikörper der K_D -Wert berechnet. Gezeigt sind die einzelnen Messpunkte (n=4) mit nichtlinearer Regressionskurve. Schwarz = BiTE, Grau = Hemibody α CD3(VH), Grün = Hemibody α CD3(VL). Hemibody-Fragmente zeigten unterschiedliche Affinitäten zu deren Zielmolekülen, waren aber mit korrespondierenden BiTE Antikörpern vergleichbar.

4.6 Funktionalität potentieller Hemibody-Kombinationen auf Tumorzellen

4.6.1 Antikörper-vermittelte Rekrutierung von T-Zellen an Tumorzellen

Bislang konnte nachgewiesen werden, dass Hemibodies, in Anwesenheit von T-Zellen, die Lyse der Tumorzellen induzieren. Dass dies auf eine Hemibody-vermittelte Rekrutierung der T-Zellen an die Tumorzellen erfolgt, wurde in einer FACS-Analyse direkt visualisiert. Hierfür wurden je 2×10^5 MM.1S Zellen und PBMCs mit fluoreszierenden Zellfarbstoffen angefärbt. MM.1S Zellen wurden mit DiO grün und PBMCs mit Cell Tracker Deep Red rot markiert. Anschließend wurden die Zellpopulationen 1:1 gemischt und mit 500 ng Hemibody bzw. BiTE Antikörper inkubiert. Komplementäre Hemibodies, die ihr jeweiliges Antigen auf der Tumorzelle erkennen und binden, bilden auf der malignen Zelle eine funktionalen α CD3-Domäne aus. Über diese können T-Zellen gebunden und mit der Tumorzelle vernetzt werden. Diese Hemibody-vermittelte Verbindung von Tumor- und T-Zellen wurde im Durchflusszytometer detektiert. Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung konnten Tumorzellen von PBMCs und doppelt-positiven Zellaggregaten klar gegeneinander abgegrenzt werden (Abbildung 25). Untersucht wurden drei Kombinationen aus α CD3(VH) α CD38_V1(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv), α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL) α BCMA(scFv), sowie α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv). Diese Hemibody-Kombinationen induzierten die Rekrutierung und Bindung von T- an MM Zellen. In allen drei Fällen konnten Effektor-Tumorzell-Aggregate in einer Höhe von 9-25 % der Gesamtzellpopulation detektiert werden. Die Hemibody- und BiTE-vermittelte T-Zell-Rekrutierung war hierbei vergleichbar. Hemibodies-Fragmente alleine, sowie 1x PBS behandelte Ansätze zeigten keine Verknüpfung von Effektor- und Tumorzellen (< 0,8 %).

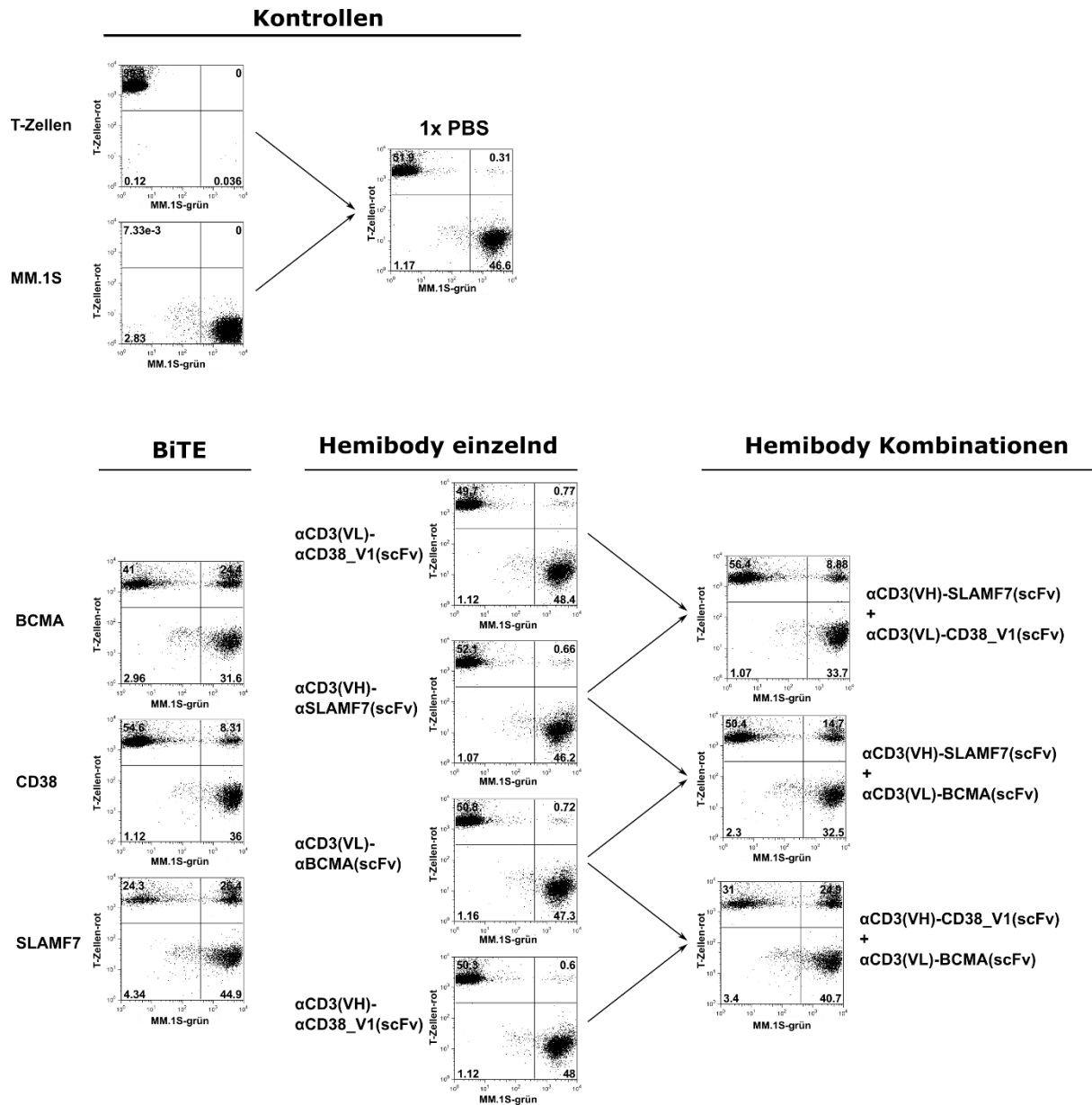


Abbildung 25: FACS-Analyse der Antikörper-vermittelten Rekrutierung von T-Zellen an Tumorzellen. Je 2×10^5 MM.1S und PBMCs wurden mit fluoreszierenden Zellfarbstoff angefärbt und mit 500 ng Antikörper für 2 h inkubiert. MM.1S = grün und T-Zellen = rot. Doppelt-positive Zellaggregate aus T- und Tumorzellen zeigten sich im rechten oberen Quadranten. Als Negativkontrolle wurde ein Zellansatz mit 1x PBS behandelt. Hemibody-Kombinationen vernetzten T-Zellen mit Tumorzellen.

4.6.2 Antikörper-induzierte T-Zell-Aktivierung und Tumorzelllyse

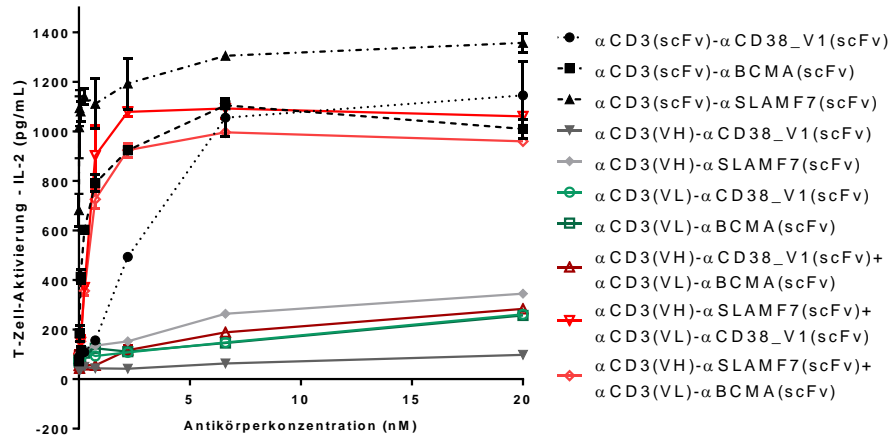
Aktivierte T-Zellen sezernieren Botenstoffe wie IL-2 und IFN- γ und übermitteln so ein parakrines Signal aktivierende Zytokine zu produzieren und zu proliferieren. Zudem induzieren sie über die Ausschüttung von Perforin und Granzym die Lyse der Zielzelle. Um zu zeigen, dass T-Zellen nach der Hemibody-vermittelten Rekrutierung an die Tumorzellen aktiviert werden und die Tumorzelllyse induzieren, wurden zwei ELISAs und verschiedene Viabilitäts-Assays durchgeführt. Die ELISAs detektieren die proinflammatorischen T-Zell Zytokine IL-2 und IFN- γ als Maß für die T-Zell-Aktivierung. Diese wurde nachfolgend mit der induzierten Tumorzelllyse verglichen. Für alle Assays wurden 10 000 MM.1S Zellen mit 50 000 PBMCs und Antikörpern in verschiedener Konzentration für 24 h inkubiert. Im ELISA wurde der Zellüberstand auf T-Zell-sezernierte, aktivierungstypische Zytokine hin untersucht. Die Tumorzelllyse wurde in einem Luziferase-basierten Assay über Zugabe von Luziferin detektiert. Getestet wurden drei Hemibody-Kombinationen aus α CD3(VH) α CD38_V1(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv), aus α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv), sowie α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv). Diese Daten wurden in Abbildung 26 gegenübergestellt.

Aus dieser ging hervor, dass Hemibodies T-Zelle aktivieren. In beiden durchgeführten ELISAs konnte, parallel zu Antikörperkonzentration, eine Zunahme an IL-2 und IFN- γ detektiert werden. Diese lag bei > 5 nM Antikörper bei 200-1000 pg IL-2/ml und 100-500 pg IFN- γ /ml. Gleicher Effekt wurde auch bei den Positivkontrollen, den BiTE Antikörpern, gemessen. Die Konzentration an sezernierten Zytokinen bei Einzel-Konstrukt-Stimulationen war, verglichen mit den Hemibody-Kombinationen, gering, stieg aber mit der zunehmenden Antikörperkonzentration > 5 nM stetig an.

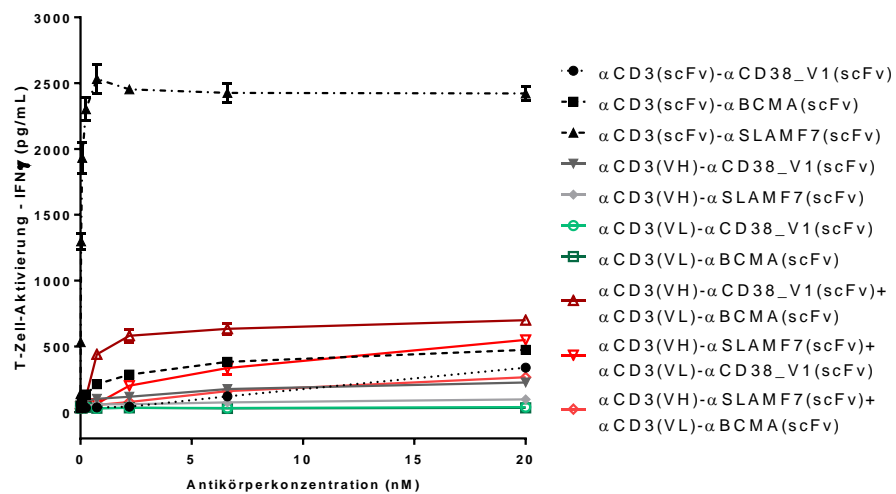
Die Hemibody-aktivierten T-Zellen induzierten die Lyse der Tumorzellen. Mit zunehmender Antikörperkonzentration stieg die detektierbare T-Zell-Aktivierung parallel zu der Menge an lysierten Tumorzellen. Die Hemibody-vermittelte Tumorzelllyse wurden bei drei weiteren MM Zelllinien OPM-2, U-266 und RPMI-8226 (Abbildung 34) untersucht.

Um zu belegen, dass der gemessene Effekt der Tumorzelllyse in den Luziferase-basierten Versuchen mit PBMCs auf die T-Zell Subpopulation zurückzuführen ist, wurde ein Viabilitätsassay mit aufgereinigten T-Zellen durchgeführt. Dieser bestätigte, dass die Hemibody-vermittelte Tumorzelllyse durch T-Zellen induziert wird (Abbildung 35, Anhang). Der lytische Effekt der aufgereinigten T-Zellen war identisch mit dem Effekt, der mit PBMCs gemessen wurde. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die stimulatorische Wirkung, die einzelne Hemibody-Fragmente in hohen Konzentrationen auf PBMCs besitzen, bei aufgereinigten T-Zellen deutlich verringert sind. Hemibody-Fragmente alleine zeigten vernachlässigbare stimulatorische Effekte auf T-Zellen.

IL-2



IFN-γ



Zellyse

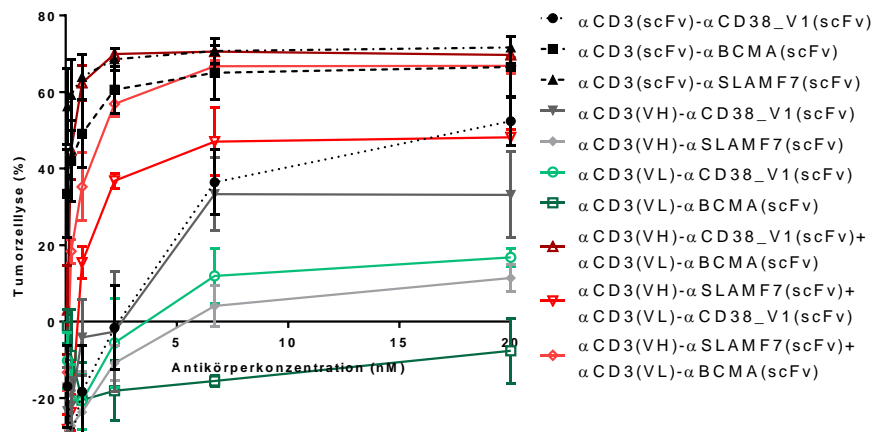


Abbildung 26: Hemibody-vermittelter T-Zell-Aktivierung und Tumorzellyse gemessen im IL-2 und IFN-γ ELISA und Luziferase Viabilitäts-Assay. Die Sekretion an T-Zell-aktivierungstypischen Zytokinen aus IL-2 und IFN-γ wurde an Antikörper-inkubierten MM.1S und PBMCs (Ratio Tumor:PBMCs = 1:5) nach 24 h im Überstand detektiert. Die Hemibody-vermittelte und T-Zell-induzierte Tumorzellyse wurden an fLuc+ MM.1S Zellen nachgewiesen. Als Positivkontrolle dienten BiTE Antikörper. Als Nullwert wurde ein Ansatz aus nur Tumorzellen und PBMCs verwendet. Schwarz = Positivkontrolle BiTE, Grau = Hemibody αCD3(VH), Grün = Hemibody αCD3(VL), Rot = Hemibody αCD3(VH) + Hemibody αCD3(VL). Hemibodies führen zur Aktivierung der T-Zellen und vermitteln die Tumorzellyse.

4.6.3 Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) der Hemibody-induzierten Tumorzelllyse auf Antigen-doppelt positiven CHO Zellen

Um die Wirksamkeit der produzierten Hemibodies zu untersuchen, wurde die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) bestimmt, bei der 50 % der maximalen Wirkung beobachtet wird. Der EC_{50} -Wert wird üblicherweise ermittelt, um die Potenz eines neuen Wirkstoffes abzuschätzen. Diese mittlere effektive Konzentration wurde an einer erstellten Dosis-Wirkungskurve berechnet. Hierfür wurden transfizierte Antigen-doppelt-positive CHO Zellen verwendet, die beide humane Antigene stabil exprimierten und ein schnelles Zellwachstum, ähnlich einer Tumorzelle, aufweisen. Rekombinante fLuc+ CHO Zellen wurden mit PBMCs (Verhältnis T:E = 1:5) und Hemibodies in einer Verdünnungsreihe für 24 h unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität über die Luziferaseaktivität bestimmt. Mittels Graphpad Prism wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und der EC_{50} -Wert über eine sigmoidale Kurve, mit 4-Parameter-nichtlinearen Regression, errechnet. Die erstellten Kurven und EC_{50} -Werte veranschaulicht Abbildung 27.

Sowohl Hemibody-Kombinationen als auch BiTEs zeigten bei geringen Antikörperkonzentrationen hohe lytische Effekte auf CHO Zellen innerhalb einer log-Stufe. Die besten Dosis-Wirkungskurven wurden mittels Kombinationen aus α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv) sowie α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) mit einer mittleren effektiven Konzentration zwischen 0,57 nM und 0,59 nM erzielt. Hemibody-Fragmente alleine ließen geringe bis keine lytischen Effekte auf Antigen-positive Zellen erkennen. Lediglich die α CD3(VH)-Konstrukte induzierten bei hohen Antikörperkonzentrationen > 10 nM eine T-Zell-vermittelte Lyse von Zielzellen. Die erhobenen Daten auf CHO Zellen waren mit den Daten auf Multiplen Myelomzellen kongruent (nicht gezeigt).

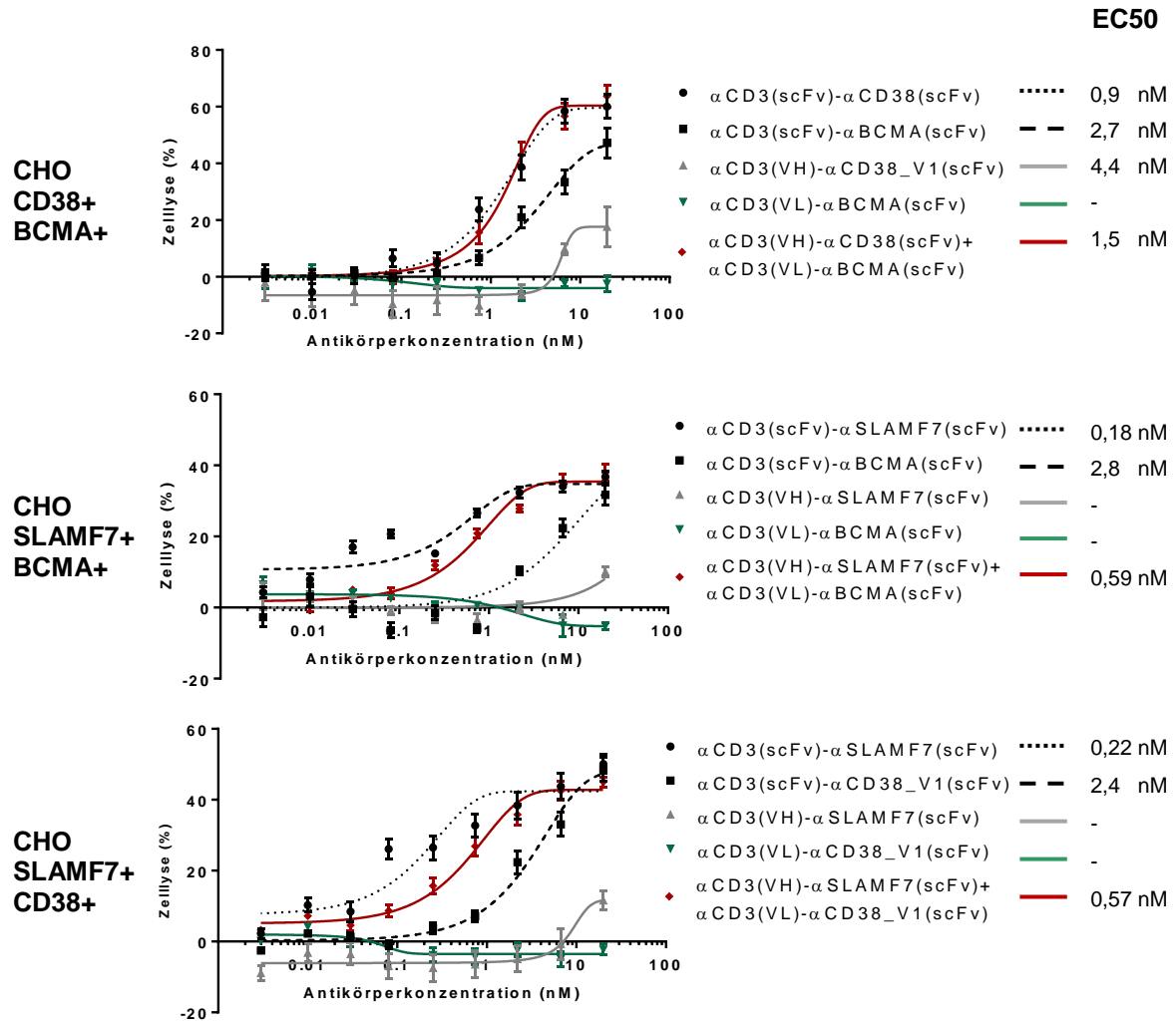


Abbildung 27: Mittlere Effektive Konzentration (EC₅₀) von Hemibodies auf CHO Zellen. Dosiswirkungskurven wurden mit einem Luziferase Viabilitäts-Assays von fLuc+ CHO Zellen mit PBMCs und verschiedenen Antikörperkonzentrationen ermittelt. Schwarz = BiTE, Grau = Hemibody α CD3(VH), Grün = Hemibody α CD3(VL), Rot = Hemibody α CD3(VH) + Hemibody α CD3(VL). Hemibodies und BiTEs zeigten hohe lytische Effekte auf CHO Zellen mit einer mittleren effektiven Konzentration zwischen 0,2 nM und 1,5 nM.

