

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Abteilung für Molekulare Innere Medizin
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. Harald Wajant

Checkpoint inhibierende anti-TNFRSF Rezeptor Antikörper-Fusionsproteine

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Jakob Johannes Ulrich
aus Frankfurt am Main

Würzburg, März 2021

Referent : Prof. Dr. Harald Wajant

Korreferent : Prof. Dr. Christoph Otto

Dekan : Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2021

Der Promovend ist Zahnarzt

Für meine Familie, Freunde und Lisa, die mich stets unterstützt und motiviert haben.

Ihr seid der größte Schatz in meinem Leben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Checkpoint inhibierende anti-TNFRSF Rezeptor Antikörper-Fusionsproteine“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt, sowie 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.

Frankfurt am Main, den 01.03.2021

Jakob Ulrich

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.Mai 2018 bis 1.März 2021 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Professor Dr. Harald Wajant angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Antikörper.....	1
1.1.1	Aufbau von Antikörpern.....	1
1.1.2	Immunglobulin G.....	5
1.1.3	Antikörper als Therapeutikum.....	7
1.2	Immun-Checkpoint Rezeptor PD-1 und seine Liganden.....	9
1.2.1	Immun-Checkpoint Inhibitoren.....	11
1.3	TNF-Superfamilie.....	13
1.3.1	Rezeptoren der TNFR-Superfamilie.....	13
1.3.2	Liganden der TNF-Superfamilie.....	15
1.3.3	Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie.....	18
1.3.4	TNFR vermittelte Signalkaskaden.....	22
1.4	Zielsetzung.....	25
2	Material.....	26
2.1	Zellen.....	26
2.1.1	Prokaryotische Zellen.....	26
2.1.2	Eukaryotische Zellen.....	26
2.2	Antikörper und Proteine.....	27
2.3	Enzyme.....	27
2.3.1	Restriktionsenzyme.....	27
2.3.2	Weitere Enzyme.....	28
2.4	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien.....	28
2.5	Lösungen und Puffer.....	30
2.6	Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	33
2.7	Laborkits.....	34
2.8	Gerätschaft.....	35
3	Methoden.....	37
3.1	DNA-Klonierung.....	37
3.1.1	Verdau.....	37
3.1.2	PCR.....	37
3.1.3	DNA-Aufreinigung.....	38
3.1.4	Ligation.....	38
3.1.5	Hitzeschock-Transformation und Ausstrichverfahren.....	38
3.1.6	Überführung selektionierter Bakterienklone in einen Miniansatz.....	39

Inhaltsverzeichnis

3.1.7 Aufreinigung und Kontrollverdau des Miniansatzes (Mini-DNA-Präparation)	39
3.1.8 Midiansatz.....	40
3.1.9 Midipräparation	40
3.2 Zellkultur.....	41
3.2.1 Kultivierung.....	41
3.2.2 PEI-Transfektion	41
3.2.3 Kryokonservierung.....	42
3.3 Proteinaufreinigung	43
3.4 Westernblot.....	44
3.4.1 SDS-PAGE	44
3.4.2 Proteintransfer	44
3.4.3 Immundetektion	45
3.5 Silberfärbung.....	45
3.6 <i>Gaussia princeps</i> Luziferase Assays	46
3.6.1 Gleichgewichtsbindungsstudien	46
3.7 IL-8 ELISA.....	47
4 Ergebnisse.....	48
4.1 Herstellung und Charakterisierung der parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG1 und anti-PD-L1-IgG2	48
4.1.1 Klonierung der Expressionsplasmide für die parentalen Antikörper.....	48
4.1.2 Produktion der parentalen Antikörper.....	51
4.1.3 Gleichgewichtsbindungsstudien zur Bestimmung der Affinität des parentalen anti-PD-L1 Antikörpers.....	54
4.2 Herstellung der Antikörper-Fusionsproteine.....	57
4.2.1 Klonierung des Expressionsplasmides für das Antikörper-Fusionsprotein... 57	
4.2.2 Produktion des Antikörper-Fusionsproteins.....	59
4.3 Charakterisierung des Antikörper-Fusionsproteins	62
4.3.1 Gleichgewichtsbindungsstudien zur Bestimmung der Affinität der funktionellen Domänen des Antikörper-Fusionsproteins	62
4.3.2 Aufreinigung.....	67
4.3.3 Überprüfung der agonistischen Aktivität des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 mittels PD-L1 vermittelter Immobilisation	69
4.4 Analyse eines Checkpoint-inhibierenden 4-1BB Antikörper-Fusionsproteins	72
4.4.1 Klonierung des Expressionsplasmides für das Antikörper-Fusionsprotein... 72	
4.4.2 Produktion und Aufreinigung des anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB Antikörper-Fusionsproteins	74

Inhaltsverzeichnis

4.4.3 Analyse der agonistischen Aktivität des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB	75
5 Diskussion	79
6 Zusammenfassung	86
7 Literaturverzeichnis	88
I. Abbildungsverzeichnis	I
II. Tabellenverzeichnis	II
III. Abkürzungsverzeichnis	III
IV. Sequenzen	VII
V. Danksagung	XVI
VI. Lebenslauf	XVII

1 Einleitung

1.1 Antikörper

Antikörper stellen einen wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunantwort des Menschen dar. B-Lymphozyten exprimieren vor Kontakt mit Antigenen sogenannte membranständige B-Zell-Rezeptoren, die unter anderem ein membranständiges Antikörpermolekül enthalten. Erkennen B-Zell-Rezeptoren passende Antigene, kommt es zur Proliferation und Differenzierung des B-Lymphozyten zur Plasmazelle. Plasmazellen sind in der Lage antigenspezifische Antikörper zu bilden. Antikörper, beziehungsweise Immunglobuline, sind die sezernierte Form des Antikörpers des B-Zell-Rezeptors und besitzen die gleiche Spezifität gegenüber dem Antigen. Nach Bindung von Antigenen an spezifische Antikörper, werden diese für zytotoxische, lytische und phagozytotische Immunreaktionen durch das angeborene Immunsystem markiert (Murphy & Weaver, 2018). Neben der wichtigen Rolle im adaptiven Immunsystem, spielen Antikörper als Therapeutika, insbesondere in der Onkologie, eine immer größer werdende Rolle.

1.1.1 Aufbau von Antikörpern

Antikörper/Immunglobuline werden in fünf verschiedene Isotypen (IgG, IgA, IgM, IgE und IgD) eingeteilt (Schur, 1988). IgG kommt am häufigsten im menschlichen Körper vor und besitzt noch weitere Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4). Antikörper bestehen aus einer konstanten Fc-Domäne (*fragment crystallizable*) und zwei variablen Fab-Domänen (*fragment antigen binding*) (Murphy & Weaver, 2018). Sie setzen sich aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chain*; H_c) und zwei identischen leichten Ketten (*light chain*; L_c) zusammen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette setzt sich aus einer variablen Domäne (*variable light/heavy*; V_L,V_H) und einer oder mehrerer

konstanter Domänen (*constant light/heavy*; C_L,C_H) zusammen (Williams & Barclay, 1988). Anhand der Unterschiede in den konstanten Regionen (C_H) der schweren Ketten erfolgt die Einteilung in die unterschiedlichen Isotypen (Jazwinska, Dunckley, Propert, Gatenby, & Serjeantson, 1988). Die 25 kDa schwere leichte Kette besteht aus einer variablen (V_L) und konstanten (C_L) Domäne. Die schwere Kette hingegen besteht aus einer variablen (V_H) und 3 oder 4 konstanten (C_H) Regionen. Schwere Ketten mit 3 konstanten Regionen (IgG, IgA, IgD) besitzen zudem eine *hinge*-Region zwischen C_{H1} und C_{H2} und kommen auf ein Molekulargewicht von 55 kDa. IgM und IgE verfügen über eine vierte konstante C_{H4} Domäne, anstelle der *hinge*-Region (Schroeder & Cavacini, 2010). Weitere Unterscheidungsmerkmale der Isotypen ist die Anzahl sowie Anordnung der Disulfidbrücken und der Grad der Glykolysierung (Murphy & Weaver, 2018). Der Grad der Glykolysierung variiert vor allem im Bereich der Fc-Region und kann funktionelle Eigenschaften und die Stabilisierung von Antikörpermolekülen beeinflussen (Arnold, Wormald, Sim, Rudd, & Dwek, 2007; Bowden et al., 2012; H. Liu, Bulseco, & Sun, 2006). Die Fc-Domäne setzt sich aus allen C_H-Domänen, außer der C_{H1}-Domäne, zusammen. Über die Fc-Domäne des Antikörpers kann nach Antigenbindung die Verbindung zum angeborenen Immunsystem vermittelt werden und Immunreaktionen, wie beispielsweise die Komplementaktivierung und Phagozytose, induziert werden. Zusätzlich wird die Serumhalbwertszeit durch die Fc-Domäne bestimmt (Murphy & Weaver, 2018; Normansell, 1987; Torres & Casadevall, 2008). Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen erfolgt zwischen dem antigenseitigen Epitop und dem Paratop, welche sich N-terminal an den beiden Fab-Abschnitten befinden. Da Antigene mehrere Epitope besitzen können, ist es möglich, dass mehrere Antikörper an das Antigen binden. Die V_H und V_L Domänen setzen sich aus drei hypervariablen Regionen (*complementarity-determining regions*; CDRs) und vier stabilen Regionen (*framework regions*; FRs) zusammen. Durch die V(D)J-Rekombination ist es möglich eine immense Vielfalt an unterschiedlichen Immunglobulinen herzustellen. Unter Berücksichtigung aller genetischen Vorgänge während der V(D)J-Rekombination in der frühen B-Zell-Entwicklung, lässt sich die mögliche Anzahl an Immunglobulinen auf ca. 10¹⁶ beziffern.

Ebenfalls kommt es zu Rekombinationen in Gensequenzen, welche die konstanten Regionen der schweren Kette (C_H) kodieren. Dieser Vorgang wird als CSR (*class-switch recombination*) bezeichnet und ermöglicht es anschließend der B-Zelle variable und konstante Domänen zu kombinieren und Immunglobuline zu generieren, welche den jeweiligen Anforderungen entsprechen. Die letzte Möglichkeit der Diversifikation von Immunglobulinen stellt der Prozess der somatischen Hypermutation in den variablen Regionen dar. Dieser Vorgang findet T-Zell-abhängig nach Kontakt zwischen dem Antigen und dem B-Zell-Rezeptor statt (Honjo, 1983; Murphy & Weaver, 2018; Schroeder & Cavacini, 2010). Abbildung 1 zeigt exemplarisch den Aufbau eines Antikörpers am Beispiel des IgG1-Isotyps. Zusätzlich wird in der Abbildung der Verdau durch die Proteasen Papain und Pepsin gezeigt.

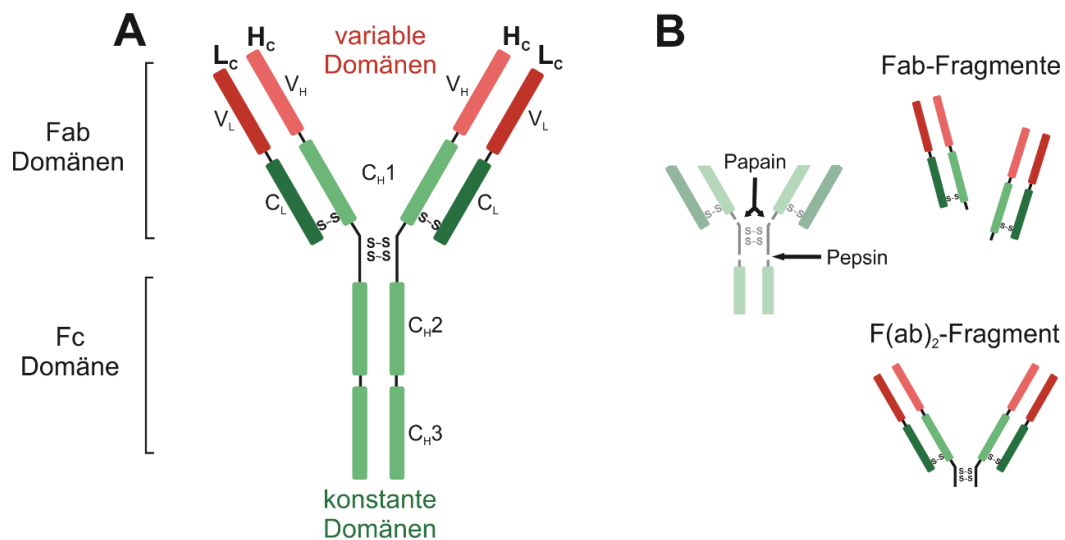


Abbildung 1: Aufbau eines Antikörpers und dessen enzymatischer Verdau

A zeigt den Aufbau eines IgG1-Antikörpers. Die schwere Kette (*heavy chain*; H_C) setzt sich aus drei konstanten Domänen (*constant heavy*; C_H) und einer variablen Domäne (*variable heavy*; V_H) zusammen. Die leichte Kette (*light chain*; L_C) setzt sich hingegen aus je einer konstanten (*constant light*; C_L) und einer variablen Domäne (*variable light*; V_L) zusammen. Die rötlichen Segmente demonstrieren die variablen Domänen (V_L , V_H) und die grünlichen Segmente die konstanten Domänen (C_L , C_H) des Antikörpers. Zusätzlich lässt sich der Antikörper in zwei **Fab-** und eine **Fc-Domäne** unterteilen. **B** zeigt den enzymatischen Verdau des Antikörpers mit Papain und Pepsin, wodurch zwei **Fab-Fragmente** beziehungsweise ein **F(ab)₂-Fragment** entsteht.

Abbildung 1B zeigt den proteolytischen Verdau des Antikörpers mit Papain beziehungsweise Pepsin. Papain spaltet das Antikörpermolekül oberhalb der Disulfidbrücken in der *hinge*-Region (zwischen C_{H1} und C_{H2}). Dabei entstehen zwei einzelne Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment (Fahey, 1964). Pepsin wiederum spaltet das Antikörpermolekül unterhalb der Disulfidbrücken in der *hinge*-Region in ein Fc-Fragment und in ein F(ab)₂-Fragment. Letzteres ist in der Lage an zwei Antigene zu binden (Turner, Bennich, & Natvig, 1970). Fab-Fragmente sowie F(ab)₂-Fragmente können Antigene spezifisch binden, sind jedoch durch das Fehlen der Fc-Domäne nicht mehr in der Lage, Immunreaktionen zu induzieren (Heinrich, Müller, & Graeve, 2014). Zusätzlich zu den proteolytisch gewonnenen Antikörperfragmenten können *single chain variable fragments* (scFv) genetisch erzeugt werden. Sie setzen sich aus den variablen Domänen (V_L,V_H) der schweren und leichten Kette zusammen und verfügen über die antigenspezifischen Eigenschaften des ursprünglichen parentalen Antikörpers (K. A. Smith et al., 2004).

1.1.2 Immunglobulin G

Im Rahmen der Krebstherapie bietet sich vor allem Immunglobulin G als Basis für die Generierung spezifischer Antikörper an. Aufgrund einfacher Produzierbarkeit, struktureller Stabilität im Körper, Effektorfunktionen, geringem Molekulargewicht und der langen Serumhalbwertszeit von 21 Tagen, bringt IgG viele Vorteile mit sich (X.-y. Liu, Pop, & Vitetta, 2008). Somit stellen umfassende Kenntnisse hinsichtlich der Eigenschaften der IgG Subklasse eine wichtige Grundlage für die Herstellung therapeutischer Antikörper dar.

Immunglobulin G ist mit 10 – 20 %, gemessen an allen Plasmaproteinen, der am häufigsten im menschlichen Serum vorkommende Ig-Isotyp (Vidarsson, Dekkers, & Rispen, 2014). Wie bereits erwähnt, gibt es vier Subklassen der IgG-Proteine (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4). Die Bezeichnung der Subklassen erfolgt anhand ihrer Häufigkeit im Serum (IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4) (Schur, 1988). Sie unterscheiden sich in Anzahl und Ausrichtung der Disulfidbrücken, welche zum einen die identischen schweren Ketten, zum anderen die schwere mit der leichten Kette in der Fab-Region miteinander verbinden (Franklin & Frangione, 1969). Bei 90 %-tiger Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen, finden sich weitere Unterschiede in der *hinge*-Region und der C_{H2}-Region (Vidarsson et al., 2014). IgG spielt eine wichtige Rolle in der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC) und der komplementabhängigen Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*; CDC). Über den Fc-Teil wird dem Komplementsystem, NK-Zellen und Monozyten ermöglicht, an IgG zu binden und gebundene Antigene zu neutralisieren. Dabei zeigen die IgG-Subklassen unterschiedliche Affinitäten gegenüber dem Komplementsystem und Fcγ-Rezeptoren (Nimmerjahn & Ravetch, 2007; Schroeder & Cavacini, 2010). Fcγ-Rezeptoren werden von verschiedenen Immunzellen exprimiert und ermöglicht ihnen an den Fc-Teil von Antigen-Antikörper-Komplexe zu binden (Bruhns et al., 2009). Die Affinitätsunterschiede lassen sich auf den unterschiedlichen Aufbau der *hinge*-Region und C_{H2} Domäne zurückführen, da sich hier die Bindungsstellen für das Komplementsystem und Fcγ-Rezeptoren befinden (Ferrante, Beard, & Feldman,

1990; Schroeder & Cavacini, 2010; Siber, Schur, Aisenberg, Weitzman, & Schiffman, 1980; Vidarsson et al., 2014).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über molekulare Eigenschaften und Affinitäten gegenüber dem Komplementsystem beziehungsweise Fc γ -Rezeptoren für die jeweiligen IgG Subklassen.

Tabelle 1: Eigenschaften der IgG-Subklassen

In Anlehnung an Vidarsson et al., 2014 zeigt die Tabelle einen Überblick über molekulare Eigenschaften und Affinitäten der IgG Subklassen gegenüber dem Komplementsystem und Fc γ -Rezeptoren (**Fc γ R**). Anhand ihrer Funktion lassen sich Fc γ -Rezeptoren in vier aktivierende und einen inhibierenden Rezeptor einteilen. Darüber hinaus gibt es einen Fc γ R, welcher nicht in der Lage ist Signale zu transduzieren (Bruhns et al., 2009; Daëron, Jaeger, Du Pasquier, & Vivier, 2008; Scallon et al., 1989).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Molekulare Eigenschaften				
Molekulargewicht (kDa)	146	146	170	146
AS in <i>hing</i> -Region	15	12	62	12
Disulfidbrücken zwischen schweren Ketten	2	4	11	2
Affinität gegenüber Komplementsystem				
	++	+	+++	-
Affinität gegenüber FcγR				
aktivierende Fc γ R	+++*	+	++++	++*
inhibierende Fc γ R	+	-	++	+
Fc γ R ohne Signaltransduktion	+++	-	++++	-

* bei diesen Subklassen ist für die vier aktivierenden Fc γ R ein durchschnittlicher Affinitätswert gebildet worden, falls abweichende Affinitäten für die einzelnen Rezeptoren publiziert wurden.

kDa = Kilodalton

AS = Aminosäuren

- = keine Affinität

+ - ++++ = Grad der Affinität (von schwach nach stark)

1.1.3 Antikörper als Therapeutikum

Die Zahl der erhältlichen antikörperbasierten Therapeutika hat in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen. Neue Erkenntnisse auf molekularer Ebene, beispielsweise bezüglich der Interaktion zwischen IgG und Fcγ-Rezeptoren, bieten neue Ansätze, um die Effizienz von Antikörpern als Medikament zu steigern. Einsatzgebiete sind die Onkologie, die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und die Transplantationsmedizin (X.-y. Liu et al., 2008). Der erste zugelassene Antikörper ist Muromonab-CD3, welcher auf muriner Basis hergestellt wurde und in der Transplantationsmedizin zum Einsatz kommt (Kung, Goldstein, Reinherz, & Schlossman, 1979). Als erster Antikörper zur Krebstherapie wurde Rituximab zugelassen. Hierbei handelt es sich um einen chimären monoklonalen anti-CD20 Antikörper, bei welchem die variablen Domänen einen murinen Ursprung haben (Reff et al., 1994). Mit der Generierung von Immunkonjugaten, wie beispielsweise Gemtuzumab-Ozogamicin und Ibritumomab-Tiuxetan, wurde die Absicht verfolgt die Effizienz der monoklonalen Antikörper mittels gebundener bakterieller Toxine beziehungsweise Radioisotopen zu steigern. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von monoklonalen Antikörpern lassen sich anhand der Fab-Domänen und der Fc-Domäne erläutern (siehe Abbildung 1) (X.-y. Liu et al., 2008). Über den Fc-Teil der monoklonalen Antikörper können Kaskaden, wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, beziehungsweise die Aktivierung des Komplementsystems, initiiert werden (Di Gaetano et al., 2003). Die Fab-Domänen können einerseits über Bindung an bestimmte Signalmoleküle, Wachstumsstimulation und Immunsuppression unterbinden (Arteaga et al., 1993; Gerber et al., 2007). Andererseits können durch Bindung Apoptose an Zielzellen, direkte Hemmung des Tumorwachstums und Sensibilisierung der Tumorzellen für Chemotherapeutika ausgelöst werden (Ghetie et al., 1997; Jazirehi, Vega, Chatterjee, Goodglick, & Bonavida, 2004). Werden die unterschiedlichen Wirkungsweisen betrachtet, lassen sich therapeutische Antikörper, die Rezeptoren erkennen, zusammenfassend in agonistische und antagonistische Antikörper einteilen. Agonistische Antikörper binden direkt an ihren Rezeptor und

1 Einleitung

können beispielsweise apoptotische Kaskaden in Tumorzellen auslösen. Ein Beispiel hierfür stellen die Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren (TNFR) TRAILR1 und TRAILR2 dar. Des Weiteren können agonistische Antikörper immunmodulatorisch wirken. CD40 und 4-1BB, beides TNFR, können durch Agonisten aktiviert werden, wodurch immunologische Prozesse gegenüber Tumorzellen hochreguliert werden. Antagonistische Antikörper können durch Bindung an einen korrespondierenden Rezeptor beziehungsweise Liganden, deren Interaktion mit dem zugehörigen Liganden oder Rezeptor unterbinden. Ein Beispiel hierfür stellen Immun-Checkpoint Inhibitoren dar, welche durch Bindung an einen Immun-Checkpoint Rezeptor oder Liganden einer Immunsuppression durch Tumorzellen entgegenwirken (Alsaab et al., 2017; Schütt & Bröker, 2011; Wajant, 2015).

1.2 Immun-Checkpoint Rezeptor PD-1 und seine Liganden

Die T-Zell Aktivität wird von stimulierenden und hemmenden Proteinen gesteuert. Sogenannte inhibierende Immun-Checkpoints, wie PD-1/PD-L1 (*programmed cell death protein-1 / programmed death ligand 1*) und CTLA-4 (*cytotoxic t-cell lymphocyte-associated protein 4*) schwächen physiologisch die T-Zell-Aktivität, um inflammatorisch bedingte Schäden bei der Bekämpfung von Pathogenen am körpereigenen Gewebe zu minimieren (Pardoll, 2012). *Programmed cell death protein-1* (PD-1) ist ein Immun-Checkpoint-Rezeptor und wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und myeloischen Zellen exprimiert (Freeman et al., 2000; Ishida, Agata, Shibahara, & Honjo, 1992). Der Rezeptor interagiert mit seinen Liganden PD-L1 (B7-H1) (*programmed death ligand 1*) und PD-L2 (B7-DC) (*programmed death ligand 2*) (Dong, Zhu, Tamada, & Chen, 1999; Latchman et al., 2001). PD-L1 wird überwiegend auf Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen exprimiert. PD-L2 findet sich hingegen auf dendritischen Zellen und Makrophagen. Dabei zeigt PD-L1 eine dreifach stärkere Affinität gegenüber PD-1 als PD-L2 (Topalian, Drake, & Pardoll, 2012). Nach Aktivierung der T-Zelle durch Antigenbindung, wird PD-1 vermehrt an der T-Zelloberfläche exprimiert und es kommt zur Bildung von Zytokinen, wie zum Beispiel IFN γ (Interferon γ), IL-4 (Interleukin 4) und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), die eine Expression von PD-L1 und PD-L2 in peripheren Geweben bewirken (Wilke et al., 2011; Yamazaki et al., 2002). Kommt es zur Interaktion zwischen dem PD-1 Rezeptor und seinen Liganden, wird die T-Zell Aktivität inhibiert, eine Überstimulierung verhindert und autoimmunologische Prozesse in körpereigenen Geweben unterbunden (Freeman et al., 2000). PD-L1 kann an einen weiteren Rezeptor auf der T-Zelle binden. Über die Bindung an B7.1 kann PD-L1 über einen zusätzlichen Weg die Aktivität der T-Zelle reduzieren (Butte, Keir, Phamduy, Sharpe, & Freeman, 2007). Tumorzellen können ebenfalls PD-L1 an ihrer Zelloberfläche exprimieren und entziehen sich auf diesem Wege einer Immunreaktion. Dabei wird die PD-L1 Expression über zwei Mechanismen induziert. Bei der sogenannten adaptiven Immunresistenz reagiert die Tumorzelle auf die IFN γ -Ausschüttung von aktivierten T-Zellen mit der

1 Einleitung

Expression von PD-L1. Darüber hinaus kann PD-L1 über den Mechanismus der angeborenen Immunresistenz gebildet werden. Dabei kommt es zu einer Hochregulation der PD-L1 Expression durch den PI3K-Akt Kinase-Signalweg (Pardoll, 2012; Ribas, 2015). Mit der Entwicklung von Immun-Checkpoint Inhibitoren hat sich ein vielversprechender Ansatz in der Antikörpertherapie entwickelt, bei welchen gezielt in die Signalkaskaden der Immunregulation durch Immun-Checkpoints eingegriffen wird.