4.6.4 Kombinatorische Spezifität von Hemibodies auf Antigen-einfach-positiven CHO Zellen

BiTE Antikörper stehen in der Kritik, abseits der Tumorzellen Toxizität bei gesunden Körperzellen zu bewirken. Da ein BiTE Antikörper nur gegen ein Antigen gerichtet ist, erkennt und lysiert diese Therapieform jede Antigen-exprimierende Zelle, ob Tumorzelle oder Antigen-positive gesunde Zelle. Um diese Risiken zu minimieren adressieren Hemibodies eine Kombination aus zwei Antigenen. Eine Zelllyse wird nur bei dem gleichzeitigen Erkennen beider Antigene auf einer Zielzelle initiiert. Einfach-positive gesunde Körperzellen sollen hiernach keine Hemibody-induzierte Immunantwort auslösen.

Um die Spezifität von Hemibodies zu überprüfen, wurden fLuc+ Antigen-einfach-positive CHO Zellen verwendet, die nur ein humanes Protein stabil exprimieren. In diesem System ist keine Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen humanen Molekülen zu erwarten und der gemessene Effekt der Zelllyse kann nur auf die Bindung der Antikörper an das Zielprotein zurückgeführt werden. Dazu wurden 7 500 CHO Zellen ausgesät und am folgenden Tag mit 75 000 PBMCs und den Hemibody-Fragmenten, einzeln oder in Kombination, inkubiert. Nach 24 h wurde die Zellviabilität im Luziferase Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die jeweiligen BiTE Antikörper mitgeführt. Diese Daten werden in Abbildung 28 gezeigt. Aus dieser wurde ersichtlich, dass Hemibody-Fragmente alleine als auch in Kombination, sehr geringe lytische Effekte auf Antigen-einfach-positive Zellen besitzen. Die induzierte Rate der Tumorzelllyse lag bei 20 nM Antikörper < 20 %. Am höchsten wurde die Tumorzelllyse auf BCMA-einfach-positiven CHO Zellen detektiert. Bei allen anderen Zielzellen war dieser Effekt gering bis vernachlässigbar. Im Falle der BiTE Antikörper konnte auf Antigen-einfach-positiven Zellen eine Lyse der CHO Zellen von bis zu 50 % gemessen werden.

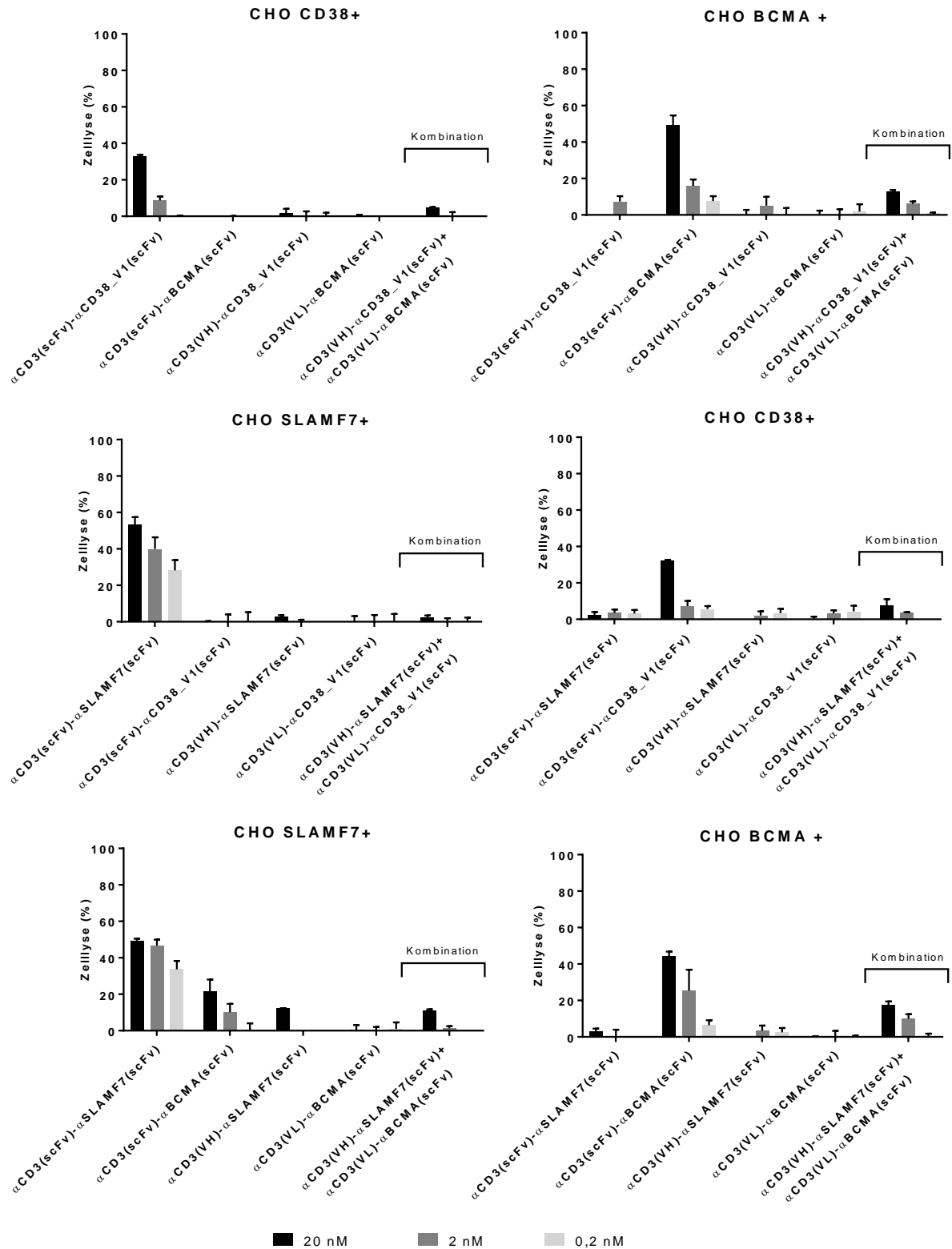


Abbildung 28: Verbesserte Sicherheit von Hemibodies auf Antigen-einfach-positiven Zellen im Vergleich zu BiTE Antikörpern. fLuc+ CHO Zellen mit jeweils nur einen Tumorantigenen wurden mit PBMCs (Ratio 1:5) und Antikörperkonzentrationen wie angegeben für 25 h co-kultiviert. Als Positivkontrolle dienten BiTE Antikörper. Hemibody-Kombinationen besitzen im Vergleich zu einem BiTE Antikörper vernachlässigbare lytischen Effekte auf Antigen-einfach-positiven Zellen.

4.7 *In vivo* Komplementierung und Effektivität von Hemibodies

Weiblichen NOD SCID Mäusen wurden i.v. 1×10^6 fLuc+ MM.1S Zellen injiziert. Nach einer 14-tägigen Tumorwachstumsphase wurden sie einmalig mit 1×10^7 PBMCS i.v. und einer täglichen s.c. Gabe von 8 µg Hemibodies (α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv)) bzw. BiTE Antikörper (α CD3(scFv)- α SLAMF7(scFv)) für 7 Tage behandelt. Der Behandlungsbeginn wurde als Tag 0 gekennzeichnet. Ab Tag 7 wurde die Antikörperbehandlung eingestellt und das Tumorstadium in der BiTE und Hemibody-Kombinationsgruppe beobachtet. Als Negativkontrolle dienten drei mit 1x PBS behandelte Mäuse. Eine Übersicht über die erhobenen Daten zeigt Abbildung 29. In den Kontrollgruppen aus 3 Mäusen, behandelt mit 1x PBS und den einzelnen Hemibody-Fragmenten, konnte von Tag 0 bis Tag 4 eine Zunahme der MM.1S Zellen in den Knochen der beiden Hinterbeine detektiert werden. Von Tag 4 bis Tag 7 nahm dagegen die Tumorstadium in den 1x PBS und zwei der α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) behandelten Mäusen ab und wächst dagegen in einer α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und allen α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) Mäusen weiter an. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen führte eine Behandlung von 4 Mäusen mit einer Kombination an Hemibodies gegen CD38 und SLAMF7 zu einem vollständigen Tumorrückgang nach bereits 4 Tagen, der sich nach einer 7-tägigen Applikation noch verstärkte. Diese Tumorreversion war auch nach etwa einer Woche ohne Antikörperinjektion immer noch stabil und unverändert. In der Positivgruppe von 4 Mäusen mit einer täglichen SLAMF7-BiTE Behandlung waren nach 7 Tagen 2 Mäuse frei von MM.1S Zellen.

Zusätzlich wurde innerhalb einer Durchflusszytometrie-Analyse der Expressionstatus der adressierten Antigene SLAMF7 und CD38 zusammen auf CD3-positiven Lymphozyten veranschaulicht (Abbildung 28,B). Aus dieser wird deutlich, dass etwa je 20 % der CD3-tragende Lymphozyten CD38 oder SLAMF7 exprimieren, jedoch kaum doppelt-positiv sind für beide Antigene.

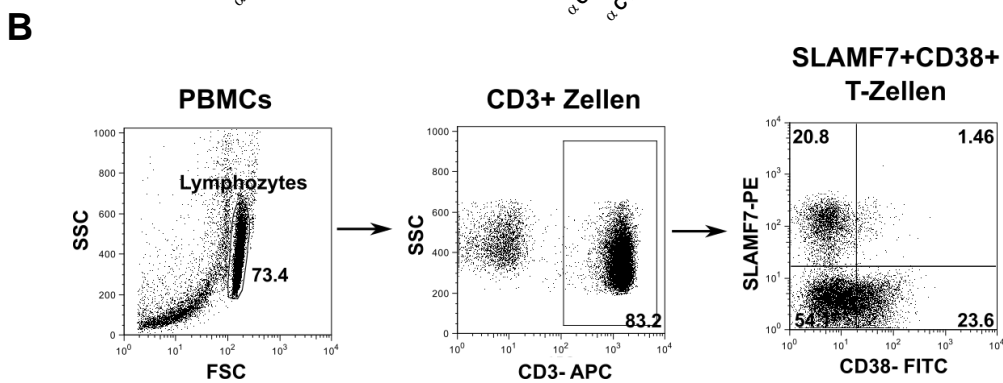
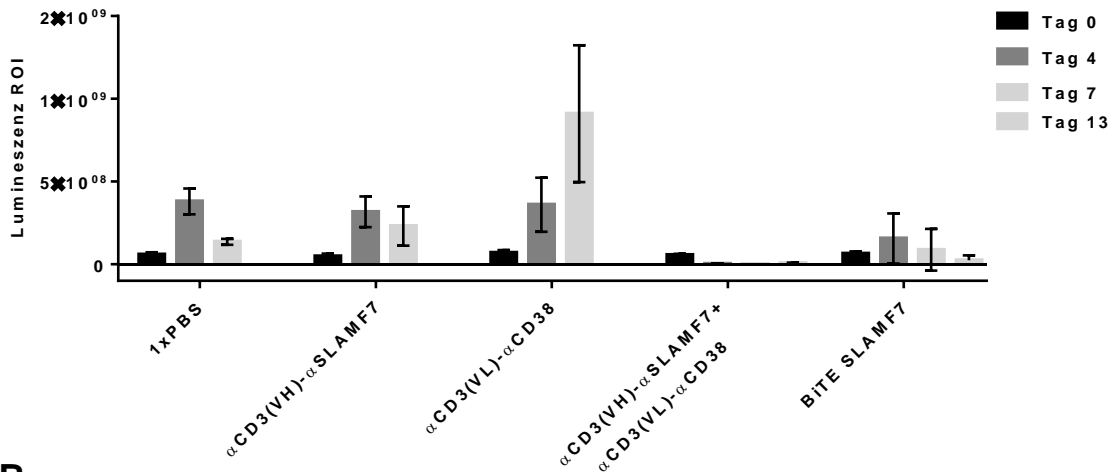
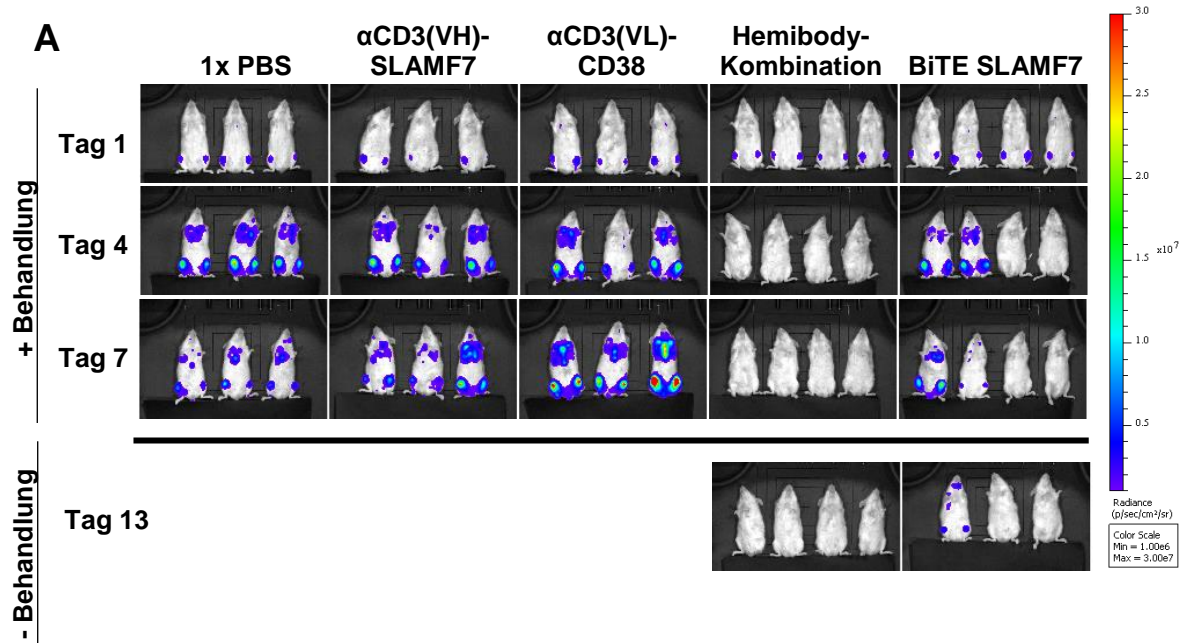


Abbildung 29: Wirkung von Hemibodies gegen SLAMF7 und CD38 auf MM.1S Zellen in NOD SCID Mäusen. A) 17 NOD SCID Mäuse wurden 2×10^6 fLuc+ MM.1S Zellen und nach 14 Tagen 1×10^7 PBMCs i.v. injiziert. Anschließend wurde für 7 Tage täglich 8 μ g Hemibody, BiTE Antikörper bzw 1x PBS (Negativkontrolle) subkutan verabreicht. Das Tumorstadium wurde bis Tag 13 über das Luziferase Signal der MM.1S Zellen beobachtet. Eine Behandlung von 4 Mäusen mit der Hemibody-Kombination α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) führte zu einem vollständigen Rückgang der MM.1S Zellen innerhalb von 4 Tagen. **B)** FACS-Analyse CD3+Lymphozyten auf SLAMF7 und CD38 Expression.

5 Diskussion

5.1 Neue Immuntherapien für eine spezifischere Tumorbehandlung

Als Standardbehandlung der meisten Krebserkrankungen gelten Chemo-, Strahlen- und die operative Therapie. Diese werden durch neue Therapieformen ergänzt. Häufig besitzen diese Therapieformen, wie monoklonale Antikörper, alleine jedoch geringe Effektivität, oder sie zeigen, wie Chemo-, Strahlentherapie und manche BiTE Antikörper, Dosis-limitierende Nebenwirkung. Folglich ist der Bedarf an effektiven Therapieformen mit geringen Nebenwirkungen immer noch sehr hoch. Diese Lücke soll durch eine Hemibody-basierte Therapie geschlossen werden. Hemibodies vereinen eine spezifische Therapieform, die auf Tumorzellen begrenzt ist, mit der Effektivität einer T-Zell-rekrutierenden Immuntherapie ähnlich den BiTE Antikörpern. Hierfür bestehen Hemibodies aus zwei geteilten Antikörperfragmenten, die Tumorzellen über eine aberrante Antigen-signatur erkennen und sich erst auf der Tumorzelle zu einem T-Zell-aktivierenden Antikörper zusammenschließen. Bislang wurden zwar schon viele trispezifische und polyspezifische Antikörper entwickelt, jedoch wenige, die eine aberrante Antigenkombination auf einer Zielzelle detektieren. Einer der wenigen Produzenten ist AbbVie, der IgG-Antikörper (*dual-variable-domain immunoglobulin* (DVD-Ig)) gegen zwei Epitope auf einer Zielzelle untersucht [194, 195]. Diesen fehlen, im Vergleich zu Hemibodies, jedoch die T-Zell-aktivierenden Domänen zur Aktivierung des Immunsystems. Ein anderer Ansatz, der die Aktivierung des Immunsystems mit einbezieht, sind *Trispecific Killer cell Engagers* (TriKEs). Diese aktivieren Natürliche Killerzellen (NK)-Zellen zur Tumorzelllyse. Sie bestehen dafür aus zwei verbundene scFv-Domänen zur spezifischen Erkennung von Tumorzellen und einem α CD16(scFv) zur Aktivierung von NK-Zellen. CD16 ist ein aktivierender Rezeptor, der durch die konservierte Fc-Domäne von IgGs gebunden werden kann und durch ADCC oder Effektorzellaktivierung die Tumorzelllyse induziert [196, 197]. Weitere Versuche in der Adressierung multipler Zielmoleküle wurden mit der Entwicklung einer bi- und trivalenten CAR T-Zelle unternommen. Diese CAR T-Zellen besitzen zwei bis drei CAR Rezeptoren gegen je ein spezifisches Tumorantigen. Hierdurch wird versucht, die Tumorheterogenität innerhalb eines Patienten zu berücksichtigen. Durch das Adressieren mehrerer Zielmoleküle soll das Überleben einzelner Tumorzelle entgegengewirkt werden [198, 199]. NK-Zellen, als auch benannte CAR T-Zellen, werden jedoch schon durch die Bindung jeweils eines Tumorantigens aktiviert. Eine spezifische Erkennung von Tumorzellen über zwei Antigene und der daraus möglichen Unterscheidung zwischen Antigen-einfach-positiver gesunder Körperzelle und maligner Tumorzelle ist nicht gegeben. Für ein verbessertes Sicherheitsprofil wurden T-Zellen mit zwei unterschiedlichen CAR-Proteinen ausgestattet. Die Bindung des ersten CAR-Rezeptors übermittelt ein Signal an die T-Zelle, das Überleben und Proliferation anregt, und einen zweiten CAR-Rezeptor hochreguliert, der nach Antigenbindung die zytotoxische T-Zell Maschinerie in Gang setzt [200-203]. Da die zytotoxische T-Zell Antwort hier wieder nur über ein Antigen

gesteuert wird, ist eine spezifischere Unterscheidung zwischen Tumorzelle und Antigen-einfach-positiven gesunden Körperzellen nicht gegeben. Über Rezeptor 1 voraktivierte CAR-T-Zellen können in einer heterogenen Tumorumgebung jede Antigen 2 exprimierende Zelle lysieren.

5.1.1 Antigenidentifizierung für eine spezifische MM Therapie

Hemibody-Therapien können auf viele maligne Erkrankungen zugeschnitten werden. Der Schlüssel hierfür liegt, wie bei jeder zielgerichteten Therapieform, in der Identifizierung der passenden Tumorantigene. Als Antigene können hier jegliche Rezeptoren herangezogen werden, die nicht Tumor-spezifisch sein müssen. Um Nebenwirkungen auf gesunden Körperzellen zu verhindern, dürfen die Zielmoleküle jedoch in Kombination nur auf den Tumorzellen zu finden sein. Diese Vorgabe ermöglicht es, Oberflächenmoleküle zu adressieren, die für andere Therapieformen schwierig anzugreifen sind, wie CD138. Um solch eine Antigenkombination zu identifizieren, stehen Proteinexpressionsdaten von 90 % aller Proteine von Geweben und Organen in Datenbanken wie *Human Proteinatlas* (HPA), *Human Proteome Map* (HPM) und *Proteomics Database* (PD) zur Verfügung. Bei der Datenbankanalyse der in dieser Arbeit beschriebenen Antigene für das MM wird deutlich, dass eine Kombination aus CD138, SLAMF7, CD38, CD229, BCMA und LAX1 vorteilhaft ist. Zusätzlich dazu bestätigten Durchflusszytometriestudien eine relativ stabile Antigen-Expression der Moleküle CD138, CD38, SLAMF7 und CD229 auf 30 MM Patienten (siehe Abbildung 12). Unter Berücksichtigung der Tumorerheterogenität und um dem Effekt der klonalen Expansion einzelner Zellen vorzugreifen, zeigen Kombinationen dieser Antigene bislang die vorteilhaftesten Eigenschaften für eine kombinatorische Immuntherapie. Das Antigen BCMA wurde dagegen nur bei etwa 30 % aller MM Zellen (CD38+/CD138+) detektiert. Eine BCMA-adressierende Immuntherapie ist folglich für die Behandlung eines heterogenen Tumors nicht ratsam, da nur ein geringer Teil aller Tumorzellen erkannt wird.

5.1.2 Neue Antigene auf MM Zellen – LAX1 und CHRM5

Während der Suche nach geeigneten Zielmolekülen für das MM mittels Genevestigator konnten im Rahmen dieser Arbeit interessante neue Rezeptoren identifiziert werden. Eines dieser Antigene ist der *lymphocyte transmembrane adaptor 1* (LAX1). Dieses wird auf T- und B-Zellen zur negativen Regulation der T-Zell und B-Zell-Rezeptor-vermittelten Immunantwort exprimiert. Nach der Aktivierung von T- oder B-Zellen wird LAX1 an dessen zytoplasmatischem Ende phosphoryliert. Es interagiert mit Grb2 und der p85 Untereinheit der PI3K [204]. LAX1 zeigte auf cDNA Ebene von MM Zelllinien eine ähnliche Expression wie CD138 und BCMA. Auf Proteinebene wurde LAX1 dagegen in geringen Mengen auf MM Zelllinien und primären Patientenproben detektiert (Abbildung 11, Abbildung 12). Auf PBMCs

und T-Zellen konnte LAX1 dagegen im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 11). Während der Antigensuche mittels Genevestigator wurde neben der Gruppe aus bekannten Antigenen eine zweite Gruppe unbekannter Gene, mit verändertem cDNA-Expressionsprofil, detektiert. Diese Gruppe zeigt ein geringes Expressionsniveau von CD138, CD38 und BCMA und wird sonst vermehrt als Oberflächenproteine auf dendritischen Zellen, Makrophagen oder neuronalen Zellen beschrieben (Abbildung 8). Von diesen Antigenkandidaten konnten die Rezeptoren, RNF215, GPR32 und CHRM5 auf cDNA Ebene in MM Zelllinien und Patientenproben bestätigt werden. Auf Proteinebene zeigten RNF215 und GPR32 eine relativ ubiquitäre Expression auf unterschieden Zelltypen wie Lymphozyten-Subpopulationen, Makrophagen, epithelialen Zellen und Fettgewebe (Abbildung 10, [205-207]). Der Muskarinische Acetylcholinrezeptoren M₅ (CHRM5) wird dagegen laut PD nur auf neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert. Hier vermittelt es die Antwort auf Acetylcholin [208] [209].

CHRM5 ist ein G-Protein gekoppelter Multipass-Transmembranrezeptor [208]. Er besitzt ein gebundenes G_q-Protein [210]. Die Bindung von Acetylcholin an den M₅ Rezeptor induziert die G-Protein spezifische Zellantwort [208, 209]. Nach der Bindung des Acetylcholins über das G_q-Protein wird die membranständige Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet PIP₂ in IP₃ und DAG. Das IP₃ diffundiert in das Zytoplasma und setzt hier Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Ca²⁺-Ionen stimulieren direkt oder indirekt über Calmodulin verschiedene biochemische Vorgänge wie zum Beispiel Glykogenabbau, Exozytose oder Kontraktion der glatten Muskeln. Muskarine Rezeptoren werden auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems gefunden, wo sie die Antwort auf Acetylcholin vermitteln. Bislang ist die klinische Relevanz von CHRM5 nicht vollständig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte es zum ersten Mal im Zytoplasma von MM Zellen primärer Patientenproben über immunhistochemischen Analysen nachgewiesen werden. Von 10 getesteten Patienten wurde bei 2 Patienten eine hohe CHRM5 Konzentration auf MM Zellen gemessen. 8 Patienten zeigten ein mittleres bis geringes CHRM5 Expressionsniveau. Im Zytoplasma von gesunden Geweben wurde CHRM5 jedoch ebenfalls detektiert. Inwiefern hier, als auch in den MM Zellen, CHRM5 auf die Zelloberfläche transportiert und exprimiert wird, oder ob es sich bei der immunhistochemische Färbung um eine unspezifische Antikörperfärbung handelt, konnte aufgrund des Mangels an weiteren kommerziell erhältlichen CHRM5 Antikörpern noch nicht geklärt werden.

5.2 Hemibody Produktion

Für die Expression von rekombinanten Proteinen wurden in den letzten Jahrzehnten diverse Systeme entwickelt. Diese umfassen bakterielle Zellen [211, 212], Hefen und filamentöse Pilzzellen [213, 214], eukaryotische Algen [215], Insektenzellen [216], Pflanzenzellen [217],

Säugetierzellen [218] und transgene Tiersysteme [219]. Die Wahl des richtigen Expressionssystems sollte nach den strukturellen Anforderungen an das Protein getroffen werden. Die Produktion von einfachen scFv-Fragmenten ist in prokaryotischen *E. coli* Zellsystemen als auch in CHO Zellkulturen möglich. Innerhalb von *E. coli* Zellen können Antikörper im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas oder in der oxidierenden Umgebung des periplasmatischen Raums produziert werden. Alle gezeigten Hemibodies dieser Arbeit wurden im Zytoplasma von *Shuffle T7 Express E.coli* Zellen generiert. In diesem *E. coli* Stamm wurden die beiden reduzierenden Thioredoxin und Glutaredoxin/Glutathion Signalwege im Zytoplasma durch die genetische Mutation der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und Glutathion-Reduktase (*gor*) ausgeschaltet [181]. Zusätzlich wird die periplasmatische Isomerase DsbC zur Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma exprimiert. Diese interagiert mit hydrophoben Resten fehlgefalteter Proteine, unterstützt die Bildung von Disulfidbrücken und führt zur Ausbildung von korrekt gefalteten Proteinen [181]. Aufgrund von veröffentlichten Daten zur verbesserten Ausbildung von Disulfidbrücken mit Hilfe von Fusionstags [181, 220] wurde zusätzlich Trx1 als Fusionstag für eine gesteigerte Produktion löslicher Antikörperderivate verwendet. In *Shuffle T7 E.coli Express* Zellen ist Trx1 Teil des RedOx-Systems. Es liegt oxidiert vor und katalysiert die Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma [181]. Als Fusionstag soll das hitzestabile Trx1 die Löslichkeit der Fusionsproteine verbessern. Vermutet wird unter anderem, dass Trx1, ähnlich wie Chaperone, an hydrophobe Aminosäuresegmente bindet und durch seine gute Löslichkeit dem Fusionsprotein mehr Zeit für eine richtige Faltung einräumt [221, 222]. Von 10 getesteten Fusionstags zeigte Trx1 die besten Produktionsergebnisse von zytoplasmatisch hergestellten Hemibody-Fragmenten (Abbildung 30).

5.2.1 Unterschiedliche Produzierbarkeit der einzelnen Hemibody-Konstrukte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 39 verschiedene Hemibody-Fragmente und BiTE Antikörper hergestellt. Es wurden, neben Konstrukte für CD70, CD28, BCMA und SLAMF7, zwei unterschiedliche Klone gegen CD38, drei gegen CXCR4 und vier gegen CD138 getestet. Insgesamt konnte bei allen Hemibody-Konstrukten eine mittlere bis geringe Proteinausbeute erreicht werden. Die Gesamtmenge an produziertem und IMAC-aufgereinigtem Konstrukt lag zwischen 2 µg/l und 300 µg/l Kulturvolumen.

Diese Varianz könnte für ein unzureichendes Produktionsprotokoll und für eine weiterhin notwendige Optimierung der Produktionsbedingungen stehen. Den größten Einfluss auf die Ausbeute besitzen bei der Antikörperproduktion Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, Medium, Mediumzusätze, IPTG-Induktion und Dauer der Proteinproduktion [223]. Um die Effizienz der Proteinproduktion zu erhöhen, müssten alle Parameter optimal auf das jeweilige Antikörperfragment abgestimmt werden [224]. Bis jetzt konnten aber noch keine generellen

Konditionen identifiziert werden, die eine gute Expression aller Antikörper eines Antikörperformats ermöglichen. Der Hauptfaktor ist, wie auch in diesem Fall, in der AS-Sequenz der verschiedenen Antikörper zu suchen [225]. Die Nukleotidsequenz bestimmt die erfolgreiche Transkription und Initiierung der Translation, und die AS-Sequenz die Proteinfaltung, Aggregatbildung und mögliche Proteintoxizität für die Zelle [225]. Die AS-Sequenzen der Hemibodies CD138_V1 und CD138_V2 (Indatuximab Ravtansine) unterschieden sich insgesamt in nur drei AS. Die BiTE Moleküle α CD3(scFv)- α CD138_V1(scFv) und α CD3(scFv)- α CD138_V2(scFv) wurden mit einer Ausbeute 50 μ g/l und 250 μ g/l produziert. Eine Veränderung von drei AS ergab hier eine verbesserte Produktionsmenge um ein Fünffaches. Die Wahl der geeigneten AS-Sequenz sollte daher mit größter Sorgfalt getroffen werden.

5.2.2 Aggregationen und Verunreinigungen produzierter Hemibody-Fragmente

Eine weitere Herausforderung bei der Expression von humanen rekombinanten Proteinen im Zytoplasma von *E.coli* Zellen ist die Bildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*). Aufgrund des reduzierenden Milieus im Zytoplasma der Zellen können keine Disulfidbrücken ausgebildet werden. Fehlenden Disulfidbrücken führen zur Fehlfaltung der Proteine. Sie akkumulieren und bilden Einschlusskörperchen (bis zu 0,5 g/l in Schüttelkolben und 3,1g/l im Bioreaktor) [223]. Diese Proteinaggregate reichern sich in der Zelle an, können zytotoxisch wirken und die weitere Proteinbiosynthese negativ beeinflussen [225-227]. Die Bildung solcher Proteinaggregate ist ein temperaturabhängiger Prozess. Es wurde daher versucht, durch die Verwendung eines pColdIV Vektors, der die Produktion bei 14 °C ermöglicht, das Problem der Aggregation zu verringern. Zudem wurden innerhalb dieser Arbeit veränderte *E.coli* Zellen verwendet, bei denen eine Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des Zytoplasmas bei oxidierenden Bedingungen beschrieben ist. Diese Ansätze schienen jedoch nicht ausreichend zu sein um Proteinaggregate zu verhindern. Bei der Produktion aller 39 Antikörper-Fragmente wurde ein großer Anteil an unlöslichen Produkten mit His-Tag im Zytoplasma der Bakterienlysate detektiert (Abbildung 31). Diese könnten durch aufwändige *in vitro* Renaturierung zu möglicherweise funktionsfähigen Antikörperfragmenten zurückgefaltet werden [228].

Verunreinigungen könnten zusätzlich auf bakterielle Proteine mit Histidin-reichen Sequenzen zurückzuführen sein [229]. *E.coli* Zellen exprimieren einige Proteine, die an einen Metall-Chelat-Komplex über freie Histidinreste binden und typischerweise über IMAC mit aufgereinigt werden. Je nach verwendetem Metallion werden unterschiedliche Proteine gebunden. Bei einer Ni-NTA Säule werden vermehrt SlyD und ArgE, bei einer Kobalt Säule das Protein CAT gebunden und eluiert [229]. Diese Proteine wurden neben weiteren Verunreinigungen auch auf SDS-PAGE-Gelen mit anschließender Coomassie-Färbung bei etwa 21 – 25 kDa detektiert

[229]. Weitere Verunreinigungen könnten über unspezifisch gebundene Proteine an die IMAC-Säule erklärt werden. Diese unspezifische Bindung erhöht sich wahrscheinlich bei gering produzierten Antikörpermengen aufgrund des daraus resultierenden hohen Anteils unbesetzter Bindungsstellen in der IMAC-Säule. Auch könnte ein Teil der Verunreinigungen auf abgebautes Proteinprodukt durch Proteasen zurückzuführen sein. Zudem lagen Hemibodies während der Produktion nicht nur als Einschlusskörperchen vor, sondern bildeten Di- und Multimere, wie anhand des Chromatographieprofils gezeigt werden konnte (Abbildung 21).

Verunreinigungen, unlösliche Aggregate, Abbauprodukte sowie Di- und Multimere konnten mittels IEX, DS und SEC erfolgreich von den monomeren Hemibodies abgetrennt werden. Produziert werden konnte so ein monomerischer Hemibody in ausreichender Konzentration und Reinheit bis zu 80 %.

5.3 Biochemische Eigenschaften von Hemibodies

Um das neue Format der Hemibody biochemisch zu charakterisieren, wurden neben analytischen Gelchromatographien zur Bestimmung des Monomergehalts auch Studien zur Bindungsaffinität an das Tumorantigen und Untersuchungen zur thermischen Stabilität durchgeführt.

Proteinaggregate und die Bildung von Di- und Multimeren bei der Produktion der Konstrukte waren verstärkt bei α CD3(VH)-Hemibodies oder BiTE Antikörpern zu beobachten. Diese könnten durch viele Ursachen erklärt werden, wie zum Beispiel Proteinfehlfaltungen bei der Expression. Nach der Synthese falten Proteine in ihre thermodynamisch-günstigste, dreidimensionale Struktur, in der hydrophobe Bereiche im Inneren von hydrophilen Bereichen an der Oberfläche des Moleküls isoliert werden [230]. Die Proteinstruktur wird hierbei durch nicht-kovalente Interaktionen und Disulfidbrückenbindungen stabilisiert [231]. Fehlfaltungen sind generell durch Mutationen, Fehler in der Proteinsynthese oder Umgebungsstress (Temperaturen, pH-Wert, oxidativer Stress) begründet [232]. Weiterhin können eine geringe Proteinstabilität oder Stress bei der Aufreinigung zu Proteinfehlfaltungen führen [233-236]. Hierbei werden hydrophobe Bereiche frei zugänglich und können zu Aggregationen und Interaktionen mit weiteren Proteinen führen [231, 237]. Im Hemibody-Format können freie hydrophobe Bereiche jedoch auch durch die unnatürliche geteilte α CD3-Domäne erklärt werden. α CD3(VL)-Hemibodies zeigten deutlich weniger Protein-Protein-Interaktionen. Für alle weiteren biochemischen Charakterisierungen wurden nur aufgereinigte, monomere Antikörper verwendet.

Um die Bindungsstärke der Hemibodies zu ihrem Zielepitop auf der Tumorzelle zu ermitteln, wurde die K_D bestimmt. Eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen ist die Bindung von Streptavidin zu Biotin mit einer Dissoziationskonstante im

Femtomolarbereich von 10^{-15} M [238]. Die meisten Antikörper haben K_D -Werte im unteren micromolaren (10^{-6} M) bis nanomolaren (10^{-7} - 10^{-9} M) Bereich. Blinatumomab bindet an CD19 mit einer K_D von $1,49 \times 10^{-9}$ M und an das CD3 der T-Zelle mit $2,6 \times 10^{-7}$ M [239]. Die in dieser Arbeit vorgestellten Hemibodies, wie auch BiTE Antikörper, besaßen eine Affinität zu ihrem Tumorantigen im Bereich von 10^{-7} - 10^{-10} M (Abbildung 24). Bis auf CD138_V2 zeigten Hemibodies vergleichbare K_D -Werte zu den entsprechenden BiTE Formaten. Die Affinität des α CD3(VH) und -(VL) zu CD3 ϵ wurde nicht bestimmt. Es wird jedoch vermutet, dass die Affinität dieser komplementierenden CD3-Domäne zur T-Zelle gering ist. Möglicherweise müssen sich die beiden α CD3 Antikörperfragmente zuerst über nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammenlagern und in die aktive Form falten, bevor sie gemeinsam an CD3 binden können. Durch die schwache Interaktionsstärke der beiden geteilten α CD3 Ketten zueinander könnte die Affinität zum CD3 zusätzlich verringert werden. Nicht-kovalent verbundene VH- und VL-Moleküle neigen dazu schnell voneinander zu dissoziieren [234-236]. Eine Optimierung der Affinität der beiden VH- und VL- Domänen zueinander ist jedoch nicht ratsam. Dies könnte zur Selbstligation der beiden Hemibody-Fragmente in Lösung, ohne die Bindung an ein Tumorantigen, und zur *off-target* Toxizität durch unkontrollierte T-Zell Stimulationen führen. Die geringe Affinität der beiden α CD3 Fragmente ist vermutlich besser für eine sichere und spezifische Hemibody-vermittelte T-Zell Antwort auf der Tumorzelle.