1.2.1 Immun-Checkpoint Inhibitoren

In den letzten Jahren hat sich eine neue Klasse therapeutischer Antikörper auf dem kommerziellen Markt etabliert. Die bereits erwähnten Immun-Checkpoint Inhibitoren zeigen ein bemerkenswertes Ansprechverhalten gegenüber Tumorzellen bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen während einer Antikörpertherapie (Alsaab et al., 2017). Durch die Blockade von Immun-Checkpoints, kann das supprimierte Immunsystem reaktiviert werden. Derzeit befinden sich zwei Klassen von Immun-Checkpoint Inhibitoren auf dem Markt. Sie richten sich einerseits gegen PD-1/PD-L1, andererseits gegen CTLA-4. 2011 wurde Ipilimumab (anti-CTLA-4) als erster Immun-Checkpoint Inhibitor durch die FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassen (Michot et al., 2016). Diese therapeutischen Antikörper finden bei diversen Krebsarten, wie beispielsweise beim metastasierten Melanom, Lungen-, Blasen-, Nierenzellkarzinom sowie soliden und hämatopoetischen Malignomen, Anwendung (Hanahan & Weinberg, 2011). Avelumab (Bavencio®) ist ein vollständig humanisierter IgG1 Antikörper von der Firma Merck KGaA, der an PD-L1 bindet. Bavencio® wurde erstmals im März 2017 durch die FDA (*Food and Drug Administration*) zur Behandlung des metastasierten Merkelzellkarzinoms zugelassen. Durch die Bindung an PD-L1 auf Tumorzellen kann der Antikörper die Interaktion zwischen dem Liganden und seinen korrespondierenden Rezeptoren PD-1 und B7.1 unterbinden und der supprimierten T-Zell Aktivität entgegenwirken (Kim, 2017). Zusätzlich ist Avelumab in der Lage antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) über seinen Fc-Teil zu vermitteln. *In-vitro* Studien konnten zeigen, dass der monoklonale Antikörper in der Lage war, ADCC bei Tumorzellen auszulösen und dabei ein geringes Ausmaß an Lyse bei Immunzellen zu verursachen (Boyerinas et al., 2015; Grenga, Donahue, Lepone, Richards, & Schlom, 2016). Ebenfalls konnte in klinischen Studien die Wirksamkeit von Avelumab, bei gleichzeitig limitiert auftretenden Nebenwirkungen, nachgewiesen werden (Disis et al., 2015; Kelly et al., 2015). Typische Immunreaktionen im Rahmen der Antikörpertherapie mit Avelumab führten während und nach der Behandlung zu Beeinträchtigungen von Organen des behandelten Patienten. Allgemein häufig beobachtete

Nebenwirkungen während einer anti-PD-1/anti-PD-L1-Immuntherapie sind Durchfall, Kolitis, Pankreatitis, Pneumonien sowie neurologische und hämatologische Beeinträchtigungen (Postow, Callahan, & Wolchok, 2015). Trotz der vielversprechenden Wirkung von Immun-Checkpoint Inhibitoren, unterliegen diese gewissen Limitationen. Beispielsweise können durch Tumorerogenität unterschiedliche PD-L1 Expressionslevel vorliegen. Ebenfalls führt eine PD-L1 Expression von Tumorzellen nicht zwangsläufig zu einem Ansprechverhalten im Rahmen einer Antikörpertherapie (Aguiar Jr et al., 2016). Neue Strategien in der Krebstherapie verfolgen das Konzept der Kombinationstherapie. Dabei werden spezifische Antikörper miteinander, beziehungsweise mit Kinaseinhibitoren oder Chemotherapeutika kombiniert, wodurch eine effektivere Tumorbekämpfung und Reduktion von behandlungsbedingten Nebenwirkungen ermöglicht werden soll. So hat sich die Kombinationstherapie von anti-PD-1/PD-L1 und anti-CTLA-4 Antikörpern als etablierte Behandlung bei Patienten mit unterschiedlichen Malignomen behauptet (Callahan, Postow, & Wolchok, 2015; Postow et al., 2015). Eine Vielzahl der heutzutage untersuchten Antikörper richten sich gegen Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie (TNFR-Superfamilie). Eine Kombination dieser mit Immun-Checkpoint Inhibitoren könnte einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie darstellen (Aggarwal, Gupta, & Kim, 2012).

1.3 TNF-Superfamilie

Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF) beschreibt die Liganden der TNFSF und die korrespondierenden Rezeptoren der TNFR-Superfamilie (TNFRSF). Anfang der siebziger Jahre wurde man erstmals auf ein pleiotropes Zytokin, den Tumor Nekrose Faktor (TNF), aufmerksam, als in Tierversuchen antitumorale Effekte des Zytokins durch Aktivierung des Immunsystems beobachtet wurden (Carswell et al., 1975). Die TNF-Superfamilie umfasst 29 Rezeptoren und 19 Liganden, deren Interaktion inflammatorische Prozesse, Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose steuern. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass mehrere Liganden mit dem selben Rezeptor beziehungsweise umgekehrt interagieren können (Bossen et al., 2006; Locksley, Killeen, & Lenardo, 2001).

1.3.1 Rezeptoren der TNFR-Superfamilie

Die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie sind überwiegend Typ-I-Transmembranproteine. Durch Proteolyse oder alternatives Spleißen des codierenden Exons der Transmembrandomäne können membranständige TNF-Rezeptoren zusätzlich als lösliche Rezeptoren vorliegen. Charakteristisch für die TNFR-Superfamilie sind die bis zu sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen (CRD), welche wiederum bis zu sechs Cysteinreste enthalten. Ihre Anzahl kann rezeptorabhängig variieren und sie spielen eine Rolle in der Ligandenbindung. Eine weitere Gemeinsamkeit stellt die extrazelluläre *pre-ligand assembly domain* (PLAD) dar. Sie kann vor Ligandenbindung inaktive dimere beziehungsweise trimere Rezeptorkomplexe ausbilden. Jedoch haben die einzelnen PLAD der Rezeptoren eine schwache Affinität zueinander, so dass höchstwahrscheinlich der Großteil der TNFR als monomere Rezeptoren vorliegen. Die transmembrane Domäne besteht aus ungefähr 30 Aminosäuren und bildet als Sekundärstruktur eine α -Helix aus (Bodmer, Schneider, & Tschopp, 2002; Chan et al., 2000; Locksley et al., 2001; Wajant, 2015). Nach

Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung, Trimerisierung und Oligomerisierung der Rezeptorkomplexe und der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (Wajant, Pfizenmaier, & Scheurich, 2003). Die TNFR lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen intrazellulären Domänen in drei Gruppen einteilen:

- 1) Todesrezeptoren
- 2) TRAF-interagierende Rezeptoren
- 3) Decoy-Rezeptoren

Todesrezeptoren verfügen intrazellulär über eine Protein-Protein Interaktions-Todesdomäne (*death domain*; DD), die sich aus bis zu 80 Aminosäuren zusammensetzt. Diese Rezeptoren sind in der Lage über die *death domain* Apoptose mittels Proteasen wie Caspase 8 zu initiieren. TRAF-interagierende Rezeptoren besitzen intrazellulär bis zu drei Bindungsstellen für TRAF-Proteine (*TNF receptor-associated factor*) und können auf diesem Wege inflammatorische Prozesse über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie aktivieren. Decoy-Rezeptoren kompetieren mit TRAF-interagierenden Rezeptoren und Todesrezeptoren um Liganden und verfügen über keine Kompetenz Signalkaskaden zu initiieren (Ashkenazi & Dixit, 1998; Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001; Wajant, 2015).

1.3.2 Liganden der TNF-Superfamilie

Liganden der TNFSF kommen als membranständige und lösliche Liganden vor. TNF-Liganden sind trimere Typ-II-Transmembranproteine. Einzige Ausnahme stellt $LT\alpha$ dar. Membranständige TNF-Liganden besitzen eine intra- und extrazelluläre Domäne, welche über eine Transmembrandomäne verknüpft sind. Extrazellulär befindet sich C-terminal die THD-Domäne (*TNF homology domain*). Durch alternatives Spleißen oder durch Metalloproteasen der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase*) können membranständige Liganden in lösliche Formen überführt werden. Es kommt dabei zwischen der Transmembrandomäne und der THD, in der sogenannten *stalk*-Region, zur Proteolyse. Über die THD-Domäne, welche 150 Aminosäuren umfasst, wird eine Trimerisierung der Liganden und die Bindung an die CRDs der Rezeptoren der TNFRSF vermittelt. Dabei geht trotz der trimeren Struktur jeder Ligand mit einem korrespondierenden Rezeptor eine Bindung ein (Black et al., 1997; Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001; C. A. Smith, Farrah, & Goodwin, 1994; Wajant, 2015).

Abbildung 2 gibt einen Überblick über Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie, deren schematischen Aufbau und auslösende Signalkaskaden. Zusätzlich gibt Tabelle 2 einen Überblick über die 19 TNF-Liganden mit ihren korrespondierenden TNF-Rezeptoren.

1 Einleitung

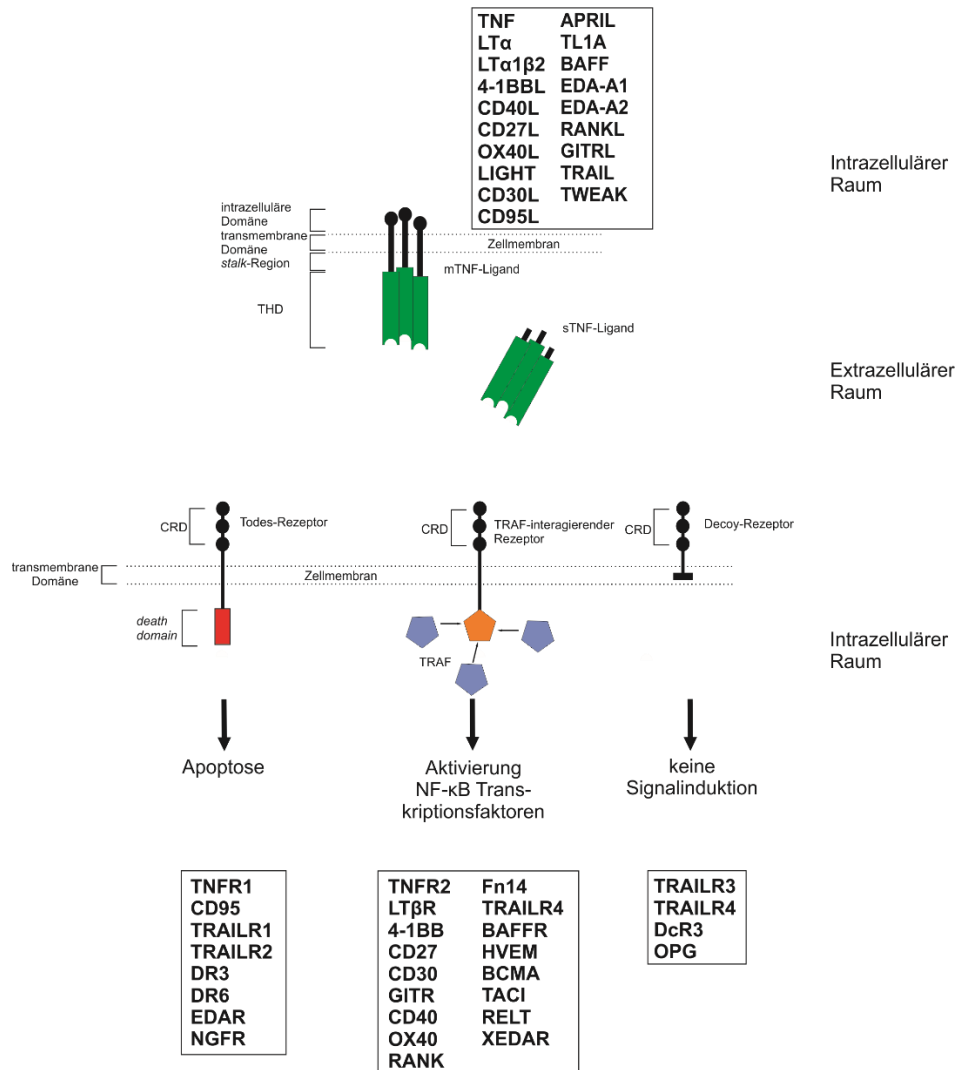


Abbildung 2: Überblick über Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie und deren schematischer Aufbau

Grafische Darstellung in Anlehnung an Wajant (2015)

Die Abbildung gibt einen Überblick über Liganden und spezifische Rezeptoren der TNF-Superfamilie (schwarze Kästen). Membranständige Liganden (**mTNF-Liganden**) setzen sich aus einer **intrazellulären** und **transmembranen Domäne** zusammen. Extrazellulär befindet sich die **stalk-Region** und die charakteristische **THD** (*TNF homology domain*). Durch alternatives Spleißen oder Proteolyse in der *stalk-Region* können lösliche Liganden (**sTNF-Liganden**) generiert werden. Die TNF-Rezeptoren lassen sich in **Todes-**, **TRAF-interagierende** und **Decoy-Rezeptoren** einteilen. Die cysteinreiche Domäne (**CRD**) liegt extrazellulär und spielt eine Rolle in der Ligandenbindung. Des Weiteren setzen sich die Rezeptoren aus einer transmembranen Domäne und der *pre-ligand assembly domain* (PLAD) zusammen. Todesrezeptoren verfügen über eine intrazelluläre **death domain** (DD) und sind der Lage nach Aktivierung Apoptose auszulösen. TRAF-interagierende Rezeptoren verfügen über eine Bindungsstelle für bis zu drei **TRAF** (*TNF receptor-associated factor*) Proteine. Ihre Stimulierung führt zur Aktivierung der NF-κB Transkriptionsfaktoren. **Decoy**-Rezeptoren kompetieren mit den anderen Rezeptoren um Liganden und besitzen keine intrazelluläre Domäne zur Signaltransduktion.

Tabelle 2: Liganden der TNF-Superfamilie mit korrespondierenden TNF-Rezeptoren

Tabellarische Übersicht der TNF-Liganden mit korrespondierenden TNF-Rezeptoren nach Bodmer et al. (2012) und Wajant (2015)

Ligand	Todesrezeptor	TRAF-interagierender Rezeptor	Decoy-Rezeptor
4-1BBL (<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 9</i>)		4-1BB	
APRIL (<i>a proliferation-inducing ligand</i>)		BCMA TACI	
BAFF (<i>B-cell activating factor</i>)		BAFFR BCMA TACI	
CD27L (<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>)		CD27	
CD30L (<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 8</i>)		CD30	
CD40L (<i>B-cell activating molecule</i>)		CD40	
CD95L (<i>apoptosis-mediating surface antigen Fas ligand</i>)	CD95		DcR3
EDA-A1 (<i>ectodermal dysplasia protein 1</i>)	EDAR		
EDA-A2 (<i>ectodermal dysplasia protein 2</i>)		XEDAR	
GITRL (<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>)		GITR	
LIGHT (<i>herpes virus entry mediator ligand</i>)		HVEM LTβR	DcR3
LTα (<i>lymphotoxin alpha</i>)	TNFR1	TNFR2 HVEM LTβR	
LTα1β2 (<i>lymphotoxin alpha1/beta2</i>)			
OX40L (<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>)		OX40	
RANKL (<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)		RANK	OPG
TL1A (<i>TNF ligand related molecule 1</i>)	DR3		DcR3
TNF (<i>tumor necrosis factor</i>)	TNFR1	TNFR2	
TRAIL (<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>)	TRAILR1 TRAILR2	TRAILR4	OPG TRAILR3 TRAILR4
TWEAK (<i>TNF related weak inducer of apoptosis</i>)		Fn14	

1.3.3 Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie

Nach erfolgter Ligandenbindung bilden sich TNF-Liganden₃-TNFRSF₃ Komplexe aus, die TNFR-abhängig unterschiedlich in der Lage sind Signalkaskaden zu induzieren. Entscheidend für eine starke Signaltransduktion ist eine sekundäre Interaktion zwischen TNF-Liganden₃-TNFRSF₃-Komplexen und Ausbildung von interagierenden und transaktivierenden multimeren TNF-Liganden₃-TNFRSF₃-Komplexen. Durch räumliche Ausrichtung und reduzierte Mobilität, welche durch membrangebundene Liganden ermöglicht wird, kann es bei diesen in der Zell-Zell-Kontaktzone zwischen Liganden und Rezeptor exprimierenden Zellen zu spontaner Ausbildung multimerer Ligand-Rezeptor-Komplexe kommen. Im Falle von löslichen Liganden, lassen sich durch sekundäre Oligomerisierung oder Immobilisation an die Zelle Aktivierungspotenziale wie bei membranständigen Liganden beobachten. Die sekundäre Oligomerisierung der TNF-Liganden kann beispielsweise über sekundäre Antikörper erfolgen. So fand eine deutliche Steigerung der Aktivität von spezifischen TNF-Liganden statt, welche mit einem FLAG-Tag modifiziert wurden und über einen sekundären anti-FLAG Antikörper vernetzt wurden. Für den löslichen CD40L zeichnete sich dabei eine Aktivitätssteigerung um das 10-fache und für den löslichen 4-1BBL sogar um das 200-fache ab. Ebenfalls kann eine hohe Rezeptoreigenaffinität zwischen einzelnen TNF-Liganden₃-TNFRSF₃-Komplexen zu einer spontanen sekundären Interaktion zwischen den TNF-Liganden₃-TNFRSF₃ Komplexen führen (Engelmann et al., 1990; Wajant, 2015; Wajant, Gerspach, & Pfizenmaier, 2013; Wyzgol et al., 2009). Beispielhaft hierfür ist lösliches TNF, dass mit den beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 eine Bindung eingeht, jedoch lediglich den TNFR1, der sehr stark autoaggregiert, aktiviert (Grell, Wajant, Zimmermann, & Scheurich, 1998). Abbildung 3 zeigt schematisch die Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF durch Liganden der TNF-Superfamilie.

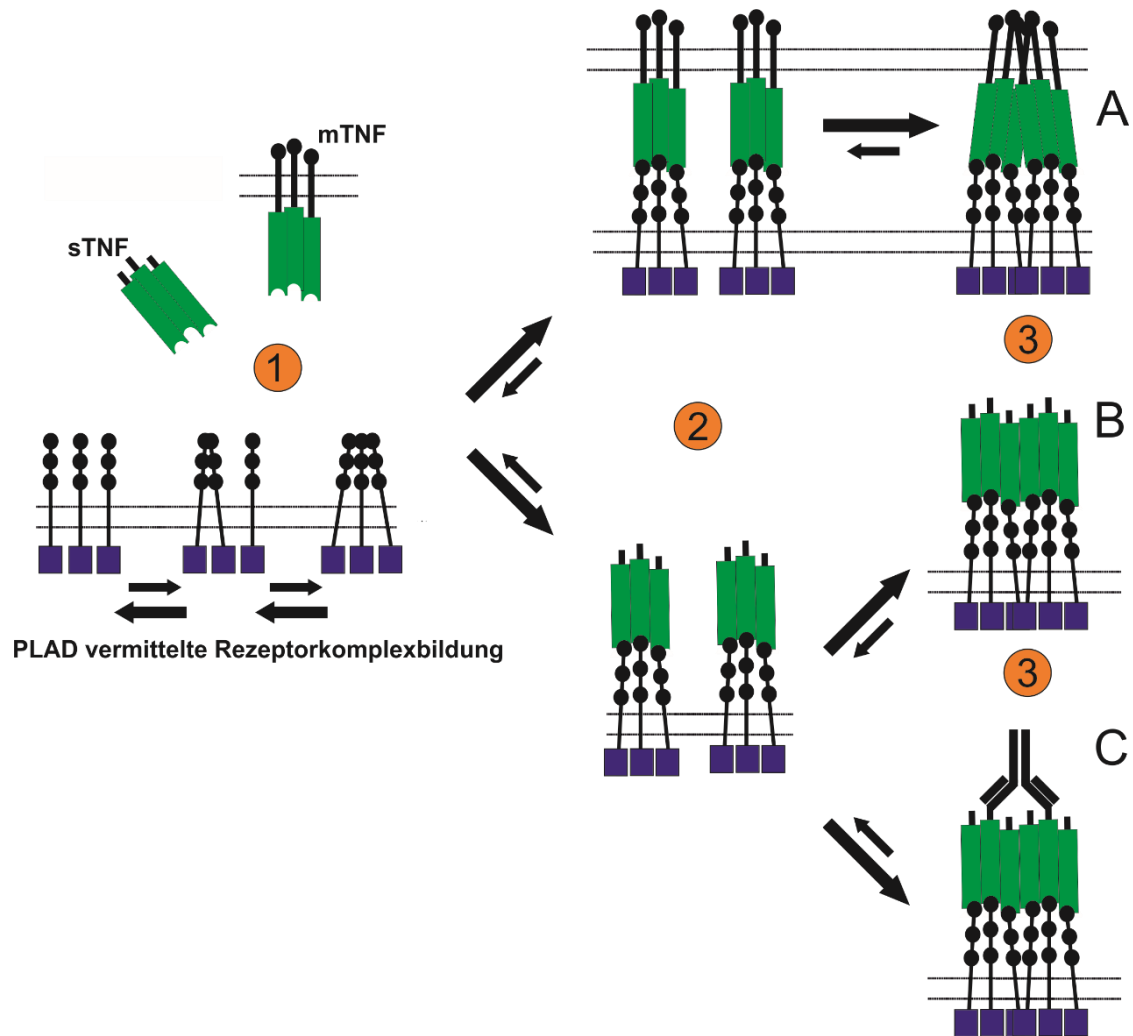


Abbildung 3: Darstellung der TNFR-Aktivierung durch membrangebundene und lösliche TNF-Liganden

Grafische Darstellung in Anlehnung an Wajant (2015)
 Die Abbildung zeigt die Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF durch zugehörige lösliche (sTNF) und membrangebundene (mTNF) Liganden der TNFSF (1). Zunächst kommt es nach **PLAD (pre-ligand assembly domain) vermittelter Rezeptorkomplexbildung** zur Bindung zwischen Liganden und Rezeptoren, wodurch TNF-Liganden₃-TNFRSF₃-Komplexe entstehen (2). Im Falle von membrangebundenen Liganden wird über eine starre räumliche Ausrichtung die Bildung von transaktivierenden multimeren TNF-Liganden₃-TNFRSF₃-Komplexen ermöglicht (3A). Binden lösliche Liganden an TNFR ist die Bildung von transaktivierenden multimeren Komplexen einerseits durch eine hohe Rezeptoreigenaffinität (3B), andererseits über eine unterstützte sekundäre Immobilisation, beispielsweise mit sekundären Antikörpern, möglich (3C).

Das Prinzip der Aktivierung von TNFRs durch TNF-Liganden kann ebenfalls auf die TNFR-Aktivierung durch spezifische Antikörper übertragen werden. Antikörper auf Basis des IgM und IgG3, welches zur Aggregation tendiert, sind oft bereits ohne zusätzliche Vernetzung und Immobilisation in der Lage, starke Signale zu induzieren und ähneln darin oligomerisierten löslichen TNF-Liganden (Dhein et al., 1992; Espevik, Brockhaus, Loetscher, Nonstad, & Shalaby, 1990). Typischerweise zeigen dimere TNFR-Komplexe, die mit einem spezifischen Antikörper interagieren, lediglich eine schwache Signalinduktion. Erst eine sekundäre Oligomerisierung durch Protein G oder sekundäre Antikörper oder auch die Immobilisation durch Bindung an zellständige Fcγ-Rezeptoren transformiert die Antikörper in potente Agonisten. TNFR-spezifische Antikörper zielen darauf ab, Apoptose in Tumorzellen (beispielsweise TRAILR1 spezifischer Antikörper) zu verursachen. Ebenfalls stellt die Modulation von Immunzellen zur Tumorbekämpfung, wie zum Beispiel mit CD40 und 4-1BB spezifischen Antikörpern, einen weiteren Ansatz dar (Dhein et al., 1992; Engelmann et al., 1990; Wajant, 2015).

1.3.3.1 Aktivierung von 4-1BB und CD40 durch Antikörper

Die TNF-Rezeptoren 4-1BB (CD137) und CD40 gehören zur Gruppe der TRAF-interagierenden Rezeptoren. Ihre Aktivierung induziert eine Immunmodulation, die sich allgemein in einer verbesserten Rekrutierung und Funktion von antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen äußert und somit zur Tumorregression führt (Karin & Gallagher, 2009; Moran, Kovacsovics-Bankowski, & Weinberg, 2013).

4-1BB wird auf aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und einigen Tumorzellen exprimiert. Nach Bindung und anschließender Aktivierung von 4-1BB durch Antikörper wird die Überlebensrate von tumorspezifischen T-Zellen erhöht und es kommt zur Tumorregression durch Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. Zusätzlich kann durch die Aktivierung des 4-1BB Rezeptors einer Suppression von T-Effektorzellen durch regulatorische T-Zellen entgegengewirkt

werden. Eine verbesserte Penetration von tumorinfiltrierenden T-Zellen in das Tumorgebiet und die Zerstörung von Tumorzellen durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) sind weitere Effekte, die mit 4-1BB Antikörpern beobachtet wurden (Hernandez-Chacon et al., 2011; Melero et al., 1997; Shuford et al., 1997).

Der CD40-Rezeptor wird vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen stark exprimiert. Antikörper, die CD40 aktivieren, erhöhen die Aktivität von antigenpräsentierenden Zellen, wodurch eine Aktivitätssteigerung von tumorspezifischen T-Zellen und deren zytotoxischer Funktion erreicht wird. Wie bei 4-1BB spezifischen Antikörpern kann über die Bindung an CD40 auf tumorösen Zellen auch ADCC initiiert und auf diesem Wege Tumorzellen zerstört werden. Ein zusätzlicher Nutzen von CD40-spezifischen Antikörpern liegt in der Unterbindung der Interaktion von tumorassoziertem CD40 und seinem natürlich korrespondierenden Liganden CD40L. Durch Unterbindung der Interaktion kann auf direktem Wege die Tumorzellproliferation verhindert werden (Diehl et al., 1999; French, Chan, Tutt, & Glennie, 1999; Moran et al., 2013).

1.3.4 TNFR vermittelte Signalkaskaden

1.3.4.1 Die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskaden

NF- κ B (nuclear factor kappa B) Proteine fassen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren zusammen. Sie liegen als Homo- oder Heterodimere vor und setzen sich aus zwei gleichen (Homodimere) beziehungsweise zwei unterschiedlichen (Heterodimere) der fünf vorkommenden Rel-Transkriptionsproteinen (p65 (RelA), p100/p52, p105/p50, RelB und c-Rel) zusammen. Nach Aktivierung von TRAF-interagierenden Rezeptoren der TNFRSF kann über NF- κ B Proteine die Transkription von Genen für physiologische und pathologische Prozesse, wie Zellproliferation, Zelltod und immunmodulatorische Vorgänge gesteuert werden (Gilmore, 2006). Die bei allen Transkriptionsfaktoren vorkommende charakteristische RHD (*Rel homology domain*) beinhaltet die NLS (*nuclear localization signal*). Über die RHD wird die DNA-Bindung, Proteindimerisierung und Translokation in den Zellkern vermittelt. Im inaktiven Zustand sind die Transkriptionsfaktoren durch die inhibitorischen Moleküle I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ und Vorläufermoleküle p100 und p105 inhibiert. Die Inhibition wird durch die Maskierung der NLS durch sogenannte *Ankyrin-Repeats*, welche in den I κ Bs und in den Vorläufermolekülen p100 und p105 enthalten sind, vermittelt. Dadurch wird eine Translokation der NF- κ B Proteine in den Zellkern unterbunden. Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren kann nach Rezeptoraktivierung über die klassische oder alternative NF- κ B-Signalkaskade erfolgen, wobei sich beide Kaskaden deutlich in der Kinetik unterscheiden (Scheidereit, 2006; Verma et al., 1995). Bei der klassischen Signalkaskade wird durch eine zeitlich schnell ablaufende Phosphorylierung der I κ Bs deren proteasomale Degradation initiiert und so die nukleäre Translokation und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Hayden & Ghosh, 2004). Der für die Phosphorylierung der inhibitorischen Moleküle verantwortliche IKK (*I κ B kinase complex*) setzt sich aus den katalytischen Untereinheiten IKK α , IKK β und der regulatorischen Untereinheit NEMO (*NF- κ B essential modifier*) zusammen (Karin & Ben-Neriah, 2000; Yamaoka et al., 1998). Während der klassischen

Signalkaskade sind insbesondere IKK β und NEMO für die Phosphorylierung der I κ Bs von Bedeutung (Silverman & Maniatis, 2001). Nach Bindung an den Rezeptor kommt es durch TRAF (*TNF receptor associated factor*) Proteine und cIAP Proteine (*cellular inhibitor of apoptosis protein*), welche an die aktivierten TNF-Rezeptoren binden, zur K63-Ubiquitinylierung von NEMO, wodurch eine Bindestellen für TAK1 (*TGF β activated kinase 1*) und TAB1/2 (*TAK binding protein*) generiert wird, so dass die Phosphorylierung des IKKs durch TAK1 möglich wird. Darauf folgend kommt es zur Phosphorylierung der I κ Bs durch den IKK und anschließenden K48-Ubiquitinylierung, wodurch die proteasomale Degradation gestartet wird.