Hemibodies stellen mit einer veränderten Effektor-domäne, im Vergleich zu BiTE Antikörpern, eine neues Antikörperformat dar. Hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität und ihres Schmelzpunktes unterschieden sich diese beiden Antikörperformate jedoch kaum voneinander. Sowohl Hemibodies als auch BiTE Antikörper zeigten ähnliche Schmelzpunkte zwischen 55 und 73 °C. Im direkten Vergleich zueinander entfalteten sich BiTE Antikörper bereits bei 3-5 °C niedriger Temperatur. Interessanterweise konnte anhand dieser Versuche zur thermischen Stabilität beobachtet werden, dass Hemibodies im Vergleich zu BiTE Antikörpern, bereits bei Raumtemperatur von 25 °C, mehr freie hydrophobe Bereiche besaßen. Dies konnte anhand der SYPRO Orange Fluoreszenz zu Beginn der Schmelzkurve detektiert werden (siehe Abbildung 23). Diese könnten durch das geteilte α CD3 erklärt werden. Proteine mit freien hydrophoben Bereichen sind anfälliger für Aggregationen [233-236]. Dieser Effekt konnte vor allem bei Langzeitlagerungen der Konstrukte bei 4 °C beobachtet werden. Die Antikörperstabilität könnte durch die Zugabe von stabilisierenden Pufferzusätze oder Liganden signifikant erhöht werden. Diese reduzieren die Neigung der Proteine, sich während der Aufreinigung und Lagerung zu entfalten oder zu aggregieren. Verwendet werden könnten Natriumcitratpuffer mit pH-Werten zwischen 5,0-5,5. Zusätzlich verwendbare Additive sind vielfältig und müssen auf das jeweilige Protein angepasst werden. Möglich wäre der Einsatz von Arginin, Urea, Guanidin HCL, Glycerol, verschiedene Zucker, Polyethylenglykole, Aminosäuren, diversen Salzen u.v.m. [240]. Zudem wurden bereits viele weitere Methoden

beschrieben, um optimierte VH- und VL-Sequenzen zu identifizieren und so die Aggregatbildung zu reduzieren [241-244]. Diese Veränderungen sollten jedoch die Kontaktstellen zwischen dem α CD3(VH) und -(VL) für deren Komplementierung nicht stören. Aus den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass Hemibodies *in vitro* biochemisch den BiTE Antikörpern sehr ähneln. Daher ist zu erwarten, dass Hemibodies und BiTEs *in vivo* ähnliche physiologische Eigenschaften zeigen, die beachtet werden sollten. Bispezifische Antikörper besitzen einige Vorteile. Sie können aufgrund der geringen Größe gut ins Gewebe infiltrieren und einen nahen Kontakt zwischen Effektor und Zielzelle herstellen, der es ermöglicht, effiziente immunologische Synapsen ohne die Notwendigkeit von co-stimulierenden Molekülen zu generieren [245]. Je geringer dabei die Distanz zwischen Effektor und Tumorzelle ist, desto effizienter ist die Ausbildung der immunologischen Synapse und die T-Zell Antwort [246]. Jedoch werden sie aufgrund ihrer geringen Größe von etwa 40 kDa auch schnell über die Nieren aus dem Blut gefiltert und bzw durch das retikulohistiozytäre System abgebaut. Blinatumomab besitzt eine kurze Halbwertszeit von $1,25 \pm 0,63$ h [245, 247]. Dagegen besitzt Albumin (67 kDa) und ein klassischer IgG Antikörper (150 kDa) im Serum eine Halbwertszeit von 19 Tagen bzw. 3-4 Wochen [248]. Die meisten scFv basierten Antikörper ohne Fc-Domäne werden daher mit Albumin oder Albumin-bindenden Fragmenten fusioniert, die an den neonatalen Fc-Rezeptor binden und damit recycelt werden. Dies verlängert die Halbwertszeit im Serum um das fünf- bis sechsfache [249]. Zudem werden neue Methoden untersucht, wie die Molekülgröße über PEGylierung oder Multimerisierung anzupassen, oder über rekombinant produzierte Fc-Fragment-Fusionen die renale Filtration und Degradation zu verringern und FcRn-vermittelte-Recyclingprozesse zu nutzen [250]. Die Halbwertszeit von Hemibodies könnte auf diese Weise ebenfalls verlängert werden.

5.4 Funktionalitätsstudien von Hemibodies

5.4.1 Hemibodies binden auf humanen MM Zellen an ihr spezifisches Antigen

Hemibody-Fragmente sind in zwei funktionale Einheiten unterteilt, dem Tumorantigen-bindenden scFv und dem geteilten T-Zell-aktivierenden scFv. Eine sichere Immuntherapie setzt voraus, dass jede Untereinheit eines Hemibodies spezifisch ihr Zielmolekül auf der Tumorzelle bindet, um zu einer funktionsfähigen Einheit mit zytotoxischer T-Zell-Aktivierung zu komplementieren. Die spezifische Bindung wurde häufig als eines der Selektionskriterien zur Auswahl geeigneter AS-Sequenzen aus einer hergestellten Antikörper-Bibliothek der verschiedenen Hersteller herangezogen (siehe Herstellerangaben und Patente der verschiedenen verwendeten AS-Sequenzen Tabelle 13). Mittels durchflusszytometrischen Analysen auf MM Zellen und Antigen-einfach-positiven CHO Zellen wurde nachgewiesen, dass Hemibody Fragmente in der Lage sind, nur ihr spezifisches Zielantigen auf der Zelloberfläche zu binden. Antigene der möglichen komplementierenden Hemibody Partner

wurden dagegen nicht erkannt (Abbildung 33). Antigenbindung zeigten Hemibodies der AS-Sequenz CD38_V1, CD38_V2, CD138_V2, CXCR4_V2, CXCR4_V3, SLAMF7, BCMA, CD28 und die Hemibodies α CD3(scFv/VL)- α CD70(scFv). Alle weiteren Hemibodies besaßen dagegen geringe bis keine Bindungsaktivität. Die Menge an gebundenen einzelnen Hemibodies war äquivalent zu Kontroll-BiTE Antikörpern. Die geteilte CD3-Domäne nahm folglich keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Tumorantigendomäne. Die Hemibody-Fragmente mit geringer Bindungsaffinität wurden vermehrt als Multimer-Monomer-Aggregatgemisch produziert. Sie lagen folglich vermehrt inaktiv oder aggregiert vor. Von allen produzierten Hemibodies zeigten nur α CD3(scFv/VH/VL)- α CD38_V1(scFv) und α CD3(scFv/VH/VL)- α BCMA(scFv) Kreuzreaktivität gegen Makaken Antigene (Abbildung 32).

5.4.2 Hemibody-Komplementierung zu einem T-Zell-aktivierenden Komplex

Die Zusammenlagerung zweier geteilter Antikörper-Ketten zu einer funktionalen Einheit ist ein komplexer Prozess. Dieser ist abhängig von vielen Faktoren, wie dem Aufbau des Antikörpers mit der Anordnung der einzelnen Einheiten und deren Verknüpfungen über GS-Linker sowie den verwendeten Sequenzen für T- und Tumorzellbindenden Domänen. Auch die Konzentration an Antigenen auf der Tumorzelle, deren Verteilung, molekulare Größe und Struktur im Vergleich zu einem Partnerantigen spielt eine erhebliche Rolle. Weitere Faktoren, wie die gesamte Antikörpergröße, beeinflussen zudem die Wirksamkeit. Kleine Antikörper zeigen eine bessere Gewebsinfiltration. Zudem ist die Effektivität der Ausbildung der immunologischen Synapse größer aufgrund der geringen Distanz zwischen Effektor- und Tumorzelle. Jedoch ist bei Antikörpern mit geringer Molekülgröße die Halbwertszeit niedriger [191, 246]. Beim Aufbau der Hemibodies sind folglich vielen Faktoren zu beachten. Hier muss zudem die Wahl der beiden adressierten Antigenepitope, deren Distanz zur Zellmembran und zueinander berücksichtigt werden, um eine Religation des geteilten α CD3 Komplexes und die T-Zell vermittelten Tumorzelllyse zu initiieren. Dieser Effekt der Zelllyse konnte bei 39 von 75 getesteten Hemibody-Kombinationen bei einer Konzentration von 1-5 nM detektiert werden. (Abbildung 18). Diese Studien haben gezeigt, dass eine Komplementierung der α CD3(VH)- und -(VL)-Domänen zu einer funktionalen Einheit möglich ist. Es rekrutiert die T-Zelle an die Tumorzelle (Abbildung 25), aktiviert diese und induziert die T-Zell Antwort (Abbildung 26). Die induzierte Tumorzelllyse war in vielen Fällen zur BiTE Antikörper-vermittelten Lyse leicht verringert. Dieser Effekt könnte über eine verringerte Affinität der beiden geteilten α CD3 Domänen zum CD3 ϵ , im Gegensatz zum bereits fusioniert und gefalteten CD3(scFv) der BiTE Antikörper, erklärt werden. Zudem stimulierten einige Hemibody-Fragmente alleine in Konzentrationen von > 5 nM die Tumorzelllyse. Dieser Wirkung konnte bei Hemibody-Fragmenten unterschiedlicher Produktionen detektiert werden.

Bei etwa der Hälfte aller Kombinationen wurde keine Tumorzelllyse detektiert. Die Ursachen hierfür könnten, neben strukturellen Fehlfaltungen, in der molekularen Größe und Verteilung der Antigene liegen. So wäre es möglich, dass manche Antigene nicht in unmittelbarer Nähe zueinander exprimiert werden, oder die Epitope auf den beiden Antigenen zu weit voneinander entfernt liegen, als dass sich die beiden CD3-Domänen finden. Möglich sind weiterhin sterische Hinderungen der Antigene. Antigene könnten in ihrer 3-dimensionalen Struktur die Komplementierung der CD3-Domänen oder die Bindung an die T-Zelle behindern. Diese Problematik könnte durch die Wahl eines anderen Epitops oder der Linkerlängen korrigiert werden. Studien haben bereits gezeigt, dass Veränderungen der Linkerlänge Einfluss auf die Aktivität eines Antikörpers nimmt [251, 252].

5.4.3 *Off-Tumor* Toxizität von Hemibodies und BiTEs auf T-Zellen

In Studien wurde gezeigt, dass BiTE Antikörper Effektorzellen in Abwesenheit von Zielzellen selbst in hohen Konzentrationen nicht aktivieren. Nur in Anwesenheit der Zielzelle verknüpfen BiTE Antikörper, über zwei scFv, das CD3 ϵ der Effektorzellen mit einem weiteren Oberflächenmolekül der Zielzelle. Die Effektorzelle wird anschließend erst aktiviert, wenn eine kritische Menge an CD3-gebundenen BiTE Antikörpern überschritten ist. Die Ansammlung von TCR führt hier nachfolgend zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, ohne die Beteiligung von co-stimulierenden Molekülen [139-141]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass T-Zellen, die das adressierte Tumorantigen tragen, sich gegenseitig zur BiTE-vermittelten Zelllyse vernetzen. Dieser Effekt könnte der eigentlichen Antitumor Immunantwort entgegenwirken [191]. Einige der MM spezifischen adressierten Tumorantigene wurden auch auf der Oberfläche von T-Zellen detektiert. CD3+/CD8+ T-Zellen exprimieren neben CD28, einem Molekül zur Co-Stimulation, CXCR4 und zum Teil CD38 und SLAMF7 (Abbildung 19). Das führte dazu, dass sowohl BiTE Antikörper, wie auch Hemibody-Fragmente, T-Zellen binden könnten. Hemibodies zeigen hier jedoch einen klaren Vorteil. Aufgrund der geteilten α CD3-Domäne müssen T-Zellen beide Tumor-Zielmoleküle exprimieren um die Religation der beiden α CD3-Hälften und eine Hemibody-vermittelte T-Zelllyse zu initiieren. BiTE Antikörper stimulieren T-Zellen dagegen schon bei der Expression eines Zielmoleküls. Dieser Effekt konnte innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abbildung 20). Alle BiTE Antikörper, deren Zielantigene auf der T-Zelle ebenfalls exprimiert wurden, initiieren eine gegenseitige T-Zell-Aktivierung. Hemibody-Fragmente alleine zeigten diesen Effekt dagegen nicht. Ein Hemibody-Fragment war über das geteilte α CD3 nicht in der Lage, trotz möglicher Bindung an die T-Zelle über die Tumorantigensequenz, T-Zellen zu aktivieren. Wurden Hemibodies in Kombination miteinander eingesetzt, bei dem ein Fragment an die T-Zelle binden konnte war größtenteils keine T-Zell-Stimulation messbar. Nur in einigen Fällen, wie zum Beispiel bei den Kombinationen aus α CD3(VH)- α BCMA(scFv) und α CD3(VL)-

α SLAMF7(scFv) sowie α CD3(VH)- α BCMA(scFv) und α CD3(VL)- α CD28(scFv) wurde eine T-Zell-Aktivierung detektiert. Die so gebundenen T-Zellen eliminierten sich gegenseitig und standen einer Tumorspezifischen Immunantwort nicht mehr zur Verfügung. Die Mechanismen hinter diesem Effekt sind noch unklar. Insgesamt konnten 16 Hemibody-Kombinationen (Abbildung 20) identifiziert werden, die mit PBMCs von drei verschiedener Spender keine T-Zell-aktivierende Wirkungen in Abwesenheit der Zielzelle zeigten.

5.5 Potentielle Hemibody-Kombinationen für eine MM Behandlung

Auf der Grundlage von Produktionsdaten, biochemischer Charakterisierung, Funktionalität und der spezifischen T-Zell-Aktivierung nur in Anwesenheit der Tumorzelle, wurden aus 75 Hemibody-Kombinationen für die Behandlung von MM die Kombinationen aus α CD3(VH) α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv), α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL) α BCMA(scFv), sowie α CD3(VH)- α CD38_V1(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv) selektiert. Diese Hemibody-Fragmente konnten in einer mittleren bis hohen Konzentration, monomerisch und in einer Reinheit zwischen 35-65 % produziert werden. Zudem besaßen diese Konstrukte sowohl alleine, als auch in Kombination, keinen Einfluss auf die T-Zellen in Abwesenheit der Tumorzelle. Nur in Anwesenheit von MM Zellen rekrutieren benannte Hemibody-Kombinationen T-Zellen zur Tumorzelle (Abbildung 25). Die Hemibodies führen nachfolgend zur T-Zell-Aktivierung, Ausschüttung aktivierungstypischer Zytokine wie IL-2 und IFN- γ und zur Tumorzelllyse (Abbildung 26). Die Anzahl an lysierten Tumorzellen korrespondiert mit der gemessenen Konzentration an T-Zell stimulierenden Zytokinen und konnte bei vier MM Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 26, Abbildung 34). Diese Effekte wurden auch bei BiTE Antikörpern gemessen. Bislang wurde bei BiTE Antikörpern von einer halbmaximalen effektiven Konzentration im pM bis nM Bereich berichtet [246, 253, 254], die im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die EC₅₀-Konzentration der Hemibody-Kombinationen entsprach denen den BiTE Antikörper. Hier zeigte sich nach 24 h eine 20-35 %ige Tumorzelllyse bei einer halbmaximalen effektiven Konzentration im pM bis nM Bereich (Abbildung 27). Im Gegensatz zu BiTE Antikörpern besaßen Hemibodies, aufgrund der Tatsache, dass sie gleichzeitig zwei Tumorantigene für eine spezifische T-Zelle Antwort erkennen müssen, eine kombinatorische Spezifität. Im Vergleich zu BiTE Antikörpern ist die lytische Wirkung von Hemibodies auf Antigen-einfach-positive Zellen sehr gering und vernachlässigbar. Immer wieder werden Studien veröffentlicht, die von Nebenwirkungen der BiTE Antikörper auf Antigen-einfach-positive gesunde Körperzellen berichten [163, 164]. Dieser Effekt wurde auch bei BiTE Antikörpern gegen das MM gemessen. BiTE Antikörper erkannten und lysierten gesunde Antigen-einfach-positive Zellen und MM Zellen gleichermaßen. Hemibodies dagegen zeigten hier einen deutlichen Vorteil. Selbst in sehr hohen Antikörperkonzentrationen von 20 nM waren bei den Kombinationen aus

α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv) sowie α CD3(VH)- α CD38_V1(scFv) und α CD3(VL)- α BCMA(scFv) nur geringe lytische Effekte von 1-15 % messbar. BiTE Antikörper vermitteln dagegen eine *on-target/off-tumor*-Lyse von bis zu 50 %. Kombinationen aus α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) und α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) besaß keine Wirkung auf Antigen-einfach-positive Zellen. In einem Gemisch aus Antigen-einfach-positiven und -doppelt positiven Zellen wäre die Hemibody-vermittelte Immunantwort, im Gegensatz zu BiTE Antikörpern, auf die eigentlichen Tumorzellen beschränkt.

In *in vivo* Mausstudien an NOD SCID Mäusen führte eine tägliche Applikation von 8 μ g α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) mit α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) bereits nach 4 Tagen zur kompletten Remission eines MM.1S Tumors bei 4/4 Mäusen. Hiermit konnte die Funktionalität von Hemibodies gegen das MM *in vivo* belegt werden. Beide Hemibody-Fragmente waren in der Lage sich innerhalb eines Organismus zu finden, zu einem T-Zell-rekrutierenden Komplex zu komplementieren und die Tumorzelllyse zu initiieren. Bei einer SLAMF7 BiTE Behandlung waren nach 7 Tagen nur 2/4 Mäusen tumorfrei. Dieser verringerte lytische Effekt im Vergleich zu der untersuchten Hemibody-Kombination könnte in der SLAMF7-Expression von etwa 20 % der CD3-positiven T-Zellen begründet sein. Wie bereits in einem vorangegangenen T-Zell-Aktivierungs ELISA veranschaulicht wurde, rekrutieren SLAMF7-adressierende BiTE Antikörper nicht nur T-Zellen zur Tumorzelle, sondern vernetzen auch T-Zellen gegenseitig zur Lyse (Abbildung 20). Folglich stehen so weniger T-Zellen für eine BiTE-induzierte Immunantwort gegen das MM zur Verfügung. Hemibody-Fragmente alleine zeigten in allen getesteten Mäusen keine lytischen Effekte (Abbildung 29). Jedoch wurden hier Unterschiede im Tumorwachstum detektiert. In allen 1x PBS Mäusen und zwei α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) behandelten Mäusen nahm die Menge an MM.1S Zellen von Tag 4 auf Tag 7 ab. In diesem Zeitraum war dagegen bei allen α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) behandelten Mäusen und einer α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv) Maus ein Tumorwachstum ersichtlich. Ob es sich hierbei um eine verstärkte Tumorpheriferation aufgrund der einzelnen Hemibodies handelt ist unklar. Da die MM Zellpopulation von Tag 4 bis Tag 7 in manchen Mäusen abnimmt, könnte dieser Effekt auch mit einer Abstoßungsreaktion der Tumorzellen in manchen Mäusen, einer verstärkten Reaktion der injizierten PBMCs auf die Tumorzellen ohne Antikörperverknüpfung, einem ungeeignetem Testsystem oder Schwankungen in den Messparametern (unterschiedliche Luziferinmengen oder Messzeitpunkt), erklärt werden. In diesem Fall wäre die zunehmende Tumorpheriferation in den α CD3(VL)- α CD38_V1(scFv) behandelten Mäusen auf ein normales Zellwachstum zu begründen.

5.6 Ausblick – Weiterentwicklung Hemibodies

Hemibodies sollen eine sichere Immuntherapie ermöglichen, indem sie eine tumorspezifische Antigenkombination aus zwei Oberflächenproteinen erkennen und binden müssen, um sich

auf der Tumorzelle zu einem funktionsfähigen T-Zell-aktivierenden Antikörper zusammenzulagern. Durch dieses Format könnten *on-target/off-tumor* Toxizität, die andere Immuntherapien auf Antigen-einfach-positive gesunde Zellen zeigen, umgangen werden. Die Wirksamkeit als auch die verbesserte Spezifität von Hemibodies gegenüber BiTE Antikörpern konnte deutlich *in vitro*, auf MM Zelllinien, als auch *in vivo*, an einem MM basierendem Mausmodell, nachgewiesen werden.

Jedoch bleiben bis zur klinischen Anwendung noch einige Fragen offen die geklärt werden müssen. So muss untersucht werden, ob Hemibody-Fragmente alleine ohne komplementären Partner stimulatorische Effekte auf die Tumorzellproliferation ausüben, oder in hohen Konzentrationen T-Zellen aktivieren. Diese beiden Effekte deuteten sich bereits in einigen Versuchen bei hohen eingesetzten Antikörperkonzentrationen an (Abbildung 27-28, 34). Zudem konnte bei etwa der Hälfte aller getesteten Hemibody-Kombinationen keine gezielte Tumorzelllyse induziert werden. Hier war vermutlich keine Religation der beiden geteilten α CD3 Ketten möglich oder die produzierten Antikörper durch Fehlfaltungen inaktiv. Die Wahl der Antigenkombinationen wird hierdurch limitiert. Über Studien zu angepassten Antikörper-Linkerlängen an die Verteilung und der Distanz der adressierten Antigene oder Produktionsoptimierungen, könnte dieser Punkt optimiert werden. Zudem ist bislang unklar, ob T-Zellen nach der Aktivierung ohne Co-Stimulation in Anergie gehen und die Hemibody-vermittelte Immunantwort dadurch limitiert ist.

Andere Forscher haben sich hierfür bereits eine neue Strategie überlegt, um die Hemibody-basierte Technologie zu verbessern. Hier werden die geteilten reaktiven α CD3- Ketten über Schutzgruppen inaktiviert und erst am Zielgewebe, durch proteolytische Abspaltung der Schutzgruppe, freigesetzt und aktiviert. Ermöglicht wird diese Abspaltung der Schutzgruppen zum Beispiel in Darmgewebe durch Enterokinasen. Antikörperfragmente werden so nur in Tumornähe aktiviert. Im Körper liegen sie sonst inaktiv vor [255].

Unter der Berücksichtigung aller genannten Faktoren wäre eine Hemibody-basierte Therapieform eine große Bereicherung für die Behandlung von malignen Erkrankungen.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> , Antikörper-vermittelter Zytotoxizität
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i> , Antikörper-vermittelter zellulärer Phagozytose
ALL	akuter lymphatischer Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	<i>B-cell activation factor</i>
BCMA	<i>B-cell maturation Antigen</i> , TNFRSF17
bFGF/FGF2	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BiTE	<i>bispecific T-cell engager</i>
BsAbs	bispezifische Antikörper
cADPR	zyklische Adenosindiphosphatbose
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD229	LY9, SLAMF73
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i> , komplementvermittelte Zytolyse
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDRs	komplementaritätsbestimmende Regionen
CHRM5	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren M ₅
ConA	Concanavalin A
cspA	<i>cold shock protein A</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAG	Diacylglycerin
Db	<i>Diabody</i>
EAT-2	<i>Ewing's sarcoma-associated transcript 2</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
Fab	<i>antigen-binding fragment</i>
Fab	<i>antigen-binding fragment</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Scanning</i>
fLuc+	<i>Firefly</i> Luziferase-positiv
GADH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPA	<i>Human Proteinatlas</i>
HPM	<i>Human Proteome Map</i>
IEX	Ionenaustauschchromatographie
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IMAC	immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ITAMs	Tyrosin-basierenden Aktivierungsmotiven
ITSMs	<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motifs</i>

K _D	Dissoziationskonstante
l	Liter
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiple Myelom
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
NAD ⁺	ADPR aus Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NTA	Nitrilotriacetic Acid
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	<i>Proteomics Database</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RRMM	rezidiviertem oder refraktärem Multiplem Myelom
SAP	SLAM-assoziierten Proteinfamilie
scDb	<i>single-chain diabody</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDC1	Syndecan-1, CD138
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
SLAMF7	<i>Signaling lymphocytic activation molecule F7</i>
SV	Säulenvolumen
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAC1	<i>transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
taFv	<i>Tandem-scFv</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β ₂	transformierende Wachstumsfaktor-β ₂
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Trx1	Thioredoxin1
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
t-SNE	<i>T-distributed Stochastic Neighbor Embedding</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VH	Variable schwere Kette
viSNE	<i>visual interactive Stochastic Neighbor Embedding</i>
VL	Variable leichte Kette
α	Anti-

6.2 Literaturverzeichnis

1. Rajkumar, S.V. and S. Kumar, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. Mayo Clin Proc, 2016. 91(1): p. 101-19.
2. Tonon, G. and K.C. Anderson, *30 - Multiple Myeloma*, in *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, J. Mendelsohn, et al., Editors. 2015, Content Repository Only!: Philadelphia. p. 455-466.e4.
3. Koch-Institut, R., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. GEMEINSAME PUBLIKATION DES ZENTRUMS FÜR KREBSREGISTERDATEN UND DER GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2017. 11. Ausgabe.
4. Christian Gerecke, S.F., Susanne Striffler, Martin Schmidt-Hieber, Hermann Einsele, Stefan Knop *Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms* Deutsches Ärzteblatt 2016. Jg. 113(Heft 27–28).
5. Attal, M., et al., *A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma*. Intergroupe Francais du Myelome. N Engl J Med, 1996. 335(2): p. 91-7.
6. Singhal, S., et al., *Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma*. N Engl J Med, 1999. 341(21): p. 1565-71.
7. Dimopoulos, M., et al., *Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma*. N Engl J Med, 2007. 357(21): p. 2123-32.
8. Rios-Tamayo, R., et al., *Pomalidomide in the treatment of multiple myeloma: design, development and place in therapy*. Drug Des Devel Ther, 2017. 11: p. 2399-2408.
9. Richardson, P.G., et al., *A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma*. N Engl J Med, 2003. 348(26): p. 2609-17.
10. Barlogie, B., et al., *Treatment of multiple myeloma*. Blood, 2004. 103(1): p. 20-32.
11. Zhang, H. and J. Chen, *Current status and future directions of cancer immunotherapy*. J Cancer, 2018. 9(10): p. 1773-1781.
12. Weiner, L.M., J.C. Murray, and C.W. Shuptrine, *Antibody-based immunotherapy of cancer*. Cell, 2012. 148(6): p. 1081-4.
13. GM, C., *The Cell: A Molecular Approach - The Development and Causes of Cancer*. Vol. 2nd edition. 2000, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
14. Vigneron, N., *Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy*. BioMed research international, 2015. 2015: p. 948501-948501.
15. Dalgleish, A. and H. Pandha, *Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines*. Adv Cancer Res, 2007. 96: p. 175-90.
16. Akl, M.R., et al., *Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine*. Oncotarget, 2015. 6(30): p. 28693-715.
17. Cojoc, M., et al., *Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis*. Onco Targets Ther, 2013. 6: p. 1347-61.
18. Deaglio, S., et al., *CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target*. Trends Mol Med, 2008. 14(5): p. 210-8.
19. Fehniger, T.A., *CD70 turns on NK cells to attack lymphoma*. Blood, 2017. 130(3): p. 238-239.
20. Hengeveld, P.J. and M.J. Kersten, *B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy?* Blood Cancer Journal, 2015. 5: p. e282.
21. Liao, Y.X., et al., *The role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in the progression and metastasis of bone sarcomas (Review)*. Int J Mol Med, 2013. 32(6): p. 1239-46.
22. Weisel, K., *Spotlight on elotuzumab in the treatment of multiple myeloma: the evidence to date*. Onco Targets Ther, 2016. 9: p. 6037-6048.
23. Tkachenko, E., J.M. Rhodes, and M. Simons, *Syndecans: new kids on the signaling block*. Circ Res, 2005. 96(5): p. 488-500.
24. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Biochem, 1999. 68: p. 729-77.
25. Teng, Y.H., R.S. Aquino, and P.W. Park, *Molecular functions of syndecan-1 in disease*. Matrix Biol, 2012. 31(1): p. 3-16.

26. Akl, M.R., et al., *Molecular and clinical profiles of syndecan-1 in solid and hematological cancer for prognosis and precision medicine*. *Oncotarget*, 2015. 6(30): p. 28693-28715.
27. Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield, *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation*. *Cell Regul*, 1989. 1(1): p. 27-35.
28. Dobra, K., M. Nurminen, and A. Hjerpe, *Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells*. *Anticancer Res*, 2003. 23(3b): p. 2435-44.
29. Gallo, R., et al., *Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin*. *J Invest Dermatol*, 1996. 107(5): p. 676-83.
30. Nugent, M.A. and E.R. Edelman, *Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity*. *Biochemistry*, 1992. 31(37): p. 8876-83.
31. Salmivirta, M., J. Heino, and M. Jalkanen, *Basic fibroblast growth factor-syndecan complex at cell surface or immobilized to matrix promotes cell growth*. *J Biol Chem*, 1992. 267(25): p. 17606-10.
32. Chu, C.L., J.A. Buczek-Thomas, and M.A. Nugent, *Heparan sulphate proteoglycans modulate fibroblast growth factor-2 binding through a lipid raft-mediated mechanism*. *Biochem J*, 2004. 379(Pt 2): p. 331-41.
33. Beauvais, D.M., B.J. Burbach, and A.C. Rapraeger, *The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells*. *J Cell Biol*, 2004. 167(1): p. 171-81.
34. Elenius, K., et al., *Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins*. *J Biol Chem*, 1990. 265(29): p. 17837-43.
35. Purushothaman, A., et al., *Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis*. *Blood*, 2010. 115(12): p. 2449-57.
36. Beauvais, D.M., et al., *Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor*. *J Exp Med*, 2009. 206(3): p. 691-705.
37. Rajgopal, R., et al., *Heparin synergistically enhances interleukin-11 signaling through up-regulation of the MAPK pathway*. *J Biol Chem*, 2006. 281(30): p. 20780-7.
38. Gotte, M., et al., *An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ*. *Breast Cancer Res*, 2007. 9(1): p. R8.
39. O'Connell, M.P., et al., *Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells*. *J Biol Chem*, 2009. 284(42): p. 28704-12.
40. Sullivan, H.C., et al., *Daratumumab (anti-CD38) induces loss of CD38 on red blood cells*. *Blood*, 2017. 129(22): p. 3033-3037.
41. Sherman, G.G., et al., *CD38 Expression on CD8+ T Cells as a Prognostic Marker in Vertically HIV-Infected Pediatric Patients*. *Pediatric Research*, 2002. 51(6): p. 740-745.
42. Cannizzo, E.S., et al., *Immunophenotype and Function of CD38-Expressing CD4+ and CD8+ T Cells in HIV-Infected Patients Undergoing Suppressive Combination Antiretroviral Therapy*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014. 211(9): p. 1511-1513.
43. Sandoval-Montes, C. and L. Santos-Argumedo, *CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines*. *J Leukoc Biol*, 2005. 77(4): p. 513-21.
44. Gars, M.L., et al., *CD38 is a key regulator of enhanced NK cell immune responses during pregnancy through its role in immune synapse formation*. *bioRxiv*, 2018: p. 349084.
45. Liu, Q., et al., *Crystal structure of human CD38 extracellular domain*. *Structure*, 2005. 13(9): p. 1331-9.
46. Ferrero, E. and F. Malavasi, *Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone*

- marrow stromal cell antigen 1 and alypsian ADP-ribosyl cyclase*. J Immunol, 1997. 159(8): p. 3858-65.
47. Lee, H.C., *Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP*. Physiol Rev, 1997. 77(4): p. 1133-64.
 48. Santos-Argumedo, L., et al., *A B lymphocyte surface molecule mediating activation and protection from apoptosis via calcium channels*. J Immunol, 1993. 151(6): p. 3119-30.
 49. Zubiaur, M., et al., *CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3-zeta/zeta-associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes*. J Immunol, 1997. 159(1): p. 193-205.
 50. Deaglio, S., et al., *CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential*. Blood, 2007. 110(12): p. 4012-21.
 51. Zilber, M.T., et al., *CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(6): p. 2840-5.
 52. Deaglio, S., et al., *Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member*. J Immunol, 1998. 160(1): p. 395-402.
 53. Deaglio, S., et al., *CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells*. Mol Med, 2010. 16(3-4): p. 87-91.
 54. Avery, D.T., et al., *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells*. J Clin Invest, 2003. 112(2): p. 286-97.
 55. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells*. J Exp Med, 2004. 199(1): p. 91-8.
 56. Tai, Y.T. and K.C. Anderson, *Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma*. Immunotherapy, 2015. 7(11): p. 1187-99.
 57. Elgueta, R., V.C. de Vries, and R.J. Noelle, *The immortality of humoral immunity*. Immunol Rev, 2010. 236: p. 139-50.
 58. Yang, M., et al., *B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells*. J Immunol, 2005. 175(5): p. 2814-24.
 59. Novak, A.J., et al., *Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival*. Blood, 2004. 103(2): p. 689-94.
 60. Neri, P., et al., *Neutralizing B-cell activating factor antibody improves survival and inhibits osteoclastogenesis in a severe combined immunodeficient human multiple myeloma model*. Clin Cancer Res, 2007. 13(19): p. 5903-9.
 61. Bellucci, R., et al., *Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor*. Blood, 2005. 105(10): p. 3945-50.
 62. Boles, K.S. and P.A. Mathew, *Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily*. Immunogenetics, 2001. 52(3-4): p. 302-7.
 63. Lee, J.K., K.S. Boles, and P.A. Mathew, *Molecular and functional characterization of a CS1 (CRACC) splice variant expressed in human NK cells that does not contain immunoreceptor tyrosine-based switch motifs*. Eur J Immunol, 2004. 34(10): p. 2791-9.
 64. Liu, Y.C., S. Szmania, and F. van Rhee, *Profile of elotuzumab and its potential in the treatment of multiple myeloma*. Blood Lymphat Cancer, 2014. 2014(4): p. 15-27.
 65. Cannons, J.L., S.G. Tangye, and P.L. Schwartzberg, *SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity*. Annu Rev Immunol, 2011. 29: p. 665-705.
 66. Lee, J.K., et al., *CS1 (CRACC, CD319) induces proliferation and autocrine cytokine expression on human B lymphocytes*. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4672-8.
 67. Malaer, J.D. and P.A. Mathew, *CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma*. Am J Cancer Res, 2017. 7(8): p. 1637-1641.

-
68. Einsele, H. and M. Schreder, *Treatment of multiple myeloma with the immunostimulatory SLAMF7 antibody elotuzumab*. *Ther Adv Hematol*, 2016. 7(5): p. 288-301.
 69. Kim, J.R., S.O. Mathew, and P.A. Mathew, *Blimp-1/PRDM1 regulates the transcription of human CS1 (SLAMF7) gene in NK and B cells*. *Immunobiology*, 2016. 221(1): p. 31-9.
 70. Tai, Y.T., et al., *Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu*. *Blood*, 2008. 112(4): p. 1329-37.
 71. Caruz, A., et al., *Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene*. *FEBS Lett*, 1998. 426(2): p. 271-8.
 72. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling*. *J Biol Chem*, 1998. 273(2): p. 669-72.
 73. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment*. *Blood*, 2006. 107(5): p. 1761-7.
 74. Wojcechowskyj, J.A., et al., *Quantitative phosphoproteomics of CXCL12 (SDF-1) signaling*. *PLoS One*, 2011. 6(9): p. e24918.
 75. Domanska, U.M., et al., *A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide*. *Eur J Cancer*, 2013. 49(1): p. 219-30.
 76. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 635-8.
 77. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. *Nature*, 1996. 382(6594): p. 829-33.
 78. Jacobs, J., et al., *CD70: An emerging target in cancer immunotherapy*. *Pharmacol Ther*, 2015. 155: p. 1-10.
 79. Boursalian, T.E., et al., *Targeting CD70 for human therapeutic use*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. 647: p. 108-19.
 80. Denoed, J. and M. Moser, *Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance*. *J Leukoc Biol*, 2011. 89(2): p. 195-203.
 81. Julie A. McEarchern, C.M., Allen Ho, Yu-Tzu Tai, Leigh Francisco, Kerry Klussman, Carol Morris-Tilden, Kristine Gordon, Ezogelin Oflazoglu, Kim Kissler, Nikhil Munshi, Kenneth C. Anderson, Steven P. Treon, Paul Carter, Alan F. Wahl, Iqbal S. Grewal and Che-Leung Law, *A Humanized Anti-CD70 Monoclonal Antibody Targets CD70-Expressing Multiple Myeloma*. *Blood*, 2005. 106(11): p. 1591.
 82. de la Fuente, M.A., et al., *Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9*. *Blood*, 2001. 97(11): p. 3513-20.
 83. Cartier, F., et al., *The expression of the hepatocyte SLAMF3 (CD229) receptor enhances the hepatitis C virus infection*. *PLoS One*, 2014. 9(6): p. e99601.
 84. Llinas, L., et al., *Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry*. *Immunol Lett*, 2011. 134(2): p. 113-21.
 85. Martin, M., et al., *Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229*. *J Immunol*, 2005. 174(10): p. 5977-86.
 86. Romero, X., et al., *CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse*. *J Immunol*, 2005. 174(11): p. 7033-42.
 87. Atanackovic, D., et al., *Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma*. *Haematologica*, 2011. 96(10): p. 1512-20.
 88. Esensten, J.H., et al., *CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy*. *Immunity*, 2016. 44(5): p. 973-88.
 89. Beyersdorf, N., T. Kerkau, and T. Hunig, *CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective*. *Immunotargets Ther*, 2015. 4: p. 111-22.
-

90. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(4): p. 227-42.
91. Boise, L.H., et al., *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL*. Immunity, 1995. 3(1): p. 87-98.
92. Attarwala, H., *TGN1412: From Discovery to Disaster*. Journal of young pharmacists : JYP, 2010. 2(3): p. 332-336.
93. Nair, J.R., et al., *CD28 expressed on malignant plasma cells induces a prosurvival and immunosuppressive microenvironment*. J Immunol, 2011. 187(3): p. 1243-53.
94. Bahlis, N.J., et al., *CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival*. Blood, 2007. 109(11): p. 5002-10.
95. Mohr, E., et al., *Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature*. J Immunol, 2009. 182(4): p. 2113-23.
96. van de Donk, N.W., et al., *Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma*. Leukemia, 2012. 26(2): p. 199-213.
97. van de Donk, N.W., et al., *Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma*. Blood, 2016. 127(6): p. 681-95.
98. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. 12(4): p. 278-87.
99. Charles A Janeway, J., Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik, *Immunobiology*. The Immune System in Health and Disease. Vol. 5th edition. 2001: New York: Garland Science.
100. Emmons, C. and L.G. Hunsicker, *Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use*. Iowa Med, 1987. 77(2): p. 78-82.
101. Kimball, J.A., et al., *OKT3 antibody response study (OARS): a multicenter comparative study*. Transplant Proc, 1993. 25(1 Pt 1): p. 558-60.
102. Hwang, W.Y. and J. Foote, *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. 36(1): p. 3-10.
103. Presta, L.G., *Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(5-6): p. 640-56.
104. Morrison, S.L., et al., *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(21): p. 6851-5.
105. Galizia, G., et al., *Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer*. Oncogene, 2007. 26(25): p. 3654-60.
106. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. 321(6069): p. 522-5.
107. Riechmann, L., et al., *Reshaping human antibodies for therapy*. Nature, 1988. 332(6162): p. 323-327.
108. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. 357(1): p. 39-51.
109. Hoogenboom, H.R. and P. Chames, *Natural and designer binding sites made by phage display technology*. Immunol Today, 2000. 21(8): p. 371-8.
110. Lonberg, N., *Human antibodies from transgenic animals*. Nat Biotechnol, 2005. 23(9): p. 1117-25.
111. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. 228(4705): p. 1315-7.
112. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 677-704.
113. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. 192(7): p. 1027-34.