Zentraler Aspekt bei der deutlich langsamer ablaufenden alternativen Signalkaskade stellt die Prozessierung des Vorläufermoleküls p100 zu p52 dar. Anders als beim klassischen NF- κ B Signalweg erfolgt bei der alternativen Kaskade nicht die Aktivierung des IKK sondern die von IKK α über NIK (*NF- κ B inducing kinase*). In unstimulierten Zellen wird über eine Ubiquitinylierung von NIK eine Akkumulation der Kinase verhindert. Nach Rezeptoraktivierung werden TRAF2-cIAP1 bzw. TRAF2-cIAP2 Komplexe an den Rezeptor rekrutiert und so die Ubiquitinylierung von NIK unterbunden. Darüber wird eine Akkumulation von NIK ermöglicht und IKK α wird phosphoryliert. Die anschließende IKK α -vermittelte Phosphorylierung von p100 und die darauf mögliche K48-Ubiquitinylierung von p100 ermöglicht die proteasomale Degradation zu p52 (Bonizzi & Karin, 2004; Hayden & Ghosh, 2004; Mace, Smits, Vaux, Silke, & Day, 2010; Pomerantz & Baltimore, 2002; Scheidereit, 2006). Abbildung 4 stellt schematisch die klassische und alternative NF- κ B-Signalkaskade dar.

1 Einleitung

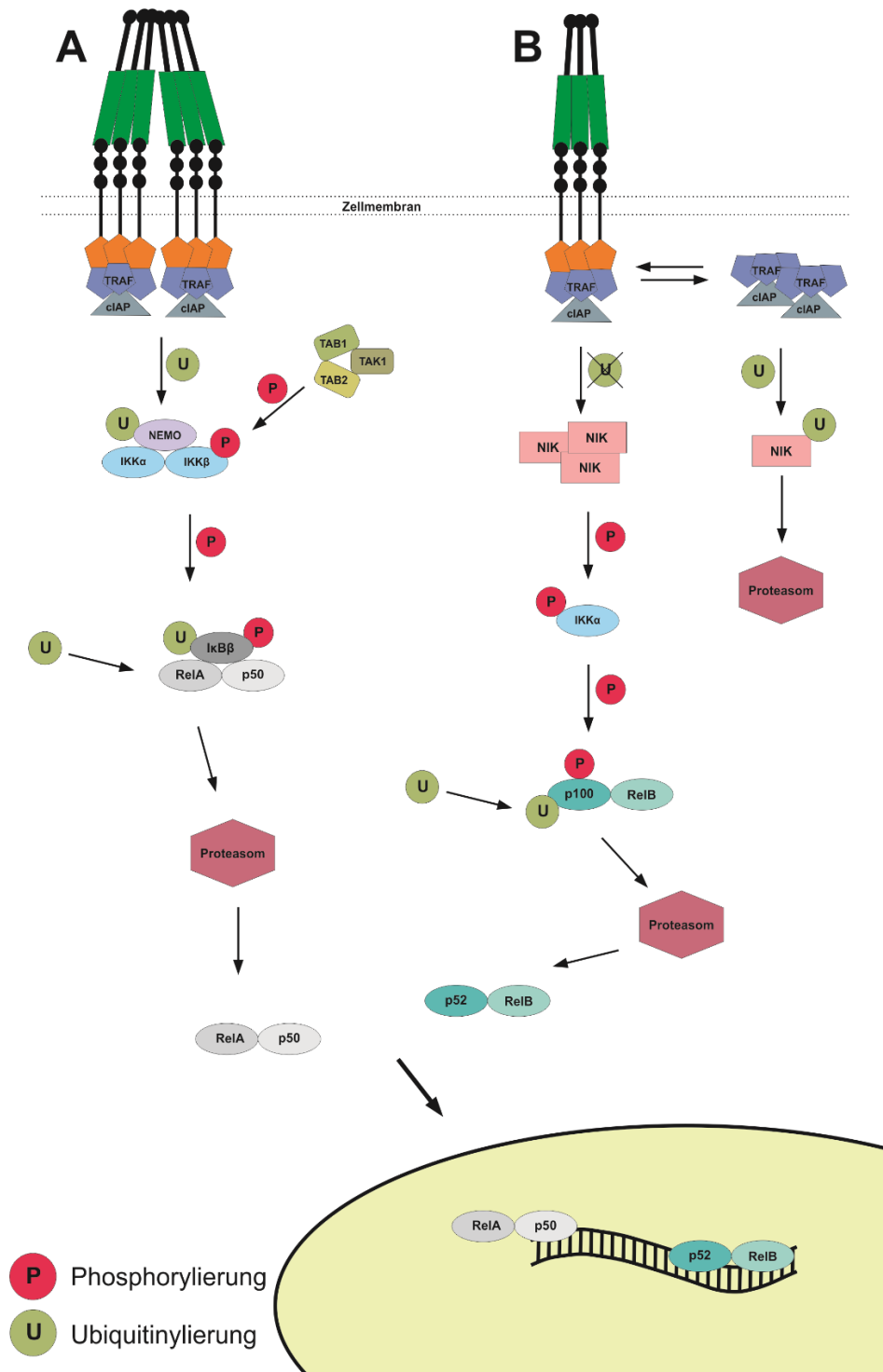


Abbildung 4: Ablauf der klassischen und alternativen NF-κB-Signalkaskade

Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der klassischen (A) und alternativen (B) NF-κB-Signalkaskade. Hauptziel beider Wege ist die Phosphorylierung und Ubiquitinylierung der inhibitorischen Moleküle IκBα, IκBβ, IκBε sowie Vorläufermoleküle p100 und p105, wodurch diese vollständig, oder teilweise im Falle von p100 und p105, proteasomal degradiert werden und eine Translokation der NF-κB Transkriptionsfaktoren in den Zellkern ermöglicht wird. Der ausführliche Ablauf wird im Text beschrieben.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bispezifische Antikörper-Fusionsproteine hergestellt und charakterisiert, die eine Inhibition des Immun-Checkpoints PD-1 über Bindung an dessen korrespondierenden Liganden PD-L1 mit der Aktivierung der immunstimulatorischen TNFRSF-Rezeptoren CD40 und 4-1BB verknüpfen.

PD-L1 spezifische Antikörper-Monotherapien unterliegen nach wie vor großen Limitationen im Ansprechverhalten. Über die Kombination unterschiedlicher Antikörper wird derzeit in klinischen Studien versucht, die Erfolgsraten während einer Krebstherapie zu verbessern. Die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper-Fusionsproteine greifen den Ansatz der Kombinationstherapie auf und vereinen die Kompetenzen zweier funktionell unabhängiger Antikörper in einem Protein.

Die Agonismus von TNFR-spezifischen Antikörpern wird entscheidend von dessen Immobilisation bestimmt. Meist wird die Immobilisation der Antikörper-TNFR-Komplexe über die Bindung an zellassoziierte Fc γ -Rezeptoren erzielt. Die damit verbundene Aktivierung dieser Rezeptoren kann jedoch zu unspezifischen Nebenwirkungen während einer Therapie führen. Zur Reduktion möglicher Nebenwirkungen, wurde der IgG2 Subtyp aufgrund seiner niedrigen Affinität gegenüber Fc γ -Rezeptoren als Basis für die Herstellung der Antikörper-Fusionsproteine gewählt, um eine größtmögliche Fc γ -Rezeptorunabhängigkeit zu erzielen. Nachteil ist, dass damit typischerweise auch die agonistische Antikörperwirkung stark reduziert wird. Die für den Agonismus von anti-CD40 und anti-4-1BB benötigte Zellverankerung sollte daher in dieser Arbeit über die Bindung an Tumor-exprimiertes PD-L1 erreicht werden. Somit kommt der PD-L1-spezifischen Domäne der Antikörper-Fusionsproteine neben der Unterbindung der Immunsuppression eine weitere bedeutsame Funktion zu, nämlich den Agonismus von anti-CD40 und anti-4-1BB Antikörpern freizusetzen. Das bispezifische Proteindesign könnte weiterhin zu einer erhöhten Selektivität und Aktivität der Antikörper-Fusionsproteine gegenüber Tumorzellen bei gleichzeitiger Minimierung von systemischen Wirkungen führen.

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Prokaryotische Zellen

Folgende prokaryotischen Zellen wurden für die Klonierung der Expressionsplasmide verwendet.

Zellen	Herkunft
NEB 5- α kompetente E.coli (<i>high efficiency</i>)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

2.1.2 Eukaryotische Zellen

Die verwendeten eukaryotischen Zellen stammten aus Vorräten der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg.

Zellen	Erläuterung
HEK293	Embryonale Nierenzelllinie
HT1080	Fibrosarkomzellen
HT1080-CD40	Fibrosarkomzellen (mit CD40 stabil transfiziert)
HT1080-4-1BB	Fibrosarkomzellen (mit 4-1BB stabil transfiziert)

2.2 Antikörper und Proteine

Antikörper/Protein	Herkunft
18D1-IgG3-LC:GpL	aus Vorräten der Abteilung für Molekulare Innere Medizin (Universitätsklinikum Würzburg)
ANTI-FLAG® M2 (IgG1, murin, monoklonal)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland)
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (IgG1, murin, polyklonal)	LI-COR® (Lincoln, Nebraska, USA)
TNF60-Flag	aus Vorräten der Abteilung für Molekulare Innere Medizin (Universitätsklinikum Würzburg)

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsenzyme

Die aufgeführten Restriktionsendonukleasen wurden zum Klonieren der gewünschten Expressionsvektoren verwendet.

BamH1	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Bgl2	
EcoR1	
Hind3	
Mfe1	
Sal1	
Xba1	
Xho1	

2.3.2 Weitere Enzyme

Enzym	Herkunft	Bemerkung
CIP (Alkaline Phosphatase)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck (Darmstadt, Deutschland)	Bestandteil von KOD Hot Start DNA Polymerase-Kit
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Litauen)	Bestandteil von Rapid DNA Ligation Kit

2.4 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
6 x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Litauen)
ABTS	Roche (Mannheim, Deutschland)
ABTS-Puffer	Roche (Mannheim, Deutschland)
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Anti-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau Na-Salz	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)

2 Material

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
DPBS (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Essigsäure (≥ 99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (≥ 70 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol (≥ 99.8 %), absolut	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	gibco® by life technologies™ (Grand Island, New York, USA)
FLAG-Peptid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Litauen)
Glycerin (≥ 99,5 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Hefeextrakt	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Methanol (≥ 99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland)
Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NEBuffer 1-4 (für Restriktionsenzyme)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

2 Material

Pepton	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Prestained Protein Standard, Broad Range (11 - 190 kDa)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
RNase A	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS, ultra pure (≥ 99,5 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TRIS (≥ 99,9 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Solution (10 x)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TWEEN® 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.5 Lösungen und Puffer

Blotpuffer (1 x)	0,025 M TRIS 0,192 M Glycin 20 % Methanol pH: 8,3
ELISA Assay Diluent	1 x PBS 10 % FCS

2 Material

ELISA Coating Buffer	0,1 M Natriumcarbonat pH: 9,5
Laemmli-Puffer (SDS Sample Buffer, 4 x)	0,2 M TRIS 0,04 % Bromphenolblau Na-Salz 8 % SDS 10 % 2-Mercaptoethanol 40 % Glycerin
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,004 M SDS 0,05 M TRIS 0,38 M Glycin pH: 8,3
LB Agar Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid 10 g/l Pepton 15 g/l Agar-Agar
LB Medium (5-fach konzentriert)	25 g/l Hefeextrakt 50 g/l Natriumchlorid 50 g/l Pepton
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) (10-fach konzentriert)	3,12 g/l Natriumdihydrogenphosphat 26,65 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat 81,9 g/l Natriumchlorid pH: 7,2
PBS-TWEEN	PBS (1-fach konzentriert) 0,05 % TWEEN® 20
PBS-TWEEN-Milch	PBS (1-fach konzentriert) 0,05 % TWEEN® 20 5 % Magermilchpulver

2 Material

S1-Puffer (Mini-DNA-Präparation)	50 mM TRIS/ Salzsäure 10 mM EDTA 0,1 mg/ml RNase A pH: 8,0
S2-Puffer (Mini-DNA-Präparation)	0,2 M Natriumhydroxid 1 % SDS
S3-Puffer (Mini-DNA-Präparation)	3 M Natriumacetat pH: 4,8
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,015 M SDS 0,5 M TRIS pH: 6,8 (mit Salzsäure eingestellt)
TAE-Puffer (50-fache Konzentration)	0,1 M EDTA 1 M Essigsäure 2 M TRIS pH: 8,3
TBS (<i>TRIS buffered saline</i>) (10-fach konzentriert)	24,2 g/l TRIS 80 g/l Natriumchlorid pH: 7,6 (mit Salzsäure eingestellt)
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	0,015 M SDS 1,5 M TRIS pH: 8,8

2.6 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Amersham™Protran™0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membran	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Autoklaviermüllbeutel	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Chromatografiesäule	BioRad (München, Deutschland)
Dialysierschlauch Visking, Cellulose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Durchflusszytometrie Röhrchen (5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Eppendorf-Pipetten (0,5 - 10; 2 - 20; 20 - 200; 100 -1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Erlenmeyerkolben	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Glaspasteurpipetten	Brand (Wertheim, Deutschland)
Glaspipetten	Brand (Wertheim, Deutschland)
Handstückzähler	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Kryoröhrchen CRYO.S (2 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Microplatte (96 Well, schwarz, med. binding)	
Microplatte (96 Well, U-Boden, transparent)	
Microplatte (96 Well, F-Boden, high binding)	
Multikanalpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Multistepper Pipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Nitril-Handschuhe	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Parafilm M (38 m x 10 cm)	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Petrischalen (60 x15 mm)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen Combitips (5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)

2 Material

Polypropylenröhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5/2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Schutzbrille	neoLab® (Heidelberg, Deutschland)
Serologische Pipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Skalpell	pfm (Köln, Deutschland)
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vernichtungsbeutel	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Waageschälchen	
Whatman-Blotting-Papier	
Zellkulturflaschen (175 cm ²)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten (24 Well)	
Zellkulturschalen (145/20 mm)	

2.7 Laborkits

BioLux® <i>Gaussia</i> Luciferase Assay Kit	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
KOD Hot Start DNA Polymerase Kit	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
BD OptEIA™ IL8-ELISA Set	BD Biosciences (San Diego, California, USA)
Pierce™ Silver Stain Kit	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega (Mannheim, Deutschland)
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Litauen)

2.8 Gerätschaft

CO ₂ -Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
EVOS xl digital inverted microscope (Lichtmikroskop)	Advanced Microscopy Group (Bothell, Washington, USA)
Feinwaage ATL-623	Sartorius Acculab Atilon (Göttingen, Deutschland)
FlexCycler (Flexibler PCR Thermocycler)	Analytik Jena (Jena, Deutschland)
Flockeneisbereiter AF 124	Scotsman® Ice (Mailand, Italien)
Gefrierschrank -80°C Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific (Marietta, Ohio, USA)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen, Deutschland)
Gellaufkammern SDS-PAGE	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Heizblock	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Mikrobiologischer Inkubator Multitron	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
Mikrowelle TechnoStar MWN 20 S	Venalisia (Kösching, Deutschland)
neoMag® Digitaler Magnetrührer D-6010	neoLab® (Heidelberg, Deutschland)
Kaltzentrifuge accuSpin Micro 17R	Thermo Electron (Osterode, Deutschland)
Kühlgerät KGE39AI41E	Bosch (München, Deutschland)
Kühlraum (4°C)	Schick (Vaihingen/Enz, Deutschland)
LI-COR Odyssey Infrared Imager	LI-COR® Biosciences (Bad Homburg, Deutschland)
LUmo Luminometer	Anthos Labtec (Krefeld, Deutschland)
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos Labtec (Krefeld, Deutschland)
PerfectBlue™ Horizontal Minigelsystem	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Spektralphotometer GeneQuant pro RNA/DNA	GE Healthcare Life Sciences, (Marlborough, Massachusetts, USA)
Sterilwerkbank LaminAir® HB2448	Heraeus (Hanau, Deutschland)

Stromquelle EPS 301	GE Healthcare Life Sciences, (Marlborough, Massachusetts, USA)
Stromquelle Consort E835	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
UV-Kontaktlampe Chroma 43	Klein (Würzburg, Deutschland)
Vortexer 7-2020	neoLab® (Heidelberg, Deutschland)
Vortexer GLW L46	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Waage BA 210	Sartorius Acculab Atilon (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad Typ3043	Köttermann (Würzburg, Deutschland)
Wet-Blotkammer	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Wippschüttler WS 10	Edmund Bühler (Bodelshausen, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.OR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Zentrifuge J2-HS	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge MIKRO 200R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge PICO 17	Thermo Electron (Osterode, Deutschland)

3 Methoden

3.1 DNA-Klonierung

3.1.1 Verdau

Für den Verdau der Vektoren beziehungsweise DNA-Inserts wurde ein 50 µl Verdauansatz, bestehend aus 5 µl DNA, 5 µl enzymabhängiger NEBuffer, je 1 µl Restriktionsenzym und 38 µl H₂O, für 60 Minuten im Wasserbad zwischen 35-40°C inkubiert. Bei dem Verdau der Vektoren wurde nach der einstündigen Inkubation 1 µl CIP dem Verdauansatz für weitere 30 Minuten hinzugefügt. Zwischenzeitlich wurde das Agarosegel vorbereitet. Hierfür wurden 0,6 g Agarose mit 60 ml 1x TAE vermengt, in der Mikrowelle erhitzt, 3 µl Midori Green Advance hinzu pipettiert und in der Gelelektrophoresekammer ausgegossen. Nach Abschluss des Verdau, wurde der Ansatz mit 2 µl Ladepuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 15 Minuten bei 110 Volt. Anschließend wurde die gewünschte DNA-Bande auf der UV-Kontaklampe herausgeschnitten, in 500 µl Binding Puffer überführt und über Nacht bei 4°C gelagert.

3.1.2 PCR

Einige der DNA-Inserts wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Hierfür wurde ein Ansatz, bestehend aus je 1,5 µl Forward beziehungsweise Reverse-Primer, 3 µl MgSO₄, 5 µl dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate), 5 µl 10x Puffer, 1 µl 1:100 DNA und 1 µl Polymerase, hergestellt. Anschließend wurde die PCR mit Hilfe des FlexCyclers durchgeführt. Durch die darauffolgende Agarose-Gelelektrophorese wurden die vervielfältigten DNA-Fragmente separiert, ausgeschnitten und in 550 µl Binding-Puffer überführt, über Nacht bei 4°C gelöst und am Folgetag mithilfe des

Gelextraktionskits NucleoSpin aufgereinigt. Durch den darauffolgenden Restriktionsverdau wurden kompatible Schnittstellen für den zugehörigen verdauten Vektor geschaffen. Abschließend erfolgte eine erneute Aufreinigung.

3.1.3 DNA-Aufreinigung

Die im Binding Puffer gelöste DNA wurde mithilfe des Gelextraktionskits NucleoSpin aufgereinigt. Die DNA wurde in die Einsatzfilter des Extraktionskits überführt und für 10 Sekunden bei 11.000 rpm abzentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde verworfen. 600 µl NT3 Waschpuffer wurde hinzugefügt und erneut für 10 Sekunden bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Anschließend erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation und darauffolgend eine Elution der DNA mit 25 µl NE Elutionspuffer.

3.1.4 Ligation

Die Ligation erfolgte mit Hilfe des T4 DNA Ligase Kits. Hierfür wurden 3 µl des verdauten DNA Inserts, 1 µl des verdauten DNA Parentalvektors, 1 µl Ligase, 4 µl Ligase-Puffer und 11 µl H₂O vermischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.5 Hitzeschock-Transformation und Ausstrichverfahren

Bei der Hitzeschock-Transformation wurden 5-α kompetente E.coli (*high efficiency*)-Bakterien verwendet, wobei 20 µl der Bakterienkultur mit 2 µl des zuvor ligierten Expressionsvektors vermischt wurde. Es erfolgte eine 30-minütige Lagerung auf Eis, darauffolgend ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und abschließend eine erneute Lagerung für 30 Sekunden auf Eis.

Den transfizierten Bakterien wurde 250 µl SOC Outgrowth Medium hinzugefügt und es erfolgte eine Inkubation für 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C. Für das Ausstrichverfahren wurden die transfizierten Bakterien anschließend auf einer mit Ampicillin versetzten LB-Agar-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.6 Überführung selektionierter Bakterienklone in einen Miniansatz

Einzelne, über Nacht auf der LB-Agar-Agarplatte gewachsenen Bakterienklone, wurden mithilfe einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen, welches 2 ml 1x LB-Medium und 2 µl Ampicillin beinhaltet, überführt. Es erfolgte eine Inkubation des Miniansatzes unter rotierender Bewegung bei 37°C über Nacht.

3.1.7 Aufreinigung und Kontrollverdau des Miniansatzes (Mini-DNA-Präparation)

Ungefähr 1,5 ml des über Nacht inkubierten Miniansatzes wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Bakterienpellet in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine Lyse durch Zugabe von 100 µl S2-Puffer und anschließend eine Neutralisation mithilfe von 100 µl S3-Puffer. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der flüssige Überstand in 250 µl Isopropanol überführt und für 5 Minuten bei 4°C erneut zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols wurde das DNA-Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert. Der Kontrollverdauansatz, bestehend aus 3 µl DNA, je 0,5 µl Restriktionsenzym, 2 µl enzymabhängiger NEBuffer und 14 µl H₂O, wurde für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend erfolgte die Analyse des Verdaus mittels Gelelektrophorese.

3.1.8 Midiansatz

Ein Erlenmeyerkolben wurde mit 150 ml 1x LB-Medium, 150 µl Ampicillin und 20 µl einer positiven Bakterienkultur vorbereitet. Es erfolgte eine Inkubation des Midiansatzes unter rotierender Bewegung bei 37°C über Nacht.

3.1.9 Midipräparation

Die Midipräparation erfolgte mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems. Hierfür wurde die Bakteriensuspension aus dem Erlenmeyerkolben in ein Zentrifugengefäß überführt und für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterienpellet in 8 ml Resuspensionspuffer gelöst. Die resuspendierten Bakterien wurden in ein neues Zentrifugengefäß überführt, die Suspension mit 8 ml Lysispuffer ergänzt und anschließend 9 ml Neutralisationspuffer hinzugefügt. Das Bakterienlysate wurde für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend auf die Reinigungssäulen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Nach der Zugabe von 5 ml Endotoxin Removal Puffer, wurde 20 ml Waschpuffer hinzugefügt. Abschließend wurde die gereinigte DNA in 400 µl H₂O eluiert, die Konzentration bestimmt und die Sequenzierung der DNA bei der Firma GATC durchgeführt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung der adhärenenten HEK293 sowie der HT1080, HT1080-CD40 und HT1080-4-1BB erfolgte mit RPMI-1640 Medium + 10 % hitzeinaktiviertem FCS in Zellkulturflaschen (175 cm²) bei 37°C und 5 % CO₂. Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte für 40 Minuten bei 56°C im Wasserbad. Ab einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden mit 1 x Trypsin/EDTA durch eine 10-minütige Inkubation abgelöst und anschließend die Reaktion mit RPMI-1640 Medium + 10 % hitzeinaktiviertem FCS gestoppt.

3.2.2 PEI-Transfektion

Für die DNA Transfektion wurden HEK293 in Zellkulturschalen (145/20 mm) kultiviert und ab einer Konfluenz von ca. 90 % transfiziert. Hierfür wurde ein Transfektionsansatz mit 2 ml RPMI-1640 Medium + 1 % Penicillin/Streptomycin, 12 µg der gewünschten DNA und 36 µl Polyethylenimin vorbereitet. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation des Ansatzes. Währenddessen wurde ein Mediumwechsel der Zellen mit RPMI-1640 Medium + 1 % Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Abschließend fügte man den Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen hinzu und inkubierte die Zellen über Nacht im CO₂-Inkubator. Am Tag nach der PEI-Transfektion wurde ein Mediumwechsel der Zellen mit RPMI-1640 Medium + 2 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Es erfolgte eine 7-tägige Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Nach 7 Tagen wurde der Überstand der Zellkulturschalen abgenommen, in 50 ml Falcons überführt, für 10 Minuten bei 4600 rpm abzentrifugiert und erneut in neue 50 ml Falcons überführt.

3.2.3 Kryokonservierung

Zur Gefrierkonservierung der Zellen wurden diese mit 1 x Trypsin/EDTA durch eine 10-minütige Inkubation abgelöst und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von RPMI-1640 Medium + 10 % hitzeinaktiviertem FCS abgestoppt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 4 Minuten bei 1200 rpm. Nach dem Absaugen des Überstandes, wurde das Zellpellet in Gefrierlösung, bestehend aus 90 % hitzeinaktiviertem FCS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der produzierten Proteine, welche einen FLAG-Tag enthalten, erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Anti-FLAG® M2 Affinity Gel in einer Chromatografiesäule. Hierfür wurden die im Affinitätsgel enthaltenen M2-Agarose-Beads mit 1 x TBS in die Chromatografiesäule überführt, einmalig mit 0,1 M Glycin und anschließend zweimal mit 1 x TBS gewaschen. Die aufzureinigenden Proteinüberstände wurden mit 0,15 M NaCl ergänzt und anschließend auf die Chromatografiesäule gegeben. Es wurde eine Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/12 - 15 Sekunden eingestellt und die Säule über Nacht bei 4°C beladen. Nach dem Durchlauf erfolgte eine Waschung mit 1 x TBS. Um die gebundenen Proteine von den M2-Agarose-Beads zu lösen, wurde eine Elution mit einer Flagpeptid-Lösung durchgeführt. Die Flagpeptid-Lösung, welche aus 6 ml 1 x TBS, 38,4 µl Flagpeptid, 6 µl Penicillin/Streptomycin und 15 µl Natriumazid besteht, wurde auf die Chromatografiesäule gegeben und das gereinigte Protein in 700 µl Fraktionen in 2 ml Reaktionsgefäßen eluiert. Nach erfolgter Elution wurden die M2-Agarose-Beads mit 1 x TBS gewaschen, in ein 15 ml Falcon überführt und mit 1:1 Glycerol-TBS-Lösung bei -20°C zur weiteren Verwendung konserviert. Die im TBS eluierten Proteine wurden gegen 1 x PBS mithilfe eines Dialysierschlauches über Nacht bei 4°C unter konstanter Rührbewegung dialysiert. Am Folgetag erfolgte eine Sterilfiltration der dialysierten, aufgereinigten Proteine. Abschließend wurde ein Westernblot zum quantitativen und eine Silbergefärbung zum qualitativen Nachweis durchgeführt.