114. Lesokhin, A.M., et al., *Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study*. J Clin Oncol, 2016. 34(23): p. 2698-704.
115. Gorgun, G., et al., *Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma*. Clin Cancer Res, 2015. 21(20): p. 4607-18.
116. Spiess, C., Q. Zhai, and P.J. Carter, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*. Mol Immunol, 2015. 67(2 Pt A): p. 95-106.
117. Dahlén, E., N. Veitonmäki, and P. Norlén, *Bispecific antibodies in cancer immunotherapy*. Therapeutic advances in vaccines and immunotherapy, 2018. 6(1): p. 3-17.
118. de Weers, M., et al., *Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors*. J Immunol, 2011. 186(3): p. 1840-8.
119. Overdijk, M.B., et al., *Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma*. MAbs, 2015. 7(2): p. 311-21.
120. Krejcik, J., et al., *Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma*. Blood, 2016. 128(3): p. 384-94.
121. Collins, S.M., et al., *Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC*. Cancer Immunol Immunother, 2013. 62(12): p. 1841-9.
122. Zonder, J.A., et al., *A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma*. Blood, 2012. 120(3): p. 552-9.
123. Lonial, S., et al., *Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. N Engl J Med, 2015. 373(7): p. 621-31.
124. Schönfeld, K., et al., *Indatuximab ravtansine (BT062) combination treatment in multiple myeloma: pre-clinical studies*. Journal of hematology & oncology, 2017. 10(1): p. 13-13.
125. Bashey, A., et al., *CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2009. 113(7): p. 1581-8.
126. Perez, P., et al., *Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody*. Nature, 1985. 316(6026): p. 354-6.
127. 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.
128. Staerz, U.D. and M.J. Bevan, *Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(5): p. 1453-7.
129. Mezzanzanica, D., et al., *Human ovarian carcinoma lysis by cytotoxic T cells targeted by bispecific monoclonal antibodies: analysis of the antibody components*. Int J Cancer, 1988. 41(4): p. 609-15.
130. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(16): p. 5879-83.
131. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. Science, 1988. 242(4877): p. 423-6.
132. Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, *"Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(14): p. 6444-8.
133. Mallender, W.D. and E.W. Voss, Jr., *Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody*. J Biol Chem, 1994. 269(1): p. 199-206.
134. 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.

135. Thakur, A. and L.G. Lum, "NextGen" *Biologics: Bispecific Antibodies and Emerging Clinical Results*. *Expert Opin Biol Ther*, 2016. 16(5): p. 675-88.
136. Nunez-Prado, N., et al., *The coming of age of engineered multivalent antibodies*. *Drug Discov Today*, 2015. 20(5): p. 588-94.
137. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. *Br J Pharmacol*, 2009. 157(2): p. 220-33.
138. Baeuerle, P.A. and C. Reinhardt, *Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy*. *Cancer Res*, 2009. 69(12): p. 4941-4.
139. Kufer, P., R. Lutterbuse, and P.A. Baeuerle, *A revival of bispecific antibodies*. *Trends Biotechnol*, 2004. 22(5): p. 238-44.
140. 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.
141. Brischwein, K., et al., *Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class*. *J Immunother*, 2007. 30(8): p. 798-807.
142. Lopez, J.A., et al., *Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death*. *Trends Immunol*, 2012. 33(8): p. 406-12.
143. 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.
144. Molhoj, M., et al., *CD19-/CD3-bispecific antibody of the BiTE class is far superior to tandem diabody with respect to redirected tumor cell lysis*. *Mol Immunol*, 2007. 44(8): p. 1935-43.
145. 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.
146. Klinger, M., et al., *Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab*. *Blood*, 2012. 119(26): p. 6226-33.
147. Bargou, R., et al., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*. *Science*, 2008. 321(5891): p. 974-7.
148. June, C.H., et al., *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. *Science*, 2018. 359(6382): p. 1361-1365.
149. Kuwana, Y., et al., *Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 149(3): p. 960-8.
150. Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, *Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(24): p. 10024-8.
151. Garfall, A.L., et al., *Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma*. *N Engl J Med*, 2015. 373(11): p. 1040-7.
152. Tian, C., et al., *Anti-CD138 chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for multiple myeloma with extensive extramedullary involvement*. *Ann Hematol*, 2017. 96(8): p. 1407-1410.
153. Gogishvili, T., et al., *SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7(+) normal lymphocytes*. *Blood*, 2017. 130(26): p. 2838-2847.
154. Mikkilineni, L. and J.N. Kochenderfer, *Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma*. *Blood*, 2017. 130(24): p. 2594-2602.
155. Oncology, T.L., *High stakes, high risks*. *The Lancet. Oncology*, February 2007. 8(2): p. 85.
156. Williams, M., et al., *Rituximab-induced Cytokine Storm in the Absence of Overt Lymphoproliferative Disease*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2016. 38(1): p. e29-31.

157. Brentjens, R.J., et al., *CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia*. *Sci Transl Med*, 2013. 5(177): p. 177ra38.
158. Davila, M.L., et al., *Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia*. *Sci Transl Med*, 2014. 6(224): p. 224ra25.
159. Kochenderfer, J.N., et al., *Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2013. 122(25): p. 4129-39.
160. Kochenderfer, J.N., et al., *Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor*. *J Clin Oncol*, 2015. 33(6): p. 540-9.
161. Lee, D.W., et al., *T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial*. *Lancet*, 2015. 385(9967): p. 517-528.
162. Qasim, W., et al., *Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells*. *Sci Transl Med*, 2017. 9(374).
163. Kebenko, M., et al., *A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE(R)) antibody construct, in patients with refractory solid tumors*. *Oncoimmunology*, 2018. 7(8): p. e1450710.
164. Parkhurst, M.R., et al., *T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis*. *Mol Ther*, 2011. 19(3): p. 620-6.
165. Morgan, R.A., et al., *Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2*. *Mol Ther*, 2010. 18(4): p. 843-51.
166. Dagogo-Jack, I. and A.T. Shaw, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017. 15: p. 81.
167. Marusyk, A. and K. Polyak, *Tumor heterogeneity: causes and consequences*. *Biochimica et biophysica acta*, 2010. 1805(1): p. 105-117.
168. Fidler, I.J. and I.R. Hart, *Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications*. *Science*, 1982. 217(4564): p. 998-1003.
169. Heppner, G.H., *Tumor heterogeneity*. *Cancer Res*, 1984. 44(6): p. 2259-65.
170. Majzner, R.G. and C.L. Mackall, *Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy*. *Cancer Discov*, 2018. 8(10): p. 1219-1226.
171. Stanta, G. and S. Bonin, *Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity*. *Front Med (Lausanne)*, 2018. 5: p. 85.
172. Jones, P.G. and M. Inouye, *The cold-shock response--a hot topic*. *Mol Microbiol*, 1994. 11(5): p. 811-8.
173. Gross, C.A., et al., *The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1998. 63: p. 141-55.
174. Murakami, K.S., et al., *Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex*. *Science*, 2002. 296(5571): p. 1285-90.
175. Schein, C.H., *Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria*. *Nature Biotechnology*, 1989. 7: p. 1141-1149.
176. Uhlen, M., et al., *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. *Science*, 2015. 347(6220): p. 1260419.
177. Amir el, A.D., et al., *viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia*. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(6): p. 545-52.
178. 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.

179. Hammond, S.A., et al., *Selective targeting and potent control of tumor growth using an EphA2/CD3-Bispecific single-chain antibody construct*. *Cancer Res*, 2007. 67(8): p. 3927-35.
180. Lenkkeri-Schütz U, K.B., Itin C, Hofmeister R, *Multispecific deimmunized CD3-binders Multispezifische, deimmunierte CD3-bindende Moleküle*. 15-Oct-2004.
181. Lobstein, J., et al., *SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm*. *Microb Cell Fact*, 2012. 11: p. 56.
182. Block, H., et al., *Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review*. *Methods Enzymol*, 2009. 463: p. 439-73.
183. Khan, F., M. He, and M.J. Taussig, *Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on ni-nitrioltriacetic acid surfaces*. *Anal Chem*, 2006. 78(9): p. 3072-9.
184. Boivin, S., S. Kozak, and R. Meijers, *Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens*. *Protein Expr Purif*, 2013. 91(2): p. 192-206.
185. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. *Science*, 1976. 193(4257): p. 1007-8.
186. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. *Adv Immunol*, 2007. 96: p. 41-101.
187. Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao, *CD27 and CD70 in T cell and B cell activation*. *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(3): p. 275-81.
188. Brugnani, D., et al., *CD70 expression on T-cell subpopulations: study of normal individuals and patients with chronic immune activation*. *Immunol Lett*, 1997. 55(2): p. 99-104.
189. Tesselaar, K., et al., *Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo*. *J Immunol*, 2003. 170(1): p. 33-40.
190. van de Ven, K. and J. Borst, *Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential*. *Immunotherapy*, 2015. 7(6): p. 655-67.
191. Horn, L.A., et al., *CD3xPDL1 bi-specific T cell engager (BiTE) simultaneously activates T cells and NKT cells, kills PDL1(+) tumor cells, and extends the survival of tumor-bearing humanized mice*. *Oncotarget*, 2017. 8(35): p. 57964-57980.
192. Rosenberg, A.S., *Effects of protein aggregates: an immunologic perspective*. *Aaps j*, 2006. 8(3): p. E501-7.
193. Ericsson, U.B., et al., *Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies*. *Anal Biochem*, 2006. 357(2): p. 289-98.
194. abbvie. *Research Approches, Bispecific Antibodies*. 2018; Available from: <https://www.abbviescience.com/oncology/cancer-research/bispecific-antibodies>.
195. Gu, J. and T. Ghayur, *Generation of dual-variable-domain immunoglobulin molecules for dual-specific targeting*. *Methods Enzymol*, 2012. 502: p. 25-41.
196. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. *Blood Rev*, 2006. 20(3): p. 123-37.
197. Tay, S.S., H. Carol, and M. Biro, *TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway*. *Hum Vaccin Immunother*, 2016. 12(11): p. 2790-2796.
198. Bielamowicz, K., et al., *Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2018. 20(4): p. 506-518.
199. Kristen Fousek, J.W., Ann George, Xingyue An, Hebatalla Samaha, Shoba Alaska Navai, Tiara T Byrd, Albert Jang, Hye Na Kim, Sujith Joseph, Matthew Baker, Navin Varadarajan, Meenakshi G. Hegde, Yong-Mi Kim, Nora Heisterkamp, Hisham Abdel-Azim and Nabil Ahmed, *Targeting Primary Pre-B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and CD19-Negative Relapses Using Trivalent CAR T Cells*. *Blood*, 2017. 130(Suppl 1): p. 4614.

-
200. Kloss, C.C., et al., *Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells*. Nat Biotechnol, 2013. 31(1): p. 71-5.
201. Lanitis, E., et al., *Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo*. Cancer Immunol Res, 2013. 1(1): p. 43-53.
202. Roybal, K.T., et al., *Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits*. Cell, 2016. 164(4): p. 770-9.
203. Cho, J.H., J.J. Collins, and W.W. Wong, *Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses*. Cell, 2018. 173(6): p. 1426-1438.e11.
204. Zhu, M., et al., *Negative regulation of lymphocyte activation by the adaptor protein LAX*. J Immunol, 2005. 174(9): p. 5612-9.
205. Schmid, M., et al., *Resolvin D1 Polarizes Primary Human Macrophages toward a Proresolution Phenotype through GPR32*. J Immunol, 2016. 196(8): p. 3429-37.
206. Norling, L.V., et al., *Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocyte recruitment to inflammatory loci: receptor-dependent actions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. 32(8): p. 1970-8.
207. Hsiao, H.M., et al., *Resolvin D1 attenuates polyinosinic-polycytidylic acid-induced inflammatory signaling in human airway epithelial cells via TAK1*. J Immunol, 2014. 193(10): p. 4980-7.
208. Eglen, R.M., *Overview of muscarinic receptor subtypes*. Handb Exp Pharmacol, 2012(208): p. 3-28.
209. Gentry, P.R., et al., *Discovery, synthesis and characterization of a highly muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-selective M5-orthosteric antagonist, VU0488130 (ML381): a novel molecular probe*. ChemMedChem, 2014. 9(8): p. 1677-82.
210. Bridges, T.M., et al., *Discovery of the first highly M5-preferring muscarinic acetylcholine receptor ligand, an M5 positive allosteric modulator derived from a series of 5-trifluoromethoxy N-benzyl isatins*. J Med Chem, 2009. 52(11): p. 3445-8.
211. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol, 2014. 5: p. 172.
212. Khoo, O. and S. Suntrarachun, *Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system*. Asian Pac J Trop Biomed, 2012. 2(2): p. 159-62.
213. Madhavan, A., A. Pandey, and R.K. Sukumaran, *Expression system for heterologous protein expression in the filamentous fungus Aspergillus unguis*. Bioresour Technol, 2017. 245(Pt B): p. 1334-1342.
214. Mattanovich, D., et al., *Recombinant protein production in yeasts*. Methods Mol Biol, 2012. 824: p. 329-58.
215. Fletcher, S.P., M. Muto, and S.P. Mayfield, *Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green algae*. Adv Exp Med Biol, 2007. 616: p. 90-8.
216. Jarvis, D.L., *Baculovirus-insect cell expression systems*. Methods Enzymol, 2009. 463: p. 191-222.
217. Plasson, C., et al., *Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells*. Methods Mol Biol, 2009. 483: p. 145-61.
218. Yarranton, G.T., *Mammalian recombinant proteins: vectors and expression systems*. Curr Opin Biotechnol, 1990. 1(2): p. 133-40.
219. Echelard, Y., *Recombinant protein production in transgenic animals*. Curr Opin Biotechnol, 1996. 7(5): p. 536-40.
220. Costa, S.J., et al., *The Fh8 tag: a fusion partner for simple and cost-effective protein purification in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2013. 92(2): p. 163-70.
221. LaVallie, E.R., et al., *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. Biotechnology (N Y), 1993. 11(2): p. 187-93.
222. Paraskevopoulou, V. and F.H. Falcone, *Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression*. Microorganisms, 2018. 6(2).
-

-
223. Arbabi-Ghahroudi, M., J. Tanha, and R. MacKenzie, *Prokaryotic expression of antibodies*. *Cancer Metastasis Rev*, 2005. 24(4): p. 501-19.
224. Frenzel, A., M. Hust, and T. Schirrmann, *Expression of recombinant antibodies*. *Front Immunol*, 2013. 4: p. 217.
225. Rippmann, J.F., et al., *Prokaryotic expression of single-chain variable-fragment (scFv) antibodies: secretion in L-form cells of Proteus mirabilis leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. 64(12): p. 4862-9.
226. Wang, W. and C.J. Roberts, *Non-Arrhenius protein aggregation*. *Aaps j*, 2013. 15(3): p. 840-51.
227. Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2005. 4(1): p. 1.
228. Yamaguchi, H. and M. Miyazaki, *Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies*. *Biomolecules*, 2014. 4(1): p. 235-51.
229. Bolanos-Garcia, V.M. and O.R. Davies, *Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1760(9): p. 1304-13.
230. Bruning, A. and J. Juckstock, *Misfolded proteins: from little villains to little helpers in the fight against cancer*. *Front Oncol*, 2015. 5: p. 47.
231. Gething, M.J. and J. Sambrook, *Protein folding in the cell*. *Nature*, 1992. 355(6355): p. 33-45.
232. Tyedmers, J., A. Mogk, and B. Bukau, *Cellular strategies for controlling protein aggregation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(11): p. 777-88.
233. Mallender, W.D., J. Carrero, and E.W. Voss, Jr., *Comparative properties of the single chain antibody and Fv derivatives of mAb 4-4-20. Relationship between interdomain interactions and the high affinity for fluorescein ligand*. *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5338-46.
234. Rothlisberger, D., A. Honegger, and A. Pluckthun, *Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability*. *J Mol Biol*, 2005. 347(4): p. 773-89.
235. Tan, P.H., B.M. Sandmaier, and P.S. Stayton, *Contributions of a highly conserved VH/VL hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency*. *Biophys J*, 1998. 75(3): p. 1473-82.
236. Ueda, H., et al., *Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region*. *Nat Biotechnol*, 1996. 14(13): p. 1714-8.
237. Roberts, C.J., *Non-native protein aggregation kinetics*. *Biotechnol Bioeng*, 2007. 98(5): p. 927-38.
238. Howarth, M., et al., *A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site*. *Nat Methods*, 2006. 3(4): p. 267-73.
239. Rogala, B., et al., *Blinatumomab: enlisting serial killer T-cells in the war against hematologic malignancies*. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. 15(6): p. 895-908.
240. Huynh, K. and C.L. Partch, *Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2015. 79: p. 28.9.1-14.
241. Jespers, L., et al., *Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation*. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(9): p. 1161-5.
242. Christ, D., K. Famm, and G. Winter, *Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains*. *Protein Eng Des Sel*, 2007. 20(8): p. 413-6.
243. Davies, J. and L. Riechmann, *Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability*. *Protein Eng*, 1996. 9(6): p. 531-7.
244. Dudgeon, K., et al., *General strategy for the generation of human antibody variable domains with increased aggregation resistance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(27): p. 10879-84.
245. Runcie, K., et al., *Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics*. *Mol Med*, 2018. 24(1): p. 50.
-

-
246. 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.
 247. Portell, C.A., C.M. Wenzell, and A.S. Advani, *Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Clin Pharmacol*, 2013. 5(Suppl 1): p. 5-11.
 248. Muller, D. and R.E. Kontermann, *Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives*. *BioDrugs*, 2010. 24(2): p. 89-98.
 249. Sedykh, S.E., et al., *Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives*. *Drug Des Devel Ther*, 2018. 12: p. 195-208.
 250. Fan, G., et al., *Bispecific antibodies and their applications*. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: p. 130.
 251. Yusakul, G., et al., *Effect of linker length between variable domains of single chain variable fragment antibody against daidzin on its reactivity*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016. 80(7): p. 1306-12.
 252. Paudel, M.K., et al., *The effect of varying the peptide linker length in a single chain variable fragment antibody against wogonin glucuronide*. *J Biotechnol*, 2017. 251: p. 47-52.
 253. Baeuerle, P.A., P. Kufer, and R. Bargou, *BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy*. *Curr Opin Mol Ther*, 2009. 11(1): p. 22-30.
 254. Hoffmann, P., et al., *Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct*. *Int J Cancer*, 2005. 115(1): p. 98-104.
 255. Maverick Therapeutics, I., Baeuerle, Patrick, *Inducible Binding Proteins And Methods Of Use*. 2017: Us.

7 Anhang

7.1 Experimentelle Date

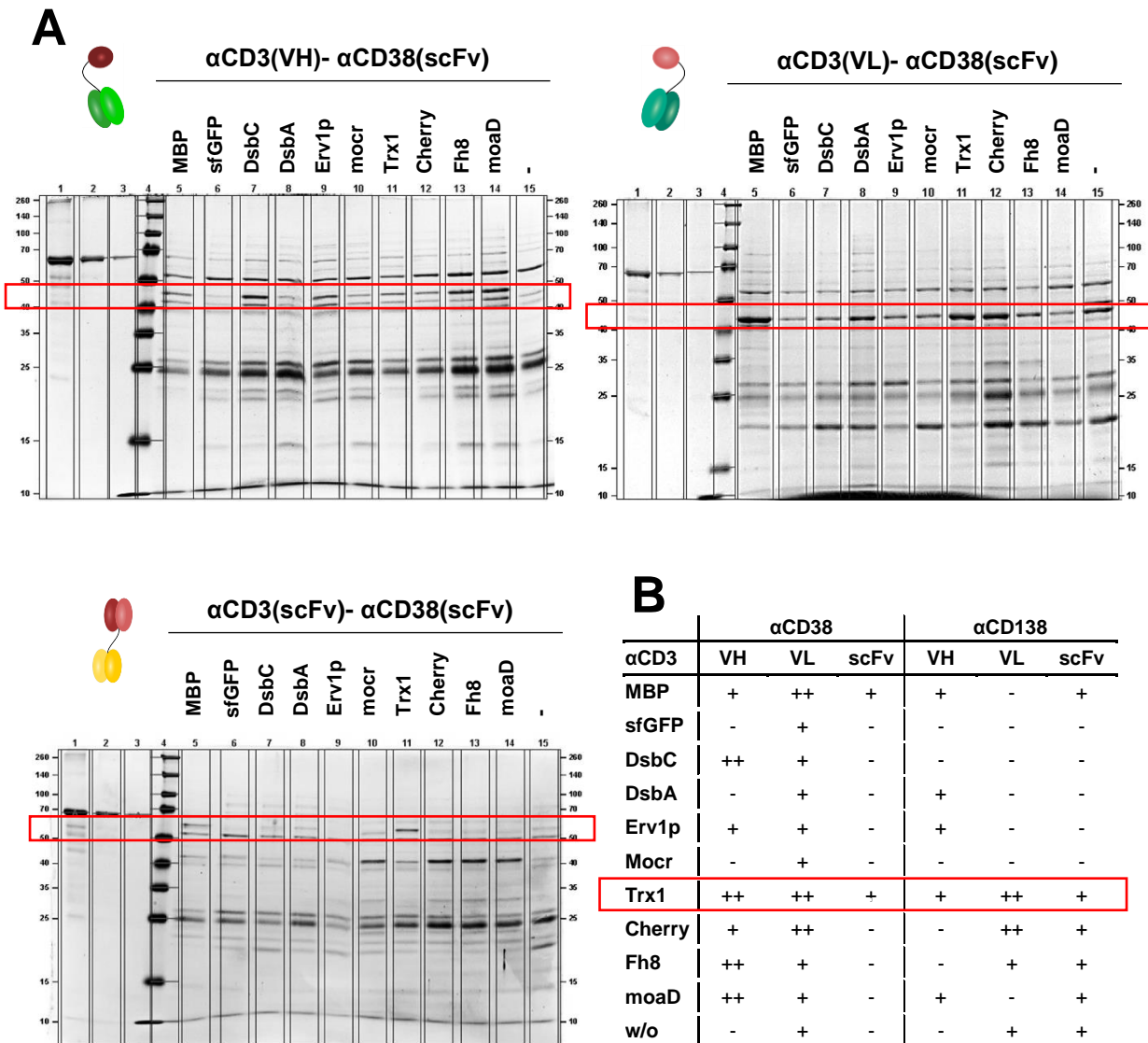


Abbildung 30: Austestung verschiedener Löslichkeits-Tags zur verbesserten Proteinproduktion. Hemibodies und BiTE Antikörper gegen CD38 und CD138 wurden mit 10 verschiedenen Fusionstags in 20 ml *Shuffle T7 Express E.coli* Zellen produziert. Getestet wurden die Fusionstags: *Maltose binding protein* (MBP), *superfolder green fluorescent protein* (sfGFP), *bacterial protein disulfide isomerase* (DsbC) und *disulfide oxidoreductase* (DsbA), *yeast sulfhydryl oxidase* (Erv1p), *monomeric mutant of the Ocr protein of bacteriophage T7* (mocr), Trx1, *red fluorescent protein* (Cherry), *Fasciola hepatica protein* (Fh8) und *prokaryotic ubiquitin-like protein* (moaD). Im Vergleich zu einem Produktionsansatz ohne Fusionstag wurden alle Tags auf die Fähigkeit hin überprüft die Menge an produzierten Antikörper zu verbessern. Die Antikörperkonzentrationen wurden hierfür über ein SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Färbung mittels BSA-Standard bestimmt. Anschließend wurde der Produktionserfolg anhand der Negativkontrolle bestimmt. **A)** Gezeigt wurden diese Produktionsdaten am Beispiel der Antikörper gegen CD38. Einen Überblick über alle Daten gibt Tabelle unter **B)** - = keine Produktionsoptimierung, + = verbesserte Proteinproduktion, ++ = stark verbesserte Proteinproduktion. Eine deutliche Produktionsverbesserung in allen getesteten Fällen wurde mit dem Fusionstag Trx1 erzielt.

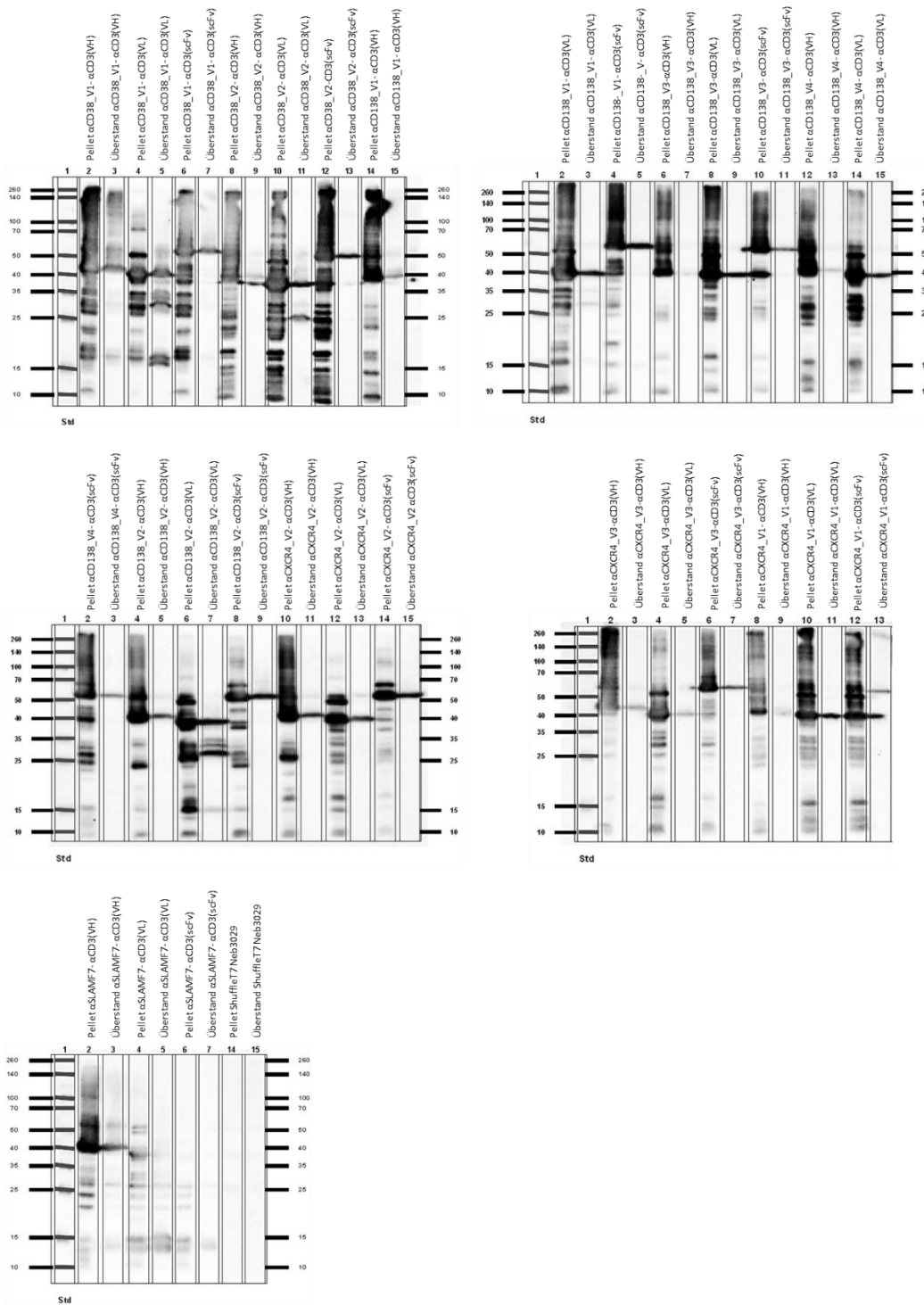
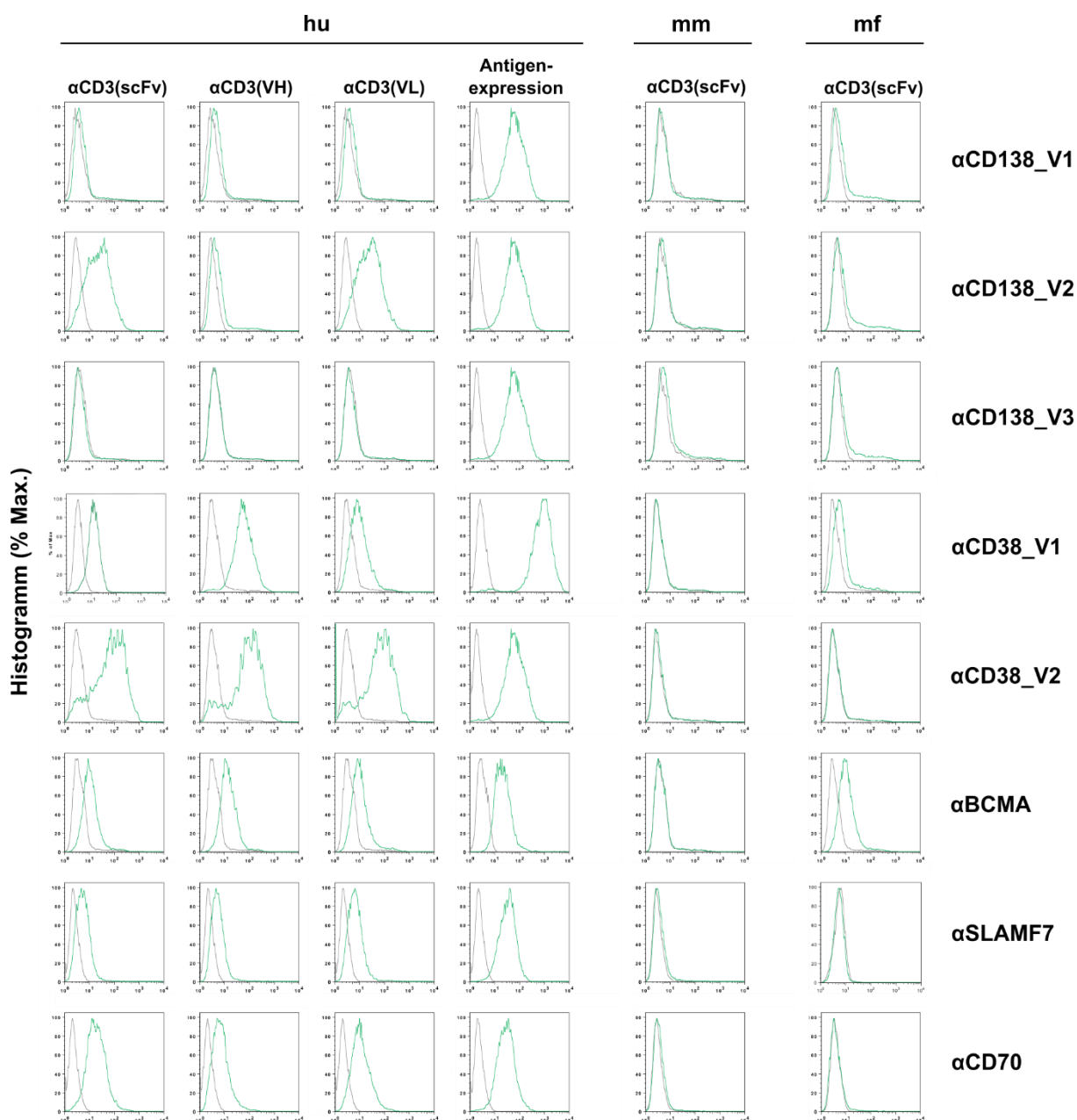


Abbildung 31: Analyse des löslichen/unlöslichen Anteils rekombinanter Proteine während der Produktion. Antikörper Produkte die während der Produktion fehlgefaltet werden bilden häufig Aggregate während der Produktion und bleiben als unlösliche Einschlusskörperchen in der Zelle zurück. Das Verhältnis an unlöslichen und löslichen Produkten wurde mittels Western-Blot anhand einer Probe aus Pellet (unlöslich) und Überstand (löslich) der lysierten *E.coli* Zellen bestimmt. Produzierte Antikörper in den verschiedenen Proben wurden auf einer Nitrozellulosemembran anhand eines anti-6x His-Tag Antikörpers (Konzentration 1:7 500 in 5 % Milchlösung) nachgewiesen. In allen verwendeten Antikörperkonstrukte wurde eine verstärkte unlösliche Aggregation der Antikörperkonstrukte in den Zellen detektiert. Als lösliches Produkt im Überstand des Zelllysats wurde nur ein Anteil bis zu etwa 40 % gemessen.



Hemibody-Bindung an Antigen-positive CHO-Zellen-FITC

■ sek. AK ■ Hemibody

Abbildung 32: Kreuzreaktivität von Hemibodies an Antigene des Ursprungs *Homo sapiens* (hu) *Mus musculus* (mm) und *Macaca fascicularis* (mf). Die Kreuzreaktivität der produzierten Antikörper wurde mittels Durchflusszytometrie auf hu-, mm- und mf-Antigen-exprimierende CHO Zellen untersucht. Die Bindung der Antikörper wurde hierbei über deren His-Tag mittels FITC-gekoppeltem anti-His-Tag Antikörper bestimmt. Gemessen wurde eine positive Bindung aller Antikörper bis auf Antikörper der Sequenz CD138_V3 an Antigene humanen Ursprungs. An Zellen mit Antigenen der Herkunft mm und mf wurde nur bei CD38_V1 und BCMA Antikörpern eine Bindung gegen Makaken-Antigenen detektiert.

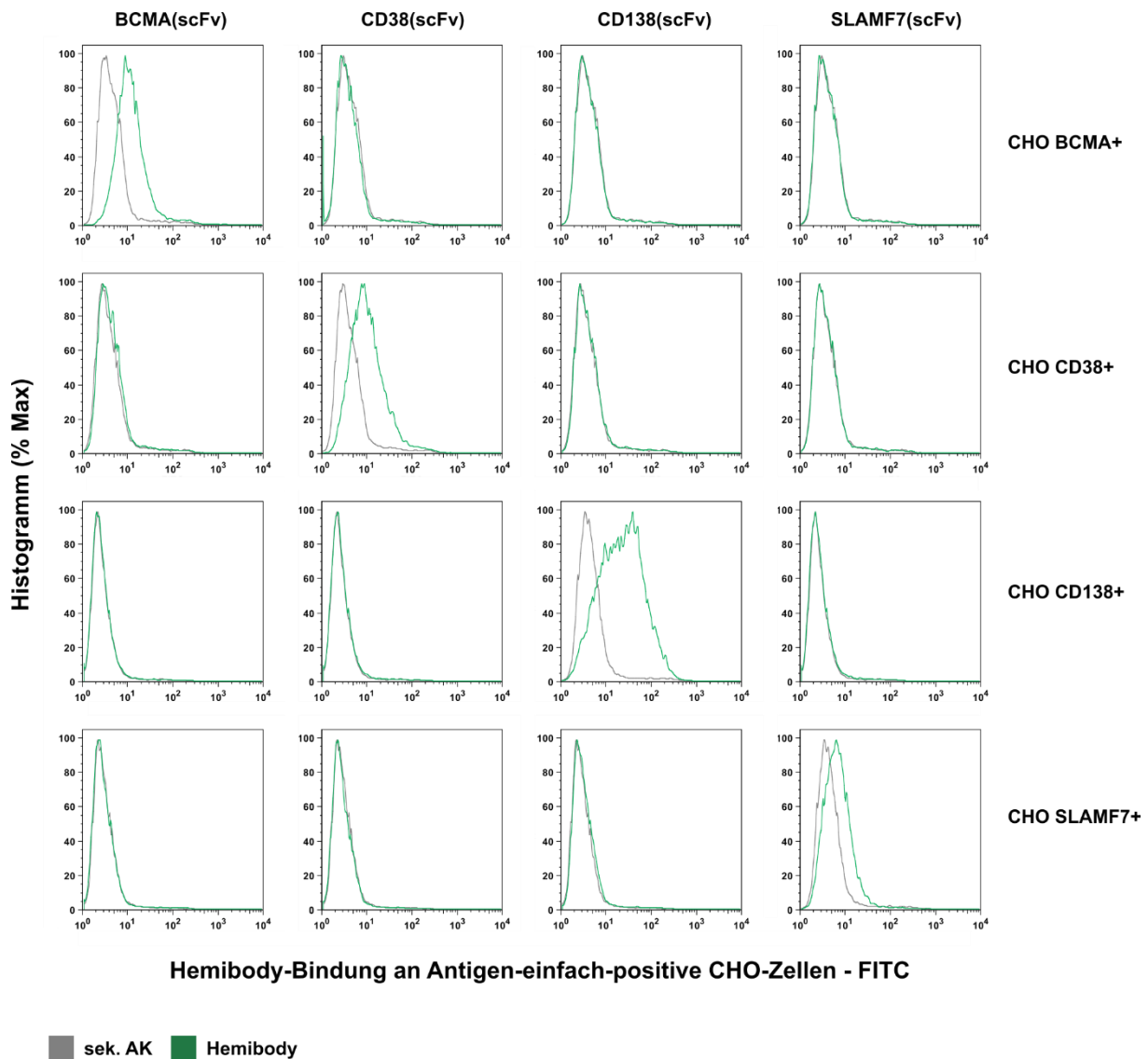
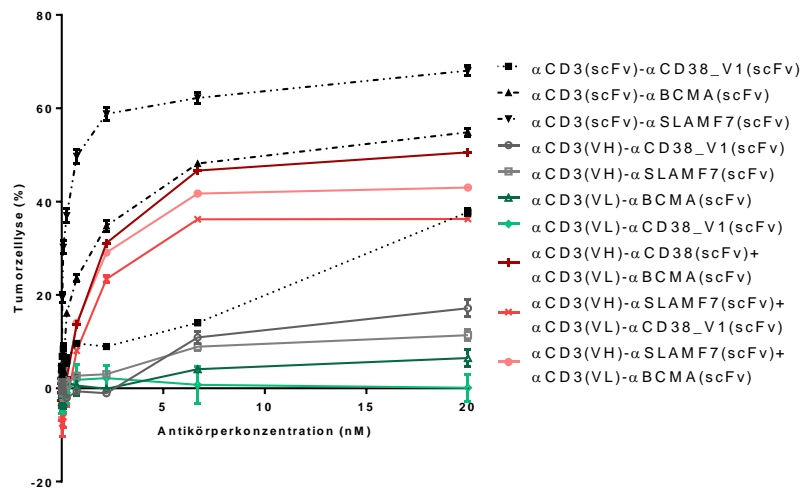
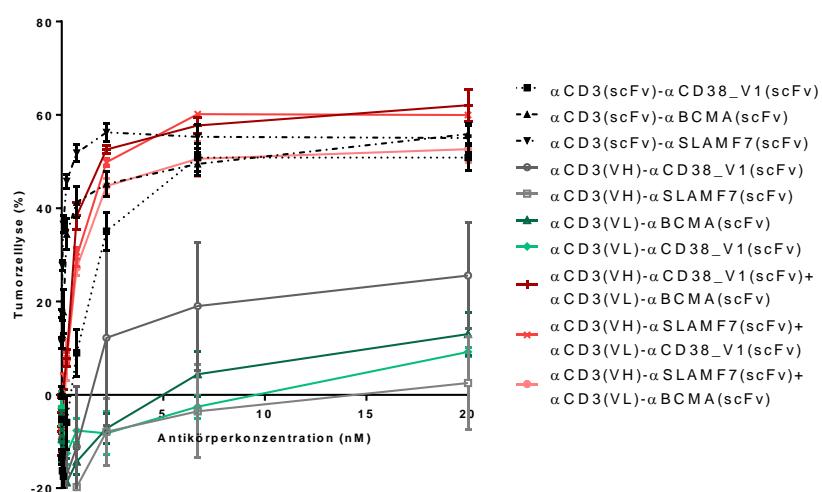


Abbildung 33: Spezifische Antigenerkennung der Antikörper. Die spezifische HB-Bindung an nur ihr jeweiliges adressierendes Antigen und nicht das Antigen des komplementären Hemibody-Partners wurde innerhalb einer FACS Analyse auf einfach Antigen-positiven CHO Zellen untersucht. Hierfür wurden einfach positive CHO Zellen auf die Bindung des jeweiligen komplementären Antikörpers Partnern getestet. Antikörperbindungen wurden über einen FITC anti-His-Tag Antikörper im Durchflusszytometer detektiert. Hier konnte keine Bindung der Antikörper an ein anderes Antigen eines möglichen Hemibody-Partners festgestellt werden.