3.4 Westernblot

3.4.1 SDS-PAGE

Um die Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine nachzuweisen und die jeweiligen Mengen zu bestimmen, wurde ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammel- und Trenngel, verwendet. Zunächst wurde das 12 % Trenngel, bestehend aus 4,4 ml Acrylamid, 2,75 ml Trenngelpuffer, 7,8 ml H₂O, 187 µl APS und 30,8 µl TEMED, gegossen und mit Isopropanol beschichtet, um Luftblasen zu entfernen und eine glatte Gelkante zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation und Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel, bestehend aus 1,4 ml Acrylamid, 1,75 ml Sammelgelpuffer, 3,8 ml H₂O, 84 µl APS, 7 µl TEMED und 25 µl Bromphenolblau (5 %), gegossen und im flüssigen Zustand mit einem Taschenkamm ergänzt. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Taschenkamm entfernt und die Geltaschen mit den zuvor denaturierten Proteinproben (5 Minuten bei 95°C) beladen. Zusätzlich wurden Molekulargewichtsstandards (*Prestained Protein Standard, Broad Range* (11 - 190 kDa)) und ein FLAG-Proteinstandard mit definierter Konzentration, mit welchem später die Proteinmengen bestimmt wurden, aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer für 100 Minuten bei 120 mV.

3.4.2 Proteintransfer

Der Übertrag der zuvor elektrophoretisch im SDS-Page Gel aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran. Hierfür wurde das Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel passgenau mit der Amersham™Protran™0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membran bedeckt und anschließend beidseitig mit doppellagigem, im Blot-Puffer getränktem Whatman-Blotting-Papier ergänzt. Die Nitrocellulosemembran wurde in der Wet-

Blotkammer anodenseitig ausgerichtet und der darauffolgende Proteintransfer erfolgte für 150 Minuten bei 90 V und 400 mA.

3.4.3 Immundetektion

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran für 60 Minuten in 5%iger PBS-TWEEN-Milch bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler geschwenkt. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung der Nitrocellulosemembran für 5 Minuten in PBS-TWEEN und die Inkubation mit dem Primärantikörper ANTI-FLAG® M2 über Nacht bei 4°C auf dem Wippschüttler. Am Folgetag wurde die Nitrocellulosemembran erneut dreimal für 5 Minuten in PBS-TWEEN gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG hinzugefügt. Es erfolgte eine 60-minütige Inkubation. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in PBS-TWEEN gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des LI-COR Odyssey Infrared Imaging Systems.

3.5 Silberfärbung

Mit Hilfe des Pierce™ Silver Stain Kits wurden die aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine quantitativ und qualitativ überprüft. Hierfür wurde eine SDS-Page durchgeführt, mit dem Unterschied, dass Bromphenolblau (5 %) für die Herstellung des Sammelgels nicht verwendet wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte die Silberfärbung nach Angaben des Herstellers.

3.6 *Gaussia princeps* Luziferase Assays

3.6.1 Gleichgewichtsbindungsstudien

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) der jeweiligen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine wurden Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. In den Bindungsstudien wurden für die Antikörper-Fusionsproteine Zellen verwendet, die das gewünschte Antigen exprimieren sowie Zellen, die über keine spezifischen Bindungsstellen verfügten. Hierfür wurden HT1080, HT1080-CD40 und transfizierte HEK293 Zellen verwendet. Zunächst wurden 200.000 Zellen der HT1080 und HT1080-CD40 Zellen in 24 Well-Platten ausgesät. Die HEK293 Zellen wurden mittels PEI-Transfektion mit den gewünschten DNA-Vektoren transfiziert und am Folgetag erfolgte eine Überführung von 500.000 Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem zu testenden Antikörper-Fusionsprotein in absteigender Konzentration ergänzt. Es folgte eine Inkubation für 90 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂. Im Anschluss an die Inkubation fand im Falle der HT1080, HT1080-CD40 Zellen eine zehnmalige und im Falle der transfizierten HEK293 Zellen eine zweimalige Waschung mit eiskaltem 1 x PBS statt. Darauffolgend wurden 50 µl RPMI-1640 Medium + 0,5 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin je Well beziehungsweise je 2 ml Reaktionsgefäß hinzugegeben, die HT1080, HT1080-CD40 Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst beziehungsweise die transfizierten HEK293 Zellen resuspendiert und in eine schwarze 96 Well Microplatte überführt. Den überführten Zellen wurde das Enzymsubstrat aus dem BioLux® *Gaussia* Luciferase Assay Kit in einer 1:100 Verdünnung zugeführt und anschließend die enzymatische Aktivität mittels Lumineszenz im LUmo Luminometer gemessen. Zusätzlich wurde zur Validierung der Messung bei 50 µl RPMI-1640 Medium + 0,5 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin ein GpL-Antikörper-Standard hinzugefügt. Um die spezifische Bindung zu ermitteln, wurde von der totalen Bindung die unspezifische Bindung subtrahiert. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0 wurden die Dissoziationskonstante K_D , die

maximale Bindung B_{\max} und der Determinationskoeffizient R^2 berechnet. Es wurden in dieser Arbeit Bindungsstudien berücksichtigt, welche einen Determinationskoeffizient R^2 von $\geq 0,90$ aufwiesen.

3.7 IL-8 ELISA

Für die IL-8 Stimulation wurden je 2×10^4 /Zellen/Well HT1080-CD40 beziehungsweise HT1080-4-1BB Zellen in einer 96 Well Microplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 in RPMI-1640 Medium + 10 % FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurden die aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB in einer Verdünnungsreihe mit absteigender Konzentration angesetzt. Zusätzlich wurde je ein Ansatz der Antikörper-Fusionsproteine mit 40.000 Kontrollzellen oder PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen ergänzt. Es folgte eine Vorinkubation für 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 . Anschließend wurde das Medium der HT1080-CD40 und HT1080-4-1BB Zellen abgesaugt und je 100 μl der entsprechenden Antikörper-Fusionsprotein-Zell Ansätze hinzugefügt. Es folgte eine Stimulation der HT1080-CD40 und HT1080-4-1BB Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 . Am Folgetag wurde die Bestimmung der IL-8 Konzentration im Überstand mit Hilfe des OptEIA IL8-ELISA Kits durchgeführt und abschließend im ELISA-Reader Lucy 2 gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung der parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG1 und anti-PD-L1-IgG2

4.1.1 Klonierung der Expressionsplasmide für die parentalen Antikörper

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollte die Produzierbarkeit der rekombinant hergestellten humanen IgG1 und IgG2 Subtypen des monoklonalen Immun-Checkpoint-Inhibitors Avelumab, welcher spezifisch an PD-L1 bindet, und die Überprüfung der Funktionalität der PD-L1-Domäne gezeigt werden. Die parentalen Antikörper sollten weiterhin zum Vergleich mit den Antikörper-Fusionsproteine genutzt werden. Zunächst wurden die schweren und leichten Ketten für die Subtypen des parentalen IgG1 und IgG2 Antikörpers hergestellt. Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten wurden mit einer Leader-Sequenz und einem FLAG-Tag hergestellt. Zusätzlich wurde eine Variante der leichten Kette kloniert, welche C-terminal mit der *Gaussia princeps* Luziferase fusioniert ist. Tabelle 3 stellt eine Übersicht über die verwendeten Vektoren, Inserts und Restriktionsenzyme dar.

4 Ergebnisse

Tabelle 3: Übersicht der Vektoren, Inserts und Restriktionsenzyme zur Herstellung der aufgeführten Expressionsplasmide

Expressionsplasmid	Vektor	Enzyme für Vektorverdau	Insert	Enzyme für Insertverdau
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hlgG1)	18D1-Flag-HC-pCR3	EcoR1 BamH1 CIP	anti-PD-L1-(Avelumab)-pMA-RQ	EcoR1 Bgl2
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hlgG2)	18D1-Flag-HC-pCR3 (hlgG2)	EcoR1 BamH1 CIP	anti-PD-L1-(Avelumab)-pMA-RQ	EcoR1 Bgl2
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC-pCR3	18D1-Flag-LC-pCR3	EcoR1 BamH1 CIP	anti-PD-L1-(Avelumab)-pMA-T	Mfe1 BamH1
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC:GpL-pCR3	18D1-Flag-LC:GpL-pCR3	EcoR1 BamH1 CIP	anti-PD-L1-(Avelumab)-pMA-T	Mfe1 BamH1

Abbildung 5 zeigt schematisch den Aufbau der verwendeten pCR3 Expressionsvektoren und den Ablauf der Klonierung bis zur DNA Extraktion. Eine detaillierte Beschreibung der Klonierung ist dem Methoden-Teil zu entnehmen.

4 Ergebnisse

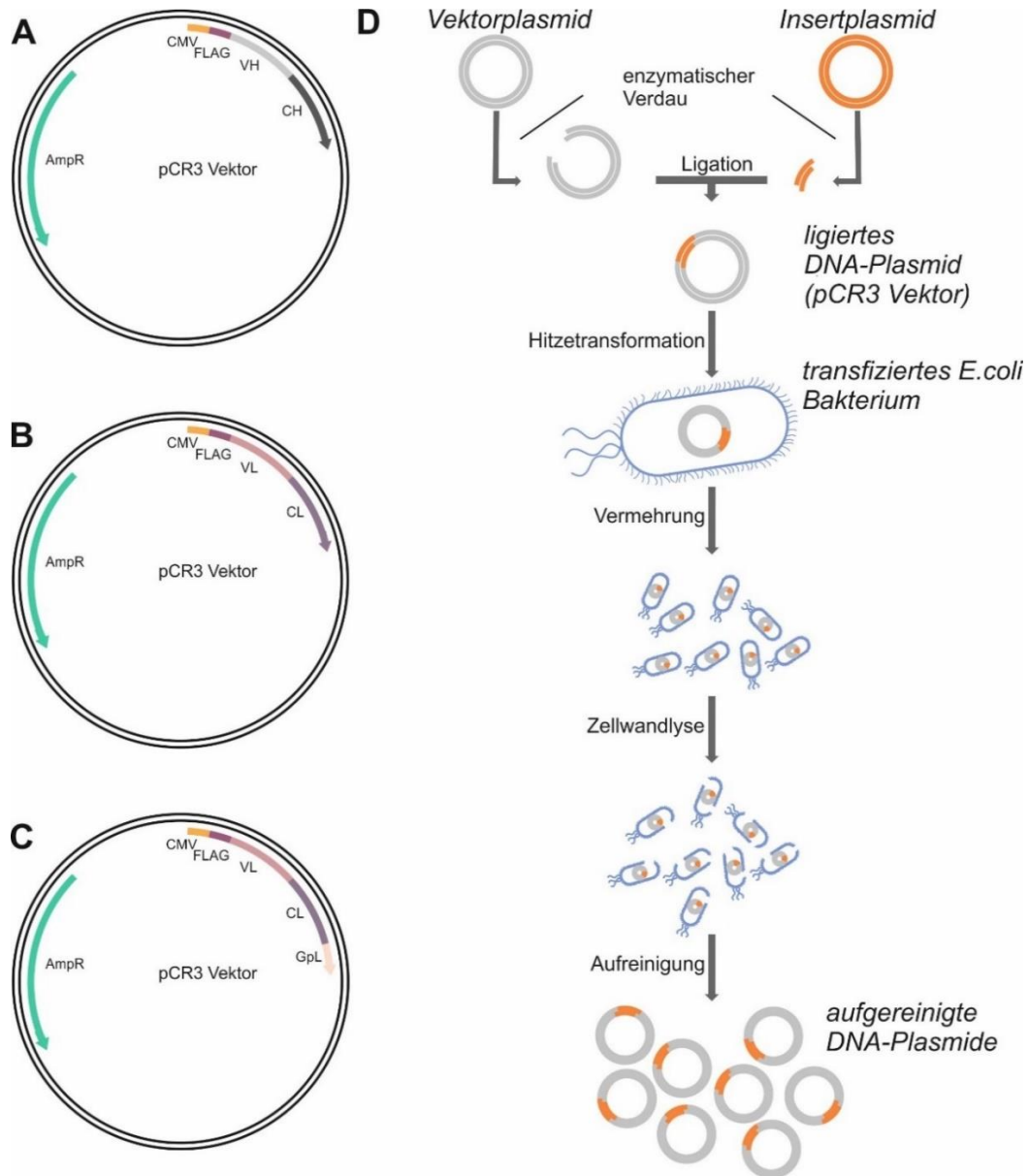


Abbildung 5: Übersicht über die verwendeten pCR3-Expressionsvektoren und die Schritte der Klonierung

A: Expressionsvektor der schweren Kette HC (*heavy chain*) mit einer V_H (*variable heavy*) und C_H (*constant heavy*) -Sequenz. Es wurde je ein Vektor für IgG1 und IgG2 hergestellt

B: Expressionsvektor der leichten Kette LC (*light chain*) mit einer V_L (*variable light*) und C_L (*constant light*) -Sequenz

C: Expressionsvektor der leichten Kette, welcher zusätzlich am 3'-Ende mit der *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) kloniert wurde

Alle Expressionsvektoren (**A–C**) enthielten am 5'-Ende eine FLAG-Tag kodierende Sequenz (DYKDDDDK), eine Antibiotikaresistenz (AmpR) und eine CMV-Promotorregion

D zeigt schematisch den Ablauf der durchgeführten Klonierung. Durch Verdau und anschließende Ligation der in **Tabelle 3** aufgeführten Vektoren und Inserts, wurden die dargestellten Expressionsvektoren **A–C** hergestellt und anschließend über Hitzetransformation in die Bakterien eingeschleust, vermehrt und aufgereinigt.

4.1.2 Produktion der parentalen Antikörper

Nach erfolgreich abgeschlossener Klonierung der in Tabelle 3 aufgeführten Expressionsplasmide, wurden diese mittels PEI in folgenden Kombinationen in HEK293 Zellen transfiziert:

1. anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hIgG1) +
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC-pCR3
2. anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hIgG1) +
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC:GpL-pCR3
3. anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hIgG2) +
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC-pCR3
4. anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hIgG2) +
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC:GpL-pCR3

Nach 7 Tagen wurden die Überstände mit den darin enthaltenen Antikörper-Fusionsproteinen abgenommen und über eine SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die Detektion mit Hilfe des FLAG spezifischen Antikörpers M2 durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise konnte einerseits das erwartete Molekulargewicht der schweren und leichten Ketten kontrolliert werden, andererseits konnte die Konzentration der einzelnen Antikörper durch Vergleich mit einem FLAG-Protein definierter Konzentration bestimmt werden. Tabelle 4 zeigt die Produktionseffizienz für die verschiedenen Antikörper. Die Produktionskonzentration ließ sich bei anti-PD-L1-IgG1 mit einem Mittelwert (MW) von 23 µg/ml ermitteln. Darauf folgend lag der MW für anti-PD-L1-IgG2 bei 13 µg/ml, gefolgt von anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL mit MW = 12 µg/ml und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL mit MW = 10 µg/ml. Alle Produktionseffizienzen stellen einen sehr guten Wert dar, um die Antikörper in weiteren Schritten charakterisieren zu können.

Tabelle 4: Darstellung der Produktivität der hergestellten parentalen AntikörperMW: Mittelwert der Produktivität ($\mu\text{g/ml}$)

Antikörper	Produktivität ($\mu\text{g/ml}$)							MW
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7	
anti-PD-L1-IgG1	35	19	18	21	21	22		23
anti-PD-L1-IgG2	20	22	12	9	9	8		13
anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL	8	9	14	12	13	13	13	12
anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL	8	10	10	12				10

Abbildung 6A zeigt den schematischen Aufbau der parentalen Antikörper sowie der entsprechenden mit GpL fusionierten Varianten. An der schweren Kette und der leichten Kette sowohl für IgG1 als auch IgG2 befindet sich N-terminal ein FLAG-Tag. Die *Gaussia princeps* Luziferase befindet sich C-terminal an der leichten Kette der parentalen Antikörper. Abbildung 6B zeigt die WB-Analyse der produzierten Antikörper. Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten migrierten mit den erwarteten Molekulargewichten (schwere Kette (HC) 54 kDa, GpL fusionierte leichte Kette (LC:GpL) 47 kDa, leichte Kette (LC) 28 kDa). Somit ergibt sich ein molekulares Gesamtgewicht für anti-PD-L1-IgG1 und anti-PD-L1-IgG2 von ca. 164 kDa und für anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL von ca. 202 kDa.

4 Ergebnisse

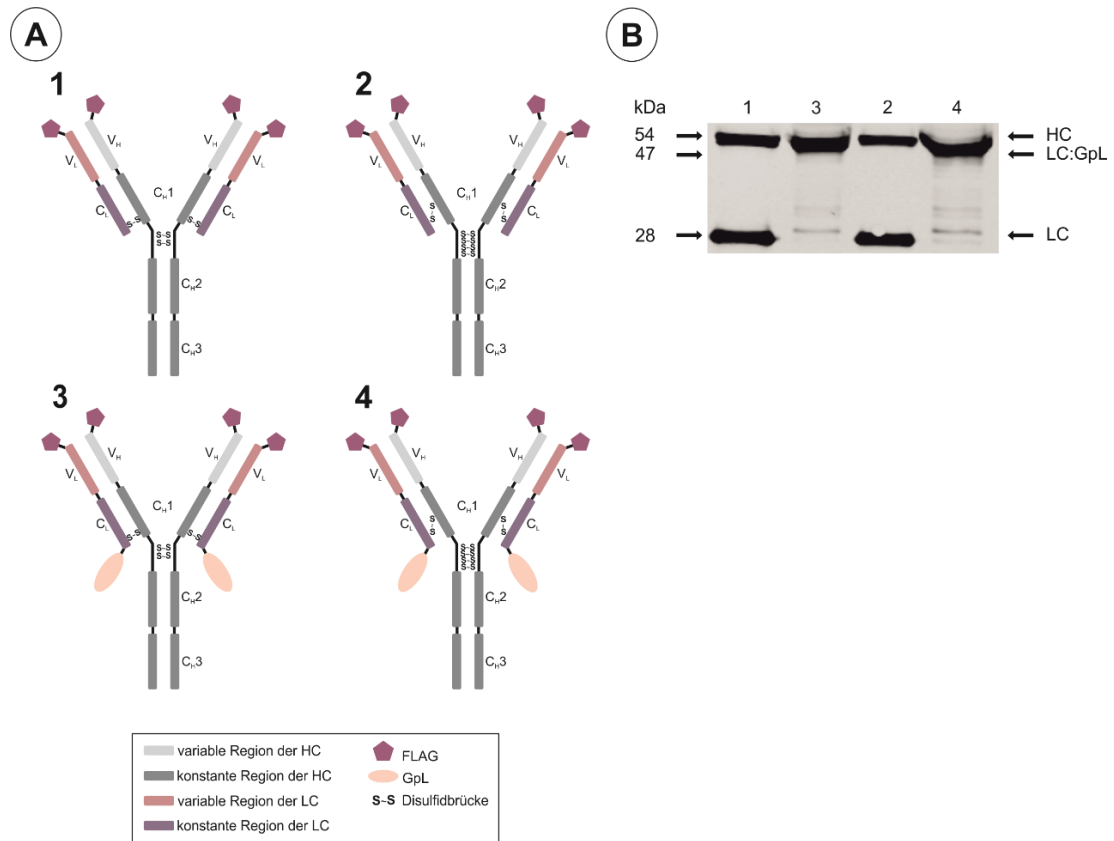


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der produzierten parentalen Antikörper und Darstellung im Westernblot

(A) Struktur der AKs

(B) Es wurden 50 ng des jeweiligen Proteins auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine konnten nach Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe des ANTI-FLAG M2-Antikörpers über den FLAG-Tag detektiert werden.

1: anti-PD-L1-IgG1

2: anti-PD-L1-IgG2

3: anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL

4: anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL

4.1.3 Gleichgewichtsbindungsstudien zur Bestimmung der Affinität des parentalen anti-PD-L1 Antikörpers

Zur Bestimmung der Affinität des anti-PD-L1 Antikörpers wurden Gleichgewichtsbindungsstudien mit anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL an embryonalen Nierenzellen HEK293 durchgeführt, die mit PD-L1 transfiziert wurden. Die Bindung der Antikörper an ihr zellassoziertes Antigen (PD-L1 Transfektanten) als auch die unspezifische Bindung (Leervektor und PD-L1 Transfektanten) konnte über die Lumineszenzreaktion, welche die enzymatische Umsetzung des Substrats Coelenterazin durch die *Gaussia princeps* Luziferase erfasst, ermittelt werden. Vor Durchführung der Bindungsstudien erfolgte zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung über das Westernblot-Verfahren, eine Konzentrationsangleichung der GpL-Varianten der parentalen Antikörper mit Hilfe eines GpL-Standards. Einerseits wurden die Zellen mit einem Leervektor EV (pAD-CMV1) transfiziert. Die Bindung zu diesen HEK293 Transfektanten gab Auskunft über die unspezifische Bindung der parentalen Antikörper. Andererseits wurden HEK293 Zellen mit dem Expressionsvektor PD-L1 (PD-L1/CD274 (hu)-pCMV6-XL4 (Origene)) mittels PEI transfiziert. Die mit diesen Zellen erhaltene totale Bindung umfasst neben der unspezifischen Bindung auch die Bindung, die spezifisch an PD-L1 erfolgte. Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der totalen Bindung wurde die spezifische Bindung für anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL ermittelt. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0 wurden die Dissoziationskonstanten K_D , die maximale Bindungen B_{max} und die Determinationskoeffizienten R^2 für anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL beziehungsweise anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL berechnet.

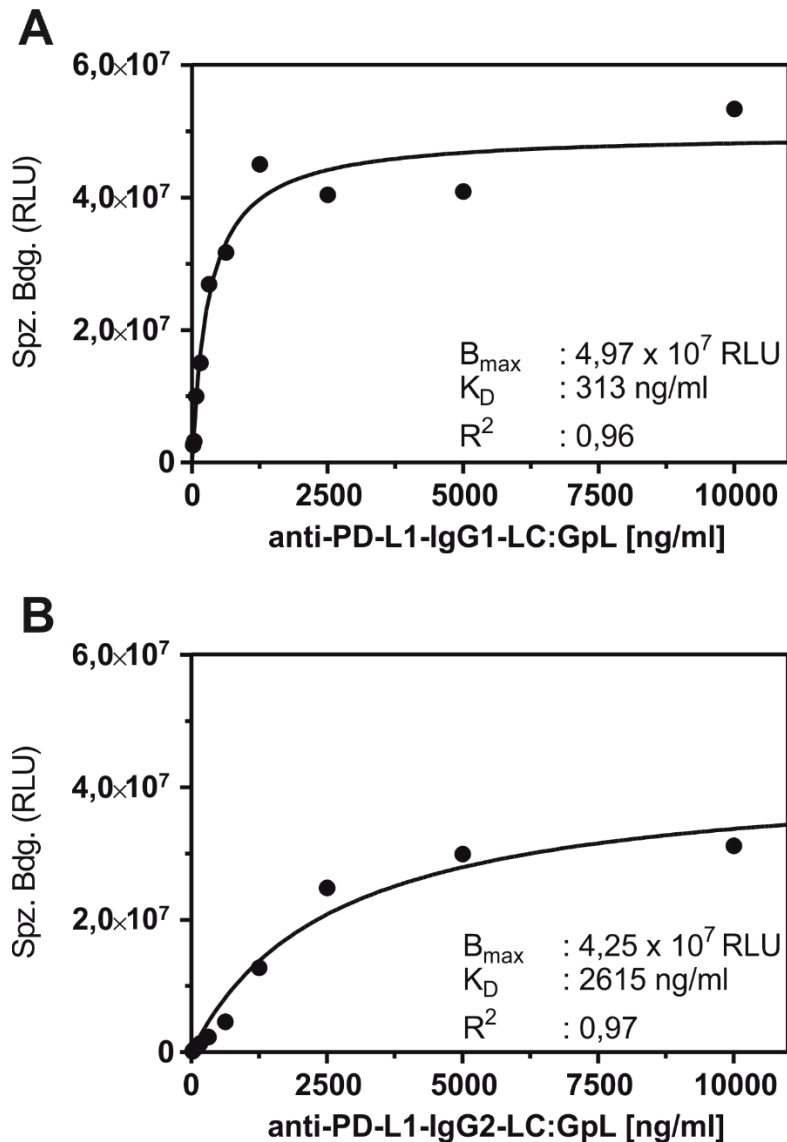


Abbildung 7: Gleichgewichtsbindungsstudien mit den Antikörpern anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL

(A,B) Zur Bestimmung der Affinität der anti-PD-L1 Antikörper wurden Gleichgewichtsbindungsstudien an HEK293 Transfektanten mit den GpL-Varianten der Antikörper durchgeführt. Leervektor transfizierte HEK293 Zellen ergaben die unspezifische Bindung, PD-L1 positive HEK293 Transfektanten die totale Bindung. Die spezifische Bindung der Antikörper ergab sich aus der Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung. Die Kurvenverläufe in **Abbildung A (anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL)** und **B (anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL)** zeigen die spezifischen Bindungen (**Spz.Bdg.**) der IgG1 und IgG2 Variante des anti-PD-L1 AKs. Es wurden 7 unabhängige Wiederholungen durchgeführt.

B_{\max} : maximale Bindung
 K_D : Dissoziationskonstante
 R^2 : Determinationskonstante
RLU: *relative light units*

4 Ergebnisse

Wie Tabelle 5 zu entnehmen ist, wurden 7 Wiederholungen je parentalem Antikörper durchgeführt. anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL zeigte mit einem durchschnittlichen K_D -Wert von 363 ng/ml einen eindeutig niedrigeren Wert als anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL. Dessen durchschnittlicher K_D -Wert lag um den 7,5-fachen Faktor bei 2722 ng/ml und zeigte somit eine niedrigere Affinität gegenüber dem PD-L1 auf.

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte für anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL an PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen

Parentaler Antikörper	Anzahl der Experimente	K_D -Werte (ng/ml)	B_{max} -Werte (RLU)	R^2 -Werte
anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL	7	164	$2,38 \times 10^7$	0,92
		367	$3,72 \times 10^7$	0,90
		313	$4,97 \times 10^7$	0,96
		586	$1,40 \times 10^7$	0,99
		444	$4,68 \times 10^7$	0,98
		352	$4,48 \times 10^7$	0,99
		312	$5,71 \times 10^7$	0,99
		\emptyset (ng/ml)	\emptyset (RLU)	\emptyset
		363	$3,91 \times 10^7$	0,96
		Standardabweichung		
	130	$1,53 \times 10^7$	0,04	
Parentaler Antikörper	Anzahl der Experimente	K_D -Werte (ng/ml)	B_{max} -Werte (RLU)	R^2 -Werte
anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL	7	2363	$2,35 \times 10^7$	0,93
		3049	$3,75 \times 10^7$	0,98
		2615	$4,25 \times 10^7$	0,97
		2198	$2,43 \times 10^7$	0,99
		2886	$4,46 \times 10^7$	0,97
		2615	$8,26 \times 10^6$	0,99
		3326	$3,13 \times 10^7$	0,99
		\emptyset (ng/ml)	\emptyset (RLU)	\emptyset
		2722	$3,03 \times 10^7$	0,97
		Standardabweichung		
	393	$1,27 \times 10^7$	0,02	

4.2 Herstellung der Antikörper-Fusionsproteine

Wie in der Gleichgewichtsbindungsstudie gefunden wurde, zeigte anti-PD-L1-IgG1 im Vergleich zu anti-PD-L1-IgG2 unerwarteter Weise eine höhere Affinität für PD-L1 transfizierte HEK293 Zellen. Logische Konsequenz wäre gewesen, Antikörper-Fusionsproteine auf Basis der IgG1-Subklasse herzustellen. Jedoch wurde bewusst eine Weiterarbeit mit IgG2 bevorzugt, da IgG2 eine niedrigere Affinität gegenüber Fc γ -Rezeptoren aufweist als IgG1 (Bruhns et al., 2009; Canfield & Morrison, 1991). Durch diesen Schritt wurde eine Erhöhung der Selektivität des Antikörper-Fusionsproteins, eine Fc γ -Rezeptor-Unabhängigkeit und die Reduzierung möglicher auftretender Nebenwirkungen während einer Antikörpertherapie, bedingt durch Fc γ -Rezeptor-Aktivierung, beabsichtigt.

4.2.1 Klonierung des Expressionsplasmides für das Antikörper-Fusionsprotein

Die Klonierung des Expressionsplasmides anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-CD40-pCR3 (hIgG2), welches die schwere Kette des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 kodiert, erfolgte wie in Abbildung 5D grafisch dargestellt. Das Expressionsplasmid kodiert neben der eigentlichen schweren Kette für anti-PD-L1 auch eine Leader-Sequenz und FLAG-Tag sowie ein *single-chain variable fragment* von anti-CD40 (G28-5), das am C-Terminus platziert ist (Abbildung 8) (Clark & Ledbetter, 1986).

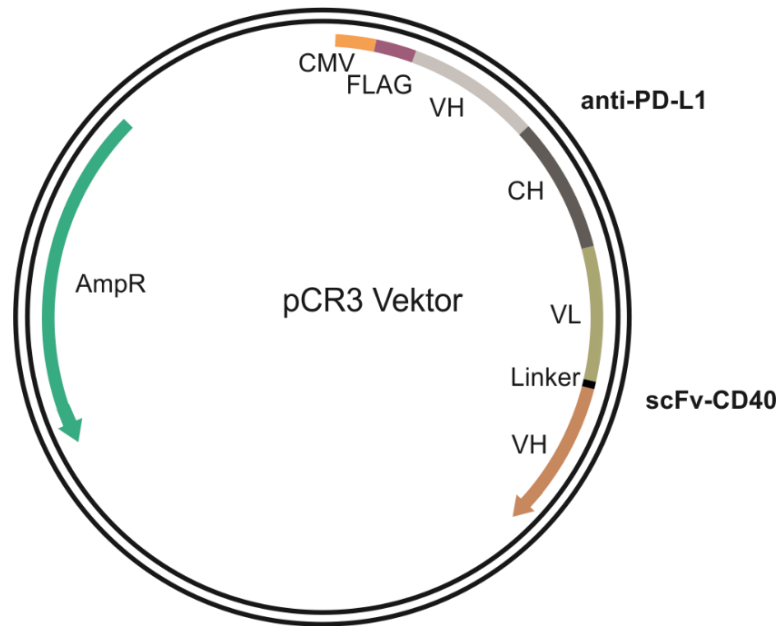


Abbildung 8: Expressionsvektor der schweren Kette für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40

Die anti-PD-L1 codierende Domäne setzt sich aus der V_H (*variable heavy*) und C_H (*constant heavy*) -Sequenz zusammen. Am 3'-Ende befindet sich der codierende Abschnitt für das *single-chain variable fragment* (**scFv**) des anti-CD40 (G28-5)-Antikörpers, welches sich aus einer variablen Domäne der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H) sowie einer **Linkerdomäne** zusammensetzt. Am 5'-Ende des Expressionsvektors wurde ein **FLAG-Tag** (DYKDDDDK) und eine **CMV-Promotorregion** fusioniert. Über den FLAG-Tag wurde die Detektion und Aufreinigung ermöglicht. Des Weiteren verfügt das Expressionsplasmid über eine Antibiotikaresistenz (**AmpR**).

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über den verwendeten Vektor, das DNA-Template, die Primer der durchgeführten PCR und die Restriktionsenzyme.

Tabelle 6: Übersicht über Vektor, DNA-Template, Primer, und Restriktionsenzyme zur Herstellung des Expressionsplasmides anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-CD40-pCR3 (hlgG2)

Expressionsplasmid	Vektor	Enzyme für Vektorverdau	DNA-Template	Primer	Enzyme für Insertverdau (PCR-Produkt)
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-CD40-pCR3 (hlgG2)	anti-Fas(E09)-Flag-HC:scFV-anti-CD40(h)-pCR3 (FAB2(1-114))	Hind3 Xho1 CIP	anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hlgG2)	T7 IgG2h-Sal1-rwd	Hind3 Sal1

4.2.2 Produktion des Antikörper-Fusionsproteins

Nach Klonierung des Expressionsplasmides, wurde dieses in Kombination mit den bereits für den parentalen Antikörper klonierten Expressionsplasmiden der leichten Kette mittels PEI in folgenden Kombinationen in HEK293 Zellen transfiziert:

1. anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-anti-CD40-pCR3 (hIgG2) +
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC-pCR3
2. anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-anti-CD40-pCR3 (hIgG2) +
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC:GpL-pCR3

Die Proteinüberstände wurden dann wiederum nach 7 Tagen abgenommen und mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und anschließend mit dem FLAG spezifischen murinen Antikörper anti-FLAG(M2) detektiert. Somit konnte wiederum das erwartete Molekulargewicht für die schweren sowie leichten Ketten überprüft und die Konzentrationen mit Hilfe eines definierten Standards bestimmt werden. Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau der Antikörper-Fusionsproteine und deren Analyse im anti-FLAG Westernblot.

4 Ergebnisse

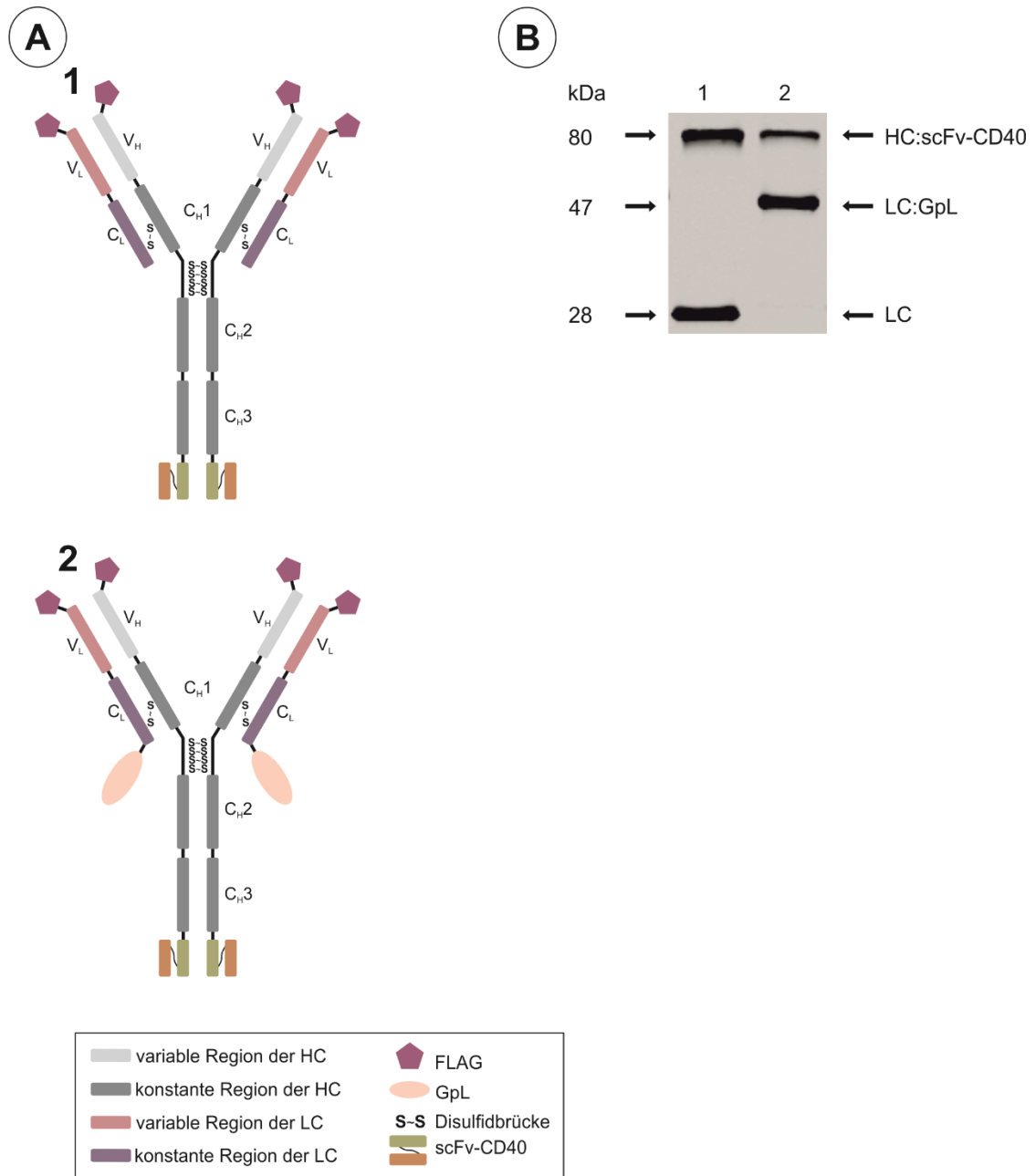


Abbildung 9: Aufbau und WB-Analyse der anti-PD-L1-scFv-CD40 Fusionsproteine

(A) Schematischer Aufbau der Antikörper-Fusionsproteine

1: anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40

2: anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL

(B) anti-FLAG WB-Analyse der Antikörper-Fusionsproteine

4 Ergebnisse

Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten stimmten mit dem erwarteten Molekulargewicht überein. Für die schweren Ketten wurde eine Bandenhöhe bei 80 kDa erwartet, für die mit GpL fusionierte leichte Kette bei 47 kDa und für die leichte Kette bei 28 kDa. Das Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 wurde in sechs unabhängigen Chargen produziert. Für die einzelnen Chargen ergab sich eine Produktivität von 8 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml sowie 21 µg/ml und somit ein Mittelwert von 10 µg/ml. anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL wurde hingegen nur einmalig produziert und erzielte dabei eine Produktivität von 13 µg/ml. Somit ist eine vergleichbare Produktivität zwischen dem Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 und den parentalen Antikörpern anti-PD-L1-IgG1 und anti-PD-L1-IgG2 zu verzeichnen.

4.3 Charakterisierung des Antikörper-Fusionsproteins

4.3.1 Gleichgewichtsbindungsstudien zur Bestimmung der Affinität der funktionellen Domänen des Antikörper-Fusionsproteins

Zur Affinitätsbestimmung der Verankerungsdomäne anti-PD-L1 und der Effektor-domäne scFv-CD40 des Antikörper-Fusionsproteins sollten wiederum Gleichgewichtsbindungsstudien mit der entsprechenden GpL-Variante durchgeführt werden. Wie in bereits durchgeführten Gleichgewichtsbindungsstudien wurde die spezifische Bindung für die funktionellen Domänen über eine Subtraktion der unspezifischen Bindung von der totalen Bindung ermittelt. Ebenfalls wurde eine Konzentrationsangleichung des Antikörper-Fusionsproteins vor Durchführung der Bindungsstudien an einem definierten GpL-Standard vorgenommen. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0 wurden die Dissoziationskonstanten K_D , die maximalen Bindungen B_{max} und die Determinationskoeffizienten R^2 für die durchgeführten Gleichgewichtsbindungsstudien berechnet.

4.3.1.1 Gleichgewichtsbindungsstudien zur Bestimmung der Affinität der anti-PD-L1 Verankerungsdomäne des Antikörper-Fusionsproteins

Die HEK293 Zellen wurden wie in vorherigen Gleichgewichtsbindungsstudien mit einem Leervektor (EV; pAD-CMV1) und einem PD-L1-codierendem Expressionsvektor (PD-L1/CD274 (hu)-pCMV6-XL4 (Origene)) mittels PEI transfiziert. Durch Abzug der unspezifischen Bindung (EV) von der totalen Bindung (PD-L1) konnte die spezifische Bindung für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL an PD-L1 bestimmt werden. Es wurden vier Wiederholungen durchgeführt. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte sowie deren durchschnittlichen Werte und Standardabweichungen. Der

4 Ergebnisse

Kurvenverlauf der spezifischen Bindung von anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL ist Abbildung 10 zu entnehmen.

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen

Antikörper-Fusionsprotein	Anzahl der Experimente	K_D -Werte (ng/ml)	B_{max} -Werte (RLU)	R^2 -Werte
anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL	4	8450	$3,08 \times 10^7$	0,96
		4920	$3,03 \times 10^7$	0,95
		7570	$2,43 \times 10^7$	0,96
		7020	$3,48 \times 10^7$	0,98
		\emptyset (ng/ml)	\emptyset (RLU)	\emptyset
		6990	$3,01 \times 10^7$	0,97
		Standardabweichung		
1500	$0,43 \times 10^7$	0,01		

Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL ließ sich ein durchschnittlicher K_D -Wert von 6990 ng/ml ermitteln. Wird das Antikörper-Fusionsprotein mit dem parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL verglichen, welcher einen durchschnittlichen K_D -Wert von 2722 ng/ml aufweist, ließ sich eine um den Faktor 2,6 niedrigere Affinität gegenüber PD-L1 feststellen.

4 Ergebnisse

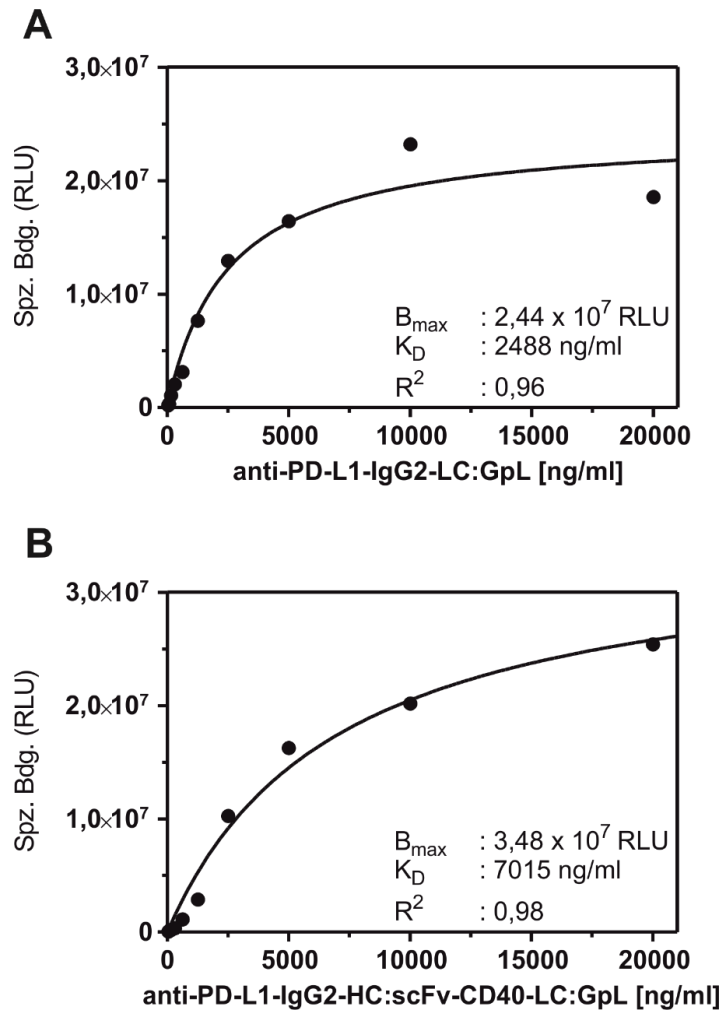


Abbildung 10: Gleichgewichtsbindungsstudien des parentalen Antikörpers anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen

Zur Bestimmung der Affinität der anti-PD-L1 Verankerungsdomäne des Antikörper-Fusionsproteins wurden Gleichgewichtsbindungsstudien an HEK293 Transfektanten mit der GpL-Variante durchgeführt. Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung, welche über die Bindung an mit einem Leervektor (EV) transfizierten HEK293 Zellen angezeigt wurde, von der totalen Bindung an PD-L1 positiven HEK293 Transfektanten, konnte die spezifische Bindung des Antikörper-Fusionsproteins am zellassoziierten PD-L1 ermittelt werden. Um einen direkten Vergleich zwischen dem parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL und dem Antikörper-Fusionsprotein zu zeigen, wird in **Abbildung A** der Kurvenverlauf für die spezifische Bindung von **anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL** an PD-L1 positiven HEK293 Transfektanten gezeigt. **Abbildung B** bildet die spezifische Bindung von **anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL** an PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen ab. Letztere wurden in vier unabhängigen Wiederholungen überprüft.

B_{max} : maximale Bindung
 K_D : Dissoziationskonstante
 R^2 : Determinationskonstante
RLU: relative light units

4 Ergebnisse

4.3.1.2 Gleichgewichtsbindungsstudien zur Bestimmung der Affinität der scFv-CD40 Effektor-domäne des Antikörper-Fusionsproteins

In den folgenden Gleichgewichtsbindungsstudien sollte die Affinität der scFv-CD40 Domäne des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL für das Antigen CD40 untersucht werden. Für die Durchführung wurden die Fibrosarkomzellen HT1080 (exprimieren kein CD40) und HT1080-CD40 (exprimieren CD40) verwendet. Die Bindung an HT1080 Zellen (unspezifische Bindung) wurde von der Bindung an HT1080-CD40 Zellen (totale Bindung) subtrahiert und somit die spezifische Bindung für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL an CD40 ermittelt. Es wurden drei Wiederholungen durchgeführt. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die ermittelten einzelnen und durchschnittlichen Werte sowie Standardabweichungen. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL lag der durchschnittliche K_D -Wert bei 19497 ng/ml, der durchschnittliche B_{max} bei $4,83 \times 10^7$ und der Determinationskoeffizient R^2 gemittelt bei 0,99. Der Kurvenverlauf der spezifischen Bindung von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL an HT1080-CD40 Zellen ist Abbildung 11 zu entnehmen.

Tabelle 8: Übersicht der ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit HT1080-CD40 Zellen

Antikörper-Fusionsprotein	Anzahl Experimente	der K_D -Werte (ng/ml)	B_{max} -Werte (RLU)	R^2 -Werte
anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL	3	23220	$4,26 \times 10^7$	0,98
		15690	$3,64 \times 10^7$	0,99
		19580	$6,59 \times 10^7$	0,99
		$\bar{\varnothing}$ (ng/ml)	$\bar{\varnothing}$ (RLU)	$\bar{\varnothing}$
		19497	$4,83 \times 10^7$	0,99
		Standardabweichung		
		3766	$1,56 \times 10^7$	0,01

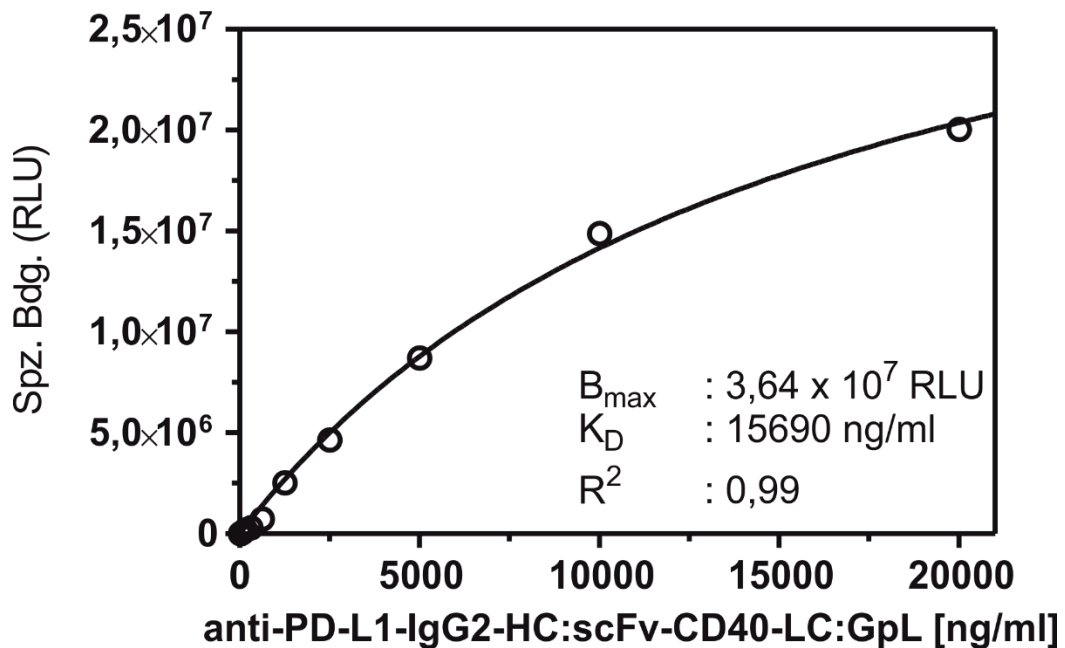


Abbildung 11: Gleichgewichtsbindungsstudie des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit HT1080-CD40 Zellen

Zur Bestimmung der Affinität der scFv-CD40 Effektor-domäne des Antikörper-Fusionsproteins **anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL** wurden Gleichgewichtsbindungsstudien mit HT1080 und HT1080-CD40 Zellen durchgeführt. Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung an HT1080 Zellen von der totalen Bindung an HT1080-CD40 Zellen konnte die spezifische Bindung (**Spz. Bdg.**) für die Effektor-domäne an dessen zellassoziiertem Antigen ermittelt werden. Die Abbildung zeigt den Kurvenverlauf der spezifischen Bindung (**Spz. Bdg.**) von **anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL** an CD40 von HT1080-CD40 Zellen. Die Bindungsstudie wurde dreimal wiederholt.

B_{\max} : maximale Bindung
 K_D : Dissoziationskonstante
 R^2 : Determinationskonstante
 RLU: *relative light units*

4.3.2 Aufreinigung

Da in den vorherigen Gleichgewichtsbindungsstudien die Bindung der Verankerungsdomäne anti-PD-L1 sowie der Effektor-domäne scFv-CD40 an die jeweiligen Antigene gezeigt werden konnte, wurden im nächsten Schritt die parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG1, anti-PD-L1-IgG2, anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL, anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL und das Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden die oben genannten Proteine in großen Mengen produziert und mit Hilfe ihres FLAG-Tags aufgereinigt. Anschließend wurde ein Aliquot zur Prüfung der Reinheit elektrophoretisch über ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abschließend erfolgte die Silberfärbung des Gels. Durch die Silbergefärbung ließ sich nicht nur die Qualität der Proteinaufreinigung anhand der Reinheit beurteilen, sondern auch die Proteinkonzentrationen mit Hilfe eines definierten Protein-Silbergelstandards bestimmen. Wie Abbildung 12 zu entnehmen ist, wurde die Aufreinigung qualitativ erfolgreich durchgeführt und es lag keine Degradation der Proteine vor. Mit dem aufgereinigten Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 wurden anschließend weitere Experimente zum Agonismus der scFv-CD40 Domäne durchgeführt.

4 Ergebnisse

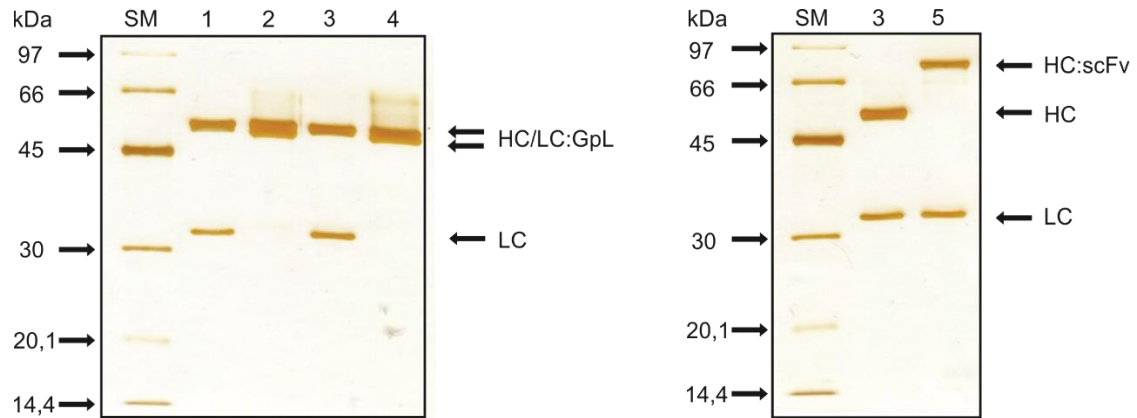


Abbildung 12: Silbergefärbung der aufgereinigten Proteine

Nach durchgeführter Aufreinigung, wurden die Antikörper-Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und abschließend eine Silbergefärbung durchgeführt. Es wurden 200 ng des jeweiligen Proteins aufgetragen. Anhand der Silbergefärbung ließ sich die Qualität und Quantität der Proteinaufreinigung beurteilen.

SM: Silbergelmarker

1: anti-PD-L1-IgG1

2: anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL

3: anti-PD-L1-IgG2

4: anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL

5: anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40

HC: schwere Kette

HC:scFv: schwere Kette mit fusioniertem *single chain variable fragment*-CD40

LC:GpL: leichte Kette mit fusionierter *Gaussia princeps* Luziferase

LC: leichte Kette

4.3.3 Überprüfung der agonistischen Aktivität des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 mittels PD-L1 vermittelter Immobilisation

Nach erfolgreich durchgeführter Aufreinigung sollte die Rezeptoraktivierung des TNFRSF Rezeptors CD40 durch anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 überprüft werden. Die erfolgreiche Stimulation des CD40 in HT1080-CD40 Zellen induziert über den klassischen NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*)-Signalweg eine starke IL-8 Produktion und Ausschüttung. Zur Überprüfung der agonistischen Aktivität der scFv-CD40 Domäne des Antikörper-Fusionsproteins wurde ein Ko-Kultur Assay durchgeführt, welcher anschließend anhand eines IL-8 ELISA ausgewertet wurde. Es wurden HEK293 Zellen mit dem Expressionsvektor für PD-L1 sowie dem Leervektor EV, welcher als Negativ-Kontrolle diente, transfiziert. Erwartet wurde eine Immobilisation des Antikörper-Fusionsproteins durch PD-L1 exprimierende HEK293 Zellen und daraus resultierend, eine Steigerung der agonistischen Aktivität der scFv-CD40 Domäne und somit eine verstärkte IL-8-Produktion der HT1080-CD40 Zellen. Im Gegensatz dazu, wurde mit einer deutlich niedrigeren Aktivität und IL-8-Produktion bei der Ko-Kultivierung mit den Kontrollzellen gerechnet. Die IL-8-Ko-Kultur Assays wurden in drei Wiederholungen unabhängig voneinander durchgeführt. Die Startkonzentration des Antikörper-Fusionsproteins betrug 5 μ g/ml, welche in zehn 1:3 Verdünnungsschritten reduziert wurde. Abbildung 13 zeigt exemplarisch einen der durchgeführten IL-8-Ko-Kultur Assays. Die IL-8 Konzentration kann als Maß für die CD40-Rezeptoraktivierung durch das Antikörper-Fusionsprotein angesehen werden.

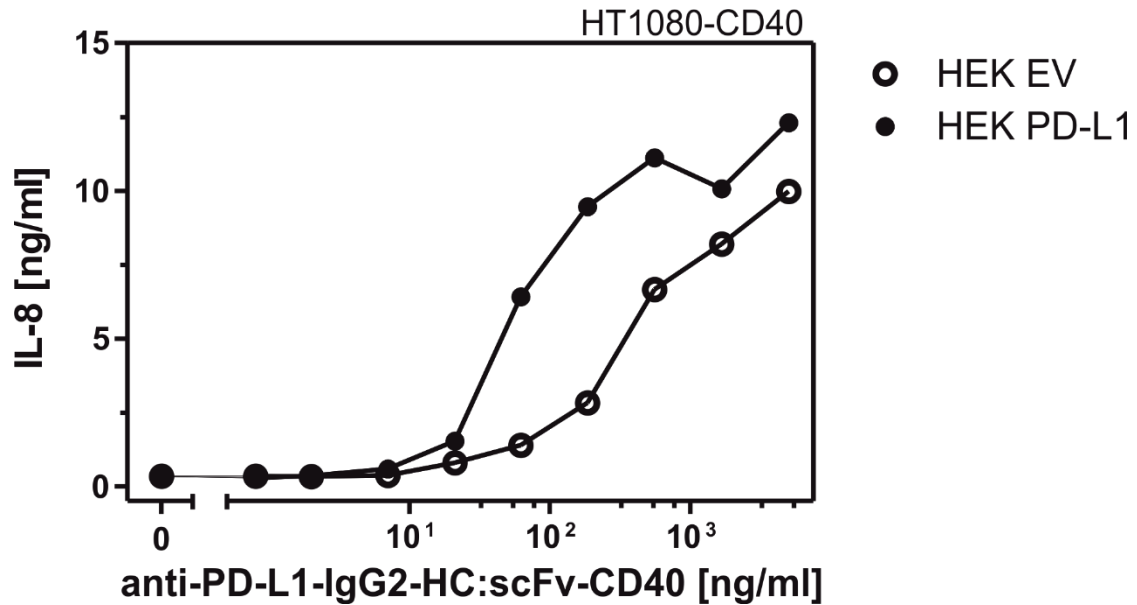


Abbildung 13: PD-L1-abhängiger CD40-Agonismus des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40

HT1080-CD40 Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Antikörper-Fusionsprotein und den Ko-Kultur Zellen mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Danach wurde der IL-8-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, wurde eine Aktivitätssteigerung des Antikörper-Fusionsproteins gemessen, welches über PD-L1 exprimierende HEK293 Zellen immobilisiert wurde. So war der EC-50 Wert in Anwesenheit der PD-L1 exprimierenden Zellen ca. 10-fach niedriger. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die ermittelten EC50-Werte. Der EC50-Wert beschreibt die effektive Konzentration, bei der die halbmaximale IL8-Konzentration erreicht ist. Der durchschnittliche EC50-Wert für das Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40, welches mit PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen kokultiviert wurde, lag bei 64 ng/ml. Bei der Kokultivierung mit Kontrollzellen (HEK EV) ergab sich ein durchschnittlicher EC50-Wert von 490 ng/ml.

4 Ergebnisse

Tabelle 9: EC-50 Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 im IL-8 ELISA Ko-Kultur Assay

Experiment	EC50 bei HEK PD-L1 (ng/ml)			EC50 bei HEK EV (ng/ml)		
	Einzelwerte	Ø	SD	Einzelwerte	Ø	SD
1	38	64	37	272	490	262
2	49			418		
3	106			781		

4.4 Analyse eines Checkpoint-inhibierenden 4-1BB Antikörper-Fusionsproteins

In den vorherig durchgeführten Ko-Kultur Assays konnte gezeigt werden, dass die Immobilisation über den PD-L1 bei dem Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 zu einer Aktivitätssteigerung des scFv-Fragmentes CD40 führt. Im weiteren Ablauf sollte das C-terminal fusionierte scFv-Fragment CD40 durch ein scFv-Fragment 4-1BB ersetzt werden. Es sollte untersucht werden, ob sich Gemeinsamkeiten in der Herstellung und in funktionellen Eigenschaften bei gleichem Antikörper-Fusionsprotein-Aufbau, mit einer N-terminal gelegenen anti-PD-L1 Verankerungsdomäne, jedoch C-terminal ersetzten Effektordomäne, feststellen lassen. Zunächst wurde die Klonierung des benötigten Expressionsplasmides für das Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB durchgeführt. Anschließend erfolgte die Produktion des Proteins in ausreichender Menge für die darauffolgende Aufreinigung. Im letzten Schritt der Arbeit wurde die agonistische Aktivität von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB mit Hilfe von HT1080-4-1BB Zellen und PD-L1 exprimierenden Verankerungszellen untersucht.

4.4.1 Klonierung des Expressionsplasmides für das Antikörper-Fusionsprotein

Die Klonierung wurde wie in Abbildung 5D durchgeführt. Zunächst musste ein Intermediat-Expressionsplasmid anti-CD40-FLAG-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (N297A) kloniert werden, um im nächsten Schritt das Expressionsplasmid anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-anti-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (hlgG2) herstellen zu können. Das Expressionsplasmid enthielt zusätzlich eine DNA-Sequenz, welche für einen Leader und FLAG-Tag codiert. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Vektoren, DNA-Templates, Primer der durchgeführten PCRs und Restriktionsenzyme.

4 Ergebnisse

Tabelle 10: Übersicht der Vektoren, DNA-Templates, Primer und Restriktionsenzyme zur Herstellung der aufgeführten Expressionsplasmide

Expressionsplasmid	Vektor	Enzyme für Vektorverdau	DNA-Template	Primer	Enzyme für Insertverdau (PCR-Produkt)
anti-CD40-Flag-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (N297A)	anti-CD40-Flag-HC:scTNF80(mu)-pCR3 (N297A)	EcoR1 BamH1 CIP	anti-4-11B-(HBBK4)-pMA-T	anti-CD27Lmu-EcoR1-fwd anti-CD20(mu)-Stop-Xba-rwd	EcoR1 Xba1
anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (hlgG2)	anti-CD40-FLAG-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (N297A)	Hind3 EcoR1 CIP	anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hlgG2)	T7 IgG2h-Sal1-rwd	Hind3 Sal1

4.4.2 Produktion und Aufreinigung des anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB Antikörper-Fusionsproteins

Die Vorgehensweise für die Produktion von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB war dieselbe wie für alle anderen in dieser Arbeit produzierten Proteine. Das benötigte Expressionsplasmid der leichten Kette, welches zur Produktion des Antikörper-Fusionsproteins benötigt wurde, ist identisch mit der des parentalen Antikörpers. Zur Produktion von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB wurden HEK293 Zellen mit den Plasmiden anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (hIgG2) und anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC-pCR3 kotransfiziert. Die Überstände wurden im Westernblot-Verfahren analysiert. Die Produktion von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB erfolgte in sechs voneinander unabhängigen Chargen. Folgende Produktionseffizienzen konnten bestimmt werden: 11 µg/ml, 12 µg/ml, 11 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml und 11 µg/ml. Der Mittelwert der Produktivität lag somit bei 10 µg/ml. Die Aufreinigung von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB erfolgte wiederum unter Ausnutzung des N-terminal fusionierten FLAG-Tags mittels anti-FLAG Affinitätschromatographie. Das aufgereinigte Protein wurde mittels SDS-Page aufgetrennt und durch Silberfärbung visualisiert.

4.4.3 Analyse der agonistischen Aktivität des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB

Zur Analyse der 4-1BB-Aktivierung durch anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB wurden erneut Ko-Kultur Assays mit HEK293 Transfektanten und HT1080-4-1BB Zellen durchgeführt. Die HEK293 Zellen wurden wieder mit einem Leervektor und einem PD-L1 Expressionsvektor mittels PEI transfiziert. Es wurden drei unabhängige Kokulturrexperimente der Transfektanten mit den HT1080-4-1BB durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit zu anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 herzustellen, betrug die Startkonzentration des Antikörper-Fusionsproteins erneut 5 µg/ml, welche in zehn 1:3 Verdünnungsschritten vermindert wurde.

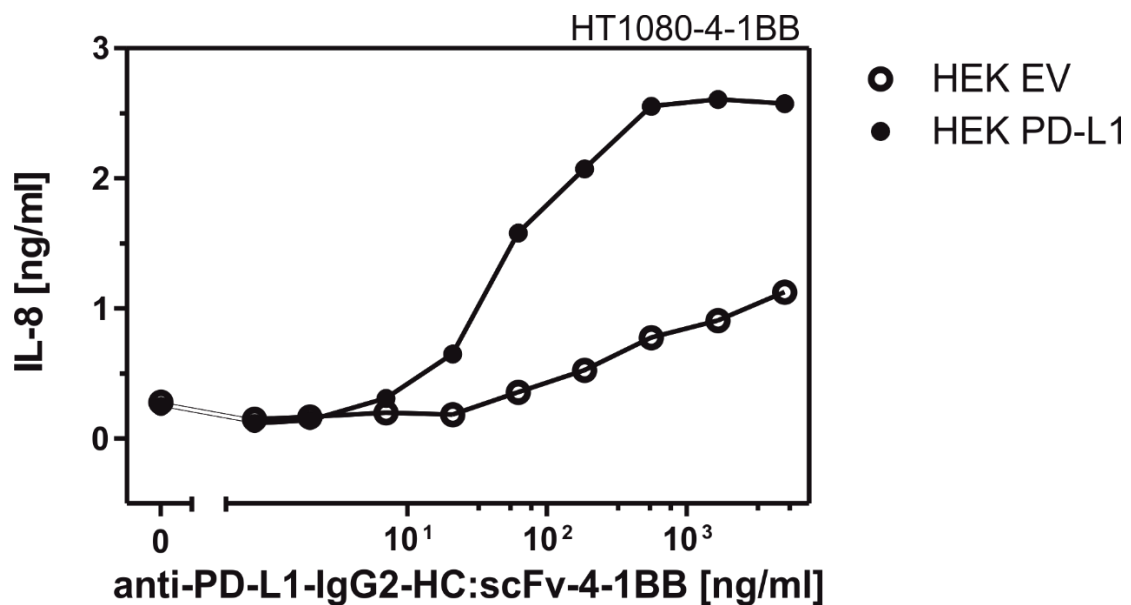


Abbildung 14: Bestimmung der agonistischen Aktivität des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB

Die HT1080-4-1BB Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB und HEK293 Transfektanten als Ko-Kultur Zellen stimuliert. Nach erfolgter Inkubation über Nacht wurde im Überstand der IL-8-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

4 Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt die ermittelten Daten einer der drei durchgeführten IL8-Ko-Kultur Assays. Die IL-8-Konzentration gilt hier als Maß für die 4-1BB-Aktivierung durch anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB. In allen durchgeführten Wiederholungen ließ sich eine sehr deutliche Aktivitätssteigerung bei den Ko-Kultur Assays erkennen, welche mit PD-L1 positiven HEK293 Zellen durchgeführt wurden. Diese zeichnete sich bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen ab. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die ermittelten EC50-Werte. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB ergab sich ein durchschnittlicher EC50-Wert von 47 ng/ml bei Anwesenheit von PD-L1 positiven HEK293 Zellen. Der durchschnittliche EC50-Wert bei der Kokultivierung mit PD-L1 negativen Kontrollzellen lag bei 3554 ng/ml.

Tabelle 11: EC-50 Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB im IL-8 ELISA Ko-Kultur Assay

Experiment	EC50 bei HEK PD-L1 (ng/ml)			EC50 bei HEK EV (ng/ml)		
	Einzelwerte	Ø	SD	Einzelwerte	Ø	SD
1	41	47	13	*	3554	1865
2	39			4872		
3	62			2235		

* nicht analysierbar

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit neuartige Antikörper-Fusionsproteine erfolgreich generiert werden. Hierfür wurden zunächst die parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG1 und anti-PD-L1-IgG2 und deren GpL-Varianten hergestellt. Daran anschließend erfolgte die Generierung von Antikörper-Fusionsproteinen auf Basis der anti-PD-L1-IgG2-Subklasse mit den Effektordomänen scFv-CD40 und scFv-4-1BB. Aufgrund der niedrigeren Affinität gegenüber Fcγ-Rezeptoren, wurde IgG2, anstelle von IgG1, für die Herstellung der Antikörper-Fusionsproteine gewählt.

Bei der Bestimmung der Affinität der Verankerungsdomäne anti-PD-L1 zeigten sich deutliche Unterschiede gegenüber dem zellständigen Antigen PD-L1. Mit einem durchschnittlichen K_D -Wert von 363 ng/ml hatte anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL die höchste Affinität gegenüber PD-L1, gefolgt von anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL mit einem durchschnittlichen K_D -Wert von 2722 ng/ml und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit 6990 ng/ml. Für die Bindung der Effektordomäne scFv-CD40 an zellständigen CD40 wurde für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL ein durchschnittlicher K_D -Wert von 19497 ng/ml in den durchgeführten Bindungsstudien ermittelt.

In den funktionellen Ko-Kultur Assays wurde die agonistische Aktivität der Effektordomänen scFv-CD40 beziehungsweise scFv-4-1BB der Antikörper-Fusionsproteine, jeweils mit und ohne PD-L1 vermittelter Immobilisation, untersucht. Bei PD-L1 vermittelter Immobilisation lag der durchschnittliche EC-50 Wert für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB bei 47 ng/ml, für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 bei 64 ng/ml. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB ergab sich in den Ko-Kultur Assays mit den PD-L1 negativen Kontrollzellen ein um den Faktor 76 erhöhter gemittelter EC-50 Wert von 3554 ng/ml. Der äquivalente Wert für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 lag um den Faktor 8 erhöht bei 490 ng/ml. Werden die ermittelten Daten der IL-8-Konzentrationen bei den Ko-Kultur Assays mit PD-L1 negativen Kontrollzellen verglichen, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 auf. Bei anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 näherten sich in hohen Konzentrationsbereichen die Werte für die IL-8 Induktion bereits ohne zusätzliche PD-L1 vermittelte Immobilisation dem Sättigungsbereich an. Bei anti-PD-L1-

4 Ergebnisse

IgG2-HC:scFv-4-1BB war hingegen keine Annäherung an den Sättigungsbereich erkennbar.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Generierung und anschließende Charakterisierung neuartiger bispezifischer Antikörper-Fusionsproteine, welche antagonistische und agonistische Eigenschaften besitzen und die Kompetenzen zweier unabhängiger Antikörper in einem Molekül vereinen. Die N-terminal befindliche anti-PD-L1 Domäne der Antikörper-Fusionsproteine stellt die antagonistische Domäne dar. Die Interaktion von PD-L1 mit seinem korrespondierenden Rezeptor PD-1 hat eine Inhibition der T-Zell Aktivität zur Folge. Durch Bindung an PD-L1, welcher auf multiplen Tumorarten exprimiert wird, soll die Bindung an PD-1 verhindert und auf diesem Wege eine Immunsuppression und Tumorevasion unterbunden werden (Alsaab et al., 2017).

Die C-terminal gelegenen TNFR-spezifischen Domänen anti-CD40 und anti-4-1BB in den Fusionsproteinen dieser Arbeit stellen hingegen die agonistischen immunstimulierenden Domänen dar. Die agonistische Aktivität von CD40 beziehungsweise 4-1BB spezifischen Antikörpern wird entscheidend von der Immobilisation an FcγRs und Ausbildung transaktivierender Antikörperkomplexe beeinflusst (Wajant, 2015). In dieser Arbeit erfolgte die Immobilisation der hergestellten Antikörper-Fusionsproteine über die Bindung an PD-L1. Somit kommt der fusionierten anti-PD-L1 Domäne, zusätzlich zur Unterbindung der Interaktion zwischen PD-L1 und seinen korrespondierenden Rezeptoren, eine weitere Aufgabe zu, nämlich die Freisetzung der agonistischen Aktivität der anti-TNFR-Domäne.

Das agonistische Potenzial der TNFR spezifischen Domänen anti-CD40 und anti-4-1BB äußert sich in einer Immunmodulation, bei welcher es zu einer verbesserten Rekrutierung und Funktion von antigenpräsentierenden Zellen bzw. zur Kostimulation von T-Zellen kommt (Moran et al., 2013). Zusätzlich wird die Selektivität der hergestellten Antikörper-Fusionsproteine erhöht, da eine PD-L1 sowie gleichzeitige CD40 bzw. 4-1BB Expression Voraussetzung für deren agonistische Aktivität ist. Hierüber soll das Risiko einer systemischen Wirkungsentfaltung minimiert und die Aktivität der Antikörper-Fusionsproteine

lokal auf tumoröse Zellen konzentriert werden. Zusätzlich wird durch die N- und C-terminal eingehenden Bindungen vermutlich eine Verringerung der Dissoziationsrate erzielt, was jedoch in dieser Arbeit nicht evaluiert wurde.

Sowohl für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 als auch anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB konnte eine Aktivitätssteigerung der Effektordomänen anti-CD40 und anti-4-1BB nach Bindung an PD-L1 nachgewiesen werden. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB zeichnete sich eine deutliche Differenz in der IL-8 Induktion zwischen den Versuchen mit PD-L1 vermittelter sekundärer Immobilisation und den Versuchen, bei welchen auf eine Immobilisation des Antikörper-Fusionsproteins verzichtet wurde, ab. Somit ließ sich eine deutliche Aktivitätssteigerung der anti-4-1BB Domäne bei gleichzeitiger Immobilisation über PD-L1 feststellen. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 fiel die Aktivitätssteigerung der anti-CD40 Domäne hingegen geringer aus, war jedoch immer noch deutlich.

Werden die parentalen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Produktivität verglichen, so ließ sich für anti-PD-L1-IgG1 die größte durchschnittliche Produktivität mit 23 µg/ml feststellen. Alle anderen in dieser Arbeit hergestellten Proteine wiesen eine Produktivität auf, die durchschnittlich zwischen 10 – 13 µg/ml lag. Kleinere Unterschiede in der Produktivität können auf Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der DNA-Konzentration einzelner Expressionsplasmide sowie auf Pipettierfehler während der PEI-Transfektion zurückzuführen zu sein. Insgesamt betrachtet war die Produktivität der Fusionsproteine sehr gut.

In den Bindungsstudien wurden zunächst die parentalen Antikörper anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL miteinander verglichen. Anschließend wurde anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL mit dem Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL hinsichtlich der Bindungseigenschaften gegenüber PD-L1 verglichen. Daran anschließend wurden Bindungsstudien durchgeführt, um die Affinität der anti-CD40 Domäne des eben genannten Antikörper-Fusionsproteins gegenüber seinem korrespondierenden Rezeptor zu ermitteln. In allen durchgeführten

Bindungsstudien können abweichende Werte für die ermittelten B_{\max} -Werte, auf unterschiedliche Fehler im Arbeitsprozess zurück zu führen sein. So können Fehler während der Zellzählung und Waschung mit 1 x PBS und anschließendem Absaugen sowie Pipettierungenauigkeiten eine mögliche Ursache sein. Bei den Bindungsstudien, bei welchen die Bindungseigenschaften gegenüber PD-L1 untersucht wurden, könnte zusätzlich ein unterschiedliches Expressionslevel von PD-L1 an der Zelloberfläche der HEK293 Transfektanten zu abweichenden B_{\max} -Werten geführt haben.

In den Bindungsstudien, bei welchen die Affinität zwischen anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL gegenüber PD-L1 verglichen wurde, ließ sich ein eindeutiger Unterschied feststellen. So wurde eine durchschnittlich um den Faktor 7,5 niedrigere Affinität (K_D -Wert) des IgG2 Subtypen gegenüber PD-L1 ermittelt. Möglicherweise lassen sich diese Unterschiede auf den unterschiedlichen Aufbau und Eigenschaften der IgG1 und IgG2 Subklasse zurückführen. Werden die *hinge*-Regionen beider Subklassen betrachtet, so unterscheiden sich diese in der Anzahl vorhandener Disulfidbrücken und Aminosäuren (siehe Tabelle 1). Die *hinge*-Region bildet eine Verbindung zwischen den Fab-Domänen und der Fc-Domäne. Sie unterscheidet sich abhängig von der IgG Subklasse in Länge und Beweglichkeit (Hamilton, 1987). Die IgG1 *hinge*-Region besitzt 2 Disulfidbrücken, 15 Aminosäuren und eine hohe Flexibilität. IgG2 besitzt hingegen die kürzeste *hinge*-Region mit 4 Disulfidbrücken und 12 Aminosäuren und geringste Flexibilität aller Subklassen. Wird die Beweglichkeit der Fab-Domänen im Verhältnis zu den Fc-Domänen der Antikörper betrachtet, lässt sich folgende Reihenfolge festhalten: IgG3>IgG1>IgG4>IgG2. Die Unterschiede in der Flexibilität beeinflussen das Potenzial Antigene über die Fab-Domänen zu binden (Carrasco et al., 2001; Roux, Strelets, & Michaelsen, 1997; Vidarsson et al., 2014). Somit könnten die Unterschiede im Aufbau der Subklassen eine Erklärung für die unterschiedliche Affinität gegenüber dem zellständigen PD-L1 sein, da durch mehr Flexibilität eine bessere räumliche Ausrichtung und effizientere Bindung an PD-L1 ermöglicht wird.

Anschließend wurde das Antikörper-Fusionsprotein mit dem *single chain variable fragment* CD40 auf Grundlage der IgG2 Subklasse des anti-PD-L1 Antikörpers rekombinant hergestellt. Ausschlaggebender Grund, trotz schlechterer Bindungseigenschaften gegenüber PD-L1, war die niedrigere Affinität von IgG2 gegenüber Fc γ -Rezeptoren sowie dem Komplementsystem und somit ein geringeres Risiko, dass angeborene Komponenten des Immunsystems, wie beispielsweise ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) oder CDC (*complement-dependent cytotoxicity*), aktiviert werden und es zu unerwünschten Nebenwirkungen während einer Antikörpertherapie kommt (Bindon, Hale, Brüggemann, & Waldmann, 1988). Die unterschiedliche Affinität der Subklassen gegenüber Fc γ -Rezeptoren lässt sich auf einen Unterschied in der C_{H2} Region der Fc-Domäne der Antikörper zurückführen. Für die Affinität gegenüber Fc γ -Rezeptoren lässt sich generell festhalten, dass IgG1 und IgG3 die höchste Bindungsfähigkeit gegenüber den meisten Fc γ -Rezeptoren aufweist (Bruhns et al., 2009; Morgan et al., 1995).

Zur Ermittlung der Affinität der anti-CD40-Domäne des Antikörper-Fusionsproteins wurden drei unabhängige Versuche mit stabil transfizierten HT1080-CD40 Zellen durchgeführt. Hierbei wurde ein durchschnittlicher K_D-Wert von 19497 ng/ml ermittelt.

Nach Überprüfung der Bindungsfähigkeit der Verankerungsdomäne anti-PD-L1 und der Effektor-domäne anti-CD40 erfolgte die Aufreinigung. Die über den FLAG-Tag vermittelte Aufreinigung ist notwendig, um eine Beeinflussung durch Mediumbestandteile in den Proteinüberständen in weiteren *in-vitro* Versuchen zu verhindern. Des Weiteren ist eine Aufreinigung nötig, um die gewünschten Antikörperproteine für spätere Tierversuche nutzen zu können. Hierfür könnte ein weiterer Ansatz darin bestehen, die Antikörper-Fusionsproteine auf Basis muriner Antikörper herzustellen, um mögliche Immunreaktionen gegenüber den Antikörper-Fusionsproteinen während den Tierversuchen zu minimieren. Abbildung 12 zeigt die Aufreinigung in Silbergefärbung von anti-PD-L1-IgG1, anti-PD-L1-IgG2, deren GpL-Varianten und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40. Bei allen leichten Ketten ohne fusionierte *Gaussia princeps* Luziferase wurde ein leicht erhöhtes Molekulargewicht von etwa 32 kDa ermittelt. Erwartet wurde ein

Molekulargewicht von 28 kDa. Ursächlich hierfür könnten eine Glykolysierung oder andere posttranslationale Modifikationen der leichten Ketten sein, weshalb sich diese knapp über der 30 kDa Markierung abzeichneten.

Wie bereits erwähnt, wurden in den funktionellen Assays die aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB auf ihre rezeptorstimulierende Wirkung untersucht. Hierfür wurden Ko-Kultur Assays mit HT1080-CD40 Zellen sowie HT1080-4-BB Zellen und PD-L1 positiven beziehungsweise negativen HEK293 Transfektanten durchgeführt. Es wurde untersucht, ob eine Immobilisation über PD-L1 zu einer Aktivitätssteigerung der scFv-Domänen führt. Die IL-8 Ausschüttung durch HT1080-CD40 beziehungsweise HT1080-4-BB Zellen gilt als Maß für die Rezeptoraktivierung und wurde nach Durchführung der Ko-Kultur Assays über ein IL-8 ELISA ermittelt. Bei beiden Antikörper-Fusionsproteinen zeichnete sich bei Immobilisation eine erhöhte IL-8 Ausschüttung ab. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den gemittelten EC-50 Werten für beide Antikörper-Fusionsproteine. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 ergab sich ein relativer Faktor von 7,7, wird der durchschnittliche EC-50 Wert bei der Ko-Kultivierung mit PD-L1 positiven HEK293 Transfektanten und PD-L1 negativen HEK293 Transfektanten verglichen. Für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB ergab sich hingegen ein relativer Faktor von 75,6. Somit wurde eine deutlichere Aktivitätssteigerung der anti-4-1BB Domäne bei gleichzeitiger sekundärer Immobilisation über PD-L1 verzeichnet.

Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, zeichnete sich für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 eine kontinuierliche IL-8 Ausschüttung bei der Ko-Kultivierung mit PD-L1 positiven sowie negativen HEK293 Transfektanten mit steigender Proteinkonzentration ab. Erwartet wurde ein flacherer Kurvenverlauf für die Ko-Kultur Assays mit PD-L1 negativen HEK293 Transfektanten und somit ein deutlicherer Aktivitätsunterschied der scFv-CD40 Domäne. Der deutlich ausgebliebene Aktivitätsunterschied bei anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 könnte auf eine Aggregationstendenz der scFv-CD40 Domäne des G28-5 Antikörpers hinweisen. Diese wurde bereits in unabhängigen Versuchen der Abteilung für Molekulare Innere Medizin (Universitätsklinikum Würzburg)

beobachtet. So zeigte ein CD40-spezifisches Antikörper-Fusionsprotein, mit der anti-CD40 Domäne des G28-5 Antikörpers und einer C-terminalen anti-CD20 Verankerungsdomäne in hohen Konzentrationsbereichen bei Ko-Kultur Assays bereits ohne zusätzliche sekundäre Immobilisation über CD20 eine hohe IL-8 Induktion (Medler et al., 2019). Eine mögliche Aggregationstendenz würde zu einer autonomen Aktivitätssteigerung der anti-CD40-Domäne ohne zusätzliche sekundäre Immobilisation führen. In späteren *in vivo* Versuchen könnten Probleme hinsichtlich der Dosierung und Vorhersage der Wirkungsentfaltung entstehen. Da eine agonistische Aktivität der anti-CD40-Domäne ohne zusätzliche sekundäre Immobilisation über PD-L1 möglich ist, wäre zusätzlich eine angestrebte selektive Wirkungsentfaltung in tumorösen Geweben mit PD-L1 Expression nicht mehr gegeben und das Antikörper-Fusionsprotein könnte systemisch an CD40-exprimierenden Zellen wirken und immunologische Prozesse auslösen.

Der Kurvenverlauf für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB wird in Abbildung 14 gezeigt. Wie bei anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 kommt es mit steigender Proteinkonzentration zu einer kontinuierlichen Erhöhung der IL-8 Ausschüttung, welche jedoch im Falle der Ko-Kultur Assays mit PD-L1 negativen HEK293 Transfektanten geringer ausfällt. Diese entsprach den Erwartungen und ein eindeutiger Unterschied zu anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 wird deutlich. Der deutlichere Aktivitätsunterschied zwischen den Ko-Kultur Assays mit PD-L1 positiven sowie negativen HEK293 Transfektanten, lässt eine Aggregationsbereitschaft und somit autonome Aktivität der anti-4-1BB Effektordomäne ausschließen. Hierdurch konnten vorteilhafte Eigenschaften von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB gegenüber anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 in dieser Arbeit gezeigt werden.

In weiteren Versuchen könnte eine Gelfiltration der produzierten, aufgereinigten anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 Antikörper-Fusionsproteine durchgeführt werden, um eine Trennung von möglichen aggregierten hochmolekularen Proteinen vorzunehmen. Eine erneute Durchführung der Ko-Kultur Assays und anschließende IL-8 ELISAs mit monomer vorliegenden Antikörper-Fusionsproteinen würde Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss eine

mögliche Aggregation der CD40 Effektor-domäne auf die IL-8 Ausschüttung der HT1080-CD40 Zellen hat. Ein weiterer Ansatz könnte darin bestehen, in zukünftigen Arbeiten eine scFv-CD40 Domäne mit Ursprung eines anderen CD40-spezifischen Antikörpers zur Herstellung des Antikörper-Fusionsproteins zu verwenden. Auf diesem Wege könnte sich der Verdacht auf eine mögliche Aggregationsbereitschaft des CD40 spezifischen G28-5 Antikörpers bestätigen beziehungsweise ausschließen lassen.

Ein interessanter Ansatzpunkt zur Optimierung der Antikörper-Fusionsproteine anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 könnte der Tausch der C-terminal gelegenen anti-CD40 beziehungsweise anti-4-1BB Effektor-domänen mit der N-terminal gelegenen anti-PD-L1 Verankerungsdomäne sein. Bereits in anderen Versuchen konnte das agonistische Potenzial von TNFR-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen gezeigt werden, welche eine FcγR-unabhängige Verankerungsdomäne am C-Terminus hatten (Medler et al., 2019).

Abschließend lässt sich festhalten, dass das neuartig gewählte Proteindesign einen interessanten und vielversprechenden Ansatzpunkt für agonistische TNFR-spezifische Antikörper dargestellt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine agonistische Aktivitätssteigerung der TNFR-spezifischen Domänen anti-CD40 beziehungsweise anti-4-1BB der Antikörper-Fusionsproteine über eine Immobilisation an PD-L1 stattfindet.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden bispezifische Antikörper-Fusionsproteine hergestellt und charakterisiert. Einerseits sollten die Proteine die immunstimulatorischen TNFRSF-Rezeptoren CD40 und 4-1BB aktivieren, welche überwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen exprimiert werden. Andererseits sollte die Inhibition des Immun-Checkpoints PD-1 durch Bindung an tumorzellexprimiertes PD-L1 erfolgen. Da PD-L1 spezifische Antikörper-Monotherapien oftmals Limitationen im Ansprechverhalten zeigen, fokussieren sich derzeitige Therapieansätze auf die Kombination mit anderen Therapeutika, insbesondere kostimulatorischen Antikörpern, um die Therapieeffektivität zu erhöhen. Mit der Generierung bispezifischer Antikörper-Fusionsproteine, welche die Kompetenzen zweier funktionell-unabhängiger Antikörper vereinen, wurde in dieser Arbeit ein potentieller klinischer Lösungsansatz untersucht. Die Aktivität TNFR-spezifischer Antikörper wird entscheidend von der Bindung an FcγRs beeinflusst. Mit dem gewählten Proteindesign wurde letzteres in dieser Arbeit über PD-L1 durchgeführt. Somit kommt der anti-PD-L1 Domäne der generierten Antikörper-Fusionsproteine neben der Inhibition von PD-1 eine weitere Aufgabe zu.

Während der Arbeit konnte das Antikörper-Fusionsprotein anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 erfolgreich produziert werden. Nach der Herstellung konnte die Bindungsfähigkeit der N-terminalen anti-PD-L1 sowie C-terminalen anti-CD40 Domäne in zellulären Bindungsstudien demonstriert werden. Die Aufreinigung der Antikörper-Fusionsproteine erfolgte mittels Affinitätschromatografie. Anschließend funktionelle Experimente zeigten eine PDL-1-abhängige Steigerung der agonistischen Aktivität der anti-CD40 Domäne. Lediglich die vermutete Aggregationsbereitschaft von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 bedarf weiterer Abklärung. Mit der Herstellung und Charakterisierung von anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB sollte das neuartige Format von Antikörper-Fusionsproteinen an einem weiteren immunstimulatorischen Beispiel der TNFR-Superfamilie validiert werden. Nach erfolgreicher Produktion und Aufreinigung, konnte erneut die Aktivitätssteigerung einer TNFR-spezifischen Domäne anti-4-

1BB bei PD-L1 abhängiger Immobilisation in funktionellen Assays bestätigt werden.

In zukünftigen Schritten könnte der Tausch der N- und C-Termini eine interessante Abwandlung im Proteindesign darstellen, um einen Vergleich mit den untersuchten Fusionsproteinen zu ziehen. Darüber hinaus könnte in späteren Tierversuchen das immunstimulatorische Potenzial und die Biokompatibilität untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte das große therapeutische Potenzial der bispezifischen Antikörper-Fusionsproteine anti-PD-L1-IgG2-scFv-CD40 und anti-PD-L1-IgG2-scFv-4-1BB gezeigt werden. Durch ihr bispezifisches Proteindesign zeigen sie deutliche Vorteile gegenüber Checkpoint-Inhibitor Monotherapien, welche häufig durch fehlendes Ansprechverhalten limitiert werden. So könnte die Bindung an PD-L1, trotz ausbleibendem Ansprechverhalten, zur Immobilisation der Antikörper-Fusionsproteine und der Aktivitätssteigerung der TNFR-spezifischen Domänen genutzt werden. Zusätzlich unterstreichen die angestrebte erhöhte Selektivität und somit lokale Aktivität der Antikörper-Fusionsproteine auf Tumorzellen und die Minimierung von systemischen Nebenwirkungen während einer Antikörpertherapie, das große therapeutische Potenzial der Antikörper-Fusionsproteine.

7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, *119*(3), 651-665. doi:10.1182/blood-2011-04-325225
- Aguiar Jr, P. N., Santoro, I. L., Tadokoro, H., de Lima Lopes, G., Filardi, B. A., Oliveira, P., De Mello, R. A. (2016). The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Immunotherapy*, *8*(4), 479-488. doi:10.2217/imt-2015-0002
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 561. doi:10.3389/fphar.2017.00561
- Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2007). The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual review of immunology*, *25*(1), 21-50. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
- Arteaga, C. L., Hurd, S. D., Winnier, A. R., Johnson, M. D., Fendly, B. M., & Forbes, J. T. (1993). Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation*, *92*(6), 2569-2576. doi:10.1172/JCI116871
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, *281*(5381), 1305-1308. doi:10.1126/science.281.5381.1305
- Bindon, C. I., Hale, G., Brüggemann, M., & Waldmann, H. (1988). Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *The Journal of Experimental Medicine*, *168*(1), 127-142. doi:10.1084/jem.168.1.127
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Srinivasan, S. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, *385*(6618), 729. doi:10.1038/385729a0
- Bodmer, J.-L., Schneider, P., & Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences*, *27*(1), 19-26. doi:10.1016/s0968-0004(01)01995-8
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, *25*(6), 280-288. doi:10.1016/j.it.2004.03.008
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.-L., Gaide, O., Hertig, S., Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(20), 13964-13971. doi:10.1074/jbc.M601553200
- Bowden, T. A., Baruah, K., Coles, C. H., Harvey, D. J., Yu, X., Song, B.-D., Crispin, M. (2012). Chemical and Structural Analysis of an Antibody Folding Intermediate Trapped during Glycan Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(42), 17554-17563. doi:10.1021/ja306068g
- Boyerinas, B., Jochems, C., Fantini, M., Heery, C. R., Gulley, J. L., Tsang, K. Y., & Schlom, J. (2015). Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunology Research*, *3*(10), 1148-1157. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0059
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, *113*(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, *27*(1), 111-122. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.016

7 Literaturverzeichnis

- Callahan, M. K., Postow, M. A., & Wolchok, J. D. (2015). CTLA-4 and PD-1 pathway blockade: combinations in the clinic. *Frontiers in oncology*, 4, 385. doi:10.3389/fonc.2014.00385
- Canfield, S. M., & Morrison, S. L. (1991). The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(6), 1483-1491. doi:10.1084/jem.173.6.1483
- Carrasco, B., de la Torre, J. G., Davis, K. G., Jones, S., Athwal, D., Walters, C., Harding, S. E. (2001). Crystallohydrodynamics for solving the hydration problem for multi-domain proteins: open physiological conformations for human IgG. *Biophysical chemistry*, 93(2-3), 181-196. doi:10.1016/s0301-4622(01)00220-4
- Carswell, E., Old, L. J., Kassel, R., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), 3666-3670. doi:10.1073/pnas.72.9.3666
- Chan, F. K.-M., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., & Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288(5475), 2351-2354. doi:10.1126/science.288.5475.2351
- Clark, E. A., & Ledbetter, J. A. (1986). Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), 4494-4498. doi:10.1073/pnas.83.12.4494
- Daëron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., & Vivier, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological reviews*, 224(1), 11-43. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x
- Dhein, J., Daniel, P., Trauth, B., Oehm, A., Möller, P., & Krammer, P. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *The Journal of Immunology*, 149(10), 3166-3173.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Golay, J. (2003). Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *The Journal of Immunology*, 171(3), 1581-1587. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1581
- Diehl, L., den Boer, A. T., Schoenberger, S. P., van der Voort, E. I., Schumacher, T. N., Melief, C. J., Toes, R. E. (1999). CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nature Medicine*, 5(7), 774. doi:10.1038/10495
- Disis, M. L., Patel, M. R., Pant, S., Infante, J. R., Lockhart, A. C., Kelly, K., Ejadi, S. (2015). Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with previously treated, recurrent or refractory ovarian cancer: a phase Ib, open-label expansion trial. *Journal of clinical oncology*, 33(15), 5509. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.5509
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5, 1365. doi:10.1038/70932
- Engelmann, H., Holtmann, H., Brakebusch, C., Avni, Y. S., Sarov, I., Nophar, Y., Wallach, D. (1990). Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *Journal of Biological Chemistry*, 265(24), 14497-14504.
- Espevik, T., Brockhaus, M., Loetscher, H., Nonstad, U., & Shalaby, R. (1990). Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 171(2), 415-426.
- Fahey, J. L. (1964). Contribution of γ -globulin subunits to electrophoretic heterogeneity: Identification of a distinctive group of 6 \cdot 6S γ -myeloma proteins. *Immunochemistry*, 1(2), 121-131. doi:10.1016/0019-2791(64)90076-x
- Ferrante, A., Beard, L. J., & Feldman, R. G. (1990). IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatric infectious disease journal*, 9(8), 516-524.
- Franklin, E. C., & Frangione, B. (1969). Immunoglobulins. *Annual review of medicine*, 20(1), 155-174. doi:10.1146/annurev.me.20.020169.001103
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Byrne, M. C. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027-1034. doi:10.1084/jem.192.7.1027

7 Literaturverzeichnis

- French, R. R., Chan, H. C., Tutt, A. L., & Glennie, M. J. (1999). CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nature Medicine*, 5(5), 548. doi:10.1038/8426
- Gerber, H.-P., Wu, X., Yu, L., Wiesmann, C., Liang, X. H., Lee, C. V., Ferrara, N. (2007). Mice expressing a humanized form of VEGF-A may provide insights into the safety and efficacy of anti-VEGF antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3478-3483. doi:10.1073/pnas.0611492104
- Ghetie, M.-A., Podar, E. M., Ilgen, A., Gordon, B. E., Uhr, J. W., & Vitetta, E. S. (1997). Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), 7509-7514. doi:10.1073/pnas.94.14.7509
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., & Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 570-575. doi:10.1073/pnas.95.2.570
- Grenga, I., Donahue, R. N., Lepone, L. M., Richards, J., & Schlom, J. (2016). A fully human IgG1 anti-PD-L1 MAb in an in vitro assay enhances antigen-specific T-cell responses. *Clinical & translational immunology*, 5(5), e83. doi:10.1038/cti.2016.27
- Hamilton, R. G. (1987). Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 33(10), 1707-1725.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes & development*, 18(18), 2195-2224. doi:10.1101/gad.1228704
- Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*: Springer-Verlag.
- Hernandez-Chacon, J. A., Li, Y., Wu, R. C., Bernatchez, C., Wang, Y., Weber, J., Radvanyi, L. (2011). Co-stimulation through the CD137/4-1BB pathway protects human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death and enhances anti-tumor effector function. *Journal of immunotherapy*, 34(3), 236-250. doi:10.1097/CJI.0b013e318209e7ec
- Honjo, T. (1983). Immunoglobulin genes. *Annual review of immunology*, 1(1), 499-528. doi:10.1146/annurev.iy.01.040183.002435
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11), 3887-3895.
- Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L., & Bonavida, B. (2004). Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by rituximab. *Cancer Research*, 64(19), 7117-7126. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3500
- Jazwinska, E. C., Dunckley, H., Propert, D. N., Gatenby, P. A., & Serjeantson, S. W. (1988). Gm typing by immunoglobulin heavy-chain gene RFLP analysis. *American journal of human genetics*, 43(2), 175-181.
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology*, 18(1), 621-663. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.621
- Karin, M., & Gallagher, E. (2009). TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunological reviews*, 228(1), 225-240. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00755.x
- Kelly, K., Patel, M. R., Infante, J. R., Iannotti, N., Nikolinakos, P., Leach, J., Gurtler, J. S. (2015). Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with metastatic or locally advanced solid tumors: assessment of safety and tolerability in a phase I, open-label expansion study. *Journal of clinical oncology*, 33(15), 3044. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.3044
- Kim, E. S. (2017). Avelumab: First global approval. *Drugs*, 77(8), 929-937. doi:10.1007/s40265-017-0749-6

7 Literaturverzeichnis

- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E., & Schlossman, S. (1979). Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, *206*(4416), 347-349. doi:10.1126/science.314668
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Nunes, R. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, *2*(3), 261-268. doi:10.1038/85330
- Liu, H., Bulseco, G.-G., & Sun, J. (2006). Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunology letters*, *106*(2), 144-153. doi:10.1016/j.imlet.2006.05.011
- Liu, X.-y., Pop, L. M., & Vitetta, E. S. (2008). Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunological reviews*, *222*(1), 9-27. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00601.x
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, *104*(4), 487-501. doi:10.1016/s0092-8674(01)00237-9
- Mace, P. D., Smits, C., Vaux, D. L., Silke, J., & Day, C. L. (2010). Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *Journal of molecular biology*, *400*(1), 8-15. doi:10.1016/j.jmb.2010.04.055
- Medler, J., Nelke, J., Weisenberger, D., Steinfatt, T., Rothaug, M., Berr, S., Wajant, H. (2019). TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcγR-independent agonistic activity. *Cell death & disease*, *10*(3), 224. doi:10.1038/s41419-019-1456-x
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellström, K. E., Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature Medicine*, *3*(6), 682-685. doi:10.1038/nm0697-682
- Michot, J., Bigenwald, C., Champiat, S., Collins, M., Carbonnel, F., Postel-Vinay, S., Hollebecque, A. (2016). Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European journal of cancer*, *54*, 139-148. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.016
- Moran, A. E., Kovacsovics-Bankowski, M., & Weinberg, A. D. (2013). The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology*, *25*(2), 230-237. doi:10.1016/j.coi.2013.01.004
- Morgan, A., Jones, N., Nesbitt, A., Chaplin, L., Bodmer, M., & Emtage, J. (1995). The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology*, *86*(2), 319-324.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie*: Springer Spektrum.
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Advances in immunology*, *96*, 179-204. doi:10.1016/S0065-2776(07)96005-8
- Normansell, D. E. (1987). Human immunoglobulin subclasses. *Diagnostic and clinical immunology*, *5*(3), 115-128.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*, 252. doi:10.1038/nrc3239
- Pomerantz, J. L., & Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-κB. *Molecular cell*, *10*(4), 693-695. doi:10.1016/s1097-2765(02)00697-4
- Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Journal of clinical oncology*, *33*(17), 1974. doi:10.1200/JCO.2014.59.4358
- Reff, M., Carner, K., Chambers, K., Chinn, P., Leonard, J., Raab, R., Anderson, D. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, *83*(2), 435-445.
- Ribas, A. (2015). Adaptive immune resistance: how cancer protects from immune attack. *Cancer discovery*, *5*(9), 915-919. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0563
- Roux, K. H., Strelets, L., & Michaelsen, T. E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *The Journal of Immunology*, *159*(7), 3372-3382.
- Scallon, B. J., Scigliano, E., Freedman, V. H., Miedel, M. C., Pan, Y.-C., Unkeless, J. C., & Kochan, J. P. (1989). A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(13), 5079-5083. doi:10.1073/pnas.86.13.5079
- Scheidereit, C. (2006). IκB kinase complexes: gateways to NF-κB activation and transcription. *Oncogene*, *25*(51), 6685-6705. doi:10.1038/sj.onc.1209934

7 Literaturverzeichnis

- Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046
- Schur, P. (1988). IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in allergy*, 23, 1-11.
- Schütt, C., & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*: Springer Spektrum.
- Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Larsen, C. P. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *Journal of Experimental Medicine*, 186(1), 47-55. doi:10.1084/jem.186.1.47
- Siber, G. R., Schur, P. H., Aisenberg, A. C., Weitzman, S. A., & Schiffman, G. (1980). Correlation between Serum IgG-2 Concentrations and the Antibody Response to Bacterial Polysaccharide Antigens. *The New England journal of medicine*, 303(4), 178-182. doi:10.1056/nejm198007243030402
- Silverman, N., & Maniatis, T. (2001). NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes development*, 15(18), 2321-2342. doi:10.1101/gad.909001
- Smith, C. A., Farrah, T., & Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6), 959-962. doi:10.1016/0092-8674(94)90372-7
- Smith, K. A., Nelson, P. N., Warren, P., Astley, S. J., Murray, P. G., & Greenman, J. (2004). Demystified... recombinant antibodies. *Journal of clinical pathology*, 57(9), 912-917. doi:10.1136/jcp.2003.014407
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology*, 24(2), 207-212. doi:10.1016/j.coi.2011.12.009
- Torres, M., & Casadevall, A. (2008). The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. *Trends in Immunology*, 29(2), 91-97. doi:10.1016/j.it.2007.11.004
- Turner, M. W., Bennich, H. H., & Natvig, J. B. (1970). Pepsin digestion of human G-myeloma proteins of different subclasses. I. The characteristic features of pepsin cleavage as a function of time. *Clinical and experimental immunology*, 7(5), 603-625.
- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995). Rel/NF- κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & development*, 9(22), 2723-2735. doi:10.1101/gad.9.22.2723
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in immunology*, 5(520). doi:10.3389/fimmu.2014.00520
- Wajant, H. (2015). Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death And Differentiation*, 22(11), 1727-1741. doi:10.1038/cdd.2015.109
- Wajant, H., Gerspach, J., & Pfizenmaier, K. (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Letters*, 332(2), 163-174. doi:10.1016/j.canlet.2010.12.019
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death And Differentiation*, 10(1), 45-65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189
- Wilke, C. M., Wei, S., Wang, L., Kryczek, I., Kao, J., & Zou, W. (2011). Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer immunology, immunotherapy*, 60(11), 1529. doi:10.1007/s00262-011-1104-5
- Williams, A. F., & Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition. *Annual review of immunology*, 6(1), 381-405. doi:10.1146/annurev.iy.06.040188.002121
- Wyzgol, A., Müller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G. U., Pfizenmaier, K., & Wajant, H. (2009). Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *Journal of Immunology*, 183(3), 1851-1861. doi:10.4049/jimmunol.0802597
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Israël, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, 93(7), 1231-1240. doi:10.1016/s0092-8674(00)81466-x
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Yagita, H. (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *Journal of Immunology*, 169(10), 5538-5545. doi:10.4049/jimmunol.169.10.5538

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Antikörpers und dessen enzymatischer Verdau	3
Abbildung 2: Überblick über Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie und deren schematischer Aufbau	16
Abbildung 3: Darstellung der TNFR-Aktivierung durch membrangebundene und lösliche TNF-Liganden.....	19
Abbildung 4: Ablauf der klassischen und alternativen NF- κ B-Signalkaskade	24
Abbildung 5: Übersicht über die verwendeten pCR3-Expressionsvektoren und die Schritte der Klonierung	50
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der produzierten parentalen Antikörper und Darstellung im Westernblot	53
Abbildung 7: Gleichgewichtsbindungsstudien mit den Antikörpern anti-PD-L1-IgG1-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL.....	55
Abbildung 8: Expressionsvektor der schweren Kette für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40.....	58
Abbildung 9: Aufbau und WB-Analyse der anti-PD-L1-scFv-CD40 Fusionsproteine	60
Abbildung 10: Gleichgewichtsbindungsstudien des parentalen Antikörpers anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen	64
Abbildung 11: Gleichgewichtsbindungsstudie des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40-LC:GpL mit HT1080-CD40 Zellen.....	66
Abbildung 12: Silbergefärbung der aufgereinigten Proteine	68
Abbildung 13: PD-L1-abhängiger CD40-Agonismus des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40	70
Abbildung 14: Bestimmung der agonistischen Aktivität des Antikörper-Fusionsproteins anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB	75

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der IgG-Subklassen	6
Tabelle 2: Liganden der TNF-Superfamilie mit korrespondierenden TNF-Rezeptoren	17
Tabelle 3: Übersicht der Vektoren, Inserts und Restriktionsenzyme zur Herstellung der aufgeführten Expressionsplasmide	49
Tabelle 4: Darstellung der Produktivität der hergestellten parentalen Antikörper	52
Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte für anti-PD-L1-IgG1- LC:GpL und anti-PD-L1-IgG2-LC:GpL an PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen.....	56
Tabelle 6: Übersicht über Vektor, DNA-Template, Primer, und Restriktionsenzyme zur Herstellung des Expressionsplasmides anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-CD40-pCR3 (hIgG2)	58
Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte für anti-PD-L1-IgG2- HC:scFv-CD40-LC:GpL mit PD-L1 transfizierten HEK293 Zellen	63
Tabelle 8: Übersicht der ermittelten K_D -, B_{max} - und R^2 -Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv- CD40-LC:GpL mit HT1080-CD40 Zellen.....	65
Tabelle 9: EC-50 Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-CD40 im IL-8 ELISA Ko-Kultur Assay ..	71
Tabelle 10: Übersicht der Vektoren, DNA-Templates, Primer und Restriktionsenzyme zur Herstellung der aufgeführten Expressionsplasmide	73
Tabelle 11: EC-50 Werte für anti-PD-L1-IgG2-HC:scFv-4-1BB im IL-8 ELISA Ko-Kultur Assay	76

III. Abkürzungsverzeichnis

III. Abkürzungsverzeichnis

4-1BB	CD137, TNFRSF9
4-1BBL	4-1BB <i>ligand</i> , CD137 <i>ligand</i> , TNFSF9
ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AmpR	Antibiotikaresistenz
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i> , TNFSF13
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BAFF	<i>B-cell activating factor</i> , TNFSF13B
BAFFR	<i>B-cell activating factor receptor</i> , TNFRSF13C
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i> , TNFRSF17
B _{max}	maximale Bindung
Caspase	<i>cysteinyl aspartat specific proteinase</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i>
CD20	<i>B-lymphocyte antigen CD20</i>
CD27	TNFRSF7
CD27L	CD27 <i>ligand</i> , CD70, TNFSF7
CD30	TNFRSF8
CD30L	CD30 <i>ligand</i> , CD153, TNFSF8
CD40	TNFRSF5
CD40L	CD40 <i>ligand</i> , <i>B-cell activating molecule</i> , CD154, TNFSF5
CD95	<i>apoptosis antigen 1</i> , Fas, TNFRSF6
CD95L	CD95 <i>ligand</i> , <i>apoptosis-mediating surface antigen Fas ligand</i> , TNFSF6
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C _H , C _L bzw. CH, CL	<i>constant heavy, constant light</i>
ciAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CMV	<i>cytomegalovirus promotor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
CSR	<i>class-switch recombination</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic t-cell lymphocyte-associated protein 4</i>
DcR3	<i>decoy receptor 3</i> , TNFRSF6B
DD	<i>death domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DR3	<i>death receptor 3</i> , TNFRSF25
DR6	<i>death receptor 6</i> , TNFRSF21
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDA-A1/2	<i>ectodermal dysplasia protein 1/2</i>
EDAR	<i>ectodermal dysplasia receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

III. Abkürzungsverzeichnis

Exp.	Experiment
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FcγR	Fc-Gamma-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fn14	<i>fibroblast growth factor-inducible 14, TWEAK receptor, TNFRSF12A</i>
FR	<i>framework region</i>
g	Gramm
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein, TNFRSF18</i>
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand, GITR ligand, TNFSF18</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GpL	<i>Gaussia princeps</i> Luziferase
H ₂ O	Wasser
Hc bzw. HC	<i>heavy chain</i>
HVEM	<i>herpesvirus entry mediator, TNFRSF14</i>
IFN-γ	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin
IκB	<i>inhibitor of κB</i>
IKK	<i>IκB kinase complex</i>
IKKα	Inhibitor von NFκB-Kinase α
IKKβ	Inhibitor von NFκB-Kinase β
IL-4	Interleukin 4
IL-8	Interleukin 8
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Bakterienkulturmedium, Luria Bertani
Lc bzw. LC	<i>light chain</i>
LIGHT	<i>herpes virus entry mediator ligand, HVEM ligand, TNFSF14</i>
LTα	<i>lymphotoxin alpha, TNFSF1</i>
LTα1β2	<i>lymphotoxin alpha 1/beta2</i>
LTβR	<i>lymphotoxin beta receptor, TNFRSF3</i>
m	Meter
M	Molar
M2	anti-FLAG monoklonaler Antikörper
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	<i>NFκB-essential modulator</i>
NFκB	<i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NK	<i>natural killer cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
OPG	Osteoprotegerin, TNFRSF11B

III. Abkürzungsverzeichnis

OX40	TNFRSF4
OX40L	OX40 <i>ligand</i> , TNFSF4
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein-1</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i> , B7-H1
PD-L2	<i>programmed death ligand 2</i> , B7-DC
PEI	Polyethylenimine
PLAD	<i>pre-ligand assembly domain</i>
R ²	Determinationskoeffizient
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor κ B</i> , TNFRSF11a
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> , TNFRSF11, <i>transcription factor RelB</i>
RelB	TNFRSF19L
RELT	<i>Rel homology domain</i>
RHD	<i>relative light units</i>
RLU	Ribonukleinsäure
RNA	<i>ribonuclease A</i>
RNase A	<i>rounds per minute</i>
rpm	<i>single chain variable fragment</i>
scFv	Natriumdodecylsulfat
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDS-PAGE	Silbergelmarker
SM	spezifische Bindung
Spez. Bdg.	<i>Transmembrane activator and CAML interactor</i> , TNFRSF13B
TACI	TRIS-Acetat-EDTA
TAE	<i>TAK-binding-protein</i>
TAB	<i>transforming growth factor β-activated kinase</i>
TAK	<i>TRIS buffered saline</i>
TBS	Tetramethylethylendiamin
TEMED	<i>TNF homology domain</i>
THD	<i>TNF ligand related molecule 1</i> , TNFSF15
TL1A	Tumornekrosefaktor, <i>tumor necrosis factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie, <i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TNFRSF	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i> , TNFRSF1A
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor 2</i> , TNFRSF1B
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Superfamilie, <i>tumor necrosis factor superfamily</i>
TNFSF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> , TNFSF10
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 1</i> , <i>death receptor 4</i> , TNFRSF10A
TRAILR1	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 2</i> , <i>death receptor 5</i> , TNFRSF10B
TRAILR2	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 3</i> , <i>decoy receptor 1</i> , TNFRSF10C
TRAILR3	

III. Abkürzungsverzeichnis

TRAILR4	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 4, decoy receptor 2, TNFRSF10D</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TNFSF12</i>
TWEEN	Polysorbat
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
V _H , V _L bzw. VH, VL	<i>variable heavy, variable light</i>
XEDAR	<i>ectodysplasin A2 receptor, TNFRSF27</i>
α	Alpha
β	Beta
ε	Epsilon
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
∅	Durchschnitt

IV. Sequenzen

IV. Sequenzen

Im Folgenden werden die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Ketten der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper-Fusionsproteine aufgelistet. Dabei werden die Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Ketten der Fusionsproteine für folgende Abschnitte farblich hervorgehoben:

FLAG-Tag	<i>Gaussia princeps</i> Luziferase
variable Domäne (HC)	konstante Domäne (HC)
variable Domäne (LC)	konstante Domäne (LC)
scFv (VH)	scFv (VL)

anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hlgG1)

atgaacttcggccttcagcctgatcttcctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa	1
M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1
gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattcgagggtg	61
V K L V P R Q L D Y K D D D D K E F E V	21
cagctgctggaatctggcggaggacttgttcagcctggcggctctctgagactgtcttgt	121
Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C	41
gccgccagcggccttcaccttcagcagctatatcatgatgtgggtccgacaggcccctggc	181
A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G	61
aaaggccttgaatgggtgtccagcatctatcccagcggcggcatcaccttttacgccgac	241
K G L E W V S S I Y P S G G I T F Y A D	81
acagtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcag	301
T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q	101
atgaacagcctgagagccgaggacaccgcccgtgtactactgcgccagaatcaagctgggc	361
M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G	121
accgtgaccaccgtggattattggggacagggcacccctggtcaccgtgtcctccagatcc	421
T V T T V D Y W G Q G T L V T V S S R S	141
tctagcggccagcacaagggccccagcgtgtccctctggcccctagcagcaagagcaca	481
S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T	161
tctggcggaaacagccgccctgggctgcctcgtgaaggactacttcccagcccgtgaca	541
S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T	181
gtgtcctggaactctggcggccctgacaagcggcgtgcacaccttccagccgtgctgcag	601
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q	201
agcagcggcctgtactctctgagcagcgtcgtgactgtgcccagcagcagcctgggcacc	661
S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T	221
cagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaggtg	721
Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V	241
gaaccaagagctgcgacaagacccacacctgtcccccttgtcctgcccctgaactgctg	781
E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L	261
ggcggaccttccgtgttccctgttcccccaagcccaggacaccctgatgatcagccgg	841
G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R	281
acccccgaagtgcactgcgtgggtggatgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttt	901
T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F	301

IV. Sequenzen

aattggtagctggacggcggtggaagtgcacaacgcccaagaccaagcccagagaggaacag N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q	961 321
tacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacagtgtctgcaccaggactggctgaac Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N	1021 341
ggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagccctgacctgcccccatcgagaaaacc G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T	1081 361
atcagcaaggccaaggccagccccgcgaaccccaggtgtacacactgcctcccagcagg I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R	1141 381
gacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaaaggcttctaccctcc D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S	1201 401
gatatcgccgtggaatgggagagcaacggccagccccgagaacaactacaagaccacccc D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P	1261 421
cctgtgctggacagcagcggctcattcttctgtacagcaagctgacctgggacaagtcc P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S	1321 441
cggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccac R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H	1381 461
tacaccagaagtccctgagcctgagccccggcaagtaa Y T Q K S L S L S P G K -	1441 481

anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC-pCR3 (hlgG2)

atgaacttcggcttcagcctgatcttctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1 1
gtgaagctgggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaaagaattcgaggtg V K L V P R Q L D Y K D D D D K E F E V	61 21
cagctgctggaatctggcggaggacttgttcagcctggcggctctctgagactgtcttgt Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C	121 41
gccgccagcggcttcaccttcagcagctatatcatgatgtgggtccgacaggccccctggc A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G	181 61
aaaggccttgaatgggtgtccagcatctatcccagcggcggcatcaccttttacgcccag K G L E G W V S S I Y P S G G I T F Y A D	241 81
acagtgaaaggcagattcaccatcagcgggacaacagcaagaacaccctgtacctgag T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q	301 101
atgaacagcctgagagccgaggacaccgcccgtgtactactgcccagaatcaagctgggc M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G	361 121
accgtgaccaccgtggattattggggacagggcaccctggtcaccgtgtcctccagatcc T V T T V D Y W G Q G T L V T V S S R S	421 141
tcgagtgctagcaccaaggccccatcggctcttccccctggcgcctgctccaggagcacc S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T	481 161
tccgagagcacagcggccccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacg S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T	541 181
gtgtcgtggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacag V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q	601 201
tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgtccctccagcaacttcggcacc S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T	661 221
cagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagtt Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V	721 241
gagcgaaatgttgtgtcgagtgccaccggtgccagcaccacctgtggcaggaccgtca E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S	781 261
gtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtc V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V	841 281
acgtgctggtggtggacgtgagccacgaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtg T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V	901 301
gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcagc D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T	961 321

IV. Sequenzen

ttccgtgtgggtcagcgtcctcaccggttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtac F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y	1021 341
aagtgcaaggtctccaacaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaacc K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T	1081 361
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgacc K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T	1141 381
aagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaggcttctaccccagcgacatcgccgtg K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V	1201 401
gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccattgctggac E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D	1261 421
tccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q	1321 441
gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgacacaaccactacacgcagaag G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K	1381 461
agcctctccctgtctccgggtaaataga S L S L S P G K -	1441 481

anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC-pCR3

atgaacttcggcttcagcctgatcttctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1 1
gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaaagaattgcagagc V K L V P R Q L D Y K D D D D K E L Q S	61 21
gccctgacacagcctgcatccgtgtctggatctccaggccagagcatcaccatctcttgt A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C	121 41
accggcacaagctccgatgtcggcggctacaattacgtgtcctggtatcagcagcacc T G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P	181 61
ggcaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaacagaccctccggcgtgtccaat G K A P K L M I Y D V S N R P S G V S N	241 81
agattcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggcc R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A	301 101
gaggacgaggccgattactactgtagcagctacaccagctcctccaccagagtgtttggc E D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F G	361 121
accggcaccaaagtgaccgtgcttggatccgaaatcaagcgtacggtggccgctcccagc T G T K V T V L G S E I K R T V A A P S	421 141
gtgttcatcttcccacctagcagcagcagctgaagtccggcacagcctctgtcgtgtgc V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C	481 161
ctgctgaacaacttctacccccgcgaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaatgcctg L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L	541 181
cagagcggcaacagccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacagc Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S	601 201
ctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgc L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C	661 221
gaagtgaccaccagggcctgtctagccccgtgaccaagagcttcaaccggggcgagtgc E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	721 241
taa -	781 261

IV. Sequenzen

anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-LC:GpL-pCR3

atgaacttcggcttcagcctgatcttcctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa	1
M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1
gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattgcagagc	61
V K L V P R Q L D Y K D D D D K E L Q S	21
gccctgacacagcctgcatccgtgtctggatctccaggccagagcatcaccatctcttgt	121
A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C	41
accggcacaagctccgatgtcggcggctacaattacgtgtcctggtatcagcagcacccc	181
T G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P	61
ggcaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaacagaccctccggcgtgtccaat	241
G K A P K L M I Y D V S N R P S G V S N	81
agattcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggcc	301
R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A	101
gaggacgaggccgattactactgtagcagctacaccagctcctccaccagagtgtttggc	361
E D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F G	121
accggcaccaaagtgaccgtgcttggatccgaaatcaagcgtacggtggccgctcccagc	421
T G T K V T V L G S E I K R T V A A P S	141
gtgttcattcttcccacctagcgcagcagcagctgaagtccggcacagcctctgtcgtgtgc	481
V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C	161
ctgctgaacaacttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaatgccttg	541
L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L	181
cagagcggcaacagccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacagc	601
Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S	201
ctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgc	661
L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C	221
gaagtgaccaccaggccctgtctagccccgtgaccaagagcttcaaccggggcgagtgc	721
E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	241
ctcgagaaaccaaccgagaataatgaggatttcaacatcgtggctgtggcatccaatttt	781
L E K P T E N N E D F N I V A V A S N F	261
gtaccaccgacctcgatgccgatcggggaaaactgcctggcaaaaaactgccctggaa	841
A T T D L D A D R G K L P G K K L P L E	281
gtgctgaaagagatggaggccaacgctagaaaagctggctgtactagaggatgtctcatc	901
V L K E M E A N A R K A G C T R G C L I	301
tgctgtcccacatcaagtgtacccccaaaaatgaaaaaattcatccctggcgggtgtcac	961
C L S H I K C T P K M K K F I P G R C H	321
acatacaggggcgacaaggaatctgctcagggcggaaatcgagaggctattgtggatatt	1021
T Y E G D K E S A Q G G I G E A I V D I	341
cctgaaattcctggattcaaggacctggagcctatggaacagtttatcgcccagggtggac	1081
P E I P G F K D L E P M E Q F I A Q V D	361
ctctgtgtcgattgtacaactggctgcctgaaagggctggccaatgtccagtgtagtgc	1141
L C V D C T T G C L K G L A N V Q C S D	381
ctgctgaaaaaatggctgccccagagatgtgccacttttcgctctaaaattcagggccag	1201
L L K K W L P Q R C A T F A S K I Q G Q	401
gtcgacaaaatcaaaggcgtggaggagactaa	1261
V D K I K G A G G D -	421

IV. Sequenzen

anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-CD40-pCR3 (hlgG2)

atgaacttcggcttcagcctgatcttcctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa	1
M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1
gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattcgagggtg	61
V K L V P R Q L D Y K D D D D K E F E V	21
cagctgctggaatctggcggaggacttgttcagcctggcggctctctgagactgtcttgt	121
Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C	41
gccgccagcggcttcaccttcagcagctatatcatgatgtgggtccgacaggccccctggc	181
A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G	61
aaaggccttgaatgggtgtccagcatctatcccagcggcggcatcaccttttacgccgac	241
K G L E W V S S I Y P S G G I T F Y A D	81
acagtgaagggcagattcaccatcagccgggacacagcaagaacaccctgtacctgcag	301
T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q	101
atgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgcccagaatcaagctgggc	361
M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G	121
accgtgaccaccgtggattattggggacagggcaccctggtcaccgtgtcctccagatcc	421
T V T T V D Y W G Q G T L V T V S S R S	141
tcgagtgctagcaccaagggcccacgtcttccccctggcgcctgctccaggagcacc	481
S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T	161
tccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccgaaccggtgacg	541
S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T	181
gtgtcgtggaactcagcgcgtctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacag	601
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q	201
tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacc	661
S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T	221
cagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagtt	721
Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V	241
gagcggcaatgttgtgtcagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtca	781
E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S	261
gtcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtc	841
V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V	281
acgtgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtg	901
T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V	301
gacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcagc	961
D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T	321
ttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtac	1021
F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y	341
aagtgcgaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaacc	1081
K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T	361
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgacc	1141
K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T	381
aagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgcacatcgccgtg	1201
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V	401
gagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccagcctcccagtgctggac	1261
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D	421
tccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag	1321
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q	441
gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcgagaag	1381
G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K	461
agcctctccctgtctccgggtaaagtgcagggacatcgatgactcagaaccactgtct	1441
S L S L S P G K V E D I V M T Q N P L S	481
ctgcctgtgtctctgggggatgaggctagcatttcttgcgctcatctcagtcactggag	1501
L P V S L G D E A S I S C R S S Q S L E	501
aactccaatggcaacaccttctgaattggttttccagaaacccggccagtcacctcag	1561
N S N G N T F L N W F F Q K P G Q S P Q	521

IV. Sequenzen

ctgctcatctaccgagtgagcaatcgggttagcggagtgcccgatcgattctctggtctc	1621
L L I Y R V S N R F S G V P D R F S G S	541
ggatctgggaccgactttaccctgaaaatctcacgagtgaggccgaggatctgggagtg	1681
G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V	561
tacttctgtctccaggtcacacatgtgccttacacatttggcggcgaacaactctcgaa	1741
Y F C L Q V T H V P Y T F G G G T T L E	581
atcaaaggaggcggaggctccggcggaggcggatctggcggaggcgggagtgatccag	1801
I K G G G G S G G G G S G G G G S D I Q	601
ctccagcagctggccctggactcgtcaaaccatctcagagcctgtctctcacctgttct	1861
L Q Q S G P G L V K P S Q S L S L T C S	621
gtcaccggatactccatcaccaccaactacaactggaattggattcggcagtttctctggg	1921
V T G Y S I T T N Y N W N W I R Q F P G	641
aacaaactcgaatggatgggatacatccgatacgcaggcactagtgaatacaccccatct	1981
N K L E W M G Y I R Y D G T S E Y T P S	661
ctcaaaaatcgggtgtccattaccgggacacttctatgaaccagttctttctccgactc	2041
L K N R V S I T R D T S M N Q F F L R L	681
acctctgtgacacctgaggataccgccacatactactgtgctagactggactactggggg	2101
T S V T P E D T A T Y Y C A R L D Y W G	701
caggaacactggtgaccgtgtcatcttaa	2161
Q G T L V T V S S -	721

anti-PD-L1-(Avelumab)-Flag-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (hlgG2)

atgaacttcggcttcagcctgatcttccctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa	1
M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1
gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattcgaggtg	61
V K L V P R Q L D Y K D D D D K E F E V	21
cagctgctggaatctggcggaggacttgttcagcctggcggctctctgagactgtcttgt	121
Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C	41
gccgccagcggcttcaccttcagcagctatatcatgatgtgggtccgacaggcccctggc	181
A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G	61
aaaggccttgaatgggtgtccagcatctatcccagcggcggcatcaccttttacgccgac	241
K G L E W V S S I Y P S G G I T F Y A D	81
acagtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcag	301
T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q	101
atgaacagcctgagagccgaggacaccgcccgtgtactactgcgccagaatcaagctggc	361
M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G	121
accgtgaccaccgtggattattggggacagggcaccctggtcaccgtgtcctccagatcc	421
T V T T V D Y W G Q G T L V T V S S R S	141
tcgagtgctagcaccaggcccatcggctcttccccctggcgccttgcctccaggagcacc	481
S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T	161
tccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacg	541
S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T	181
gtgtcgtggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacag	601
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q	201
tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacc	661
S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T	221
cagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagtt	721
Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V	241
gagcgcgaaatggtgtgctgagtgcccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtca	781
E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S	261
gtcttctcttccccccaaaaccgaagacaccctcatgatctcccggaccctgaggtc	841
V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V	281
acgtgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagacccccgaggtccagttcaactggtagctg	901
T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V	301

IV. Sequenzen

gacggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcagc	961
D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T	321
ttccgtgtgggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactgggtgaacggcaaggagtac	1021
F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y	341
aagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaacc	1081
K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T	361
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgacc	1141
K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T	381
aagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtg	1201
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V	401
gagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccattgctggac	1261
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D	421
tccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag	1321
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q	441
gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag	1381
G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K	461
agcctctccctgtctccgggtaaagaattccaggtccagctgcagcagctctggcgcgaa	1441
S L S L S P G K E F Q V Q L Q Q S G A E	481
gttattaagcctggcgcctccgtgaagctgagctgttaaagccagcggctacacctcagc	1501
V I K P G A S V K L S C K A S G Y T F S	501
agctactggatgcactgggtccgacaggtccaggacaaggcctggaatggatcggcgag	1561
S Y W M H W V R Q A P G Q G L E W I G E	521
atcaaccctggcaacggccacaccaactacaacgagaagttcaagagccgggcccactg	1621
I N P G N G H T N Y N E K F K S R A T L	541
accggcgataaccagcacaagcaccgtgtacatggaactgagcagcctgagaagcaggac	1681
T G D T S T S T V Y M E L S S L R S E D	561
accgctgtactactgcgccagatcctttaccaccgcccagagcctttgcctattggggc	1741
T A V Y Y C A R S F T T A R A F A Y W G	581
cagggaaactggtcaccgtgtccagcagatctagcacaaggccccaagctggaagag	1801
Q G T L V T V S S R S S T K G P K L E E	601
ggcgagtttagcgaggcccaattggacatcgtgatgactcagagccccgccttctctgtct	1861
G E F S E A Q L D I V M T Q S P A F L S	621
gtgaccctggcgagaaagtgaccatcacctgtagagccagccagaccatcagcgactac	1921
V T P G E K V T I T C R A S Q T I S D Y	641
ctgcactggatcagcagaagcccgatcaggcccctaagctgctgattaagtacgcctct	1981
L H W Y Q Q K P D Q A P K L L I K Y A S	661
cagagcatcagcggcatccccagcagattttctggcagcggctctggcaccgacttcacc	2041
Q S I S G I P S R F S G S G S G T D F T	681
ttaccatcagctccctggaagccgaggatgccgccactactattgtcaggacggccac	2101
F T I S S L E A E D A A T Y Y C Q D G H	701
agcttccctccaacctttggacagggcacaaagctggaaatcaagtaa	2161
S F P P T F G Q G T K L E I K -	721

anti-CD40-Flag-HC:scFv-4-1BB-(HBBK4)-pCR3 (N297A)

atgaacttcggcttcagcctgatcttctcgtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa	1
M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E	1
gtgaagctgggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattggatatac	61
V K L V P R Q L D Y K D D D D K E L D I	21
cagctccagcagctctggccctggactcgtcaaaccatctcagagcctgtctctcacctgt	121
Q L Q Q S G P G L V K P S Q S L S L T C	41
tctgtcaccggatactccatcaccaccaactacaactggaattggattcggcagtttctct	181
S V T G Y S I T T N Y N W N W I R Q F P	61
gggaacaaactcgaatggatgggatacatccgatacagcggcactagtgaatacacccca	241
G N K L E W M G Y I R Y D G T S E Y T P	81

IV. Sequenzen

tctctcaaaaatcgggtgtccattaccgggacacttctatgaaccagttcttttctccga	301
S L K N R V S I T R D T S M N Q F F L R	101
ctcacctctgtgacacctgaggataccgccacatactactgtgctagactggactactgg	361
L T S V T P E D T A T Y Y C A R L D Y W	121
gggcagggaaactggtgacctgtcatctggatccagcagcgcctctacaaagggccc	421
G Q G T L V T V S S G S S S A S T K G P	141
agcgtgttccctctggcccctagcagcaagagcacatctggcggaacagccgcctgggc	481
S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G	161
tgccctcgtgaaggactactttcccagaccctgacctgtcctggaactctggcgctctg	541
C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L	181
acaagcggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagagcagcggcctgtactctctgagc	601
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S	201
agcgtcgtgacagtgccagcagctctctgggcacccagacctacatctgcaactggaac	661
S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N	221
cacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaggtggaaccaagagctgcgacaagacc	721
H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T	241
cacacctgtccccctgtcctgccccgaactgctgggaggcccttccgtgttctctgttc	781
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F	261
ccccaaagcccagcaacacctgatgatcagccggacccccgaagtgcactgctgggtg	841
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V	281
gtggatgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttaattggtacgtggacggcgtggaa	901
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E	301
gtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagtacgccagcacctaccgggtggtg	961
V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V	321
tccgtgctgacagtgctgcaccaggactggctgaaacggcaagagtacaagtgcaaggtg	1021
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V	341
tccaacaagggcctgctgccccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccc	1081
S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P	361
cgcgaaaccccaggtgtacacactgcccccaagcagggacgagctgaccaagaaccaggtg	1141
R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V	381
tcctgacctgtctcgtgaaaggcttctaccccagcgatatcgccgtggaatgggagagc	1201
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S	401
aacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctca	1261
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S	421
ttcttctgtacagcaagctgacctggacaagtcccgtggcagcagggcaactgtgttc	1321
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F	441
agctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaacctacaccagaagtccctgagcctg	1381
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L	461
agccccggcaaggaattccaggtccagctgcagcagctctggcgccgaagttattaagcct	1441
S P G K E F Q V Q L Q Q S G A E V I K P	481
ggcgcctccgtgaagctgagctgtaaagccagcggctacaccttcagcagctactggatg	1501
G A S V K L S C K A S G Y T F S S Y W M	501
cactgggtccgacaggctccaggacaaggcctggaatggatcggcgagatcaacctggc	1561
H W V R Q A P G Q G L E W I G E I N P G	521
aacggccacaccaactacaacgagaagttcaagagccgggccaactgaccggcgatacc	1621
N G H T N Y N E K F K S R A T L T G D T	541
agcacaagcaccgtgtacatggaactgagcagcctgagaagcgaggacaccgctgtac	1681
S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y	561
tactgcgccagatcctttaccaccgcccagagcctttgctattggggccagggaaactg	1741
Y C A R S F T T A R A F A Y W G Q G T L	581
gtcaccgtgtccagcagatctagcacaagggcccaagctggaagagggcgagtttagc	1801
V T V S S R S S T K G P K L E E G E F S	601
gaggcccaattggacatcgtgatgactcagagccccgccttctgtctgtgacctggc	1861
E A Q L D I V M T Q S P A F L S V T P G	621
gagaaagtgaccatcacctgtagagccagccagaccatcagcgactacctgactggat	1921
E K V T I T C R A S Q T I S D Y L H W Y	641

IV. Sequenzen

cagcagaagcccgatcaggcccctaagctgctgattaagtacgcctctcagagcatcagc Q Q K P D Q A P K L L I K Y A S Q S I S	1981 661
ggcatccccagcagatTTTTctggcagcggctctggcaccgacttcacctttaccatcagc G I P S R F S G S G S G T D F T F T I S	2041 681
tccttgggaagccgaggatgccgccactactattgtcaggacggccacagcttccctcca S L E A E D A A T Y Y C Q D G H S F P P	2101 701
acctttggacagggcacaaagctggaaatcaagtaa T F G Q G T K L E I K -	2161 721

V. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Wajant für die Möglichkeit danken, dass ich meine Dissertation in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin anfertigen konnte. Vielen Dank für die schnelle und zielgerichtete Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Otto danken, der sich bereit erklärt hat meine Dissertation als Zweitgutachter zu betreuen.

Ein großes Dankeschön gilt dem ganzen Team der Abteilung. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme und Unterstützung, insbesondere beim Einarbeiten in die Labortätigkeiten. Ein besonderer Dank geht an Juliane und Johannes, die neben ihrer Arbeit immer ein offenes Ohr hatten und Zeit für mich gefunden haben.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, Freunde und Lisa danken. Danke für eure permanente Unterstützung und das Vertrauen in mich während der gesamten Zeit.