OPM-2



RPMI-2886



U-266

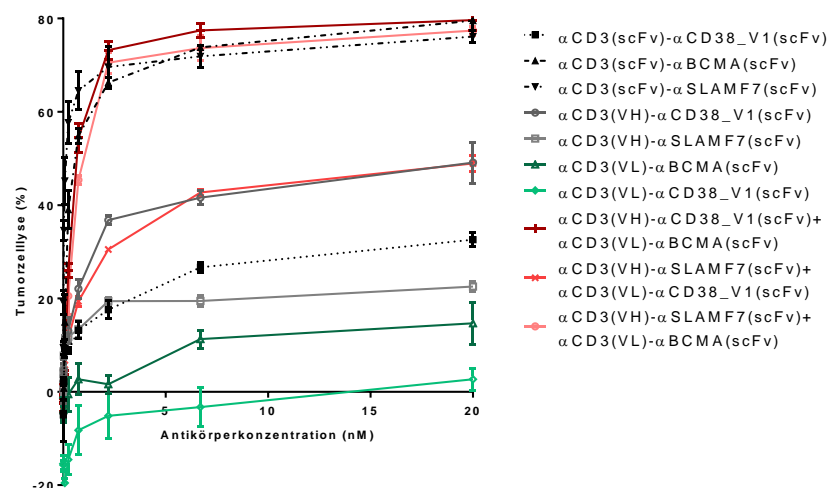


Abbildung 34: Antikörper-induzierte Tumorzelllyse von 3 Hemibody-Kombinationen auf 3 weiteren MM Zelllinien. Zum Überprüfen der Wirksamkeit selektionierter Hemibody-Kombinationen wurde ein Viabilitätsassay mit drei weiteren fLuc+ MM Zelllinien OPM-2, RPMI-8226 und U-266 und PBMCs (Ratio Tumor- zu Effektorzellen 1:5) und verschiedenen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Als Negativkontrolle und 0 % induzierte Tumorzelllyse wurden Kontrollen aus Tumorzellen + PBMCs in Abwesenheit der Antikörper gesetzt. Schwarz = Positivkontrolle BiTE, Grau = Hemibody anti-CD3(VH), Grün = Hemibody anti-CD3(VL), Rot = Hemibody anti-CD3(VH) + Hemibody anti-CD3(VL). Getestete Hemibody-Kombinationen erzielten auf allen Zelllinien hohe Raten an Tumorzelllyse.

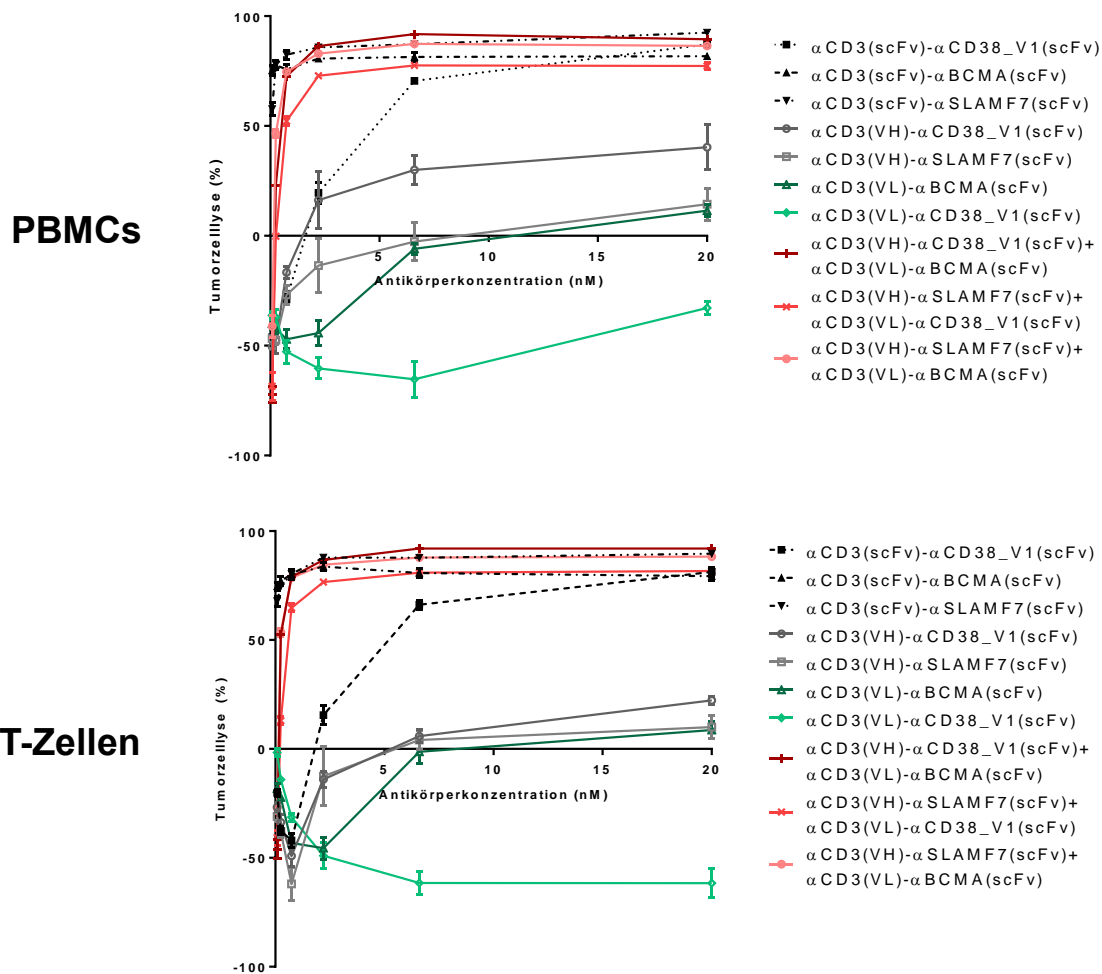


Abbildung 35: Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse der MM.1S Zellen im Vergleich mit PBMCs versus T-Zellen. Luziferase Viabilitäts-Assays von fLuc+ MM.1S Zellen mit PBMCs (Ratio Tumor- zu Effektorzellen 1:5) und aufgereinigten T-Zellen für 24 h mit Antikörperkonzentrationen von 20 nM – 0,008 nM. Als Negativkontrolle dienten Tumorzellen + PBMCs ohne Antikörperbehandlung. Schwarz = Positivkontrolle BiTE, Grau = Hemibody anti-CD3(VH), Grün = Hemibody anti-CD3(VL), Rot = Hemibody anti-CD3(VH) + Hemibody anti-CD3(VL). T-Zellen sind der Teil der hämatopoetischen Zellen der für eine Tumorzelllyse verantwortlich sind.

7.2.2 α CD3 ϵ -Antikörpersequenz

α CD3 (VH) GS Linker α CD3 (VL)

DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRF
 TITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLDYWGQGT~~TVTVSS~~GGGGSGGGSGGGGS~~DI~~
 VLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMetN~~WYQ~~QKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGT
 DYSLTINSLEAEDAATYYCQ~~QWSSNPLTFGGG~~TKVEIKGS

7.2.3 Thioredoxin Tag

Trx-Tag GS-Linker **3C-Protease-Schnittstelle**

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP~~GT~~A
 PKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGGSGGGGSLEVLFQGP

7.2.4 3C-Protease

GPNTEFALSLLRKNIMTITTSKGEFTGLGIHDRVCVIPTHAQPGDDVLVNGQKIRVKDKYKLVDPENI
 NLELTVLTLDRNEKFRDIRGFISEDLEGV~~DATLVVHSNNFTNTILEVGPVTMAGLINLSSTPTNRMIR~~
 YDYATKTGQCGVLCATGKIFGIHVGGNGRQGFSAQLKKQYFVEKQ

7.2.5 Beispiel BiTE Antikörper – α CD38_V1

Trx-Tag GS-Linker **3C-Protease-Schnittstelle** α CD3 (VH) GS-Linker
 α CD3 (VL) GS Linker α CD38 (VH) GS Linker α SLAMF7 (VL) 8xHis

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNP~~GT~~A
 PKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGGSGGGGSLEVLFQGP~~M~~DVQLVQSGA
 EVKKPGASVKVSVCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTS
 TAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLDYWGQGT~~TVTVSS~~GGGGSGGGSGGGGS~~DI~~VLTQSPATL
 SLSPGERATLSCRASQSVSYMetN~~WYQ~~QKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSL
 EAEDAATYYCQ~~QWSSNPLTFGGG~~TKVEIKGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSR
 YWMSWVRQAPGKLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIIISRDNAKNSLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCARPD~~
 GNYWYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS~~DI~~QMTQSPSSLSASVGD~~RVTITCKASQDVGI~~AVA
 WYQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQPEDVATYYCQYSSYPYTFGQGT~~
 KVEIKGSHHHHHHHH**SR*X

7.2.6 Beispiel Hemibody Sequenzen

7.2.6.1 α CD3(VH)- α SLAMF7(scFv)

Trx-Tag **GS-Linker** **3C-Protease-Schnittstelle** **α CD3 (VH)** **GS-Linker**
 α SLAMF7 (VH) **GS Linker** **α SLAMF7 (VL)** **8xHis**

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPOTA
 PKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGGSGGGGSLEVLFGQPM^DVQLVQSGA
 EVKKPGASVKVSCASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTS
 TAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLDYWGQGT^TTVTVSSGGGGS^EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
 CAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIIISRDNAKNSLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGT^LTVTVSSGGGSGGGSGGGGS^DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC
 KASQDVGIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLT^ISSLPEDVATYYCQOY
 SSYPYTFGQGTKVEIK^{GS}HHHHHHHH**SR*X

7.2.6.2 α CD3(VL)- α CD38(scFv)

Trx-Tag **GS-Linker** **3C-Protease-Schnittstelle** **α CD3 (VL)** **GS-Linker**
 α CD38 (VH) **GS Linker** **α CD38 (VL)** **8xHis**

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPOTA
 PKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGGSGGGGSLEVLFGQPM^DIVLTQSP
 ATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMetN^WYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGT
 DYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK^{GS}GGGGS^QVQLVESGGGLVQPGGSL
 LRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVSNIIYSDGSNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTL
 YLQMNSLRAEDTAVYYCARNMYRWPFFHYFFDYWGQGT^LTVTVSSGGGSGGGSGGGGS^DIEL
 TQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGNKYVSWYQQKPGQAPVVIYGDNNRPSGIPERFSGSNS
 GNTATLTISGTQAEDEADYYC^SSYDSSYFVFGGGTKLTVLGQVDGGG^{GS}HHHHHHHH**SR*X

7.3 Plasmide

7.3.1 pColdIV

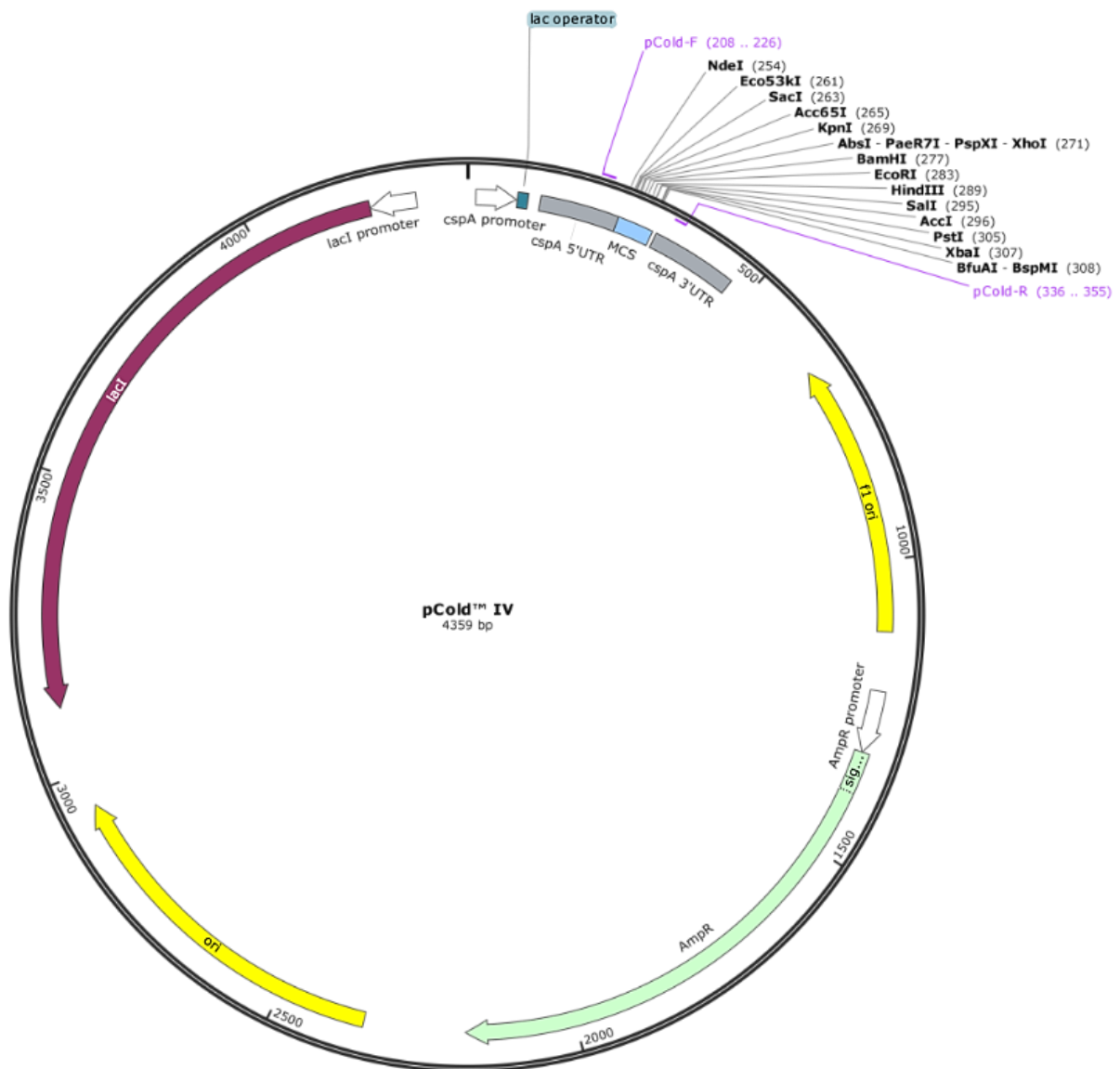


Abbildung 36: Vektorkarte des pColdIV Plasmids. Wichtige Elemente dieses Plasmids sind, neben der *multiple cloning site*, eine Ampicillinresistenz, der Lac Operator und der cspA Promoter. Hemibody-Sequenzen wurden in der *multiple cloning site* über spezifische Restriktionsschnittstellen eingefügt. Vektorkarte von TaKaRa Bio Company (Katalognummer 3364).

7.3.2 pRSF-DUET

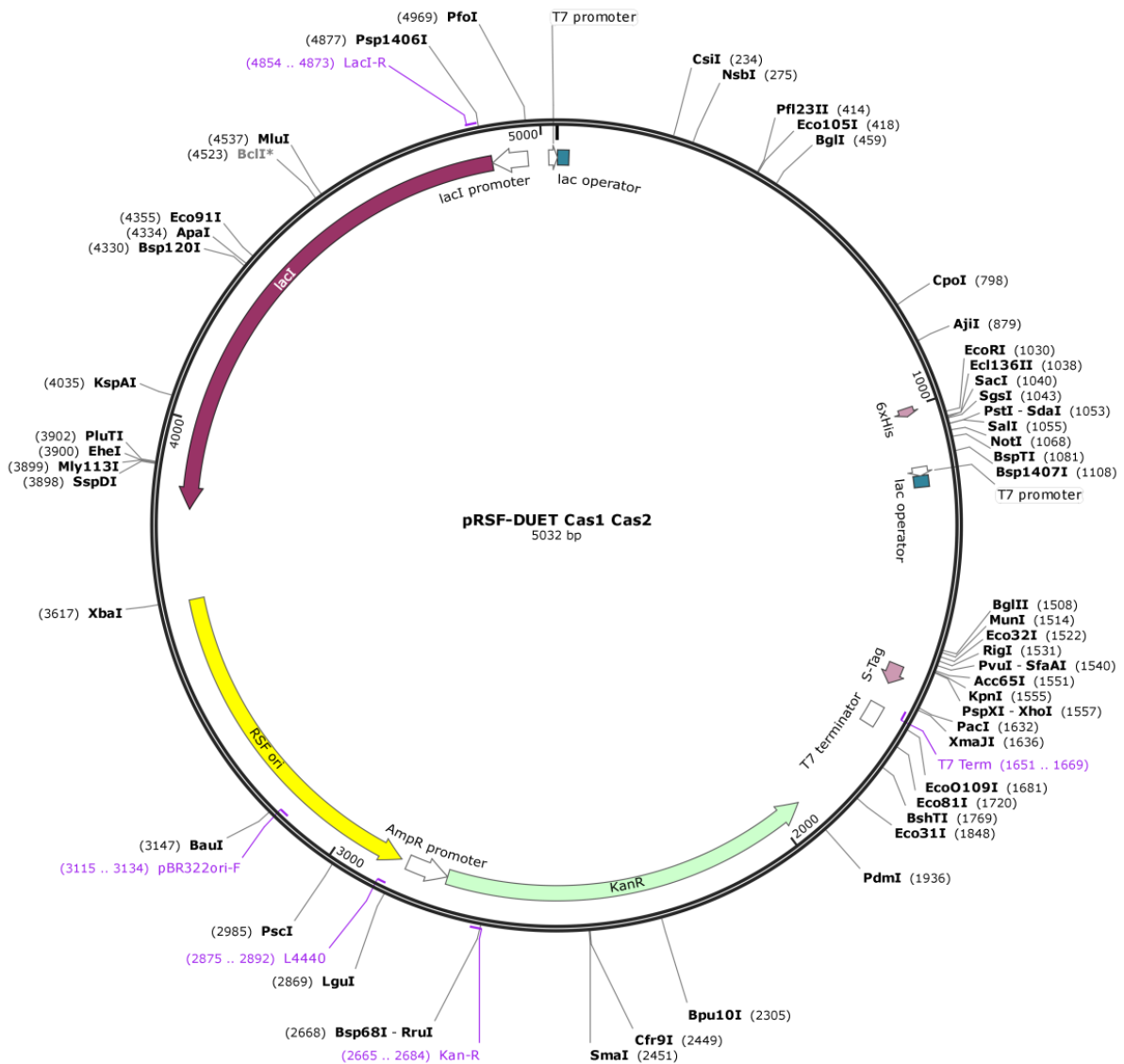


Abbildung 37: Vektorkarte des pRSF DUET Plasmids. Dieses Plasmid besitzt zwei *multiple cloning sites* mit einem T7-Lac Promoter sowie ein Kanamycin Resistenzgen. Vektorkarte der Firma Merck (Darmstadt, Germany, Katalognummer 71341).

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Posterbeitrag: Geis M, Nowotny B, Einsele H, Stuhler G, Bumm T. Hemibodies: Novel complementing T-cell activating antibody derivatives for safe cancer immunotherapy, Protein and Antibody Engineering Summit (PEGS), Lissabon, 12-16.11.2018.

Präsentation: Geis M, Nowotny B, Einsele H, Stuhler G, Bumm T. Novel trivalent T-cell activating antibody derivatives for personalized multiple myeloma therapy, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Wien, 28.09-02.10.2018

Auszeichnung

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde folgender Preis eingeworben:

Travel Award: der „Hilfe im Kampf gegen Krebs e.V.“ zur Präsentationen von Forschungsergebnissen der vorliegenden Arbeit bei internationalen Kongressen der DGHO und PEGS, April 2018.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Identifizierung von Zielmolekülen und Herstellung zweigeteilter trivalenter T-Zell-aktivierender Antikörperderivate zur immuntherapeutischen Behandlung von Multiplen Myelom“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift