

**Antigen-spezifische T-Zellaktivierung
durch rekombinante Immunrezeptoren:
Evaluierung in einem
immunkompetenten Maus-Modell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Markus Chmielewski aus Lötzen (Ostpreußen)

Köln, März 2007

Berichterstatter: Prof. Dr. Hinrich Abken
Prof. Dr. Thomas Langer
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Jens C. Brüning
Tag der Disputation: 15. Juni 2007

Abstract

T cells with tumor specificity frequently lack the physiological repertoire of effector functions. A promising approach in adoptive immunotherapy is based on the induction of a specific cellular anti-tumor reaction by grafting cytolytic T cells with immunoreceptors with MHC independent binding. Here we investigated targeting of human and murine cytotoxic T cells towards tumor cells by expression of recombinant, CEA specific immunoreceptors. The immunoreceptors are modularly composed of an extracellular single chain antibody fragment (scFv) for binding and an intracellular signaling domain both of which are linked by the IgG Fc domain. In vitro cytotoxic human and murine T cells, genetically equipped with a carcinoembryonic antigen (CEA) specific immunoreceptor, secrete IFN- γ and specifically lyse CEA⁺ tumor cells upon binding. T cells with anti-CEA immunoreceptors that harbor both CD3 ζ and CD28 signaling domains in its cytoplasmatic moiety secreted higher amounts of IFN- γ than T cells with anti-CEA receptors that harbor the CD3 ζ and OX40 domains or the CD3 ζ domain only. The efficiency of CEA specific cytolysis by receptor grafted T cells is not affected by CD28 costimulation. Coinjection of CEA⁺ tumor cells and T cells grafted with CEA specific, CD28-CD3 ζ and CD3 ζ signaling immunoreceptor resulted in significant tumor protection in immunocompetent C57-Black/6 mice. Mice that successfully eliminated CEA⁺ tumor cells by receptor grafted T cells efficiently prevented CEA⁺ tumor growth upon tumor cell rechallenge. T cells triggered by the recombinant CD3 ζ immunoreceptor were more efficiently protected against reinjected tumor cells than mice which had received T cells triggered by the CD28-CD3 ζ immunoreceptor. Further investigations revealed that application of T cells with a CEA specific immunoreceptor results in generation of a CEA specific immunological memory. Based on our mouse studies, the immunoreceptor strategy provides a promising approach to prevent an early tumor relapse by generation of antigen specific memory, thereby substantially increasing the therapeutic spectrum of the immunoreceptor strategy.

Abstract

Inhaltstverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Tumorzellen entgehen der Überwachung durch das Immunsystem	1
1.2 Tumor-assoziierte Antigene	2
1.2.1 Das karzinoembryonale Antigen (CEA)	3
1.3 Entstehung der spezifischen Immuntherapie	4
1.4 Konstruktion rekombinanter Immunrezeptoren	6
1.5 Die <i>in vivo</i> Evaluierung des immuntherapeutischen Ansatzes	10
1.6 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Stammlösungen und Puffer	13
2.1.2 Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese	13
2.1.3 Größenmarker für die Gelelektrophorese	14
2.1.3.1 DNA Größenmarker	14
2.1.3.2 Protein Größenmarker	14
2.1.4 Lösungen und Puffer für den Western-Blot	14
2.1.5 Puffer und Säulen für den Auto-MACS TM	15
2.1.6 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze	15
2.1.7 Bakterienstämme	15
2.1.8 Zelllinien	16
2.1.9 Medien für die Zellkultur und die Medienzusätze	17
2.1.10 Antikörper, Antikörpercocktails, Antiseren und Zytokine	19
2.1.10.1 Primärantikörper	19
2.1.10.2 Konjugierte Sekundärantikörper	21
2.1.10.2.1 Peroxidase gekoppelte Antikörper	21
2.1.10.2.2 Phycoerythrin gekoppelte Antikörper	21
2.1.10.2.3 Biotin gekoppelte Antikörper	21

2.1.10.2.4 FITC gekoppelte Antikörper	22
2.1.10.3 Auto-MACS TM Antikörpercocktails	23
2.1.10.4 Antiseren	23
2.1.11 Sonstige Proteine	23
2.1.12 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer	24
2.1.13 Oligonukleotide	25
2.1.14 Vektoren	26
2.1.15 anti-ErbB2 Einzelketten-Antikörper (scFv)	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Präparation von Plasmid DNA	29
2.2.1.1 Midi-Präparation von Plasmid DNA durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule	29
2.2.1.2 Schnellpräparation von Plasmid DNA nach der Koch-(boiling) Methode	29
2.2.1.3 Ethanolfällung	30
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.2.1 Photometrische Bestimmung	30
2.2.2.2 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden	30
2.2.3 Präparation von RNA aus Mausmilzzellen	31
2.2.4 Gewinnung von cDNA mit Hilfe der Reversen Transkription	32
2.2.5 Polymerasekettenreaktion	32
2.2.6 DNA Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	34
2.2.7 Gelelektrophorese	35
2.2.7.1 Native Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.7.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.8 Western-Blot zur Molekulargewichtbestimmung der Proteine	36
2.2.9 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose durch Bindung an Siliziumpartikel	36
2.2.10 Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNA	37
2.2.10.1 Spaltung der doppelsträngigen DNA durch Restriktions- Endonukleasen	37
2.2.10.2 Ligation von DNA Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4 DNA Ligase	38
2.2.11 Bakterienkultur	38

2.2.11.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α Bakterien	38
2.2.11.2 Transformation chemokompetenter <i>E.coli</i> DH5 α Bakterien	39
2.2.11.3 Blau-weiß Selektion	39
2.2.12 Zellkultur	40
2.2.12.1 Allgemeine Kulturbedingungen	40
2.2.12.2 Splitten adhärenter Zellkulturen	40
2.2.12.3 Separation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Dichtezentrifugation	41
2.2.12.4 Präparation von mononukleären Zellen aus der Mausmilz	41
2.2.12.4.1 Separation von mononukleären Mausmilzzellen mittels Dichtezentrifugation	41
2.2.12.4.2 Anreicherung und Selektion verschiedener muriner Milzzellen	42
2.2.12.4.2.1 Selektion muriner CD8 ⁺ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellsortierung (MACS [®])	42
2.2.12.4.2.2 Depletion muriner CD3 ⁺ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellsortierung (MACS [®])	43
2.2.12.5 Aktivierung muriner T-Lymphozyten	43
2.2.13 Transfektion von 293T Tumorzellen	44
2.2.14 Herstellung der Zell-Lysate	44
2.2.15 Retrovirale Transduktion humaner peripherer Blutlymphozyten (PBL)	45
2.2.16 Retrovirale Transduktion muriner T-Lymphozyten	45
2.2.17 Stimulation humaner oder muriner T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptoren durch Ko-Kultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen	46
2.2.18 Enzym-gekoppelter-Immunadsorbanttest (ELISA)	46
2.2.18.1 Nachweis löslicher Zytokine mittels der Antibody capture Assay Methode	47
2.2.18.2 Nachweis CEA oder human IgG spezifischer Antikörper im Serum immunisierter Versuchstiere mittels der Antigen capture Methode	48
2.2.18.3 Konzentrationsbestimmung von murinen IgG Proteinen im Mausserum von Versuchstieren mittels der Antigen capture Methode	49
2.2.18.4 Nachweis anti-idiotypischer Antikörper gegen die BW431/26scFv und SCA-431scFv Bindedomäne aus dem Serum immunisierter Tiere	

mittels der modifizierten Antigen capture Assay Methode	50
2.2.19 XTT-basierender Zytotoxizitätstest	50
2.2.20 Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen	51
2.2.21 Kryokonservierung von Zellen	52
2.2.22 Mäusversuche	52
2.2.22.1 Gewinnung von Serumproben	52
3 Ergebnisse	53
3.1 Optimierung eines retroviralen Gentransfer-Protokolls für die Transduktion muriner T-Lymphozyten	53
3.2 Generierung muriner T-Zell Rezeptoren erster Generation mit Spezifität für CEA und CD30	55
3.2.1 Generierung der murinen CD3 ζ cDNA	55
3.2.2 Generierung der murinen CD28 cDNA	57
3.2.3 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #866 mit muriner CD3 ζ Signalkette	59
3.2.4 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #878 mit muriner CD28-CD3 ζ Signalkette	61
3.2.5 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #881 mit muriner CD3 ζ Signalkette	65
3.2.6 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #883 mit muriner CD28-CD3 ζ Signalkette	67
3.2.7 Expression der rekombinanten anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ oder CD28-CD3 ζ Signaltransduktionskette in Zellen der Linie 293T	70
3.2.8 Expression der rekombinanten murinen anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptoren in murinen CD3 ⁺ T-Lymphozyten	72
3.3 Generierung muriner T-Zell Rezeptoren zweiter Generation mit Spezifität für CEA oder CD30	74
3.3.1 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #892 mit muriner CD4 Transmembran- und CD3 ζ Signaldomäne	74
3.3.2 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #895 mit muriner CD4 Transmembran- und CD3 ζ Signaldomäne	76

3.3.3	Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #897 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ -OX40 Signalkette	78
3.3.4	Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #898 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ -OX40 Signalkette	83
3.3.5	Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #901 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette	85
3.3.6	Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #907 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette	89
3.3.7	Expression der rekombinanten anti-CEA (#895, #898, #907) und anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897, #901) auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T	93
3.3.8	Expression der rekombinanten anti-CEA (#895, #898 und #907) und anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897 und #901) auf der Oberfläche humaner T-Lymphozyten	95
3.3.9	Aktivierung humaner CD3 ⁺ T-Lymphozyten mit CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren nach Kreuzvernetzung mit immobilisierten anti-idiotypischen Antikörpern	97
3.3.10	Aktivierung humaner CD3 ⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Inkubation mit CEA ⁺ Tumorzellen	100
3.3.10.1	T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Rezeptoren werden durch Ko-Inkubation mit CEA ⁺ Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion aktiviert	101
3.3.10.2	Spezifische Zytolyse von CEA ⁺ Tumorzellen durch humane CD3 ⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren	102
3.3.11	Expression der rekombinanten anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptoren auf der Oberfläche muriner T-Zellen	104
3.3.12	Rezeptor-vermittelte Aktivierung muriner CD8 ⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren	107
3.3.12.1	Induktion der IFN- γ Sekretion	107
3.3.12.2	Spezifische Zytolyse	109
3.4	Generierung rekombinanter anti-CEA Immunrezeptoren, die aus murinen Domänen bestehen	111
3.4.1	Generierung des murinen anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977)	111
3.4.2	Generierung des murinen anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-	

mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978)	114
3.4.3 Generierung des murinen anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982)	116
3.4.4 Expression der rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T	119
3.4.5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Immunrezeptoren	120
3.4.6 Expression muriner anti-CEA Immunrezeptoren (#977, #978 und #982) auf der Oberfläche humaner T-Lymphozyten	122
3.4.7 Funktionelle Charakterisierung muriner T-Zell Rezeptoren #977, #978 und #982	123
3.4.8 Aktivierung humaner T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Kultur mit CEA ⁺ Tumorzellen	125
3.4.9 Spezifische Zytolyse von CEA ⁺ Tumorzellen durch humane T-Lymphozyten mit murinen anti-CEA Immunrezeptoren	127
3.4.10 Expression der murinen anti-CEA Immunrezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche von murinen CD3 ⁺ T-Zellen	129
3.5 <i>In vivo</i> Evaluierung des Immunrezeptoransatzes	131
3.5.1 Wachstumskinetik der murinen Kolonkarzinomzelllinie C15A3 (CEA ⁺ , CD30 ⁻) und MC-38 (CEA ⁻ , CD30 ⁻) in Versuchstieren	131
3.5.2 Eliminierung der CEA ⁺ C15A3 Tumorzellen <i>in vivo</i> durch murine T-Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren	132
3.5.2.1 <i>In vivo</i> Immunreaktion gegen CEA ⁺ Tumorzellen bei Ko-Injektion mit CEA spezifischen T-Zellen	133
3.5.2.2 <i>In vivo</i> Immunreaktion gegen Zellen der Kolonkarzinomzelllinie C15A3 bei wiederholter Injektion der Tumorzellen	135
3.5.3 Generierung der humoralen Immunantwort gegen Zellen mit CEA Expression durch Vakzinierung mit CEA ⁺ Tumorzellen	137
3.5.4 Generierung eines immunologischen Gedächtnisses gegen CEA ⁺ Tumorzellen nach Vakzinierung mit CEA spezifischen T-Zellen und CEA ⁺ Tumorzellen	141
3.5.5 Generierung eines immunologischen Gedächtnisses gegen CEA ⁺ Tumorzellen nach Vakzinierung mit CEA spezifischen T-Zellen und CEA ⁺ Tumorzellen in C57-B1/6 Mäusen ohne endogene CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	145

3.5.6	Immunogenität der rekombinanten Immunrezeptoren	149
3.5.6.1	Nachweis der Antikörper gegen die humanisierte BW431scFv oder die murine SCA-431scFv Bindedomäne im Blutserum der Versuchstiere	153
3.6	Generierung und funktionelle Charakterisierung rekombinanter Antikörper gegen das humane ErbB2	156
3.6.1	Generierung rekombinanter Proteine mit unterschiedlicher Affinität für ErbB2	156
3.6.2	Expression rekombinanter ErbB2 spezifischer Antikörper in 293T Zellen	159
3.6.3	Bindung löslicher ErbB2 spezifischer Antikörper an ErbB2 ⁺ Zellen	160
3.6.4	Kompetitive Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an ErbB2 ⁺ Tumorzellen durch Zugabe des löslichen ErbB2	161
3.7	Bindung CEA spezifischer Antikörper an membranständiges CEA	163
3.7.1	Keine kompetitive Hemmung der Bindung CEA spezifischer Antikörper an CEA ⁺ Tumorzellen durch Zugabe des löslichen CEA	164
3.8	Einfluss des löslichen Kompetitors ErbB2 auf die Aktivierung der IFN- γ Sekretion und der Antigen-spezifischen Zytolyse der Tumorzellen bei Ko-Inkubation humaner T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren und ErbB2 ⁺ Tumorzellen	165
3.8.1	Expression der rekombinanten ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ Signaltransduktionskette in humanen CD3 ⁺ T-Lymphozyten	166
3.8.2	Untersuchung der Aktivierung humaner T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Inkubation mit ErbB2 ⁺ Tumorzellen in Gegenwart des löslichen Kompetitors ErbB2	168
3.9	Generierung und funktionelle Charakterisierung des murinen CEA spezifischen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG	171
3.9.1	Expression und Nachweis der Funktionalität des murinen CEA spezifischen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG (#970)	176
4	Diskussion	178
4.1	Optimierung eines retroviralen Gentransfer-Protokolls für die Transduktion muriner T-Lymphozyten	178
4.2	Generierung, Expression und funktionelle Charakterisierung	

rekombinanter Immunrezeptoren	179
4.2.1 Optimierung der Rezeptorkonstruktion – Generierung der Immunrezeptoren der ersten und zweiten Generation	179
4.2.2 Funktionelle Charakterisierung rekombinanter CEA spezifischer Immunrezeptoren	181
4.3 <i>In vivo</i> Evaluierung des Immunrezeptoransatzes	185
4.4 Funktionelle Charakterisierung löslicher Antikörper mit Spezifität für humanes CEA und ErbB2 Protein	192
4.5 Einfluss des löslichen ErbB2 Proteins als Kompetitor auf die Rezeptor-vermittelte Aktivierung ErbB2 spezifischer T-Zellen	194
5 Zusammenfassung	196
6 Anhang	197
6.1 DNA Sequenzen der murinen CD3 ζ und CD28 Signalkette	197
6.1.1 # 857: pCR 2.1-murine-CD28	197
6.1.2 # 861: pCR 2.1-murine-CD3 ζ	198
6.2 DNA Sequenzen der rekombinanten Immunrezeptoren erster Generation mit Spezifität für CEA und CD30	198
6.2.1 # 866: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD3 ζ	199
6.2.2 # 878: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ	200
6.2.3 # 881: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD3 ζ	201
6.2.4 # 883: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ	202
6.3 DNA Sequenzen der rekombinanten Immunrezeptoren zweiter Generation mit Spezifität für CEA und CD30	204
6.3.1 # 892: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ	204
6.3.2 # 895: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ	206
6.3.3 # 897: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40	207
6.3.4 # 898: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40	208
6.3.5 # 901: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ	210
6.3.6 # 907: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ	211
6.4 DNA Sequenzen der rekombinanten Immunrezeptoren mit Spezifität für CEA, die aus murinen Domänen bestehen	212

6.4.1	# 977: pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ	213
6.4.2	# 978: pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40	214
6.4.3	# 982: pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ	216
7	Literaturverzeichnis	218

Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen, sowie physikalische SI-Basiseinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-präsentierende-Zelle
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
CEA	karzinoembryonales Antigen
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
ddNTP	Didesoxynukleotid-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ErbB2	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor B2 (Her-2/neu)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
Fc	Kristallisierbares Fragment
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isocyanat
Fv	variables Fragment

HBS	HEPES-gepufferte Saline
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HER-2/neu	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (ERBB2)
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL-15	Interleukin-15
IFN- γ	Interferon- γ
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-abhängiges Aktivierungs-Motiv
LB	Luria-Broth-Vollmedium
MACS	magnetisch-assoziierte Zellsortierung
MCS	multiple Klonierungsstelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ori	Startpunkt der Replikation
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA-L	Leucoagglutinin
PI	Propidiumjodid
RT	Raumtemperatur
scFv	Einzelketten-Antikörper
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAA	Tumor-assoziiertes-Antigen
TAE	Tris-HCl/Acetat/EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-HCl/EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'.-Tetramethylethylamin
TIL	Tumor-infiltrierende-Lymphozyten
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Amonomethan-Hydrochlorid
ÜN	Über Nacht
XTT	Natrium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4,tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzen Sulfonsäure Hydrat

1 Einleitung

Die adaptive Immunität basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten, die spezifische Rezeptoren besitzen, die es dem Immunsystem ermöglichen, eine Vielfalt von Antigenen zu erkennen. T-Lymphozyten sind eine tragende Säule der adaptiven Immunität. Nach Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an das prozessierte Antigen im MHC Komplex differenzieren T-Lymphozyten zu Effektorzellen, die die Pathogene eliminieren. Die adaptive Immunantwort beseitigt nicht nur effektiv Krankheitserreger, sie generiert gleichzeitig durch klonale Selektion einer erhöhte Zahl ausdifferenzierter Gedächtniszellen. Das erlaubt bei wiederholter Infektion eine schnelle und wirksame Reaktion. Während das adaptive Immunsystem uns erfolgreich gegen äußere Gefahren schützt, wird die Onkogenese von körpereigenen, gesunden Zellen zu Tumorzellen vom adaptiven Immunsystem toleriert. Diese Toleranzentwicklung gegenüber neoplastisch transformierten Zellen begünstigt die Entwicklung, das Wachstum und die Metastasierung maligner Tumore (Smyth *et al.*, 2001).

1.1 Tumorzellen entgehen der Überwachung durch das Immunsystem

Vielschichtige molekulare Mechanismen verleihen Tumorzellen Schutz vor dem Zugriff durch das Immunsystem (Stuhler *et al.*, 2002). Eine Immunantwort gegen entartete Zellen wird oftmals durch folgende intrinsische Mechanismen verhindert:

- Die zentrale und periphere Toleranz führt zur Eliminierung von Tumor-spezifischen T-Lymphozyten und somit zur Abwesenheit von Tumor-spezifischen T-Zellen am Tumor.
- Tumor-assoziierte-Antigene (TAA) werden oftmals unzureichend durch Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) präsentiert, was zur fehlenden Aktivierung, Proliferation und Persistenz von T-Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors führt, wodurch auch die pro-inflammatorischen Mechanismen ausbleiben (Speiser *et al.*, 1997).
- Ein Netzwerk von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) supprimiert die Aktivität von Tumor-spezifischen T-Lymphozyten am Tumor (Nomura *et al.*, 2005).

Zugleich können Tumorzellen durch eine Reihe von extrinsischen Mechanismen der Kontrolle durch das Immunsystem entgehen. Zu diesen extrinsischen Umgehungsmechanismen werden gezählt:

- Eine fehlende Antigenexpression auf der Tumorzelloberfläche führt zu einer geminderten Immunogenität des Tumors bei. Hierfür ist die unzureichende Expression und/oder die Dysregulation der Funktion einzelner Komponenten des MHC-Klasse I Komplexes sowie weiterer Proteine, die an der Prozessierung und dem Transport von Peptiden beteiligt sind, verantwortlich (Khong *et al.*, 2002).
- Die antigenmodulierende Immunselektion führt dazu, dass Tumorzellen mit keiner oder geringer Expressionsdichte des Tumorantigens einen Überlebensvorteil vor Tumorzellen haben, die eine hohe Expressionsdichte des Tumorantigens auf der Zelloberfläche aufweisen.
- Die Sekretion von Faktoren wie beispielsweise TGF- β , IL-10 und VEGF, die eine immunsuppressive Wirkung auf zytotoxische T-Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors haben, bewirkt eine tumorinduzierte Immunsuppression (Gorelik *et al.*, 2002; Salazar-Onfray *et al.*, 1999).
- Die Expression der Todesrezeptoren CD95 oder TRAIL, die das Signal zum programmierten Zelltod weiterleiten, wird oftmals bei Tumorzellen runterreguliert, wodurch die Tumorzellen unempfindlich gegenüber Todesrezeptor-vermittelten Apoptose durch zytotoxische T-Zellen werden. Störungen der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose tragen deshalb auch zur Resistenz gegenüber zytotoxischen T-Zellen bei (Kershaw *et al.*, 2005).

1.2 Tumor-assoziierte Antigene

Körperzellen, die typische Veränderungen auf dem Weg zur Tumorentstehung hin durchgemacht haben, werden von der zellulären Immunabwehr kontrolliert. Um jedoch vom Immunsystem erkannt zu werden, müssen Tumorzellen an ihrer Zelloberfläche Moleküle tragen, die überexprimiert oder modifiziert sind und sich somit deutlich von gesunden Zellen unterscheiden. Diese Moleküle werden auch als Tumor-assoziierte-Antigene (TAA) bezeichnet. Eine Vielzahl von Tumor-assoziierten Antigenen wurde innerhalb des letzten Jahrzehnts mit Hilfe immunologischer Methoden identifiziert (Spagnoli *et al.*, 2005). Tumor-assoziierte-Antigene werden in fünf Hauptgruppen

klassifiziert (Tab. 1). Damit entartete Zellen durch zytotoxische T-Zellen eliminiert werden, müssen Tumor-assoziierte-Antigene, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, nicht notwendigerweise fremd für das Immunsystem sein. Beispielsweise reaktivieren manche Tumorzellen die Expression von Glyko-Proteinen wie CEA, die während der Embryonalentwicklung exprimiert sind, die aber in ausdifferenzierten Zellen des Darmepithels nur eine untergeordnete Rolle spielen (Dwenger *et al.*, 1996). Manches TAA, wie beispielsweise ErbB2, wird in Folge einer Gen-Amplifikation überexprimiert, was ebenfalls einen Unterschied zu gesunden Zellen darstellt (Seliger *et al.*, 2000).

TAA-Typ	Beschreibung	Beispiele	Literaturhinweis
Differenzierungs-Antigene	Proteine, die durch alle Tumorzellen eines Histotyps exprimiert werden	Tyrosinase, gp100, MART/Melan, PSA	(Bakker <i>et al.</i> , 1994; Kawakami <i>et al.</i> , 1994; Litvinov <i>et al.</i> , 2006; Wolfel <i>et al.</i> , 1994)
embryonale Antigene	Proteine, die physiologisch in embryonalen Zellen exprimiert werden	CEA, AFP	(Kawashima <i>et al.</i> , 1999; Tsang <i>et al.</i> , 1999)
hochexprimierte Antigene	Proteine, deren Expressionsdichte hochreguliert wurde	HER-2/neu (ERBB2), p53, PRAME	(Erkanli <i>et al.</i> , 2006; Neumann <i>et al.</i> , 1998; Rongcun <i>et al.</i> , 1999)
mutierte Antigene	veränderte Formen der physiologisch exprimierten Proteine	CDK4, MUM, CASP-8	(Coulie <i>et al.</i> , 1995; Madruzzo <i>et al.</i> , 1997; Wolfel <i>et al.</i> , 1995)
Antigene viralen Ursprungs	virale transformierende Proteine (Bsp. Papillomviren)	E6, E7, HPV, HHV-8, HTLV-1	(Bieganowska <i>et al.</i> , 1999; Canham <i>et al.</i> , 2004; Rensing <i>et al.</i> , 1995; Tang <i>et al.</i> , 2004)

Tabelle 1: Beispiele für humane Tumor-assoziierte-Antigene (TAA)

1.2.1 Das karzinoembryonale Antigen (CEA)

CEA (CEACAM5, CD66e) wird in Kolonkarzinomen und fetalem Darmgewebe exprimiert, nicht aber im normalen adulten Darmgewebe. CEACAM (CEA *cell adhesion molecules*) oder CD66e Protein gehört zur Familie der Adhäsionsproteine, ist in der Plasmamembran verankert und hat ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa (Beauchemin *et al.*, 1999). Die Verankerung in der Lipiddoppelschicht wird durch Verknüpfung mit Glykosylphosphatidyl-inositol-Molekülen (GPI) am C-terminalen Ende des CEA Proteins ermöglicht (Takami *et al.*, 1988). CEA wird bei Erwachsenen als Bestandteil der Glykokalyx auf der apikalen Seite reifender und enddifferenzierter Enterozyten und Darmzotten exprimiert (Frangmyr *et al.*, 1999). Das CEA hat eine Bedeutung beim Schutz vor pathogenen Bakterien und wird sowohl in lipidgebundener

Form über die Vesikulation der Mikrovilli als auch in gelöster Form mit Hilfe der GPI-abhängigen Phospholipase C in das Darmlumen freigesetzt (Matsuoka *et al.*, 1991). CEA wird in pathologisch veränderten, aber tumorfreien Geweben, beispielsweise bei Divertikulitis oder Pankreatitis, erhöht exprimiert (Fletcher, 1986). Epithelialen Tumore, insbesondere Adenokarzinome exprimieren häufig CEA (Kinugasa *et al.*, 1998). CEA erleichtert Tumorzellen, sich von Tumorzellaggregaten zu lösen und sich wieder in fremden Geweben zu etablieren und so zur Metastasierung beizutragen (Levin & Griffin, 1991). Kolonkarzinom-Patienten weisen eine CEA Serumkonzentration, die zwischen 1,0 und 4,0 µg/ml Serum liegt (Moertel *et al.*, 1986). Dieser erhöhte Blutwert ist nicht zwingend indikativ für Tumore, da der CEA-Spiegel bei Rauchern dem eines Patienten mit metastasierendem Kolonkarzinom entsprechen kann.

1.3 Entwicklung der spezifischen Immuntherapie

Innerhalb der letzten Jahrzehnte führte die Forschung auf dem Feld der Immunologie und Onkologie zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, deren Zweck die Induktion einer spezifischen anti-Tumor Reaktion ist. Grundsätzlich unterscheidet man Antikörper-vermittelte Ansätze von immuntherapeutischen Ansätzen, die auf der Rekrutierung von Antigen-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten basieren.

Die Entwicklung der Hybridomtechnik ermöglichte die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die gegen ein definiertes Antigen auf der Tumorzelloberfläche zielen und damit im Unterschied zu Chemotherapeutika und Strahlenbehandlung anvisierte Zellen spezifisch binden. Die Arbeitsgruppe Goldberg hat monoklonale Antikörper mit Spezifität zu CEA generiert und in der Radioimmundiagnostik eingesetzt (Goldberg *et al.*, 1978). Jedoch ist die therapeutische Anwendung monoklonaler Antikörper *in vivo* durch die niedrige Halbwertszeit, unzureichende Gewebspenetration, ungenügende Immunstimulation und Reaktivität mit Normalgewebe limitiert (Pavoni *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu passiv penetrierenden Antikörpern weisen Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TILs), die aus Tumorinfiltraten von Tumoren, beispielsweise Melanom, gewonnen wurden, die Fähigkeit aktiver Tumorpenetration auf (Yazdi *et al.*, 2006). Desweiteren können Tumor-spezifische T-Lymphozyten eine anti-Tumor-Reaktion unterhalten, die sich in der langandauernden Induktion und Vermittlung einer komplexen Immunreaktion mit hoher zytolytischen Aktivität gegenüber Tumorzellen äußert (Rosenberg, 1996). Der therapeutische Einsatz Tumor-infiltrierender-

Lymphozyten (TIL) wurde bisher durch die aufwendige Präparation aus Tumorbiopsien und die meist unzureichende Menge an Tumorantigen-spezifischen T-Zellen limitiert. Verbesserte Kultivierungs- und Stimulationsprotokolle *in vitro* ermöglichten eine gesteigerte Proliferation von Tumorantigen spezifischen T-Zellen, die im Rahmen der Immuntherapie den Tumorpatienten in ausreichender Menge verabreicht werden konnten (Dudley *et al.*, 2003). Unter Verwendung von amplifizierten TILs wurde eine klinische Studie an Patienten mit metastasierendem Myelom, die nach Chemotherapie-bedingten Lymphozytendepletion mit autologen Tumor-reaktiven T-Zellen und Interleukin-2 (IL-2) behandelt wurden, durchgeführt. Nach erfolgter Behandlung mit TILs wurde in 51 % der Fälle eine Tumorrückbildung, bei ca. 10 % der Tumorpatienten eine vollständige Tumorregression registriert (Dudley *et al.*, 2005). Bei keiner dieser Studien zur adoptiven Immuntherapie wurden jedoch TILs appliziert, die spezifisch gegen ein definiertes Peptid-Antigen gerichtet waren. Prinzipiell ist ein solcher Ansatz als spezifische adoptive Immuntherapie denkbar, obwohl viele wichtige Fragen zu Migrationsverhalten, Lebensdauer und spezifischer *in vivo* Aktivität bisher offen geblieben sind.

Auf der anderen Seite ist es jedoch möglich mit Hilfe DNA-Transfertechniken ausreichend viele T-Lymphozyten mit T-Zell Rezeptoren mit Spezifität zum definierten TAA zu generieren. Beispielsweise wurde die DNA für die α - und β -Kette für Tumor-reaktive T-Zell-Rezeptoren (TCR) aus Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TIL) von Patienten mit NY-ESO-1-positiven Tumoren isoliert und zur Transduktion von Vorläufer und reifen T-Zellen verwendet. Die auf diese Weise TCR-modifizierten humanen T-Lymphozyten sind *in vitro* gegenüber Tumorzellen mit MHC Präsentation des NY-ESO-1 Antigens zytolytisch wirksam (Zhao *et al.*, 2005). In einem weiteren Ansatz wurden T-Zellen mit der DNA für die α - und β -Kette eines T-Zell-Rezeptors mit Spezifität zu Nukleoprotein (NP) des Influenzavirus transduziert und in einem *in vivo* Mausmodell untersucht. Es wurde gezeigt, dass T-Lymphozyten mit NP spezifischen T-Zell Rezeptoren gegenüber NP-positiven Tumorzellen zytolytisch wirksam sind und zur Regression der NP-positiven Tumore führen (Kessels *et al.*, 2001). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass das Auffinden von T-Zell Rezeptoren aus TILs mit Spezifität für ein definiertes Tumor-assoziiertes Antigen äußerst zeitintensiv ist und nicht immer gelingt (Yazdi *et al.*, 2006)

Aus diesem Grund wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt, das die Suche nach Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Rezeptoren vereinfacht. Zu diesem Zweck wurden

transgene Tiere, die humane MHC-Moleküle auf der Oberfläche von murinen T-Zellen exprimieren, erzeugt. Anschließend wurden die MHC-Moleküle mit Peptidfragmenten des humanen MDM2 Antigens beladen und durch MHC Komplexe *in vivo* präsentiert, was zur Generierung muriner T-Zellen mit TCR-Spezifität zum humanen MDM2 Antigen führte (Stanislawski *et al.*, 2001). Auf diese Weise können T-Zell Rezeptoren mit Spezifität zu einer Vielzahl Tumor-assoziiertes Antigene generiert werden, die in Peptidform mittels MHC-Moleküle präsentiert werden. Die so gewonnenen T-Zell Rezeptoren müssen allerdings vor dem therapeutischen Einsatz in Menschen humanisiert werden (Kershaw *et al.*, 2005). Ein wesentlicher Nachteil dieser MHC-abhängigen Immuntherapie ist die Beobachtung, dass oftmals die MHC-Präsentation von prozessierten Antigenfragmenten in neoplastisch transformierten Zellen dysreguliert ist und dass im Rahmen eines immuntherapeutischen Ansatzes T-Zell Rezeptoren generiert werden müssen, die für sämtliche MHC-Haplotypen spezifisch sind (Sadelain *et al.*, 2002; Seliger, 2005). Da zahlreiche Kohlenhydrat- und Glykolipidstrukturen Tumor-assoziierte-Antigene sind, die nicht mittels MHC-Komplexe präsentiert werden, kann eine wichtige Gruppe von Tumor-assoziierten Antigenen nicht als ein mögliches Ziel verwendet werden. Um diese Defizite auszugleichen, wurden Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren definierter und MHC-unabhängiger Spezifität für ein TAA, beispielsweise das Glykoprotein CEA, ausgestattet und deren Funktion *in vitro* erfolgreich nachgewiesen (Arakawa *et al.*, 2002).

1.4 Konstruktion rekombinanter Immunrezeptoren

Die Generierung rekombinanter T-Zell Rezeptoren zielt darauf, die umfangreichen Eigenschaften von T-Lymphozyten zur Induktion und Modulation einer komplexen Immunantwort mit den spezifischen Bindungseigenschaften von monoklonalen Antikörpern zu verknüpfen. Derartige rekombinante Rezeptoren bestehen aus einer Antigen-bindenden Domäne, abgeleitet aus einem Einzelketten-Antikörper (scFv), welche mit Hilfe eines extrazellulären Gelenks mit intrazellulären Signaldomäne verbunden ist (Abb. 1). T-Zellen mit TAA-spezifischen Rezeptoren induzieren nach Bindung an das Zielantigen eine spezifische Immunantwort gegen die TAA-positive Zielzelle, die abhängig von der ausgewählten (ko)stimulatorischen Signalkette(n) zu einer komplexen T-Zell-Antwort führt. Bevorzugt wird die CD3 ζ Signalkette eingesetzt,

die mit einer ko-stimulatorischen Domäne, wie beispielsweise CD28, OX40 oder 4-1BB, verknüpft wird. Nach diesem Konstruktionsschema ist eine Reihe von rekombinanten Immunrezeptoren konstruiert und deren Funktion *in vitro* nachgewiesen worden (Tab. 2).

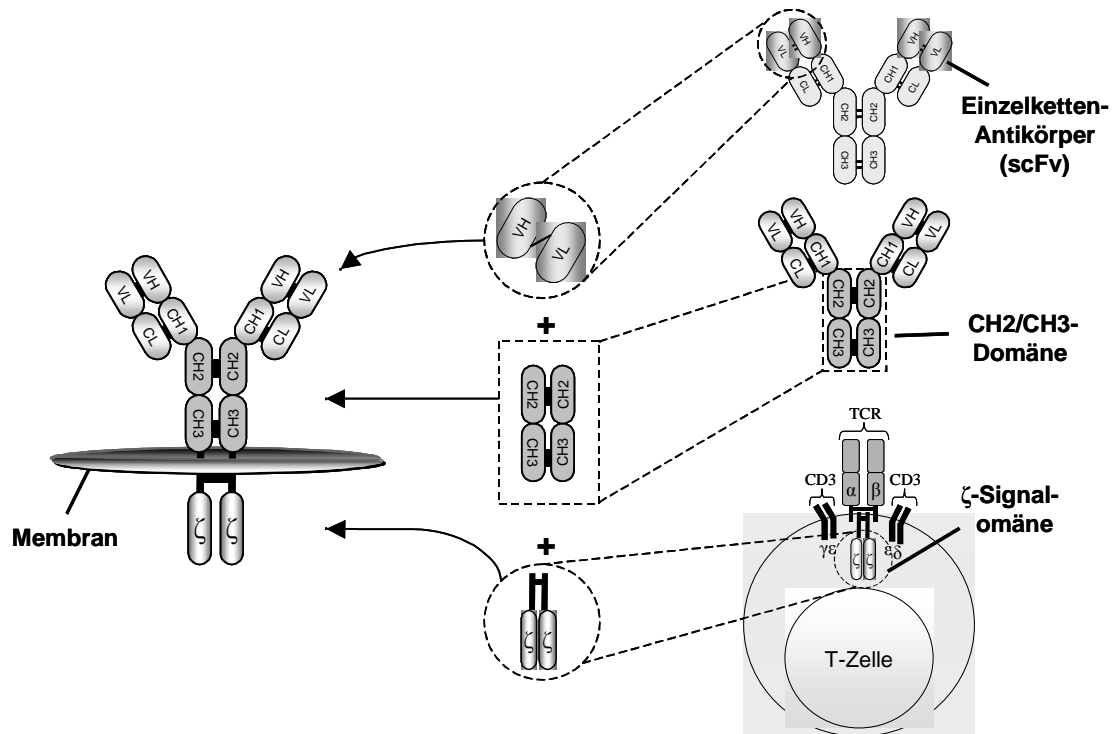


Abbildung 1: Konstruktion eines rekombinanten Immunrezeptors. Die Antigen-bindende Domäne des Rezeptors wird von der Einzelketten-Bindedomäne (scFv) eines monoklonalen Antikörpers mit der Spezifität für ein Tumor-assoziiertes-Antigen (TAA) abgeleitet, dessen variable Regionen V_H und V_L mit Hilfe einer flexiblen, Glycin-reichen Aminosäuresequenz miteinander verbunden sind. Der konstante Fc-Anteil eines IgG₁ stellt über die Transmembrandomäne die Verbindung zu der intrazellulären CD3ζ Signaldomäne her.

Die Generierung rekombinanter Immunrezeptoren mit MHC-unabhängiger Antigenerkennung erfordert den Einsatz von Einzelketten-Antikörpern (scFv) mit definierter Spezifität für ein TAA. Die Grundlage hierfür sind die variablen Regionen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Kette monoklonaler Antikörper, die mit Hilfe eines flexiblen (Gly₄Ser)₃-„Linkers“ zu einer Polypeptidkette verbunden werden (Huston *et al.*, 1988). Die Spezifität und Affinität derartig modifizierter Bindedomänen bleibt im Vergleich zum ursprünglichen Antikörper gleich (Reinhold *et al.*, 1999; Huston *et al.*, 2001). Mit Hilfe der Phagen-Display-Methode wurde eine Reihe von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern aus vorhandenen cDNA-Bibliotheken isoliert und für die Generierung TAA-spezifischer scFv-Bindedomänen bereitgestellt (Itoh *et al.*, 2003).

Tumorart	Tumor-assoziiertes-Antigen	Signal-domäne	Literaturhinweis
B-Zell-Lymphom	CD19	CD3 ζ 4-1BB-CD3 ζ	(Brentjens <i>et al.</i> , 2003; Imai <i>et al.</i> , 2004)
Kolonkarzinom	CEA CA19-9	CD3 ζ CD28-CD3 ζ	(Haynes <i>et al.</i> , 2001 und 2002; Hombach <i>et al.</i> , 2000) (Gilham <i>et al.</i> , 2006)
Ovarialkarzinom	FBP	Fc ϵ RI γ	(Hwu <i>et al.</i> , 1995; Kershaw <i>et al.</i> , 2002)
Mammakarzinom und andere Karzinome	ERBB2	CD3 ζ CD28-CD3 ζ	(Chmielewski <i>et al.</i> , 2004; Teng <i>et al.</i> , 2004; Stancovski <i>et al.</i> , 1993)
Prostatakarzinom	PSMA	CD28-CD3 ζ	(Maher <i>et al.</i> , 2002)
verschiedene Karzinome	KDR	CD3 ζ	(Kershaw <i>et al.</i> , 2000)
Adenokarzinom	TAG72	CD3 ζ	(McGuinness <i>et al.</i> , 1999)
Melanom	GD3	CD3 ζ	(Yun <i>et al.</i> , 2000)
Neuroblastom	GD2	CD3 ζ	(Rossig <i>et al.</i> , 2001)
Nierenkarzinom	CA9	Fc ϵ RI γ CD4-Fc ϵ RI γ	(Wejitens <i>et al.</i> , 1996; Lamers <i>et al.</i> , 2002)

Tabelle 2: Auflistung von Immunrezeptoren mit Spezifität zu zahlreichen Tumor-assoziierten-Antigenen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass das Einfügen einer IgG₁-(CH₂/CH₃) Gelenkregion, die als Bindeglied zwischen der Einzelketten-Antikörper (scFv) und der Signaldomäne des Immunrezeptors fungiert, einerseits zur stabileren Expression des rekombinanten Proteins auf der Oberfläche von T-Lymphozyten beiträgt und andererseits die Signalgenerierung der T-Zelle beeinflusst (Moritz *et al.*, 1995; Hombach *et al.*, 1998; Hombach *et al.*, 2000) Zudem wird die IgG₁ Domäne zur Detektion rekombinanter Immunrezeptoren auf der Zelloberfläche transduzierter T-Lymphozyten verwendet, da häufig keine anti-idiotypischen Antikörper gegen die Bindedomäne des Rezeptors verfügbar sind.

Die Bindung des rekombinanten Immunrezeptors an ein Antigen führt direkt zur intrazellulären Aktivierung der T-Zelle, deren Ausmaß unmittelbar von der Signaltransduktionskette des rekombinanten Immunrezeptors abhängt (Haynes *et al.*,

2001). Bevorzugt wird die endogene CD3 ζ Signalkette des TCR-Komplexes, die über drei Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motive (ITAM) verfügt, als Aktivierungsdomäne in rekombinanten Immunrezeptoren verwendet (Tab. 2). Kinasen aus der Src-Kinasen-Familie (SKF) tragen zur Phosphorylierung der Tyrosinreste an den drei CD3 ζ ITAM-Motiven bei (Banyash *et al.*, 1988; Iwashima *et al.*, 1994). An der Phosphorylierungsreaktionen ist die Lck und die Fyn Kinase beteiligt (Weiss *et al.*, 1994; van Oers *et al.*, 1996). Zugleich wird das ZAP-70 Protein rekrutiert und in die phosphorylierte und somit katalytisch aktive Form umgewandelt (Hatada *et al.*, 1995). Das Protein ZAP-70 leitet die Phosphorylierungskaskade weiter und führt zur Rekrutierung des LAT Proteins (*Linker for activation of T-cells*), das an der Bildung des T-Zell Aktivierungskomplexes beteiligt ist (Zhang *et al.*, 1996).

Eine vollständige T-Zell Aktivierung benötigt, neben der Bindung des endogenen TCR-Komplexes an prozessiertes und MHC-abhängig präsentierte Antigen, ein ko-stimulatorisches CD28 Signal. Die T-Zelle verbleibt im Zustand der Anergie, trotz Bildung des TCR-MHC Antigen-Komplexes, bei Fehlen des ko-stimulatorischen CD28 Signals. Dieser Zustand der peripheren Immuntoleranz schützt den Organismus vor naiven autoreaktiven T-Lymphozyten, die Auto-Antigene auf Gewebezellen erkennen. Durch die Interaktion zwischen dem CD28 Molekül der T-Zelle und dessen Liganden B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) auf der Antigen-präsentierenden-Zelle (APC) wird diese Selbst-Toleranz durchbrochen (Bonnevier *et al.*, 2006). Humane T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren und einer CD28-CD3 ζ Signalkette (Abb. 2) werden nach Bindung an CEA und Kreuzvernetzung des Rezeptors zur IFN- γ und IL-2 Sekretion, sowie Zytolyse von CEA-positiven Tumorzellen aktiviert. T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren und einer CD3 ζ Signalkette werden nach Bindung an CEA-positive Tumorzellen nicht zur IL-2 Sekretion und weniger stark zur IFN- γ Sekretion als T-Zellen mit gleicher Spezifität und einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette aktiviert (Hombach *et al.*, 2001). Untersuchungen ergaben, dass humane T-Lymphozyten mit CEA-spezifischen Immunrezeptoren und einer CD28-CD3 ζ Signalkette gleich oder höher zur Zytolyse von CEA-positiven Tumorzellen aktiviert werden als T-Zellen mit einer CD3 ζ Signalkette (Hombach *et al.*, 2001 und 2002). Eine weitere Wirkung der CD28 Stimulation ist die Transkription von bcl-2 und bcl-x1, deren Produkte den programmierten apoptotischen Zelltod der Effektorzelle verhindern (Mor *et al.*, 1996; Radvani *et al.*, 1996). Für die Optimierung der Rezeptor-vermittelten T-Zell Aktivierung stehen neben CD3 ζ und CD28 weitere interessante

Signalmodule, beispielsweise OX40, zur Verfügung. Das ko-stimulatorische Protein OX40 (CD134) ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (TNFR). Eine erhöhte OX40 Expression wird nicht in naiven, jedoch in aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten nach TCR vermittelten Aktivierung beobachtet (Gramaglia *et al.*, 1998). Eine gezielte Stimulation des OX40 Rezeptors führt zur gesteigerten klonalen T-Zell Expansion und verstärkten Generierung von Gedächtnis-T-Zellen (Croft, 2003). Zudem führt die Bindung des OX40 Liganden an den OX40 Rezeptor einerseits zur Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13, andererseits wird die Generierung IL-10 sezernierender CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) supprimiert (Ito *et al.*, 2005).

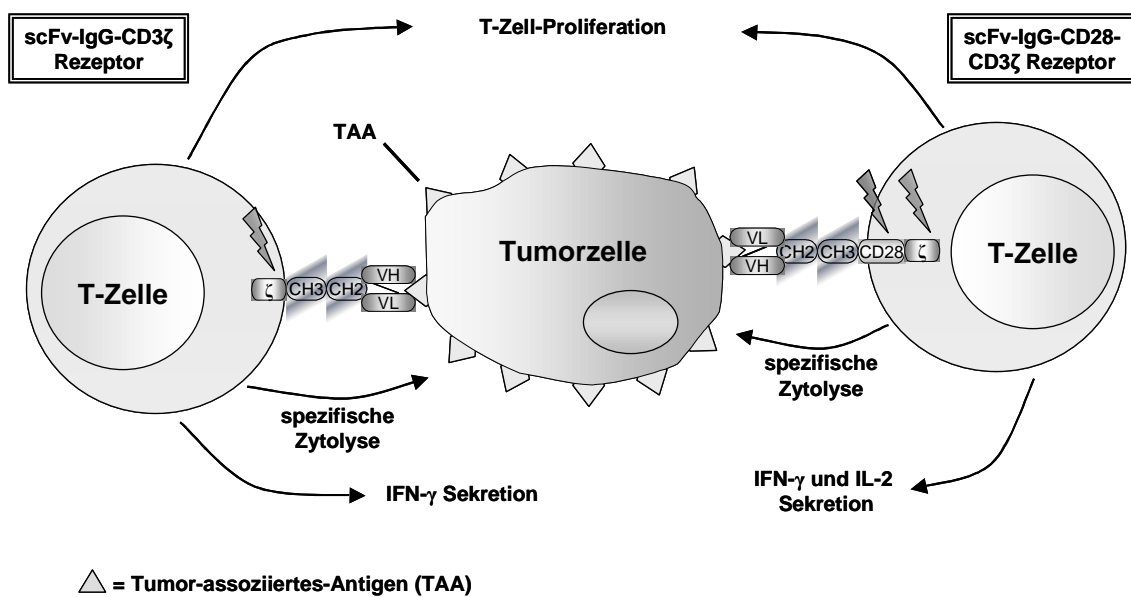


Abbildung 2: T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren werden MHC-unabhängig durch TAA-positive Tumorzellen zellulär aktiviert.

1.5 Die *in vivo* Evaluierung des immuntherapeutischen Ansatzes

Innerhalb der letzten Jahre wurde eine Reihe von Mausmodellen entwickelt, um den therapeutischen Nutzen von TAA spezifischen T-Lymphozyten zu untersuchen. So wurde gezeigt, dass murine T-Lymphozyten, ausgestattet mit dem anti-CEA_{scFv}-FcεRI_γ-Rezeptor, zur partiellen oder vollständigen Regression von etablierten CEA-positiven Tumoren, sowohl in der *scid* als auch in der syngenon C57/BL6 Maus, beitragen (Darcy *et al.*, 2000). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wurden

zwei rekombinante Immunrezeptoren mit derselben Spezifität zu CEA, aber unterschiedlichen Signaltransduktionsketten miteinander verglichen (Haynes *et al.*, 2001). Dabei zeigte sich, dass T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ Signaldomäne in der Induktion der T-Zell Aktivierung effektiver sind als mit einer γ Signalkette, angezeigt *in vitro* durch eine erhöhte IFN- γ -Sekretion nach Bindung an CEA-positive Tumorzellen und gesteigerter Lyse von CEA-positiven Tumorzellen. Im nachfolgenden *in vivo* Experiment wurde gezeigt, dass das Wachstum des CEA-positiven Tumors, sowohl in der *scid* als auch der syngenen C57/BL6 Maus, durch T-Zellen mit dem anti-CEA_{scFv}-CD3 ζ Immunrezeptor stärker gehemmt wurde als durch T-Zellen mit dem rekombinanten anti-CEA_{scFv}- γ Immunrezeptor.

Eine abgewandelte immuntherapeutische Strategie beruht auf der Generierung von T-Zellen mit Spezifität zum *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) Antigen, das an der Angiogenese beteiligt ist (Niedermann *et al.*, 2002). Hierfür hat die Arbeitsgruppe um T.M.J. Niedermann einen anti-VEGF_{scFv}-CD3 ζ Rezeptor konstruiert und in murinen CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Die *in vitro* Voruntersuchungen zeigten einen zytotoxischen Effekt von CD8⁺ Mauszellen mit VEGF spezifischen Rezeptor auf VEGF-positive Tumorzellen, wobei CD8⁺ T-Zellen mit VEGF spezifischen Rezeptoren in Mäusen (C57/BL6) mit etablierten, syngenen Tumoren das Tumolvolumen reduzierten. Eine gesteigerte Tumorrückbildung setzte ein, wenn VEGF spezifische CD8⁺ T-Zellen in einer Kombination mit dem konventionellen Angiogenese-Inhibitor TNP-470 systemisch den Versuchstieren mit syngenen Tumoren injiziert wurden.

Eine optimierte T-Zell Aktivierung wurde durch Generierung von ErbB2 spezifischen Rezeptoren mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette erreicht (Haynes *et al.*, 2002). Murine CD8⁺ T-Lymphozyten mit anti-ErbB2_{scFv}-CD28-CD3 ζ Rezeptoren wurden nach Antigenbindung stärker zur IFN- γ Sekretion aktiviert als T-Zellen mit anti-ErbB2_{scFv}-CD3 ζ Immunrezeptoren. Das *in vivo* Experiment an *scid* Mäusen zeigte, dass die Applikation von CD8⁺ T-Zellen mit anti-ErbB2_{scFv}-CD28-CD3 ζ Rezeptoren in Versuchstieren mit subkutan etablierten, ErbB2-positiven Tumoren, zu einer stärkeren Hemmung des Tumorwachstums führte als die Applikation von CD8⁺ T-Zellen mit anti-ErbB2_{scFv}-CD3 ζ Immunrezeptoren.

1.6 Zielsetzung

Die Onkogenese geht oft mit dem Verlust der MHC-abhängigen Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche einher. Dennoch exprimieren die meisten Tumore sogenannte Tumor-assoziierte-Antigene (TAA), unter anderem Polypeptide, Carbohydrate und Glykolipide. Diese sind jedoch Autoantigene, für die T-Zellen mit hoher Avidität und Spezifität dem Organismus fehlen. Es wird versucht, dieses Defizit durch einen neuen immuntherapeutischen Ansatz zu überwinden. Hierfür werden T-Zellen mit rekombinanten Rezeptoren ausgestattet, die aus einer extrazellulären Bindedomäne, einer CH2-CH3-„spacer“ Domäne und einer intrazellulären Signalkette, bevorzugt CD3 ζ Signalkette, bestehen. Um die Rezeptor-vermittelte T-Zell Aktivierung zu optimieren, kann ein weiteres Modul, beispielsweise die ko-aktivierende CD28 Signalkette, mit der CD3 ζ Signalkette kombiniert und im Rezeptor integriert werden.

Im Rahmen der Promotionsarbeit soll die Immunrezeptor-Strategie am Beispiel rekombinanter T-Zell Rezeptoren mit Spezifität zum tumorassoziierten Glykoprotein CEA in einem immunkompetenten Maus-Modell evaluiert werden. Dafür müssen murine Immunrezeptoren mit Spezifität zu CEA generiert, retroviral verpackt und in murinen T-Zellen exprimiert werden, um mittels Ko-Kultur mit CEA⁺ Tumorzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur zellulären T-Zell Aktivierung, angezeigt durch IFN- γ Sekretion und Zytolyse CEA⁺ Tumorzellen, *in vitro* charakterisiert zu werden. Die *in vivo* Testung des immuntherapeutischen Ansatzes erfolgt im immunkompetenten Tiermodell mit C57-B1/6 Mäusen durch Applikation von syngenem CEA-positiven Tumorzellen zusammen mit murinen T-Zellen, die mit CEA spezifischen Rezeptoren ausgestattet werden. Hierbei sollen Rezeptoren mit einer CD3 ζ Signaleinheit mit Rezeptoren mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette hinsichtlich ihrer Effizienz bei der primären Tumorprotektion verglichen werden. Weiterhin soll die Generierung eines immunologischen Gedächtnisses in einem „Rechallenge“ Experiment mit syngenem CEA⁺ Tumorzellen untersucht werden. Neben der Effizienz sollen auch die Sicherheitsuntersuchungen des immuntherapeutischen Ansatzes durchgeführt werden. Durch die Untersuchung der Immunogenität des rekombinanten Rezeptors soll in der C57-Black/6 Maus analysiert werden, in wie weit das rekombinante Rezeptorprotein bei mehrmaligen Applikation der Rezeptor-exprimierenden T-Zelle immunogen ist.

Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, in einem immunkompetenten Tier-Modell einen klinischen Einsatz von rekombinanten T-Zell Rezeptoren in der adoptiven Immuntherapie zu evaluieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stammlösungen und Puffer

PBS

8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,2 g/l KH₂PO₄; pH 7,4

PBS/T

PBS mit 0,1% (v/v) Tween[®]-20 (Merck, Darmstadt)

RNase-Stammlösung

100 U/ml RNase A und 8000 U/ml RNase T1 werden für 15 min bei 100°C in 15 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 inkubiert

Tris-HCl

10 mM Tris-Base, eingestellt mit 37 %-igen HCl-Säure auf pH 8,4

2.1.2 Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer

2M Tris-HCl; 57,1 ml/l Eisessig; 50 mM EDTA, pH 8,5

Ethidiumbromid

Ethidiumbromid wird in *aqua bidest* in einer Stammlösung 10 mg/ml in H₂O angesetzt.

10 x SDS-Gelelektrophorese-Puffer

30,2 g Tris-Base; 188g Glycin; 100 ml 10% Natrium-dodecylsulfat (SDS) ad 1 l in *aqua dest*

6 x Gel-Beladungspuffer für native Agarosegele

0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 40 % (w/v) Saccharose

2.1.3 Größenmarker für die Gel-Elektrophorese

2.1.3.1 DNA Größenmarker, (GibcoBRL, Eggenheim)

Größenstandard	dsDNA Fragmentgröße (bp)
1 kb DNA-ladder	12216, 11198, 10180, 9162, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506/517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
100 bp DNA-ladder	2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
Größenstandard	dsDNA Fragmentgröße (bp)
1 kb DNA-ladder	12216, 11198, 10180, 9162, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506/517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
100 bp DNA-ladder	2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

2.1.3.2 Protein Größenmarker

Precision Plus Protein™-Standards, (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Der Standard enthält rekombinante, gefärbte Proteine, deren Molekulargewicht zwischen 10 kDa und 250 kDa liegt.

Fragmentgröße (bp)	Volumen Low DNA mass™ ladder		
	2 µl	4 µl	8 µl
2000	100 ng	200 ng	400 ng
1200	60 ng	120 ng	240 ng
800	40 ng	80 ng	160 ng
400	20 ng	40 ng	80 ng
200	10 ng	20 ng	40 ng
100	5 ng	10 ng	20 ng

2.1.4 Lösungen und Puffer für den Western-Blot

Transfer-Puffer

2,9 g Glycin; 5,8 g Tris-Base; 0,37 g SDS; 200 ml Methanol ad 1l *aqua bidest*

Blocking-Puffer

50 ml 'Roti-Block' (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA); 5% (w/v) Milchpulver

(Glücksklee)

2.1.5 Puffer und Säulen für den Auto-MACSTM

MACS[®]-Waschpuffer

PBS (1x), pH 7,4 supplementiert mit FCS 1,0 % (v/v) und EDTA 2 mM

MACS[®]-Trennpuffer

PBS (1x), pH 7,4 supplementiert mit EDTA 2 mM

Auto-MACSTM column (Trennsäulen)

(*Product code*: 130-021-101, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

2.1.6 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze

Alle Nährmedien wurden vor dem Gebrauch 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze (z.B. Antibiotika) wurden steril filtriert und dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

LB-Medium

10g/l Trypton; 5g/l Hefe-Extrakt; 10g/l NaCl

LB-Agar

1l LB-Medium; 15g Bacto-Agar

Ampicillin- und Kanamycin-Stocklösung

100 mg/ml Ampicillin (Merck, Darmstadt) in H₂O, steilfiltriert. Die eingesetzte Ampicillin-Konzentration zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienstämme in LB-Medium betrug 0,1 mg/ml.

50 mg/ml Kanamycin (Merck, Darmstadt) in H₂O, steilfiltriert. Die eingesetzte Kanamycin-Konzentration zur Selektion Kanamycin-resistenter Bakterienstämme in LB-Medium betrug 50 µg/ml.

2.1.7 Bakterienstämme

***E.coli* DH5 α**

F⁻, end A1, hsd R17 (r_K⁻, m_K⁻) sup E44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15 (Woodcock *et al.*, 1989)

***E.coli* Top10[®]** (Invitrogen)

F⁻, mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.8 Zelllinien und primäre Zellen.**293T**

(Pear, 1993) Derivat von 293-Zellen, die das SV40 *large* T-Antigen exprimieren. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10 % (v/v) FCS kultiviert.

BW2064/36

Hybridomzelllinie, sezerniert monoklonalen, anti-idiotypischen Antikörper des Isotyps IgG₁ gegen die Bindedomäne des CEA-spezifischen BW431/26 Antikörpers.

C15A3

J. Shively (City of Hope Graduate School, Duarte, CA, USA). Zellen der Kolonkarzinomzelllinie MC-38 wurden stabil mit der DNA für CEA transfiziert. Die Arbeitsgruppe um J.Shivley hat hierfür einen Expressionsvektor mit Neomycin-Resistenz verwendet. Um die CEA Expression zu halten, werden C15A3 Zellen in RPMI 1640 Medium 10 % (v/v) FCS und G418 0,2 mg/ml RPMI kultiviert.

Colo320 (ATCC CCL-220)

CEA-negative kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10 % (v/v) FCS kultiviert.

LS174T (ATCC CCL 253)

CC49- und CEA-exprimierende humane Kolonkarzinomzelllinie. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS kultiviert.

MC-38

Murine Kolonkarzinomzelllinie, J. Schlom (*National Cancer Institute* NIH, Bethesda, MD, USA). Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS kultiviert.

SK-OV-3

(Lamendola *et al.*, 2003)

ERBB2-exprimierende humane Ovarialkarzinom-Zelllinie. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS kultiviert.

Humane periphere Blutlymphozyten (PBL)

Die humanen T-Lymphozyten wurden aus „buffy coats“ gewonnen und stammen von gesunden, zufällig ausgesuchten Spendern der Blutbank der Universität zu Köln. Die isolierten Lymphozyten werden in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS, IL-2 (200 U/ml) kultiviert.

Mausmilz Lymphozyten

Lymphozyten wurden aus Mausmilzen der C57-black/6 Maus präpariert. Die Spendertiere wurden von der Firma Charles River geliefert. Die murinen Lymphozyten werden in RPMI 1640 Medium (dutch modification), 10% (v/v) FCS, IL-2 (200 U/ml), IL-15 (5 ng/ml) und 2% (v/v) L-Glutamat kultiviert.

2.1.9 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze.**RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX™ für Kultivierung von Zelllinien und primären humanen Zellen**

(*Product Code 61870-010*, GibcoBRL, Eggenheim). Formulierung mit GlutaMAX™ und:

Kalziumnitrat (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	0,424 mM
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0,407 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5,33 mM
Natriumbikarbonat (NaHCO ₃)	23,81 mM
Natriumchlorid (NaCl)	103,45 mM
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) Anhydrat	5,63 mM

RPMI 1640 Medium (Dutch modification) für Kultivierung von primären Mauszellen

(*Product Code 22409-015*, GibcoBRL, Eggenheim). Formulierung ohne L-Glutamat und:

Kalziumnitrat (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	0,424 mM
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,407 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5,33 mM
Natriumbikarbonat (NaHCO ₃)	11,90 mM
Natriumchlorid (NaCl)	110,34 mM
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) Anhydrat	5,63 mM
HEPES	0,0133 mM

Fetales Kälberserum (FCS)

(Biochrom KG, Berlin)

L-Glutamin

(*Product Code 25030-081*, GibcoBRL, Eggenheim)

Natrium-Pyruvat

(*Product Code 11360-039*, GibcoBRL)

Nicht-essentielle Aminosäuren

(*Product Code 11140-035*, GibcoBRL)

β-Mercaptoethanol

(*Product Code 21985-023*, GibcoBRL)

PHA-L

(*Product Code L4144*, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)

Ciprofloxacin

(*Ciprobay*, Bayer AG, Leverkusen)

Eingesetzte Konzentration: 4 µg/ml

Penicillin-Streptomycin

(GibcoBRL, Eggenheim)

Eingesetzte Konzentration: 50 IE/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

2.1.10 Antikörper, Antikörpercocktails, Antiseren und Zytokine

2.1.10.1 Primärantikörper

Ziege-anti-human IgG₁

(Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA), polyklonales Serum

Ziege-anti-Maus IgG₁

(Southern Biotechnology)

polyklonales Serum

Human IgG Isotyp-Kontrolle

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

Maus IgG Isotyp-Kontrolle

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

Maus anti-human Interferon- γ Antikörper

(PharMingen, Hamburg), Klon-Nr.: NB42

Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon- γ .

Kaninchen anti-Maus/Ratte Interferon- γ Antikörper

(Biosource, Camarillo, USA)

Polyklonaler Antikörper gegen murines Interferon- γ .

Maus anti-human Interleukin-2 Antikörper

(PharMingen), Klon-Nr.: 5344-111

Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-2.

Kaninchen anti-human CEA Antikörper

(Abcam, Cambridge, GB)

Polyklonaler Antikörper gegen CEA.

SCA431 monoklonaler Antikörper

(Behringer Werke, Hr. Dr. K. Bosslet, Marburg)

Muriner monoklonaler Antikörper gegen CEA.

BW431/26 monoklonaler Antikörper

(Behringer Werke, Hr. Dr. K. Bosslet, Marburg)

Humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CEA, abgeleitet vom SCA431 mAk.

BW2064/36 monoklonaler Antikörper

(Behringer Werke, Hr. Dr. K. Bosslet, Marburg)

Muriner monoklonaler anti-idiotypischer Antikörper mit Spezifität für SCA431 mAk und BW431/26 mAk.

H10 monoklonaler Antikörper

(Institut für für Biologie, RWTH Aachen, Dr. R. Finnern)

Muriner monoklonaler Antikörper gegen CEA.

C6B1D2, C6ML3.9, C6.5, C6MH-B1, C6.5G98A (jeweils ein monoklonaler Antikörper)

(Schier *et al.*, 1996; G. P. Adams, Department of Medical Oncology, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA)

Monoklonale Antikörper mit unterschiedlicher Affinität zu ErbB2 (Her-2).

OKT3 monoklonaler Antikörper

(ATCC, Rockville, USA)

Muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes CD3.

Hamster anti-Maus CD3e monoklonaler Antikörper

(BD, Franklin Lackes, New Jersey, USA), Klon-Nr.: 145-2C11

Monoklonaler Antikörper gegen murine ϵ -Domäne des CD3-Komplexes.

YTS191.1 monoklonaler Antikörper und YTA 3.1 monoklonaler Antikörper

(Qin *et al.*, 1987)

Monoklonaler Ratte Antikörper gegen murines CD4.

YTS169.4 monoklonaler Antikörper

(Cobbold *et al.*, 1984)

Monoklonaler Ratte Antikörper gegen murines CD8.

Hamster anti-Maus CD28 monoklonaler Antikörper

(BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA), Klon-Nr.: 37.51

Monoklonaler Antikörper gegen murines CD28-Antigen.

2.1.10.2 Konjugierte Sekundärintikörper

2.1.10.2.1 Peroxidase gekoppelte Antikörper

HRP gekoppelter Ratte anti-Maus IgG₁ Antikörper

(BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA), Klon-Nr.: X56

Monoklonaler Antikörper gegen murine IgG₁-Domäne

2.1.10.2.2 Phycoerythrin gekoppelte Antikörper

PE gekoppelter Maus anti-human CD3 Antikörper

(DAKO, Glostrup, Dänemark), polyklonales Serum

R-PE gekoppelter Ziege anti-Maus IgG

(Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA), polyklonales Serum

R-PE gekoppelter Ziege anti-human IgG

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

2.1.10.2.3 FITC gekoppelte Antikörper

FITC gekoppelter Ziege F(ab')₂ anti-human IgG Antikörper

(Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA), polyklonales Serum

FITC gekoppelter Ziege F(ab')₂ anti-Maus IgG Antikörper

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

FITC gekoppelter Kaninchen anti-human CD3 Antikörper

(DAKO, Glostrup, Dänemark), Klon-Nr.: UCHT1

Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD3 Antigen.

FITC gekoppelter Ratte anti-Maus CD3 Antikörper

(Serotec, Oxford, GB), Klon-Nr.: KT3

Monoklonaler Antikörper gegen murines CD3 Antigen

FITC gekoppelter Ratte anti-Maus CD4/L3T4 Antikörper

(Southern Biotechnology), Klon-Nr.: GK 1.5

Monoklonaler Antikörper gegen murines CD4 Antigen

FITC gekoppelter Ratte anti-Maus CD8 α /Lyt-2 Antikörper

(Southern Biotechnology), Klon-Nr.: 53-6.7

Monoklonaler Antikörper gegen murines CD8 Antigen

2.1.10.2.4 Biotin gekoppelte Antikörper

Biotin gekoppelter Ziege F(ab')₂ anti-human IgG Antikörper

(Southern Biotechnology), Klon-Nr.: N/A

Biotin gekoppelter Ziege anti-Maus-IgG Antikörper

(Southern Biotechnology), polyklonales Serum

Biotin gekoppelter Maus anti-human Interferon- γ Antikörper

(PharMingen, Hamburg), monoklonaler Antikörper, Klon-Nr.: 4S.B3.

Biotin konjugierter Maus anti-Ratte/Maus Interferon- γ Antikörper

(Biosource, Camarillo, California, USA), monoklonaler Antikörper, Klon-Nr.: DB-1.

Biotin gekoppelter Kaninchen anti-human IL-2 Antikörper

(Biosource), monoklonaler Antikörper, Klon-Nr.: B33-2.

2.1.10.3 Auto-MACSTM Antikörpercocktails

Negative Anreicherung von murinen CD3⁺ T-Zellen

(Pan T cell isolation kit, *Product code*: 130-090-861, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

Positive Anreicherung von murinen CD8⁺ T-Zellen

(CD8 MicroBeads, *Product code*: 130-049-401, Miltenyi Biotec GmbH)

2.1.10.4 Antiseren

Mausserum

(DAKO, Glostrup, Dänemark)

Rattenserum

(DAKO)

2.1.11 Sonstige Proteine

Trypsin-EDTA-Lösung (10x)

(Sigma, Deisenhofen)

rekombinantes humanes IFN- γ

(PharMingen, Hamburg), Kat.-Bez.: R-IFNG-50

Molekulargewicht: 15,5 kDa; produziert in *E.coli*.

rekombinantes Maus IFN- γ

(BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA), Kat.-Nr.: 554587

rekombinantes humanes IL-2

(Chiron GmbH, Ratingen)

Molekulargewicht: 15,3 kDa; produziert in *E.coli*.

rekombinantes humanes IL-15

(ImmunoTools GmbH, Friesoythe)

Molekulargewicht: 13,0 kDa; produziert in *E.coli*.

rekombinantes humanes ErbB2/Fc

(R&D Systems, Minneapolis, USA)

Humanes ErbB2 fusioniert mit humanem IgG₁ MW: 131 kDa; produziert in *E.coli*

rekombinantes humanes CEA

(Abcam, Cambridge, GB)

Molekulargewicht: 120 kDa; produziert in *E.coli*

2.1.12 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer

Name des Enzyms (Roche Diagnostics)	Schnittsequenz	Inkubationspuffer
BamHI	5'-G↓GATCC-3'	A oder M
BglII	5'-A↓GATCT-3'	A, M oder H
BstXI	5'-CCA(N) ₅ ↓NTGG-3'	B oder H
EcoRI	5'-G↓AATTC-3'	A, B oder H
NcoI	5'-C↓CATGG-3'	H
SaII	5'-G↓TCGAC-3'	H
XbaI	5'-T↓CTAGA-3'	A oder H
XhoI	5'-C↓TCGAG-3'	H

Puffer A: 33mM Tris-Acetat; 10 mM Mg-Acetat; 66 mM K-Acetat; 0,5 mM DTT; pH 7,9

Puffer B: 10 mM Tris HCl, 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0

Puffer H: 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl; 1mM DTE; pH 7,5

Puffer M: 10 mM Tris-HCL; 10mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1mM DTE; pH 7,5

Das Temperaturoptimum für die Restriktionsreaktion liegt bei den meisten Enzymen bei 37° C. Die Restriktionsreaktion mit dem Enzym *BstXI* erfordert 45° C.

2.1.13 Oligonukleotide

(MWG-Biotech AG, Ebersberg)

Nr.	Name	Sequenz	Verwendungszweck	
			Sequenz.	Klon.
# 51	pBullet 5'	5'-[TTA CAC AGT CCT GCT GAC CA]-3'	√	
# 75	pRSV-sense	5'-[TTG GTG TGC ACC TCC AAG CTC CTC]-3'	√	
# 76	hIgG-Seq-AS	5'-[CAT TGC TCT CCC ACT CCA CGG]-3'	√	
# 136	pBullet 3'	5'-[CGT ACT ATA GGC TTC AGC TGG TGA TAT TG] -3'	√	
# 221	mCD28-S	5'-[AGT ACA CTC CAC TCT CCT GGT AAC AAG ATT TTG GTA AAG CAG TCG CCC]-3'		√
# 222	mCD28-S-TM-IC	5'-[AGT ACA CTC CAC TCT CCT GGT TTT TGG GCA CTG GTC GTG GTT GCT GGA]-3'		√
# 223	mCD28-AS	5'-[AGC TCT CGA GTA CTC GTC GAC TCA GGG GCG GTA CGC TGC AAA GTC TCT]-3'		√
# 224	mCD3zeta-S	5'-[ATA TCC ACT CTC CTG GTA TCC CAC CCA GAT CCC AAA CTC TGC TAC TTG CTA GAT GGA]-3'		√
# 243	mCD3-zeta-AS	5'-[AGC TCT CGA GTA CTC GTC GAC TTA GCG AGG GGC CAG GGT CTG CAT]-3'		√
# 246	mOx40-AS	5'-[AGC TCT CGA GTA CTC GTC GAC TCA GAT CTT GGC CAG AGT AAA GTG]-3'		√
# 247	mCD28/mCD3zeta-S	5'-[TTT GCA GCG TAC CGC CCC CTG AGA GCA AAA TTC AGC AGG]-3'		√
# 248	mCD3zeta/mCD28-AS	5'-[CCT GCT GAA TTT TGC TCT CAG GGG GCG GTA CGC TGC AAA]-3'		√
# 251	mIgG1-S	5'-[AAC TGG GAG GCA GGA AAT ACT TTC ACC]-3'	√	
# 255	mCD4TM-mCD3zeta-S	5'-[CTC TCC CAC TCT CCT GGT ATT GTG TTC CTG GCT TGC GTG CTG GGT GGC TCC TTC GGC TTT CTG GGT TTC CTT GGG CTC TGC ATC CTC TGC TGT GTC CTG AGA GCA AAA TTC AGC AGG AGT]-3'		√
# 263	mCD4tm-mCD28ic-S	5'-[CTC TCC CAC TCT CCT GGT ATT GTG TTC CTG GCT TGC GTG CTG GGT GGC TCC TTC GGC TTT CTG GGT TTC CTT GGG CTC TGC ATC CTC TGC TGT GTC AAT AGT AGA AGG AAC AGA CTC CTT]-3'		√
# 322	L-kappa-SCA431-NcoI	5'-[CGT ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA GTC ATA ATG TCT AGA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG]-3'		√
# 323	SCA431-VH-AS	5'-[GCC ACC CGA CCC GCC ACC GCC CGA TCC ACC ACC TCC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TGC]-3'		√
# 324	SCA431-VK-S	5'-[TCG GGC GGT GGC GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCA ATC]-3'		√
# 325	SCA431-VK-BglII-AS	5'-[CTA GAC CAG ATC TAC TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC CCC TCC GAA]-3'		√
# 332	mCD3zeta/mOX40	5'-[ATG CAG ACC CTG GCC CCT CGC CGG AAG GCT TGG AGA TTG CCT AAC ACT]-3'		√
# 333	mOX40/mCD3zeta	5'-[AGT GTT AGG CAA TCT CCA AGC CTT CCG GCG AGG GGC CAG GGT CTG CAT]-3'		√

2.1.14 Vektoren

Für die Konstruktion retroviraler Expressionsvektoren wurden Plasmide verwendet, die sich vom retroviralen Expressionsvektor pBullet ableiten. Sie verfügen neben den regulatorischen Elementen (SV40 ori) und dem Resistenzgen (amp^r) über eine Expressionskassette, die unter der Kontrolle der CMV-Promotorsequenz steht. Der Vektor pBullet leitet sich von pStitch ab, dem zwei *NcoI*- und eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle deletiert wurden (Weijtens *et al.*, 1998a).

Für die Generierung des löslichen anti-CEA-Antikörpers SCA431scFv-hIgG (#970) und der anti-ErbB2-Antikörper Proteine (#788), (#789), (#790), (#791) und (#792) wurde das DNA-Plasmid pRSV-anti-CEA-hFc (# 443) verwendet, das sich vom Expressionsvektor pRSV ableitet. Es verfügt neben der DNA für die Resistenzgene amp^r und neo^r über eine Expressionskassette, die unter der Kontrolle der RSV-LTR Promotorsequenz steht (Eshhar *et al.*, 1993). Die vorhandene Expressionskassette wurde durch Restriktion mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI* deletiert und durch eine neue Expressionskassette ersetzt.

pCR[®]2.1 Vektor

(Invitrogen, Karlsruhe; K4520-01)

pCOLT-GalV (#392)

R.L. Bolhuis, Rotterdam, NL (Weijtens *et al.*, 1998a)

Dieses retrovirale Helferplasmid enthält die Expressionskassette für das GALV *Env* Protein.

pHIT 60 (#393)

R.L. Bolhuis, Rotterdam, NL (Weijtens *et al.*, 1998a)

Dieses retrovirale Helferplasmid enthält die Expressionskassette für MLV *Gag* und MLV *Pol* Protein.

pRSV-anti-CEA-hFc (#443)

(Eshhar *et al.*, 1993)

Dieses Plasmid enthält die Expressionskassette für das CEA spezifische Fusionsprotein, das sich aus der BW431/26 Bindedomäne und dem humanen IgG zusammensetzt .

pVpack-10A1 (#596), pVpack-VSV-G (#597), pVpack-Eco (#598), pVpack-Ampho (#599) und pVpack-GP (#600)

(Stratagene, La Jolla, USA)

Das Plasmid #596 enthält die Expressionskassette für das MMLV-basierte 10A1 *Env* Protein, das Plasmid #598 die Expressionskassette für das MMLV-basierte Eco *Env* Protein und das Plasmid #599 die Expressionskassette das MMLV-basierte Ampho *Env* Protein. Das Plasmid #597 kodiert für VSV-basierte VSV-G *Env* Protein. Plasmid #600 enthält eine Expressionskassette, die für die MMLV-basierten *Gag* und *Pol* Proteine kodiert.

pBullet-L κ -BW431/26scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#607)

(Hombach *et al.*, 2001)

Das Plasmid #607 enthält die Expressionskassette für den CEA spezifischen Rezeptor BW431/26-hFc-CD28-CD3 ζ .

pRSV-H10scFv-hFc (#648)

(Journal of Immunology, in press)

Das Plasmid #648 enthält die Expressionskassette für das CEA spezifische Fusionsprotein H10scFv-hFc, das sich aus der CEA spezifischen Bindedomäne H10scFv und der humanen IgG-Domäne zusammensetzt.

pBullet-L κ -HRS3scFv-hFc- γ (#664)

(nicht publiziert)

Das Plasmid enthält die Expressionskassette für den rekombinanten Immunrezeptor HRS3scFv-mCH2-CH3-gamma, wobei eine murine IgG Domäne als Linker zwischen der CD30 spezifischen Bindedomäne und der γ Signalkette fungiert.

pBullet-L κ -BW431/26scFv-hFc-CD3 ζ (#700)

(nicht publiziert)

Das Plasmid enthält die Expressionskassette für den CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-hFc-CD3 ζ .

pBullet-C6-B1.D2scFv-hIgG-CD3 ζ (#710), pBullet-C6-B1.D2scFv-hIgG-CD28-CD3 ζ (#714), pBullet-C6-ML3-9scFv-hIgG-CD3 ζ (#744), p-Bullet-C6.5scFv-hIgG-

CD28-CD3 ζ (#745), p-Bullet-C6.5scFv-hIgG-CD3 ζ (#746), pBullet-C6MH3-B1scFv-hIgG-CD28-CD3 ζ (#747), pBullet-C6MH3-B1scFv-hIgG-CD3 ζ (#748), pBullet-C6.5G98AscFv-hIgG-CD28-CD3 ζ (#749), pBullet-C6.5G98AscFv-hIgG-CD3 ζ (# 750) und pBullet-C6-ML3-9scFv-hIgG-CD28-CD3 ζ (# 753)

(Chmielewski *et al.*, 2004)

Plasmide mit der Nummer # 710, # 744, # 746, # 748 und # 750 enthalten jeweils eine Expressionskassette für einen ErbB2 spezifischen Immunrezeptor mit einer CD3 ζ Signalkette. Plasmide mit der Nummer # 714, # 745, # 747, # 749 und # 753 enthalten jeweils eine Expressionskassette für einen ErbB2 spezifischen Immunrezeptor mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette.

pCR-Blunt/mOx40 (#832)

(La Jolla, Institute for Allergy and Immunology, San Diego, USA)

Dieser PCR-Vektor enthält die Sequenz für die murine OX40 Signalkette.

pBullet-HRS3svFv-mCH2/3-mCD28-mCD3-mOX40 (#869)

(nicht publiziert)

Das Plasmid enthält die Expressionskassette für den CD30 spezifischen Rezeptor mit dem dreifachen murinen CD28-CD3 ζ -OX40 Modul zur Signalübertragung in der T-Zelle.

2.1.15 anti-ErbB2 Einzelketten-Antikörper (scFv)

Greg Adams, Fox Chase Cancer Center (*Adams et al.*, 2001)

Mutationen in der CDR3 Region der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Kette der anti-ErbB2 Einzelketten-Antikörper (scFv) führen zu einer veränderten Bindungskinetik (Tab.3).

Nr.	Klon	V _L CDR3	V _H CDR3	k _d	k _{on}	k _{off}
# 710	C6-B1D2	AAWDDSLSGWV	HDVGYCSSSNAKWPYFQH	1,6x10 ⁻¹⁰ M	4,0x10 ⁵ s ⁻¹ M ⁻¹	6,3x10 ⁻³ s ⁻¹
# 744	C6ML3-9	ASWDYTLSGWV	HDVGYCSSSNAKWPYFQH	1,0x10 ⁻⁹ M	7,6x10 ⁵ s ⁻¹ M ⁻¹	0,76x10 ⁻³ s ⁻¹
# 746	C6.5	AAWDDSLSGWV	HDVAYCSSSNAKWPYFQH	3,17x10 ⁻⁷ M	4,1x10 ⁵ s ⁻¹ M ⁻¹	1,38x10 ⁻¹ s ⁻¹
# 748	C6MH3-B1	AAWDDSLSGWV	HDVGYCTDRCAKWPYFQH	1,2x10 ⁻¹⁰ M	5,0x10 ⁵ s ⁻¹ M ⁻¹	0,60x10 ⁻⁴ s ⁻¹
# 750	C6.5G98A	AAWDDSLSGWV	HDVGYCSSSNAKWPWLGWV	1,5x10 ⁻¹¹ M	6,9x10 ⁵ s ⁻¹ M ⁻¹	0,1x10 ⁻⁴ s ⁻¹

Tabelle 3: Sequenz, Affinität und Bindungskinetik der anti-ERBB2 scFv. Durch gezielte Mutationen in der CDR3 Region der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) des monoklonalen Antikörpers C6.5 wurden scFv mit gleicher Spezifität, aber unterschiedlich hoher Affinität für ErbB2 generiert (*Schier et al.*, 1996).

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid DNA

2.2.1.1 Midi-Präparation von Plasmid DNA durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule

(QiaFilter Midi Kit, Qiagen, Hilden)

Eine 30 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 15 Minuten bei 1100 x g sedimentiert und in 8 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 8 ml Puffer P2 (200mM NaOH; 1 % SDS). Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung mit 8 ml eiskaltem Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Anionenaustauscher-Säule (*Qiagen-tip 500*) wurde mit 10 Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % (v/v) EtOH; 0,15 % (v/v) Triti-X-100) äquilibriert. Das Zellysate wurde durch Filtration (*Qiafilter*) von Bakterientrümmern, Proteinen und genomischer DNA befreit und dann auf die Anionenaustauschersäule gegeben. Die beladene Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen. Die Elution der Plasmid DNA erfolgte mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15 % (v/v) Isopropanol). Danach wurde die Plasmid DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000 x g, 4 °C präzipitiert, mit 2,5 ml 70%-igem (v/v) EtOH gewaschen und erneut wie vorher zentrifugiert. Die sedimentierte Plasmid DNA wurde bei RT getrocknet und schließlich in 200 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert. Aufbewahrt wurde die DNA entweder kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C.

2.2.1.2 Schnellpräparation von Plasmid DNA nach der Koch-(boiling) Methode

Eine 1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 3 Minuten bei 1100 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment in 400µl STET-Lösung (10mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Triton-X-100; 0,1 M NaCl) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) durchmischt, für 30

Sekunden gekocht und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 x g bei RT zentrifugiert. Die Plasmid DNA im Überstand wurde durch Zugabe von 40 µl 3 M NaAc, pH 5,2 und 420 µl Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 x g bei RT sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml 70%-igem EtOH wurde die DNA an der Luft getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert. Noch verbliebene RNA wurde durch Zugabe von 10 % (v/v) RNase degradiert.

2.2.1.3 Ethanolfällung

Zur Fällung wurde die DNA-Lösung mit

0,1 Vol. 3M Na⁺-Acetat, pH 5,2

2,5 Vol. Ethanol_{abs}

versetzt, gründlich gemischt und 30 min bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g sedimentiert, mit 70 %-igem EtOH gewaschen und 15 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in beiden Fällen verworfen. Anschließend wurde das DNA Sediment bei RT getrocknet und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.2.2 Photometrische Bestimmung

(*Gene Quant RNS/DNS Calculator*, Pharmacia, Freiburg)

Zur Bestimmung der Konzentration einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde mittels eines Photospektrometers die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen Tris-HCl als Leerwert gemessen. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} abgeschätzt. Reine DNA-Lösungen besitzen einen Quotienten von 1,8. Bei 1 cm Strahlengang entspricht eine $OD_{260} = 1$ einer doppelsträngigen Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA.

2.2.2.3 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden

(Low DNA massTM ladder, Gibco BRL/Invitrogen, Eggenheim)

Bei dieser Methode ist nur eine ungefähre Mengenabschätzung möglich. Die zirkuläre DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen linearisiert und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung. Unter dem UV-Licht (245 nm) wurden die DNA Banden mit Marker-DNA Banden gleicher Größe und bekannter Konzentration verglichen (→ 2.1.3).

2.2.3 Präparation von RNA aus Mausmilzzellen

(RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen, Hilden)

Das Prinzip des *RNeasy[®] Mini Kits* beruht auf der Bindung freigesetzter RNA Moleküle mittels Zentrifugation an die Silizium-Matrix einer RNeasy-Säule. Hierfür wurden Zellen aus der Milz einer Maus des Stammes C57-Black/6 isoliert und bei 37° C im Aktivierungsmedium kultiviert. Nach 48h wurden ca. $1,0 \times 10^4$ Milzzellen entnommen und durch Zentrifugation (bei 300 x g und 4° C) pelletiert. Das Zellpellet wurde im sterilen PBS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (bei 300 x g und 4° C) sedimentieren. Das Zellpellet wurde mit 350 µl des Lysis-Puffers (RLT-Puffer) resuspendiert, geschwenkt, bis sich das Sediment vollständig gelöst hat. Anschließend wurden 350 µl 70%-iges (v/v) EtOH zugegeben. Die Lysat-EtOH Mischung (700 µl) wurde direkt auf die Matrix einer RNeasy-Säule pipettiert, die in ein Eppendorf-Sammelgefäß gesteckt wurde. Mit Hilfe der Zentrifugation für 15s bei 10.000 rpm wurde die RNA an das Säulenmaterial gebunden. Im ersten Waschschrift wurden 700 µl des RW1-Puffers auf die Matrix der RNeasy-Säule pipettiert und mittels der Zentrifugation für 15s bei 10.000 rpm wurde die RNeasy-Säule gewaschen. Die Säule wurde noch zweimal mit dem RPE-Puffer gewaschen, um das restliche EtOH zu entfernen. Hierfür wurden je 500 µl des RPE-Puffers auf die Säulenmatrix pipettiert und mittels der Zentrifugation für 15s und 2min bei 10.000 rpm wurde die Säule gewaschen. Anschließend wurde die RNeasy-Säule mittels Zentrifugation für 1min bei 10.000 rpm getrocknet und in ein neues Gefäß überführt. Zur RNA-Gewinnung wurden 50 µl RNase-freies H₂O auf die Säulenmatrix pipettiert und die RNA mit Hilfe der Zentrifugation für 1min bei 10.000 rpm eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4 Gewinnung von cDNA mit Hilfe der Reversen Transkription

(Omniscript[®], Qiagen, Hilden)

Die Umschreibung der RNA in die cDNA wurde mit Hilfe der RNA-abhängigen DNase (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurde die tiefgefrorene RNA auf Eis, der RT-Puffer, die Oligonukleotide, der dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 10 mM) und RNase-freies H₂O bei RT aufgetaut. Anschließend wurde der RNase-Inhibitor (10 U/μl) zum RT-Puffer dazu pipettiert. Im nächsten Schritt wurde ein Master-Mix vorbereitet, der sich folgenden Komponenten zusammensetzt:

Komponenten des Master-Mix	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10x RT-Puffer	2 μl	1x
dNTP-Mix	2 μl	0,5 mM, je dNTP
Oligo-dT-Nukleotid	2 μl	1 μM
RNase-Inhibitor	1 μl	10 U/20 μl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 μl	4 U/20 μl
RNase-freies Wasser	x μl	
RNA (wird als letztes zugegeben)	x μl	bis 2 μg/20 μl
Gesamtvolumen	20 μl	-

Der Master-Mix wurde bis zur Zugabe der RNA auf Eis gelagert. Für die cDNA-Synthese wurden die Reaktionsgefäße mit dem Master-Mix für 60min bei 37° C inkubiert. Die generierte cDNA wurde für die PCR verwendet.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis & Faloona *et al.*, 1988)

Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten, die im selben Ansatz bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt werden die zu amplifizierenden DNA Moleküle denaturiert. Im folgenden Schritt hybridisieren unter geeigneten Temperaturbedingungen zwei DNA-Oligonukleotide (Primer) mit je einem der beiden DNA Einzelstränge. Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung dieser Startermoleküle entlang der einzelsträngigen Matrize durch eine thermostabile *Taq* oder *Pwo* DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem programmierbaren Heizblock (*UNO II*, Biometra®) durchgeführt.

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde folgender Standardansatz verwendet:

- x µl Matrizen-DNA (10-100 ng)
- 5 µl 10 x Taq-Puffer
- 1 µl dNTPs (je 2 mM)
- 1 µl Primer I (100 ng)
- 1 µl Primer II (100 ng)
- x µl *aqua bidest.*
- 1 µl *Taq*- oder *Pwo*-Polymerase (2,5 Units)

Σ 50 µl

Zur Amplifikation der DNA Fragmente wurde beispielsweise folgendes Temperaturprofil verwendet:

- | | |
|---|-------------------|
| 1.) Hitzedenaturierung: | 95 °C 60 Sekunden |
| Pause (Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase) | |
| 2.) Hitzedenaturierung: | 95 °C 60 Sekunden |
| 3.) Anlagerung der Oligonukleotide: | 55 °C 20 Sekunden |
| 4.) Polymerisation | 72 °C 60 Sekunden |
| 30 Reaktionszyklen (2. - 4.) | |
| 5.) Einmalige Endpolymerisation | 72 °C 4 Minuten |
| 6.) Kühlung | 4 °C |

Die individuellen Hybridisierungstemperaturen (T_D) für Oligonukleotide mit einer Länge von weniger als 25 Basen wurde nach der "Wallace-Regel" (*Suggs et al.*, 1981) in Annäherung bestimmt:

$$T_D = 4 \times (C+G) + 2 \times (A+T)$$

2.2.6 DNA Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

(ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI-Prism Sequencer, Applied Biosystems, Warrington, GB)

Die DNA Sequenzierung wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Das Prinzip dieses enzymatischen Verfahrens beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3' Dideoxy-Nukleotiden (ddNTPs) in einen durch die DNA-Polymerase I neu synthetisierten DNA-Strang. Dies führt zum Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxylgruppe im Dideoxy-Nukleotid fehlt. Auf diese Weise wird die Polymerisierung selektiv bei A, C, G oder T terminiert. Es entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich langen DNA Fragmenten, die sich durch ein fixes 5'-Ende und ein variables, basenspezifisches 3'-Ende auszeichnen. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (A: di-chloro [R6G]; C [ROX]; G di-chloro [R100]; T di-chloro [TAMRA]) können alle vier enzymatischen Sequenzier-Reaktionen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Durch Gel-Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel werden die DNA Fragmente getrennt.

Reaktionsansatz für die Sequenzreaktion:

1 µl	Matrizen-DNA (100-200 ng)
1 µl	Sequenzierungs-Oligonukleotide (3,2 pmol)
8 µl	Terminator-Ready-Reaction-Mix (ABI-Prism)
10 µl	H ₂ O
<hr/>	
∑	20 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde nach folgendem PCR-Programm amplifiziert. Es wurden 30 Zyklen mit einem spezifischen Temperaturprofil in einem programmierbaren Heizblock (UNO II, Biometra®) durchgeführt:

1. 96 °C 30 Sekunden
2. 50 °C 15 Sekunden
3. 60 °C 4 Minuten

Die Sequenzierungen wurden vom ZMMK-ServiceLabor, Institut für Biochemie der Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln, auf einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) oder (ab 2005) auf einem ABI Prism™ 3730 DNA Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) im Institut für Genetik an der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.7 Gelelektrophorese

2.2.7.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung der DNA wurden horizontale Agarosegele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde 30 min bis 1,5 h bei 50-100 V durchgeführt. Zur Anfärbung der DNA wurde der Agarose Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht (245 nm) durch Vergleich mit den oben beschriebenen Größenstandards.

2.2.7.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden bei der Auftrennung von Proteinen zur Analyse ihres Molekulargewichts verwendet. Sie bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel.

Lösungen [ml]	Sammelgel (8 %)	Trenngel (5%)
<i>aqua bidest.</i>	4,6	2,1
30 % Acrylamid-Mix (BioRad)	2,7	0,5
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5	-
1 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	0,38
10 % (w/v) SDS	0,1	0,3
10 % (w/v) APS	0,1	0,3
TEMED	0,006	0,003
Gesamtvolumen	∑ 10 ml	∑ 3 ml

Das Gießen der Gele und die Elektrophorese erfolgten mittels eines speziellen Kammersystems (BioRad). Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen (25 µl/Vertiefung). Zusätzlich wurde ein Protein-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 90-120 Minuten bei 70 V SDS-Gelelektrophorese-Puffer durchgeführt, bis die Lauffront am Ende des Gels angelangt war.

2.2.8 Western-Blot zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine

(nach Sambrook *et al.*, „Molecular Cloning“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl., 2001, New York)

Der Western-Blot erfolgte mittels eines speziellen Kammersystems (BioRad). Alle Elemente wurden vor dem Zusammenbau auf Gelgröße zurechtgeschnitten und mit Transfer-Puffer benetzt. Der Blot wurde dann luftblasenfrei wie folgt aufgebaut. Eine Lage Whatman-Papier (BioRad) wurde auf ein Schwammstück gelegt, darauf wurde das Gel gelegt, auf welches dann eine Trans-Blot-Nitrozellulosemembran (BioRad), eine Lage Whatman-Papier (BioRad) und schließlich wieder ein Schwammstück gelegt wurden. Das Paket wurde in das Kammersystem eingespannt, dass die Nitrozellulose-Seite der Anode und das SDS-Polyacrylamid-Gel der Kathode zugewandt war. Der Elektrotransfer der Proteine wurde 2h bei 70 mA und 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit 20 ml Blocking-Puffer über Nacht bei 4 °C geblockt. Am nächsten Tag wurde die Blocking-Lösung verworfen und die Nitrozellulosemembran für 2h bei RT in 20 ml Antikörperlösung [HRP gekoppelter Ratte anti-Maus IgG Antikörper (100 ng/ml); 10 % (w/v) Magermilchpulver (Glücksklee), 10 % (v/v) fetales Kälberserum und Rattenserum (200 ng/ml)] inkubiert und anschließend fünfmal 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Dann wurde die Nitrozellulosemembran für eine Minute mit 4 ml ECL-Substratlösung (BioRad) benetzt. Die Membran wurde eingeschweißt und auf einen Autoradiographie Film (Scientific Imaging Film, Kodak, NY, USA) exponiert.

2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose durch Bindung an Siliciumpartikel.

(*Qiaex II Gel Extraction Kit (150)*, Qiagen, Hilden, 1999)

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Agarose-Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA Bande unter UV-Licht (245 nm) ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Abhängig von der Größe des im Agarosegel gefangenen DNA-Fragments wurde entsprechendes Volumen des Lösungspuffers QX1 (Qiagen) hinzugegeben:

Größe des DNA-Fragmentes	Zugabe von QX1, x-faches Volumen des Gel-Gewichts	Zugabe von H ₂ O, x-faches Volumen des Gel-Gewichts
< 100 bp	6-faches Volumen	-
100 bp – 4 kb	3-faches Volumen	-
> 4 kb	3-faches Volumen	2-faches Volumen

QIAEX II-Lösung (Qiagen) wurde resuspendiert und abhängig von der eingesetzten DNA Menge hinzugefügt:

DNA-Menge	Zugabe an QIAEX II
≤ 2µg DNA	10 [µl]
2-10 µg DNA	30 [µl]

Unter mehrmaligem Mischen wurde das gelöste Agarosestück mit der DNA-Bande 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Dabei wurde kontrolliert, dass der pH-Wert der Lösung im optimalen pH-Bereich ($\text{pH} \leq 7,5$) liegt, angezeigt durch einen pH-Indikator, um eine maximale Adsorption der DNA durch die Säulenpartikel zu erreichen. Bei einem unerwünschten Farbumschlag wurde nach Bedarf mit 1-10 µl einer 3 M Na-Acetat-Lösung, pH 5,0 gegengesteuert, um den optimalen pH-Bereich einzustellen. Danach wurde das Eppendorf-Gefäß mit der geschmolzenen Gelmatrix für 30 Sekunden bei 10.000 x g, RT zentrifugiert und das Sediment in 500 µl Puffer QX1 (Qiagen) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 Sekunden; 10.000 x g; RT) wurde das Sediment zweimal mit Puffer PE (Qiagen) gewaschen und 30-60 Minuten bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert und, um die Elutions-Effizienz zu steigern, unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Größe des DNA-Fragments	Inkubation
≤ 4 kb	RT, 5 Minuten
4 kb – 10 kb	50 °C, 5 Minuten

Anschließend wurde die Lösung für 30 Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert. Um zu verhindern, dass nicht dennoch Agaroserückstände in dem Eppendorf-Gefäß mitgeschleppt werden, die die weitere Klonierungsarbeit stören, wurde die Lösung zweimal für 30 Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert und jeweils in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

2.2.10 Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNA.

2.2.10.1 Spaltung der doppelsträngigen DNA durch Restriktionsendonukleasen.

Die verwendeten Enzyme (Roche Diagnostics, Mannheim) spalten die DNA an

definierten Schnittstellen, bei denen die DNA-Erkennungssequenz der Spaltstelle entspricht. Pro μg DNA wurden 1-3 Units Restriktionsenzym eingesetzt. Eine Enzymeinheit (Unit) entspricht dabei der definierten Menge an Enzym, die in einer Stunde 1 μg DNA, bei der vorgegebenen Temperatur (meist 37 °C), in einem Gesamtvolumen von 10 μl spaltet. Um optimale Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme zu schaffen, wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffer verwendet. Die DNA wurde nur dann mit zwei verschiedenen Restriktions-Endonukleasen gleichzeitig geschnitten, wenn die geforderten optimalen Pufferbedingungen erfüllt waren. Ansonsten wurde nacheinander geschnitten, wobei nach jedem Restriktionsverdau eine EtOH-Fällung durchgeführt wurde.

2.2.10.2 Ligation von DNA-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNA-Ligase

Isolierte DNA-Fragmente wurden in einem 4-fach molaren Überschuss mit linearisierter Vektor DNA gemischt. Nach der Zugabe von 1 U/ μl T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1/10 Vol. 10 x Inkubationspuffer wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 6 °C inkubiert und anschließend zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

10 x Ligationspuffer

660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5

Ligationsansatz:

Komponenten	verwendetes Volumen
DNA-Gesamtmenge 100 ng (ein 4:1 molares Verhältnis der Vektor-DNA zur Insertions-DNA)	2-4 μl
10 x Ligationspuffer	1 μl
T4 DNA Ligase (1U/ μl)	1 μl
H ₂ O	4-6 μl
Gesamtvolumen	Σ 10 μl
Inkubation	ü.N., bei 6°C

2.2.11 Bakterienkultur

2.2.11.1 Herstellung kompetenter *E.coli* DH5 α Bakterien

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Eine stationäre *E.coli*-Kultur des Stammes DH5 α (500 μ l) wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit vorgewärmten 2 x YT-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \approx 0,50$) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde sofort unter gelegentlichem Schwenken für 10 Minuten auf Eis abgekühlt und 5 Minuten bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in eiskaltem TFB I Puffer (30 mM Kaliumacetat; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert, erneut sedimentiert (5 Minuten, 4.000 x g; 4 °C) und in 2 ml eiskaltem TFB II Puffer (10 mM MOPS, pH 7,5; 75 mM CaCl₂; 10 mM NaCl; 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. In jedes Eppendorf-Gefäß wurden 200 μ l der Lösung mit den kompetenten Bakterien gegeben und sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Bakterien bei -80 °C gelagert.

2.2.11.2 Transformation chemokompetenter *E.coli* Bakterien

(Hanahan, 1983)

Bei -80 °C gelagerte chemokompetente Bakterien (100 μ l/Eppendorf-Gefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 100 ng Plasmid DNA gemischt. Anschließend wurden die Bakterien 20 Minuten auf Eis und für 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium wurden die Bakterien zum Erwerb der Resistenzeigenschaft (Ampicillin-Resistenz) für 1h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde aus jedem Eppendorf-Gefäß das Gesamtvolumen entnommen und auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten mit dem „Drigalsky“-Spatel ausgestrichen, wobei der Spatel nach jedem Ausstrich im 70 % Ethanol eingetaucht und abgesengt wurde.

2.2.11.3 Blau-weiß Selektion

(TOPO[®]TA Cloning Kit, Invitrogen, Eggenheim)

Das Plasmid pCR[®]2.1 (Invitrogen) wird als lineare DNA Sequenz geliefert und enthält ein ori-Element, ein Resistenzgen für Ampicillin, ein Resistenzgen für Kanamycin, einen Promotor, das Gen für β -Lactamase (*lacZ*) und eine multiple Klonierungsstelle (MCS). An beiden Enden der linearen DNA Sequenz befindet sich je ein Teil des kompletten *lacZ*-Gens und die durchgetrennte multiple Klonierungsstelle. Die

intramolekulare Ligation des Vektors führt zu einer zirkulären Plasmid DNA. *E.coli*-Bakterien, die mit diesem Plasmid transformiert werden, produzieren β -Lactamase. Die Kultur dieser *E.coli* Bakterien auf X-Gal ausgestrichenen LB-Agar Platten führt zu einer Blaufärbung der Kolonie. Bakterien ohne Plasmid produzieren keine β -Lactamase, setzen kein X-Gal um und die Kolonie bleibt ungefärbt. Im konkreten Fall führt der Einbau eines PCR Produkts an der multiplen Klonierungsstelle, im Bereich des lacZ-Gens, des pCR[®]2.1 Plasmids zur Zerstörung des Leserasters für β -Lactamase. Die mit diesem Plasmid transformierten *E.coli*-Bakterien wachsen auf LB-Agar Platten mit Ampicillin, setzen jedoch kein X-Gal um. Aufgrund der fehlenden Blaufärbung können diese *E.coli* Bakterien auf LB-Agar Platten (mit X-Gal und Ampicillin) von Bakterien mit intramolekular religierten Plasmiden unterschieden werden.

2.2.12 Zellkultur

2.2.12.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe I oder II unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (Heraeus Biotech, Hanau) durchgeführt. Die Zellen wurden in Inkubatoren (Heraeus) unter 5% CO₂-Versorgung bei 37 °C und 95 bis 100 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Medien, Zusätze und Lösungen wurden nach dem Autoklavieren oder Sterilfiltrieren unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Vor Gebrauch wurden die verwendeten Medien, sowie Wasch- und andere Lösungen auf 37 °C vorgewärmt oder auf 4°C abgekühlt.

2.2.12.2 Splitten adhärenter Zellkulturen

Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen einmal mit Ca²⁺-freiem PBS gewaschen, mit 1 ml einer Trypsin-Lösung (1 ml 10 x-fach Trypsin (Sigma, Deisenhofen) pro 10 ml PBS) für 3-5 Minuten bei 37° C inkubiert und von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in geeignetem Medium (meist 1640 RPMI, 10% (v/v) FCS) resuspendiert, wodurch die Trypsin-Aktivität blockiert wurde, und einmal mit RPMI Medium gewaschen. Nach Bedarf wird eine gewisse Anzahl Zellen in die Zellkulturschale zurückgegeben und im frischen Medium aufgenommen.

2.2.12.3 Separation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Dichtezentrifugation

(*Ficoll-Paque*, Pharmacia Biotech, Freiburg)

Von der Blut-Entnahme bis zur Bereitstellung der „buffy-coats“-Konserven (Blutbank der Universität zu Köln) vergingen in der Regel 4 bis 6 Stunden. Humane T-Lymphozyten wurden mittels Dichtezentrifugation aus „buffy-coats“-Konserven separiert. Dieses Verfahren macht sich die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zellen des humanen Blutes zunutze. Dabei wird das Blut über eine hochmolekulare Flüssigkeit geschichtet, in welcher sich Blutzellen nach der Zentrifugation in verschiedene, dichteabhängige Phasen aufteilen. Hierfür wurden 15 ml des Blutes eines gesunden Spenders 1:2 mit PBS verdünnt und auf 15 ml *Ficoll Paque*, geschichtet. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 400 x g und 20 °C zentrifugiert, wobei die Bremse des Gerätes ausgeschaltet war. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase verworfen. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig abgenommen, mit 20 ml PBS gewaschen und bei 400 x g, 10 min, bei 20 °C zentrifugiert, wobei die Bremse des Gerätes wieder eingeschaltet war. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 30 ml FCS-freiem RPMI 1640 Medium aufgenommen und erneut bei 400 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Das Zellsediment wurde in 50 ml RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS resuspendiert und die Zellen mit 1 µl IL-2 (200 U/ml) und 50 µl OKT-3 (100 ng/ml) stimuliert. Die separierten T-Lymphozyten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.12.4 Präparation von mononukleären Zellen aus der Mausmilz

Das Töten der Versuchstiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Das Mausfell wurde mittels 70%-igem Alkohol desinfiziert, der Peritonealraum mittels einer Schere eröffnet und die Milz entnommen.

2.2.12.4.1 Separation von mononukleären Mausmilzzellen mittels Dichtezentrifugation

(*Histo-Paque-1083*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Die Mausmilzen wurden mechanisch aufgeschlossen und die mononukleären Zellen mittels Dichtezentrifugation separiert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension

wurden die entnommenen Milzen, nach Zerkleinerung mittels eines Spritzkolbens, durch ein Metallsieb (Porengröße 100 µm) in frisches RPMI 1640 Medium gerieben. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden einmal mit RPMI 1640 Medium gewaschen, in 5 ml PBS resuspendiert, zur Dichtegradientenzentrifugation auf 2,5 ml Histopaque-1083[®] Lösung in einem 15 ml Falcon-Röhrchen geschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur (RT), ohne Bremse bei 850 x g zentrifugiert. Lebende, mononukleäre Zellen sammeln sich dabei in der Interphase, in der sie abpipettiert und anschließend zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen wurden.

2.2.12.4.2 Anreicherung und Selektion verschiedener muriner Milzzellen

Prinzipiell unterscheidet man bei Anreicherungsverfahren für Lymphozyten-subpopulation zwischen Positivanreicherung (Selektion) und Negativanreicherung (Depletion).

2.2.12.4.2.1 Selektion muriner CD8⁺ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellsortierung (MACS[®])

(CD8 MicroBeads, *Product code*: 130-049-401, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

Die aus der Mausmilz gewonnenen mononukleären Zellen werden nach Anweisung des Herstellers mit CD8 spezifischen Antikörpern, an die Magnetkügelchen (Beads) gekoppelt sind, im MACS[®] Waschpuffer inkubiert, gewaschen, im entsprechenden Volumen des MACS[®] Trennpuffers in einem Falcon-Röhrchen resuspendiert und für die Trennung mittels AutoMACS[®] Gerät bereitgestellt. Die Zellsuspension wird durch eine Saugvorrichtung zur ferromagnetischen Trennsäule des AutoMACS Geräts geleitet. Zellen, an die Beads-gekoppelte anti-CD8 Antikörper gebunden sind, werden im magnetischen Feld zurückgehalten. Die Fraktion der restlichen, CD8⁻ Zellen wird beim Waschen der Säule entfernt und in einem Sammelgefäß aufgefangen. Das erzeugte Magnetfeld wird ausgeschaltet und die Fraktion der CD8⁺ Zellen wird beim erneuten Waschen aus der Säule entfernt und durch eine andere Öffnung zum Sammelgefäß geleitet. Die Überprüfung der Reinheit von sortierten Zellpopulationen erfolgt mit Hilfe der Durchflußzytometrie.

2.2.12.4.2.2 Depletion muriner CD3⁺ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellsortierung (MACS[®])

(„Pan T cell isolation kit“, *Product code*: 130-090-861, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)

Das hier verwendete „Pan T cell isolation kit“ beruht auf einem indirekten Verfahren bei dem anti-Biotin MicroBeads an Biotin-konjugierte Antikörper binden, die spezifische Antigene auf der Zelloberfläche von Zellen erkennen. Zellen, die indirekt markiert werden, können in der ferromagnetischen Trennsäule des AutoMACS[®] Geräts bei eingeschaltetem Magnetfeld zurückgehalten werden. Durch negative Selektion werden CD45R⁺, CD49b⁺, CD11b⁺ und Ter-119⁺ Zellen von CD3⁺ Zellen getrennt. Die Fraktion der CD3⁺ Zellen passiert das Magnetfeld ohne angehalten zu werden und wird depletiert. Die Vorbereitung und die Durchführung der Negativanreicherung am AutoMACS[®] Gerät erfolgt analog der Positivanreicherung.

2.2.12.5 Aktivierung muriner T-Lymphozyten

Nicht-selektionierte mononukleäre Milzzellen als auch selektionierte Lymphozytensubpopulationen werden nach dem gleichen Protokoll aktiviert. Am Tag der Präparation werden Zellen im Aktivierungsmedium (Tab. 4) kultiviert. Nach 24h wird das Aktivierungsmedium gegen Kulturmedium ausgetauscht. Nach 48h befindet sich ein Großteil der so behandelten Zellen in zellulären Teilungsphasen, was eine Voraussetzung für viralen Gentransfer ist.

Komponenten	Aktivierungsmedium	Kulturmedium
RPMI 1640 Medium (Dutch modification)	√	√
Fetales Kälberserum (FCS)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
L-Glutamin	2 % (v/v)	2 % (v/v)
Natrium-Pyruvat (100x)	1x	1x
NEAA-Aminosäuren (100x)	1x	1x
β-Mercaptoethanol (1000x)	1x	1x
Penicillin	50 IE/ml	50 IE/ml
Streptomycin	50 µg/ml	50 µg/ml
PHA-L	3 µg/ml	-
anti-Maus CD3 mAk (Klon: 145-2C11)	100 ng/ml	-
anti-Maus CD28 mAk (Klon: 37.51)	100 ng/ml	-
rekobinantes humanes IL-2	300 U/ml	100 U/ml
rekobinantes murines IL-15	5 ng/ml	5 ng/ml

Tabelle 4: Medien und Medienzusätze für die Aktivierung und Kultivierung muriner T-Zellen.

2.2.13 Transfektion von 293T Tumorzellen

(*PolyFect*[®] *Transfection Reagent*, Qiagen GmbH, Hilden)

Die DNA wird mit Hilfe von fein verzweigten Trägermolekülen verpackt, deren positiv geladene Amino-Gruppen die DNA umschließen und die Passage durch die Zellmembran erleichtern. Der DNA-Polyfect-Komplex bindet an negativ geladene Rezeptoren (Glykoproteine) der eukaryotischen Zelle und ermöglicht so die Endozytose in ein von einer einschichtigen Membran umhülltes Lysosom. Das alkalische PolyFect-Reagenz wirkt bei $\text{pH} \leq 5$ als Puffer-Substanz und erhöht den pH-Wert des Lysosomenkompartiments, so dass lysosomale Nukleasen erfolgreich inhibiert werden. Jeweils 10^6 Zellen der Linie 293T wurden 24h vor der Transfektion in 8 ml Kulturmedium (RPMI 1640, 10% (v/v) FCS) pro 100 mm Kulturschale resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Jeweils 9 µg Plasmid DNA wurden in einem Eppendorfgefäß mit Kulturmedium (RPMI 1640, Serum- und Antibiotika-frei) auf 300 µl Gesamtvolumen verdünnt. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 40 µl *PolyFect Transfection Reagent* vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde jeder Transfektionsansatz mit Kulturmedium (RPMI 1640, 10 % (v/v) FCS, Antibiotika-haltig) auf 1 ml Gesamtvolumen verdünnt. Die Transfektionsansätze wurden tropfenweise zu den kultivierten Zellen in das Kulturmedium gegeben. Nach 24h wurde das Medium durch ein frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24h wurde die Expression des transfizierten Plasmids in 293T Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Bei löslichen Proteinen wurde der Kulturüberstand gesammelt und mit Hilfe eines ELISA analysiert.

2.2.14 Herstellung der Zell-Lysate

Die Herstellung der Zell-Lysate erfolgte durch Resuspension von 10^7 Zellen in 1 ml Verdünnungspuffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl) und Zugabe von 1 ml Lysispuffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, Proteinase-Inhibitoren 1 mg/ml; 2 % NP40). Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 20 Minuten bei 6.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Je 1 mg Proteinase Inhibitor-Mix (*Complete*[®], Roche Diagnostics) wurde pro 1 ml Überstand zugegeben, um einer Protease-Degradierung der freigesetzten Rezeptorproteine vorzubeugen. Das Vorhandensein rekombinanter Rezeptorproteine im Überstand wurde mittels ELISA getestet.

2.2.15 Retrovirale Transduktion humaner peripherer Blutlymphozyten (PBL)

Retrovirale Vektor DNA wurde mit der retroviralen Helferplasmid DNA pHIT60 und pCOLT (je 3 µg DNA) in Zellen der Linie 293T mit Hilfe des *PolyFect*[®] *Transfection Reagent* endozytotisch eingebracht. Das Helfer-Plasmid pHIT60 kodiert für MuLV (*Moloney murine Leukemia Virus*) *gag* und *pol* Gene. Das Helfer-Plasmid pCOLT kodiert für das GALV (*Gibbon Ape Leukemia Virus*) *env* Gen. Die Verpackungs-Gene stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors/Enhancers (Weijtens *et al.*, 1996).

Periphere Blutlymphozyten wurden mit OKT-3 monoklonalem Antikörper und IL-2 nach der Lymphozytenseparation mit Hilfe der *Ficoll-Paque*-Reagenz stimuliert. Nach 48h Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in Medium (RPMI 1640, 5 % (v/v) FCS; 200 U/ml IL-2) resuspendiert und für 48h mit den transfizierten Zellen der Linie 293T ko-kultiviert. Die Viren wurden in den Zellkulturüberstand sezerniert und transduzierten die T-Zellen. Die T-Zellen wurden abgenommen und die Rezeptorexpression durchflußzytometrisch bestimmt.

2.2.16 Retrovirale Transduktion muriner T-Lymphozyten

(Stratagene, La Jolla, USA)

Die Transduktion muriner T-Lymphozyten erfolgte ebenfalls mittels eines Dreikomponenten-Systems. Dieses System besteht aus einem retroviralen Expressionsvektor, der Verpackungszelllinie 293T und den MMLV-basierenden Helferplasmiden pVpack-Eco (# 598) und pVpack-GP (# 600). Das Helferplasmid pVpack-GP (# 600) enthält die retroviralen Gene *gag* und *pol*. Das Helferplasmid pVpack-Eco (# 598) enthält ein retrovirales *env* Gen, welches für ein Hüllenprotein kodiert. Dieses Hüllenprotein ermöglicht, dass die freigesetzten Retroviren das CAT-1 Protein, ein Transporter-Protein für kationische Aminosäuren, auf der Oberfläche muriner T-Lymphozyten binden. Der Ablauf der Transduktion muriner T-Lymphozyten entspricht dem für humane T-Zellen. Durch die Bindung des ecotropen Retrovirus an die T-Zelle gelangt die retrovirale RNA, die für einen Immunrezeptor kodiert, in die murine T-Zelle. $2,0 \times 10^6$ Zellen der Linie 293T werden äquimolar (je 3,0 µg) mit dem retroviralen Expressionsvektor und den DNA-Plasmiden pVpack-Eco (# 598) und pVpack-GP (# 600) ko-transfiziert. Anschließend werden die T-Lymphozyten 24h mit den ko-transfizierten Zellen der Verpackungslinie 293T in Kulturmedium (RPMI 1640

Medium, dutch modification) ko-kultiviert. Die Expression rekombinanter Immunrezeptoren auf der Oberfläche transduzierter T-Zellen wird mittels Durchflußzytometrie analysiert.

2.2.17 Stimulation humaner oder muriner T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptoren durch Ko-Kultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen

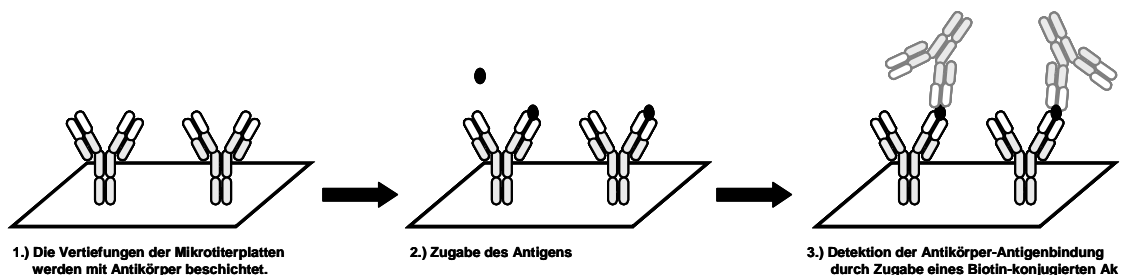
Transduzierte und nicht-transduzierte T-Lymphozyten werden 5 Minuten bei 400 x g abzentrifugiert, das Zellsediment in Medium (RPMI 1640, 5 % (v/v) FCS) resuspendiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend werden die Zellen im frischen Medium (RPMI 1640, 5 % (v/v) FCS) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die T-Zellen werden auf Immunrezeptor tragende Effektorzelle normiert und in einer Verdünnungsreihe auf 96-Loch-Rundbodenplatten (TPP®, Trasadingen, Schweiz) mit konstanter Zahl an Tumorzellen ko-kultiviert. Nach 48h wird ein Teil des Überstands abgenommen und für Zytokin-ELISA weiterverwendet, während die Zellen einem Zytotoxizitäts-Test (XTT) unterzogen werden. Je nach Ansatz variiert die Anzahl der eingesetzten Effektorzellen und Zielzellen.

2.2.18 Enzym-gekoppelter-Immunadsorbantest (ELISA)

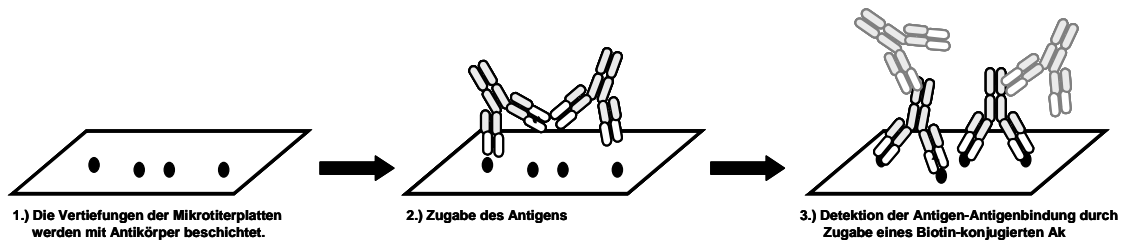
Es gibt zwei Varianten der ELISA-Technik, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

- 1.) Antibody capture assay-Methode
- 2.) Antigen capture Assay-Methode

zu 1.) Modell der Antibody capture Assay-Methode:



zu 2.) Modell der Antigen capture Assay-Methode:



2.2.18.1 Nachweis löslicher Zytokine mittels der Antibody capture Assay Methode

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (PolySorbTM, Nunc GmbH, Wiesbaden) erfolgte durch Inkubation (ÜN bei 4 °C) von einem Fangantikörper in 50 µl Beschichtungspuffer (1,7 ml 0,2 M Na₂CO₃, 0,8 ml 0,2 M NaHCO₃, ad 10 ml *aqua bidest.*). Die Konzentration des verwendeten Fangantikörpers betrug 1 µg/ml Beschichtungspuffer. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde für 2h bei RT mit 3 % (w/v) BSA in PBS inkubiert und fünfmal 200 µl PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Die Proben (50 µl/Vertiefung) wurden auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, 2h bei RT inkubiert und anschließend fünfmal mit 200 µl PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Die Inkubation mit je 50 µl/Vertiefung mit einem Biotin-gekoppelten Detektions-Antikörper (0,2 µg/ml) erfolgte 1h bei RT, anschließend wurde fünfmal mit 200 µl PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen, 30 Minuten mit einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (500 U/ml; 1:10.000 Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics) inkubiert und erneut fünfmal gewaschen. Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl ABTS-Substratlösung/Vertiefung (1 mg/ml ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics) bei Raumtemperatur (RT) entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD₄₀₅) wurde photometrisch bestimmt.

Beim Nachweis des humanen IL-2 wurden die PolySorbTM-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden) mit 1 µg/ml anti-human-IL-2 Antikörper (PharMingen, Hamburg) beschichtet. Entwickelt wurde der ELISA mit 0,2 µg/ml Biotin-konjugierten anti-human IL-2 Antikörper (PharMingen).

Bei der Bestimmung der Konzentration des humanen IFN-γ wurden MaxiSorbTM-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden) mit 1 µg/ml anti-human IFN-γ AK (PharMingen, Hamburg) beschichtet. Gebundenes humanes IFN-γ wurde nachgewiesen mit Hilfe des Biotin-konjugierten anti-human IFN-γ Antikörpers (PharMingen) 0,25 µg/ml PBS.

Beim ELISA-Nachweis des murinen IFN-γ wurden MaxiSorbTM-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH) mit 1 µg/ml anti-Maus-IFN-γ AK (Biosource, Camarillo, USA)

Gebundenes murines IFN- γ wurde nachgewiesen mit Hilfe des Biotin-konjugierten anti-Maus IFN- γ Antikörpers (Biosource) 0,20 μ g/ml PBS.

2.2.18.2 Nachweis CEA oder human IgG spezifischer Antikörper im Serum immunisierter Versuchstiere mittels der Antigen capture Methode

Beim Nachweis von Mausserum Antikörpern gegen das CEA Antigen wurden die Vertiefung von MaxiSorbTM-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden) mit 50 μ l CEA (2,5 μ g/ml Beschichtungspuffer (1,7 ml 0,2 M Na₂CO₃, 0,8 ml 0,2 M NaHCO₃, ad 10 ml *aqua bidest.*) über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen der ELISA-Platten mit je fünfmal 200 μ l PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Die Blutseren wurden aufgetaut, 1:300 vorverdünnt, in einer Verdünnungsreihe auf die beschichteten Mikrotiterplatten pipettiert (je 50 μ l/Vertiefung) und 2h bei RT inkubiert. Kommerziell erworbenes Mauserum (Dako) und der anti-CEA Antikörper (Abcam) wurden als Kontrollen verwendet. Das Kontrollserum (Dako) wurde ebenfalls 1:300 vorverdünnt. Der anti-CEA Kontroll-Antikörper wurde in einer Verdünnungsreihe (0,5 μ g/ml bis 0,5 ng/ml) eingesetzt. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Zur Detektion diente ein Biotin-konjugierter anti-Maus IgG Antikörper (SouthernBiotech), eingesetzt 0,2 μ g/ml in PBS. Nach 60-minütiger Inkubation mit dem Detektions-Antikörper wurden die Platten fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (500 U/ml; 1:10.000-Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics) 30 min bei RT inkubiert und erneut fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Der Test wurde durch Zugabe von 50 μ l ABTS-Substratlösung/Vertiefung (1 mg/ml ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics) bei RT entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD₄₀₅) wurde photometrisch bestimmt.

Beim Nachweis von human IgG spezifischen Antikörpern im Mausserum von immunisierten Versuchstieren wurden die Vertiefung von MaxiSorbTM-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden) mit human IgG (SouthernBiotech) in einer Konzentration von 1 μ g/ml PBS, 2h bei RT beschichtet. Blutseren, deren murine IgG-Konzentration zuvor bestimmt wurde, wurden in einer Verdünnungsreihe (5,0 μ g/ml bis 40 ng/ml) auf den beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Der ELISA wurde 1h bei RT mit Hilfe des Biotin-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper 0,2 μ g/ml PBS

entwickelt. Zwischen jedem Inkubationsschritt lagen jeweils fünf Waschschriffe mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20). Anschließend wurden die Platten mit der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (500 U/ml; 1:10.000-Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics), 30 min bei RT inkubiert und erneut fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl ABTS-Substratlösung/Vertiefung (1 mg/ml ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics), 30 min bei RT entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD₄₀₅) wurde photometrisch bestimmt.

2.2.18.3 Konzentrationsbestimmung von murinen IgG Proteinen im Mausserum von Versuchstieren mittels der Antigen capture Methode

Für die Konzentrationsbestimmung von murinen IgG Proteinen im Mausserum von Versuchstieren wurden die Vertiefungen von MaxiSorbTM-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden) mit anti-Maus IgG Antikörper (Southern Biotech) 1 µg/ml Beschichtungspuffer (1,7 ml 0,2 M Na₂CO₃, 0,8 ml, 0,2 M NaHCO₃, ad 10 ml *aqua bidest.*) 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen der ELISA-Platten mit je fünfmal 200 µl PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Die Blutseren wurden aufgetaut, 1:200 vorverdünnt, in einer Verdünnungsreihe auf die beschichteten Mikrotiterplatten gegeben und 2h bei RT inkubiert. Kommerziell erworbenes murines IgG (Southern Biotech) wurde als Standard verwendet und in einer Verdünnungsreihe (1,0 µg/ml bis 0,5 ng/ml) auf den beschichteten ELISA-Platten inkubiert. Entwickelt wurde der ELISA mit Hilfe des Biotin-konjugierten anti-Maus IgG Antikörpers (Southern Biotech), welcher in einer Konzentration von 0,2 µg/ml PBS (je 50 µl/Vertiefung) eingesetzt wurde. Zwischen jedem Inkubationsschritt lagen jeweils fünf Waschschriffe mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20). Der ELISA wurde mit Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (500 U/ml; 1:10.000-Verdünnung in PBS; 50 µl/Vertiefung, Roche Diagnostics), 30 min bei RT inkubiert und die ELISA-Platten erneut fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen, bevor je 50 µl/Vertiefung ABTS-Substratlösung (1 mg/ml ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics) pipettiert und 30 min bei RT inkubiert wurden. Die photometrische Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD₄₀₅) am Emax[®] ELISA-Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) durch-geführt.

2.2.18.4 Nachweis anti-idiotypischer Antikörper gegen die BW431/26scFv und SCA-431scFv Bindedomäne aus dem Serum immunisierter Tiere mittels der modifizierten Antigen capture Assay Methode

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (PolySorbTM, Nunc GmbH, Wiesbaden) erfolgte durch Inkubation (ÜN bei 4 °C) mit dem anti-human IgG Fangantikörper (1 µg/ml) in Beschichtungspuffer (1,7 ml 0,2 M Na₂CO₃, 0,8 ml 0,2 M NaHCO₃ ad 10 ml *aqua bidest.*). Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde für 2h bei RT mit 3 % (w/v) BSA in PBS-Tween inkubiert und fünfmal mit PBS-Tween gewaschen. Auf die beschichteten Mikrotiterplatten wurde das lösliche Protein BW431/26scFv-hIgG (# 443) oder das Protein SCA431scFv-hIgG (# 970) in einer Konzentration von 1,0 µg/ml PBS eingesetzt (je 50 µl/Vertiefung) und 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit je 200 µl PBS-T gewaschen. In nächsten Schritt wurden Mausseren der Versuchstiere in einer Verdünnungsreihe 5 µg bis 2,5 ng murines IgG Protein pro 1 ml PBS auf die Mikrotiterplatten aufgetragen (je 50 µl/Vertiefung) und 2h bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde der anti-idiotypische Antikörper BW648/31 (1 µg/ml PBS), der an die BW431/26scFv und SCA431scFv Domäne bindet, verwendet. Anschließend wurden die ELISA-Platten mit je 200 µl PBS gewaschen. Detektiert wurde der ELISA mit sekundärem Biotin-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper, der in einer Konzentration von 0,2 µg/ml PBS eingesetzt und 1h bei RT auf der ELISA-Platte inkubiert wurde. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit je 200 µl PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (500 U/ml; 1:10.000-Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics), 30 min bei RT inkubiert und erneut fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl ABTS-Substratlösung/Vertiefung (1 mg/ml ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics), 30 min bei RT entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD₄₀₅) wurde photometrisch bestimmt.

2.2.19 XTT-basierender Zytotoxizitätstest

(*Cell proliferation Kit II (XTT)*, Roche Diagnostics, Mannheim)

(Jost und Kirkwood, 1992)

Die Zytolyse von Tumorzellen wurde mit Hilfe eines XTT-basierenden Zytotoxizitäts-Test bestimmt. Hierbei wurde der Umsatz des durch mitochondriale Dehydrogenasen

metabolisierten XTT (Natrium 3'-[1-phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzen-Sulfonsäure-hydrat] zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz photometrisch bestimmt. Die Höhe des Umsatzes hängt direkt von der Viabilität der kultivierten Zellen ab.

Es wurden jeweils 50 µl/Vertiefung XTT-Markierungslösung (1 mg/ml XTT; 1,25 mM PMS, Roche Diagnostics, Mannheim) zu 50 µl Medium/Vertiefung gegeben, der Ansatz bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die Extinktion alle 30 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 650 nm Referenzwellenlänge (OD₄₅₀₋₆₅₀) bestimmt. Der maximale Umsatz von XTT wurde gemessen in den Vertiefungen, die nur Tumorzellen enthielten. Zudem wurde die OD der Vertiefungen bestimmt, die nur RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS. Ebenso wurde der Anteil am Gesamtumsatz des XTT-Substrates durch die Effektorzellen bestimmt. Hierfür wurde die gleiche Anzahl T-Zellen wie auch im Versuchansatz in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS ausplattiert und die OD-Messung dieser Vertiefungen nach Zugabe von XTT gemessen.

Die Anzahl der lebenden Tumorzellen [%] wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Vertiefung des Versuchansatzes}} - \text{OD}_{\text{Effektorzellen alleine}}}{\text{OD}_{\text{Tumorzellen alleine}} - \text{OD}_{\text{Medium}}} \times 100$$

2.2.20 Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen

Die Zellen werden zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen, adhärent wachsende Zellen trypsinisiert und in 10 ml Medium (RPMI 1640, 10 % (v/v) FCS) resuspendiert. Etwa 2 x 10⁵ Zellen werden in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen werden 3 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 2 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand erneut verworfen und die Zellen in etwa 100 µl PBS resuspendiert. Ein Detektions-Antikörper (Endkonzentration 5 µg/ml) wird zugegeben und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Schritt werden die Proben vor direkten Lichteinstrahlung geschützt. Danach werden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und bei 400 x g zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wird. Anschließend wird das Zellsediment in 500 µl PBS resuspendiert und 1 µl Propidiumjodid (0,5 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) hinzugegeben, um tote Zellen zu markieren. Die

Auswertung der Immunfluoreszenz-Tests erfolgt mit Hilfe eines FACSCaliburTM oder FACSCantoTM Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.2.21 Kryokonservierung von Zellen

Etwa 5×10^6 Zellen wurden trypsiniert, in Medium überführt und durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 min bei RT sedimentiert. Das Zellsediment wurde in $900 \mu\text{l}$ Einfriermedium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden zügig in Gefrier-Ampullen überführt und sofort auf Eis gelagert. Zunächst wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und nach 48h zur langfristigen Lagerung N_2 überführt.

2.2.22 Mausversuche

Für alle Mausversuche lag die Genehmigung der Bezirksregierung Köln vor. Für alle Experimente wurden ca. 8 bis 12 Wochen junge Mäuse des immunkompetenten Stammes C57-black/6 (Charles River) verwendet. Jeweils drei bis sechs Tiere pro Käfig wurden unter SPF Bedingungen gehalten. Im Tierstall wurden die Tiere bei konstant 20°C gehalten. Ein künstlicher Tag/Nacht-Zyklus von je 12 Stunden wurde erzeugt. Effektorzellen und/oder Tumorzellen wurden subkutan injiziert. Je nach Versuch wurden Zellen mit 20 bis 30 Gray mit Hilfe eines Teilchenbeschleunigers mit Neutronenquelle bestrahlt. Die Bestrahlung wurde in der Strahlentherapie der Universitätsklinik zu Köln etwa 16 Stunden vor der Injektion durchgeführt.

2.2.23 Gewinnung von Serumproben

Blut wird aus der Schwanzarterie entnommen. Hierzu wird der Schwanz des Versuchstiers unter einer Wärmelampe gehalten, um eine maximale Gefäßerweiterung zu erreichen. Anschließend wird der Schwanz mit 70%-igem Ethanol eingerieben. Nach schneller Trocknung wird der Schwanz mit einem Skalpell eingeritzt und das herausfließende Blut in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Nach kurzem Abdrücken der Wunde kommt die Blutung zum Stehen. Das Blut wird bei 2h bei RT inkubiert. Das geronnene Blut wird für 15 min bei $1500 \times g$ zentrifugiert und der Serumüberstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die Serumproben werden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung eines retroviralen Gentransfer-Protokolls für die Transduktion muriner T-Lymphozyten.

Im ersten Kapitel des Ergebnisteils beschäftigen wir uns mit der Optimierung eines retroviralen Gentransferprotokolls, welches uns eine effiziente Transduktion muriner T-Lymphozyten ermöglicht. Die Retroviren werden mit Hilfe einer Verpackungszelllinie, eines retroviralen Vektors mit der Expressionskassette für den rekombinanten Immunrezeptor und zwei Helfer-Plasmiden kodierend für die *Gag*, *Pol* und *Env* Proteine produziert. In unserem Fall verwenden wir Zellen der Linie 293T für die Produktion des Retrovirus. Da für die Effizienz der Transduktion das *Env* Protein entscheidend ist, verglichen wir die *Env* Proteine (Tab. 5) von Vesicular Stomatitis Virus G (VSVG), Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) und Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) untereinander.

ursprüngliches Virus	Helferplasmid, das für ein <i>Env</i> Protein kodiert
VSVG	pVpack-VSV-G (#597)
GALV	GaLV (#392)
MMLV	pVpack-10A1 (#596), pVpack-Eco (#598) und pVpack-Ampho (#599)

Tabelle 5: Plasmide, die eine Expressionskassette für ein retrovirales *Env* Protein enthalten.

Zur Produktion der Retroviren wurden Zellen der Linie 293T mit der Plasmid DNA für den retroviralen Vektor #439 kodierend für den anti-CEAscFv-hFc-hCD3 ζ Immunrezeptor, der Helfer-Plasmid DNA kodierend für das *Gag* und *Pol* Protein # 393 (pHIT60) und jeweils einer der fünf Helfer-Plasmid DNA kodierend für das *Env* Protein #392 (GaLV), #596 (pVpack-10A1), #597 (pVpack-VSV-G), #598 (pVpack-Eco) oder #599 (pVpack-Ampho) ko-transfiziert. Nach 8h Stunden wurde das Medium ausgetauscht und murine T-Zellen, die mit PHA-L (3,0 μ g/ml), IL-2 (500 U/ml), IL-15 (5,0 μ g/ml), anti-Maus-CD3 Antikörper (1,0 μ g/ml) und anti-Maus-CD28 Antikörper (0,1 μ g/ml) voraktiviert waren, wurden zu den transfizierten Zellen der Linie 293T zugegeben. Nach weiteren 24h der Ko-Kultur wurden die T-Zellen entnommen. Der Nachweis des Rezeptors #439 auf der T-Zelloberfläche wurde mittels Durchfluß-

zytometrie mit Hilfe eines PE gekoppelten anti-human IgG₁ Antikörpers, der gegen die extrazelluläre „spacer“-Domäne des rekombinanten Rezeptors gerichtet ist, und eines FITC konjugierten anti-Maus CD3 Antikörpers zum Markieren von T-Zellen durchgeführt. Nicht-transduzierte T-Zellen dienten als Kontrolle. Die Immunfluoreszenz-Analysen wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie ausgewertet (Abb. 3 [A]-[F]). Alle geprüften „envelopes“ vermögen murine T-Zellen zu transduzieren. Offensichtlich werden murine T-Zellen aber am effizientesten mit Retroviren infiziert, die das ecotrope *Env* Protein pVpack Eco (#598) vom MMLV enthalten (Abb.3 [E]). Nicht-transduzierte murine T-Zellen exprimieren auf der Oberfläche keinen Rezeptor.

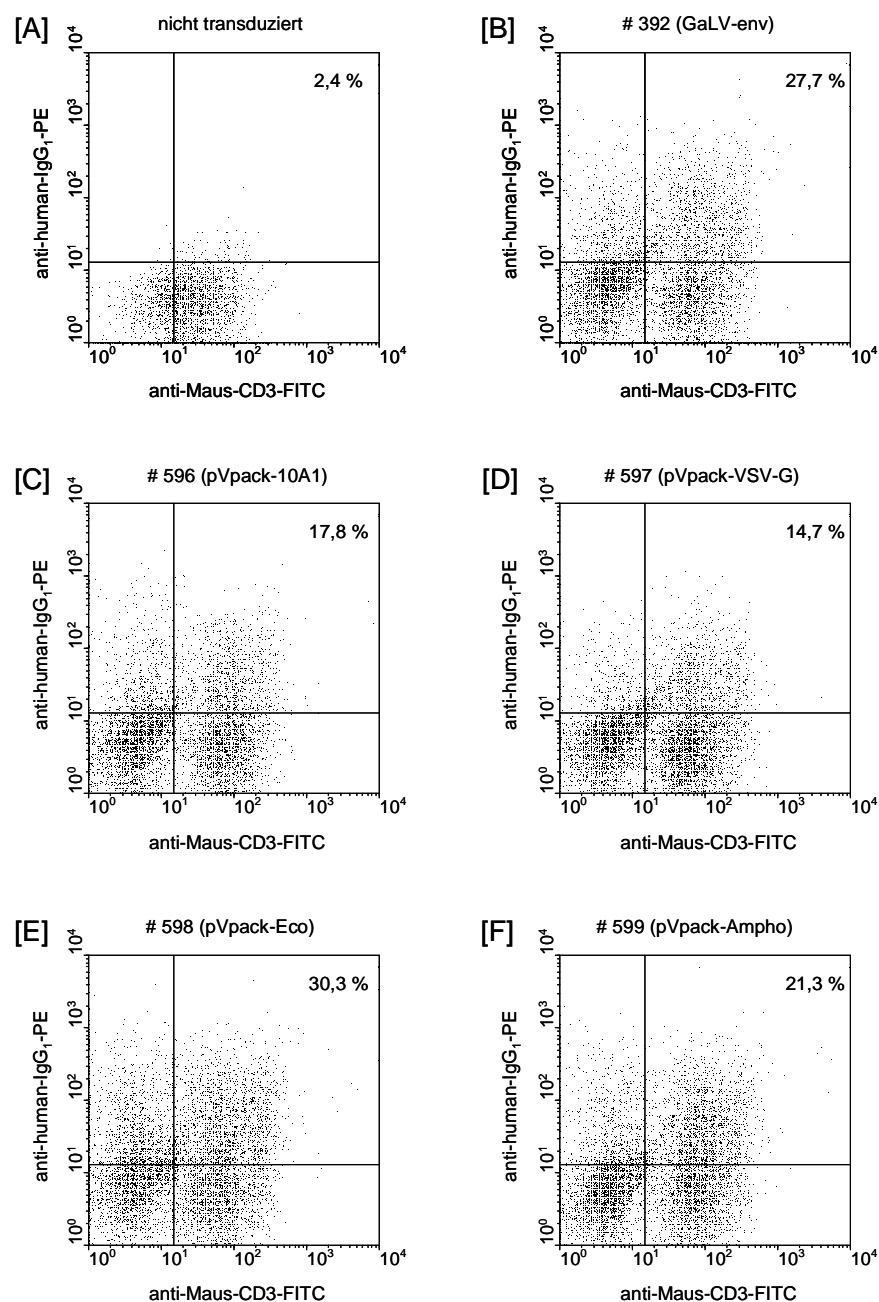


Abbildung 3: Optimierung eines retroviralen Gentransfer-Protokolls für die Transduktion muriner

T-Lymphozyten. Zellen der Linie 293T wurden mit der Plasmid DNA für den retroviralen Vektor #439, der Helfer-Plasmid DNA #393 (*gag* und *pol* Gen) und jeweils einer der fünf *env* Plasmid DNA #392, #596, #597, #598 oder #599 ko-transfiziert. Nach 8h Stunden wurde das Medium ausgetauscht und aktivierte murine T-Lymphozyten wurden zu den transfizierten Zellen der Linie 293T zugegeben. Nach weiteren 24h der Ko-Kultur wurden die T-Lymphozyten entnommen. Der Expressionsnachweis des Rezeptors # 439 auf der T-Zelloberfläche wurde mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Hierfür wurde ein PE-gekoppelter anti-human IgG₁ Antikörper, der an die extrazelluläre Fc-Domäne des Rezeptors bindet, und ein FITC-konjugierter anti-Maus-CD3 Antikörper zum Markieren der T-Zellen verwendet.

3.2 Generierung muriner T-Zell Rezeptoren erster Generation mit Spezifität für CEA und CD30.

In diesem Kapitel beschäftigen wir uns mit der Konstruktion rekombinanter Immunrezeptoren für den *in vivo* Einsatz in Mäusen.

3.2.1 Generierung der murinen CD3 ζ cDNA.

Die cDNA für die murine CD3 ζ Signaldomäne wurde aus aktivierten murinen T-Lymphozyten gewonnen. Hierfür wurden Zellen aus der Milz einer C57-Black/6 Maus isoliert und aktiviert. Die Gesamt-RNA wurde aus den T-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das poly-T *antisense*-Oligonukleotid dt(18)-N, das am 3'-poly-A-Ende der mRNA ansetzt, verwendet. Im nächsten Schritt wurde die cDNA für die murine CD3 ζ Signaldomäne mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta-S (Oligo # 224) und CD3zeta-AS (Oligo # 243) aus der Gesamt-cDNA amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende der vervielfältigten DNA eine Restriktionsschnittstelle für *BstXI* und am 3'-Ende je eine Schnittstelle für *Sall* und *XhoI* generiert. Das 488 bp lange PCR Produkt wurde aufgereinigt und mit dem linearisierten Plasmid pCR[®]2.1 ligiert (Abb. 4). Dabei fungierte die überstehende Adenin-Base an dem 3'-Ende des PCR-Produkts zusammen mit der Thymin-Base am 3'-Ende des pCR 2.1-Vektors als Bindungspaar. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das erhaltene Plasmid pCR 2.1-murine-CD3- ζ (#861) mit *Sall* geschnitten. Da die murine CD3 ζ Sequenz über eine *Sall* Schnittstelle verfügt, wurde das Plasmid #861 linearisiert. Erwartet wurde ein ca. 4.4 kb langes Fragment (Abb. 4). Desweiteren wurde die cDNA für die CD3 ζ Signalkette in dem neu generierten Plasmid #861 sequenziert. Zur Sequenzierung der CD3 ζ cDNA wurden die

beiden Oligonukleotide M13 Reverse Primer und M13 Forward (-20) Primer verwendet (Sequenz der CD3 ζ cDNA im Anhang).

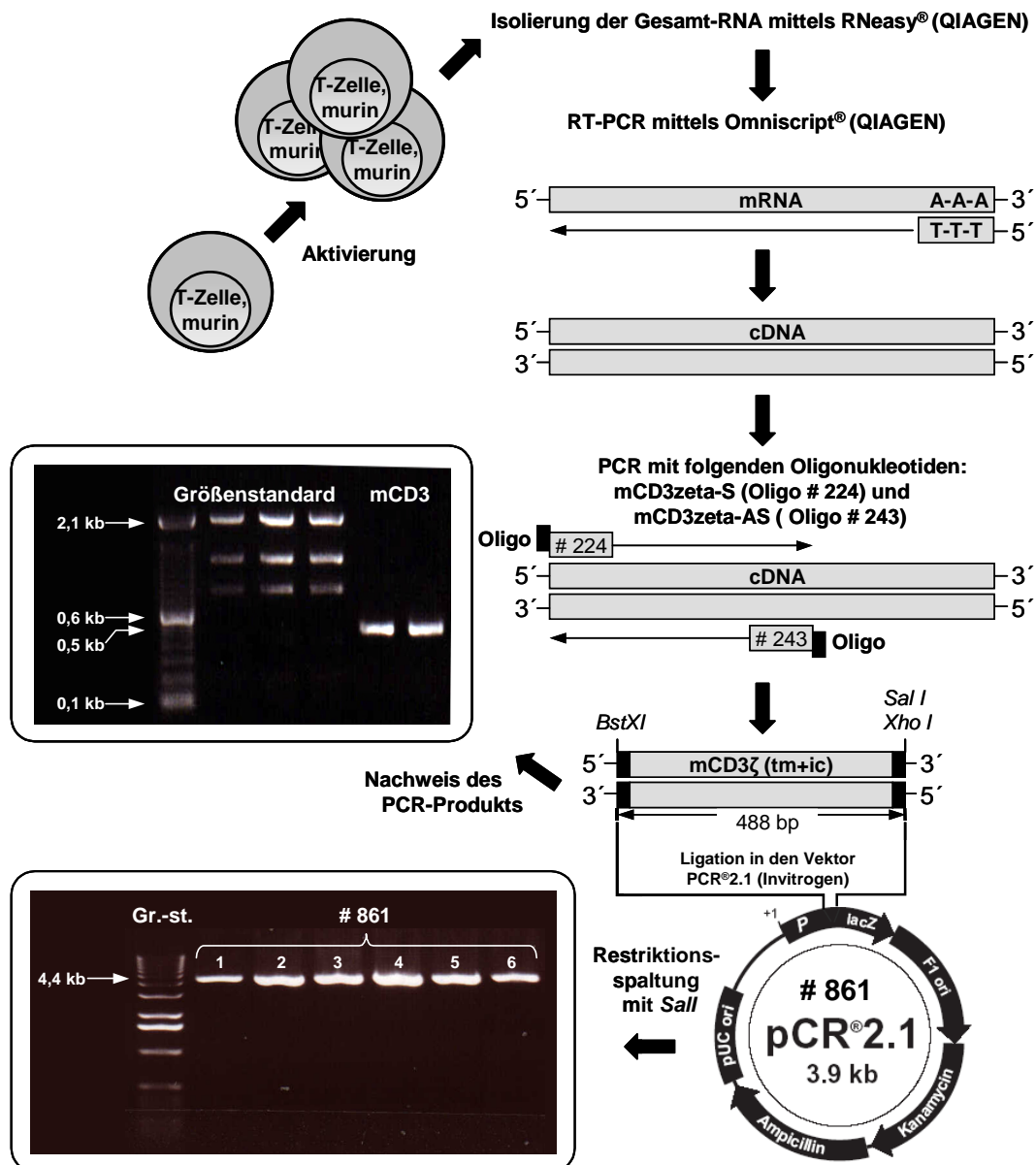


Abbildung 4: Klonierungsschema zur Gewinnung der DNA Sequenz der murinen CD3 ζ Signaldomäne. Die Gesamt-RNA aus aktivierten Milzzellen einer C57-Black/6 Spendermaus wurde aus den T-Lymphozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das poly-T *antisense*-Oligonukleotid dt(18)-N, das am 3'-poly-A-Ende der m-RNA ansetzt, verwendet. Aus der Gesamt-cDNA wurde mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta-S (Oligo # 224) und CD3zeta-AS (Oligo # 243) die cDNA-Sequenz für die murine CD3 ζ Signalkette amplifiziert. Am 5'-Ende der vervielfältigten DNA wurde eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* und am 3'-Ende für *SalI* und *XhoI* generiert. Das erzeugte PCR-Produkt ist ca. 0,5 kb lang und wurde zum Nachweis mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das PCR Produkt wurde gereinigt und mit dem linearisierten Plasmid pCR®2.1 ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Plasmid pCR 2.1-murine-CD3 ζ (#861)

durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *Sall* geschnitten, wobei das Plasmid #861, aufgrund einer Schnittstelle für *Sall*, linearisiert wurde. Erwartet wurde ein ca. 4.4 kb langes Fragment.

3.2.2 Generierung der murinen CD28 cDNA.

Die cDNA für die murine CD28 Signaldomäne wurde aus aktivierten murinen T-Zellen gewonnen. Hierfür wurden T-Lymphozyten aus der Milz einer C57-Black/6 Maus präpariert und die Gesamt-RNA aus den T-Lymphozyten isoliert und in die cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das poly-T *antisense*-Oligonukleotid dt(18)-N, das am 3'-poly-A-Ende der mRNA ansetzt, verwendet. Im nächsten Schritt wurde die cDNA für die murine CD28 Signaldomäne mit Hilfe der Oligonukleotide mCD28-S (Oligo # 221) und mCD28-AS (Oligo # 223) aus der Gesamt-cDNA amplifiziert. Auf diese Weise wurde am 5'-Ende der vervielfältigten DNA eine Restriktionsschnittstelle für *BstXI* und am 3'-Ende je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI* erzeugt. Das 641 bp lange PCR Produkt wurde gereinigt und mit dem linearen Plasmid pCR[®]2.1 zum neuen Plasmid pCR 2.1-murine-CD28 (#857) ligiert. Das Vorhandensein der CD28 cDNA in dem neu generierten Plasmid #857 wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BstXI* und *Sall* nachgewiesen. Erwartet wurde ein 3,9 kb und ein ca. 0,6 kb langes Fragment (Abb. 5). Die DNA der CD28 Signalkette wurde mit Hilfe der beiden Oligonukleotide M13 Reverse Primer und M13 Forward (-20) Primer sequenziert (Sequenzen der CD28 cDNA im Anhang).

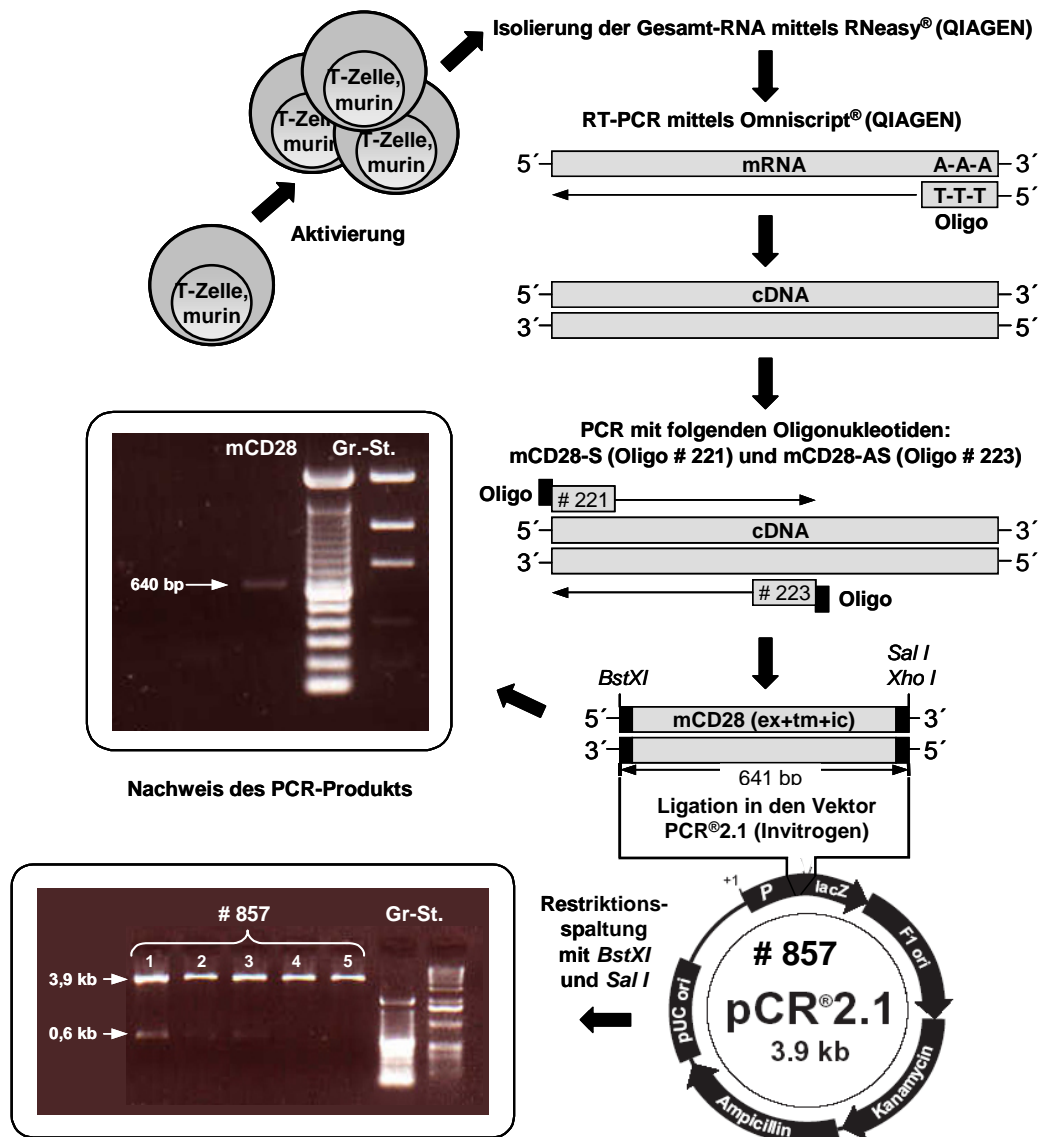


Abbildung 5: Klonierungsschema zur Gewinnung der DNA Sequenz der murinen CD28 Signal-domäne. Die mRNA aus aktivierten Milzzellen einer C57-Black/6 Spendermaus wurde mit Hilfe des poly-T *antisense*-Oligonukleotids dt(18)-N, das am 3'-poly-A-Ende der m-RNA ansetzt, in die cDNA umgeschrieben. Aus der Gesamt-cDNA wurde mit Hilfe der Oligonukleotide mCD28-S (Oligo # 221) und CD28-AS (Oligo # 223) die cDNA-Sequenz für die murine CD28 Signalkette amplifiziert. Am 5'-Ende der vervielfältigten DNA wurde eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI und am 3'-Ende je eine Schnittstelle für *Sal*I und *Xho*I generiert. Das erzeugte PCR-Produkt wurde gereinigt und mit dem linearem Plasmid pCR^{2.1} #857 ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Plasmid pCR 2.1-murine-CD28 (#857) durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Bst*XI und *Sal*I geschnitten, wobei das Plasmid in zwei Fragmente gespalten wurde. Erwartet wurde ein ca. 3,9 kb und ein ca. 0,6 kb langes Fragment.

3.2.3 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #866 mit muriner CD3 ζ Signalkette.

Die cDNA-Sequenz für die murine CD3 ζ Transmembrandomäne und Signalkette wurde mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta-S (Oligo # 224) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) in einer PCR Reaktion aus dem Plasmid # 861 amplifiziert. Auf diese Weise wurde am 5'-Ende der amplifizierten DNA eine Restriktionsstelle für *BstXI* und am 3'-Ende je eine Schnittstelle für *Sall* und *XhoI* generiert. Das PCR Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und gereinigt. Im nächsten Schritt wurde das PCR Produkt und die DNA des Plasmids pBullet-HRS3scFv-mIgG- γ (#664) durch Restriktion mit den Enzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten (Abb. 6). Dabei wurde das DNA Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mIgG- γ (#664) deletiert. Die komplementären kohäsiven Enden der murinen CD3 ζ DNA und der linearisierten Plasmid DNA #664 wurden zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD3 ζ (#866) ligiert (Abb. 12).

Die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette in dem neu generierten retroviralen Expressionsvektor #866 wurde durch Restriktion mit den Restriktions-Endonukleasen *BstXI* und *Sall* nachgewiesen, wobei zwei Fragmente der Größe 6,9 kb und 0,4 kb generiert wurden.

Zusätzlich wurde die DNA für die CD3 ζ Signalkette in dem neu generierten Plasmid #866 mit Hilfe zweier Oligonukleotide mIgG1-S (Oligo # 251) und pBullet-3' (Oligo # 136) sequenziert (Sequenz im Anhang).

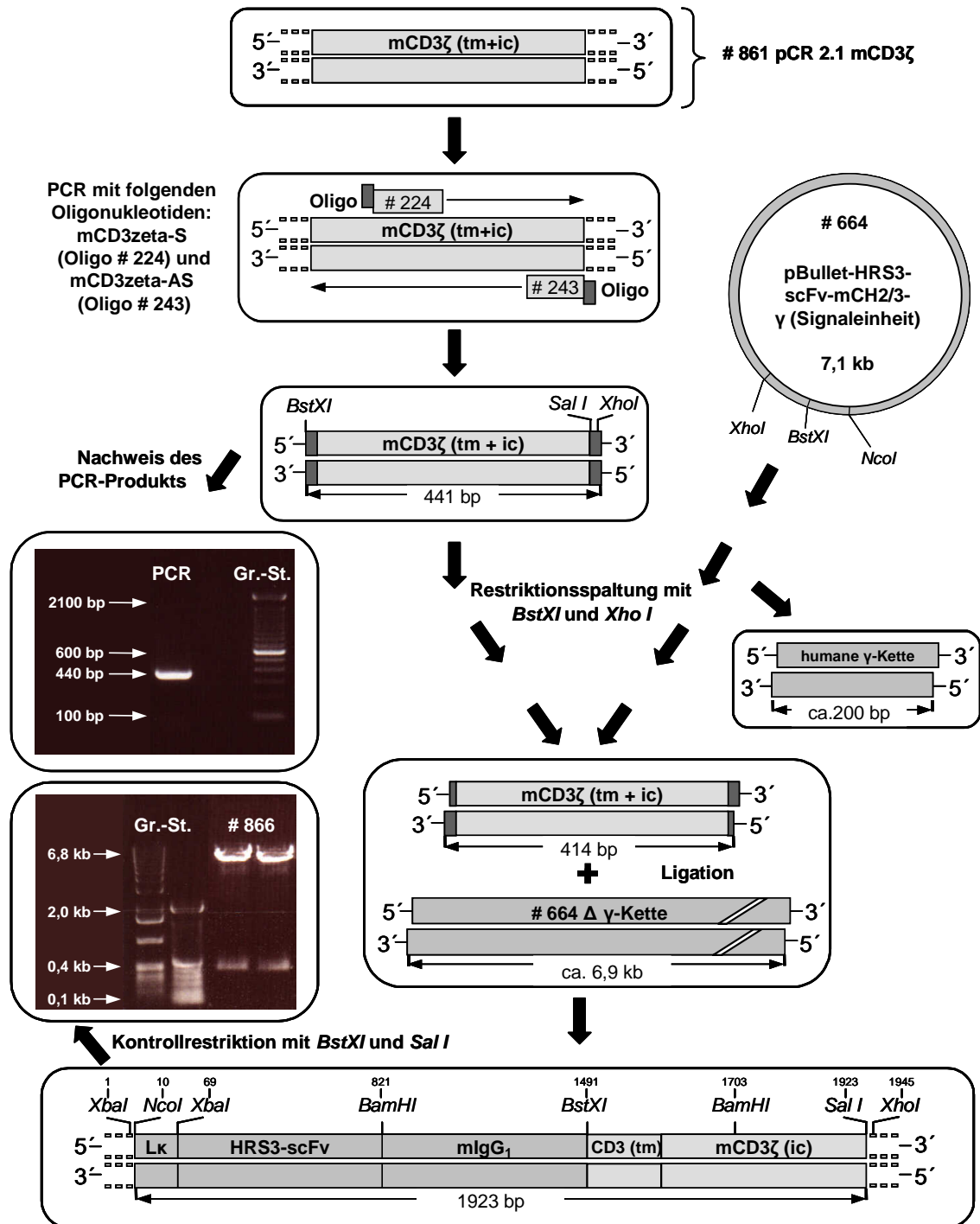


Abbildung 6: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #866. Das Plasmid #861 kodiert für die murine CD3 ζ Signalkette. Mit Hilfe der PCR wurde die CD3 ζ DNA amplifiziert und dabei am 5'-Ende die Schnittstellen für das Enzym *BstXI* und am 3'-Ende für das Enzym *XhoI* generiert, die zur Klonierung in das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG- γ (#664) genutzt wurden. Das PCR-Produkt und das Plasmid wurden durch Restriktion mit den Enzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten, wobei die DNA für die γ Signalkette aus dem Plasmid #664 deletiert wurde. Die komplementären kohäsiven Enden des DNA Fragments für die CD3 ζ Signalkette und des linearisierten HRS3scFv-Plasmids #664 wurden mit Hilfe der T4-Ligase ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das entstandene Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-CD3 ζ (#866) durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BstXI* und *SalI* geschnitten, wobei zwei Fragmente ca. 6,9 kb und ca. 0,4 kb groß generiert wurden.

3.2.4 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #878 mit muriner CD28-CD3 ζ Signalkette.

Die cDNA für die murine CD28 Transmembrandomäne und Signalkette wurde mittels der PCR-Methode mit Hilfe der Oligonukleotide mCD28-S-TM-IC (Oligo # 222) und mCD3zeta/mCD28-AS (Oligo # 248) aus dem Plasmid #857 amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde ein 20 Basenpaar langes Sequenzfragment inseriert, das für einen Teil der CD3 ζ Signalkette kodiert. Das fertige PCR-Produkt CD28(tm+ic) setzt sich aus der DNA für die Transmembrandomäne und Intrazellulärdomäne des murinen CD28 zusammen (Abb. 7).

Die cDNA der murinen CD3 ζ Signaldomäne wurde mittels der PCR-Methode mit Hilfe der beiden Oligonukleotide mCD3zeta-AS (Oligo # 243) und mCD28/mCD3zeta-S (Oligo # 247) aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde eine 20 Basenpaar lange Sequenz inseriert, die für einen Teil der CD28 Signaldomäne kodiert. Am 3'-Ende des PCR-Produkts wurde jeweils eine Schnittstelle für die Restriktions-Endonuklease *Sall* und *XhoI* erzeugt. Das PCR Produkt CD3 ζ (ic) enthält die DNA für die murine intrazelluläre CD3 ζ Signaldomäne (Abb. 7).

Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die PCR-Produkte CD28(tm+ic) und CD3 ζ (ic) dadurch miteinander verknüpft, dass die denaturierten DNA-Einzelstränge mit Hilfe der Komplementärsequenz am 3'-Ende des CD28 und am 5'-Ende des CD3 ζ PCR Produkts miteinander hybridisierten und gleichzeitig als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang dienten. Anschließend wurden mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Oligonukleotide mCD28-S-TM-IC (Oligo # 222) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) die mCD28-mCD3 ζ DNA vervielfältigt (Abb. 8). Für den weiteren Klonierungsschritt wurde das amplifizierte PCR-Produkt mCD28-mCD3 ζ elektrophoretisch aufgetrennt und gereinigt.

Im nächsten Schritt wurde das PCR-Produkt mCD28-mCD3 ζ und die DNA des Plasmids pBullet-HRS3scFv-mIgG- γ (#664) durch Restriktion mit *BstXI* und *XhoI* geschnitten (Abb. 9). Dabei wurde das DNA Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) deletiert. Die komplementären kohäsiven Enden der DNA für die murine CD28-CD3 ζ Signalkette und der linearisierten Plasmid DNA #664 wurden zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#878) ligiert. Das Vorhandensein der DNA für die murine

CD28-CD3 ζ Signalkette in dem neu generierten retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#878) wurde durch die Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*XI und *Xho*I nachgewiesen, wobei zwei Fragmente der erwarteten Größe ca. 6,9 kb und ca. 0,6 kb generiert wurden (Abb. 9). Die DNA für die CD28 Signalkette in dem neu generierten Plasmid #878 wurde mittels der Oligonukleotide mIgG1-S (Oligo # 251) und pBullet-3' (Oligo # 136) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

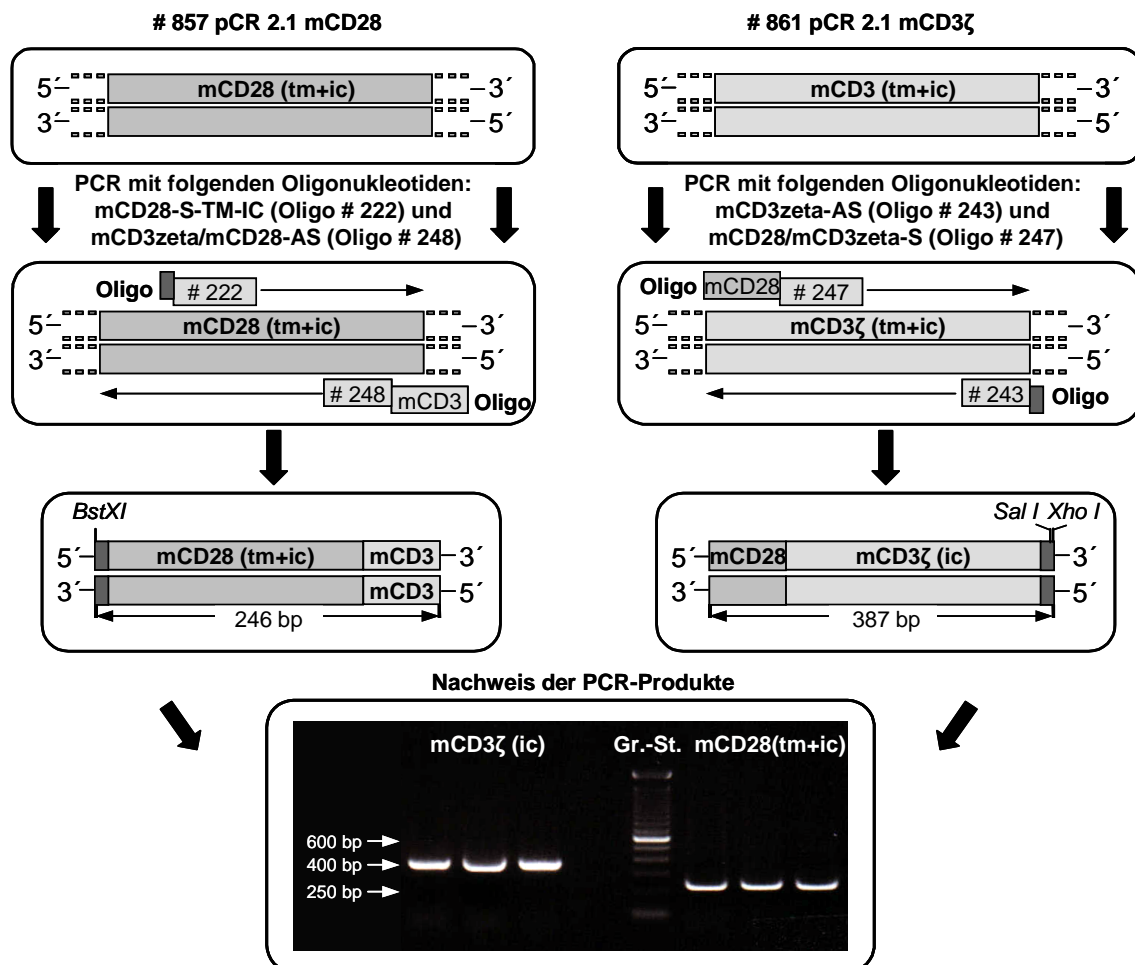


Abbildung 7: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #878 mit muriner CD28-CD3 ζ Signalkette. Die CD28 DNA wurde mittels der PCR-Methode mit Hilfe der Oligonukleotide mCD28-S-TM-IC (Oligo # 222) und mCD3zeta/mCD28-AS (Oligo # 248) aus dem Plasmid #857 amplifiziert und dabei am 5'-Ende die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI und am 3'-Ende eine 20 Basenpaar lange Sequenz inseriert, die für einen Teil der interzellulären CD3 ζ Signaldomäne kodiert. Das PCR Produkt CD28(tm+ic) enthält die DNA für die Transmembran- und Intrazellulärdomäne des murinen CD28. Das murine CD3 ζ wurde mittels der Oligonukleotide mCD3zeta-AS (Oligo # 243) und mCD28/mCD3zeta-S (Oligo # 247) aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Das PCR Produkt CD3 ζ (ic) enthält die DNA für die intrazelluläre murine CD3 ζ Signalkette. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde eine 20 Basenpaar lange Sequenz inseriert, die für einen Teil der intrazellulären CD28 Signalkette kodiert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde je eine Schnittstelle für die Enzyme *Sal*I und *Xho*I erzeugt.

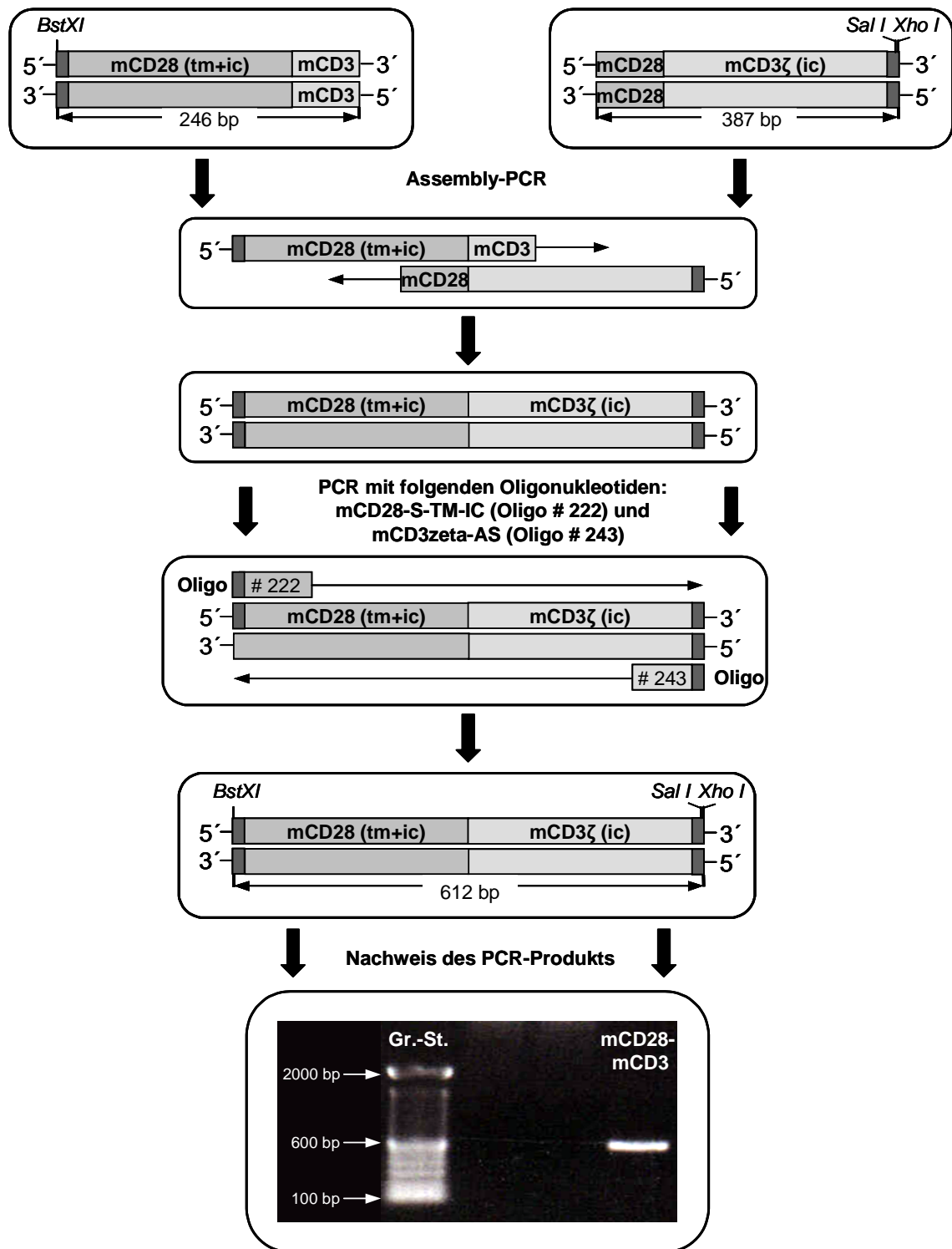


Abbildung 8: Generierung der DNA für die murine mCD28-mCD3 ζ Signalkette mittels Assembly-PCR. Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die beiden PCR-Produkte CD28(tm+ic) und CD3 ζ (ic) miteinander verknüpft. Nach der Denaturierung hybridisierte die 3'-Endsequenz des CD28 PCR Produkts mit der komplementären 5'-Sequenz des CD3 ζ PCR Produkts. Dabei dienten die miteinander hybridisierten Sequenzbereiche als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide mCD28-S-TM-IC (Oligo # 222) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) zugegeben, um das PCR-Produkt mCD28-mCD3 ζ in der gewünschten Gesamtlänge zu amplifizieren. Dabei wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI, am 3'-Ende

jeweils eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SalI* und *XhoI* inseriert.

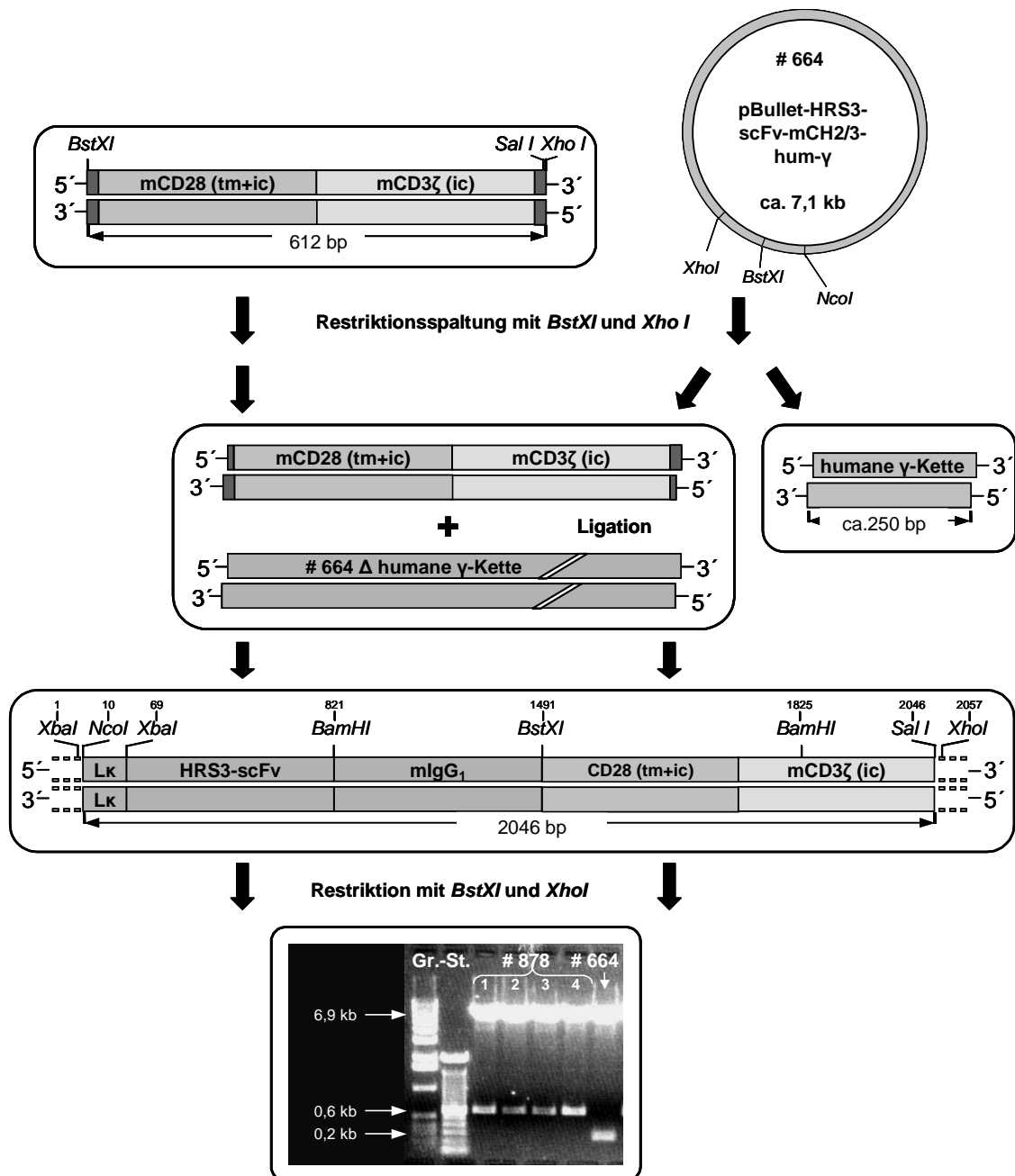


Abbildung 9: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #878 mit muriner CD28-CD3 ζ Signalkette. Das PCR-Produkt mCD28-mCD3 ζ und die Plasmid DNA pBullet-HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) wurden mit *BstXI* und *XhoI* geschnitten. Dabei wurde das DNA Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) deletiert. Die DNA für die murine CD28-CD3 ζ Signalkette wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #664 mittels T4-Ligase ligiert. Der Nachweis der DNA für die murine CD28-CD3 ζ Signalkette in dem neu generierten retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mCH2/3-mCD28-mCD3 ζ (#878) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *BstXI* und *XhoI* durchgeführt. Die Reaktion lieferte erwartungsgemäß ein ca. 6,9 kb und ein ca. 0,6 kb langes Fragment.

3.2.5 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #881 mit muriner CD3 ζ Signalkette.

Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD3 ζ (#866) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BstXI* in zwei Fragmente geschnitten, wobei das Fragment, das die HRS3scFv-mIgG DNA enthält, deletiert wurde. Das andere Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #866 enthält, wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Um die BW431/26scFv-mIgG Sequenz zu erhalten, wurde das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG- γ (#663) durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, so dass ein ca. 1,5 kb langes Fragment, das für den extrazellulären Anteil am Rezeptor kodiert, isoliert wurde.

Die komplementären kohäsiven Enden des BW431/26scFv-mIgG Fragments und der linearisierten Plasmid DNA #866 wurden miteinander ligiert, wobei der retrovirale Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD3 ζ (#881) generiert wurde (Abb. 10).

Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Plasmid #881 durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *BstXI* linearisiert. Das Vorhandensein der BW431/26scFv Sequenz im Plasmid # 881 wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen. Im Unterschied zu dem Ausgangsvektor #866 enthält das neu generierte Plasmid #881 eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XhoI*, so dass die Restriktionsreaktion jeweils zwei Fragmente der Größe 5,9 kb und 1,4 kb lieferte (Abb. 10).

Die Sequenz des Rezeptors BW431/26scFv-mIgG-mCD3 ζ mit den flankierenden Regionen im neu generierten Plasmid #881 mittels der Oligonukleotide pBullet-5' (Oligo # 51), pBullet-3' (Oligo # 136) und mIgG1-S (Oligo # 251) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

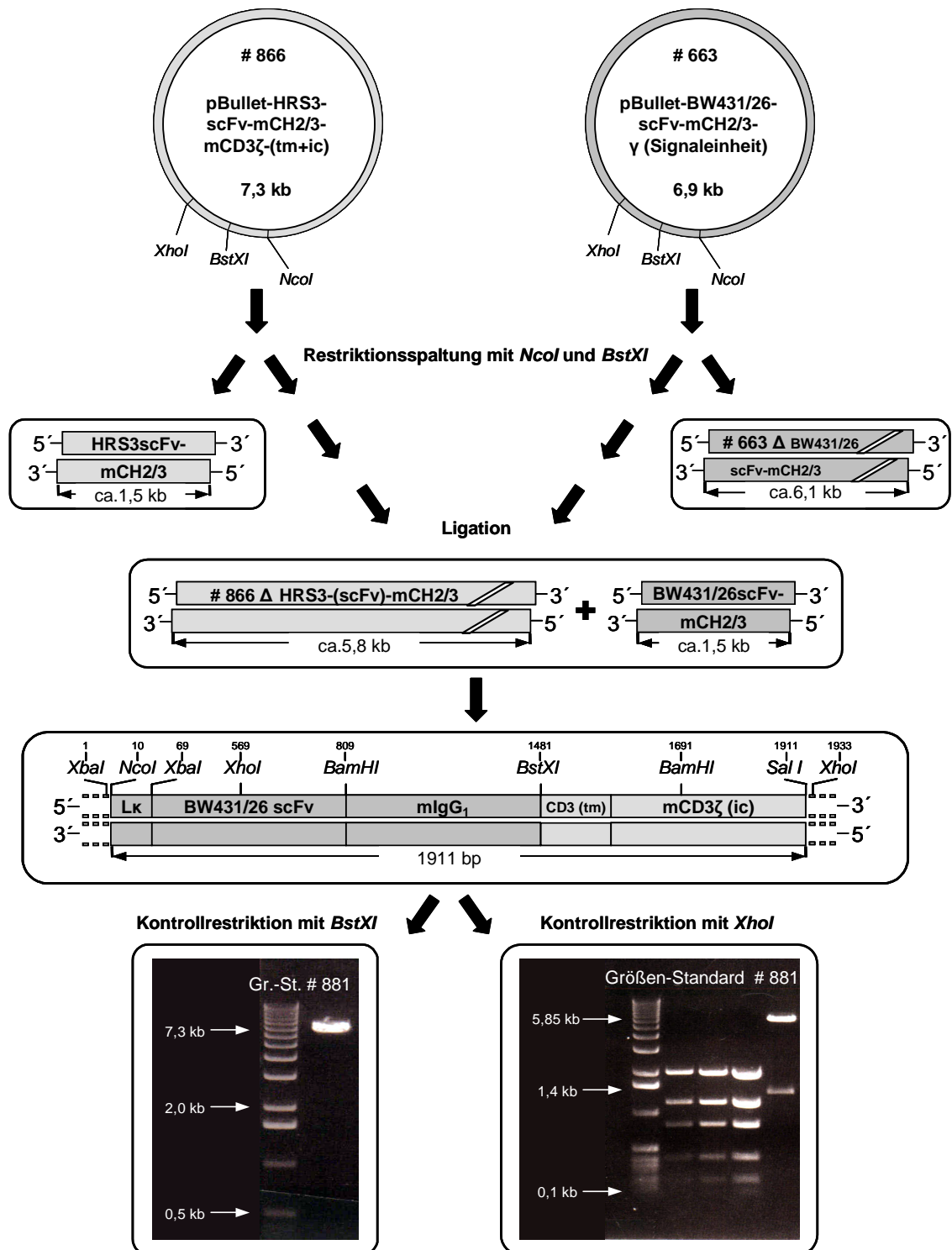


Abbildung 10: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #881 mit muriner CD3ζ Signalkette. Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mCH2/3-γ (#663) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Sequenzfragmente geschnitten, wobei die BW431/26scFv-mIgG DNA generiert und für die weitere Klonierung verwendet wurde. Die linearisierte Plasmid DNA #663 wurde deletiert. Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD3ζ (#866) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, wobei das HRS3scFv-mIgG Fragment deletiert und die linearisierte Plasmid DNA #866 für die weitere Klonierung verwendet wurde. Das BW431/26scFv-mIgG Fragment wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #866 mittels T4-Ligase zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD3ζ (#881) ligiert. Das

Vorhandensein der DNA für die BW431/26scFv-Bindedomäne in dem neu generierten retroviralen Expressionsvektor #881 wurde durch Restriktion mit dem Enzym *XhoI* nachgewiesen, wobei das Plasmid #881 erwartungsgemäß in zwei Fragmente, ca. 5,9 kb und ca. 1,4 kb lang, gespalten wurde.

3.2.6 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #883 mit muriner CD28-CD3 ζ Signalkette.

Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#878) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Fragmente geschnitten. Das Fragment, das die HRS3scFv-mIgG DNA enthält, wurde deletiert. Das andere Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #878 enthält, wurde gereinigt und isoliert. Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mCH2/3- γ (#663) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Fragmente geschnitten, wobei die BW431/26scFv-mIgG DNA isoliert, gereinigt und mit der linearisierten Plasmid DNA #878 zum neuen Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#883) ligiert wurde.

Das Vorhandensein der BW431/26scFv Sequenz im Plasmid #883 wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen, da im Unterschied zu dem Ausgangsvektor #878 das neu generierte Plasmid #883 über eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XhoI* verfügt, so dass zwei Fragmente der Größe 5,9 kb und 1,5 kb generiert wurden (Abb. 11). Zusätzlich wurde die DNA des Rezeptors BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#883) einschließlich der flankierenden Regionen mit Hilfe der Oligonukleotide pBullet-5' (Oligo # 51), pBullet-3' (Oligo # 136) und mIgG1-S (Oligo #251) sequenziert (Rezeptorsequenz im Anhang).

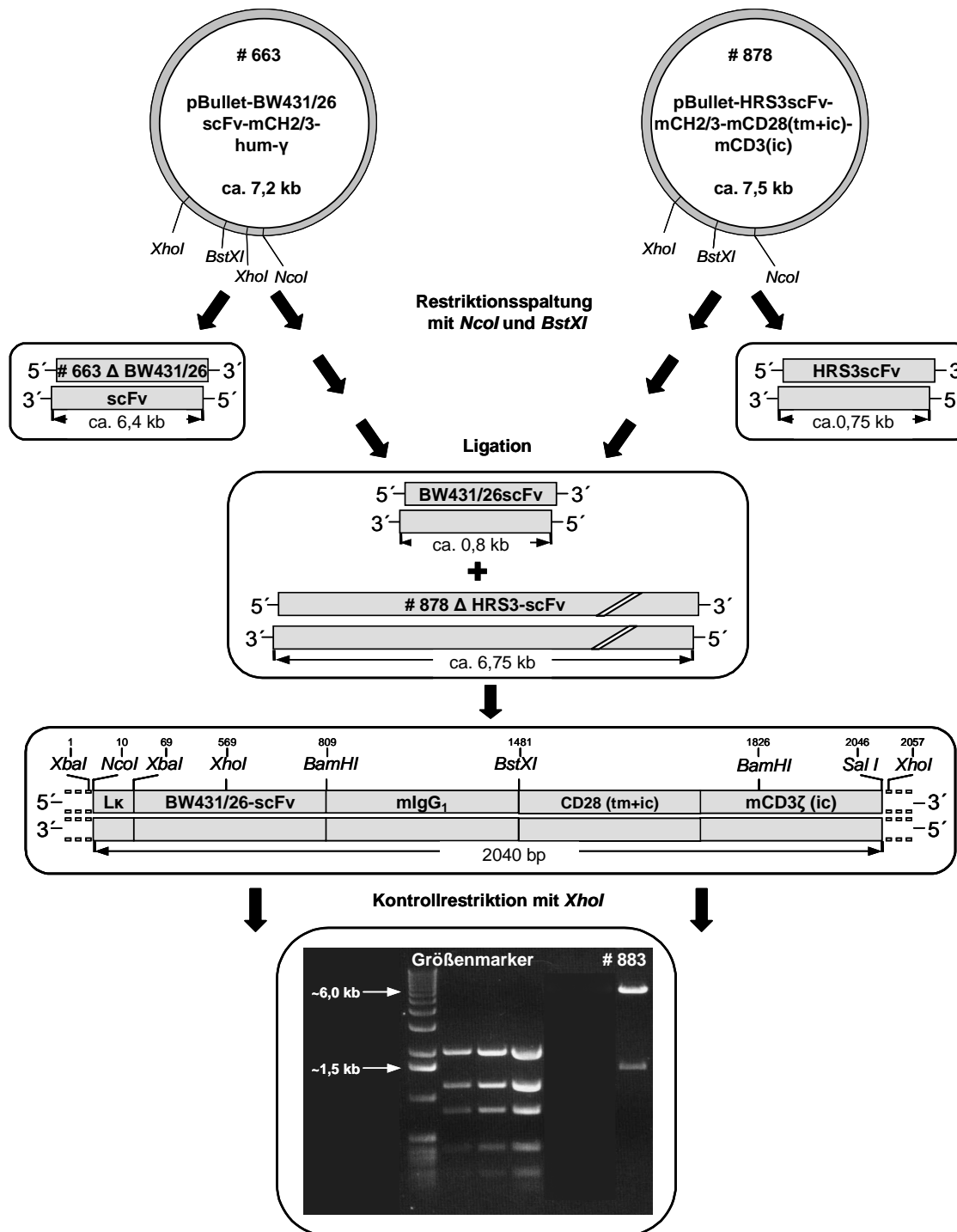


Abbildung 11: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #883 mit muriner CD28-CD3ζ Signalkette. Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mCH2/3-γ (#663) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Sequenzfragmente gespalten. Das BW431/26scFv-mIgG Fragment, das für den extrazellulären Anteil am Immunrezeptor kodiert, wurde isoliert. Die linearisierte Plasmid DNA #663 wurde deletiert. Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ (#878) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, wobei das HRS3scFv-mIgG Fragment deletiert wurde. Hingegen wurde die linearisierte Plasmid DNA #878 mit der BW431/26scFv DNA mit Hilfe der T4-Ligase zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ (#883) ligiert. Das Vorhandensein der DNA für die BW431/26scFv-Bindedomäne in dem neu generierten retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ

(#883) wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen, wobei zwei Fragmente, ca. 5,9 kb und ca. 1,5 kb lang, generiert wurden.

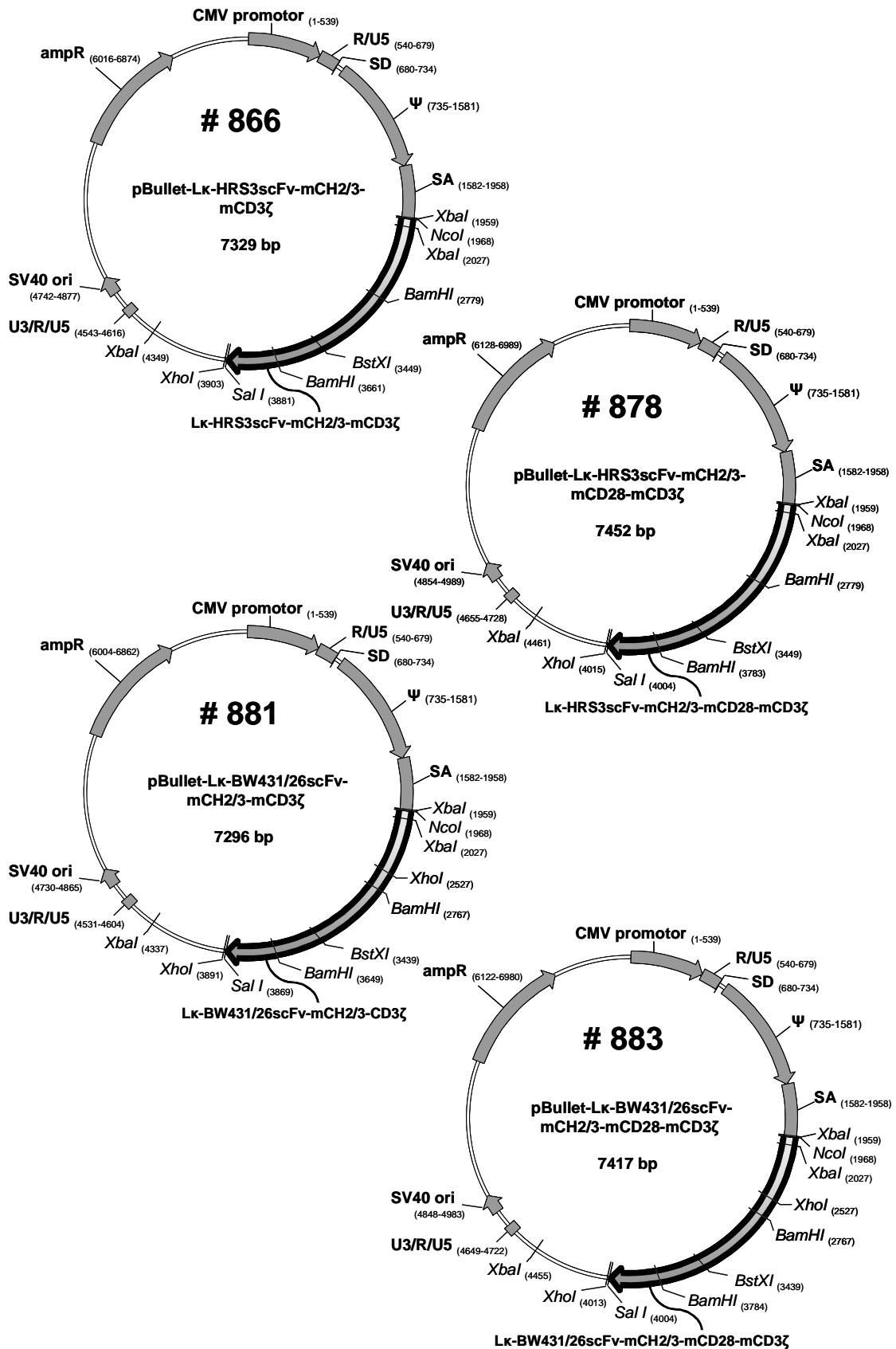


Abbildung 12: Plasmidkarten der neu generierten retroviralen Expressionsvektoren # 866, # 878, # 881 und # 883.

3.2.7 Expression der rekombinanten anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ oder CD28-CD3 ζ Signaltransduktionskette in Zellen der Linie 293T.

In diesem Abschnitt untersuchten wir die Expression der neu generierten rekombinanten Immunrezeptoren auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T. Dazu wurden Zellen der Linie 293T mit der DNA für den anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-mIgG-mCD3 ζ (#881) und für den anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#883) transfiziert. Außerdem wurden weitere Zellen der Linie 293T mit der DNA für die anti-CD30 Rezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD3 ζ (#866) und HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (#878) transfiziert.

Nach 48h der Inkubation wurde die Expression rekombinanter Rezeptoren auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen mittels Durchflußzytometrie mit Hilfe des FITC-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörpers, der an die extrazelluläre IgG Proteindomäne des Rezeptors bindet, nachgewiesen. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein FITC-gekoppelter anti-human IgG₁ Antikörper verwendet.

Die Expression der rekombinanten anti-CD30 und anti-CEA Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ (#866 und #881) oder mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ -Signalkette (#878 und #883) wurde mit Hilfe des FITC-konjugierten anti-Maus-IgG₁ Antikörpers nachgewiesen. Die Frequenz der Rezeptorexpression in 293T Zellen ist offensichtlich äußerst niedrig (Abb.13 , [B], [C], [D] und [E]). Der Nachweis der Rezeptoren ist jedoch spezifisch, da auf der Zelloberfläche nicht-transfizierter Zellen der Linie 293T keine Rezeptoren detektiert wurden (Abb.13 [A]).

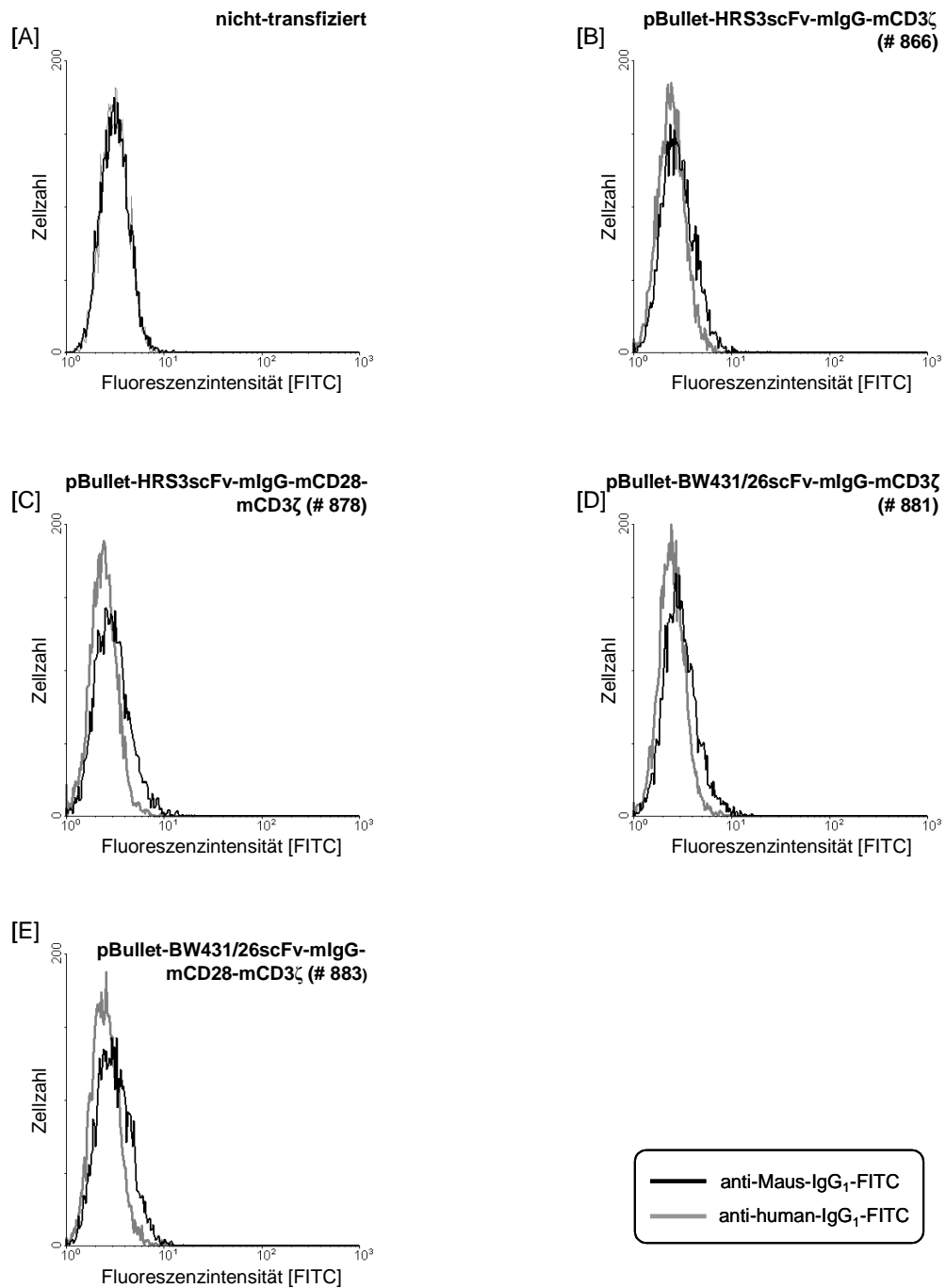


Abbildung 13: Expression der rekombinanten anti-CEA (#881 und #883) und der anti-CD30 Immunrezeptoren (#866 und #878) auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T. Jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen der Linie 293T wurden mit Vektor DNA, kodierend für die Rezeptoren # 866, # 878, # 881 oder # 883, transfiziert und für 48h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zellen der Linie 293T mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus IgG₁ Antikörper (schwarze Linie), der an die extrazelluläre IgG Domäne des rekombinanten Rezeptors bindet, oder mit einem FITC-markierten anti-human IgG₁ Antikörper als Kontrolle (graue Linie) inkubiert und mittels Durchflußzytometrie ausgewertet.

3.2.8 Expression der rekombinanten murinen anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptoren in murinen CD3⁺ T-Lymphozyten.

Murine CD3⁺ T-Lymphozyten wurden aus der Milz einer C57-Black/6 Maus isoliert und mit Hilfe von PHA-L (1,0 µg/ml), anti-Maus CD28 (0,1 ng/ml), anti-Maus CD3 (0,2 ng/ml), IL-2 (200 U/ml) und IL-15 (5,0 µg/ml) aktiviert. Anschließend wurden die T-Lymphozyten jeweils mit den Vektoren für den Rezeptor BW431/26scFv-mIgG-mCD3ζ (#881), BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ (#883), HRS3scFv-mIgG-mCD3ζ (#866), HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ (#878) oder BW431/26-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#895) retroviral transduziert. Dazu wurden die Retroviren in Zellen der Linie 293T durch Transfektion mit der Vektor DNA und mit den beiden retroviralen Helferplasmiden pColt (#393) und pVPack-Eco (#598) produziert. Die murinen CD3⁺ T-Lymphozyten wurden anschließend mittels der generierten ecotropen Retroviren infiziert. Nach 24h der Ko-Kultivierung der T-Zellen mit den Virus-produzierenden 293T Zellen im IL-2- und IL-15-haltigen Kulturmedium erfolgte der Nachweis der Immunrezeptoren mittels Durchflußzytometrie mit Hilfe des FITC-gekoppelten anti-Maus CD3 Antikörpers und des PE-konjugierter anti-Maus IgG₁ Antikörpers. Murine CD3⁺ T-Lymphozyten, die mit dem Vektor für den Rezeptor anti-CEA-mIgG-mCD4-CD3ζ (#895) retroviral transduziert wurden, dienten zum Vergleich. Nicht-transduzierte murine CD3⁺ T-Lymphozyten dienten als Kontrolle (Abb. 14).

Die Frequenz und Expressionsstärke des Immunrezeptors mit der murinen CD4 Transmembrandomäne (#895) ist in Vergleich zu Immunrezeptoren mit der murinen CD3 Transmembrandomäne (#866, #878, #881 und #883) signifikant höher. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden rekombinante Immunrezeptoren der zweiten Generation kloniert, die eine murine CD4 Transmembrandomäne enthalten.

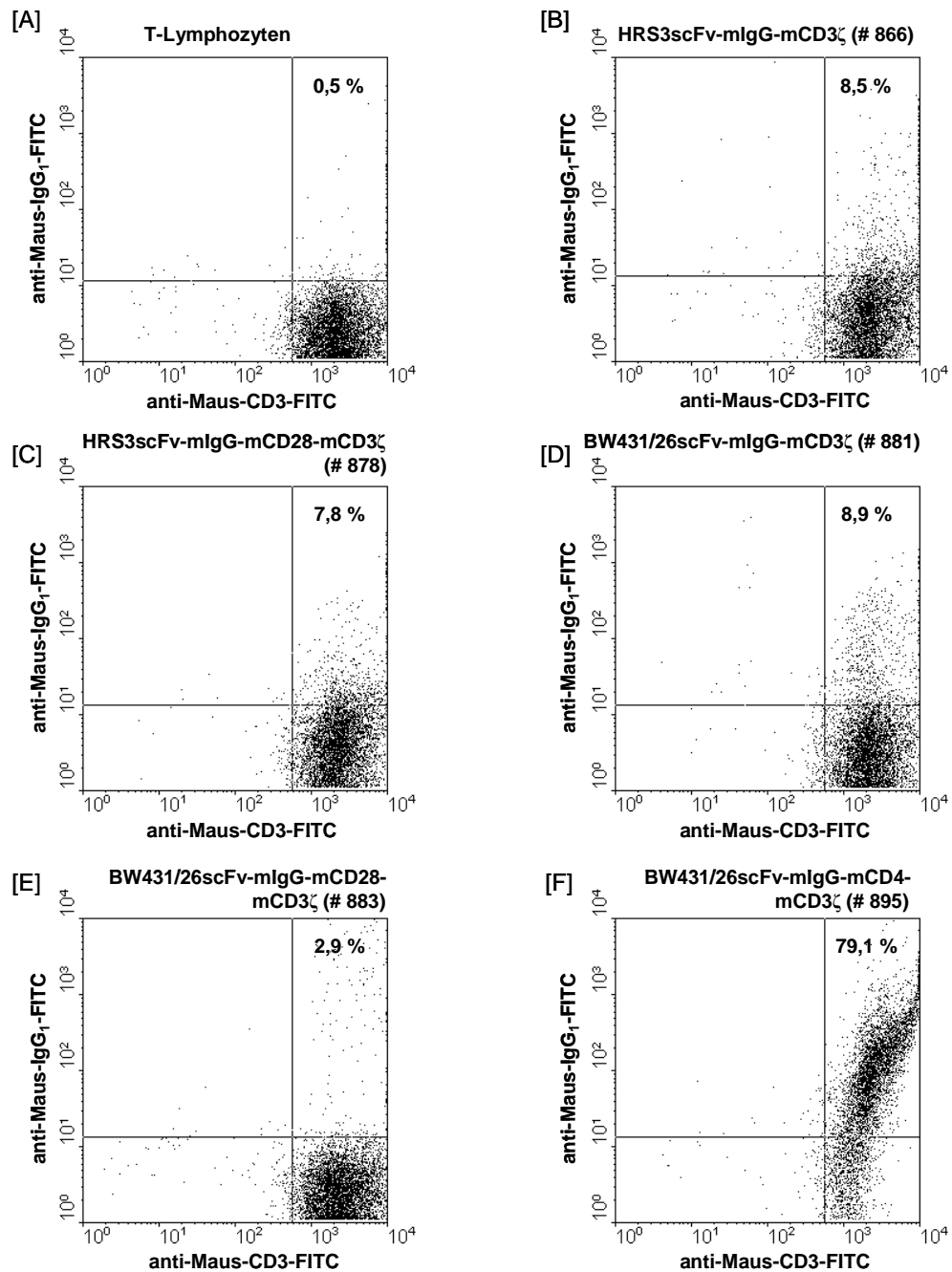


Abbildung 14: Expression der anti-CEA (#881 und #883) und der anti-CD30 Immunrezeptoren (#866 und #878) auf der Oberfläche transduzierter muriner CD3⁺ T-Lymphozyten. Die murinen CD3⁺ T-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren, kodierend für die Immunrezeptoren #866, #878, #881 und #883, retroviral transduziert. T-Zellen, transduziert mit dem Vektor, kodierend für den Immunrezeptor #895, dienten als Vergleich und nicht-transduzierte murine CD3⁺ T-Zellen wurden als Kontrolle benutzt. Nach 24h der Inkubation wurde die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen mit Hilfe des PE-konjugierten anti-Maus-IgG₁ Antikörpers, der an die extrazelluläre murine mIgG Domäne bindet, und des FITC-gekoppelten anti-Maus-CD3 Antikörpers, der an die CD3 Domäne des T-Zell-Rezeptors bindet, mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen. Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse wurde der prozentuale Anteil der T-Zellen, die den Rezeptor auf der Oberfläche exprimiert haben, von der Gesamtzahl der T-Zellen bestimmt.

3.3 Generierung muriner T-Zell Rezeptoren zweiter Generation mit Spezifität für CEA oder CD30.

In diesem Kapitel beschäftigen wir uns mit der Optimierung der rekombinanten Immunrezeptoren. Die zuvor konstruierten Immunrezeptoren mit der murinen CD3 ζ Transmembrandomäne wurden nur unzureichend auf der T-Zell Oberfläche exprimiert. Für den *in vitro* als auch den *in vivo* Einsatz rekombinanter Immunrezeptoren benötigen wir eine höhere Expressionsdichte des Rezeptors auf der Oberfläche transduzierter T-Lymphozyten. Um dieses zu erreichen, haben wir die murinen Rezeptoren mit der CD4 Transmembrandomäne ausgestattet.

3.3.1 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #892 mit muriner CD4 Transmembran- und CD3 ζ Signaldomäne.

Die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette wurde mittels der PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide mCD4TM-mCD3zeta-S (Oligo # 255) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Auf diese Weise wurde am 5'-Ende der amplifizierten DNA eine Restriktionsschnittstelle für *BstXI* erzeugt. Hinter die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* wurde die DNA für die Transmembrandomäne des murinen CD4 inseriert. Am 3'-Ende der amplifizierten DNA wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI* generiert. Das PCR Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt, gereinigt und anschließend durch Restriktion mit den Enzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten. Ebenso wurde die DNA des Plasmids pBullet-HRS3scFv-mCH2/3-mCD28-mCD3 ζ -mOX40 (#869) durch Restriktion mit den Enzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten, wobei die DNA für die murine CD28-CD3-OX40 Domäne aus dem Plasmid #869 deletiert wurde. Die komplementären kohäsiven Enden des CD4-CD3 ζ PCR-Produktes und des linearisierten Plasmids #869 wurden zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) ligiert, der statt der CD3 ζ Transmembrandomäne die CD4 Domäne besitzt (Abb. 15).

Zur Überprüfung der Klonierung wurden sowohl der Ausgangsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ -mOX40 (#869) als auch der neu generierte Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten, wobei zwei DNA Fragmente

erwarteter Größe generiert wurden. Zudem wurde die DNA für die Transmembrandomäne und die Signalkette im Plasmid #892 mit Hilfe der Oligonukleotide pBullet-3' (Oligo # 136) und mIgG1-S (Oligo # 251) sequenziert (Sequenz im Anhang).

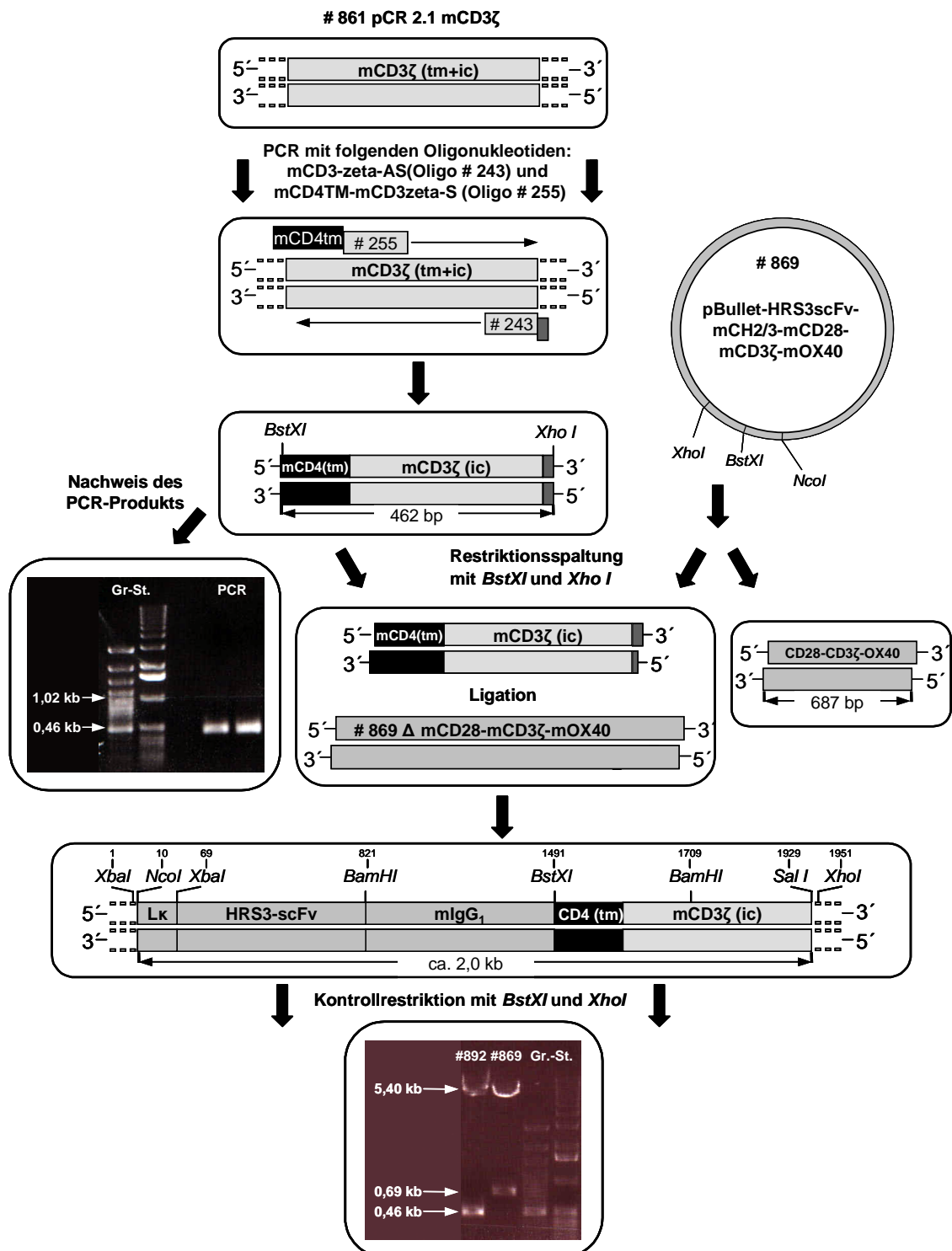


Abbildung 15: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #892 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ Signalkette. Mit Hilfe der PCR und der Oligonukleotide mCD4TM-mCD3zeta-S (Oligo # 255) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) wurde die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Hierdurch wurde am 5'-Ende der amplifizierten DNA

eine Restriktionsschnittstelle für *BstXI* generiert und dahinter die murine CD4 Transmembrandomäne inseriert. Am 3'-Ende der amplifizierten DNA wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI* erzeugt. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Reinigung wurde das PCR Produkt und die DNA des Plasmids pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ -mOX40 (#869) durch Restriktion mit *BstXI* und *XhoI* geschnitten, wobei die CD28-CD3-OX40 DNA aus dem Plasmid #869 deletiert wurde. Mit Hilfe der T4-Ligase wurde die DNA für die murine CD4-CD3 ζ Domäne mit dem linearisierten Plasmid #869 zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) ligiert, dessen Gesamtgröße etwa 7,3 kb beträgt. Die erfolgreiche Insertion der DNA für die murine CD4-CD3 ζ Domäne wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BstXI* und *XhoI* nachgewiesen, wobei erwartungsgemäß für das Plasmid #869 ein ca. 5,4 kb und ein ca. 0,7 kb langes Fragment und für das Plasmid #892 DNA Fragmente von ca. 5,4 kb und ca. 0,5 kb Länge generiert wurden.

3.3.2 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #895 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ Signalkette.

Die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette wurde mittels der PCR aus dem Plasmid #861 mit Hilfe der Oligonukleotide mCD4TM-mCD3zeta-S (Oligo # 255) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) amplifiziert. Am 5'-Ende der amplifizierten DNA wurde eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* erzeugt. Hinter die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BstXI* wurde die DNA für die Transmembrandomäne des murinen CD4 inseriert. Am 3'-Ende der amplifizierten DNA wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI* erzeugt. Das PCR-Produkt und die DNA des Plasmids pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ -mOX40 (#884) wurden in einer Restriktionsreaktion mit *BstXI* und *Sall* geschnitten (Abb. 16). Dabei wurde das DNA Fragment für die murine CD28-CD3-OX40 Domäne aus dem Plasmid #884 deletiert. Das DNA Fragment für die murine CD4-CD3 ζ Domäne und das linearisierte Plasmid #884 wurden mit Hilfe der T4-Ligase ligiert (Abb. 16). Auf diese Weise wurde die CD3 Transmembrandomäne des Rezeptors #884 gegen die CD4 Transmembrandomäne ausgetauscht, was zur Generierung des retroviralen Expressionsvektors pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) führte.

Zur Überprüfung der Klonierung wurden die Expressionsvektoren #884 und #895 durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* geschnitten., wobei für die Plasmide #884 und #895 jeweils zwei Fragmente erwarteter Größe generiert wurden, da sie je eine

Schnittstelle für *XhoI* innerhalb der Bindedomäne BW431/26scFv und eine weitere unmittelbar hinter dem Stop-Codon des Rezeptors enthalten. Zudem wurde die DNA für die Transmembrandomäne und die Signalkette im neu generierten Plasmid #895 mit Hilfe der beiden Oligonukleotide pBullet-3' (Oligo # 136) und mIgG1-S (Oligo # 251) sequenziert (Rezeptorsequenz im Anhang).

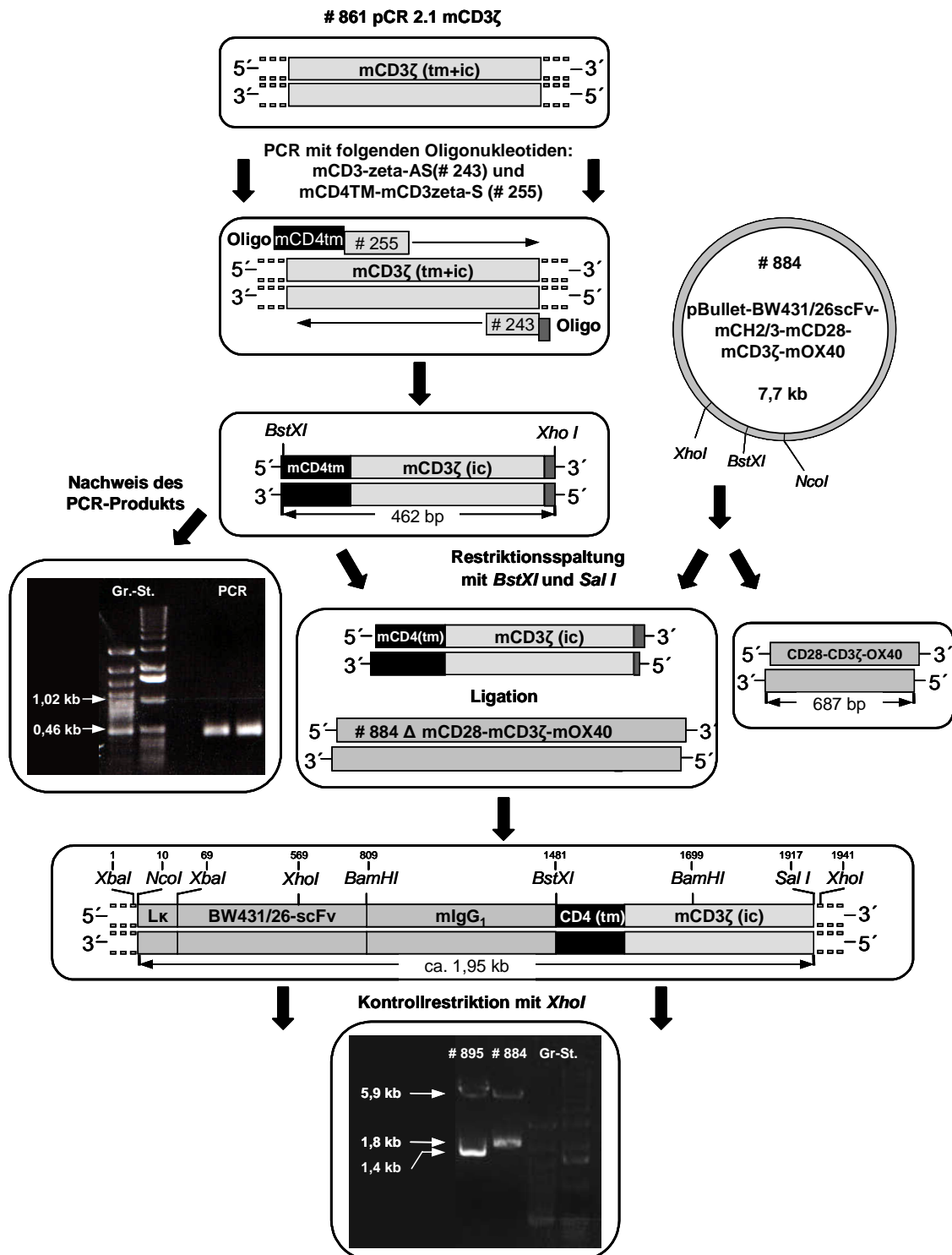


Abbildung 16: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #895 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ Signalkette. Mit Hilfe der PCR und mittels der Oligonukleotide

mCD4TM-mCD3zeta-S (Oligo # 255) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) wurde die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde eine Restriktionsschnittstelle für *Bst*XI erzeugt und dahinter die DNA für die CD4 Transmembrandomäne inseriert. Am 3'-Ende der amplifizierten DNA wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *Xho*I erzeugt. Das PCR Produkt ist ca. 0,5 kb lang und wurde elektrophoretisch getrennt und gereinigt und anschließend durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Bst*XI und *Xho*I geschnitten. Die DNA des Plasmids pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ -mOX40 (#884) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Enzymen *Bst*XI und *Xho*I geschnitten, wobei die DNA für die CD28-CD3-OX40 Signalkette deletiert wurde. Anschließend wurde die DNA für die murine CD4-CD3 ζ Domäne mit dem linearisierten Plasmid #884 mit Hilfe der T4-Ligase zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde die Plasmid DNA der Expressionsvektoren #884 und #895 durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *Xho*I geschnitten, wobei die Reaktion für das Plasmid #884 ein ca. 5,9 kb und ein ca. 1,8 kb langes DNA Fragment und für das Plasmid #895 ein ca. 5,9 kb und ein ca. 1,4 kb langes DNA Fragment lieferte.

3.3.3 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #897 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ -OX40 Signalkette.

Die DNA für die murine OX40 Signalkette wurde mit Hilfe der PCR und mittels der Oligonukleotide mCD3zeta/mOx40 (Oligo # 332) und mOx40-AS (Oligo # 246) aus dem Plasmid #832 amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR-Produkts wurde die 21 Basenpaar lange Teilsequenz der intrazellulären CD3 ζ Signaldomäne inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *Xho*I inseriert (Abb. 17). Parallel wurde die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette mittels der PCR und der Oligonukleotide mCD4tm-mCD3zeta-S (Oligo # 255) und mOx40/mCD3zeta (Oligo # 333) aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Am 5'-Ende der amplifizierten DNA wurde eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI generiert und dahinter die DNA für die Transmembrandomäne des murinen CD4 inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde eine 27 Basenpaar lange Teilsequenz der murinen OX40 Signaldomäne eingefügt. Das PCR Produkt mCD4-mCD3 ζ enthält die DNA für die murine CD4 Transmembrandomäne und die CD3 ζ Signalkette (Abb. 17).

Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die PCR Produkte mCD4-mCD3 ζ und mOX40 miteinander fusioniert (Abb. 18). Aufgrund der komplementären Sequenzen am 3'-Ende des mCD4-mCD3 ζ und am 5'-Ende des mOX40 PCR-Produkts hybridisierten die denaturierten DNA-Einzelstränge miteinander und dienten gleichzeitig als

Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurde mit Hilfe der PCR und mittels der Oligonukleotide mCD4TM-mCD3zeta (Oligo # 255) und mOx40-AS (Oligo # 246) das PCR-Produkt mCD4-mCD3 ζ -mOX40 in der geforderten Gesamtlänge vervielfältigt. Das Assembly-PCR-Produkt mCD4-mCD3 ζ -mOX40 enthält am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* und am 3'-Ende je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SalI* und *XhoI* (Abb. 18).

Anschließend wurde das PCR-Produkt mCD4-mCD3 ζ -mOX40 und die DNA des Plasmids pBullet-HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) durch Restriktion mit den Enzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten, wobei das DNA Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) deletiert. Mit Hilfe der T4-Ligase wurde die DNA für die murine mCD4-mCD3- ζ -mOX40 Signalkette mit der linearisierten Plasmid DNA #664 zum neu generierten retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897), der die murine CD4 Transmembrandomäne enthält, ligiert (Abb. 19).

Das Vorhandensein der DNA für die murine CD4-CD3 ζ -OX40 Signalkette in dem neuen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *BstXI* und *XhoI* nachgewiesen, wobei diese Reaktion jeweils zwei Fragmente der erwarteten Größe lieferte (Abb. 19). Ferner wurde die Sequenz für die CD4-CD3 ζ -OX40 Signalkette in dem neu generierten Expressionsvektor #897 mit Hilfe der Oligonukleotide mIgG1-S (Oligo # 251) und pBullet-3' (Oligo # 136) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

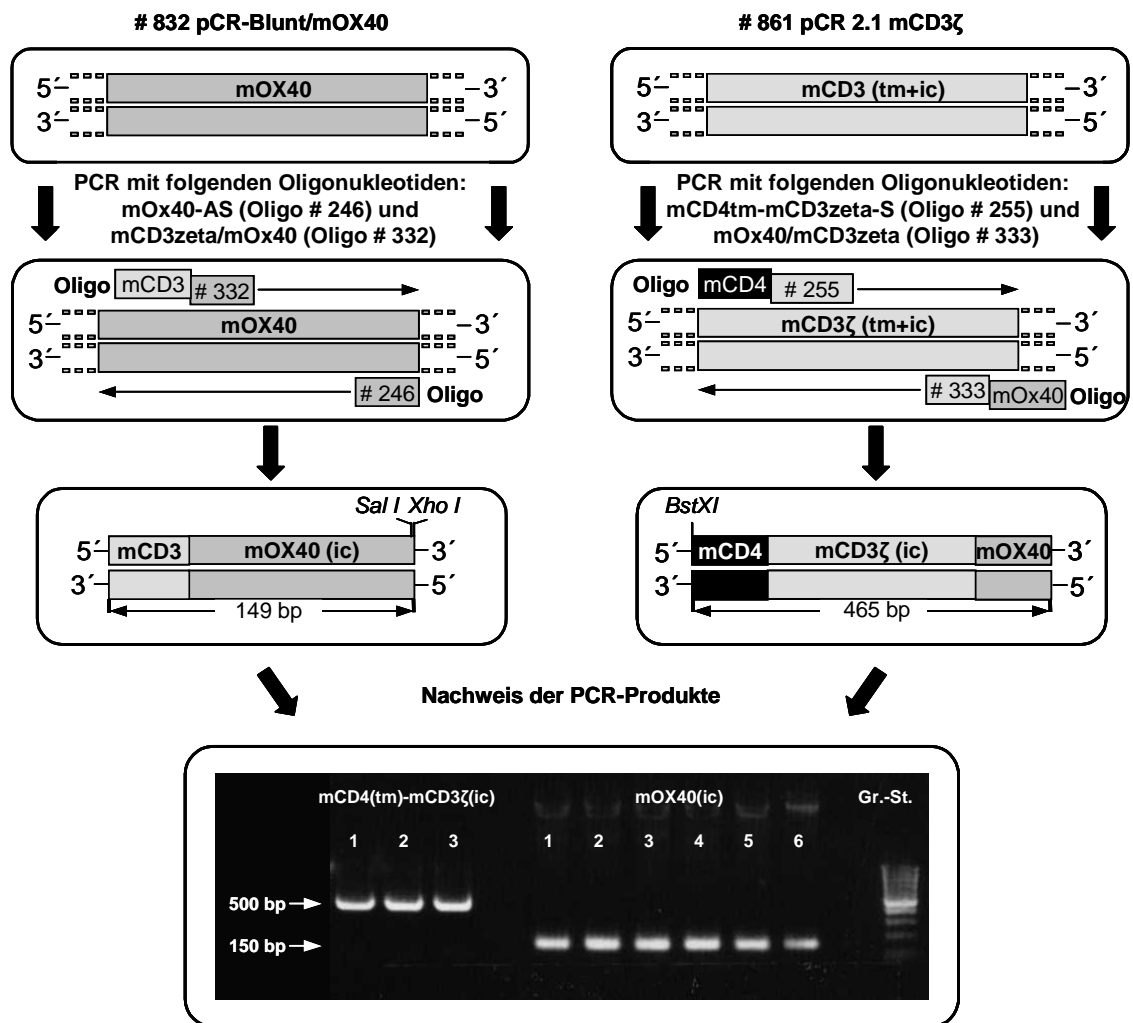


Abbildung 17: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #897 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und muriner CD3ζ-OX40 Signalkette. Die CD3ζ DNA wurde mittels der PCR aus dem Plasmid #861 mit Hilfe der Oligonukleotide mCD4TM-mCD3-zeta-S (Oligo # 255) und mOX40/mCD3zeta (Oligo # 333) amplifiziert. Das PCR Produkt enthält die DNA für die murine CD4 Transmembrandomäne und die CD3ζ Signalkette und ist ca. 0,5 kb lang. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* generiert. Hinter die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BstXI* wurde die DNA für die Transmembrandomäne des murinen CD4 inseriert. Am 3'-Ende des PCR-Produkts wurde zusätzlich eine 27 Basenpaar lange Teilsequenz der murinen OX40 Signaldomäne inseriert. Die DNA für die murine OX40 Signaldomäne wurde mittels der PCR aus dem Plasmid # 832 und mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta/mOX40 (Oligo # 332) und mOX40-AS (Oligo # 246) amplifiziert und dabei zusätzlich am 5'-Ende eine 21 Basenpaar lange Teilsequenz der intrazellulären CD3ζ Signaldomäne inseriert. Am 3'-Ende des PCR-Produkts wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI* erzeugt. Das fertige PCR-Produkt mOX40(ic) ist ca. 0,15 kb lang.

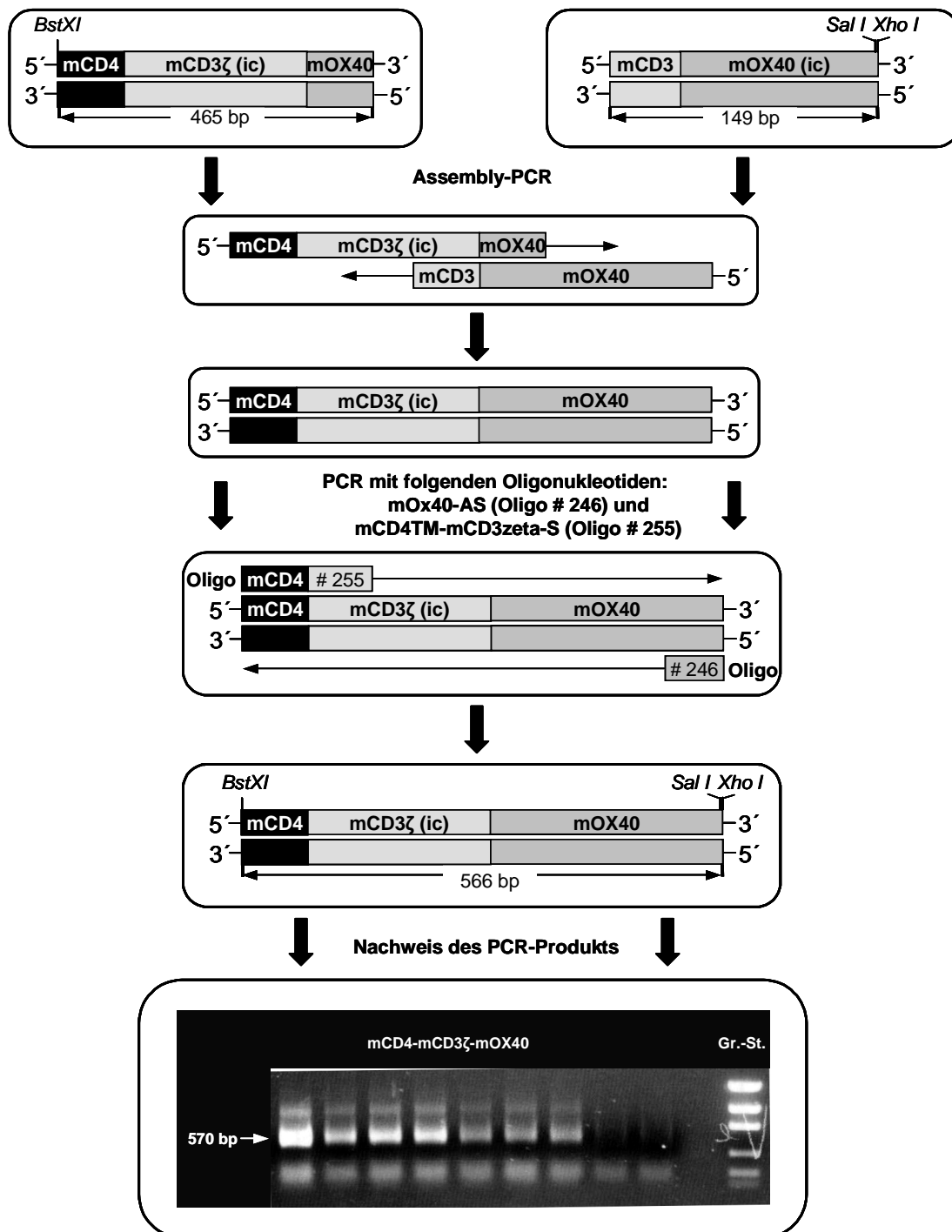


Abbildung 18: Erzeugung der DNA Sequenz für die murine CD4-CD3 ζ -OX40 Signalkette mittels Assembly-PCR. Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die PCR Produkte mCD4-mCD3 ζ und mOX40 miteinander fusioniert. Nach der Denaturierung hybridisierte die 3'-Endsequenz des mCD4-mCD3 ζ PCR Produkts mit der komplementären 5'-Anfangssequenz des mOX40 PCR Produkts. Dabei dienten die miteinander hybridisierten Sequenzbereiche als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide mCD4tm-mCD3zeta-S (Oligo # 255) und mOX40-AS (Oligo # 246) zugegeben, um das PCR Produkt CD4-CD3 ζ -OX40 in der gewünschten Gesamtlänge zu amplifizieren. Dabei wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI, am 3'-Ende jeweils eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sal*I und *Xho*I inseriert. Das fertige PCR-Produkt mCD28-mCD3- ζ ist ca. 0,6 kb lang.

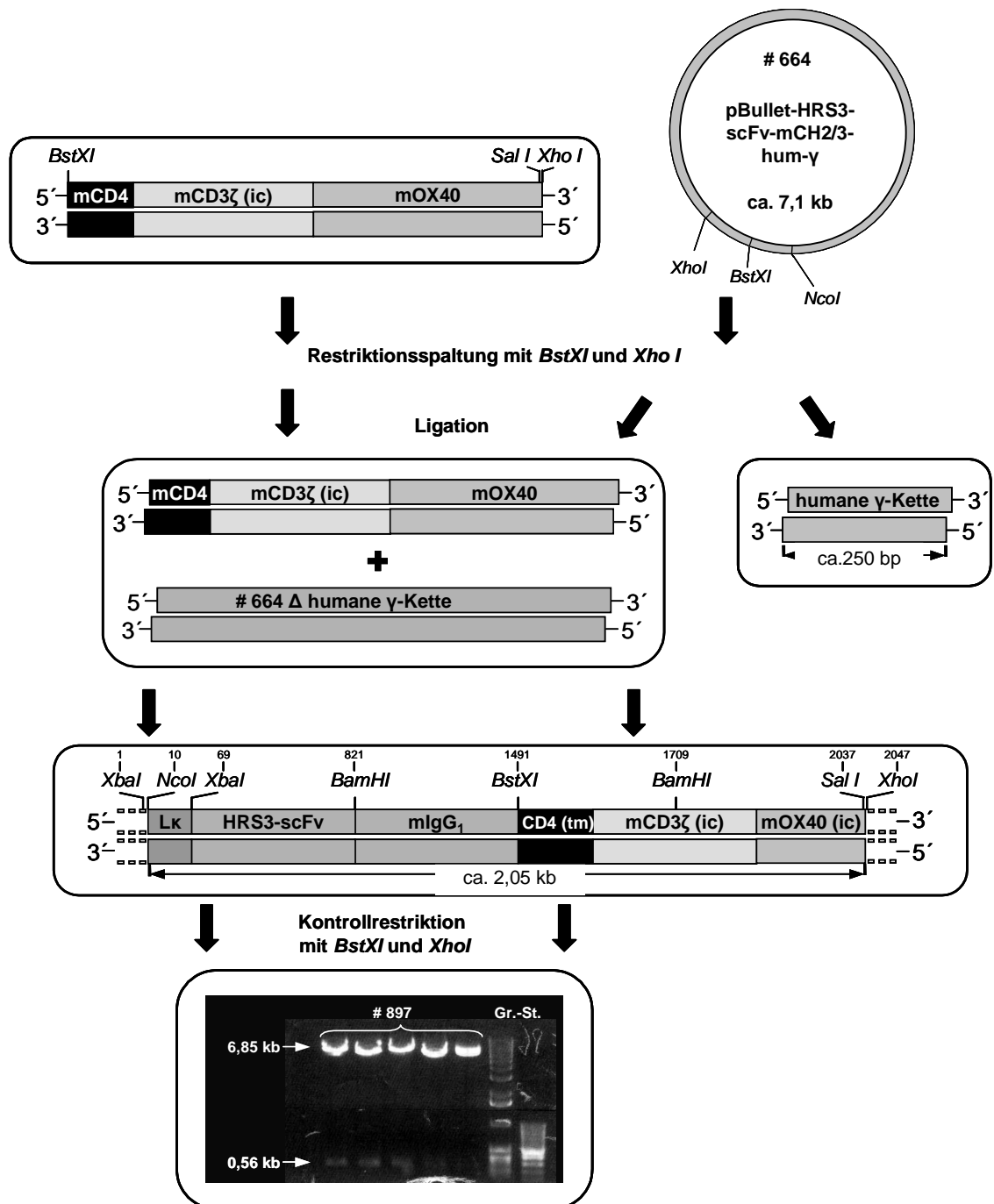


Abbildung 19: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #897 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und muriner CD3 ζ -OX40 Signalkette. Das PCR Produkt mCD4-mCD3 ζ -mOX40 und die Plasmid DNA pBullet-HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) wurden durch Restriktion mit den Enzymen *Bst*XI und *Xho*I geschnitten. Dabei wurde das DNA Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) deletiert. Die DNA für die murine CD4-CD3 ζ -OX40 Signalkette wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #664 zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) ligiert, dessen Gesamtgröße etwa 7,4 kb beträgt. Das Vorhandensein der DNA für die murine CD4-CD3 ζ -OX40 Domäne in dem neuen retroviralen Expressionsvektor #897 wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Bst*XI und *Xho*I nachgewiesen. Die Reaktion lieferte erwartungsgemäß ein ca. 6,9 kb und ein ca. 0,6 kb langes Fragment.

3.3.4 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #898 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD3 ζ -OX40 Signalkette.

Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten. Das eine Fragment, das die BW431/26scFv-mIgG DNA enthält, wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das andere Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #895 enthält, wurde deletiert.

Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) wurde durch Restriktion mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten, wobei das Fragment, das die Sequenz für die extrazelluläre HRS3scFv-mIgG Domäne enthält, deletiert und das andere Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #897 enthält, für die weitere Klonierungsarbeit verwendet wurde.

Das DNA Fragment BW431/26scFv-mIgG wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #897 zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898) ligiert (Abb. 20).

Das Vorhandensein der BW431/26scFv DNA in dem Plasmid #898 wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen. Im Unterschied zu dem Ausgangsvektor #897 verfügt der neue Expressionsvektor #898 im Sequenzbereich der BW431/26scFv Domäne über eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XhoI*, so dass die Restriktion jeweils zwei Fragmente der erwarteten Größe lieferte (Abb. 20).

Ferner wurde die DNA des Rezeptors BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 mit den flankierenden Regionen im neu generierten Plasmid #898 mit Hilfe der Oligonukleotide pBullet-5' (Oligo # 51), pBullet-3' (Oligo # 136) und mIgG1-S (Oligo # 251) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

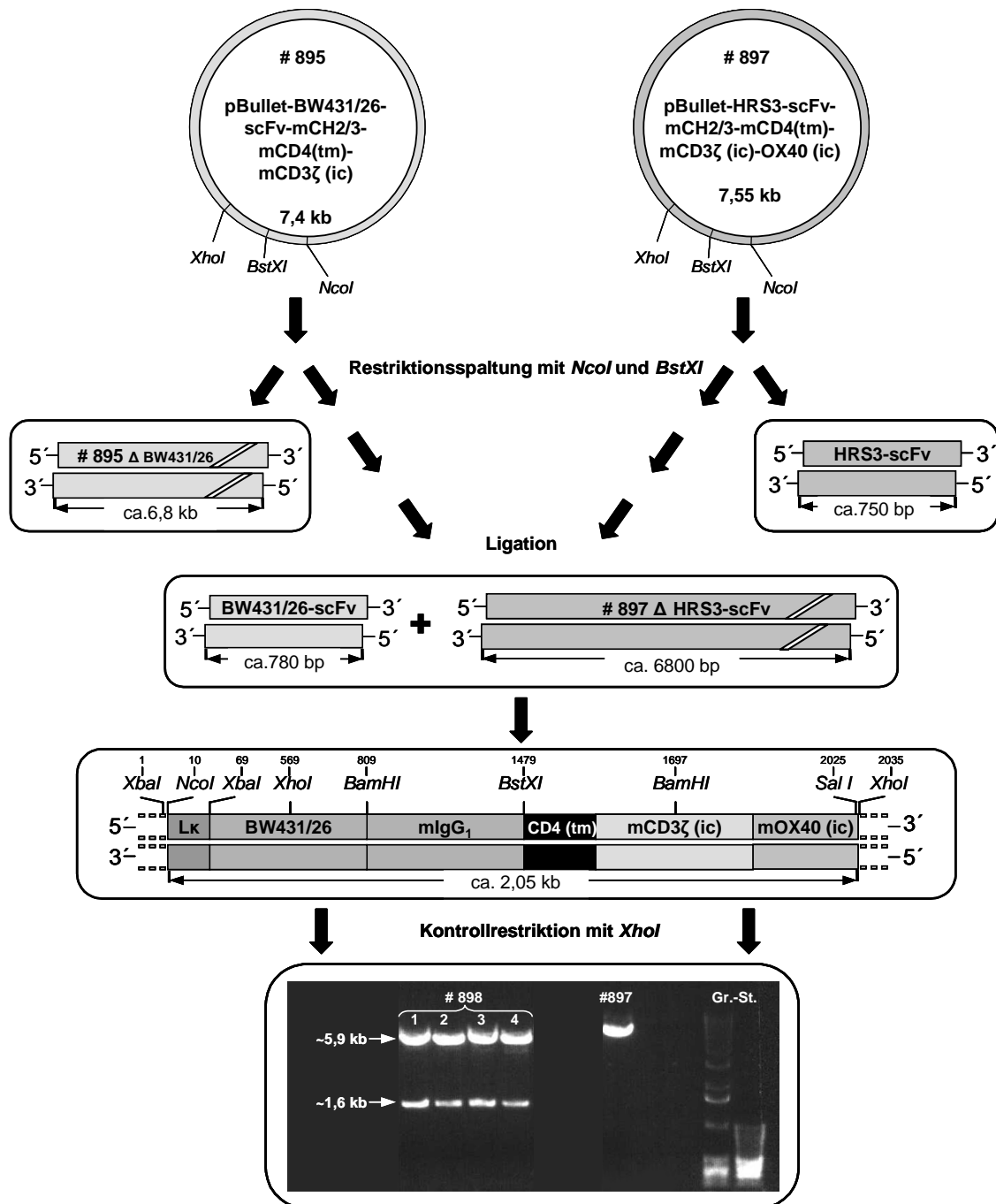


Abbildung 20: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #898 mit muriner CD4-CD3ζ-OX40 Signalkette. Die DNA des Plasmids pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD3ζ (#895) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten, wobei die BW431/26scFv-mIgG DNA für die weitere Klonierung verwendet und die linearisierte Plasmid DNA #895 deletiert wurde. Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#897) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, wobei die HRS3scFv-mIgG Sequenz deletiert und das linearisierte Plasmid #897 für die weitere Klonierung verwendet wurde. Die BW431/26scFv-mIgG DNA wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #897 zum neuen, ca. 7,4 kb großen, retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#898) ligiert. Das Vorhandensein der DNA für die BW431/26scFv Bindedomäne in dem retroviralen Expressionsvektor #898 wurde durch Restriktion mit dem Enzym *XhoI* nachgewiesen, wobei erwartungs-

gemäß ein 5,9 kb und ein 1,6 kb langes Fragment generiert wurde, wohingegen das Ausgangsplasmid #897 aufgrund einer einzigen Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert wurde.

3.3.5 Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #901 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette.

Die DNA für die murine CD28 Signalkette wurde mittels PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta/mCD28-AS (Oligo # 248) und mCD4tm-mCD28ic-S (Oligo # 263) aus dem Plasmid #857 amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* generiert. Hinter die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BstXI* wurde die DNA für die Transmembrandomäne des murinen CD4 inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde eine 21 Basenpaar lange Teilsequenz der murinen CD3 ζ Signaldomäne inseriert (Abb. 21).

Die DNA für die murine CD3 ζ Signalkette wurde mittels der PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta-AS (Oligo # 243) und mCD28/mCD3zeta-S (Oligo # 247) aus dem Plasmid #861 amplifiziert. Am 5'-Ende der vervielfältigten DNA wurde eine 21 Basenpaar lange Teilsequenz der murinen CD28 Signaldomäne inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI* generiert (Abb. 21).

Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die PCR Produkte mCD4-mCD28 und mCD3 ζ miteinander fusioniert (Abb. 22). Aufgrund der komplementären Sequenzen am 3'-Ende des mCD4-mCD28 und am 5'-Ende des mCD3 ζ PCR Produkts hybridisierten die denaturierten DNA-Einzelstränge miteinander und dienten gleichzeitig als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide mCD4TM-mCD3zeta (Oligo # 263) und mCD3zeta-AS (Oligo # 243) hinzugegeben, um das PCR Produkt mCD4(tm)-mCD28(ic)-mCD3- ζ (ic) in der gewünschten Gesamtlänge zu amplifizieren. Das fertige Assembly-PCR Produkt mCD4-mCD28-mCD3 ζ enthält am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BstXI* und am 3'-Ende je eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sall* und *XhoI*.

Im nächsten Schritt wurde das PCR Produkt mCD4-mCD28-mCD3 ζ und die DNA des Plasmids pBullet-HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BstXI* und *XhoI* fragmentiert, wobei das Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) deletiert wurde (Abb. 23). Mit Hilfe der T4-Ligase wurde die DNA für die murine mCD4-mCD28-mCD3 ζ

Signalkette mit der linearisierten Plasmid DNA #664 zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ligiert. Das Vorhandensein der DNA Sequenz für die murine CD4-CD28-CD3 ζ Signalkette in dem neu generierten retroviralen Expressionsvektor #901 wurde durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*XI und *Xho*I dadurch nachgewiesen, dass diese Reaktion jeweils zwei Fragmente der erwarteten Größe lieferte (Abb. 23). Ferner wurde die DNA für die murine CD4-CD28-CD3 ζ Signaldomäne in dem neu generierten Expressionsvektor #901 mit Hilfe der Oligonukleotide mIgG1-S (Oligo # 251) und pBullet-3' (Oligo # 136) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

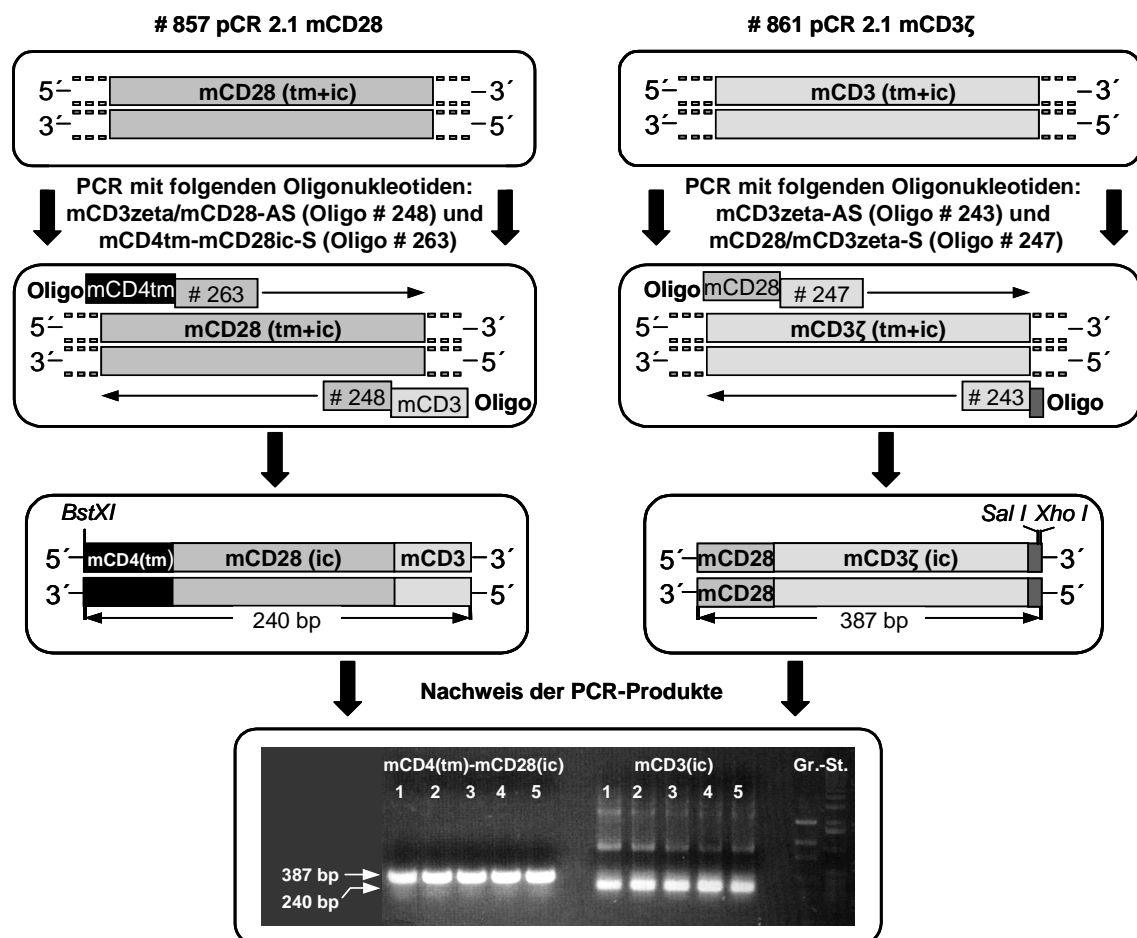


Abbildung 21: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #901 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette. Die DNA für die murine CD28 Signaldomäne wurde mittels der PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide mCD3zeta/mCD28-AS (Oligo # 248) und mCD4tm-mCD28ic-S (Oligo # 263) aus dem Plasmid #857 amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI generiert. Hinter die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI wurde die DNA für die Transmembrandomäne des murinen CD4 inseriert. Am 3'-Ende des PCR-Produkts wurde eine 21 Basenpaar lange Teilsequenz der murinen CD3 ζ Signaldomäne inseriert. Das PCR Produkt mCD4-mCD28 ist 240 Basenpaar lang. Die CD3 ζ DNA wurde mittels der PCR unter Verwendung der Oligonukleotide mCD3zeta-AS (Oligo # 243) und

mCD28/mCD3zeta-S (Oligo # 247) amplifiziert. Das PCR Produkt CD3 ζ enthält die DNA für die murine CD3 ζ Signaldomäne und ist ca. 0,4 kb lang. Am 5'-Ende des PCR-Produkts wurde eine 21 Basenpaar lange Teilsequenz der murinen CD28 Signaldomäne inseriert und am 3'-Ende des PCR-Produkts wurde je eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *SalI* und *XhoI* generiert.

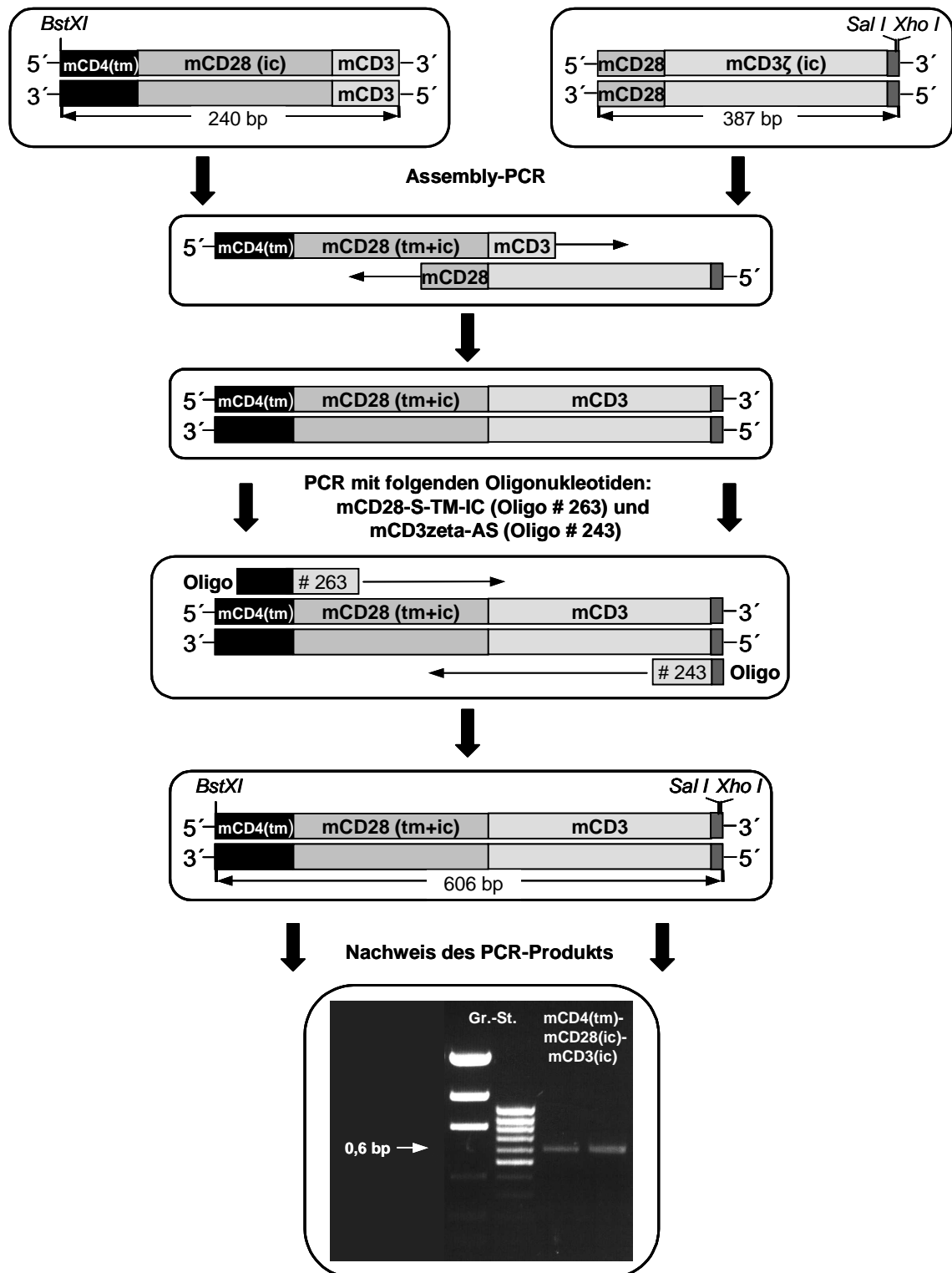


Abbildung 22: Erzeugung der DNA für die murine CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette mit Hilfe der Assembly-PCR. Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die PCR Produkte mCD4-mCD28 und mCD3 ζ miteinander verknüpft. Nach der Denaturierung hybridisierte die 3'-Sequenz des mCD4-mCD28 PCR Produkts mit der komplementären 5'-Sequenz des CD3 ζ PCR Produkts. Dabei

dienten die miteinander hybridisierten Sequenzbereiche als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide mCD3zeta-AS (Oligo # 243) und mCD4tm-mCD28ic-S (Oligo # 263) hinzugegeben, um das PCR-Produkt mCD4-mCD28-mCD3 ζ in der gewünschten Gesamtlänge zu amplifizieren. Dabei wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*XI, am 3'-Ende jeweils eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sal*I und *Xho*I inseriert. Das PCR-Produkt mCD4-mCD28-mCD3 ζ ist ca. 0,6 kb lang.

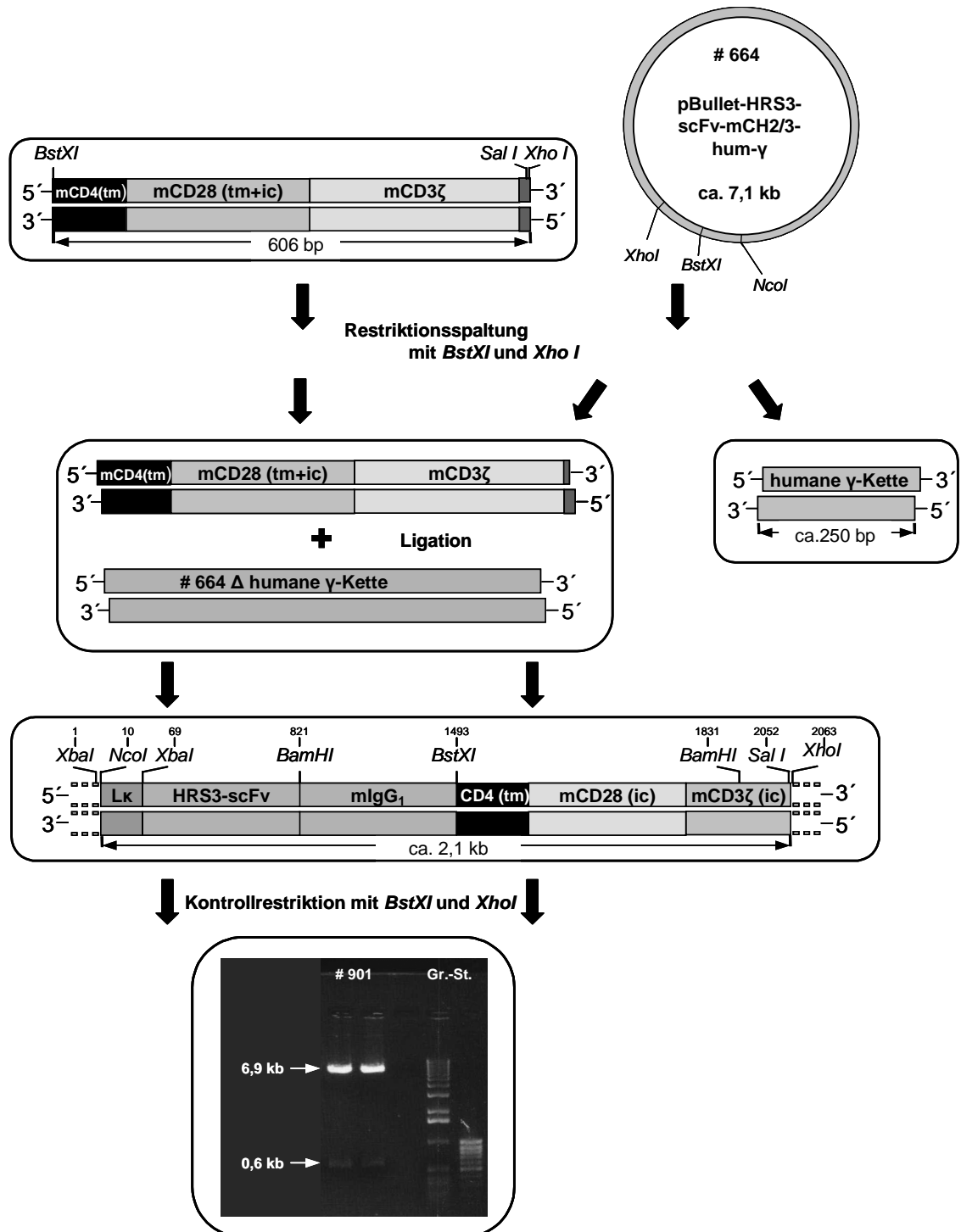


Abbildung 23: Klonierung des rekombinanten anti-CD30 Immunrezeptors #901 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette. Das PCR Produkt mCD4-mCD28-mCD3 ζ und die Plasmid DNA pBullet-HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) wurden durch Restriktion-

enzymen *BstXI* und *XhoI* geschnitten, wobei das DNA Fragment für die humane γ Signalkette aus dem Plasmid HRS3scFv-mCH2/3- γ (#664) deletiert wurde. Die DNA für die murine CD4-CD28-CD3 ζ Signalkette wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #664 mittels T4-Ligase zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ligiert. Das Vorhandensein der DNA für die murine CD4-CD28-CD3 ζ Domäne in dem neu generierten Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) wurde dadurch nachgewiesen, dass die Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *BstXI* und *XhoI* ein ca. 6,9 kb und ein ca. 0,6 kb langes Fragment lieferte.

3.3.6 Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #907 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette.

Der Expressionsvektor pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) wurde durch Restriktion mittels der beiden Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten, wobei das Fragment, das die HRS3scFv-mIgG DNA enthält, deletiert wurde. Das andere Fragment, das die linearisierte DNA #901 enthält, wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mCH2/3- γ (#663) wurde durch die Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, wobei die DNA für die BW431/26scFv-mIgG Domäne für die weitere Klonierungsarbeit verwendet und die linearisierte Plasmid DNA #663 deletiert wurde. Die komplementären kohäsiven Enden der BW431/26scFv-mIgG DNA und der linearisierten Plasmid DNA #901 wurden zum retroviralen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) ligiert (Abb. 24).

Das Vorhandensein der BW431/26scFv Domäne in dem Plasmid #907 wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen. Im Unterschied zu dem Ausgangsvektor #901 verfügt das neu generierte Plasmid #907 über eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XhoI*, so dass diese Reaktion jeweils zwei Fragmente der erwarteten Größe lieferte (Abb. 24). Ferner wurde die DNA des Rezeptors BW431/26scFv-mIgG-mCD3 ζ mit den flankierenden Regionen im neu generierten Plasmid #907 mit Hilfe der Oligonukleotide pBullet-5' (Oligo # 51), pBullet-3' (Oligo # 136) und mIgG1-S (Oligo # 251) bestimmt (Sequenzen im Anhang).

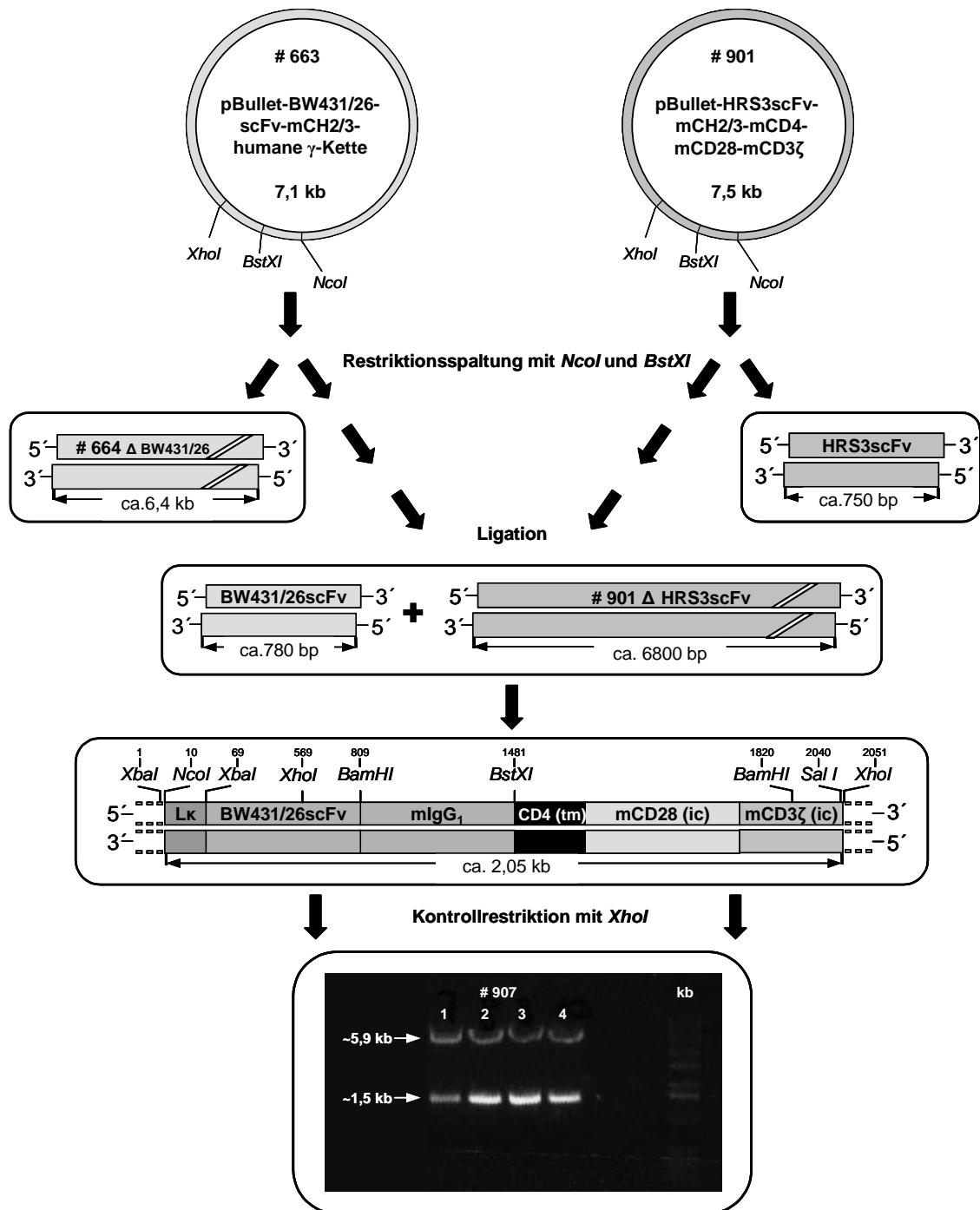


Abbildung 24: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors #907 mit muriner CD4 Transmembrandomäne und CD28-CD3 ζ Signalkette. Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mCH2/3- γ (#663) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Sequenzfragmente geschnitten, wobei die BW431/26scFv-mIgG Domäne für die weitere Klonierung verwendet und die linearisierte Plasmid DNA #663 deletiert wurde. Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, wobei die DNA für die HRS3scFv-mIgG Domäne deletiert und die linearisierte Plasmid DNA #901 für die Klonierung verwendet wurde. Die BW431/26scFv-mIgG DNA wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #901 zum neuen Expressionsvektor pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) ligiert. Das Vorhandensein der DNA für die BW431/26scFv Bindedomäne in dem neu generierten retroviralen

Expressionsvektor #907 wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen, wobei das Plasmid #907 erwartungsgemäß in zwei Fragmente, ca. 5,9 kb und ca. 1,5 kb, geschnitten wurde.

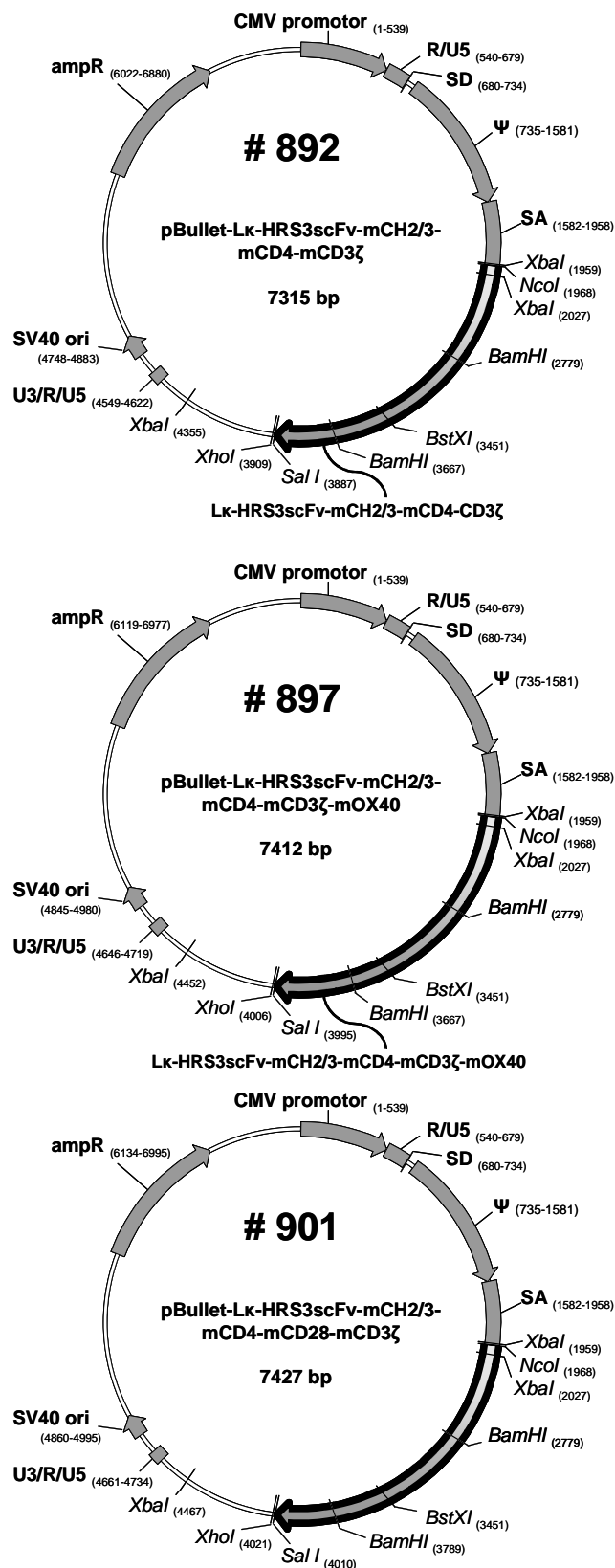


Abbildung 25: Plasmidkarten der neu generierten retroviralen anti-CD30 Expressionsvektoren (#892, #897, #901).

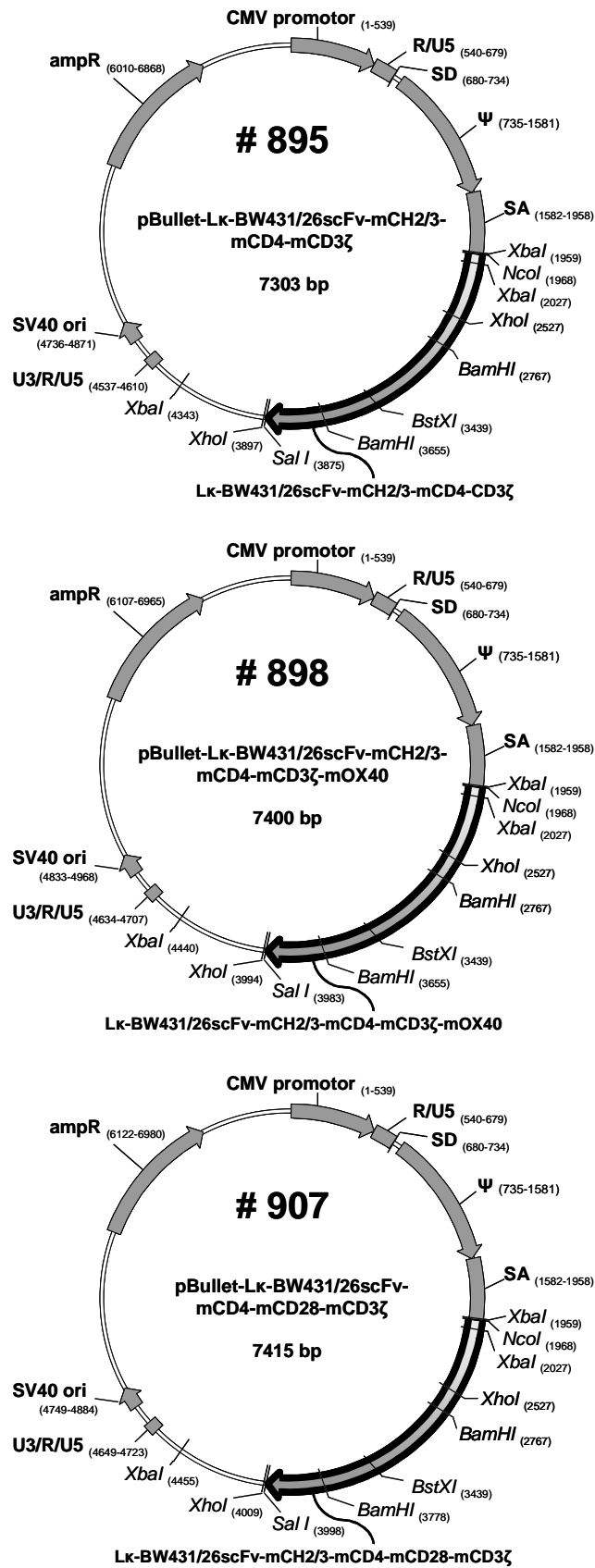


Abbildung 26: Plasmidkarten der neu generierten retroviralen anti-CEA Expressionsvektoren (#895, #898, #907).

3.3.7 Expression der rekombinanten anti-CEA (#895, #898, #907) und anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897, #901) auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T.

Es wurde überprüft, ob die rekombinanten T-Zell Rezeptoren mit der CD4 Transmembrandomäne auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T exprimiert werden. Hierfür wurden Zellen der Linie 293T mit der Plasmid DNA für die murinen Rezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) oder BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) transfiziert. Nach 48h wurde die Expression rekombinanter Rezeptoren auf der Oberfläche transfizierter Zellen der Linie 293T mittels Durchflußzytometrie mit einem PE-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörper, der an die murine IgG Domäne des extrazellulären Rezeptorteils bindet, nachgewiesen. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein PE-gekoppelter anti-human IgG₁ Antikörper verwendet.

Die Expression der rekombinanten anti-CD30 Rezeptoren sowie der anti-CEA Rezeptoren, jeweils mit der CD3 ζ (#892, #895), der CD3 ζ -OX40 (#897, #898) und der CD28-CD3 ζ Signalkette (#901, #907) wurde mit Hilfe des PE-konjugiertem anti-Maus IgG₁ Antikörpers nachgewiesen (Abb.27 [B] bis [G]). Sowohl die anti-CD30 (#892, #897, #901) als auch die anti-CEA Immunrezeptoren (#895, #898, #907) werden mit einer hoher Frequenz auf der Oberfläche von 293T Zellen exprimiert. Auf der Oberfläche nicht-transfizierter Zellen der Linie 293T wurden keine Rezeptoren detektiert (Abb.27 [A]).

Anschließend wurden die transfizierten Zellen der Linie 293T lysiert, um die rekombinanten Rezeptoren mit Hilfe der Western-Blot-Analyse darzustellen (Kapitel 3.4.5).

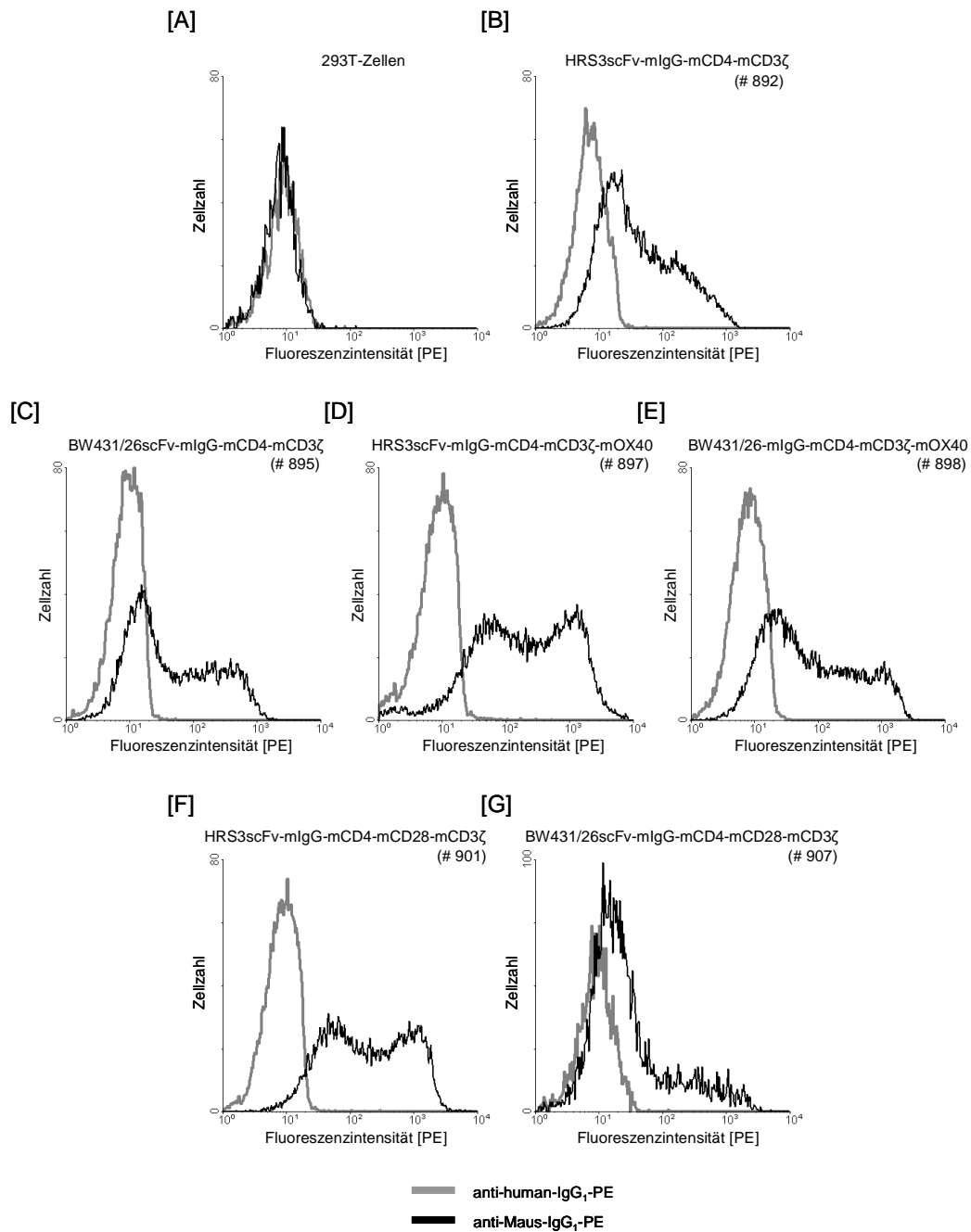


Abbildung 27: Expression der rekombinanten anti-CEA (#895, #898, #907) und der anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897, #901) auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T. Jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen der Linie 293T wurden mit dem Plasmid für die Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#892), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#895), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#897), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#898), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#901) oder BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#907) transfiziert. Nach 48h der Inkubation wurden die transfizierten und nicht-transfizierten Zellen der Linie 293T mit einem PE-konjugiertem anti-Maus IgG₁ Antikörper (schwarze Linie), der an die murine IgG Domäne bindet, oder mit einem PE-markierten anti-human IgG₁ Antikörper (graue Linie) als Kontrolle inkubiert. Die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen der Linie 293T wurde mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen.

3.3.8 Expression der rekombinanten anti-CEA (#895, #898 und #907) und anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897 und #901) auf der Oberfläche humaner T-Lymphozyten.

Periphere Blutlymphozyten wurden durch Stimulation mit dem agonistischen anti-CD3 Antikörper OKT-3 (1 µg/ml) und IL-2 (200 U/ml) aktiviert. In einem ersten Ansatz wurden T-Lymphozyten jeweils mit den rekombinanten Vektoren für die anti-CD30 Rezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#897) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#901) retroviral transduziert (Abb. 28 [E], [F] oder [G]).

In einem weiteren Ansatz wurden T-Lymphozyten jeweils mit den Vektoren für die anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#898) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#907), wie im Methodenteil beschrieben, retroviral transduziert (Abb. 28 [A], [B] oder [C]).

Nach 48h wurden humane T-Lymphozyten entnommen und für die Untersuchung der Rezeptorexpression mittels Durchflußzytometrie mit PE-konjugiertem anti-Maus IgG₁ Antikörper, der an die IgG Domäne des rekombinanten Rezeptors bindet, inkubiert. Nicht-transduzierte humane PBL dienten als Kontrolle. Die Expression der rekombinanten anti-CD30 (#892, #897, #901) und anti-CEA (#895, #898, #907) Immunrezeptoren wurde auf der Oberfläche von humanen T-Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen. Sowohl anti-CD30 als auch anti-CEA Immunrezeptoren werden mit hoher Frequenz auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert. Nicht-transduzierte T-Lymphozyten exprimieren keine rekombinanten Immunrezeptoren auf der Oberfläche.

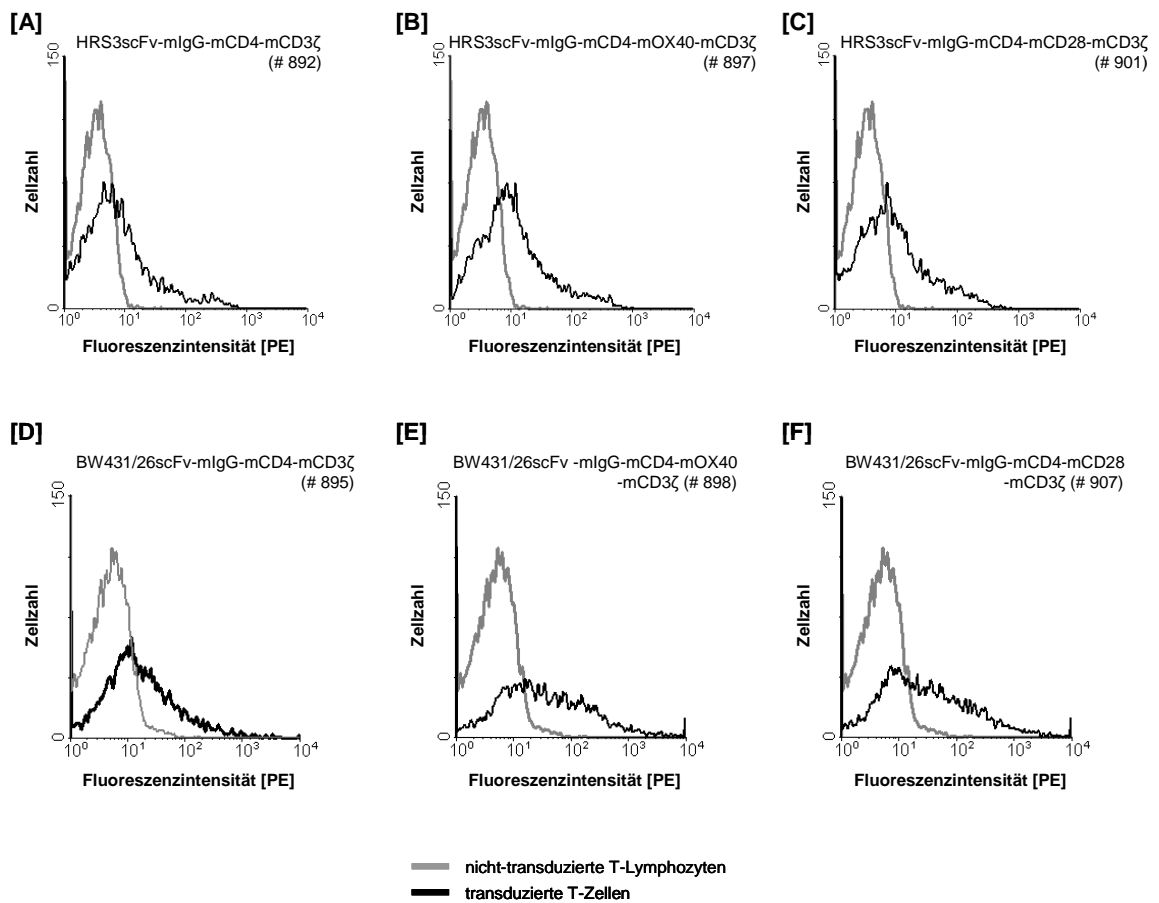


Abbildung 28: Expression der anti-CEA (#895, #898 und #907) und anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897 und #901) auf der Oberfläche humaner T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten wurden retroviral mit den Vektoren, kodierend für anti-CD30 Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) oder mit den Vektoren, kodierend für anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907), transduziert. Hierfür wurden Zellen der Linie 293T mit der Vektor DNA und den Helferplasmiden pHit60 (#392) und pColt (#393) ko-transfiziert und anschließend mit isolierten Blutlymphozyten inkubiert. Nach 48h der Ko-Inkubation mit Virus-produzierenden 293T Zellen wurden die T-Lymphozyten entnommen und für die anschließende Messung mittels Durchflußzytometrie vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden die transduzierten T-Zellen und zur Kontrolle die nicht-transduzierten T-Zellen mit dem PE-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörper, der spezifisch an die IgG₁ Domäne des rekombinanten Immunrezeptors bindet, inkubiert. Anschließend wurden die T-Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert.

3.3.9 Aktivierung humaner CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren nach Kreuzvernetzung mit immobilisierten anti-idiotypischen Antikörpern.

Es wurde die zelluläre Aktivierung von CD3⁺ T-Lymphozyten nach Kreuzvernetzung der membranständigen rekombinanten Immunrezeptoren geprüft. Dazu wurde der anti-Maus IgG₁ monoklonaler Antikörper, der gegen die IgG Domäne im extrazellulären Anteil des Rezeptors gerichtet ist, und alternativ der BW2064/36 monoklonaler Antikörper, der gegen die BW431/26scFv Bindedomäne des Rezeptors gerichtet ist, verwendet. Als Kontrollen dienten der anti-human IgG₁ Antikörper gleichen Isotyps und das mIgG Protein gleichen Isotyps. Die zelluläre Aktivierung der CD3⁺ T-Lymphozyten wurde anhand der Induktion der IFN- γ und IL-2 Sekretion bestimmt.

Die humanen T-Lymphozyten (CD3⁺) wurden mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung MACS[®] aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders isoliert und mit dem agonistischen anti-CD3 Antikörper OKT-3 (1 μ g/ml) und IL-2 (200 U/ml) aktiviert. Im nächsten Schritt wurden die CD3⁺ T-Lymphozyten mittels retroviralen Gentransfers mit den anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) oder den anti-CD30 Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ausgestattet. T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Rezeptoren (#895, #898 und #907), normiert auf die Anzahl Rezeptor tragender T-Zellen, wurden für 48h auf Kulturplatten inkubiert, die mit BW2064/36 Antikörper, murinem IgG, anti-Maus IgG₁ Antikörper oder anti-human IgG₁ Antikörper beschichtet wurden. Als Kontrolle wurden CD3⁺ T-Lymphozyten mit anti-CD30 Immunrezeptoren (#892, #897 und #901) und nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten verwendet. Die Konzentration des sezernierten IFN- γ und IL-2 im Kulturüberstand als Marker für die zelluläre Aktivierung wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb. 29):

- (1.) In den Kulturüberständen von CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 und #907 als auch mit CD30 spezifischen

Immunrezeptoren #892, #897 und #901 wurde nach Inkubation auf Kulturplatten mit immobilisiertem anti-Maus IgG₁ Antikörper eine erhöhte IFN- γ Konzentration detektiert. Dies ist auf die Kreuzvernetzung der Rezeptoren über die murine IgG₁ Domäne zurückzuführen. In den Zellkulturüberständen von nicht-transduzierten T-Lymphozyten wurde eine geringere IFN- γ Konzentration detektiert.

- (2.) In den Kulturüberständen von T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 und #907 wurde nach Inkubation auf Kulturplatten mit immobilisiertem BW2064/36 Antikörper eine erhöhte IFN- γ Konzentration im Vergleich zu Zellkulturüberständen von nicht-transduzierten T-Lymphozyten und T-Zellen mit den CD30 spezifischen Rezeptoren #892, #897 und #901 detektiert. Offensichtlich werden CEA spezifische T-Zellen spezifisch über die Bindedomäne aktiviert.
- (3.) Nach Inkubation von T-Zellen mit CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren auf Kulturplatten mit immobilisiertem murinen IgG Protein oder anti-human IgG₁ Antikörper, die als Kontrollen dienten, wurde eine niedrige IFN- γ Konzentration detektiert. Diese IFN- γ Konzentration ist gleich hoch wie bei naiven, nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten, was die Voraktivierung der T-Zellen mit dem agonistischen anti-CD3 Antikörper OKT3 anzeigt.

Ein Teil des Kulturüberstandes wurde für die Konzentrationsbestimmung des sezernierten IL-2 mittels ELISA verwendet (Abb. 30):

- (1.) In den Überständen von T-Lymphozyten mit CD28-CD3 ζ Immunrezeptoren #907 (anti-CEA) und #901 (anti-CD30) wurde nach Inkubation auf Kulturplatten mit immobilisierten anti-Maus IgG₁ Antikörper, der sich gegen die murine IgG₁ Domäne des Rezeptors richtet, eine erhöhte IL-2 Konzentration detektiert. In den Zellkulturüberständen von nicht-transduzierten T-Zellen, T-Zellen mit CD3 ζ -OX40 Immunrezeptoren #898 (anti-CEA) und #897 (anti-CD30) oder mit CD3 ζ Immunrezeptoren #895 (anti-CEA) und #892 (anti-CD30) wurde eine niedrige IL-2 Konzentration detektiert. Somit werden T-Zellen mit rekombinanten CEA als auch CD30 spezifischen Immunrezeptor mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne zur IL-2 Sekretion aktiviert.
- (2.) In den Überständen von T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor

#907 mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne wurde nach Antigen-spezifischer Stimulation mit immobilisiertem BW2064/36 Antikörper eine erhöhte IL-2 Konzentration detektiert. Dagegen wurde im Überstand von T-Zellen mit dem CD30 spezifischen Immunrezeptor #901 nach Inkubation mit dem BW2064/36 Antikörper eine geringere IL-2 Konzentration, trotz identischer CD28-CD3 ζ Signaldomäne, detektiert. Dies zeigt, dass ausschließlich CEA spezifische T-Zellen durch den agonistischen BW2064/36 Antikörper zur IL-2 Sekretion aktiviert werden. In den Überständen von T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren mit CD3 ζ Signalkette (#895) und mit CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#898) als auch von T-Zellen mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren #892 und #897, die als Kontrolle dienten, wurde eine geringe IL-2 Konzentration gemessen, die dem Messhintergrund des Systems zuzuordnen ist.

- (3.) Nach Inkubation von CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA (#895, #898 oder #907) oder mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892, #897 oder #901) auf Kulturplatten mit immobilisiertem murinen IgG Protein oder anti-human IgG₁ Antikörper, die als Kontrollen dienten, wurde im Kulturüberstand eine geringe IL-2 Konzentration detektiert, die gleich hoch ist wie bei naiven, nicht-transduzierten T-Lymphozyten. Dieses ist auf die Voraktivierung mit dem OKT3 Antikörper und IL-2 zurückzuführen.

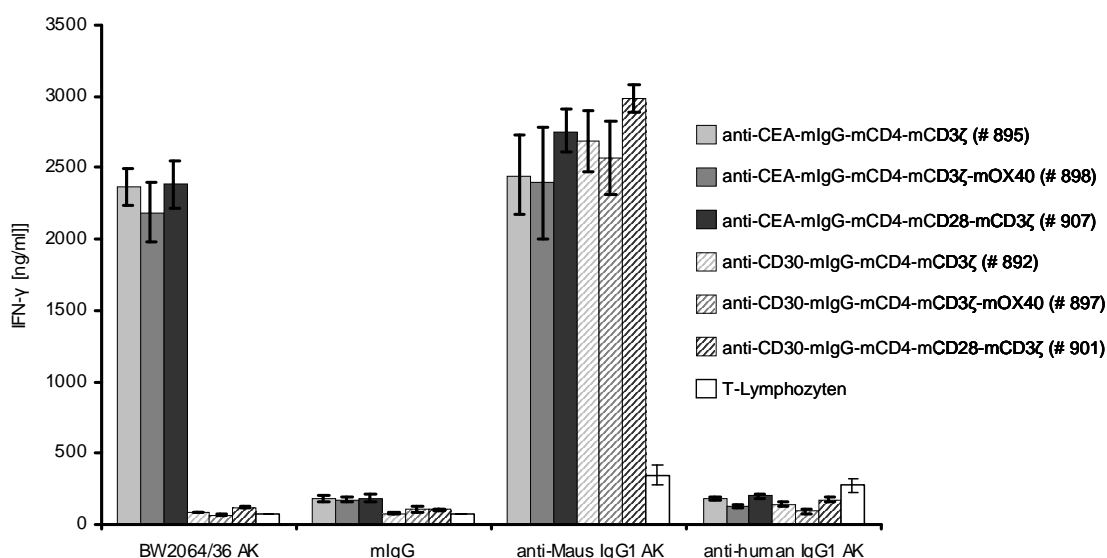


Abbildung 29: Humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit rekombinanten CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren werden zur IFN- γ Sekretion induziert. Zellkulturplatten wurden mit je 5 μ g/ml Beschichtungspuffer mit BW2064/36 Antikörper (anti-idiotypischer Antikörper gegen BW431/26scFv),

anti-Maus-IgG₁ Antikörper (Antikörper gegen die IgG Domäne im extrazellulären Anteil des Rezeptors) beschichtet. Als Kontrollen gleichen Isotyps wurden das mIgG Protein (5 µg/ml) und der anti-human-IgG₁ Antikörper (5 µg/ml) verwendet, die ebenfalls auf Mikrotiterplatten immobilisiert wurden. Anschließend wurden CEA spezifische (#895, #898 und #907), CD30 spezifische (#892, #897 und #901) oder naive T-Zellen auf den beschichteten Platten für 48h inkubiert. Die IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand wurde nach 48h mit Hilfe eines ELISA gemessen.

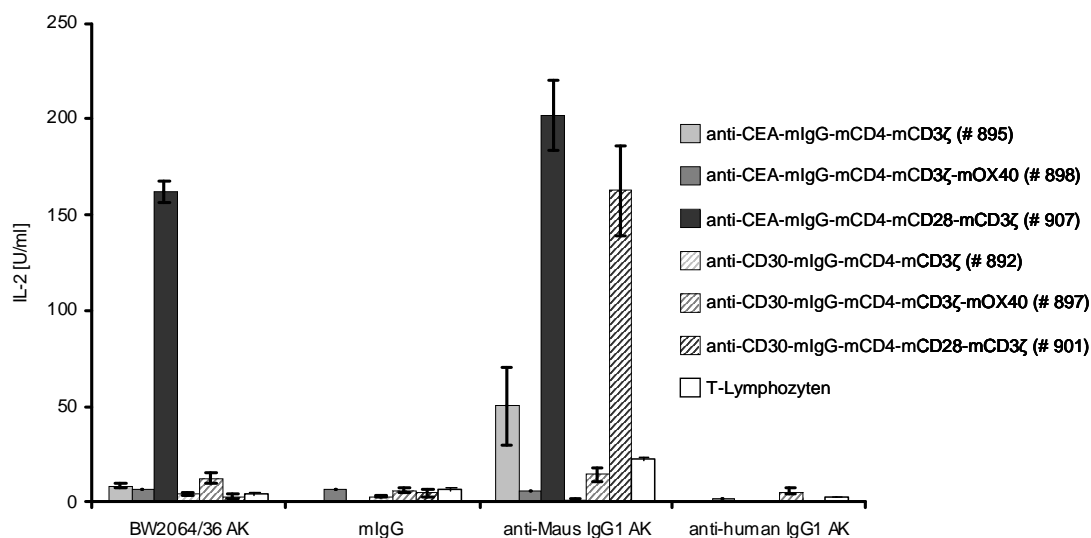


Abbildung 30: Humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit rekombinanten CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren werden zur IL-2 Sekretion stimuliert. Zellkulturplatten wurden mit BW2064/36 Antikörper, anti-Maus-IgG₁ Antikörper und als Kontrolle mit anti-human-IgG₁ Antikörper oder murinem IgG Protein (je 5 µg/ml Beschichtungspuffer) beschichtet. Anschließend wurden CEA spezifische (#895, #898 und #907), CD30 spezifische (#892, #897 und #901) oder naive T-Zellen auf den beschichteten Platten für 48h inkubiert. Die IL-2 Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.

3.3.10 Aktivierung humaner CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen.

Während in dem vorherigen Experiment gezeigt wurde, dass humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Rezeptoren, nach spezifischer Kreuzvernetzung, aktiviert werden, wollen wir in den weiteren Untersuchungen der Frage nachgehen, ob die Aktivierung auch erfolgt, wenn die humanen T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren mit CEA⁺ Tumorzellen ko-kultiviert werden.

3.3.10.1 T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Rezeptoren werden durch Ko-Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion aktiviert.

Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) wurden mit humanen T-Zellen ko-kultiviert, die mit CEA spezifischen Immunrezeptoren (#895, #898 und #907) ausgestattet wurden. Hierfür wurden CD3⁺ T-Lymphozyten mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) durch retroviralen Gentransfer ausgestattet und in einer Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatten mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) ko-kultiviert. Als Kontrollen dienten nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten und CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901). Nach 48h der Ko-Kultur wurde die IFN- γ Konzentration mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb.31 [A] und [B]):

- (1.) CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren #895 und #898 sezernieren nach Ko-Kultur mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺) IFN- γ , wobei die OX40 Ko-Stimulation durch den Rezeptor #898 die IFN- γ Konzentration nicht weiter erhöht. Die Ko-Kultivierung der CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #907 mit ko-stimulatorischer CD28 Signaldomäne mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺) führte zu einer höheren IFN- γ Sekretion im Vergleich zu T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ Signalkette (#895) oder mit der CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#898). Die Ko-Kultivierung der T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren (#895, #898 und #907) mit Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻) führt nicht zur Induktion der IFN- γ Sekretion. Dies zeigt, dass die Aktivierung Antigen spezifisch durch die anti-CEA Rezeptoren vermittelt wird.
- (2.) Die Ko-Kultivierung der CD3⁺ T-Lymphozyten mit Rezeptorspezifität für CD30 (#892, #897 oder #901) und nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) und Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻,

CD30⁻) führt zu keiner Induktion der IFN- γ Sekretion.

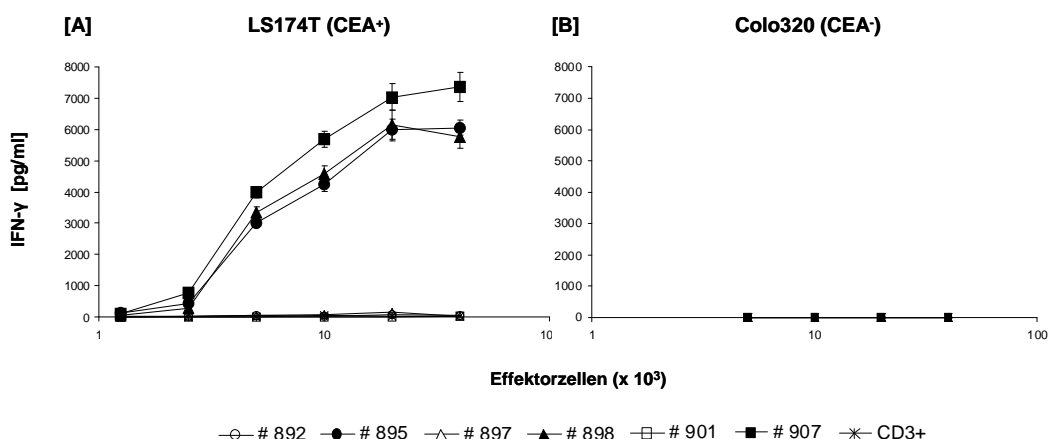


Abbildung 31: Induktion der IFN- γ Sekretion bei CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren bei Ko-Inkubation mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻, CD30⁻). CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CEA (#895, #898 und #907) oder den CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892, #897 und #901) wurden in einer Verdünnungsreihe ($1,25 \times 10^3$ bis 4×10^4 Rezeptor tragende T-Zellen/Vertiefung) ausplattiert und mit je $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen der Linie [A] LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder [B] Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l RPMI 1640 Medium für 48h ko-inkubiert. Die IFN- γ Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

3.3.10.2 Spezifische Zytolyse von CEA⁺ Tumorzellen durch humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren.

In diesem Teil untersuchen wir, ob humane CD3⁺ T-Lymphozyten, ausgestattet mit CEA spezifischen Immunrezeptoren, *in vitro* eine spezifische Zytolyse CEA⁺ Tumorzellen vermitteln. Hierfür wurden CD3⁺ T-Lymphozyten mit den anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) durch retroviralen Gentransfer ausgestattet und mit Tumorzellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden naive CD3⁺ T-Lymphozyten und T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) verwendet, die ebenfalls durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten Immunrezeptoren ausgestattet wurden.

In einem ersten Ansatz wurden die CD3⁺ T-Zellen, normiert auf die Anzahl Rezeptor tragender T-Zellen, in einer Verdünnungsreihe mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) ausplattiert und für 48h ko-inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden CD3⁺ T-Zellen, eingestellt auf die Anzahl der Rezeptor tragender T-Zellen in einer Verdünnungsreihe ausplattiert und mit Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-inkubiert.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb. 32 [A] und [B]):

CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 oder #907 vermitteln nach Bindung an CEA⁺ Tumorzellen der Linie LS174T dosisabhängig eine spezifische Zytolyse der CEA⁺ Tumorzellen. Die zytolytische Aktivität der CD3⁺ T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 oder #907 ist gegenüber Zellen der Linie LS174T gleich hoch. Dies zeigt, dass unter diesen experimentellen Bedingungen, unabhängig von der CD28 oder OX40 ko-stimulatorischen Domäne des Rezeptors, CEA spezifische T-Zellen nach Antigenbindung gleich effizient die Zytolyse vermitteln.

CD3⁺ T-Zellen ohne rekombinanten Immunrezeptor und CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren #892, #897 und #901 entwickeln gegenüber Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) keine Immunrezeptor-vermittelte zytolytische Aktivität. Offensichtlich wurde die Aktivierung des zytolytischen Effekts auf CEA⁺ Tumorzellen der Linie LS174T Antigen spezifisch vermittelt.

Die Antigen Spezifität der Rezeptor-vermittelten Zytolyse wurde dadurch demonstriert, dass CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 und #907 bei Ko-Kultivierung mit Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻) keine spezifische Zytolyse der CEA-negativen Tumorzellen vermitteln. Weiterhin wurde gezeigt, dass CD3⁺ T-Lymphozyten mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892, #897 und #901) und nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten keine Rezeptor-vermittelte Zytolyse gegenüber Tumorzellen der Linie Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) induzieren.

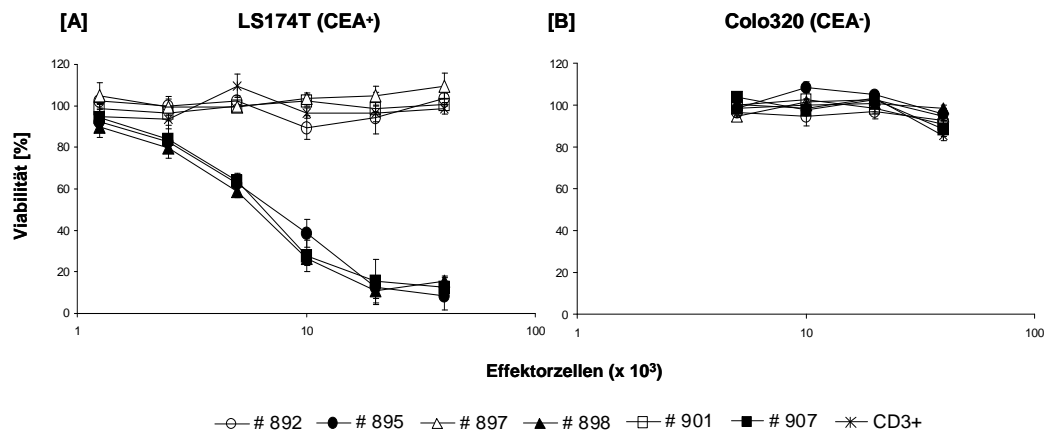


Abbildung 31: Spezifische Zytolyse von CEA⁺ Tumorzellen der Linie LS174T bei Ko-Inkubation mit T-Zellen mit rekombinanten CEA spezifischen Immunrezeptoren. Nicht-transduzierte humane CD3⁺ T-Zellen, T-Zellen mit den CEA (#895, #898 und #907) oder den CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892, #897 und #901), normiert auf die Anzahl Rezeptor tragender T-Zellen, wurden in einer Verdünnungsreihe (5×10^3 bis 4×10^4 Effektorzellen/Vertiefung) ausplattiert und mit je $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/Vertiefung [A] der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder [B] Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-inkubiert. Die Messung des zytolytischen Effektes auf Tumorzellen erfolgte durch die Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen mit Hilfe der Metabolisierungsreaktion des XTT-Substrates. Aus den Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3.3.11 Expression der rekombinanten anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptoren auf der Oberfläche muriner T-Zellen.

Die rekombinanten T-Zell Rezeptoren wurden durch retroviralen Gentransfer auf der Oberfläche muriner CD3⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert. Hierfür wurden T-Zellen aus der Milz einer C57-Black/6 Maus isoliert, aktiviert und durch retroviralen Gentransfer mit den Vektoren für die anti-CEA Rezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) oder anti-CD30 Rezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ausgestattet. Zur Produktion der Retroviren wurde die retrovirale Vektor DNA zusammen mit der retroviralen Helferplasmiden pColt (#393) und pVPack-Eco (#598) in die Zellen der Linie 293T ko-transfiziert. Die murinen T-Lymphozyten wurden durch Ko-Inkubation mit Virus-produzierenden 293T Zellen mit den generierten ecotropen Retroviren infiziert. Nach 36 Stunden wurde der Nachweis der Rezeptorexpression auf der

Oberfläche von transduzierten T-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt. Hierfür wurden die transduzierten T-Zellen mit Hilfe des PE-gekoppelten anti-Maus IgG₁ Antikörpers und des FITC-konjugierten anti-Maus CD3 Antikörpers bei CD3⁺ T-Zell-Population oder mittels des FITC-konjugierten anti-Maus-CD8a Antikörpers bei CD8⁺ T-Zell-Population markiert. Je nach Ansatz dienten nicht-transduzierte CD3⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen als Kontrolle.

Die CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 und #907 werden auf der Oberfläche transduzierter CD8⁺ T-Zellen exprimiert, wobei der Anteil Rezeptor tragender T-Zellen, trotz gleicher Transduktionsbedingungen, in einem Experiment zwischen 30 und 90 % lag (Abb. 33 [B] bis [D]). Die CD30 spezifischen Immunrezeptoren #892, #897 und #901 werden auf der Oberfläche transduzierter CD3⁺ T-Zellen exprimiert, wobei die Frequenz Rezeptor exprimierender T-Zellen zwischen 40 und 50 % liegt (Abb. 33 [F] bis [H]). Sowohl nicht-transduzierte CD8⁺ als auch CD3⁺ T-Zellen exprimieren keine rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche (Abb. 33 [A] und [E]).

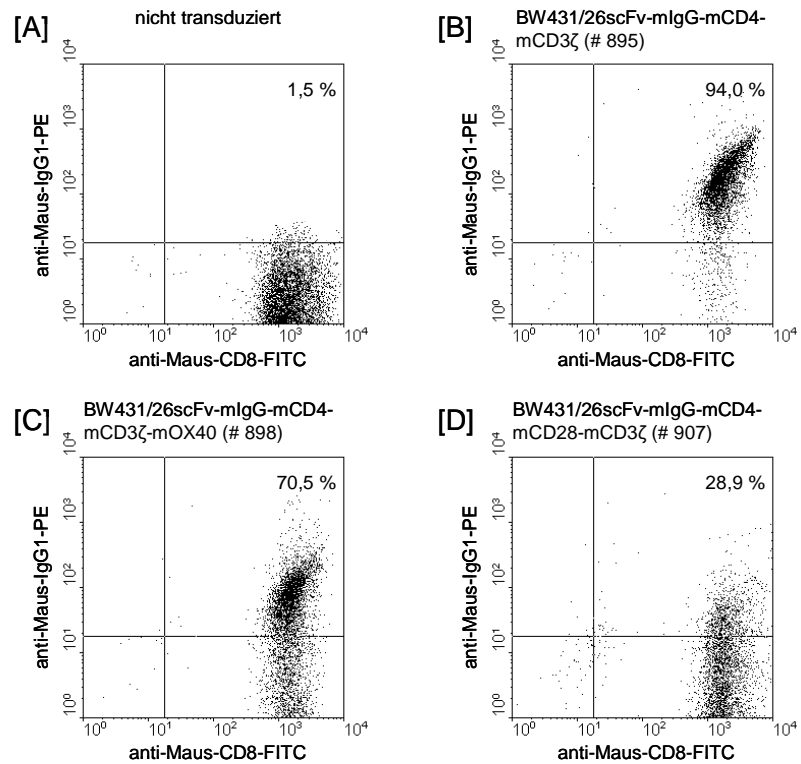
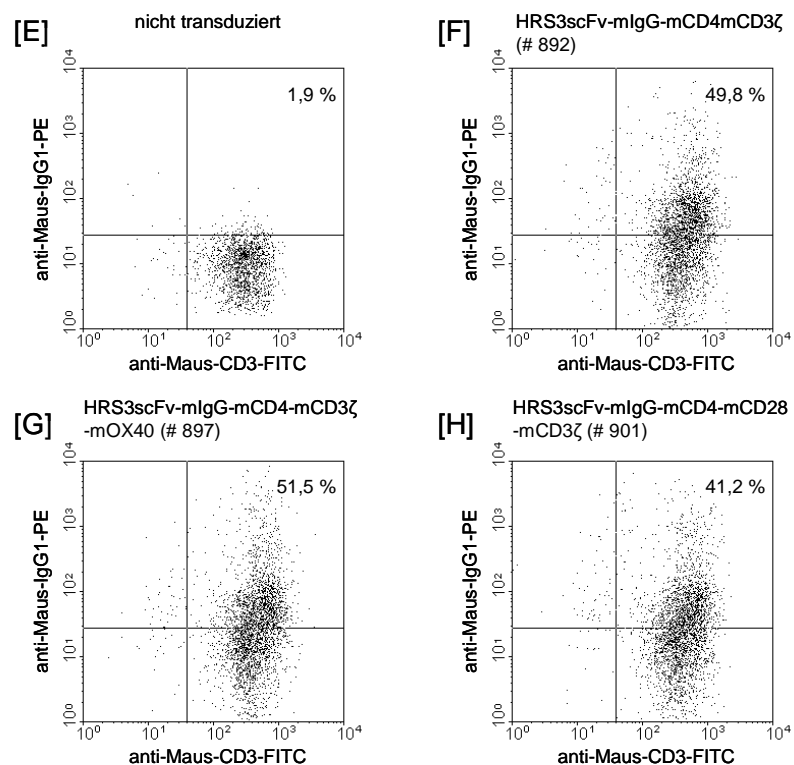
CD8⁺ T-Zellen:CD3⁺ T-Zellen:

Abbildung 33: Nachweis der Expression der anti-CEA Rezeptoren (#895, #898 und #907) und anti-CD30 Rezeptoren (#892, #897 und #901) auf der Oberfläche transduzierter muriner T-Zellen mittels Durchflußzytometrie. Die CD8⁺ T-Zellen wurden retroviral mit den Vektoren, kodierend für die CEA spezifischen Immunrezeptoren #895 (BW431/26-scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ), #898 (BW431/26-

scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40) und #907 (BW431/26-scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ) transduziert. Die CD3⁺ T-Zellen wurden retroviral mit den Vektoren, kodierend für die CD30 spezifischen Immunrezeptoren #892 (HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ), #897 (HRS3-scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40) und #901 (HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ), transduziert. Die nicht-transduzierten CD8⁺ als auch CD3⁺ T-Lymphozyten dienten als Kontrolle. Nach 36h wurde die Expression der rekombinanten anti-CEA und anti-CD30 Immunrezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht. Zu diesem Zweck wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem FITC-gekoppelten anti-Maus-CD8a Antikörper und dem PE-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörper, wohingegen die CD3⁺ T-Zellen mit dem FITC-gekoppelten anti-Maus-CD3 Antikörper und dem PE-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörper inkubiert wurden. Anschließend wurden die T-Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die Prozentzahl gibt den Anteil der T-Zellen, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimiert haben, von der Gesamtzahl der T-Zellen an.

3.3.12 Rezeptor-vermittelte Aktivierung muriner CD8⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren.

In dem Kapitel 3.2.10 haben wir gezeigt, dass humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren durch Ko-Inkubation mit humanen, CEA-positiven Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion und zur Antigen spezifischen Zytolyse aktiviert werden. In diesem Kapitel möchten wir untersuchen, ob murine CD8⁺ T-Zellen mit den gleichen Immunrezeptoren bei Ko-Inkubation mit murinen, CEA⁺ Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion und zur Antigen spezifischen Zytolyse aktiviert werden.

3.3.12.1 Induktion der IFN- γ Sekretion.

Murine CD8⁺ T-Lymphozyten wurden durch retroviralen Gentransfer mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) oder mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ausgestattet. Die Aktivierung der transduzierten CD8⁺ T-Zellen wurde anhand der Induktion der IFN- γ Sekretion bestimmt. In diesem Experiment wurden die CEA spezifischen CD8⁺ T-Zellen in einer Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatten mit Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) oder MC-38 (CEA⁻, CD30⁻) ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte CD8⁺ T-Lymphozyten oder CD8⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-

mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), oder HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901). Nach 48h wurde die IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb.34 [A] und [B]):

- (1.) Murine CD8⁺ T-Zellen mit rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren #895 oder #907 sezernierten nach Ko-Inkubation mit Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺) IFN- γ abhängig von der Anzahl Rezeptor-tragender T-Zellen. Die Ko-Kultivierung der T-Zellen mit dem Immunrezeptor #907 mit kombinierter CD28-CD3 ζ Signalkette mit C15A3 Zellen führte zu einer höheren IFN- γ Sekretion im Vergleich zu T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 mit einer CD3 ζ Signaldomäne. Da beide Rezeptoren sich in der CD28 Domäne unterscheiden, schließen wir, dass die Rezeptor-vermittelte Induktion der T-Zelle zur IFN- γ Sekretion durch die ko-stimulatorische CD28 Signaldomäne im Immunrezeptor #907 verstärkt wird.
- (2.) Bei der Inkubation der CD8⁺ T-Zellen mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892 und #901) mit Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) wurde kein IFN- γ im Zellkulturüberstand detektiert. Nicht-transduzierte CD8⁺ T-Zellen werden nicht zur IFN- γ Sekretion durch Ko-Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen induziert.
- (3.) Als Kontrollen für die Rezeptorspezifität wurden murine CD8⁺ T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #895, #898 und #907 oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren #892, #897 und #901 mit Zellen der Linie MC-38 (CEA⁻, CD30⁻) ko-inkubiert, wobei keine Induktion der IFN- γ Sekretion registriert wurde. Nicht-transduzierte CD8⁺ T-Zellen wurden ebenfalls durch die Ko-Inkubation mit Zellen der Linie MC-38 nicht zur IFN- γ Sekretion aktiviert. Offensichtlich wird die T-Zell Aktivierung Antigen spezifisch durch die anti-CEA Immunrezeptoren #895 und #907 vermittelt.

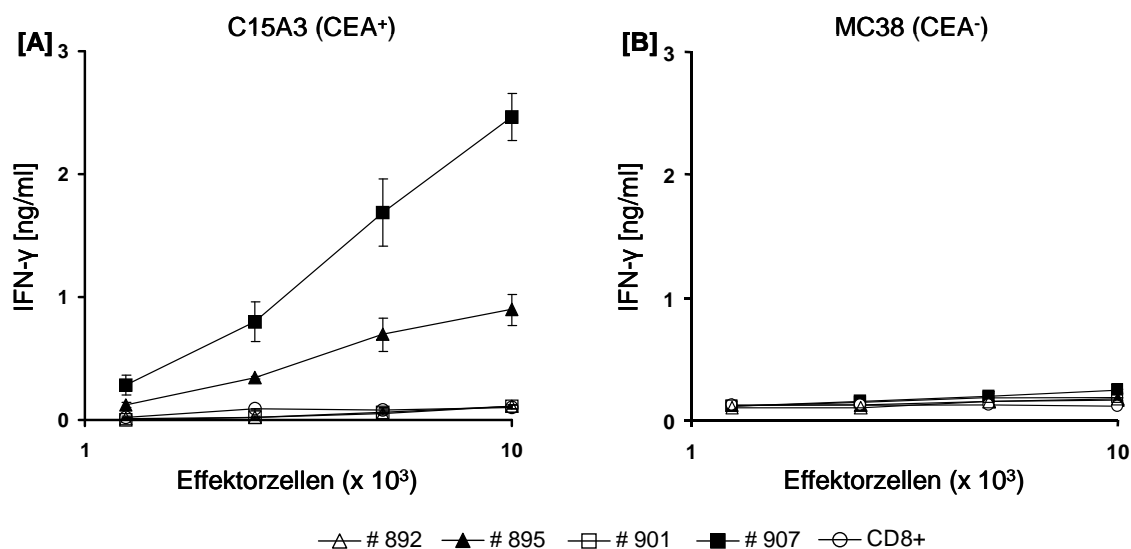


Abbildung 34: Induktion der Rezeptor-vermittelten IFN- γ Sekretion durch murine CD8⁺ T-Lymphozyten. Die murinen CD8⁺ T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) oder BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) wurden in einer Verdünnungsreihe (1,25 x 10³ bis 1 x 10⁴ Rezeptor tragende T-Zellen/Vertiefung) ausplattiert und mit je 2 x 10⁴ Tumorzellen/Vertiefung der Linie [A] C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) oder [B] MC-38 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte CD8⁺ T-Lymphozyten oder CD8⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen rekombinanten Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) verwendet. Die Konzentration des murinen IFN- γ im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

3.3.12.2 Spezifische Zytolyse.

In diesem Teilkapitel wurde untersucht, ob murine CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem anti-CEA-CD3 ζ Rezeptor #895 oder mit anti-CEA-CD28-CD3 ζ Rezeptor #907 *in vitro* Antigen spezifisch zur spezifischen Zytolyse induziert werden. Hierfür wurden murine CD8⁺ T-Zellen mit rekombinanten Rezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) ausgestattet. Die T-Zellen wurden durchflußzytometrisch analysiert, auf die Anzahl Rezeptor tragender Effektorzellen eingestellt und in einer Verdünnungsreihe zusammen mit Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) oder der Linie MC-38 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-inkubiert.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb.35 [A] und [B]):

- (1.) Murine CD8⁺ T-Zellen mit rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren #895 oder #907 wurden durch Ko-Kultivierung mit Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) zellulär aktiviert und entwickelten eine zytolytische Aktivität gegenüber CEA⁺ Tumorzellen. Dabei ist die zytolytische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 mit der CD3 ζ Signaleinheit und CD8⁺ T-Zellen mit dem Immunrezeptor #907 mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne gegenüber Zellen der Linie C15A3 gleich hoch. Hingegen wurde keine zytolytische Aktivität muriner CD8⁺ T-Lymphozyten mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) oder nicht-transduzierter CD8⁺ T-Lymphozyten, die als Kontrollen verwendet wurden, gegenüber Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺) registriert. Dies zeigt, dass die zytolytische Aktivität Antigen spezifisch durch die anti-CEA Immunrezeptoren #895 und #907 vermittelt wird.
- (2.) Als weitere Kontrollen für die Rezeptorspezifität verwendeten wir murine CD8⁺ T-Lymphozyten mit CEA (#895 oder #907) oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892 oder #901), die mit MC-38 Zellen (CEA⁻, CD30⁻) koinkubiert wurden. Dabei wurde kein zytolytischer Effekt gegenüber MC-38 Tumorzellen registriert. Auch diese Kontrollen zeigen, dass die zytolytische Aktivität spezifisch durch die anti-CEA Immunrezeptor vermittelt wird

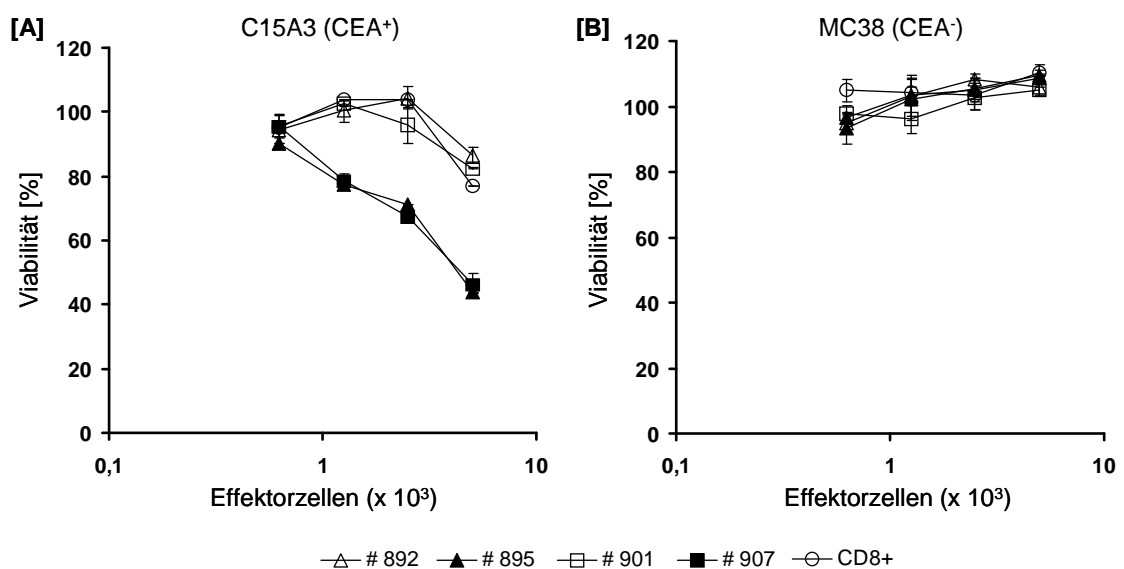


Abbildung 35: Spezifische Zytolyse von CEA⁺ C15A3 Tumorzellen bei Ko-Kultivierung mit T-Zellen mit rekombinanten CEA spezifischen Immunrezeptoren. Murine CD8⁺ T-Zellen wurden mittels retroviralen Gentransfers mit anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ

(#895) oder BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) ausgestattet. Die Anzahl der zu einsetzenden T-Zellen wurde auf die Zahl Rezeptor tragender T-Zellen eingestellt. Die Effektorzellen wurden in einer Verdünnungsreihe ($1,25 \times 10^3$ bis 1×10^4 Rezeptor tragende T-Zellen/Vertiefung) ausplattiert und mit Zellen (2×10^4 Tumorzellen/Vertiefung) der Linie [A] C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) oder [B] MC-38 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte T-Zellen oder CD8⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen rekombinanten Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) oder HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) verwendet. Die Tumorzell-Viabilität wurde durch Metabolisierung des XTT-Substrates nachgewiesen. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.4 Generierung rekombinanter anti-CEA Immunrezeptoren, die aus murinen Domänen bestehen.

In dem vorherigen Kapitel konnten wir zeigen, dass die anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) in hoher Rezeptordichte auf der Zelloberfläche transduzierter muriner T-Lymphozyten exprimiert werden und eine T-Zellaktivierung *in vitro* vermitteln. In diesem Kapitel wollen wir Immunrezeptoren, die nur aus murinen Komponenten bestehen, generieren. Das Ziel ist die Ausstattung muriner T-Lymphozyten mit funktionstüchtigen anti-CEA Rezeptoren mit keiner oder nur geringer Immunogenität bei einem *in vivo* Versuch mit immunkompetenten Mäusen. Um diese T-Zell Rezeptoren zu generieren, wurde die humanisierte BW431/26scFv Bindedomäne der Rezeptoren #895, #898 und #907 gegen die murine SCA-431scFv Bindedomäne ausgetauscht. Die Generierung der neuen rekombinanten Immunrezeptoren über die Klonierung, Proteinexpression hinzu biochemischer und funktioneller Charakterisierung beschreibt das folgende Kapitel.

3.4.1 Generierung des murinen anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977).

Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten. Das eine Fragment, das die BW431/26-scFv-mIgG DNA enthält, wurde deletiert. Das andere Fragment, das die restliche Plasmid DNA #895 enthält, wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mIgG- γ (#971)

wurde durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten. Dabei wurde das Fragment, das für die murine anti-CEA Bindedomäne SCA-431scFv-mIgG kodiert, elektrophoretisch getrennt, gereinigt und für die weitere Klonierungsarbeit zur Verfügung gestellt. Das andere Fragment mit der linearisierten Plasmid DNA #971 wurde deletiert. Die komplementären kohäsiven Enden des SCA-431scFv-mIgG DNA Fragments und der linearisierten Plasmid DNA #895 wurden mit Hilfe zu dem neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977) ligiert (Abb. 36).

Zur Überprüfung der Klonierung wurden sowohl das neu generierte Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977) als auch das Ausgangsplasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) durch Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* geschnitten, wobei für das Plasmid #977 und das Plasmid #895 jeweils zwei DNA Fragmente der erwarteten Größe generiert wurden.

Zudem wurde die DNA des Rezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ im neu generierten Plasmid #977 mit Hilfe der beiden Oligonukleotide pBullet-5' (# 51) und pBullet-3' (# 136) sequenziert (Rezeptorsequenz im Anhang).

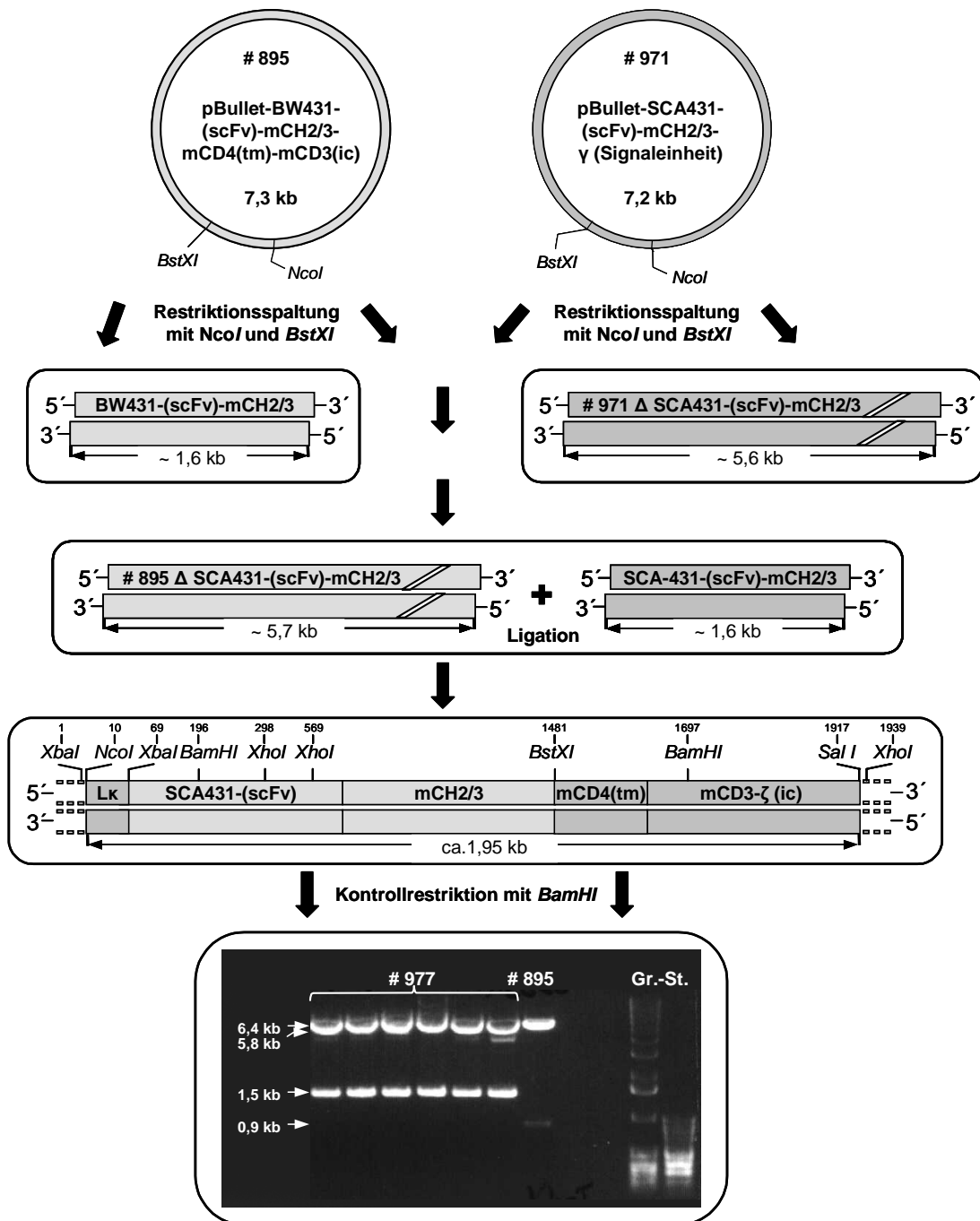


Abbildung 36: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977). Das Plasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bst*XI in zwei Fragmente geschnitten. Die BW431/26scFv-IgG DNA wurde deletiert. Der linearisierte Vektor #895 wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das Plasmid pBullet-SCA431scFv-mIgG- γ (#971) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Enzymen *Nco*I und *Bst*XI geschnitten, wobei das SCA-431scFv-mIgG DNA Fragment für die weitere Klonierungsarbeit verwendet und die linearisierte Plasmid DNA #971 deletiert wurde. Die SCA-431scFv-mIgG DNA wurde zusammen mit der linearisierten Plasmid DNA #895 mit Hilfe der T4-Ligase zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977) ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurden sowohl das neu generierte Plasmid

pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977) als auch das Ausgangsplasmid pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) mit dem Restriktionsenzym *BamHI* geschnitten. Diese Reaktion lieferte erwartungsgemäß für das Plasmid #977 ein ca. 5,8 kb und ein ca. 1,5 kb langes DNA Fragment und für das Plasmid # 895 ein ca.6,4 kb und ein ca.0,9 kb langes DNA Fragment.

3.4.2 Generierung des murinen anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978).

Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten. Das eine Fragment, das die HRS3scFv-mIgG DNA enthält, wurde deletiert. Das andere Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #897 enthält, wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet.

Das Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mIgG- γ (#971) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten. Dabei wurde das Fragment, das für die murine anti-CEA Bindedomäne SCA-431scFv-mIgG kodiert, elektrophoretisch getrennt, gereinigt und für die weitere Klonierungsarbeit zur Verfügung gestellt. Das andere Fragment mit der linearisierten Plasmid DNA #971 wurde deletiert.

Das SCA-431scFv-mIgG DNA Fragment und die linearisierte Plasmid DNA #897 wurden miteinander zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) ligiert (Abb. 37). Zur Überprüfung wurde die DNA für den Rezeptor #978 mit Hilfe der Oligonukleotide pBullet-5' (# 51) und pBullet-3' (# 136) sequenziert (Rezeptorsequenz im Anhang).

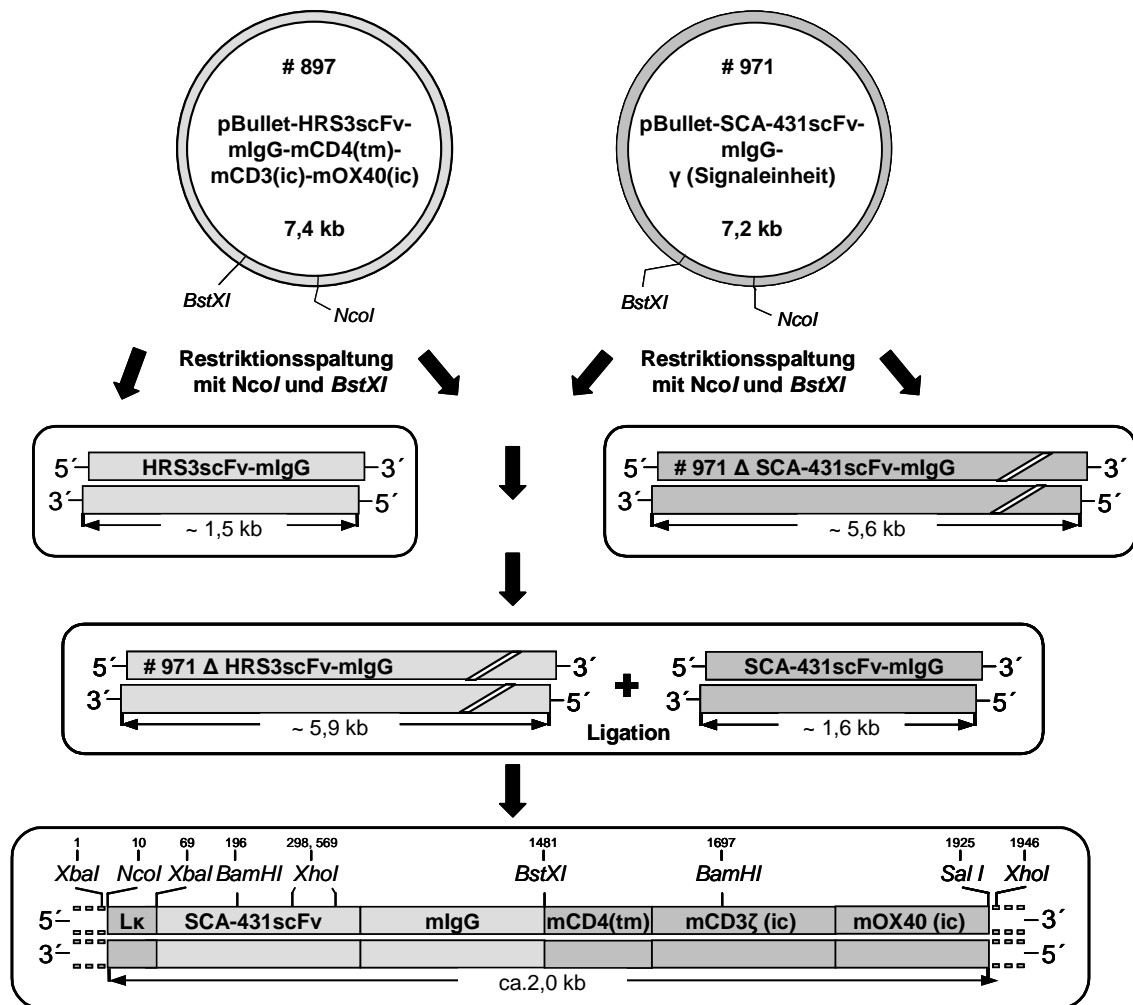


Abbildung 37: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#978). Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#897) wurde durch die Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente geschnitten. Die HRS3scFv-mIgG DNA wurde deletiert. Die linearisierte Plasmid DNA #897 wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mCH2/3-γ (#971) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* geschnitten, wobei die DNA für die SCA-431scFv-mIgG Domäne für die weitere Klonierungsarbeit verwendet wurde. Hingegen wurde die linearisierte Plasmid DNA #971 deletiert. Die SCA431scFv-mIgG DNA wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #895 mit Hilfe der T4-Ligase zum ca. 7,4 kb großen retroviralen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#977) ligiert.

3.4.3 Generierung des murinen anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982).

Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Fragmente gespalten. Dabei wurde das DNA Fragment, das die HRS3scFv-mIgG Domäne enthält, deletiert. Das andere DNA Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #901 enthält, wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BstXI* in zwei Fragmente gespalten. Dabei wurde das DNA Fragment, das für die SCA-431scFv-mIgG Domäne kodiert, für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Das andere Fragment, das die linearisierte Plasmid DNA #977 enthält, wurde deletiert. Anschließend wurde das DNA Fragment SCA-431scFv-mIgG mit der linearisierten Plasmid DNA #901 zum neuen Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) ligiert (Abb. 38).

Die erfolgreiche Integration der SCA-431scFv DNA im Plasmid #982 wurde durch Restriktion mit dem Enzym *XhoI* nachgewiesen. Im Unterschied zu dem Ausgangsvektor #901 verfügt das neu generierte Plasmid #982 über zwei zusätzliche Schnittstellen für das Restriktionsenzym *XhoI*, so dass diese Reaktion jeweils drei Fragmente der erwarteten Größe lieferte (Abb. 38).

Zusätzlich wurde die DNA des Rezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ mitsamt der umgebenden Regionen im neu generierten Plasmid #982 mit Hilfe der Oligonukleotide pBullet-5' (# 51), pBullet-3' (# 136) und mIgG1-S (#251) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

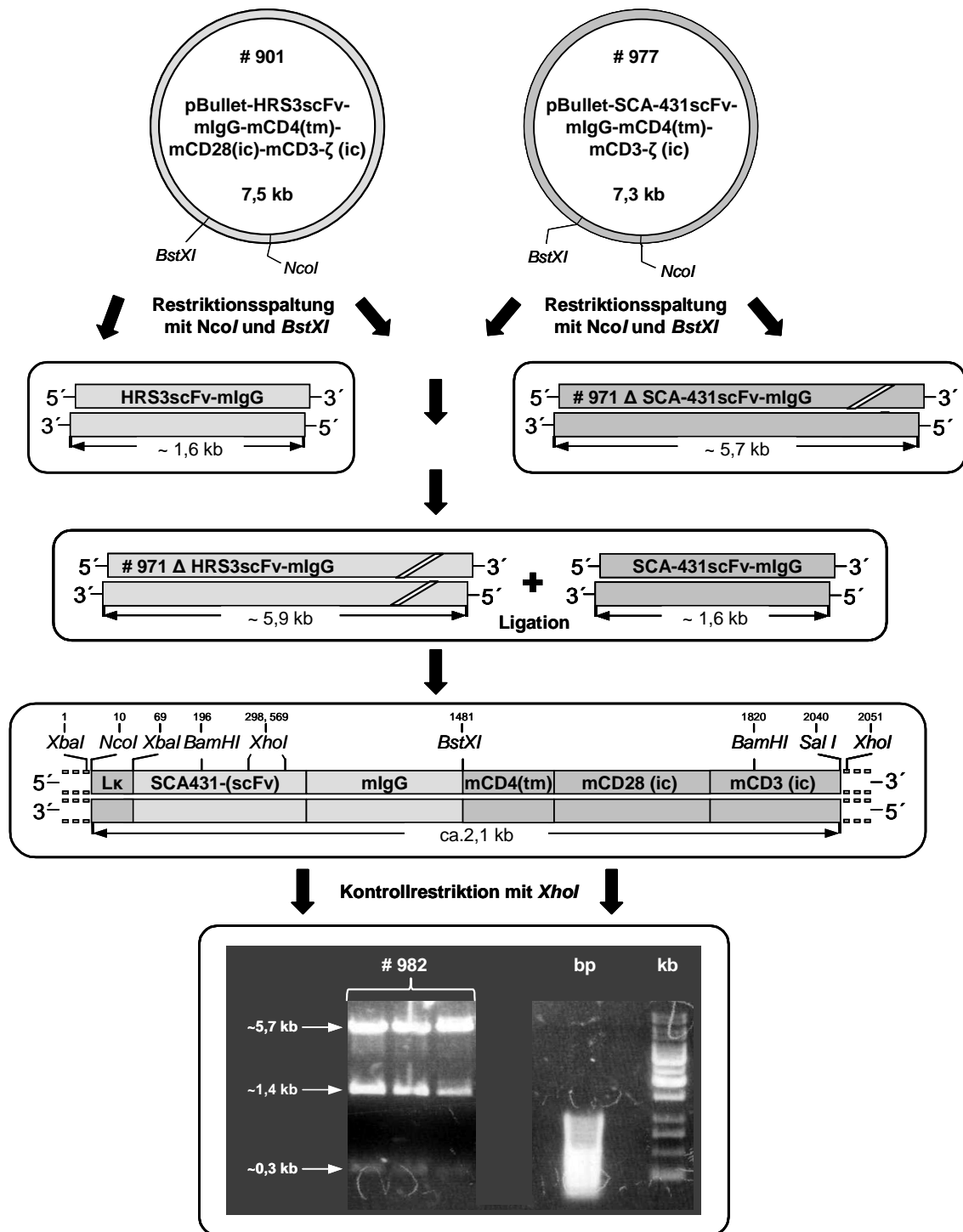


Abbildung 38: Klonierung des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#982) mit muriner CD28-CD3ζ Signalkette. Das Plasmid pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#901) wurde durch Restriktion mit den Endonukleasen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente gespalten, wobei das HRS3scFv-mIgG DNA Fragment deletiert und die linearisierte Plasmid DNA #901 für die weitere Klonierungsarbeit verwendet wurde. Das Plasmid pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD3ζ (#977) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Endonukleasen *NcoI* und *BstXI* in zwei DNA Fragmente gespalten. Dabei wurde die DNA für die SCA-431scFv-mIgG Domäne für die weitere Klonierungsarbeit verwendet und die linearisierte Plasmid DNA #977 deletiert. Die SCA-431scFv-mIgG DNA wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #901 mit Hilfe der T4-Ligase

zum neuen retroviralen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) ligiert. Die erfolgreiche Klonierung des Plasmids #982 wurde durch die Restriktion mit dem Enzym *XhoI* nachgewiesen, die erwartungsgemäß ein 5,7 kb, 1,4 kb und 0,3 kb großes DNA Fragment generierte.

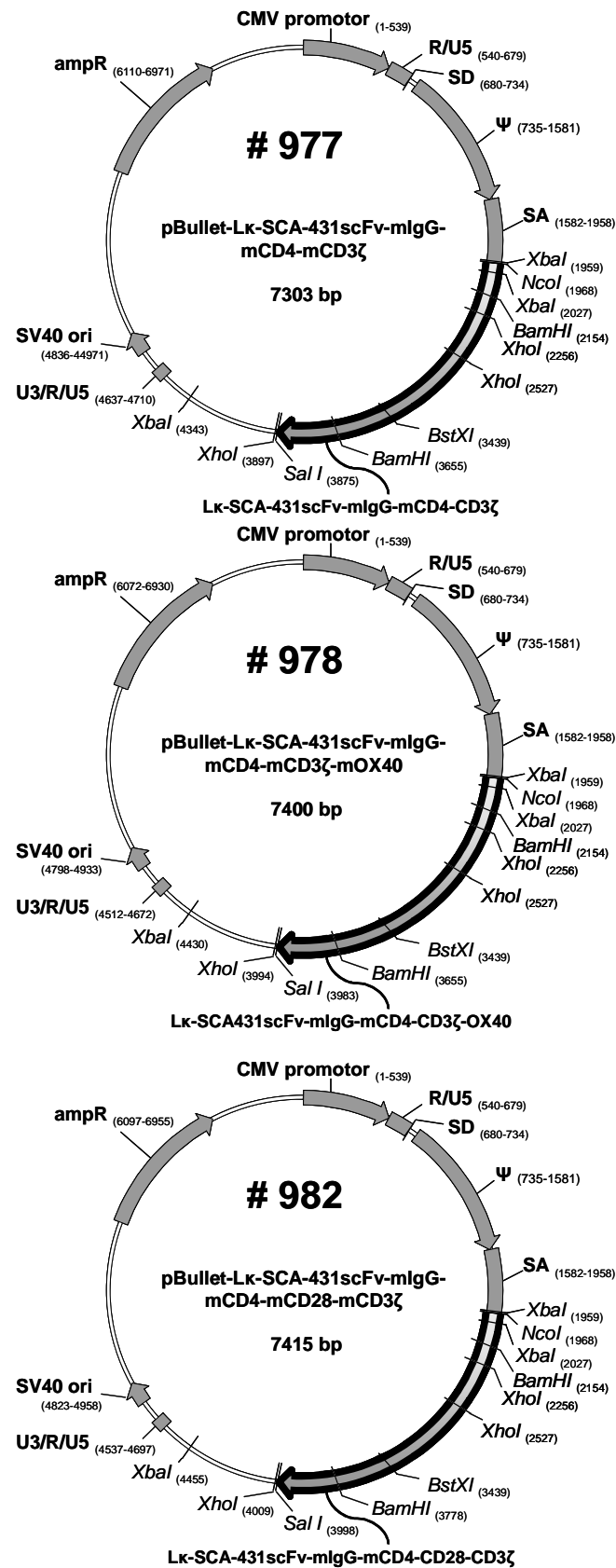


Abbildung 39: Plasmidkarten der neu generierten retroviralen Plasmide #977, #978 und #982.

3.4.4 Expression der rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T.

Es wurde überprüft, ob die rekombinanten T-Zell-Rezeptoren mit der SCA-431scFv Bindedomäne auf der Zelloberfläche von Zellen der Linie 293T exprimiert werden. Hierfür wurden Zellen der Linie 293T mit der Plasmid DNA für die murinen Rezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) transfiziert. Nach 48h wurde die Expression rekombinanter Rezeptoren auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht. Hierfür wurden die transfizierten Zellen mit dem PE-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörper inkubiert, der an die murine IgG Domäne des extrazellulären Rezeptorteils bindet. Als Kontrolle gleichen Isotyps wurde der PE-gekoppelte anti-human IgG₁ Antikörper verwendet. Die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten wurden paarweise übereinander gelegt und ausgewertet (Abb. 40).

Die Expression der rekombinanten anti-CEA Rezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) oder SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) auf der Oberfläche von 293T Zellen wurde mit Hilfe des PE-konjugiertem anti-Maus IgG₁ Antikörper nachgewiesen (Abb. 40 [B], [C] und [D]), wobei eine hohe Expressionsrate für alle neu generierten rekombinanten Immunrezeptoren (#977, #978, #982) registriert wurde. Auf der Zelloberfläche nicht-transfizierter Zellen der Linie 293T, die der Kontrolle dienten, wurden keine rekombinanten Rezeptoren detektiert (Abb. 40 [A]).

Die rekombinanten Proteine wurden weiter mit Hilfe der Western-Blot Analyse (Kap. 3.4.5) untersucht, wofür die transfizierten 293T Zellen lysiert wurden.

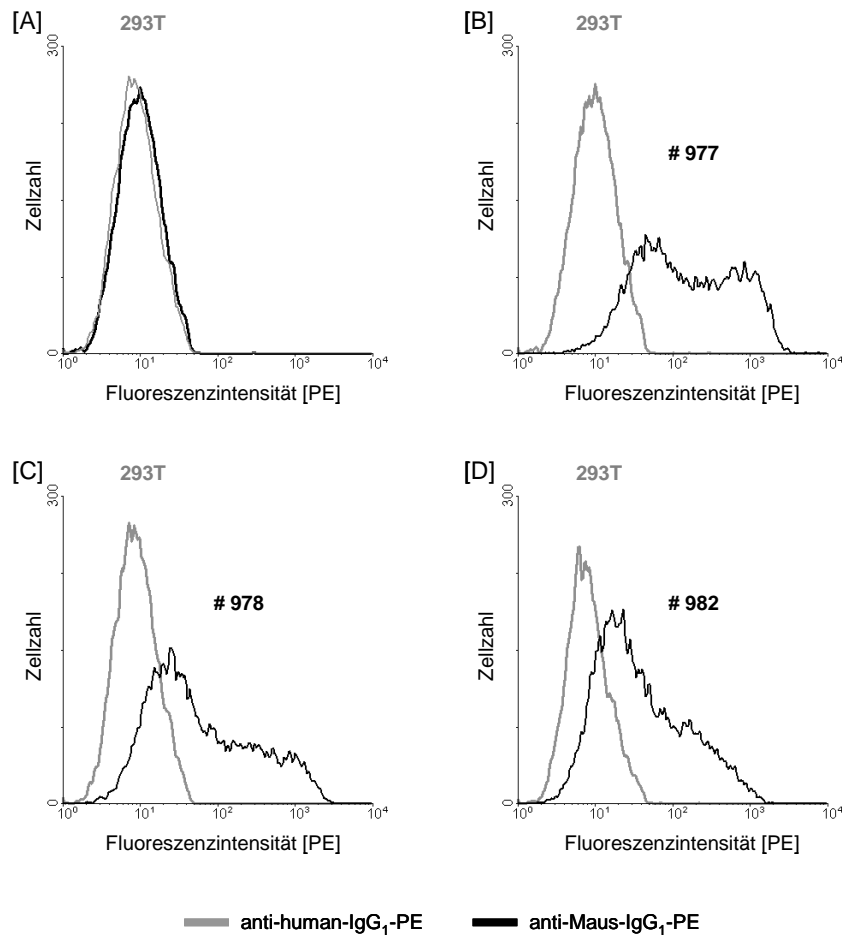


Abbildung 40: Expression der murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren #977, #978 oder #982 auf der Oberfläche von Zellen der Linie 293T. Jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen der Linie 293T wurden mit der DNA für den rekombinanten Immunrezeptor SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) oder SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) transfiziert und nach 48h zum Nachweis der Immunrezeptoren mit dem PE-markierten anti-Maus IgG₁ Antikörper (schwarze Linie), der gegen die murine IgG Domäne des Rezeptors gerichtet ist, oder mit dem PE-konjugierten anti-human-IgG₁ Antikörper (graue Linie) inkubiert. Die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen der Linie 293T wurde mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen.

3.4.5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Immunrezeptoren.

Die SDS-Gelelektrophorese diente zusammen mit der Western-Blot Analyse der Molekulargewichtbestimmung und Identifikation rekombinanter CEA spezifischer Rezeptorproteine. Hierfür wurden Zellen der Linie 293T mit der Plasmid DNA für die rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898), SCA-431scFv-

mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) transfiziert, 48h inkubiert und zur Proteingewinnung lysiert. Nach Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die Rezeptorproteine mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die „geblotteten“ Rezeptorproteine wurden mit dem HRP-konjugierten anti-Maus IgG₁ monoklonalen Antikörper, der die IgG Domäne des Rezeptors erkennt, detektiert. Wir ermittelten für die anti-CEA Rezeptorproteine # 895 und # 977 ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa, für die CEA Rezeptoren # 978 und # 982 ein Molekulargewicht von ca. 73 kDa und für den Rezeptor # 898 ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa. Diese Werte entsprechen dem errechnetem Molekulargewicht der rekombinanten Rezeptorproteine.

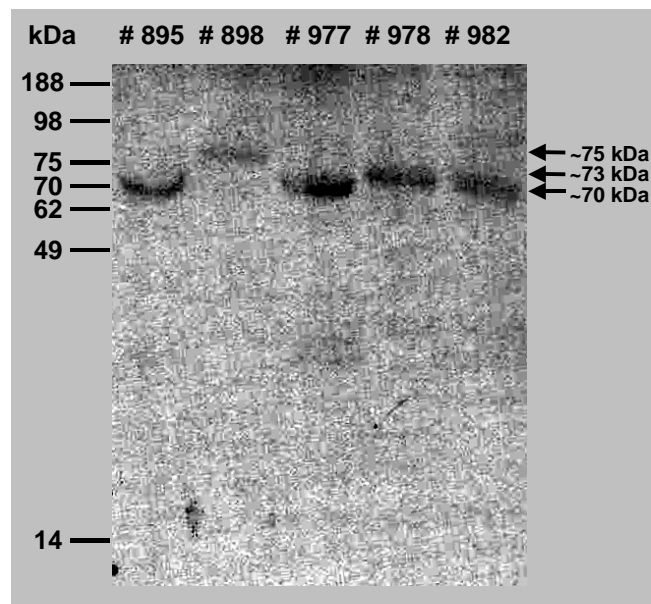


Abbildung 41: Western-Blot Analyse der rekombinanten anti-CEA Rezeptorproteine. Zellen der Linie 293T wurden mit der DNA für die rekombinanten Rezeptorproteine BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898), SCA431-26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) transfiziert, 48h inkubiert und anschließend lysiert. Zell-Lysate wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 8%-igen denaturierenden PAA-Gel mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem HRP-konjugierten anti-Maus IgG₁ Antikörper, der die murine IgG Domäne der Rezeptoren erkennt, und durch Zugabe des HRP-Substrates und Chemolumineszenz detektiert.

3.4.6 Expression muriner anti-CEA Immunrezeptoren (#977, #978 und #982) auf der Oberfläche humaner T-Lymphozyten.

Um die Modulation der Rezeptor-vermittelten Aktivität von T-Zellen durch die neuen rekombinanten anti-CEA Rezeptoren (#977, #978 und #982) *in vitro* zu untersuchen, wurden isolierte humane $CD3^+$ T-Zellen durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten Rezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) ausgestattet (Abb. 42 [B], [C] oder [D]).

Nach 48h der Ko-Kultivierung der T-Zellen mit Virus-produzierenden 293T Zellen im IL-2-haltigen Kulturmedium erfolgte der Nachweis der membranständigen Immunrezeptoren mittels Durchflußzytometrie mit Hilfe des FITC-gekoppelten anti-human-CD3 Antikörpers und des PE-gekoppelten anti-Maus-IgG₁ Antikörpers. Nicht-transduzierte humane $CD3^+$ T-Lymphozyten dienten als Kontrolle. Es wurde eine Expressionsrate der CEA spezifischen Immunrezeptoren (#977, #978 und #982) auf T-Lymphozyten registriert, die zwischen 30 % und 60 % liegt (Abb. 42).

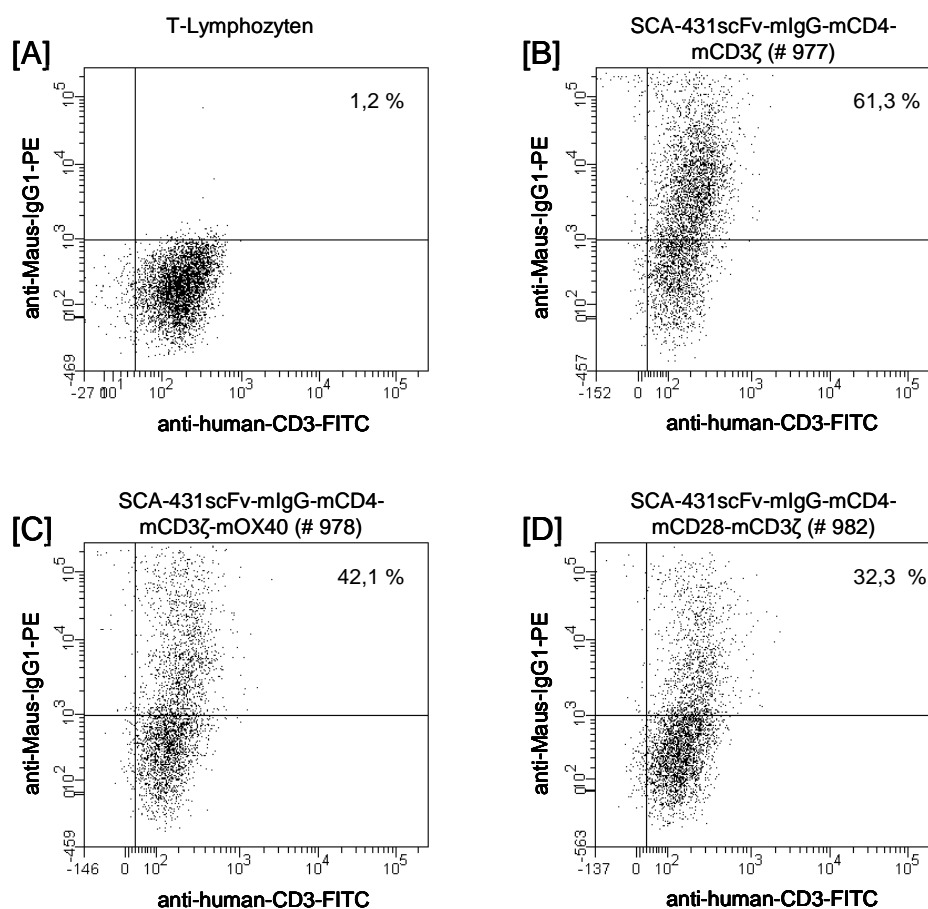


Abbildung 42: Expression der murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche transduzierter humaner $CD3^+$ T-Lymphozyten. Die humanen $CD3^+$ T-Zellen

wurden durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) ausgestattet. Nicht-transduzierte humane CD3⁺ T-Lymphozyten dienten als Kontrolle. Nach 48h wurde die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht. Hierfür wurden die T-Zellen mit dem FITC-gekoppelten anti-Maus-CD3 Antikörper und dem PE-konjugierten anti-Maus-IgG₁ Antikörper, der an die murine IgG Domäne bindet, inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Die ermittelte Prozentzahl gibt den Anteil der T-Zellen, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimieren, von der Gesamtzahl der T-Zellen an.

3.4.7 Funktionelle Charakterisierung muriner T-Zell Rezeptoren #977, #978 und #982.

Da die rekombinanten Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) mit hoher Frequenz auf humanen T-Zellen exprimiert werden, wenden wir uns im folgenden Kapitel der Funktionsuntersuchung der neu generierten Immunrezeptoren zu. Hierfür werden humane CD3⁺ T-Lymphozyten durch retroviralen Gentransfer mit den neu generierten Immunrezeptoren #977, #978 und #982 ausgestattet und die Aktivierung der T-Zellen nach Kreuzvernetzung des Rezeptors anhand der IFN- γ oder IL-2 Sekretion bestimmt.

Die zelluläre Aktivierung von CD3⁺ T-Lymphozyten durch die rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren #977, #978 oder #982 wurde dadurch induziert, dass der Immunrezeptor mit immobilisiertem anti-Maus IgG₁ Antikörper, welcher an die IgG Domäne im extrazellulären Anteil des Rezeptors bindet, kreuzvernetzt wurde. Als Kontrolle diente der anti-human IgG₁ Antikörper gleichen Isotyps. Die zelluläre Aktivierung der CD3⁺ T-Lymphozyten wurde anhand des Anstiegs der IFN- γ und IL-2 Konzentration im Kulturüberstand nachgewiesen. Bei der Versuchsvorbereitung wurden CD3⁺ T-Lymphozyten isoliert, mit dem anti-CD3 Antikörper OKT-3 und IL-2 aktiviert und durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) oder mit den anti-CD30 Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ausgestattet. T-Zellen mit CEA spezifischen Rezeptoren #977, #978 oder #982, normiert auf die Anzahl Rezeptor tragender CD3⁺ T-

Zellen, wurden für 48h auf Kulturplatten inkubiert, die mit dem anti-Maus IgG₁ Antikörper oder dem anti-human IgG₁ Antikörper beschichtet wurden. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte CD3⁺ T-Zellen und CD3⁺ T-Zellen mit den anti-CD30 Immunrezeptoren (#892 und #901). Die Kulturüberstände wurden gesammelt und die Konzentration des sezernierten IFN- γ und IL-2 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Wir erhielten folgende Ergebnisse:

- (1.) In den Überständen von CD3⁺ T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren (#977, #978 und #982) als auch mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892 und #901) wurde nach Inkubation auf Kulturplatten mit immobilisiertem anti-Maus-IgG₁ Antikörper eine erhöhte IFN- γ Konzentration detektiert (Abb. 43 [A]). In den Zellkulturüberständen von T-Zellen mit den CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#982 oder #901) mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signaleinheit wurde eine erhöhte IL-2 Konzentration detektiert (Abb. 43 [B]), wohingegen in den Kulturüberständen von T-Zellen mit rekombinanten CEA (#977, #978) oder CD30 spezifischen Immunrezeptor (#892) ohne die ko-stimulatorische CD28 Signaldomäne kein IL-2 detektiert wurde. In Kulturüberständen von nicht-transduzierten T-Lymphozyten wurde keine erhöhte IFN- γ und IL-2 Konzentration detektiert (Abb. 43 [A] und [B]). Dies zeigt einerseits, dass die Kreuzvernetzung der IgG Domäne des CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptors mit der CD3 ζ Signalkette (#977, #892), der CD28-CD3 ζ Signaldomäne (#982, #901) oder der CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#978) mit immobilisierten anti-mIgG₁ Antikörper zur Induktion der IFN- γ Sekretion führt. Andererseits wird gezeigt, dass die IL-2 Sekretion nach Kreuzvernetzung der IgG Domäne ausschließlich durch T-Zellen mit Immunrezeptoren (#901, #982) mit der CD28-CD3 ζ Signaldomäne induziert wird.
- (2.) CD3⁺ T-Zellen mit dem CEA (#982) oder CD30 spezifischen (#901) Immunrezeptor mit der CD28-CD3 ζ Signaldomäne werden stärker zur IFN- γ Sekretion stimuliert als T-Zellen mit den CEA oder CD30 spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ Signaldomäne (#977, #892) oder mit der CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#978). Die CD28 ko-stimulatorische Domäne führt bei der T-Zell Aktivierung offensichtlich zu einer erhöhten IFN- γ Sekretion.

(3.) Als Kontrollen wurden nicht-transduzierte T-Lymphozyten, T-Zellen mit CEA spezifischen (#977, #978 und #982) und mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892 und #901) auf Kulturplatten mit immobilisierten anti-human IgG₁ Antikörper inkubiert, was zu keiner Rezeptor-vermittelten Aktivierung der IFN- γ und IL-2 Sekretion führte (Abb. 43 [A] und [B]).

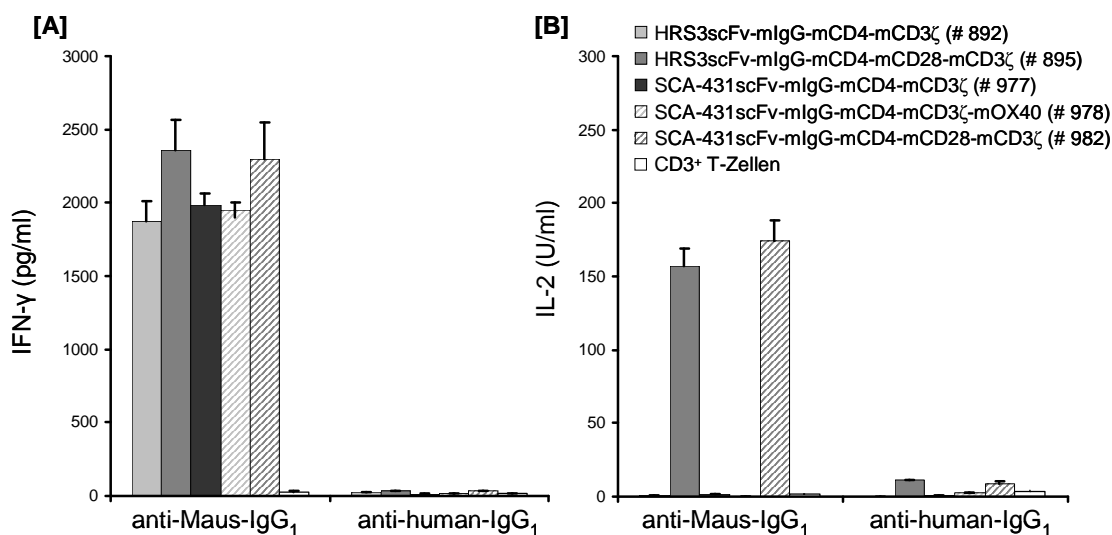


Abbildung 43: Induktion der IFN- γ und IL-2 Sekretion bei humanen CD3⁺ T-Lymphozyten nach Kreuzvernetzung der Immunrezeptoren. Zellkulturplatten wurden mit dem anti-Maus IgG₁ Antikörper, der gegen die IgG Domäne im extrazellulären Anteil des Rezeptors gerichtet ist, beschichtet. Als Kontrolle gleichen Isotyps wurde der anti-human IgG₁ Antikörper auf den Zellkulturplatten immobilisiert. T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#982) oder mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901), normiert auf die Anzahl Rezeptor tragender CD3⁺ T-Zellen (je 2×10^4 Effektorzellen/Vertiefung) wurden für 48h auf Kulturplatten inkubiert, die mit dem anti-Maus IgG₁ Antikörper (5 μ g/ml) oder zur Kontrolle mit dem anti-human IgG₁ Antikörper (5 μ g/ml) beschichtet worden waren. Die Aktivierung der humanen Rezeptor tragenden CD3⁺ T-Zellen mit rekombinanten anti-CEA (#977, #978 und #982) oder anti-CD30 Immunrezeptoren (#892 und #901) wurde anhand der IFN- γ und IL-2 Konzentration mittels ELISA bestimmt.

3.4.8 Aktivierung humaner T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Kultur mit CEA⁺ Tumorzellen.

In den weiteren Untersuchungen wollen wir der Frage nachgehen, ob humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren bei Ko-Kultur mit CEA⁺

Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion und zur Zytolyse der CEA⁺ Tumorzellen aktiviert werden. Hierfür wurden Zellen der Linie LS174T (CEA⁺) und als Kontrolle Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻) mit humanen CD3⁺ T-Lymphozyten in einer Verdünnungsreihe ko-inkubiert, die mit Hilfe des retroviralen Gentransfers mit murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) ausgestattet wurden. Als weitere Kontrollen wurden nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten und CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) verwendet. Nach 48h der Ko-Inkubation wurde der zytolytische Effekt auf die CEA⁺ Tumorzellen durch Umsetzungsreaktion des XTT-Substrates und die sezernierte IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb.44 [A] und [B]):

- (1.) CD3⁺ T-Lymphozyten mit Expression der CEA spezifischen Immunrezeptoren #977, #978 oder # 982 wurden dosisabhängig durch Ko-Kultur mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺) zur IFN- γ Sekretion induziert. CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ Signalkette (#977) und mit der kombinierten CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#978) werden gleichstark zur IFN- γ Sekretion stimuliert. T-Lymphozyten mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor mit der CD28-CD3 ζ Signaleinheit (#982) werden durch die Ko-Kultivierung mit Zellen der Linie LS174T stärker zur IFN- γ Sekretion stimuliert als T-Zellen mit den Immunrezeptoren #977 oder #978.
- (2.) CD3⁺ T-Lymphozyten mit einer Spezifität für das CD30-Antigen (#892 und #901) und nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten werden durch die Ko-Kultivierung mit Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) nicht zur IFN- γ Sekretion aktiviert. Dies zeigt, dass die Aktivierung der T-Zellen Antigen-spezifisch durch die rekombinanten Rezeptoren vermittelt wird.
- (3.) CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA (#977, #978 und #982) oder CD30 spezifischen Rezeptoren (#892 und #901) als Kontrolle werden durch die Ko-Kultivierung mit Zellen der Linie Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) nicht zur IFN- γ Sekretion aktiviert. Nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten wurden ebenfalls nicht durch die Zellen der Linie Colo320 zur IFN- γ Sekretion aktiviert.

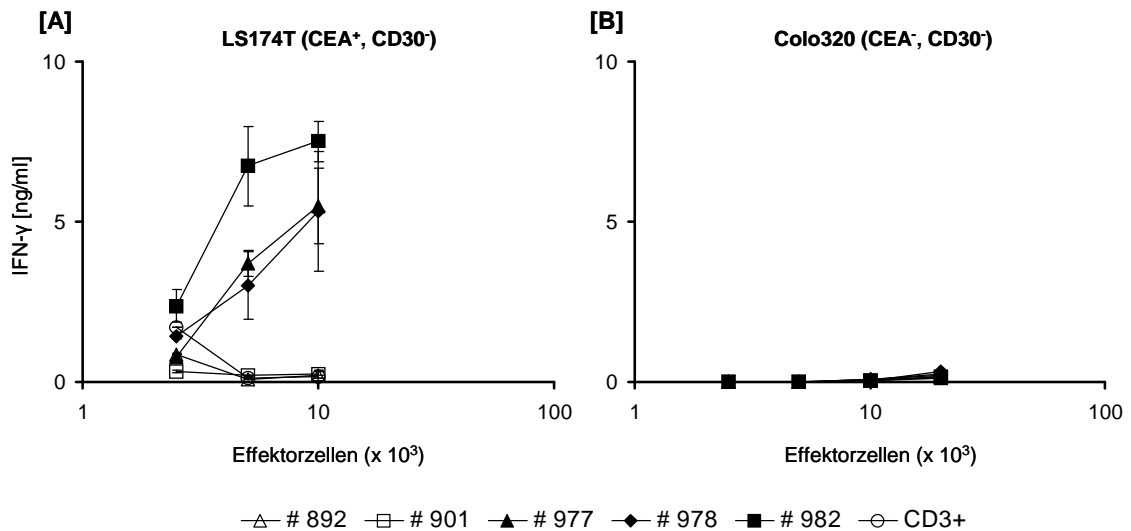


Abbildung 44: Induktion der IFN- γ Sekretion durch Ko-Inkubation der CEA spezifischen T-Lymphozyten mit CEA⁺ Tumorzellen. Die humanen CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) wurden in einer Verdünnungsreihe ($2,5 \times 10^3$ bis 2×10^4 Rezeptor tragende T-Zellen/Vertiefung) ausplattiert und mit je $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/Vertiefung der Linie [A] LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder als Kontrolle mit [B] Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte T-Lymphozyten und CD3⁺ T-Lymphozyten mit den CD30 spezifischen rekombinanten Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) verwendet. Die IFN- γ Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des ELISA bestimmt. Aus den Daten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

3.4.9 Spezifische Zytolyse von CEA⁺ Tumorzellen durch humane T-Lymphozyten mit murinen anti-CEA Immunrezeptoren.

In diesem Teil untersuchen wir, ob die Ko-Inkubation von humanen CD3⁺ T-Lymphozyten, retroviral ausgestattet mit murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren (#977, #978 und #982), mit CEA⁺ Tumorzellen zur Antigen spezifischer Zytolyse von CEA⁺ Tumorzellen führt. Der hierfür benötigte Testansatz wurde zuvor im Kapitel 3.4.9 beschrieben. T-Zellen, ausgestattet mit rekombinanten Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982), wurden in einer Verdünnungsreihe mit Tumorzellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) oder der Linie Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden naive CD3⁺ T-Zellen und T-Zellen mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) verwendet.

Wir erhielten folgende Ergebnisse (Abb.45 [A] und [B]):

- (1.) CD3⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #977, #978 und #982 werden bei Ko-Inkubation mit Tumorzellen der Linie LS174T (CEA⁺) zur spezifischen Zytolyse der CEA⁺ Tumorzellen aktiviert, wobei die zytolytische Aktivität der CD3⁺ T-Zellen mit CD3 ζ Rezeptor # 977, CD3 ζ -OX40 Rezeptor #978 und CD28-CD3 ζ Rezeptor #982 gegenüber Zellen der Linie LS174T gleich hoch ist. Unabhängig von der Art der intrazellulären Signalkette des Rezeptors sind die T-Zellen nach Antigenbindung gleichstark zytolytisch wirksam gegen CEA⁺ Zielzellen.
- (2.) Naive humane CD3⁺ T-Zellen und CD3⁺ T-Zellen mit den CD30 spezifischen Immunrezeptoren #892 und #901 entwickeln gegenüber Zellen der Linie LS174T (CEA⁺, CD30⁻) keine zytolytische Aktivität. Dies zeigt, dass die Rezeptor-vermittelte zytolytische Aktivität der T-Zellen Antigen spezifisch verläuft.
- (3.) Als Kontrollen verwendete humane T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #977, #978 oder #982 entwickeln bei Ko-Inkubation mit Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) keine spezifische zytolytische Aktivität gegen die CEA⁻ Zielzellen. Nicht-transduzierte T-Zellen und T-Zellen, ausgestattet mit rekombinanten CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892 und #901), die als weitere Kontrollen verwendet wurden und mit Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) Tumorzellen ko-inkubiert wurden, entwickeln ebenfalls keine zytolytische Aktivität gegen die CEA⁻ und CD30⁻ Zielzellen. Die zytolytische Aktivität der T-Zellen ist somit Antigen-spezifisch.

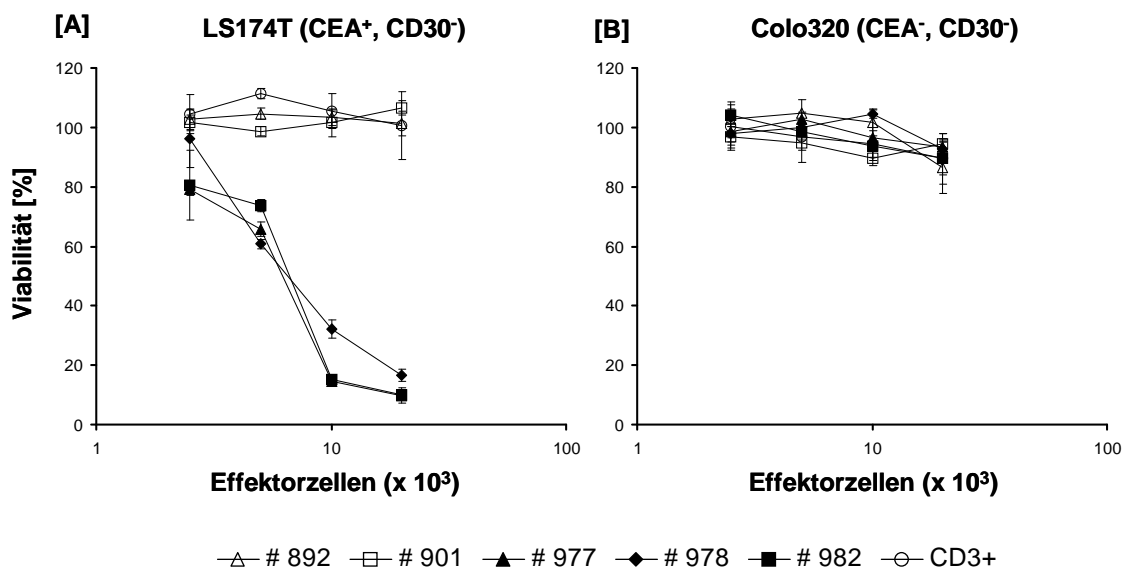


Abbildung 45: Induktion der Zytolyse von CEA⁺ Tumorzellen bei Ko-Inkubation mit humanen CD3⁺ T-Zellen mit murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren. Humane CD3⁺ T-Zellen mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren (#977, #978 und #982) oder den CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#892 und #901), normiert auf die Anzahl Rezeptor-tragender T-Zellen, wurden in einer Verdünnungsreihe ($2,5 \times 10^3$ bis 2×10^4 Effektorzellen/Vertiefung) ausplattiert und mit je $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/Vertiefung der Linie [A] LS174T (CEA⁺, CD30⁺) oder [B] Colo320 (CEA⁻, CD30⁻) für 48h ko-inkubiert. Die Messung des zytolytischen Effektes auf Tumorzellen der Linie LS174T oder Colo320 erfolgte durch die Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen mittels Umsetzung des XTT-Substrates. Aus den Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3.4.10 Expression der murinen anti-CEA Immunrezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche von murinen CD3⁺ T-Zellen.

Im vorherigen Kapitel konnten wir zeigen, dass humane T-Lymphozyten, retroviral ausgestattet mit CEA spezifischen Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982), durch Ko-Inkubation mit humanen CEA⁺ Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion und zur Zytolyse von CEA⁺ Tumorzellen aktiviert werden. Im Hinblick auf den bevorstehenden experimentellen Einsatz der rekombinanten Rezeptoren in immunkompetenten Mäusen wollen wir in diesem Kapitel untersuchen, ob diese murinen Rezeptoren auf der Oberfläche muriner CD3⁺ T-Zellen exprimiert werden.

Für die retrovirale Transduktion muriner CD3⁺ T-Zellen wurden Milzzellen einer C57-

Black/6 Maus isoliert, mit einem Aktivierungscocktail, zusammengesetzt aus dem anti-Maus-CD3 Antikörper (Klon-Nr: 145-2C11) (0,1 µg/ml), anti-Maus-CD28 Antikörper (Klon-Nr.: 37.51) (0,1 µg/ml), PHA-L (3 µg/ml), IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (5 ng/ml), aktiviert und mittels retroviralen Gentransfers mit murinen anti-CEA Rezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#982) ausgestattet. Der Nachweis der Rezeptorexpression auf der Oberfläche transduzierter T-Lymphozyten wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt. Hierfür wurden die transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten mittels des FITC-konjugierten anti-Maus CD3 Antikörpers und des PE-gekoppelten anti-Maus IgG₁ Antikörpers markiert. Nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten dienten als Kontrolle. Die Expression der anti-CEA Rezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche transduzierter T-Zellen wurde mit Hilfe der FACS Analyse bestimmt. Nicht-transduzierte CD3⁺ T-Zellen exprimieren keine rekombinanten Immunrezeptoren auf der Oberfläche (Abb. 46 [A] bis [D]).

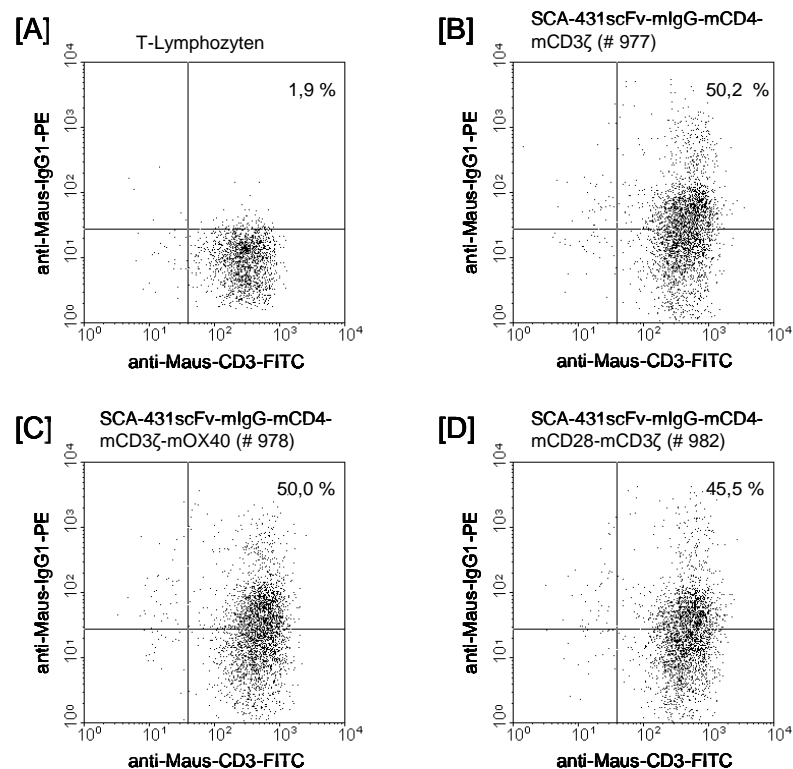


Abbildung 46: Expression der CEA spezifischer Immunrezeptoren #977, #978 und #982 auf der Oberfläche transduzierter muriner CD3⁺ T-Zellen. Die murinen CD3⁺ T-Zellen wurden durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten Immunrezeptoren SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ (#982) ausgestattet. Hierfür wurden murine T-Zellen mit Virus-produzierenden 293T-Zellen für 24h ko-inkubiert. Anschließend wurde die Expression der rekombinanten Rezeptorproteine auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen mittels Durchflußzytometrie mit Hilfe des FITC-gekoppelten anti-Maus

CD3 Antikörpers (1 µg/ml) und des PE-konjugierten anti-Maus-IgG₁ Antikörpers (0,2 µg/ml), der die murine IgG Domäne erkennt, untersucht und die Transduktionsrate bestimmt. Die Prozentzahl gibt den Anteil der T-Zellen, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimiert haben, von der Gesamtzahl der T-Zellen an.

3.5 *In vivo* Evaluierung des Immunrezeptoransatzes.

In den vorherigen Kapiteln wurden die rekombinanten Immunrezeptoren *in vitro* hinsichtlich der zellulären Aktivierung charakterisiert. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Prüfung der anti-Tumor Aktivität in *in vivo* Ansätzen. Alle Untersuchungen werden an immunkompetenten C57-Black/6 Mäusen durchgeführt.

3.5.1 Wachstumskinetik der murinen Kolonkarzinomzelllinie (CEA⁺, CD30⁻) und MC-38 (CEA⁻, CD30⁻) in Versuchstieren.

In diesem Versuch wollten wir der Frage nachgehen, ob die subkutane Injektion von Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺) oder MC-38 (CEA⁻) zur Tumorbildung in immunkompetenten C57-Black/6 Versuchstieren führt. Tumorzellen der Linie C15A3 und MC-38 wurden in unterschiedlicher Zellzahl den Versuchstieren subkutan injiziert. Anschließend wurde das Tumolvolumen regelmäßig gemessen (Abb. 49 [A] und [B]). Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺) induzieren dosisabhängig einen Tumor in C57-Black/6 Mäusen. Tiere mit einer höheren Zahl (1×10^6 Tumorzellen) an Zellen der Linie C15A3 zeigen ein früheres Tumorstadium als Versuchstiere mit einer niedrigeren Zellzahl (5×10^5 und 1×10^5 Tumorzellen) auf. Injizierte Zellen der Linie MC-38 (CEA⁻) führen ebenfalls dosisabhängig zur Tumorbildung in C57-Black/6 Mäusen.

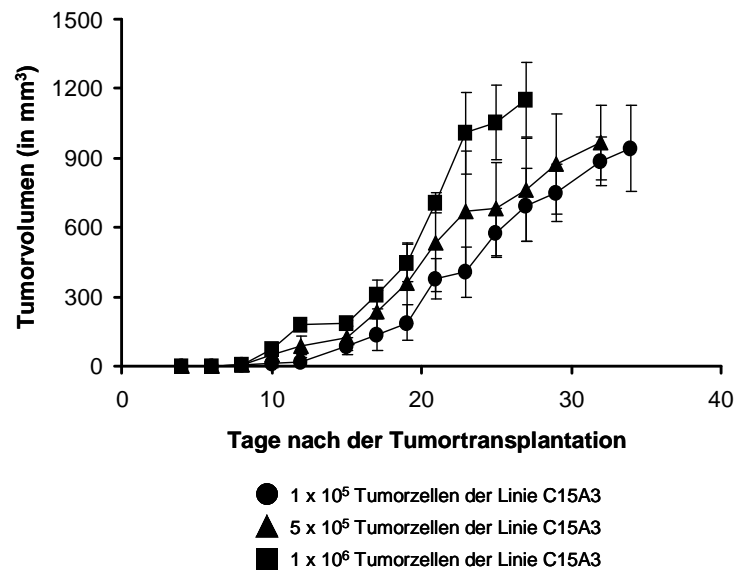
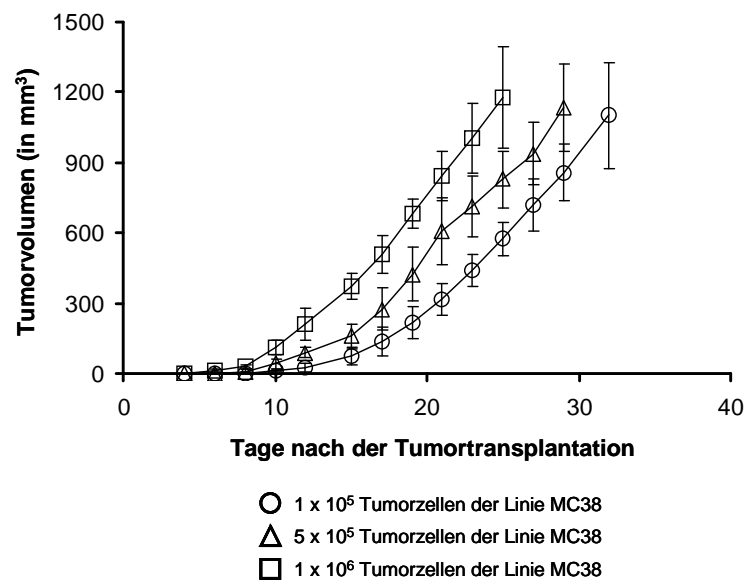
[A] Zellen der Linie C15A3 in Mäusen des Stammes C57-Black/6**[B] Zellen der Linie MC38 in Mäusen des Stammes C57-Black/6**

Abbildung 48: Wachstumskinetik der murinen Kolonkarzinomzelllinie C15A3 (CEA⁺) und MC-38 (CEA⁻) in n C57-Black/6 Versuchstieren. Jeweils 1 x 10⁵, 5 x 10⁵ oder 1 x 10⁶ Zellen der Linie C15A3 [A] oder MC-38 [B] wurden jeweils vier C57-Black/6 Tieren subkutan injiziert. Anschließend wurde über den Zeitraum von bis zu 34 Tagen das Tumorvolumen gemessen.

3.5.1 Eliminierung der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen in vivo durch murine T-Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren.

In ersten Teil des nachfolgenden Experiments wollten wir der Frage nachgehen, ob

murine CD8⁺ T-Lymphozyten mit CEA spezifischen Immunrezeptor *in vivo* Antigen spezifisch ko-injizierte CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 in immunkompetenten C57-Black/6 Versuchsmäusen eliminieren.

3.5.1.1 *In vivo* Immunreaktion gegen CEA⁺ Tumorzellen bei Ko-Injektion mit CEA spezifischen T-Zellen.

Zellen der murinen Kolonkarzinomzelllinie C15A3 und murine CD8⁺ T-Lymphozyten, ausgestattet durch retroviralen Gentransfer mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907), wurden jeweils sechs C57-Black/6 Mäusen subkutan ko-injiziert. Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA⁺) und nicht-transduzierte murine CD8⁺ T-Zellen wurden weiteren sechs Versuchstieren als Kontrolle ko-injiziert.

In den darauffolgenden Tagen wurde das Tumolvolumen der Versuchstiere in den drei Gruppen gemessen (Abb. 49 [B]). Das tumorfreie Überleben der Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit zeigt der Kaplan-Meier Plot (Abb. 49 [C]).

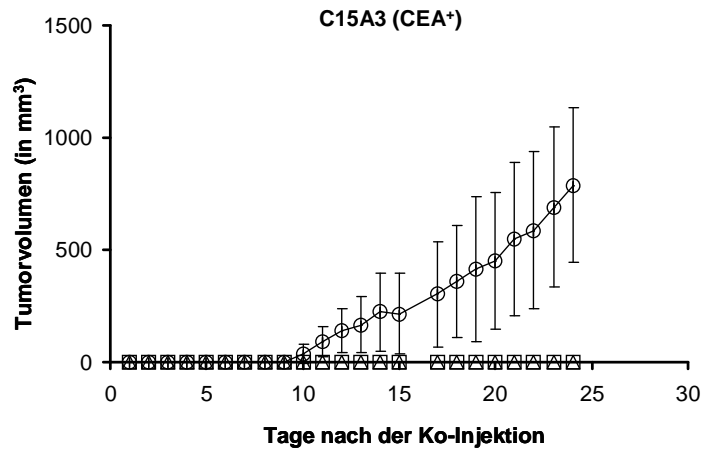
Wir erhielten folgende Ergebnisse:

- (1.) In allen C57-Black/6 Versuchsmäusen (6/6) der Gruppe 1, die als Kontrolle dient, entwickelten sich nach subkutaner Ko-Injektion mit Zellen der Kolonkarzinomzelllinie C15A3 (CEA⁺) und nicht-transduzierten CD8⁺ T-Lymphozyten Tumore.
- (2.) Nach subkutaner Ko-Injektion mit Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺) und CD8⁺ T-Lymphozyten, retroviral ausgestattet mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren #895 oder #907, entwickelten sich in keinem der Tiere aus der Gruppe 2 (0/6) und aus der Gruppe 3 (0/6) in einem Beobachtungszeitraum von 25 Tagen Tumore.

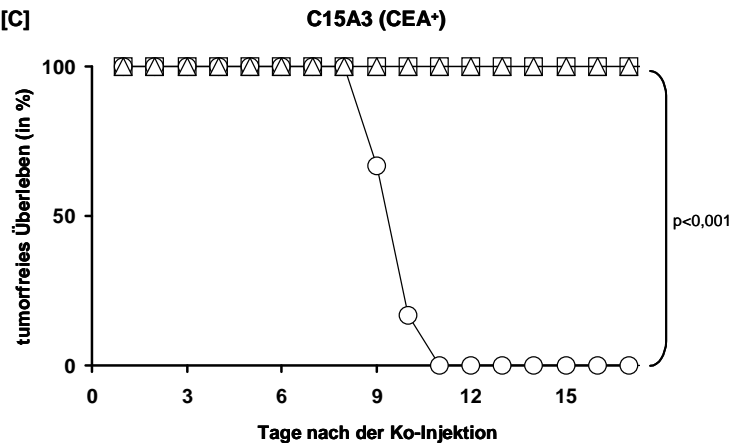
[A]

Gruppe	Anzahl (Mäuse ♂)	T-Lymphozyten (CD8+)	Anzahl der T-Lymphozyten	Tumorlinie	Anzahl der Tumorzellen	Ko-Injektionsart, (-ort)
1	6	nicht transduziert	5×10^5	C15A3	5×10^5	subkutan, (rechts lateral)
2	6	# 895	5×10^5	C15A3	5×10^5	subkutan, (rechts lateral)
3	6	# 907	5×10^5	C15A3	5×10^5	subkutan, (rechts lateral)

[B]



[C]



- Gruppe 1: 5×10^5 Tumorzellen der Linie C15A3 + 5×10^5 T-Lymphozyten (n.t.)
- △ Gruppe 2: 5×10^5 Tumorzellen der Linie C15A3 + 5×10^5 T-Lymphozyten (# 895)
- Gruppe 3: 5×10^5 Tumorzellen der Linie C15A3 + 5×10^5 T-Lymphozyten (# 907)

Abbildung 49: Wachstum der CEA⁺ Tumore in C57-Black/6 Mäusen nach Ko-Injektion der CEA⁺ Tumorzellen mit CEA spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Es wurden je drei Gruppen mit jeweils sechs C57-Black/6 Mäusen gebildet. [A] Je 6 Tiere wurden mit je 5×10^5 C15A3 (CEA⁺) Tumorzellen und mit jeweils 5×10^5 nicht-transduzierten CD8⁺ T-Zellen (Gruppe 1), mit jeweils 5×10^5 Rezeptor tragenden CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD3 ζ Immunrezeptor #895 (Gruppe 2) oder mit jeweils 5×10^5 Rezeptor tragenden CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD28-CD3 ζ Immunrezeptor #907 (Gruppe 3) ko-injiziert, [B] das Tumorzellen innerhalb von 24 Tagen gemessen und anschließend aus den Daten des Tumorzellenwachstums [C] das tumorfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zeit nach Kaplan-Meier bestimmt.

3.5.1.2 *In vivo* Immunreaktion gegen Zellen der Kolonkarzinomzelllinie C15A3 bei wiederholter Injektion der Tumorzellen.

Im zweiten Experimentteil haben wir uns damit beschäftigt, ob bei einer erneuten Injektion der CEA⁺ Tumorzellen ein „immunologisches Gedächtnis“ generiert wird, das das Tumorwachstum ganz oder nur teilweise verhindert.

Um diese Frage zu beantworten, wurden CEA⁺ Tumorzellen den Versuchstieren appliziert, die vor 16 Tagen mit CEA⁺ Tumorzellen und CEA spezifischen T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor #895 (Gruppe 2) oder mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor #907 (Gruppe 3) ko-injiziert wurden und keine Tumore 17 Tage nach der Behandlung entwickelt haben. Versuchstiere der Gruppe 1 wurden aufgrund der Tumorgröße nicht als Kontrolle wiederverwendet. Als Kontrolle wurden Versuchstieren der neuen Gruppe 4, die bisher unbehandelt blieben, CEA⁺ Tumorzellen C15A3 appliziert (Abb. 50 [A] und [B]). Nach erfolgter Applikation der CEA⁺ Tumorzellen in Mäuse der Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 4 wurde das Tumolvolumen über den Zeitraum von 5 Wochen gemessen (Abb. 50 [C]) und das tumorfreie Überleben der Versuchstiere nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (Abb. 50 [D]).

Aus der Untersuchung erhielten folgendes Ergebnis:

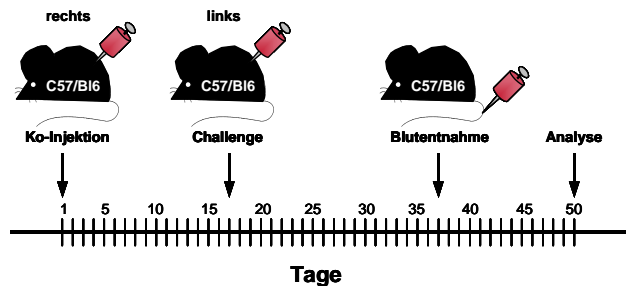
- (1.) Alle tumorfrei gebliebenen Tiere der Gruppe 2, die bei der ersten Behandlung mit Zellen der Linie C15A3 und T-Lymphozyten, ausgestattet mit dem CD3 ζ Immunrezeptor #895, ko-injiziert wurden, haben auch nach wiederholter subkutaner Injektion der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen keine Tumore entwickelt (0/6). Die Hälfte der Tiere der Gruppe 2, die in der ersten Behandlung mit Zellen der Linie C15A3 und T-Lymphozyten, ausgestattet mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor #907, ko-injiziert wurden, haben nach wiederholter subkutaner Injektion mit Zellen der Linie C15A3 einen Tumor entwickelt (3/6). Hingegen führte bei allen Versuchstieren der Gruppe 4 als Kontrolle die subkutane Injektion der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen zur Tumorentstehung (6/6). Offensichtlich werden CEA⁺ Tumorzellen bei wiederholter Gabe in allen Versuchstieren der Gruppe 1 und der Hälfte der Versuchstiere der Gruppe 2 eliminiert, die zuvor mit CEA⁺ Tumorzellen und mit T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren (#895 und #907) ko-injiziert wurden. Ob dieses

Ergebnis auf die injizierten und persistierenden CEA spezifischen T-Zellen, die humorale oder zelluläre Antwort des Wirts zurückzuführen ist, wollen wir in den nächsten Kapiteln untersuchen.

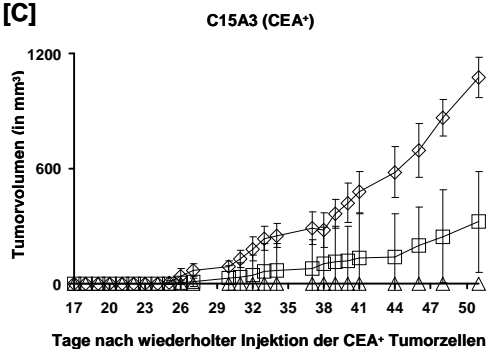
[A]

Gruppe	Erste Behandlung am Tag -17 mit:	Zweite Behandlung am Tag 0 mit:			
		Anzahl (Mäuse)	Tumorlinie	Anzahl der Tumorzellen	Ko-Injektionsart, (-ort)
1	5 x 10 ⁵ Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA ⁺) und 5 x 10 ⁵ T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD3 ζ Rezeptor # 895	6	C15A3	5x10 ⁵	subkutan, (links lateral)
2	5 x 10 ⁵ Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA ⁺) und 5 x 10 ⁵ T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD28-CD3 ζ Rezeptor # 907	6	C15A3	5x10 ⁵	subkutan, (links lateral)
4	keine	6	C15A3	5x10 ⁵	subkutan, (links lateral)

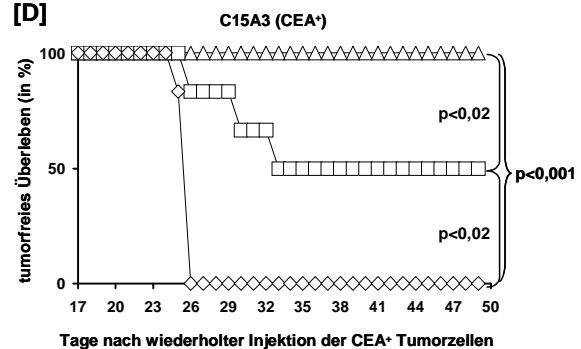
[B]



[C]



[D]



- ▲ Gruppe 1: Ko-Injektion der C15A3 Tumorzellen mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD3 ζ Rezeptor (# 895) am Tag 0 und Injektion der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen am Tag 17
- Gruppe 2: Ko-Injektion der C15A3 Tumorzellen mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD28-CD3 ζ Rezeptor (# 907) am Tag 0 und Injektion der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen am Tag 17
- ◆ Gruppe 4: Injektion der C15A3 Tumorzellen am Tag 17

Abbildung 50: Wachstum CEA-positiver Tumore in vorbehandelten C57-Black/6 Mäusen nach wiederholter Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen. Im Vorversuch wurden drei Gruppen mit jeweils 6 Tieren gebildet, wobei Mäuse der Gruppe 1 mit je 5 x 10⁵ Tumorzellen der Linie C15A3 und nicht-transduzierten murinen T-Zellen, Mäuse der Gruppe 2 mit je 5 x 10⁵ Zellen der Linie C15A3 und Rezeptor tragenden T-Lymphozyten mit dem CD3 ζ Rezeptor #895 und Mäuse der Gruppe 3 mit jeweils 5 x 10⁵ Zellen der Linie C15A3 und Rezeptor tragende T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Rezeptor #907 subkutan, rechts lateral ko-injiziert wurden. Anschließend wurde das Tumorzellwachstum bestimmt. [A] Nach 17 Tagen erfolgte die wiederholte Applikation der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen. Hierfür wurden den Versuchstieren aus der Gruppe 2 und Gruppe 3 Zellen der Linie C15A3 subkutan links lateral injiziert. Als Kontrolle wurde die Gruppe 1 aufgrund der Tumorzellgröße aufgelöst und durch unbehandelte

Versuchstiere aus derselben Lieferung ersetzt (Gruppe 4), die ebenfalls mit je 5×10^5 Zellen der Linie C15A3 subkutan links lateral injiziert wurden. **[B]** Die Pfeile markieren die Behandlungstage, wobei die Ko-Injektion am Tag 1, die erste Blutentnahme am Tag 14, die wiederholte Applikation CEA⁺ Tumorzellen („Challenge“) am Tag 17 und die zweite Blutentnahme für die Gewinnung der Blutseren am Tag 37 durchgeführt wurde. Das Tumolvolumen wurde regelmäßig gemessen **[C]** und aus den gewonnenen Daten das tumorfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt **[D]**.

3.5.2 Generierung der humoralen Immunantwort gegen Zellen mit CEA Expression durch Vakzinierung mit CEA⁺ Tumorzellen.

Durch die Entnahme von Blutseren, im ersten Teil (nach Ko-Injektion von T-Zellen mit Tumorzellen) und im zweiten Teil des vorherigen Versuchs (nach der wiederholten Gabe der CEA⁺ Tumorzellen) konnten wir uns ein genaueres Bild über die humorale Immunantwort machen. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Nachweis der CEA spezifischer Antikörper in den Blutseren der Versuchstiere.

Den Versuchstieren der Gruppe 1 bis Gruppe 4 (Kap.: 3.5.2) wurde am Tag 14 und am Tag 37 Blut aus der Schwanzarterie entnommen (Abb. 50 **[B]**). Aus dem Vollblut wurde das Blutserum vom Blutplasma mit Hilfe der Zentrifuge getrennt. Der Nachweis der anti-CEA Antikörper aus dem Blutserum der Versuchstiere wurde mittels ELISA durchgeführt.

Folgendes Ergebnis erhielten wir aus den Serumproben am Tag 14 des Versuchs (Abb. 51 **[A]**, **[B]** und **[C]**):

- (1.) In den Blutseren der Versuchstiere der Gruppe 2, die 14 Tage nach der Ko-Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen und CEA spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor #895 keine Tumore entwickelten, wurden keine CEA spezifischen Antikörper gefunden. Im Blutserum der Versuchstiere der Gruppe 3, die zwei Wochen nach der Ko-Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen und CEA spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor #907 keine Tumore entwickelten, wurden ebenfalls keine CEA spezifischen Antikörper detektiert. Hingegen wurden in den Blutseren aller Kontrolltiere aus der Gruppe 1 (6/6), die zwei Wochen nach der Ko-Injektion der CEA⁺ Tumorzellen mit nicht-transduzierten T-Zellen Tumore entwickelten, CEA spezifischen

Antikörper mittels ELISA detektiert. Offensichtlich ist das Vorliegen eines CEA⁺ soliden Tumors die Voraussetzung für die Produktion CEA spezifischer Antikörper. Dennoch reicht allein die humorale Antwort gegen das CEA nicht aus, um CEA⁺ Tumore zu eliminieren.

Wir erhielten weiterhin folgendes Ergebnis aus den Serumproben, die wir am Tag 37 des Versuchs entnommen haben (Abb. 52 [A], [B] und [C]):

- (1.) In den Blutseren aller Versuchstiere der Gruppe 2, die nach erneuter Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen keine Tumore entwickelten, wurden auch 14 Tage nach der erneuten Applikation CEA-positiver Tumorzellen keine CEA spezifischen Antikörper detektiert. In den Blutseren der Versuchstiere aus der Gruppe 3, die nach der erneuten Injektion mit Zellen der Linie C15A3 (CEA⁺) Tumore entwickelten (3/6), wurden Antikörper gegen das CEA mittels ELISA detektiert. In den Blutseren der Versuchstiere derselben Gruppe, die nach wiederholter Injektion mit C15A3 Tumorzellen keine Tumore entwickelten, wurden keine CEA spezifischen Antikörper detektiert.
- (2.) Als Kontrolle führte die Injektion der CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 in allen Versuchstieren der Gruppe 4 (6/6) zur Bildung eines soliden Tumors und zur Generierung muriner Antikörper gegen CEA. Dies zeigt, dass die Generierung CEA spezifischer Antikörper von der Bildung eines soliden CEA⁺ Tumors abhängig ist. Offensichtlich hängt die humorale Antwort der Versuchstiere allein von dem Vorhandensein eines soliden CEA⁺ Tumors in dem Versuchstier ab.

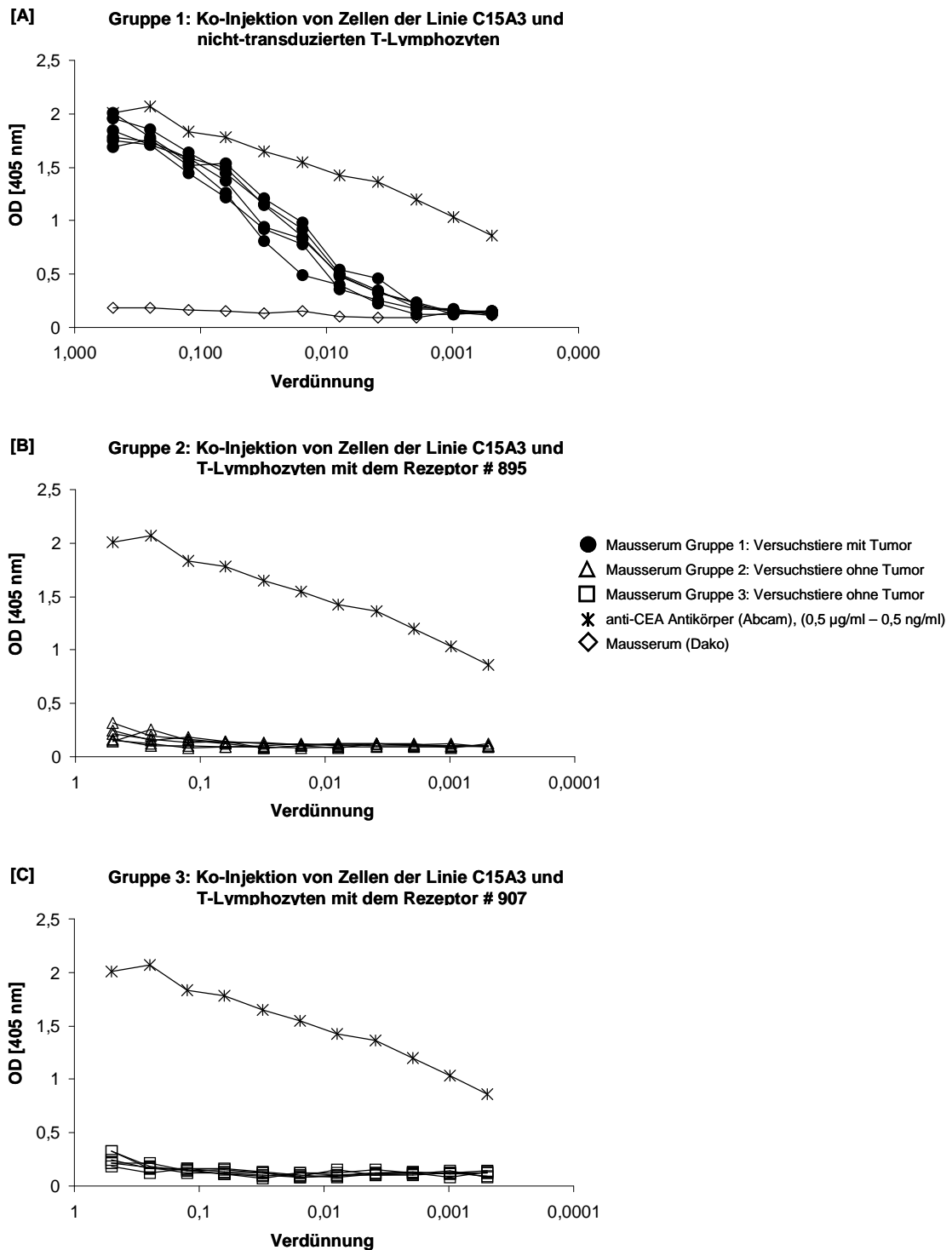


Abbildung 51: Nachweis CEA spezifischer Antikörper im Blutserum der Versuchstiere. Der Nachweis CEA spezifischer Antikörper im Blutserum 14 Tage nach der Ko-Injektion der CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 mit murinen [A] nicht-transduzierten T-Zellen, mit [B] T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor #895 oder mit [C] T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor #907 erfolgte mittels ELISA. Hierfür wurden die Vertiefung der Mikrotiterplatten mit CEA (2,5 µg/ml) beschichtet. Die Blutseren wurden 1:200 vorverdünnt und in einer Verdünnungsreihe auf die beschichteten Platten gegeben und inkubiert. Kommerziell erworbenes Mauserum (Dako) (1:200) und der anti-CEA Antikörper (Abcam) (0,5 µg/ml bis 0,5 ng/ml) wurden als Kontrollen verwendet.

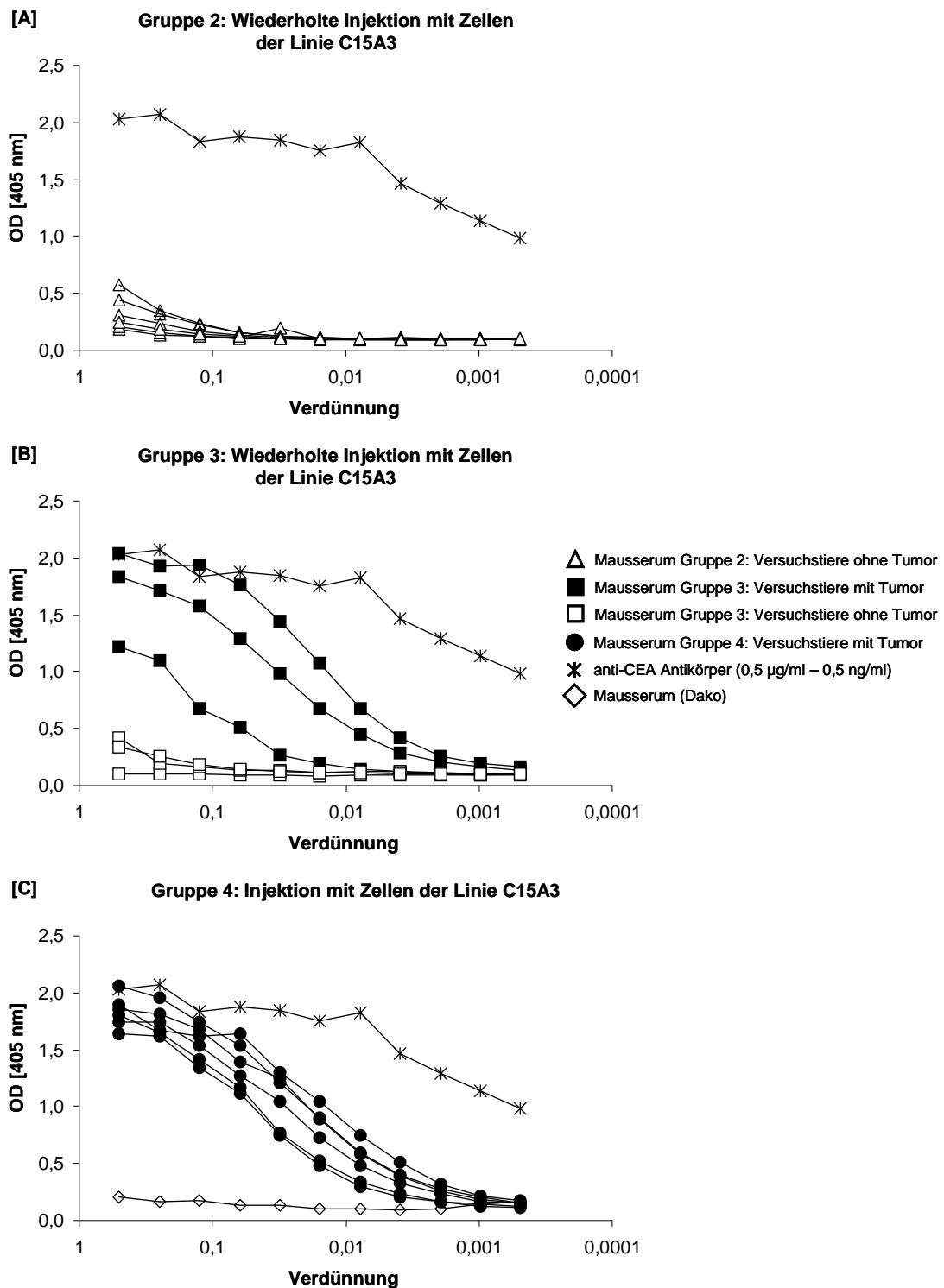


Abbildung 52: Nachweis CEA spezifischer Antikörper im Blutserum der Versuchstiere nach wiederholter Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen. Der Nachweis CEA spezifischer Antikörper im Blutserum 20 Tage nach wiederholter Injektion („Challenge“) mit CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 im Blutserum der Versuchstiere aus der Gruppe 2 [A] , Gruppe3 [B] und Gruppe 4 [C] erfolgte mittels ELISA.

3.5.3 Generierung eines immunologischen Gedächtnisses gegen CEA⁺ Tumorzellen nach Vakzinierung mit CEA spezifischen T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen.

In dem Kapitel 3.5.2 haben wir gezeigt, dass murine CD8⁺ T-Zellen mit rekombinanten CEA spezifischen Immunrezeptoren bei Ko-Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen die Entstehung solider Tumore verhindern. Es ist bisher unbeantwortet geblieben, ob diese Hemmung der Tumorbildung spezifisch für CEA ist und durch die zuvor applizierten T-Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren (#895) oder durch das Immunsystem der C57-Black/6 Maus ausgelöst wird. Um diese Frage zu beantworten, haben wir C57-Black/6 Mäuse mit bestrahlten, teilungsunfähigen CEA⁺ Tumorzellen mit CEA spezifischen murinen CD8⁺ T-Lymphozyten ko-injiziert und nach zwei Wochen entweder mit CEA⁺ C15A3 Tumorzellen oder als Kontrolle mit CEA⁻ MC-38 Tumorzellen injiziert.

Hierfür haben wir vier Gruppen mit je 24 Tieren gebildet, wobei jedem Versuchstier bestrahlte Tumorzellen (20 Gray) der Linie C15A3 mit CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD3 ζ Immunrezeptor #895 (Gruppe 1), mit CD8⁺ T-Zellen mit dem CD30 spezifischen CD3 ζ Rezeptor #892 als Kontrolle (Gruppe 2) oder mit nicht-transduzierten CD8⁺ T-Zellen als weitere Kontrolle ko-injiziert wurden (Abb. 53). Versuchstiere aus der Gruppe 4 wurden zur Kontrolle nur mit bestrahlten C15A3 (CEA⁺) Tumorzellen injiziert. Nach 14 Tagen erfolgte der zweite Versuchsteil, wobei Mäuse aus den vier Hauptgruppen in jeweils zwei Untergruppen mit je zwölf Tieren aufgeteilt wurden. Versuchstiere der Untergruppen 1a, 2a, 3a und 4a wurden mit Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA⁺) und als Kontrolle Versuchstiere der Untergruppen 1b, 2b, 3b und 4b mit Tumorzellen der Linie MC-38 (CEA⁻) injiziert. In den folgenden Tagen wurde das Tumolvolumen gemessen (Abb. 54).

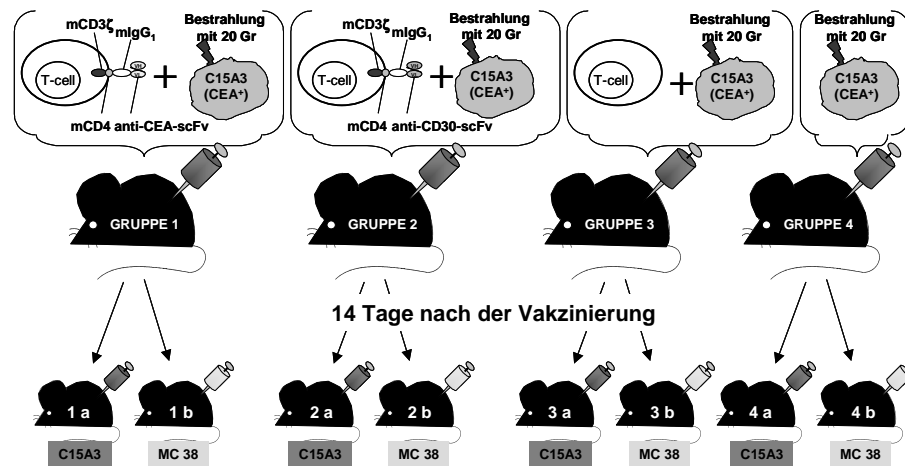


Abbildung 53: Schematische Darstellung des zweistufigen Versuchsaufbaus.

Wir haben folgendes Ergebnis bekommen (Abb. 54 [A] und [B]):

- (1.) Versuchstiere aus der Gruppe 1a, die 14 Tage nach der ersten Behandlung erneut mit Zellen der Kolonkarzinomzelllinie C15A3 (CEA⁺) injiziert wurden, haben 35 Tage danach Tumore mit dem kleinsten Volumen im Vergleich zu Tieren aus den Gruppen 2a, 3a und 4a entwickelt. Offensichtlich haben Versuchstiere, die zuvor mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden, einen Überlebensvorteil gegenüber Versuchstieren aus der Gruppe 2a, 3a und 4a, die 35 Tage nach der wiederholten Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen größere Tumore im Vergleich zu Gruppe 1a gebildet haben. Das durchschnittliche Tumolvolumen der Versuchstiere aus der Gruppe 2a, 3a und 4a ist zwischen 10- bis 100-fach größer als bei Versuchstieren aus der Gruppe 1.
- (2.) Versuchstiere aus der Gruppe 1b, 2b, 3b und 4b, die als Kontrolle im zweiten Versuchsteil mit CEA⁻ Tumorzellen der Linie MC38 (CEA⁻) injiziert wurden, entwickelten 35 Tage nach der Behandlung durchschnittlich gleich große Tumore. Versuchstiere der Gruppe 1b, die im ersten Versuchsteil mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 ko-injiziert wurden, haben keinen Überlebensvorteil gegenüber Versuchstieren aus der Kontrollgruppe 2b, 3b und 4b, wenn im zweiten Versuchsteil CEA⁻ Tumorzellen anstatt von CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert werden.

Anhand der Wachstumskurven der Tumore errechneten wir die Wahrscheinlichkeit für das tumorfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zeit für die Versuchstiere aus den Gruppen 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a und 4b (Abb. 54 [C] und [D]):

- (1.) Rund 90 % der Versuchstiere aus der Gruppe 1a, die mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen vakziniert und 14 Tage später mit C15A3 Tumorzellen injiziert wurden, blieben in darauffolgenden 35 Tagen tumorfrei. Dagegen blieben nur 60 bis 70 % der Versuchstiere, die als Kontrolle mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und mit T-Zellen mit dem CD30 spezifischen Immunrezeptor #892 (Gruppe 2) oder mit nicht-transduzierten T-Zellen (Gruppe 3) ko-injiziert und 14 Tage später mit C15A3 Tumorzellen injiziert wurden, in den nächsten 35 Tagen tumorfrei. Rund 75 % der Versuchstiere aus der Gruppe 4a, die als eine weitere Kontrolle mit bestrahlten C15A3 (CEA⁺) Tumorzellen vakziniert und zwei Wochen später mit C15A3 Tumorzellen injiziert wurden, blieben ebenfalls in den folgenden 35 Tagen tumorfrei. Offensichtlich ist das tumorfreie Überleben der Versuchstiere aus der Gruppe 1a am höchsten (ca. 90 %), die zuvor mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden, da durchschnittlich etwa 65 % der Versuchstiere aus den Kontrollgruppen 2a, 3a und 4a nach erfolgter Vakzinierung mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und erneuter Injektion mit C15A3 Tumorzellen im untersuchten Zeitraum tumorfrei blieben.
- (2.) Die (Ko)-Injektion bestrahlter C15A3 (CEA⁺, CD30⁻) Tumorzellen (Gruppe 4b) mit T-Zellen mit dem anti-CEA Immunrezeptor #895 (Gruppe 1b), mit T-Zellen mit dem anti-CD30 Immunrezeptor #892 (Gruppe 2b) oder mit nicht-transduzierten T-Zellen (Gruppe 3b) als Kontrolle führte dazu, dass weniger als 50 % der Versuchstiere (Gruppe 1b, 2b, 3b und 4b) 35 Tage nach der Injektion mit CEA⁻ MC-38 Zellen tumorfrei blieb. Offensichtlich haben Versuchstiere aus der Gruppe 1b, die wie Versuchstiere aus der Gruppe 1a im ersten Versuchsteil mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 ko-injiziert wurden, keine erhöhte Wahrscheinlichkeit auf tumorfreies Überleben bei anschließender Applikation CEA⁻ Tumorzellen im Vergleich zu Versuchstieren aus den Gruppen 2b, 3b und 4b.

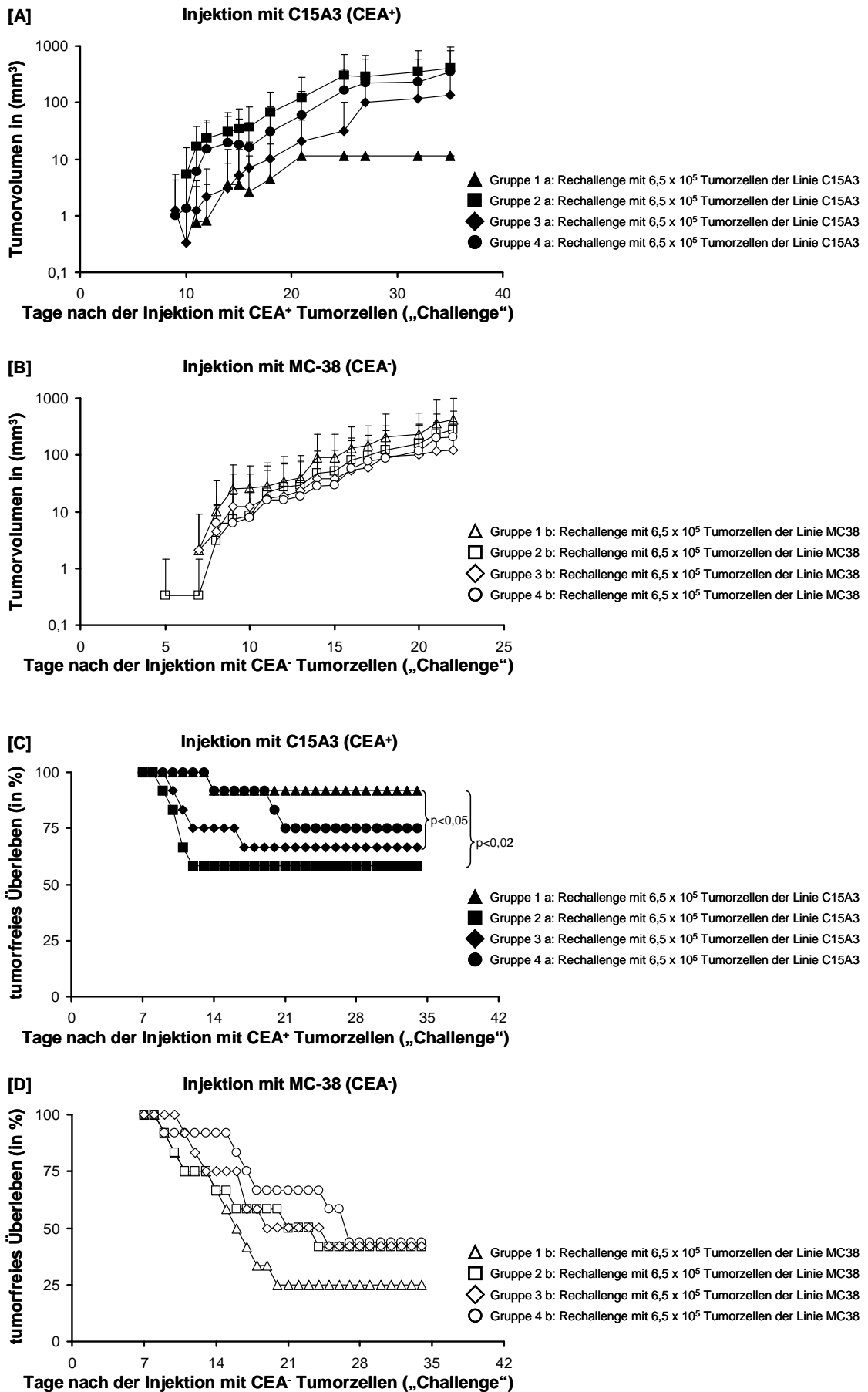


Abbildung 54: Tumorwachstum und tumorfreies Überleben der Versuchstiere bei wiederholter

Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen. Im ersten Versuchsteil wurden jeweils 24 Tiere mit je 5×10^5 bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 (Gruppe 4) und jeweils 5×10^5 CD8⁺ T-Zellen mit dem rekombinanten CEA spezifischen CD3 ζ Immunrezeptor #895 (Gruppe 1), mit T-Zellen mit dem CD30 spezifischen CD3 ζ Immunrezeptor #892 (Gruppe 2), oder mit nicht-transduzierten T-Zellen (Gruppe 3) als Kontrolle (ko)-injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Gruppen geteilt und jeweils 12 Versuchstiere wurden mit jeweils $6,5 \times 10^5$ CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 (Gruppe 1a, 2a, 3a und 4a) und die anderen 12 Versuchstiere mit jeweils $6,5 \times 10^5$ CEA⁻ Tumorzellen der Linie MC-38 (Gruppe 1b, 2b, 3b und 4b) subkutan injiziert und das Wachstum der Tumore gemessen [A] und [B]. Anhand der Daten aus der Messung der Tumore wurde die Wahrscheinlichkeit auf das tumorfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zeit errechnet und als Kaplan-Meier Plot dargestellt [C] und [D].

3.5.4 Generierung eines immunologischen Gedächtnisses gegen CEA⁺ Tumorzellen nach Vakzinierung mit CEA spezifischen T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen in C57-Bl/6 Mäusen ohne endogene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Im Kapitel 3.5.4 haben wir gezeigt, dass Versuchstiere nach Ko-Injektion mit murinen CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen am effektivsten vor Tumorbildung geschützt werden, wenn sie erneut mit CEA⁺ Tumorzellen injiziert werden („Challenge“). Es ist bisher unbeantwortet geblieben, ob dieser Effekt allein auf die injizierten murinen CD8⁺ T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptoren zurückzuführen ist oder ob endogene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen daran beteiligt sind. Um diese Fragestellung in C57-Black/6 Versuchstieren ohne CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu beantworten, wurden Versuchstiere mit depletierenden anti-Maus CD4 Antikörper (YTS191.1 und YTA3.1) und anti-Maus CD8 Antikörper (YTS169.4) behandelt. Die Depletion endogener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut der Versuchstiere wurde mit dem FITC konjugierten anti-Maus-CD4 Antikörper und dem FITC-markierten anti-Maus-CD8 Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurde aus der Schwanzarterie das Blut entnommen, die Erythrozyten mittels Lysispuffer lysiert und die verbliebenen Blutzellen mittels der genannten Antikörpern durchflußzytometrisch untersucht.

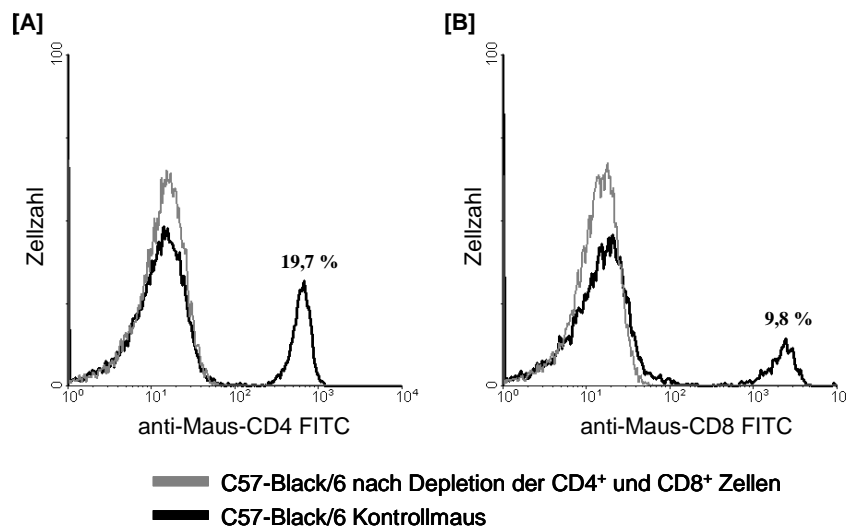


Abbildung 55: Depletion endogener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in C57-Black/6 Mäusen. C57-Black/6 Versuchsmäuse wurden am Tag -10 und Tag -7 mit den monoklonalen anti-Maus CD4 Antikörpern YTS191.1 und YTA3.1 (jeweils 250 µg/Maus) und mit dem monoklonalen anti-Maus-CD8 Antikörper YTS169.4 (je 500 µg/Maus) intraperitoneal injiziert. Am Tag -1 wurde aus der Schwanzarterie der behandelten und als Kontrolle der nicht-behandelten Versuchstiere das periphere Blut entnommen, die Erythrozyten mittels Lysispuffer lysiert und die verbliebenen Blutzellen mit dem FITC-konjugierten anti-Maus-CD4 Antikörper oder dem FITC-markierten anti-Maus-CD8 Antikörper (jeweils 0,5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnten wir nachweisen, dass eine Woche nach der Depletion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit den monoklonalen anti-Maus CD4 Antikörpern YTS191.1 und YTA3.1 und dem monoklonalen anti-Maus CD8 Antikörper YTS169.4 der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzellzahl im peripheren Blut behandelter Versuchstiere unter 0,2 % liegt. Als Kontrolle verwendetes Blut un behandelter C57-Black/6 Versuchstiere enthält nach Erythrozyten-Lyse etwa 20 % CD4⁺ und ca. 10 % CD8⁺ T-Zellen. Somit generierten wir C57-Black/6 Versuchstiere, die temporär kaum endogene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut enthalten.

Im nachfolgenden Mausversuch wollten wir untersuchen, ob ein „immunologisches Gedächtnis“ bei temporär CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-defizienten C57-Black/6 Versuchstieren durch Ko-Injektion muriner CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischem Immunrezeptor #895 mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen generiert wird. Hierfür wurden zwei Gruppen mit je sechs Tieren gebildet, wobei jedem Versuchstier bestrahlte Tumorzellen (20 Gy) der Linie C15A3 mit unbestrahlten (Gruppe 1) oder als Kontrolle mit bestrahlten (Gruppe 2) murinen CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD3ζ

Rezeptor #895 ko-injiziert wurden. Als weitere Kontrollen wurden zwei Gruppen mit jeweils sechs Versuchstieren gebildet, die nicht mit depletierenden Antikörpern vorbehandelt und mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und T-Zellen (je 20 Gy) mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 (Gruppe 3) oder mit dem CD30 spezifischen Immunrezeptor #892 (Gruppe 3) ko-injiziert wurden. Nach zwei Wochen wurden Versuchstiere aus der Gruppe 1 bis Gruppe 4 erneut mit CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 injiziert („Challenge“) und in den darauffolgenden 50 Tagen das Wachstum der Tumore in den Versuchstieren gemessen. Aus den Daten wurde das tumorfreie Überleben errechnet und mittels Kaplan-Meier Plot dargestellt (Abb. 56 [B] und [C]).

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

- (1.) Alle Versuchstiere aus der Gruppe 1, die nach der Depletion endogener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden, entwickelten nach erneuter Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen („Challenge“) im Zeitraum von 50 Tagen keine Tumore (0/6). Hingegen entwickelten im beobachteten Zeitraum 33 % der Versuchstiere aus der Kontrollgruppe 2, die nach der Depletion endogener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit bestrahlten CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden, nach erneuter Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen („Challenge“) Tumore (2/6). Offensichtlich entwickeln Versuchstiere aus der Gruppe 1 ein „immunologisches Gedächtnis“, das erfolgreicher als Versuchstiere aus der Gruppe 2 vor CEA⁺ Tumorzellen schützt, obwohl die endogenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu Versuchsbeginn depletiert wurden. Hingegen weisen Versuchstiere aus der Gruppe 2, die nach der Depletion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit bestrahlten CEA spezifischen T-Zellen (#895) und bestrahlten Tumorzellen ko-injiziert wurden, nach der erneuten Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen eine geringere Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zu Versuchstieren aus der Gruppe 1 auf.
- (2.) Weitere Kontrollen zeigen, dass Versuchstiere, die mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und bestrahlten T-Zellen mit dem CD30 spezifischen Immunrezeptor #892 (Gruppe 3) oder mit bestrahlten T-Zellen mit dem CEA

spezifischen Immunrezeptor #895 (Gruppe 4) ko-injiziert und anschließend mit CEA⁺ Tumorzellen injiziert wurden („Challenge“), eine geringere Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben im Vergleich zu Versuchstieren aus der Gruppe 1 haben. Die Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben in Abhängigkeit von der Zeit bei Versuchstieren aus der Gruppe 3 und Gruppe 4 entspricht dem der Versuchstiere aus der Gruppe 2, obwohl bei Gruppe 2 zu Versuchsbeginn die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden. Offensichtlich beruht die erhöhte Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben der Versuchstiere aus der Gruppe 1 gegenüber Versuchstieren aus der Gruppe 2, Gruppe 3 und Gruppe 4 auf den injizierten murinen CD8⁺ T-Zellen mit dem rekombinanten Immunrezeptor #895.

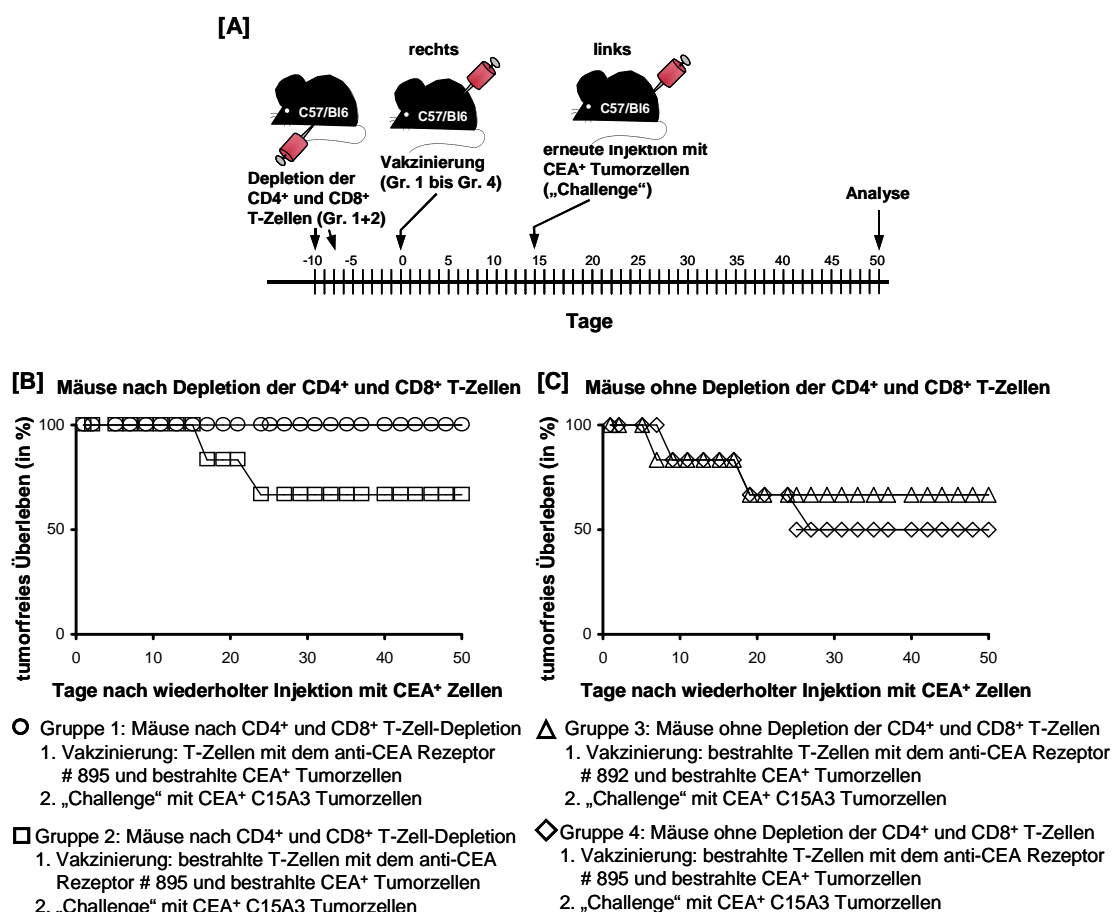


Abbildung 56: Generierung eines immunologischen Gedächtnisses gegen CEA⁺ Tumorzellen nach Vakzinierung mit CEA spezifischen T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen in C57-Bl/6 Mäusen. Es wurden vier Gruppen mit jeweils sechs C57-Black/6 Versuchstieren gebildet. [A] Nach der Depletion endogener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden Versuchstiere am Tag 0 mit jeweils 5 x 10⁵ bestrahlten (20 Gy) CEA⁺ C15A3 Tumorzellen und unbestrahlten CD8⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor # 895 (Gruppe 1) oder als Kontrolle mit bestrahlten CD8⁺ T-Zellen mit dem Immunrezeptor # 895 (Gruppe 2) ko-injiziert. Als weitere Kontrollen wurden Versuchstiere der Gruppe 3 mit

jeweils 5×10^5 bestrahlten C15A3 Tumorzellen und bestrahlten T-Zellen mit dem CD30 spezifischen Immunrezeptor #892 und Versuchstiere der Gruppe 4 mit je 5×10^5 bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und bestrahlten T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 ko-injiziert. Anschließend wurden 14 Tage nach der Vakzinierung Versuchstiere der Gruppe 1, Gruppe 2, Gruppe 3 und Gruppe 4 mit je 5×10^5 CEA⁺ C15A3 Tumorzellen injiziert und [B], [C] das tumorfreie Überleben in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Als tumorfrei wurden Versuchstiere mit einem Tumorzellen $\leq 30 \text{ mm}^3$ gewertet.

3.5.5 Immunogenität der rekombinanten Immunrezeptoren.

Bisher konnten wir zeigen, dass die humorale Immunantwort nach Vakzinierung der C57-Black/6 Versuchstiere mit CEA⁺ Tumorzellen aktiviert wird (Kap. 3.5.3). Es wurden CEA spezifische Antikörper im Blutserum der Versuchstiere mit soliden Tumoren detektiert. In diesem Kapitel wollen wir der Frage nachgehen, ob die rekombinanten Immunrezeptoren selbst als Fremd-Antigene durch das Immunsystem der immunkompetenten C57-Black/6 Maus erkannt werden. Getestet wurden rekombinante anti-CEA Rezeptoren, die ausschließlich humane (#439), gemischt human-murine (#895) oder ausschließlich murine Domänen (#977) enthalten (Abb. 57).

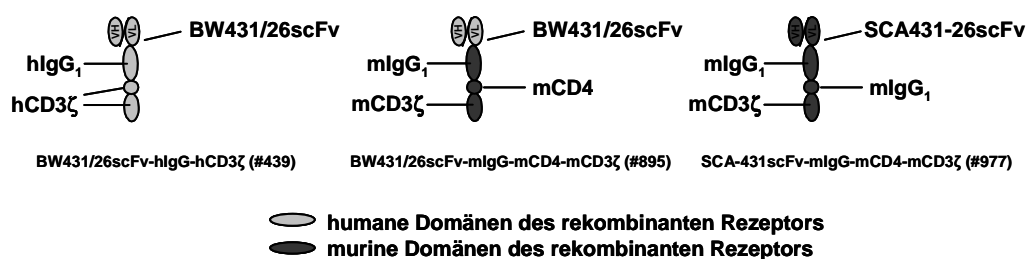


Abbildung 57: Aufbau der CEA spezifischen rekombinanten T-Zell Rezeptoren. Der rekombinante Immunrezeptor #439 besteht ausschließlich aus humanen Domänen. Der Rezeptor #895 enthält bis auf die Bindedomäne nur murine Domänen. Der rekombinante T-Zell-Immunrezeptor #977 enthält ausschließlich murine Domänen.

Murine CD3⁺ T-Lymphozyten wurden durch retroviralen Gentransfer mit den CEA spezifischen CD3 ζ Immunrezeptoren #439, #895 und # 77 ausgestattet. Anschließend wurden vier Gruppen mit C57-Black/6 Versuchstieren gebildet, die mit nicht-transduzierten murinen T-Lymphozyten (Gruppe 1), mit T-Zellen mit dem humanen Immunrezeptor #439 (Gruppe 2), mit T-Zellen mit dem gemischt human-murinen Immunrezeptor #895 oder mit T-Zellen mit dem ausschließlich murinen Immunrezeptor #977 intraperitoneal injiziert wurden (jeweils 5×10^5 T-Zellen/Maus).

Vier Wochen nach der Vakzinierung mit T-Zellen mit den rekombinanten anti-CEA Immunrezeptoren #439, #895 und #977 und nicht-transduzierten T-Zellen als Kontrolle erfolgte der zweite Versuchsteil, wobei Tieren aus den Versuchsgruppe 1 bis 4 jeweils 5×10^5 CEA⁺ Tumorzellen mit T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren injiziert wurden. Während des Experiments wurde den Versuchstieren an zuvor festgelegten Zeitpunkten Blut aus der Schwanzarterie entnommen, um daraus Blutserum zu gewinnen. Der zeitliche Ablauf des Versuchs ist in der Abbildung 58 zusammengefasst.

I Vakzinierung (intraperitoneale Injektion)	Gruppe 1: nicht-transduzierte CD3 ⁺ T-Zellen (30 Tiere)	Gruppe 2: T-Zellen mit dem Rezeptor # 439 (12 Tiere)	Gruppe 3: T-Zellen mit dem Rezeptor # 439 (12 Tiere)	Gruppe 4: T-Zellen mit dem Rezeptor # 439 (6 Tiere)	je 5×10^5 T-Zellen
nach 4 Wochen: Bildung von Untergruppen (je 6 Tiere/Untergruppe)					
II "Rechallenge"- Versuch, (subkutane Injektion, rechts lateral)	1a C15A3 + T-Zellen (# 439)	2a C15A3 + T-Zellen (# 439)	3a C15A3 + T-Zellen (# 895)	4a C15A3 + T-Zellen (# 977)	je 5×10^5 T-Zellen und 5×10^5 Tumorzellen
	1b C15A3 + T-Zellen (# 895)	2b C15A3 + T-Zellen (# 977)	3b C15A3 + T-Zellen (# 977)		
	1c C15A3 + T-Zellen (# 977)				
	1d C15A3 + T-Zellen (n.t.)				
	1e C15A3				

n.t.= nicht transduziert

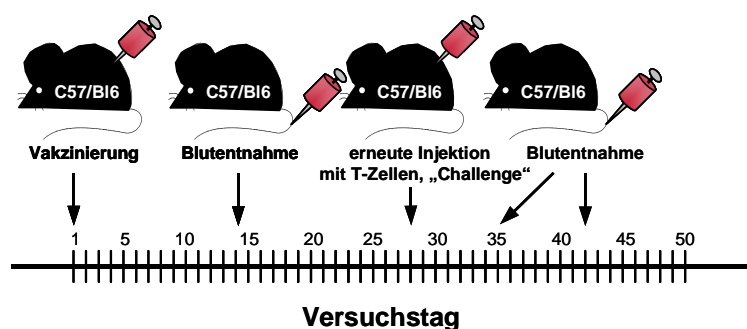


Abbildung 58: Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf der Untersuchung der Immunogenität rekombinanter anti-CEA Immunrezeptoren in C57-Black/6 Versuchstieren.

In den gewonnen Blutseren haben wir zunächst nach Antikörpern gegen die humane IgG₁-„spacer“-Domäne des Immunrezeptors #439 gesucht. Als Kontrolle wurden Blutseren der Versuchstiere verwendet, die mit nicht-transduzierten T-Zellen injiziert wurden. Nachfolgend untersuchten wir, ob Versuchstiere Antikörper gegen die humanisierte BW431/26scFv Bindedomäne der Rezeptoren #439 und #895 generieren, wenn sie erneut mit T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren #439 und #895 injiziert werden. Als Kontrolle wurden Blutseren der Versuchstiere verwendet, die mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen oder mit T-Zellen mit dem Immunrezeptor #977 mit der murinen anti-CEA Bindedomäne SCA-431scFv injiziert wurden.

Den Nachweis der Antikörper gegen die humane IgG₁-„spacer“ Domäne des Rezeptors #439 haben wir mittels ELISA durchgeführt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit humanem IgG Protein beschichtet. Blutseren, deren murine IgG Konzentration zuvor mittels ELISA bestimmt wurde, wurden in einer Verdünnungsreihe auf den beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert und zur Detektion der gebunden

murinen IgG Proteine der Biotin-konjugierte anti-Maus IgG Antikörper zugegeben.

- (1.) In den Blutseren der Versuchstiere aus der Gruppe 2a wurden 14 Tage nach der Vakzinierung mit murinen CD3⁺ T-Zellen, retroviral ausgestattet mit dem humanen Immunrezeptor #439, keine Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“-Domäne detektiert. In den Blutseren der Kontrolltiere aus der Gruppe 1, die mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen vakziniert wurden, wurden ebenfalls keine Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne detektiert. Offensichtlich gibt es zwei Wochen nach der Vakzinierung mit Rezeptor-tragenden T-Zellen keinen Hinweis darauf, dass die humane IgG Domäne des Immunrezeptors #439 in der C57-Bl./6 Maus spezifische Antikörper induziert.
- (2.) In den Blutseren der Versuchstiere aus der Gruppe 1a wurden 31 bzw. 38 Tage nach der Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 7 bzw. 14 Tage nach der Ko-Injektion mit T-Zellen mit dem humanen Immunrezeptor #439 und Tumorzellen der Linie C15A3 keine Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne detektiert. In den Blutseren der Versuchstiere aus der Kontrollgruppe 1d wurden ebenfalls 31 bzw. 38 Tage nach der Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen und 7 bzw. 14 Tage nach der erneuten Injektion mit nicht-transduzierten T-Zellen und Zellen der Linie C15A3 keine Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne detektiert. Hingegen wurde in den Blutseren der Versuchstiere aus der Gruppe 2a, die 31 bzw. 38 Tage nach der Injektion mit CD3⁺ T-Zellen mit dem humanen Immunrezeptor #439 und 7 bzw. 14 Tage nach der erneuten Injektion („Challenge“) mit CD3⁺ T-Zellen mit dem Rezeptor #439 und Zellen der Linie C15A3 Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne nachgewiesen. Offensichtlich führt die zweimalige Applikation der T-Zellen mit dem humanem Immunrezeptor #439 in der C57-Bl./6 Maus zur Generierung der human IgG spezifischen Antikörpern.
- (3.) In den Blutseren der Versuchstiere aus der Gruppe 2b wurden 31 bzw. 38 Tage nach der Injektion mit CD3⁺ T-Zellen mit dem humanen Immunrezeptor #439 und 7 bzw. 14 Tage nach der Injektion („Challenge“) mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem murinen Rezeptor #977 und Zellen der Linie C15A3 Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne nachgewiesen. Offenbar ist 31 bzw. 38 Tage nach der Vakzinierung mit T-Zellen mit dem humanem Immunrezeptor #439 und 7 bzw. 14 Tage nach Injektion mit T-Zellen mit dem murinen Immunrezeptor #977 mit der murinen IgG Domäne die humorale Antwort gegen

die humane IgG Domäne bei Versuchstieren nachweisbar.

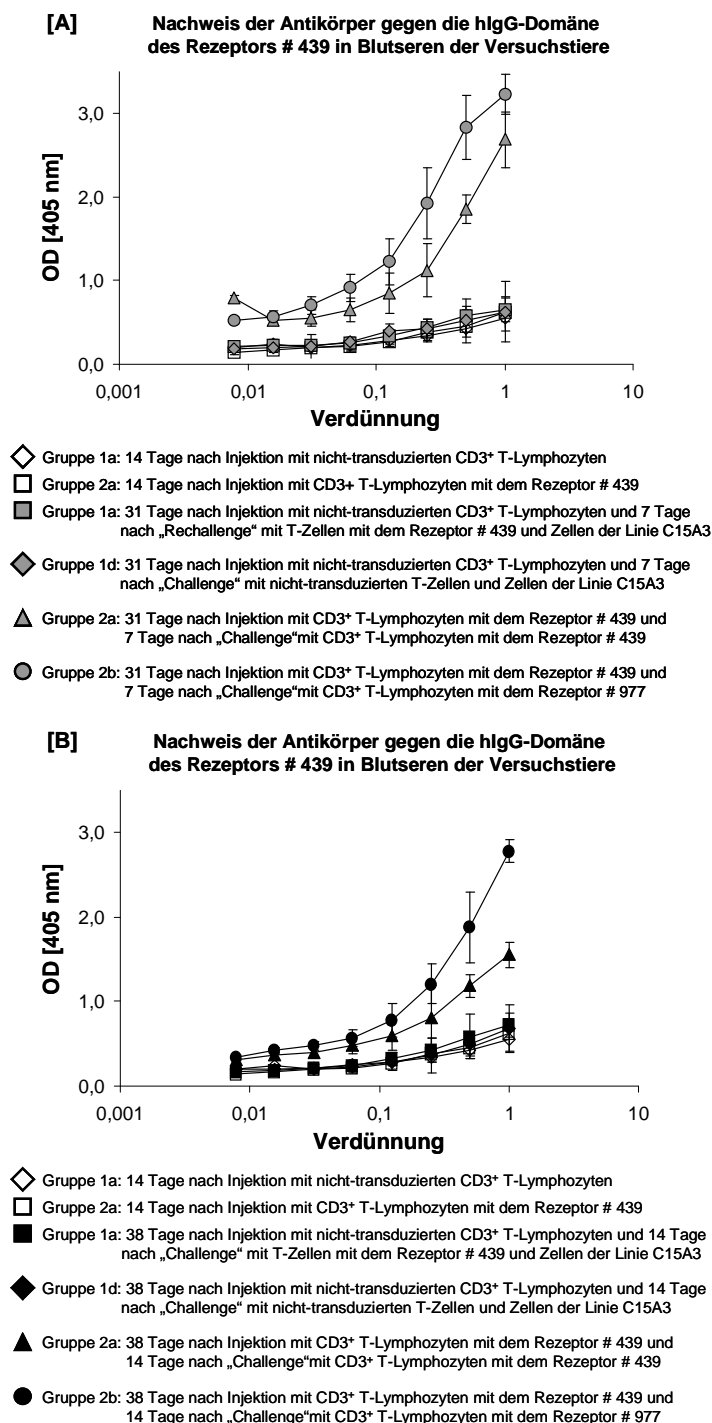


Abbildung 59: Nachweis von Antikörpern gegen die humane IgG Domäne in den Blutseren von Versuchstieren. Je 5×10^5 nicht-transduzierte T-Zellen oder T-Zellen mit dem Immunrezeptor #439 wurden Versuchstieren intraperitoneal injiziert. Nach 24 Tagen erfolgte die erneute Injektion („Challenge“) mit je 5×10^5 Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA⁺) T-Zellen mit dem Immunrezeptor #439 und #977 oder als Kontrolle mit murinen nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen. Zur Bestimmung der Antikörper gegen die humane IgG Domäne wurde aus der Schwanzarterie der Versuchstiere 14 Tage nach der Vakzinierung und 7 [A] bzw. 14 Tage [B] nach dem erneuten Injektion mit Rezeptor tragenden T-Zellen mit CEA⁺ Tumorzellen („Challenge“) Blut entnommen. Aus dem Vollblut wurden Mausseren

gewonnen. Mikrotiterplatten wurden mit humanem IgG Protein (1µg/ml) beschichtet. Anschließend wurden Blutseren hinzugegeben und in einer Verdünnungsreihe (5 µg/ml bis 40 ng/ml) auf den beschichteten Mikrotiterplatten ausplattiert und inkubiert, wobei die murine IgG Konzentration in den Mausseren zuvor mittels ELISA bestimmt wurde. Die Bindung der murinen IgG Proteine wurde mit Hilfe des Biotin-konjugierten anti-Maus IgG Antikörpers (0,2 µg/ml) detektiert.

3.5.5.1 Nachweis der Antikörper gegen die humanisierte BW431scFv oder die murine SCA-431scFv Bindedomäne im Blutserum der Versuchstiere.

Der Nachweis von Antikörpern gegen die humanisierte anti-CEA Bindedomäne BW431/26scFv des Rezeptors #895 in den Blutseren der Versuchstiere erfolgte mittels ELISA mit Hilfe der Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443) und SCA431scFv-hIgG (#970), die die Bindedomänen der membranständigen CD3ζ Immunrezeptoren #895 und #977 enthalten. Zuvor wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit dem anti-human IgG Antikörper beschichtet. Auf die beschichteten Mikrotiterplatten wurde der Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443) oder SCA-431scFv-hIgG (#970) zugegeben und mittels der immobilisierten anti-human IgG Antikörper gebunden. Anschließend wurden Mausseren der Versuchstiere in einer Verdünnungsreihe auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Als Kontrolle wurde der anti-idiotypische Antikörper BW648/31-mIgG, der an die BW431/26scFv und SCA-431scFv Bindedomäne bindet, verwendet. Entwickelt wurde der ELISA mit dem Biotin-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper.

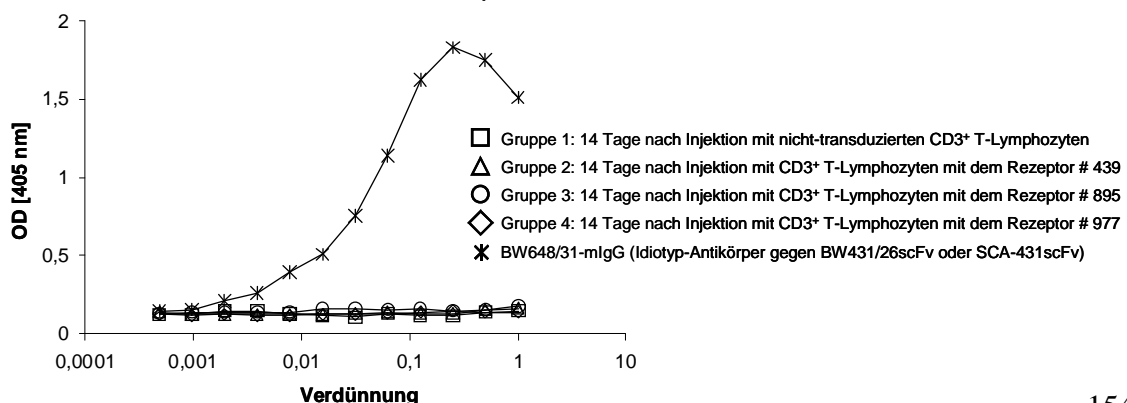
- (1.) In den Blutseren der Versuchstiere wurden 14 Tage nach der Vakzinierung mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen (Gruppe 1a), mit CD3⁺ T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 mit der humanisierten BW431/26scFv Domäne (Gruppe 3a) und mit CD3⁺ T-Zellen mit dem Immunrezeptor #977 mit der murinen SCA431scFv Bindedomäne (Gruppe 4a) keine Antikörper gegen die humanisierte BW431/26scFv Bindedomäne detektiert. Als Kontrolle wurde die Bindung des BW648/31-mIgG Idiotyp-Antikörpers an die immobilisierte BW431/26-scFv Domäne (#443) nachgewiesen. Offensichtlich generieren die Versuchstiere zwei Wochen nach der Vakzinierung mit T-Zellen mit dem humanem Immunrezeptor #895 keine Antikörper gegen die humanisierte BW431/26 Bindedomäne des Rezeptors.

Weiterhin wurden 31 bzw. 38 Tage nach der Vakzinierung mit nicht-

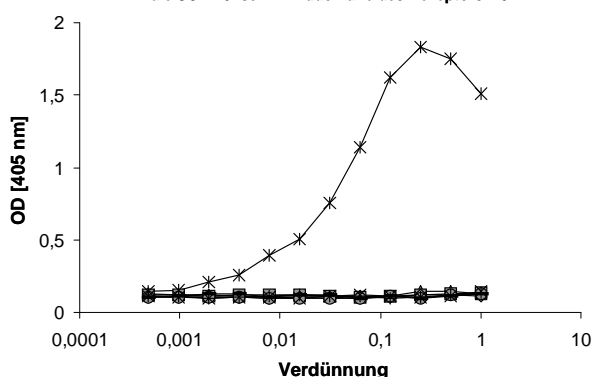
transduzierten CD3⁺ T-Zellen und 7 bzw. 14 Tage nach der Ko-Injektion mit Zellen der Linie C15A3 und mit T-Zellen mit dem human-murinen Immunrezeptor #895 (Gruppe 1b), und mit nicht-transduzierten T-Zellen als Kontrolle (Gruppe 1d) keine Antikörper gegen die BW431/26scFv Bindedomäne des Immunrezeptors #439 detektiert. In den Blutseren der Versuchstiere wurden 31 bzw. 38 Tage nach der Vakzinierung mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen und 7 bzw. 14 Tage nach der Ko-Injektion mit Zellen der Linie C15A3 mit T-Zellen mit dem Immunrezeptor #977 (Gruppe 1c) keine Antikörper gegen die murine SCA-431scFv Bindedomäne detektiert. Offensichtlich führt die einmalige Injektion der T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 mit der humanisierten anti-CEA Bindedomäne BW431/26scFv, unter gegebenen Versuchsbedingungen, zu keiner Generierung der Antikörper gegen die BW431/26scFv Domäne des Immunrezeptors.

(2.) Ferner haben wir in den Blutseren der Versuchstiere 31 bzw. 38 Tage nach der Vakzinierung mit CD3⁺ T-Zellen mit dem human-murinen Immunrezeptor #895 und 7 bzw. 14 Tage nach der Ko-Injektion mit Zellen der Linie C15A3 und mit T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 (Gruppe 3a) und mit T-Zellen mit dem murinen Immunrezeptor #977 (Gruppe 3b) keine Antikörper gegen die BW431/26scFv Bindedomäne des Immunrezeptors #895 und die SCA-431scFv Bindedomäne des Immunrezeptors #977 detektiert. Offensichtlich führte auch die erneute Injektion mit T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 mit einer humanisierten anti-CEA Bindedomäne, unter gegebenen Versuchsbedingungen, zu keiner Generierung der Antikörper gegen die BW431/26scFv Domäne des rekombinanten Immunrezeptors #895. Offenbar ist die murine Bindedomäne SCA-431scFv und die humanisierte Bindedomäne BW431/26scFv unter gegebenen Versuchsbedingungen nicht in immunkompetenten C57-Black/6 Mäusen immunogen.

[A] Antikörper gegen die BW431/26scFv Bindedomäne des Rezeptors # 895 und die SCA-431scFv Bindedomäne des Rezeptors # 977

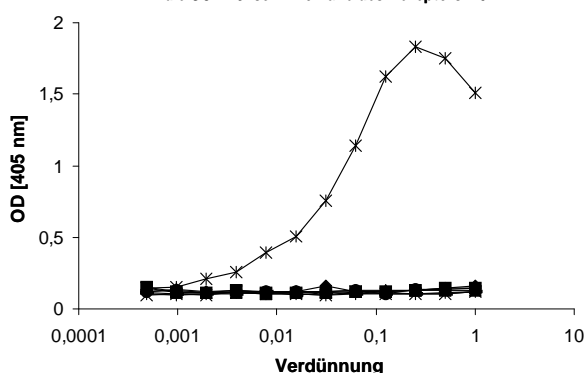


[B] Antikörper gegen die BW431/26scFv Bindedomäne des Rezeptors # 895 und die SCA-431scFv Bindedomäne des Rezeptors # 977



- ▲ Gruppe 1b: 31 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 7 Tage nach „Challenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 895 und Zellen der Linie C15A3
- Gruppe 1c: 31 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 7 Tage nach „Challenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 977 und Zellen der Linie C15A3
- ◆ Gruppe 1d: 31 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 7 Tage nach „Challenge“ mit nicht-transduzierten T-Zellen und Zellen der Linie C15A3
- Gruppe 1e: 31 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 7 Tage nach „Challenge“ mit nicht-transduzierten T-Zellen und Zellen der Linie C15A3
- × Gruppe 3a: 31 Tage nach Injektion mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem Rezeptor # 895 und 7 Tage nach „Challenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 895 und Zellen der Linie C15A3
- Gruppe 3b: 31 Tage nach Injektion mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem Rezeptor # 895 und 7 Tage nach „Challenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 977 und Zellen der Linie C15A3
- + Gruppe 4a: 31 Tage nach Injektion mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem Rezeptor # 977 und 7 Tage nach „Challenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 977 und Zellen der Linie C15A3
- ✱ BW648/31-mIgG (Idiotyp-Antikörper gegen BW431/26scFv oder SCA-431scFv)

[C] Antikörper gegen die BW431/26scFv Bindedomäne des Rezeptors # 895 und die SCA-431scFv-Domäne des Rezeptors # 977



- ▲ Gruppe 1b: 38 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 895 und Zellen der Linie C15A3
- Gruppe 1c: 38 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 977 und Zellen der Linie C15A3
- ◆ Gruppe 1d: 38 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit nicht-transduzierten T-Zellen und Zellen der Linie C15A3
- Gruppe 1e: 38 Tage nach Injektion mit nicht-transduzierten CD3⁺ T-Lymphozyten und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit nicht-transduzierten T-Zellen und Zellen der Linie C15A3
- × Gruppe 3a: 38 Tage nach Injektion mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem Rezeptor # 895 und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 895 und Zellen der Linie C15A3
- Gruppe 3b: 38 Tage nach Injektion mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem Rezeptor # 895 und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 977 und Zellen der Linie C15A3
- + Gruppe 4a: 38 Tage nach Injektion mit CD3⁺ T-Lymphozyten mit dem Rezeptor # 977 und 14 Tage nach „Rechallenge“ mit T-Zellen mit dem Rezeptor # 977 und Zellen der Linie C15A3
- ✱ BW648/31-mIgG (Idiotyp-Antikörper gegen BW431/26scFv oder SCA-431scFv)

Abbildung 60: Nachweis der Antikörper gegen die humanisierte BW431/26scFv und die murine SCA-431scFv Bindedomäne in den Blutseren der Versuchstiere. Nicht-transduzierte T-Zellen oder T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 oder #977 (je 5×10^5 Rezeptor Tragende T-Zellen/Maus) wurden Mäuse intraperitoneal injiziert. Nach 24 Tagen wurden Versuchstiere erneut mit je 5×10^5 Tumorzellen

der Linie C15A3 und nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen oder T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 oder #977 ko-injiziert („Challenge“). Aus der Schwanzarterie der Versuchstiere wurde [A] 7 Tage nach der Vakzinierung und [B] 7 Tage und [C] 14 Tage nach dem „Challenge“ Blut entnommen, um aus dem Vollblut Mausseren zu gewinnen. Mikrotiterplatten wurden mit dem anti-human IgG Antikörper (1 µg/ml) beschichtet und auf die vorbeschichteten Mikrotiterplatten der Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443) (1µg/ml) oder SCA-431scFv-hIgG (#970) (1µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden Mausseren der Versuchstiere aus der Gruppe 1b, 1c, 1d, 3a, 3b oder 4a in einer Verdünnungsreihe (5 µg/ml bis 2,5 ng/ml) auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Als Kontrolle wurde der anti-idiotypische Antikörper BW648/31-mIgG (1 µg/ml), der an die BW431/26scFv und SCA-431scFv Domäne bindet, verwendet. Entwickelt wurde der ELISA mit dem Biotin-konjugierten anti-MausIgG Antikörper (0,2 µg/ml).

3.6 Generierung und funktionelle Charakterisierung rekombinanter Antikörper gegen das humane ErbB2.

Die Spezifität des rekombinanten Immunrezeptors für ein Zielprotein wird durch die Bindedomäne definiert. Zahlreiche Zielproteine auf der Oberfläche von Tumorzellen werden proteolytisch gespalten und als lösliche Proteine freigesetzt, so dass die erhöhte Konzentration des freigesetzten Proteins im Blut als Tumormarker detektiert werden kann. Wir wollen der Frage nachgehen, ob die Bindung löslicher, antigen-spezifischer Proteine an Zielantigen⁺ Zellen durch das lösliche Zielantigen beeinträchtigt wird. Dazu wurden zunächst Expressionsvektoren für extrazellulären Domänen mit CEA und ErbB2 Spezifität generiert, in 293T Zellen exprimiert und die produzierten Antikörper mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht.

3.6.1 Generierung rekombinanter Proteine mit unterschiedlicher Affinität für ErbB2.

Die DNA für die anti-ErbB2scFv Bindedomänen wurden aus den retroviralen Expressionsvektoren #710, #744, #746, #748 und #750 durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* herausgeschnitten. Das Plasmid pRSV-BW431/26scFv-hIgG (#443) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Enzymen *BamHI* und *XbaI* geschnitten, wobei die DNA für die anti-CEA Bindedomäne BW431/26scFv deletiert wurde. Die linearisierte Plasmid DNA #443 wurde für die weitere Klonierungsarbeit verwendet. Anschließend wurden die DNA Fragmente für die anti-ErbB2scFv Bindedomänen #710, #744, #746, #748 und #750 mit der linearisierten

Plasmid DNA #443 ligiert, so dass die Plasmide pRSV-C6-B1D2-hIgG (#788), pRSV-C6ML3-9-hIgG (#789), pRSV-C6.5-hIgG (#790), pRSV-C6MH3-B1-hIgG (#791) und pRSV-C6.5G98A-hIgG (#792) resultierten, die zur Überprüfung der Klonierung durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* geschnitten wurden. Die Reaktion lieferte zwei DNA Fragmente der erwarteten Größe (Abb. 61). Das Vorhandensein der DNA für die anti-ErbB2 Domänen in den neu generierten Plasmiden pRSV-C6-B1D2-hIgG (#788), pRSV-C6ML3-9-hIgG (#789), pRSV-C6.5-hIgG (#790), pRSV-C6MH3-B1-hIgG (#791) und pRSV-C6.5G98A-hIgG (#792) wurde durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *XhoI* nachgewiesen, wobei im Gegensatz zum Plasmid #443 die Plasmide #788 bis #792 aufgrund einer einzigen *XhoI* Schnittstelle linearisiert wurden. Hingegen lieferte die Restriktion des Plasmids #443, aufgrund zweier *XhoI* Schnittstellen, zwei Fragmente der erwarteten Größe. Ferner wurde die DNA für die anti-ErbB2scFv Bindedomänen der Plasmide pRSV-C6-B1D2-hIgG (#788), pRSV-C6ML3-9-hIgG (#789), pRSV-C6.5-hIgG (#790), pRSV-C6MH3-B1-hIgG (#791) und pRSV-C6.5G98A-hIgG (#792) mit Hilfe der Oligonukleotide pRSVsense (# 75) und seq hFc-AS (# 76) sequenziert.

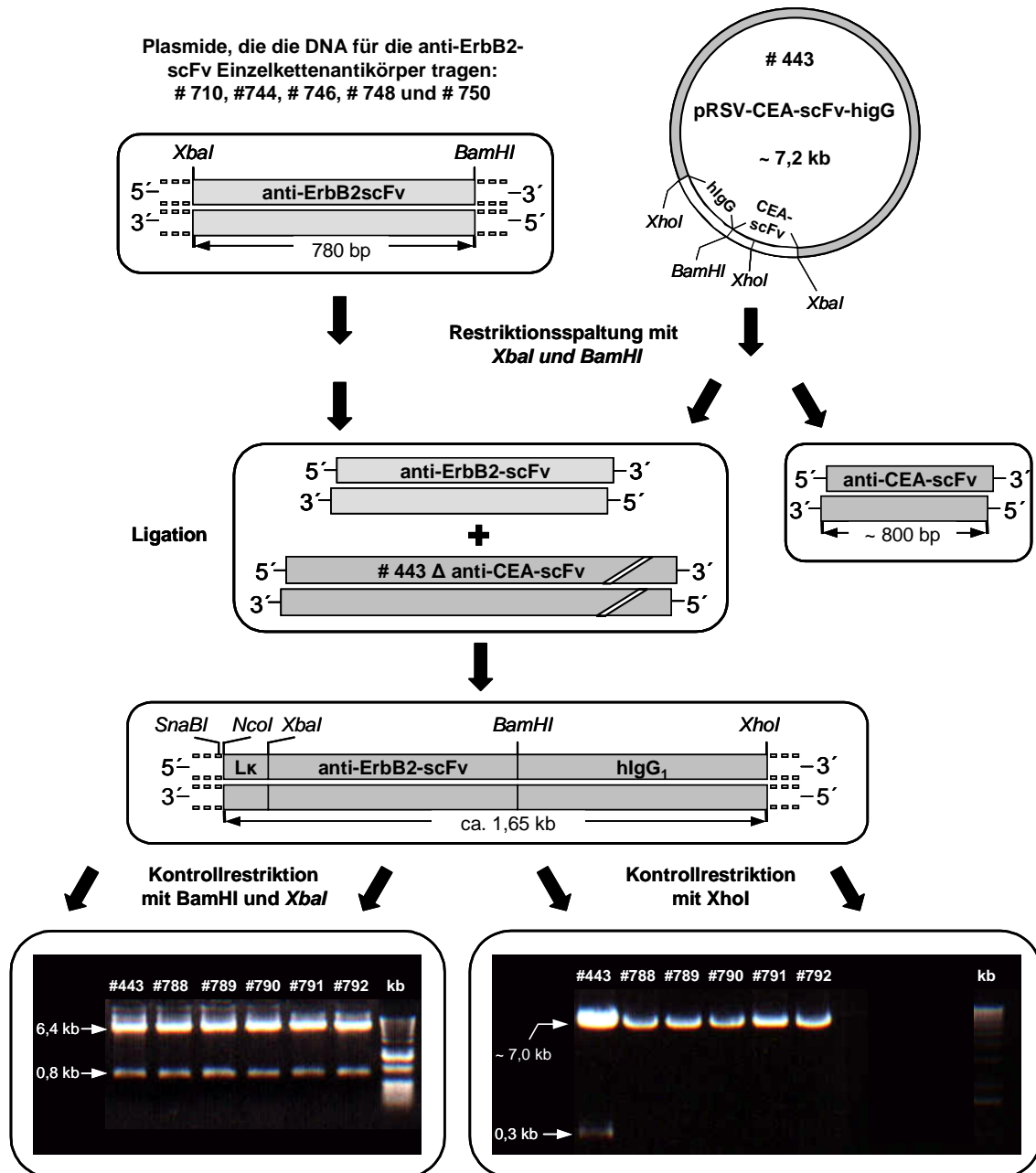


Abbildung 61: Klonierung der rekombinanten anti-ErbB2scFv-hIgG Proteine mit unterschiedlicher Affinität für ErbB2. Die DNA für die anti-ErbB2scFv Bindedomänen wurde aus den Plasmiden #710, #744, #746, #748 und #750 durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* geschnitten. Das Plasmid pRSV-CEAscFv-hIgG (#443) wurde ebenfalls durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* geschnitten, wobei die DNA für die anti-CEA Bindedomäne BW431/26scFv deletiert wurde. Mit Hilfe der T4-Ligase wurden die DNA Fragmente für die anti-ErbB2scFv Bindedomänen #710, #744, #746, #748 und #750 mit der linearisierten Plasmid DNA #443 ligiert, so dass die Expressionsvektoren pRSV-C6-B1D2-hIgG (#788), pRSV-C6ML3-9-hIgG (#789), pRSV-C6.5-hIgG (#790), pRSV-C6MH3-B1-hIgG (#791) und pRSV-C6.5G98A-hIgG (#792) resultierten, die zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* geschnitten wurden. Die Reaktion lieferte erwartungsgemäß ein 6,4 kb und ein 0,8 kb langes Fragment. Das Vorhandensein der ErbB2 spezifischen Bindedomänen in den

Rezeptoren #788 bis #792 wurde durch Restriktion mit dem Enzym *XhoI* nachgewiesen, wobei die neu generierten Plasmide #788 bis #792 aufgrund einer einzigen Schnittstelle für *XhoI* linearisiert wurden.

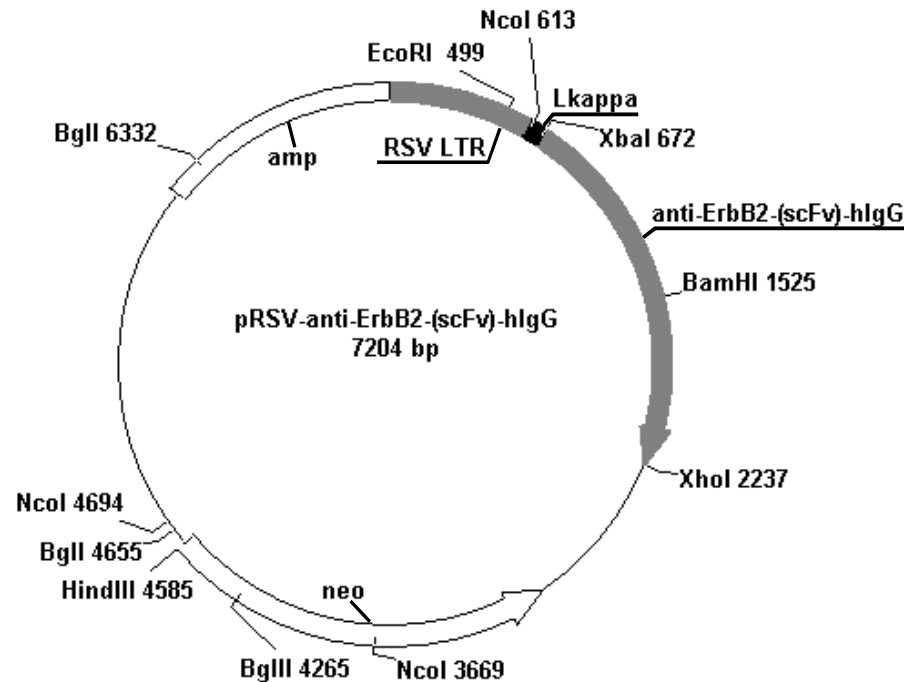


Abbildung 62: Plasmidkarte der neu generierten Expressionsvektoren pRSV-C6-B1D2(scFv)-hIgG (#788), pRSV-C6ML3-9scFv-hIgG (#789), pRSV-C6.5scFv-hIgG (#790), pRSV-C6MH3-B1scFv-hIgG (#791) und pRSV-C6.5G98AscFv-hIgG (#792).

3.6.2 Expression rekombinanter ErbB2 spezifischer Antikörper in 293T Zellen.

Tumorzellen der Linie 293T wurden mit der Plasmid DNA, kodierend für die Fusionsproteine pRSV-C6-B1D2-hIgG (#788), pRSV-C6ML3-9-hIgG (#789), pRSV-C6.5-hIgG (#790), pRSV-C6MH3-B1-hIgG (#791) und pRSV-C6.5G98A-hIgG (#792) transfiziert und 48h inkubiert. Die Expressionskassette sind mit der Ig kappa Sequenz ausgestattet, so dass die Antikörper von der transfizierten Zelle sezerniert werden. Anschließend wurden die Kulturüberstände gesammelt und die Konzentration der anti-ErbB2 Antikörper auf einheitliche 1 µg/ml human IgG durch Titerbestimmung mittels ELISA eingestellt (Abb. 63). Hierfür wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit dem monoklonalen anti-human IgG Antikörper beschichtet und die vorverdünnten Kulturüberständen mit den generierten rekombinanten anti-ErbB2-hIgG Proteinen (#788, #789, #790, #791 und #792) dazugegeben. Anschließend wurde der ELISA mit dem polyklonalen Biotin-konjugierten anti-human IgG Antikörper detektiert.

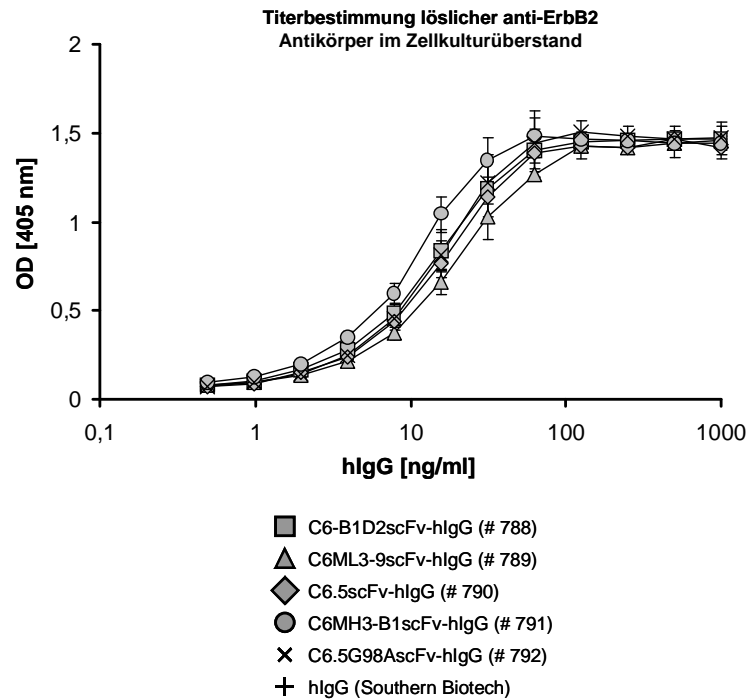


Abbildung 63: Titerbestimmung löslicher anti-ErbB2 Proteine im Zellkulturüberstand. Überstände wurden zuvor mittels ELISA auf 1 µg/ml human IgG eingestellt und auf Mikrotiterplatten pipettiert, die mit dem anti-human IgG Antikörper (1µg/ml) beschichtet wurden. Entwickelt wurde der ELISA mit dem Biotin-gekoppelten anti-human IgG Antikörper (0,25 µg/ml).

3.6.3 Bindung löslicher ErbB2 spezifischer Antikörper an ErbB2⁺ Zellen.

Die Bindung der anti-ErbB2 Antikörper C6-B1D2-hIgG (#788), C6ML3-9-hIgG (#789), C6.5-hIgG (#790), C6MH3-B1-hIgG (#791) oder C6.5G98A-hIgG (#792) an ErbB2⁺ Zellen der Linie Sk-Ov-3 wurde durchflußzytometrisch untersucht. Hierfür wurden Tumorzellen der Linie Sk-Ov-3 zusammen mit dem anti-ErbB2 Antikörper #788, #789, #790, #791 oder #792 in einer Verdünnungsreihe inkubiert. Als Kontrolle wurde ein humanes IgG Protein verwendet. Detektiert wurde die Bindung der ErbB2 spezifischen Proteine an Zellen mittels Durchflußzytometrie mit Hilfe des PE-konjugierten anti-human IgG Antikörpers (0,2 µg/ml). Anschließend wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bestimmt (Abb. 64).

- (1.) Die anti-ErbB2 Antikörper C6-B1D2-hIgG (#788), C6ML3-9-hIgG (#789), C6.5-hIgG (#790), C6MH3-B1-hIgG (#791) mit einer Affinität der Antigenbindenden Domäne für ErbB2 $k_D \leq 1,6 \times 10^{-8}$ M binden stärker an Zellen der

Linie Sk-Ov-3 als das Protein C6.5G98A-hIgG (# 792) mit der niedrigsten Affinität aller fünf Proteine für ErbB2 ($k_D = 1,0 \times 10^{-9}$ M).

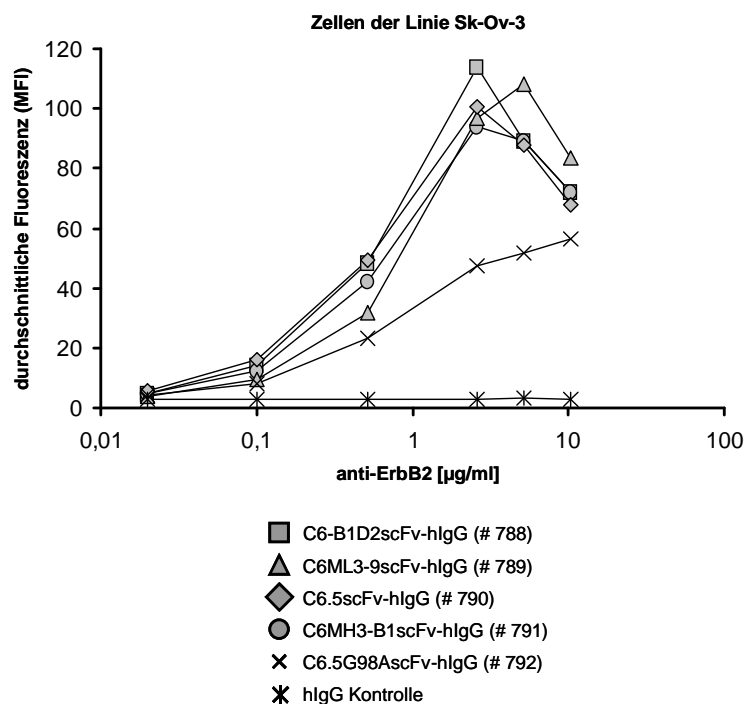


Abbildung 64: Bindung löslicher ErbB2 spezifischer Antikörper an ErbB2⁺ Zellen. Je $2,5 \times 10^5$ Tumorzellen der Linie Sk-Ov-3 (ErbB2⁺) wurden zusammen mit dem anti-ErbB2 Antikörper #788, #789, #790, #791 oder #792 in einer Verdünnungsreihe (10,4 µg/ml bis 0,2 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle gleichen Isotyps wurde das humane IgG Protein verwendet, und ebenfalls in einer Verdünnungsreihe (10,4 µg/ml bis 0,2 µg/ml) mit ErbB2⁺ Tumorzellen inkubiert. Die Bindung der ErbB2 spezifischen Antikörper an Zellen wurde mit Hilfe des PE-markierten anti-human IgG Antikörpers (0,2 µg/ml) detektiert. Die Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten wurde mittels Durchflußzytometrie durchgeführt.

3.6.4 Kompetitive Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an ErbB2⁺ Tumorzellen durch Zugabe des löslichen ErbB2.

Es wurde untersucht, ob durch die Zugabe des ErbB2-hIgG Proteins eine kompetitive Hemmung der Bindung der rekombinanten anti-ErbB2 Antikörper C6-B1D2-hIgG (#788), C6ML3-9-hIgG (#789), C6.5-hIgG (#790), C6MH3-B1-hIgG (#791) und C6.5G98A-hIgG (#792) an ErbB2⁺ Zellen induziert wird. Hierfür wurden Tumorzellen der Linie Sk-Ov-3 (ErbB2⁺) zusammen mit einer konstanter Konzentration des anti-ErbB2 Antikörper #788, #789, #790, #791 oder #792 in einer Verdünnungsreihe mit ErbB2-hIgG Protein inkubiert. Als Kontrolle wurden Sk-Ov-3 Tumorzellen zusammen

mit humanem IgG Protein (Southern Biotech) kompetitiert. Detektiert wurde die Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an Sk-Ov-3 Tumorzellen mit dem PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bestimmt und die kompetitive Hemmung der Bindung an ErbB2⁺ Tumorzellen errechnet (Abb. 65).

Die Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper C6-B1D2scFv-hIgG (#788), C6ML3-9scFv-hIgG (#789), C6.5scFv-hIgG (#790), C6MH3-B1scFv-hIgG (#791) und C6.5G98AscFv-hIgG (#792) an ErbB2⁺ Sk-Ov-3 wird durch die Zugabe des löslichen ErbB2-hIgG ab einer Konzentration von ca. 1 µg/ml kompetitiv gehemmt. Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an membranständiges ErbB2 eintritt, ist für alle ErbB2 spezifischen Antikörper gleich und beträgt etwa 2,8 µg/ml des Kompetitors. Offensichtlich hängt die kompetitive Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an membranständiges ErbB2 der Tumorzellen nicht von der unterschiedlichen Affinität der anti-ErbB2 Antikörper ab.

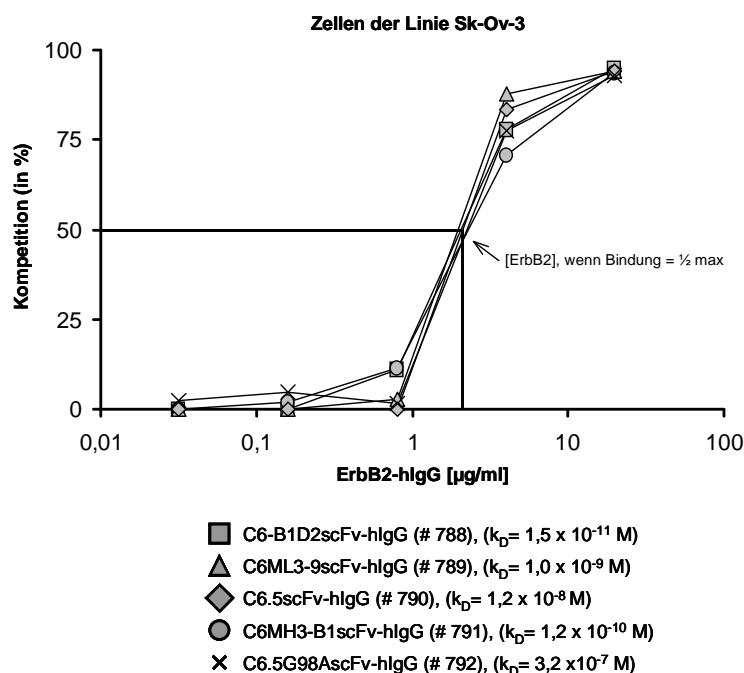


Abbildung 65: Die kompetitive Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an ErbB2⁺ Tumorzellen ist von der Konzentration des zugegebenen Kompetitorproteins abhängig. Je $2,5 \times 10^5$ Tumorzellen der Linie Sk-Ov-3 wurden zusammen mit einer konstanter Konzentration (4 µg/ml) am anti-ErbB2 Antikörper #788, #789, #790, # 791 oder #792 in einer Verdünnungsreihe mit ErbB2-hIgG Protein (20 µg/ml bis 0,03 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurden je $2,5 \times 10^5$ Sk-Ov-3 Tumorzellen zusammen mit humanem IgG Protein (20 µg/ml bis 0,03 µg/ml) inkubiert. Detektiert wurde die Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an Sk-Ov-3 Tumorzellen mit dem PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper

(0,2 µg/ml). Mittels der Durchflußzytometrie wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Die kompetitive Hemmung (in %) der ErbB2 spezifischen Antikörper wurde durch das Auftragen der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) aus dem Kontrollansatz (ohne Kompetitor) gegen die aus dem Kompetitionsansatz (in Gegenwart des Kompetitors) errechnet.

3.7 Bindung CEA spezifischer Antikörper an membranständiges CEA.

In diesem Kapitel wollen wir untersuchen, ob zwei Antikörper mit Spezifität für unterschiedliche Domänen des CEA durch die Zugabe des löslichen CEA in ihrer Bindung an membranständiges CEA der LS174T Tumorzellen kompetitiv gehemmt werden.

Hierfür wurden Tumorzellen der Linie 293T mit der Plasmid DNA für die löslichen CEA spezifischen Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443) und H10scFv-hIgG (#648) transfiziert. Nach 48h wurden die Kulturüberstände gesammelt, die Konzentration der CEA spezifischen Antikörper im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt und durch Verdünnung auf gleiche Konzentration eingestellt.

Die Bindung der CEA spezifischen Proteine BW431/26scFv-hIgG (#443) und H10scFv-hIgG (#648) an CEA⁺ LS174T Tumorzellen wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht. Hierfür wurden Tumorzellen der Linie LS174T zusammen mit dem anti-CEA Antikörper #443 oder #648 in einer Verdünnungsreihe inkubiert. Als Kontrolle wurden LS174T Zellen mit dem humanen IgG Protein in einer Verdünnungsreihe inkubiert. Detektiert wurde die Bindung der CEA spezifischen Antikörper mit dem PE-markierten anti-human IgG Antikörper.

Der anti-CEA Antikörper H10scFv-hIgG (#648) bindet stärker an membranständiges CEA der Tumorzellen als der anti-CEA Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443). Das humane IgG Kontrollprotein bindet nicht an LS174T Tumorzellen (Abb. 66). Dieser Versuch wurde mehrfach durchgeführt, wobei der H10scFv-hIgG Antikörper durchgehend stärker als der BW431/26scFv-hIgG Antikörper an CEA⁺ Tumorzellen gebunden hat.

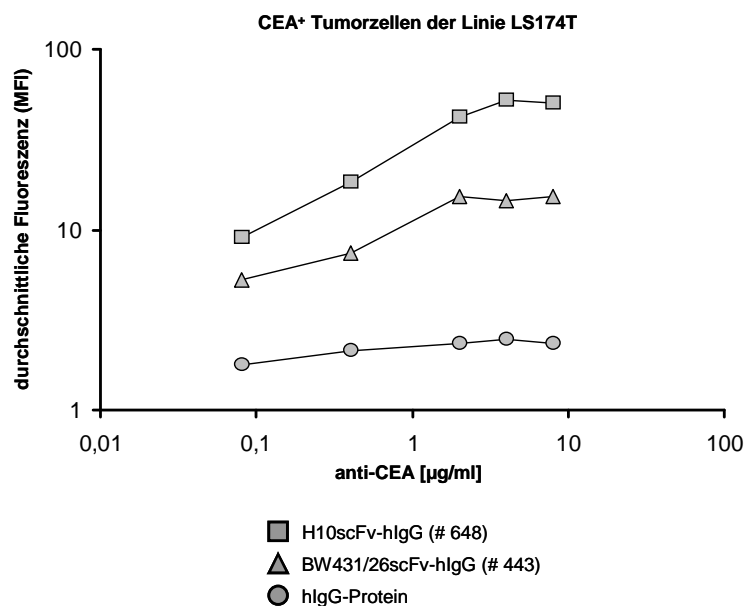


Abbildung 66: Bindung CEA spezifischer Antikörper an CEA⁺ Tumorzellen. Je 1×10^5 Tumorzellen der Linie LS174T (CEA⁺) wurden zusammen mit dem anti-CEA Antikörper #443 oder #648 in einer Verdünnungsreihe (8 µg/ml bis 0,2 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurde das humane IgG Protein (Southern Biotech) verwendet. Detektiert wurde die Bindung der CEA spezifischen Antikörper an CEA⁺ Tumorzellen mit dem PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper (0,2 µg/ml). Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bestimmt.

3.7.1 Keine kompetitive Hemmung der Bindung CEA spezifischer Antikörper an CEA⁺ Tumorzellen durch Zugabe des löslichen CEA.

Tumorzellen der Linie LS174T wurden mit einer konstanter Konzentration des anti-CEA Antikörpers #443 oder #648 in einer Verdünnungsreihe mit gelöstem CEA inkubiert. In einem zusätzlichen Kontrollansatz wurden LS174T Tumorzellen zusammen mit BSM (bovine serum mercaptalbumin) inkubiert. Detektiert wurde die Bindung CEA spezifischer Antikörper mit dem PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bestimmt (Abb. 67).

- (1.) Die Bindung CEA spezifischer Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443) und H10scFv-hIgG (#648) an membranständiges CEA der LS174T Tumorzellen wird durch die Zugabe des löslichen Inhibitors CEA, ab einer Konzentration von etwa 1 µg/ml CEA, verstärkt. Offensichtlich bindet der dimere anti-CEA Antikörper sowohl gelöstes als auch membranständiges CEA. Im Kontrollansatz

hat die Zugabe von BSM keine kompetitiven Einfluss auf Die Bindung CEA spezifischer Antikörper #443 und #648 an membranständiges CEA. Die Bindung der anti-CEA Antikörper ist somit spezifisch. Es ist keine kompetitive Hemmung der Bindung der CEA spezifischen Antikörpern #443 und #648 an membranständiges CEA durch Zugabe des löslichen CEA in einer Konzentrationsbreite von 0,12 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ nachweisbar. Die Bindung CEA spezifischer Antikörper an membranständiges CEA wird durch die Zugabe des löslichen CEA verstärkt.

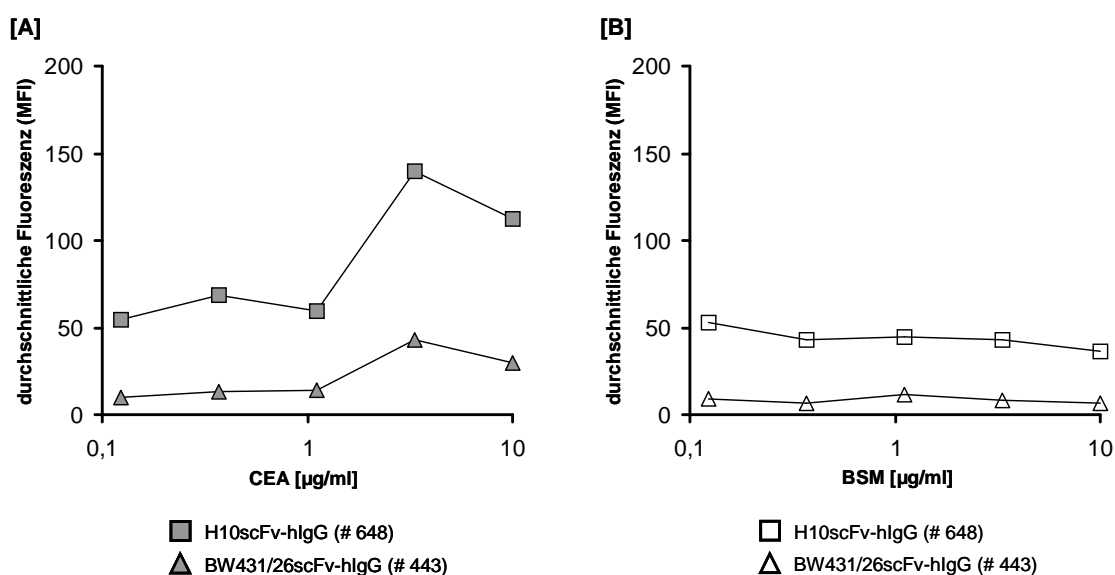


Abbildung 67: Bindung CEA spezifischer Antikörper an membranständiges CEA in Gegenwart eines Kompetitors. Je 1×10^5 Zellen der Linie LS174T wurden mit einer konstanter Konzentration (4 $\mu\text{g/ml}$) des anti-CEA Antikörpers #443 oder #648 in einer Verdünnungsreihe mit löslichem CEA (10 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,12 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Als Kontrolle wurden je 1×10^5 LS174T Tumorzellen in einer Verdünnungsreihe mit BSM (10 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,12 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Detektiert wurde die Bindung CEA spezifischer Proteine #443 oder #648 an die CEA⁺ Tumorzellen mit dem PE-markierten anti-human IgG Antikörper (0,2 $\mu\text{g/ml}$). Mittels der Durchflußzytometrie wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bestimmt.

3.8 Einfluss des löslichen Kompetitors ErbB2 auf die Aktivierung der IFN- γ Sekretion und der Antigen-spezifischen Zytolyse der Tumorzellen bei Ko-Inkubation humaner T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren und ErbB2⁺ Tumorzellen.

Die Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an membranständiges ErbB2 wird durch

die Zugabe des löslichen ErbB2 Proteins kompetitiv gehemmt und ist von der Konzentration des Kompetitors abhängig. In diesem Kapitel wollen wir der Frage nachgehen, ob humane T-Zellen mit ErbB2 spezifischen rekombinanten Immunrezeptoren in ihrer Aktivierung durch das lösliche Kompetitorprotein ErbB2 beeinträchtigt werden. Hierfür sollen T-Zellen durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten anti-ErbB2 Immunrezeptoren ausgestattet und mit ErbB2⁺ Tumorzellen in Gegenwart des Kompetitors ko-inkubiert werden. Der Einfluss des Kompetitors auf die T-Zell Aktivierung soll anhand der IFN- γ Sekretion und Messung des zytolytischen Effektes auf ErbB2⁺ Tumorzellen untersucht werden.

3.8.1 Expression der rekombinanten ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ Signaltransduktionskette in humanen CD3⁺ T-Lymphozyten.

Periphere Blutlymphozyten wurden mit monoklonalem OKT-3 Antikörper und IL-2 aktiviert und durch retroviralen Gentransfer zur Expression der anti-ErbB2-CD3 ζ Rezeptoren C6-B1D2scFv-hIgG-hCD3 ζ (#710), C6ML3-9scFv-hIgG-hCD3 ζ (#744), C6.5scFv-hIgG-hCD3 ζ (#746), C6MH3-B1scFv-hIgG-hCD3 ζ (#748) und C6.5G98AscFv-hIgG-hCD3 ζ (#750) transduziert. Nach 48h der Ko-Kultur der T-Zellen mit Retrovirus-produzierenden 293T Tumorzellen erfolgte der Nachweis der rekombinanten Immunrezeptoren mittels der Durchflußzytometrie mit Hilfe des FITC-gekoppelten anti-human IgG₁ Antikörpers, der gegen die humane IgG Domäne des rekombinanten Immunrezeptors gerichtet ist, und des PE-konjugierter anti-human CD3 Antikörpers, zur Markierung der CD3⁺ T-Zelle. Nicht-transduzierte T-Lymphozyten und T-Lymphozyten mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26-hIgG-hCD3 ζ (#700) dienten als Kontrolle. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Expressionsrate der Rezeptoren #700, #710, #744, #746, #748 und #750 analysiert. Nicht-transduzierte T-Lymphozyten exprimieren keine rekombinanten Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Abb. 68).

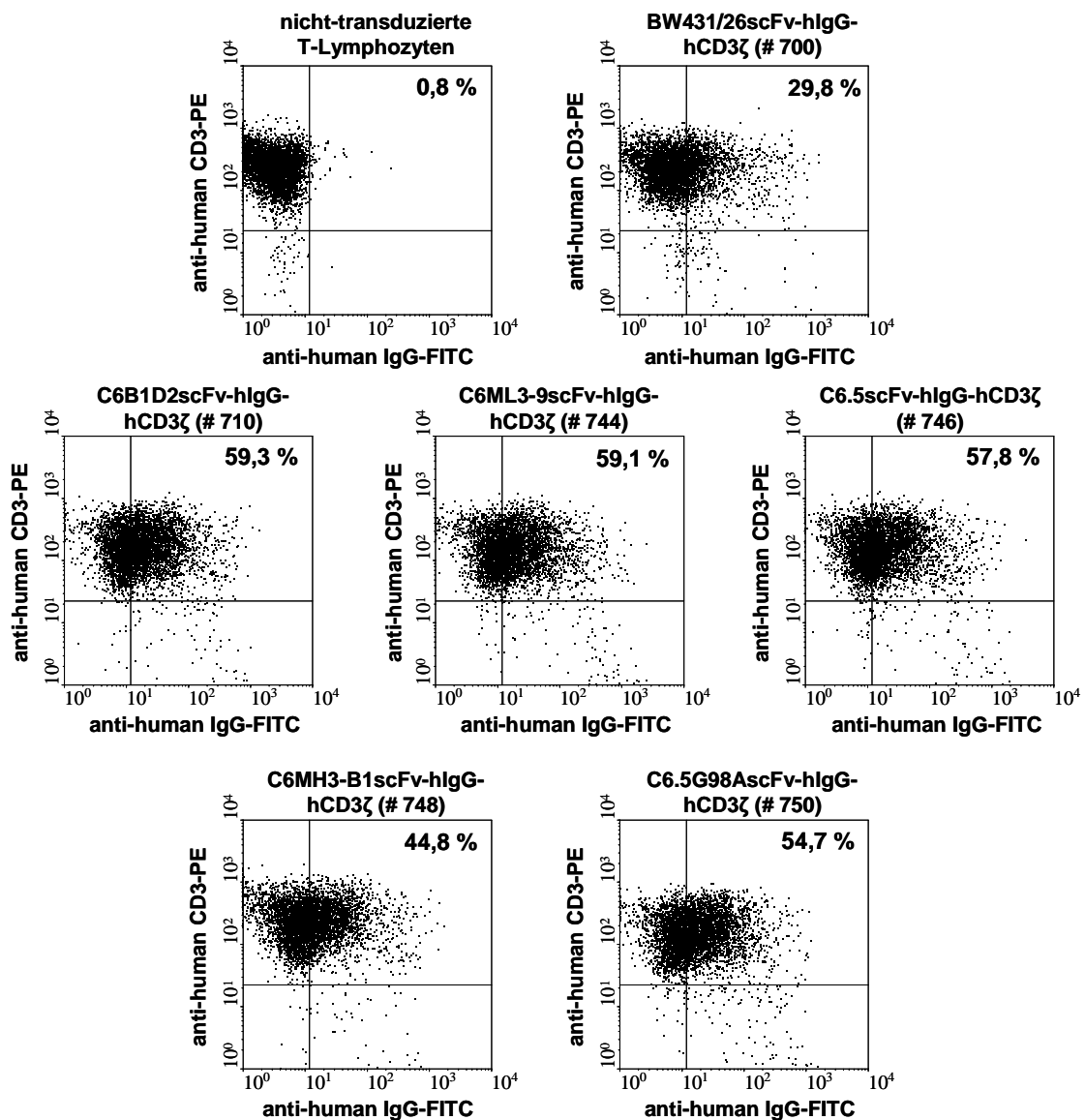


Abbildung 68: Expression der ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren mit CD3 ζ Signaleinheit auf der Oberfläche transduzierter CD3 $^+$ T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten wurden durch retroviralen Gentransfer mit rekombinanten Immunrezeptoren C6-B1D2scFv-hIgG-hCD3 ζ (#710), C6ML3-9scFv-hIgG-hCD3 ζ (#744), C6.5scFv-hIgG-hCD3 ζ (#746), C6MH3-B1scFv-hIgG-hCD3 ζ (#748) und C6.5G98AscFv-hIgG-hCD3 ζ (#750) ausgestattet. Die Expression rekombinanter Immunrezeptoren auf den CD3 $^+$ T-Zellen wurde mittels der Durchflußzytometrie und mit Hilfe des FITC-gekoppelten anti-human IgG $_1$ Antikörpers, der gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne der rekombinanten Immunrezeptoren gerichtet ist, und des PE-konjugierten anti-human-CD3 Antikörpers, zur Markierung der CD3 $^+$ T-Zellen, durchgeführt. Als Kontrolle dienten T-Lymphozyten mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-hIgG-hCD3 ζ (#700) und nicht-transduzierte CD3 $^+$ T-Zellen. Die Prozentzahl gibt den Anteil der CD3 $^+$ T-Lymphozyten, die den Immunrezeptor auf der Oberfläche exprimiert haben, von der Gesamtzahl der T-Zellen an.

3.8.2 Untersuchung der Aktivierung humaner T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Inkubation mit ErbB2⁺ Tumorzellen in Gegenwart des löslichen Kompetitors ErbB2.

In diesem Teilkapitel wollen wir der Frage nachgehen, welchen Einfluss die Zugabe des löslichen Antigens ErbB2 auf die Aktivierung der IFN- γ Sekretion und der ErbB2 spezifischen Zytolyse der Tumorzellen bei Ko-Inkubation der humanen T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren mit ErbB2⁺ Tumorzellen hat.

Hierfür wurden humane CD3⁺ Effektorzellen durch retroviralen Gentransfer mit dem anti-ErbB2 Immunrezeptor C6-B1D2scFv-hIgG-hCD3 ζ (#710), C6ML3-9scFv-hIgG-hCD3 ζ (#744), C6.5scFv-hIgG-hCD3 ζ (#746), C6MH3-B1scFv-hIgG-hCD3 ζ (#748) und C6.5G98AscFv-hIgG-hCD3 ζ (#750) ausgestattet und auf Mikrotiterplatten mit Zellen der Linie Sk-Ov-3 (ErbB2⁺) in Gegenwart des löslichen ErbB2 ko-inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne die Zugabe des löslichen ErbB2. Als weitere Kontrollen dienten nicht-transduzierte T-Lymphozyten und T-Lymphozyten, die den CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-hIgG-hCD3 ζ (#439) exprimieren. Nach 48h wurde die IFN- γ Konzentration mit Hilfe eines ELISA und die Zytolyse ErbB2⁺ Tumorzellen mittels des mit Hilfe der Umsetzungsreaktion des XTT-Substrates bestimmt.

T-Lymphozyten mit Expression der ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren #710, #744, #746, #748 und #750 werden durch Ko-Inkubation mit Sk-Ov-3 (ErbB2⁺) Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion aktiviert. T-Lymphozyten, die den Immunrezeptor #710, #744, #746 und #748 auf der Oberfläche exprimieren, sezernieren gleich hohe Mengen IFN- γ . T-Lymphozyten, die den nieder affinen anti-ErbB2 Immunrezeptor #750 ($k_D = 3,2 \times 10^{-7}$ M) auf ihrer Oberfläche exprimieren, sezernieren eine geringere Menge IFN- γ im Vergleich zu T-Zellen mit den höher affinen Immunrezeptoren für ErbB2.

Die Zugabe des ErbB2 Antigens ins Kulturmedium führt zur geminderten Induktion der IFN- γ Sekretion in Abhängigkeit von Konzentration des Kompetitors ErbB2. Die Minderung der IFN- γ Sekretion betrifft alle Ko-Inkubationsansätze mit gleicher Kinetik (Abb. 69).

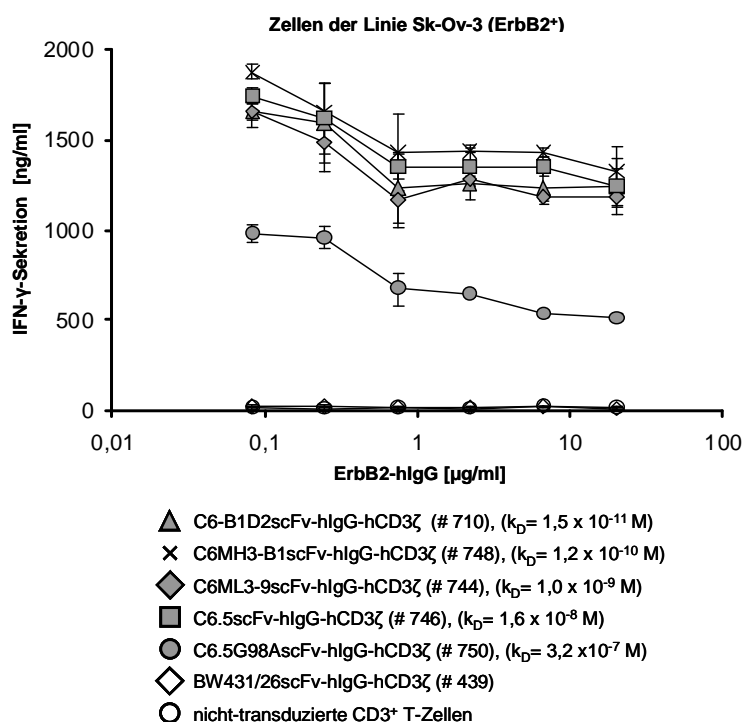


Abbildung 69: IFN-γ Sekretion nach ErbB2 spezifischer Aktivierung humaner CD3⁺ T-Lymphozyten. Je 1×10^4 humane CD3⁺ T-Zellen mit dem ErbB2 spezifischen Immunrezeptor C6-B1D2-hIgG-hCD3ζ (#710), C6ML3-9scFv-hIgG-hCD3ζ (#744), C6.5scFv-hIgG-hCD3ζ (#746), C6MH3-B1scFv-hIgG-hCD3ζ (#748) und C6.5G98AscFv-hIgG-hCD3ζ (#750) wurden mit je 5×10^4 Tumorzellen der Linie Sk-Ov-3 in Gegenwart des Kompetitors ErbB2-hIgG in einer Verdünnungsreihe (20 µg/ml bis 0,08 µg/ml) ko-inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne die Zugabe des löslichen ErbB2. Nicht-transduzierte humane CD3⁺ T-Lymphozyten und T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #439 wurden als weitere Kontrollen verwendet. Nach 48h wurde die IFN-γ Konzentration im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung.

Humane CD3⁺ T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren #710, #744, #746, #748 oder #750 werden durch Ko-Inkubation mit ErbB2⁺ Sk-Ov-3 Tumorzellen zur spezifischen Zytolyse induziert. Dagegen werden nicht-transduzierte humane CD3⁺ T-Zellen und T-Zellen mit dem Immunrezeptor #439 durch Ko-Inkubation mit Zellen der Linie Sk-Ov-3 nicht zur spezifischen Zytolyse aktiviert (Abb. 70). T-Zellen mit den Immunrezeptoren #710, #744, #746 oder #748 mit verschiedener Affinität zu ErbB2 werden in Gegenwart des löslichen ErbB2 gleich stark zur spezifischen Zytolyse induziert. Als Kontrolle dienenden CD3⁺ T-Zellen mit dem für ErbB2 nieder affinen Rezeptor C6.5G98AscFv-hFc-hCD3ζ (#750) ($k_D = 3,2 \times 10^{-7}$ M) werden in Gegenwart des Kompetitors ErbB2 weniger stark zur spezifischen Zytolyse induziert als T-Zellen

mit höher affinen anti-ErbB2 Immunrezeptoren ($k_D \leq 1,6 \times 10^{-8}$ M). Die Aktivität der ErbB2 spezifischen T-Zellen gegenüber ErbB2-positiven Tumorzellen wird nicht durch die Zugabe des löslichen ErbB2-hIgG Fusionsproteins beeinflusst (Abb. 70). Offensichtlich führt die Gegenwart des Kompetitorproteins ErbB2-hIgG, trotz Minderung der IFN- γ Sekretion, zu keiner kompetitiven Hemmung des zytolytischen Effektes der T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren auf ErbB2⁺ Tumorzellen.

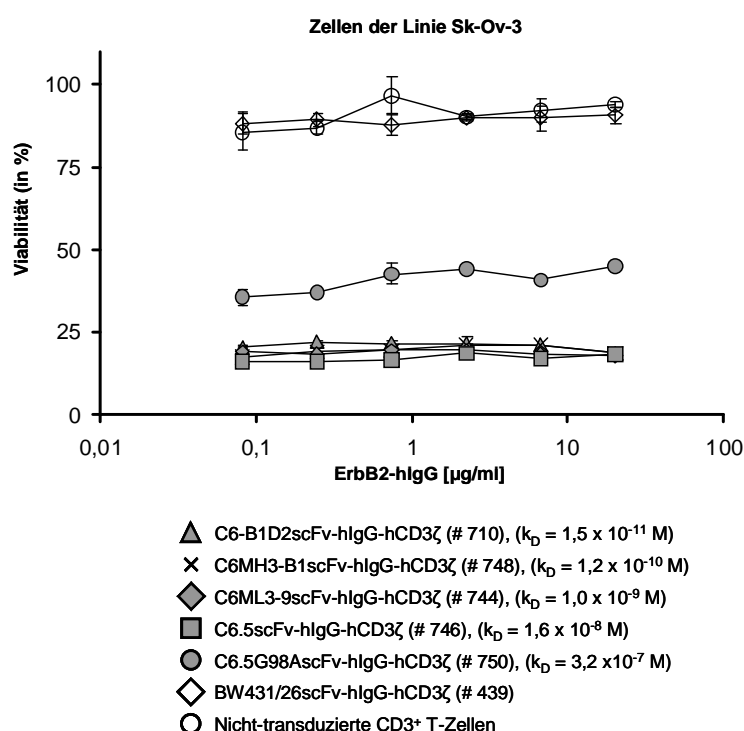


Abbildung 70: Einfluss des löslichen Kompetitors ErbB2-hIgG auf die Induktion der zytolytischen Aktivität der ErbB2 spezifischen T-Zellen gegenüber ErbB2⁺ Tumorzellen. Je 1×10^4 humane CD3⁺ T-Zellen mit dem ErbB2 spezifischen Immunrezeptor C6-B1D2scFv-hIgG-hCD3ζ (#710), C6ML3-9scFv-hIgG-hCD3ζ (#744), C6.5scFv-hIgG-hCD3ζ (#746), C6MH3-B1scFv-hIgG-hCD3ζ (#748) und C6.5G98AscFv-hIgG-hCD3ζ (#750) wurden mit je 5×10^4 Tumorzellen der Linie Sk-Ov-3 im Kulturmedium ko-inkubiert, dem das lösliche Protein ErbB2-hIgG in einer Verdünnungsreihe 20 µg/ml bis 0,08 µg/ml zugegeben wurde. Als Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz ohne die Gegenwart des Kompetitors angefertigt. Nicht-transduzierte CD3⁺ T-Lymphozyten und T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor anti-CEA-hIgG-hCD3ζ #439 wurden als weitere Kontrollen verwendet. Nach 48h wurde die Viabilität der Tumorzellen mit Hilfe der Umsetzungsreaktion des XTT-Substrates bestimmt. Aus der Dreifachbestimmung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

3.9 Generierung und funktionelle Charakterisierung des murinen CEA spezifischen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG.

Aus einer schweren (V_H) und einer leichten (V_K) Antikörper-Einzelkette eines CEA spezifischen Antikörpers sollte ein funktionstüchtiger Antikörper SCA-431scFv-hIgG generiert werden. In diesem Kapitel beschreiben wir die Generierung des CEA spezifischen murinen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG (#977) und dessen Charakterisierung mittels der Durchflußzytometrie mit Hilfe der Tumorzellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Für die Generierung des CEA spezifischen Antikörpers wurde die DNA für die schwere Kette mit Hilfe der PCR mittels der Oligonukleotide L-kappa-SCA-431-NcoI (# 322) und SCA431-VH-AS (# 323) aus dem Plasmid 431-VH Mas Lys 19 (#680) amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde vor die DNA für die L-kappa Domäne die Restriktionsschnittstelle für *NcoI* und dahinter eine weitere Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XbaI* inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde eine 40 bp lange Sequenz der Glycin-Linker Domäne eingefügt, die die beiden Domänen miteinander verbinden soll. Die DNA für die leichte Kette des Antikörpers wurde mit Hilfe der PCR und mittels der Oligonukleotide SCA-431-VK-S (# 324) und SCA431-VK-BglII-AS (# 325) aus dem Plasmid 431-Vk Lys 17 (#681) amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde eine 33 bp lange Sequenz des Glycin-Linkers eingefügt. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BglII* inseriert (Abb. 71). Die PCR Produkte V_H und V_K wurden elektrophoretisch getrennt und für die weiteren Klonierungsschritte gereinigt. Beim nächsten Klonierungsschritt wurde die schwere und die leichte Kette des Antikörpers mit Hilfe der Assembly-PCR miteinander verbunden. Aufgrund der kurzen Komplementärsequenz am 3'-Ende der DNA für die V_H -Kette und am 5'-Ende der V_K -Kette hybridisierten die denaturierten DNA Einzelstränge miteinander und dienten gleichzeitig als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide L-kappa-SCA-431-NcoI (# 322) und SCA431-VK-BglII-AS (# 325) zugegeben, um das PCR Produkt 431-VH-Kette-431-VK-Kette in der gewünschten Gesamtlänge zu vervielfältigen. Für den weiteren Klonierungsschritt wurde das amplifizierte Gesamt-PCR Produkt 431-VH-Kette-431-VK-Kette elektrophoretisch aufgetrennt, gereinigt und mit dem linearisierten pCR[®]2.1 Vektor zum neuen Plasmid pCR 2.1-431-VH-Kette-

431-VK-Kette (#939) ligiert (Abb. 72). Anschließend wurde das inserierte Fragmentstück im Plasmid #939 mit Hilfe der PCR und mittels der Oligonukleotide M13 Reverse Primer (Invitrogen) und M13 Forward (-20) Primer (Invitrogen) sequenziert.

Im letzten Schritt wurde das Plasmid pCR-2.1-SCA-431-(scFv) (#939) durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *BglIII* und *XbaI* geschnitten (Abb. 73), wobei das DNA Fragment für die anti-CEA Bindedomäne SCA-431scFv aus dem PCR-Vektor #939 isoliert wurde. Die verbliebene Vektor DNA #939 wurde deletiert. Das Plasmid pRsV-ErbB2scFv-hIgG (#788) wurde durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *BamHI* geschnitten, wobei das DNA Fragment für die anti-ErbB2scFv Bindedomäne deletiert und das linearisierte Plasmid #788 für die weitere Klonierungsarbeit verwendet wurde. Die komplementären kohäsiven Enden der DNA für die murine anti-CEA Bindedomäne SCA-431scFv und des linearisierten Plasmids #788 wurden zum neuen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-hIgG₁ (#970) ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Plasmid #970 durch Restriktion mit den Enzymen mit *NcoI* und *BamHI* geschnitten, wobei erwartungsgemäß drei Fragmente der erwarteten Größe generiert wurden. Ferner wurde der Vektor # 977 mit Hilfe der beiden Oligonukleotide pRSVsense (# 75) und seq hFc-As (# 76) sequenziert (Sequenzen im Anhang).

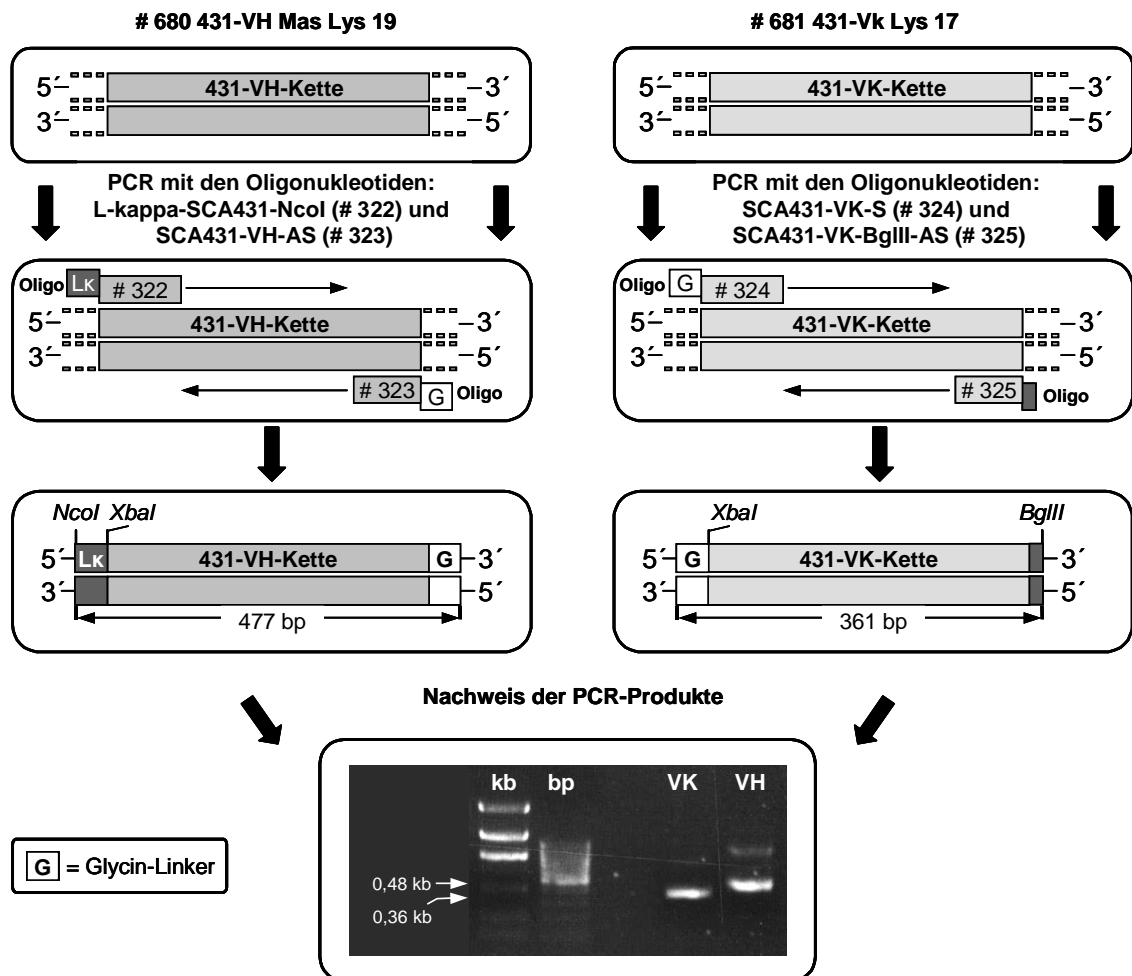


Abbildung 71: Klonierung des murinen CEA spezifischen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG. Die DNA für die schwere Kette des Antikörpers wurde mit Hilfe der PCR mittels der Oligonukleotide L-kappa-SCA-431-NcoI (# 322) und SCA431-VH-AS (# 323) aus dem Plasmid 431-VH Mas Lys 19 (# 680) amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR Produkts wurde vor die L-kappa DNA die Restriktionschnittstelle für *NcoI* und dahinter eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XbaI* inseriert. Am 3'-Ende des PCR Produkts wurde eine 40 bp lange Sequenz der Glycin-Linker Domäne, die die beiden Ketten V_H und V_K miteinander verbinden soll, inseriert. Das fertige PCR-Produkt VH enthält die DNA für die schwere Kette des Antikörpers. Die DNA für die leichte Kette des Antikörpers wurde mit Hilfe der PCR und der Oligonukleotide SCA-431-VK-S (# 324) und SCA431-VK-BglII-AS (# 325) aus dem Plasmid 431-Vk Lys 17 (#681) amplifiziert. Am 5'-Ende des PCR-Produkts wurde eine 33 bp lange Sequenz des Glycin-Linkers und am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BglII* inseriert. Das PCR-Produkt VK enthält die DNA für die leichte Kette des Antikörpers.

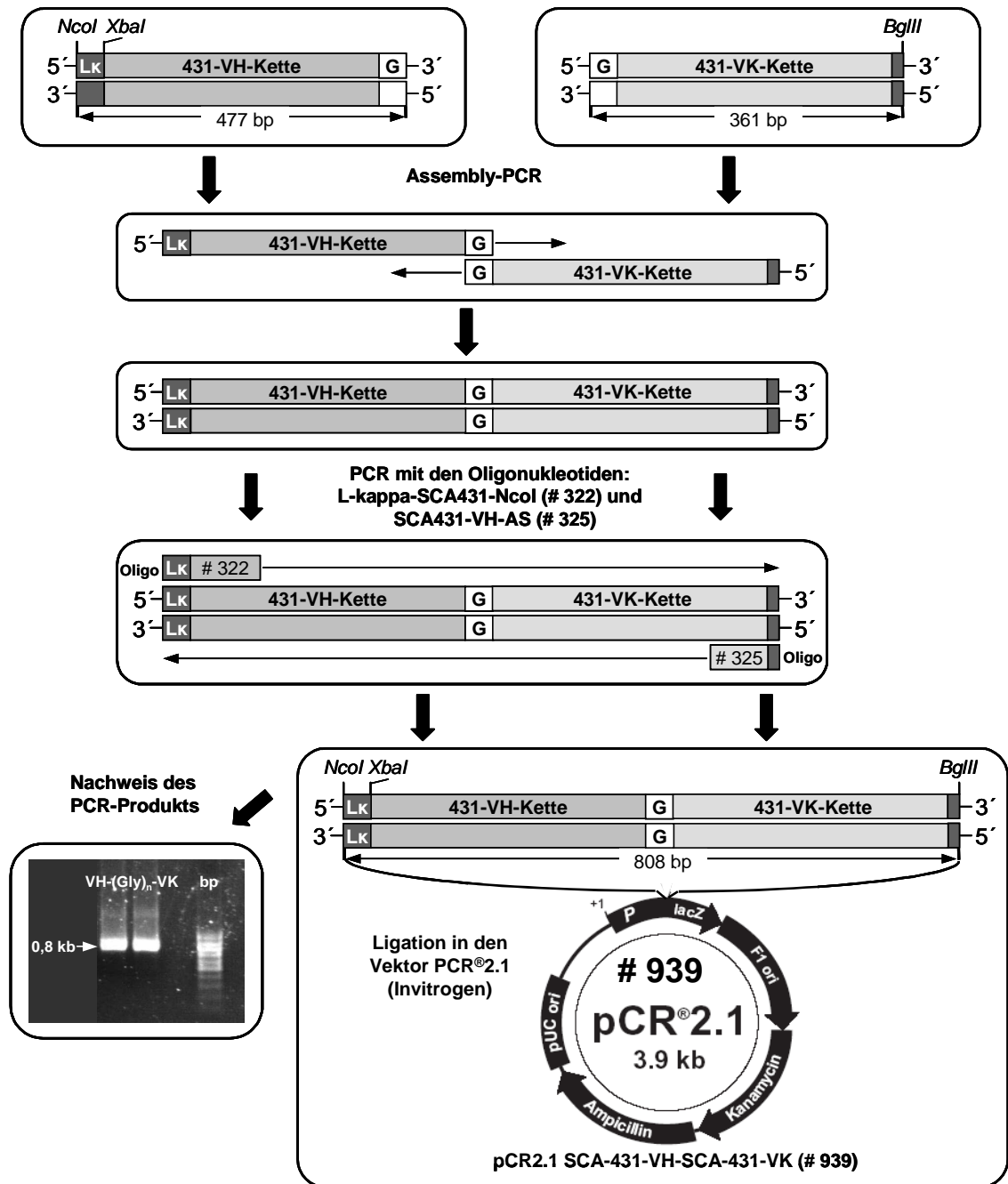


Abbildung 72: Generierung des PCR-Vektors pCR2.1 SCA-431-VH-SCA-431-VK (#939). Mit Hilfe der Assembly-PCR wurden die beiden PCR Produkte 431-VH und 431-VK miteinander verknüpft. Nach der Denaturierung hybridisierte die 3'-Sequenz des 431-VH PCR Produkts mit der komplementären 5'-Sequenz des 431-VK PCR Produkts. Dabei dienten die miteinander hybridisierten Sequenzbereiche als Oligonukleotide bei der Synthese zum DNA-Doppelstrang. Anschließend wurden die beiden Oligonukleotide L-kappa-SCA-431-NcoI (# 322) und SCA431-VK-BglIII-AS (# 325) zugegeben, um das PCR Produkt 431-VH-Kette-431-VK-Kette in der gewünschten Gesamtlänge zu amplifizieren. Dabei wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NcoI*, am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BglIII* inseriert.

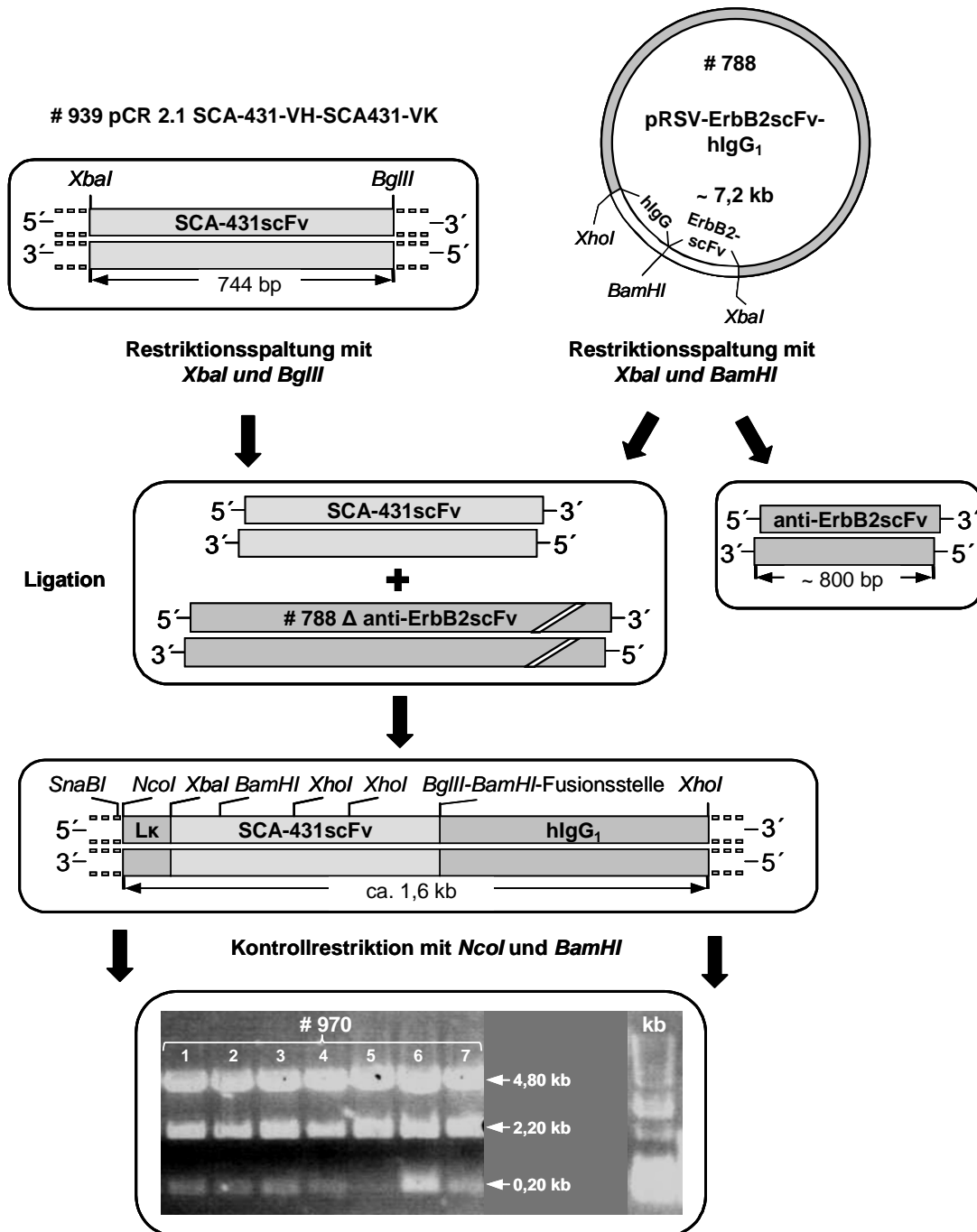


Abbildung 73: Generierung des Expressionsvektors pRSV-SCA-431scFv-hIgG (#970). Der PCR Vektor pCR-2.1-SCA431-VH-SCA431-VK (#939) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *BglIII* und *XbaI* geschnitten, wobei das DNA Fragment für anti-CEA Bindedomäne SCA-431scFv aus dem Plasmid #939 isoliert wurde. Der linearisierte PCR Vektor #939 wurde deletiert. Das Plasmid pRSV-ErbB2scFv-hIgG (#788) wurde durch Restriktion mit den beiden Enzymen *XbaI* und *BamHI* geschnitten, wobei das DNA Fragment für die anti-ErbB2scFv Bindedomäne deletiert und das linearisierte Plasmid #788 isoliert wurde. Die DNA für die murine anti-CEA Bindedomäne SCA431-VH-SCA431-VK wurde mit der linearisierten Plasmid DNA #788 mit Hilfe der T4-Ligase zum neuen Expressionsvektor pBullet-SCA-431scFv-hIgG₁ (#970) ligiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Plasmid #970 durch Restriktion mit den Enzymen *NcoI* und *BamHI* geschnitten. Erwartet wurden drei Fragmente 4,8 kb, 2,2 kb und 0,2 kb.

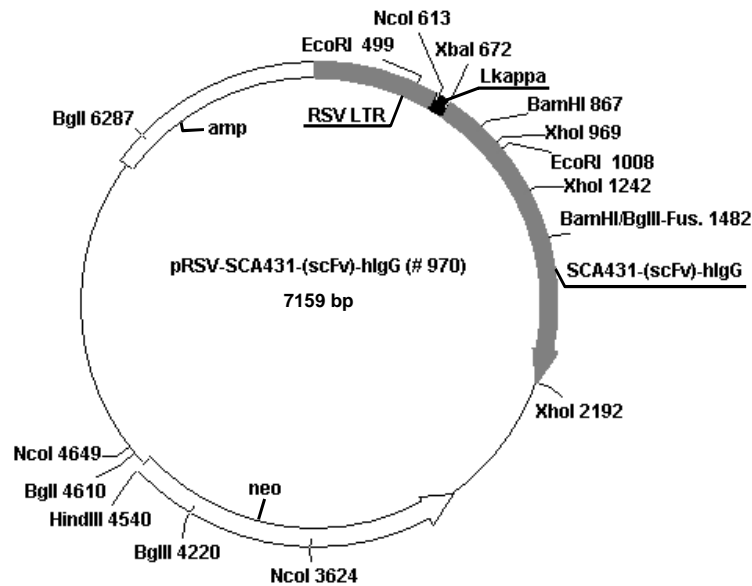


Abbildung 74: Plasmidkarte des neu generierten Plasmids pRSV-SCA-431scFv-hIgG (#970).

3.9.1 Expression und Nachweis der Funktionalität des murinen CEA spezifischen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG (#970).

Tumorzellen der Linie 293T wurden mit der Plasmid DNA für den Antikörper SCA-431scFv-hIgG (#970) transfiziert und 48h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände gesammelt, die Konzentration der CEA spezifischen Antikörper mittels ELISA bestimmt. Die Bindung des neu generierten Antikörpers #970 an CEA⁺ Tumorzellen der Linie C15A3 und LS174T wurde untersucht. Hierfür wurden Tumorzellen der Linie C15A3, LS174T und als Kontrolle der Linie MC38 (CEA⁻) mit dem SCA-431scFv-hIgG Antikörper (#970) inkubiert. Tumorzellen der Linien C15A3, LS174T und MC-38, die mit dem humanem IgG Protein inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Die Bindung des CEA spezifischen Antikörpers SCA-431-hIgG (#970) auf der Oberfläche der Tumorzellen der Linie C15A3 und LS174T wurde indirekt mit Hilfe des PE-konjugierten anti-human IgG Antikörpers nachgewiesen. Auf der Oberfläche der CEA⁻ MC-38 Tumorzellen wurde keine Bindung des PE-konjugierten anti-human IgG Antikörpers an den primären SCA-431-hIgG Antikörper detektiert.

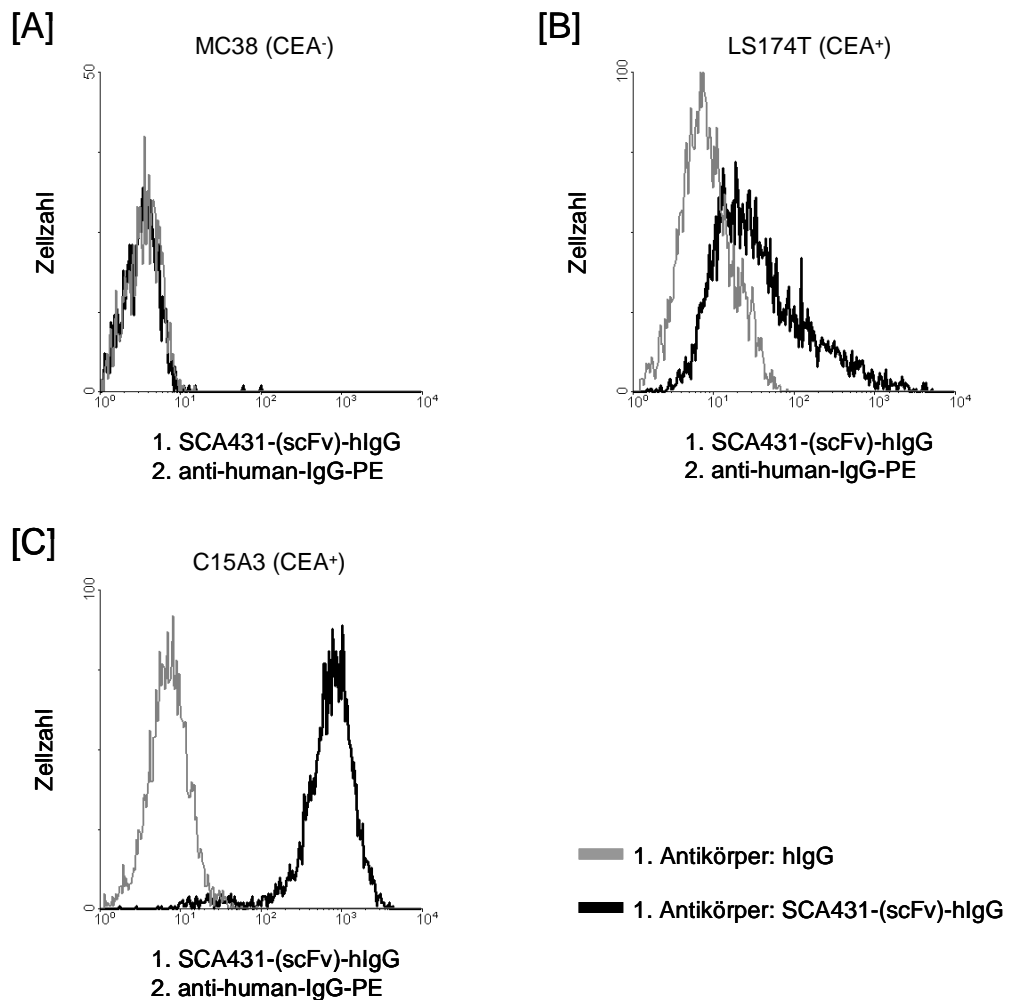


Abbildung 75: Bindung des CEA spezifischen Antikörpers an CEA-positive Zellen. Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen der Linie C15A3, MC-38 und LS174T wurden mit dem CEA spezifischen SCA431scFv-hIgG Antikörper (#970) oder zur Kontrolle mit dem humanem IgG Protein (Southern Biotech) ($2 \mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 30 min erfolgte die Detektion der Bindung an Tumorzellen der Linien LS174T, C15A3 und MC-38 mit Hilfe des PE-markierten anti-human IgG Antikörpers ($0,5 \mu\text{g/ml}$). Die Bindung des CEA spezifischen Antikörpers SCA-431scFv-hIgG (#970) (schwarze Linie) an Zellen der Linie LS174T und C15A3 wurde indirekt mit Hilfe des PE-markierten anti-human IgG Antikörpers nachgewiesen. Es wurde keine Bindung des rekombinanten Antikörpers SCA-431scFv an CEA⁻ MC-38 Tumorzellen detektiert. Zellen der Linie C15A3, MC-38 und LS174T, die als Kontrolle mit dem hIgG Protein inkubiert wurden (graue Linie), wurden nicht durch den PE-konjugierten Antikörper anti-human IgG gebunden.

4 Diskussion

Ein neuer Ansatz in der adoptiven Immuntherapie maligner Erkrankungen beruht darauf, T-Zellen durch einen rekombinanten T-Zell Rezeptor Spezifität für ein Tumor-assoziiertes-Antigen (TAA) zu verleihen. Derartige rekombinante Immunrezeptoren bestehen in ihrem extrazellulären Anteil aus einer antigenbindenden Domäne eines Einzelketten-Antikörpers (scFv), einer Transmembrandomäne und intrazellulär aus einer Signalkette, die der zellulären Aktivierung dient. Dieser modulare Aufbau der rekombinanten Immunrezeptoren erlaubt es, T-Zellen eine gewünschte Spezifität mit umfangreichen Fähigkeiten zur Induktion und Modulation einer zellulären Immunantwort zu verleihen. Innerhalb der letzten Jahre haben Forschergruppen zahlreiche Immunrezeptoren mit Spezifität zu unterschiedlichen Antigenen generiert, wobei die *in vivo* Evaluierung der Immunrezeptor-Strategie meist in immundefizienten Mäusen durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Immunrezeptor-Strategie am Beispiel des anti-CEA Rezeptors in einem immunkompetenten Maus-Modell evaluiert werden.

4.1 Optimierung eines retroviralen Gentransfer-Protokolls für die Transduktion muriner T-Lymphozyten.

Im Rahmen der *in vivo* Evaluierung des immuntherapeutischen Ansatzes sollte das retrovirale Gentransferverfahren für die Transduktion muriner T-Zellen optimiert werden. Für die Produktion retroviraler Partikel sind *gag*, *pol* und *env* Gene notwendig, wobei die *gag* Gene für virale Matrix, Capsid und Nucleocapsid Proteine, die *pol* Gene für Protease, Reverse Transkriptase und Integrase und die *env* Gene für Oberflächenproteine zur spezifischen Zielzellerkennung kodieren (Tai *et al.*, 2005). Da für die Spezifität und somit auch für die Effizienz der Transduktion das *Env* Protein des Retrovirus entscheidend ist, wurden in dieser Arbeit die *Env* Proteine der Retroviren *Vesicular Stomatitis Virus G* (VSVG), *Gibbon Ape Leukemia Virus* (GALV) und *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) untersucht.

Hierfür wurden Zellen der Linie 293T mit retroviralem Expressionsvektor #439, mit Helferplasmid für *Gag* und *Pol* Proteine pHIT60 (#393) und Helferplasmid für das *Env* Protein GaLV (#392), pVpack-10A1 (#596), pVpack-VSV-G (#597), pVpack-Eco (#598) oder pVpack-Ampho (#599) ko-transfiziert und Retroviren generiert, deren

Capside den Vektor #439 enthalten. Die murinen T-Zellen wurden mittels Retroviren mit den *Env* Hüllenproteinen der Retroviren VSVG, GALV oder MMLV, transduziert. Obwohl VSVG, GALV und MMLV basierte Retroviren die Fähigkeit zur T-Zell Transduktion haben, werden murine T-Lymphozyten am effizientesten mit Retroviren infiziert, die das vom MMLV abgeleitete ecotrope *Env* Protein (#598) enthalten. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, dass Retroviren mit MMLV Grundgerüst effektiv murine T-Zellen transduzieren. Dabei spielen die *in vitro* Kulturbedingungen eine Schlüsselrolle und müssen je nach Ansatz modifiziert werden (Kiem *et al.*, 2004). Der Einsatz retroviraler Vektoren zur Transduktion proliferierender primärer Maus T-Lymphozyten ist derzeitiges Standardsystem, da die Viren nach Infektion der mitotisch aktiven Zielzelle in das Wirtsgenom integrieren und eine stabile Expression des Transgens ermöglichen. Durch die Entwicklung gewebspezifischer Inkubationssysteme für T-Zellen (Hozumi *et al.*, 2000) und Generierung neuartiger Vektorensysteme (Van Parijs *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2003) wurde die Effizienz retroviraler Gentransfersysteme *in vitro* gesteigert. Neben den retroviralen Systemen werden alternativ adenovirale Systeme verwendet, um primäre Zellen lymphatischen Ursprungs zu transduzieren (Volpers *et al.*, 2004). Jedoch die begrenzte Größe des Transgens, die zeitaufwendige Generierung adenoviraler Vektoren und die episomale Persistenz des adenoviralen Genoms zählen zu den entscheidenden Nachteilen der adenoviralen Systeme gegenüber den retroviralen Systemen.

4.2 Generierung, Expression und funktionelle Charakterisierung rekombinanter Immunrezeptoren.

Im Rahmen der Evaluierung der adoptiven Immuntherapie in einem immunkompetenten Maus-Modell wurden rekombinante CEA spezifische Immunrezeptoren mit humanen und murinen Binde-, Transmembran- und Signaldomänen generiert, deren Expression auf der Oberfläche transduzierter humaner und muriner T-Zellen detektiert und die Immunrezeptor-vermittelte T-Zell Aktivität untersucht.

4.2.1 Optimierung der Rezeptorkonstruktion – Generierung der Immunrezeptoren der ersten und zweiten Generation.

Während im letzten Jahrzehnt zahlreiche Immunrezeptoren mit humanen Domänen

generiert, in humanen T-Zellen exprimiert und *in vitro* untersucht wurden, ist über die Konstruktion, Expression und Funktion muriner rekombinanter Immunrezeptoren wenig bekannt. Neben der Gentransfermethode, die für die Effizienz der T-Zell Transduktion entscheidend ist, ist die Stabilität der Expression rekombinanter Immunrezeptoren auf der Oberfläche der T-Zelle von der Anordnung der Domänen in dem rekombinanten Rezeptorprotein abhängig (Hombach *et al.*, 2002). Deswegen haben wir bei der Generierung muriner Immunrezeptoren der ersten Generation die bewährte Konstruktion humaner rekombinanter Rezeptorproteine übernommen. Dementsprechend wurden CEA und CD30 spezifische Immunrezeptoren (#866 und #881) generiert, die die scFv Domäne zur Antigen-Bindung, die murine IgG₁ CH2-CH3 Domäne als „spacer“ und die transmembrane und intrazelluläre Domäne der CD3 ζ Kette als Signalkette tragen. Da eine adäquate Kostimulation eine erhebliche Bedeutung für die Eigenschaft, Effizienz und die Dauer der Tumor spezifischen T-Zell Aktivierung hat, wurden ferner murine CEA und CD30 spezifische Immunrezeptoren (#878 und #883) mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette generiert. Im Vergleich zur einzelnen CD3 ζ Signalkette führt die Kombination aus der CD3 ζ Signalkette und der ko-stimulatorischen CD28 Signaldomäne im humanen System nach Bindung des Rezeptors an Antigen zur gesteigerten IFN- γ Sekretion und zusätzlich zur Induktion der IL-2 Sekretion (Hombach *et al.*, 2001). Die Transfektion von 293T Tumorzellen mit der DNA für die neu generierten murinen CEA und CD30 spezifischen Immunrezeptoren #866, #878, #881 und #883 ergab eine signifikant geringe Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche im Vergleich zu baugleichem humanen Immunrezeptor #439. Die anschließende Untersuchung der retroviralen Transduktionsrate humaner T-Zellen zeigte erneut eine signifikant niedrige Expressionsfrequenz der murinen rekombinanten Immunrezeptoren mit einer CD3 ζ Signalkette (#866 und #878) und einer CD28-CD3 ζ Signaleinheit (#881 und #883). Offensichtlich sichert die Konstruktion muriner Immunrezeptoren nach dem Vorbild humaner Immunrezeptoren nicht eine vergleichbar hohe Expressionsrate (30 % bis 70 %) der rekombinanten Proteine auf der Oberfläche transduzierter T-Zellen. Die Arbeitsgruppe um Hans-Christoph Selinka hat bei der Generierung rekombinanter Membranproteine gezeigt, dass die Verwendung der CD4 Transmembrandomäne zu einer signifikant hohen Expressionsrate des generierten Proteins auf der Oberfläche muriner und humaner T-Zellen führt (Selinka *et al.*, 1992). Andererseits wurden an der University of Manchester rekombinante Immunrezeptoren mit der humanen CD3 Transmembrandomäne generiert und mit einer Frequenz von

20 % in murinen CD4⁺ und 70 % in CD8⁺ T-Zellen exprimiert (Jiang *et al.*, 2006). Ferner wurde am Weizmann Institut (Rehovot, Israel) gezeigt, dass Mäuse, transgen für den rekombinanten anti-2,4,6-trinitrophenyl (TNP) Immunrezeptor mit der CD28 Transmembrandomäne, den rekombinanten Immunrezeptor mit einer hohen Frequenz in murinen T-Zellen exprimieren (Friedmann-Morvinski *et al.*, 2005).

Aufgrund der bisher niedrigen Expressionsfrequenz der CEA und CD30 spezifischer Immunrezeptoren mit der murinen CD3 und CD28 Transmembrandomäne haben wir eine zweite Generation muriner Immunrezeptoren mit der CD4 Transmembrandomäne generiert. Hierfür wurde die CD3 und die CD28 Transmembrandomäne der CEA und CD30 spezifischen Immunrezeptoren (#866, #878, #881 und #883) durch die murine CD4 Transmembrandomäne ausgetauscht und rekombinante CEA und CD30 spezifische Immunrezeptoren mit der CD3 ζ Signaleinheit (#892, #895), mit der kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette (#901, #907) und mit der CD3 ζ -OX40 Signaldomäne (#897 und #898) generiert. Anschließend wurden die neuen Rezeptorproteine in 293T Tumorzellen, in humanen und in murinen T-Zellen mit einer hohen Frequenz (30% bis 90 %) exprimiert. Offensichtlich sichert die CD4 Transmembrandomäne eine hinreichend hohe Expressionsfrequenz der rekombinanten Immunrezeptoren in murinen und in humanen T-Zellen, um diese *in vitro* und *in vivo* funktionell charakterisieren zu können.

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung rekombinanter CEA spezifischer Immunrezeptoren.

Wir wollten zunächst untersuchen, ob humane T-Zellen mit den neu generierten CEA und CD30 spezifischen Immunrezeptoren durch Kreuzvernetzung der humanen IgG CH2-CH3-, „spacer“ Domäne zur IFN- γ und IL-2 Sekretion induziert werden. Hierfür wurden humane CD3⁺ T-Zellen durch retroviralen Gentransfer mit murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#895), BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#898) und BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#907) und CD30 spezifischen Immunrezeptoren HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#892), HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#897) und HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#901) ausgestattet und durch Kreuzvernetzung mit immobilisierten Antikörpern zur IFN- γ und IL-2 Sekretion induziert. Dabei wurde gezeigt, dass T-Zellen mit den CEA und CD30 spezifischen Immunrezeptoren

mit der CD3 ζ Signalkette (#892, #895), mit der CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#897, #898) und mit der kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne (#901, #907) durch Vernetzung der IgG-„spacer“ Domäne zur IFN- γ Sekretion induziert werden, wobei T-Zellen mit den CEA spezifischen Immunrezeptoren (#895, #898) mit der CD3 ζ und CD3 ζ -OX40 Domäne gering schwächer zur IFN- γ Sekretion induziert werden als T-Zellen mit dem Immunrezeptor #907 mit der CD28-CD3 ζ Signaleinheit. Die Untersuchung der IL-2 Sekretion ergab, dass T-Zellen mit dem rekombinanten CEA spezifischen Immunrezeptor #907 mit der CD28-CD3 ζ Signalkette durch Vernetzung der IgG-„spacer“ Domäne zur IL-2 Sekretion induziert werden. Dagegen werden T-Zellen mit dem Immunrezeptor mit der CD3 ζ Signalkette (#895) und mit der CD3 ζ -OX40 Signaldomäne (#898) nicht zur IL-2 Sekretion induziert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten aus der Untersuchung der humanen T-Zellen mit CD30 spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ (#892), CD3 ζ -OX40 (#897) und CD28-CD3 ζ (#901) Signalkette überein, die ebenfalls durch Kreuzvernetzung der humanen IgG CH2-CH3-„spacer“ Domäne zur IFN- γ Sekretion und im Fall des CD28-CD3 ζ Immunrezeptors #901 zur IL-2 Sekretion induziert werden.

Als nächstes haben wir uns mit der Frage beschäftigt, ob humane T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren (#895, #898 und #907) durch die Ko-Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen zur spezifischen Zytolyse gegenüber CEA⁺ Tumorzellen und zur IFN- γ Sekretion induziert werden. Hierfür wurden humane T-Zellen, ausgestattet mit den Immunrezeptoren mit der CD3 ζ Signalkette (#895), mit der CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#898) und mit der kombinierten CD28-CD3 ζ (#907) Signaldomäne mit CEA⁺ Tumorzellen der humanen Linie LS174T ko-inkubiert. Dabei wurden die T-Zellen mit den rekombinanten Rezeptoren #895, #898 oder #907 Antigen spezifisch mit gleicher Effizienz zur Zytolyse der CEA⁺ Tumorzellen induziert. Außerdem wurden T-Zellen mit dem Immunrezeptor #907 mit der CD28-CD3 ζ Signaleinheit durch die Ko-Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen Antigen-spezifisch zur IFN- γ Sekretion stärker induziert als T-Zellen mit dem Immunrezeptor #895 mit der CD3 ζ Signalkette und T-Zellen mit dem Immunrezeptor #898 mit der CD3 ζ -OX40 Signaldomäne. Dies entspricht den bisherigen Erkenntnissen, dass T-Zellen mit Immunrezeptoren mit der kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette im Vergleich zu T-Zellen mit der einzelnen CD3 ζ Signalkette oder mit der kombinierten CD3 ζ -OX40 Signaldomäne sich durch die Induktion der IL-2 Sekretion, Aktivierung einer erhöhten IFN- γ Sekretion und einer stärkeren T-Zell Proliferation unterscheiden (Eshhar *et al.*, 2001; Hombach *et al.*, 2001;

Maher *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivierung der T-Zelle mit rekombinantem Immunrezeptor mit dem ko-stimulatorischen OX40 (CD134) Signalmolekül zur verstärkten Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-X and Bfl1 führt, womit die Lebensdauer der T-Zelle verlängert wird (Finney *et al.*, 2004). Die so aktivierte T-Zelle kann im Zuge der T-Zell Differenzierung sich weiter zu einer Gedächtnis-T-Zelle entwickeln (Sugamura *et al.*, 2004).

Nachdem wir die Antigen spezifische Aktivierung der humanen T-Zellen mit murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren gezeigt haben, beschäftigten wir uns mit der Frage, ob auch murine T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren durch Ko-Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen Antigen spezifisch zur Zytolyse CEA⁺ Tumorzellen und IFN- γ Sekretion induziert werden. Hierfür haben wir murine CD8⁺ T-Zellen durch retroviralen Gentransfer mit murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ (#895) und mit der kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne (#907) ausgestattet und mit CEA⁺ Tumorzellen der murinen Linie C15A3 ko-inkubiert. Die Untersuchung ergab, dass murine CD8⁺ T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptor mit der CD28-CD3 ζ Signaleinheit (#907) Antigen spezifisch stärker zur IFN- γ Sekretion induziert werden als T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor mit der CD3 ζ Signaldomäne (#895). Die anschließend durchgeführte Untersuchung der Rezeptor-vermittelten zytolytischen Aktivität der CEA spezifischen T-Zellen gegenüber CEA⁺ Tumorzellen ergab, dass T-Zellen mit dem CD3 ζ (#895) und dem CD28-CD3 ζ (#907) Immunrezeptor Antigen spezifisch gleich stark zytolytisch auf CEA⁺ Tumorzellen wirken. Möglicherweise verleihen die rekombinanten murinen CEA spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ und der CD28-CD3 ζ Signaleinheit sowohl der humanen als auch der murinen T-Zelle eine gleich effektive Rezeptor-vermittelte Aktivierung. Moeller *et al.*, 2005, zeigten, dass murine CD8⁺ T-Zellen mit ErbB2 spezifischem Immunrezeptor mit der humanen CD3 ζ Signaldomäne im Vergleich zu T-Zellen mit ErbB2 spezifischem Immunrezeptor mit integrierter CD28-CD3 ζ Signalkette zytolytisch gleich effektiv auf ErbB2⁺ Tumorzellen wirken. Weiterhin wurde durch diese Arbeitsgruppe gezeigt, dass murine CD8⁺ T-Zellen mit ErbB2 spezifischem Immunrezeptor mit der CD28-CD3 ζ Signaleinheit stärker zur IFN- γ Sekretion induziert werden als T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor. Diese Ergebnisse werden durch unsere Resultate, die wir aus der funktionellen Charakterisierung der murinen CD8⁺ T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren gewonnen haben, bestätigt. Ergänzend konnte durch Moeller *et al.* gezeigt werden, dass T-Zellen mit dem ErbB2 spezifischen

Immunrezeptor mit der CD28-CD3 ζ Signaldomäne bei Antigen spezifischer Aktivierung deutlich stärker proliferieren als T-Zellen mit der CD3 ζ Signaldomäne. Offensichtlich profitieren sowohl humane als auch murine T-Zellen mit rekombinantem Immunrezeptor von der Insertion der CD28 ko-stimulatorischen Domäne. Interessanterweise hat die Arbeitsgruppe um Zelig Eshhar für die Erforschung der CD28 Ko-Aktivierung zwei Mäuse generiert, die transgen für den 2,4,6-trinitrophenyl (TNP) spezifischen Immunrezeptor mit der kombinierten CD28-FcR γ und der FcR γ Signalkette sind (Friedmann-Morvinski *et al.*, 2005). Die Ko-Inkubation der murinen T-Zellen mit dem TNP spezifischen Immunrezeptor CD28-FcR γ und FcR γ mit TNP⁺, B7⁺ Tumorzellen führt zur Expression der IL-2R α Rezeptorkette (CD25) als Marker für T-Zell Aktivierung und T-Zell Proliferation. Andererseits werden ausschließlich T-Zellen mit dem TNP spezifischen CD28-FcR γ Immunrezeptor durch die Ko-Inkubation mit TNP⁺, B7⁻ Tumorzellen zur Expression der IL-2R α Rezeptorkette aktiviert. Hingegen werden T-Zellen mit dem FcR γ Immunrezeptor nicht zur Expression der IL-2R α Rezeptorkette aktiviert. Offensichtlich führt die fehlende CD28/B7 Interaktion in murinen T-Zellen zur geminderten T-Zell Aktivierung.

Bei unserer *in vivo* Evaluierung des immuntherapeutischen Ansatzes werden murine T-Zellen retroviral mit CEA spezifischen Immunrezeptoren ausgestattet und anschließend in immunkompetente C57-Black/6 Mäuse injiziert. In der Literatur ist es bisher unbeantwortet geblieben, ob rekombinante Immunrezeptoren mit humanen Domänen in der Maus als immunogen erkannt und eliminiert werden. Daher haben wir Immunrezeptoren generiert, die ausschließlich aus murinen Domänen bestehen. Das Ziel ist die Ausstattung muriner T-Lymphozyten mit anti-CEA Rezeptoren mit keiner oder nur geringer Immunogenität bei einem *in vivo* Versuch in immunkompetenten Mäusen. Um diese T-Zell Rezeptoren zu generieren, wurde die humanisierte BW431/26scFv Bindedomäne der Rezeptoren #895, #898 und #907 gegen die murine SCA-431scFv Bindedomäne ausgetauscht. Nachfolgend untersuchten wir die Rezeptorvermittelte Aktivierung der humanen T-Zellen mit den neu generierten Immunrezeptoren. Hierfür wurden humane CD3⁺ T-Zellen durch retroviralen Gentransfer mit den Immunrezeptoren mit der CD3 ζ Signalkette (#977), mit der CD3 ζ -OX40 Signaldomäne (#978) und mit der CD28-CD3 ζ Signaleinheit (#982) ausgestattet. Durch die Kreuzvernetzung der murinen IgG-„spacer“ Domäne des Rezeptors wurden T-Zellen zur IFN- γ Sekretion induziert, wobei T-Lymphozyten mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor (#982) stärker zur IFN- γ Sekretion aktiviert wurden als T-Zellen mit

dem CD3 ζ (#977) und dem CD3 ζ -OX40 (#978) Immunrezeptor. Ferner ermöglicht die ko-stimulatorische CD28 Domäne die Rezeptor-vermittelte Induktion der IL-2 Sekretion bei T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor (#982). Bei der Ko-Inkubation der humanen T-Zellen mit CEA spezifischen Immunrezeptoren (#977, #978 und #982) mit CEA⁺ Tumorzellen wurden T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor stärker zur IFN- γ Sekretion induziert als T-Zellen mit dem CD3 ζ (#977) und dem CD3 ζ -OX40 (#978) Immunrezeptor. Es wurde ferner gezeigt, dass T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor mit der CD3 ζ Signalkette(#977), mit der CD3 ζ -OX40 Signaleinheit (#978) und mit der CD28-CD3 ζ Signaldomäne (#982) gleich stark Antigen spezifisch zur Zytolyse der CEA⁺ Tumorzellen induziert werden.

Im Hinblick auf den geplanten experimentellen Einsatz der rekombinanten Rezeptoren in immunkompetenten C57-Black/6 Mäusen untersuchten wir, ob murine CD8⁺ T-Lymphozyten die neu generierten Immunrezeptoren #977, #978 und #982 exprimieren. Hierfür wurden murine CD8⁺ T-Zellen durch retroviralen Gentransfer mit Immunrezeptoren mit ausschließlich murinen Domänen SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (#978) und SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982) mit einer Frequenz von ca. 50 % transduziert. Offensichtlich führt der Austausch der humanisierten CEA spezifischen Bindedomäne BW431/26 gegen die murine anti-CEA Bindedomäne SCA-431 nicht zur Minderung der Expression der rekombinanten Immunrezeptoren auf der Oberfläche muriner T-Zellen.

4.3 *In vivo* Evaluierung des Immunrezeptoransatzes.

Wir verwendeten ausschließlich immunkompetente C57-Black/6 Mäuse, um den immuntherapeutischen Ansatz an einem „naturnahen“ Tiermodell zu evaluieren. Dabei haben wir zunächst untersucht, ob die subkutaner Injektion der Zellen der murinen Kolonkarzinomzelllinie C15A3 (CEA⁺) und MC-38 (CEA⁻) zur Tumorentwicklung in C57-Black/6 Mäusen führt. Wir zeigten, dass Zellen der Linie C15A3 und MC-38 dosisabhängig einen Tumor in C57-Black/6 Mäusen induzieren, wobei bereits 1×10^5 Tumorzellen für die Tumoretablierung ausreichend sind.

Wir wollten nun untersuchen, ob die Ko-Injektion von T-Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren mit CEA⁺ Tumorzellen zur Eliminierung des syngenen CEA⁺ Tumors führt und welchen Einfluss die Insertion der CD28 ko-stimulatorischen Domäne auf die

Induktion der Rezeptor-vermittelten zytolytischen Aktivität der T-Zellen hat.

Hierfür haben wir murine CD8⁺ T-Zellen mit CEA spezifischem Immunrezeptor mit der CD3 ζ (#895) und der CD28-CD3 ζ (#907) Signaldomäne ausgestattet und mit CEA⁺ Tumorzellen subkutan ko-injiziert. Während alle Kontrolltiere (6/6), ko-injiziert mit nicht-transduzierten T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen, in einem Zeitraum von 15 Tagen Tumore entwickelten, blieben alle Versuchstiere nach der Ko-Injektion der CEA⁺ Tumorzellen mit T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor #895 und mit den T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor #907 im selben Zeitraum tumorfrei. Dieses Ergebnis bestätigt teilweise das Resultat der Mausversuche, die die Arbeitsgruppe um N. M. Haynes, 2002, publiziert hat. In diesem Ansatz wurden ErbB2⁺ Tumorzellen den BALB/c Versuchsmäusen subkutan injiziert und anschließend angereicherte murine CD8⁺ T-Zellen, ausgestattet mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ und der CD28-CD3 ζ Signaldomäne, appliziert. Die anschließende Untersuchung des Tumorwachstums ergab, dass Versuchstiere, die am selben Tag mit T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor und ErbB2⁺ Tumorzellen injiziert wurden, ein geringeres Tumolvolumen nach drei Wochen aufwiesen als Versuchstiere, denen T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor und ErbB2⁺ Tumorzellen appliziert wurden. Es wurde ferner gezeigt, dass mit steigendem zeitlichen Abstand zwischen der Injektion (s.c.) der ErbB2⁺ Tumorzellen und der Applikation (i.v.) der ErbB2 spezifischen T-Zellen die tumorprotektive Wirkung in den Versuchstieren abnimmt. Durch die unterschiedlichen Bedingungen beim Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung ist das Maus-Modell der Arbeitsgruppe um Haynes mit unserem Maus-Modell nur begrenzt vergleichbar. Die erhöhte tumorprotektive Wirkung der murinen CD8⁺ T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor gegenüber T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor wurde bei uns nicht registriert, was beispielsweise daran liegen kann, dass die T-Zellen dort zeitverzögert intravenös injiziert wurden. Außerdem unterscheiden sich die beiden Maus-Modelle durch den unterschiedlichen Rezeptorbau, anderes Zielantigen und der Verwendung anderer Zelllinien.

Wir haben uns anschließend gefragt, ob die Versuchstiere die zuvor erfolgreich CEA⁺ Tumorzellen eliminiert haben, ein „immunologisches Gedächtnis“ generiert haben, das bei erneuter Injektion („Challenge“) mit CEA⁺ Tumorzellen die Etablierung des CEA⁺ Tumors ganz oder teilweise verhindert. Hierfür wurden Versuchstiere, die vor zwei Wochen mit CEA⁺ Tumorzellen und mit T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor oder mit T-Zellen mit dem kombinierten CD28-CD3 ζ Immunrezeptor ko-injiziert wurden,

erneut mit CEA⁺ Tumorzellen injiziert. Während die Hälfte der Versuchstiere, die zuvor mit CEA⁺ Tumorzellen und T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor ko-injiziert wurden nach dem „Challenge“-Versuch einen Tumor entwickelte (3/6), blieben alle Versuchstiere, die zuvor mit CEA⁺ Tumorzellen und T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor ko-injiziert wurden, nach erneuter Injektion („Challenge“) mit CEA⁺ Tumorzellen tumorfrei. Als Kontrolle entwickelten alle Versuchstiere (6/6) einen Tumor, die mit CEA⁺ Tumorzellen injiziert wurden. Offensichtlich ist die Tumorprotektion nach erneuter Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen bei Versuchstieren mit zuvor injizierten T-Zellen mit dem CD3 ζ Immunrezeptor (#895) effektiver als bei Versuchstieren mit zuvor injizierten T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Immunrezeptor (#907). In der Literatur ist bisher wenig über die Generierung eines Immunrezeptor-vermittelten „immunologischen Gedächtnisses“ bei murinen und humanen T-Zellen bekannt. Moeller *et al.*, 2005, haben gezeigt, dass BALB/c Versuchsmäuse nach einer initialen Injektion mit murinen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit dem ErbB2 spezifischen CD28-CD3 ζ Immunrezeptor und mit ErbB2⁺ Tumorzellen auch nach einer erneuten Applikation („Challenge“) der ErbB2⁺ Zellen tumorfrei bleiben. Interessanterweise lässt die tumorprotektive Wirkung deutlich in der Effizienz nach, wenn zuvor ausschließlich murine CD8⁺ T-Zellen mit dem ErbB2 spezifischen CD28-CD3 ζ Immunrezeptor injiziert wurden. Pule *et al.*, 2005, haben einen rekombinanten Immunrezeptor mit drei Signaldomänen generiert, wobei im cytosolischen Teil des Rezeptors, neben der CD3 ζ und der CD28 Signaleinheit, die ko-stimulatorische OX40 Signaldomäne integriert wurde. Zusammengefasst erwies sich die OX40 Kostimulation während der Antigen spezifischen Immunantwort als wirkungsvoller „Verstärker“ zur Verlängerung des Überlebens von Antigen spezifischen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. Der Einsatz der T-Zellen mit derartig konstruierten Immunrezeptoren könnte als effizientes Mittel bei einem Tumorrezidiv wirken und zur Antigen spezifischen Eliminierung der Tumorzellen beitragen.

Wir konnten bisher zeigen, dass murine CD8⁺ T-Zellen mit rekombinanten CEA spezifischen Immunrezeptoren mit der CD3 ζ Signalkette und der kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne bei Ko-Injektion mit CEA⁺ Tumorzellen effektiv die Entwicklung solider Tumore in C57-Black/6 Versuchsmäusen verhindern. Es ist dennoch unbeantwortet geblieben, ob die Hemmung der Entwicklung der Tumore, bei wiederholter Injektion der CEA⁺ Tumorzellen, spezifisch durch die zuvor applizierten T-Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren (#895) oder durch das eigene Immunsystem

der C57-Black/6 Maus vermittelt wird. Um diese Frage zu beantworten, haben wir C57-Black/6 Mäuse mit bestrahlten, teilungsunfähigen CEA⁺ Tumorzellen mit murinen CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem CEA spezifischen CD3 ζ Immunrezeptor (#895) ko-injiziert und nach zwei Wochen entweder mit CEA⁺ C15A3 Tumorzellen oder als Kontrolle mit CEA⁻ MC-38 Tumorzellen injiziert. Wir zeigten, dass Versuchstiere, die zuvor mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor #895 und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden, eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben in Abhängigkeit von der Zeit haben als Versuchstiere aus den Kontrollgruppen, die zuvor mit bestrahlten Tumorzellen und mit T-Zellen mit dem CD30 spezifischen Immunrezeptor (#892) oder mit nicht-transduzierten T-Zellen ko-injiziert wurden. Es ist festzuhalten, dass die wiederholte Injektion der CEA⁺ Tumorzellen bereits zu einem erheblichen Vakzinierungseffekt in immunkompetenten C57-Black/6 Versuchstieren führt, so dass mehr als 60 % der Versuchstiere, die zuvor mit bestrahlten und anschließend mit vitalen CEA⁺ Tumorzellen injiziert wurden, tumorfrei blieb. Diesen Vakzinierungseffekt machte sich die Arbeitsgruppe um Dr. Gilham zu Nutze, um die tumorprotektive Wirkung des immuntherapeutischen Ansatzes zu erhöhen (Jiang *et al.*, 2006). In dem Ansatz wurden BALB/c Versuchsmäuse mit Tumorzellen, die das humane h5T4 Antigen exprimieren, injiziert und anschließend mit replikationsdefizienten h5T4⁺ Adenoviren vakziniert. Nach einer Woche erfolgte die Injektion muriner CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit dem anti-h5T4-CD3 ζ Immunrezeptor. Dabei wurde gezeigt, dass die Vakzinierung und die Injektion der T-Zellen mit dem anti-h5T4-CD3 ζ Immunrezeptor Antigen spezifisch das Wachstum der h5T4⁺ Tumore hemmt. Zudem wurde registriert, dass der tumorsuppressive Effekt auf die h5T4⁺ Tumore bei zeitnaher Injektion der h5T4⁺ Tumorzellen und der T-Zellen mit anti-h5T4 Immunrezeptoren am höchsten ist und mit zunehmend zeitlichen Abstand abnimmt. Interessanterweise wird die Effizienz des immuntherapeutischen Ansatzes mit h5T4 spezifischen T-Zellen dadurch gesteigert, dass Versuchstiere mit einer Kombination aus murinen dendritischen Zellen (BMDC) und replikationsdefizienten h5T4⁺ Adenoviren vakziniert werden. Begründet wird dieses Phänomen dadurch, dass durch die Applikation der h5T4⁺ Adenoviren und der dendritischen Zellen es *in vivo* zur Generierung von Th1 Zellen kommt, die die tumorsuppressive Wirkung der injizierten h5T4 spezifischen T-Zellen gegenüber h5T4⁺ Tumorzellen verstärken (Palmer *et al.*, 2004). Ferner zeigten Lou *et al.*, 2004, dass T-Zellen mit definierter Antigenpezifität, ko-injiziert mit Antigen spezifischen dendritischen Zellen, zu einer verstärkten

Immunantwort gegen Zielzellen induziert werden, gezeigt durch eine erhöhte Proliferation der T-Zellen, verstärkte Tumordinfiltration und effektivere tumorsuppressive Wirkung.

Wir zeigten, dass immunkompetente C57-Black/6 Versuchstiere, die zuvor mit CEA spezifischen T-Zellen und bestrahlten CEA⁺ Zellen ko-injiziert wurden, bei erneuter Injektion („Challenge“) mit CEA⁺ Tumorzellen eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben in Abhängigkeit von der Zeit in Vergleich zu Versuchstieren haben, die als Kontrolle mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und CD30 spezifischen oder nicht-transduzierten murinen T-Zellen zuvor ko-injiziert wurden. Dieser Überlebensvorteil der Versuchstiere mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor (#895) gegenüber Mäusen aus den Kontrollgruppen entfällt dann, wenn die Mäuse nicht erneut mit CEA⁺ C15A3 Zellen, sondern mit den parentalen CEA⁻ MC-38 Zellen injiziert werden. Offensichtlich ist die Tumorprotektion CEA spezifisch. Um auszuschließen, dass dieses „immunologische Gedächtnis“ in den Versuchstieren durch endogene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen generiert wird, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den Versuchstieren depletiert. Anschließend wurden die Versuchsmäuse mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und mit T-Zellen mit dem anti-CEA Immunrezeptor (#895) und als Kontrolle mit bestrahlten T-Zellen mit dem anti-CEA Immunrezeptor (#895) ko-injiziert. Die Untersuchung des tumorfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Zeit zeigte, dass Versuchstiere, die mit murinen CD8⁺ T-Zellen mit CEA spezifischen Rezeptor (#895) und mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden, eine tendenziell erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu Versuchstieren haben, die als Kontrolle mit bestrahlten CEA spezifischen CD8⁺ T-Zellen und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden. Offensichtlich wird in den Versuchstieren der anti-CEA Effekt gegenüber CEA⁺ Tumorzellen durch persistierende T-Zellen mit dem anti-CEA-CD3 ζ Immunrezeptor (#895) vermittelt. Dieser anti-CEA Effekt wurde nicht bei Kontrolltieren ohne CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Depletion beobachtet, die mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und bestrahlten CEA oder CD30 spezifischen T-Zellen vakziniert und erneut mit vitalen CEA⁺ Tumorzellen injiziert wurden („Challenge“). Offenbar wird das „immunologische Gedächtnis“ gegenüber CEA⁺ Tumorzellen nicht durch die endogenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen generiert. Saha *et al.* zeigten, 2006, in ihrem Maus-Modell einen alternativen Weg, der möglicherweise zur Generierung CEA spezifischer T-Zellen und Gedächtniszellen führt. Hierfür wurden dendritische Zellen mit dem anti-idiotypischen Antikörper, der

das CEA Epitop imitiert, gepulst. Anschließend wurden C57-Black/6 Versuchsmäuse, transgen für das CEA, mit gepulsten dendritischen Zellen und CEA⁺ C15 Tumorzellen injiziert. Hierdurch wurden in der Maus CEA spezifische T-Zellen generiert, die mittels des MHC I Komplexes zur Eliminierung der CEA⁺ Tumore induziert wurden. Ferner wurde durch weitere Untersuchungen mittels Durchflußzytometrie gezeigt, dass 6 bis 12 Wochen nach erfolgreicher Eliminierung der CEA⁺ Tumorzellen eine signifikant erhöhte Expression der Markerproteine LY-6C, CD44 und CD127 auf der Oberfläche der murinen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen registriert wurde, die indikativ für die Generierung von Gedächtnis-T-Zellen sind. Um die Generierung des tumor-protektiven „immunologischen Gedächtnisses“ zu beweisen, hat die Arbeitsgruppe um A. Saha 90 Tage nach der Vakzinierung mit dendritischen Zellen und CEA⁺ Tumorzellen die Versuchstiere erneut mit CEA⁺ C15 Tumorzellen injiziert („Challenge“). Das Ergebnis zeigt, dass die Versuchstiere eine gleich effiziente Tumorprotektion gegen die CEA⁺ C15 als auch die CEA⁻ MC-38 Tumorzellen nach Vakzinierung mit gepulsten dendritischen Zellen generiert haben, was in unserem Maus-Modell als Vakzinierungseffekt beschrieben wird. Mit unserem Maus-Modell zeigen wir, dass dieser Vakzinierungseffekt genauso durch bestrahlte, teilungsunfähige CEA⁺ Tumorzellen generiert wird. Aus unseren Ergebnissen geht zusätzlich hervor, dass die Ko-Injektion der T-Zellen mit dem CEA spezifischen CD3ζ Immunrezeptor (#895) und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen zusätzlich zur Generierung eines CEA spezifischen „immunologischen Gedächtnisses“ führt, das offenbar auf die CEA spezifischen T-Zellen zurückzuführen ist.

Die Untersuchung der humoralen Antwort gegen CEA⁺ Tumore in immunkompetenten C57-Black/6 Mäusen hat uns zudem gezeigt, dass CEA spezifische Antikörper ausschließlich im Blutserum der Versuchstiere detektierbar sind, die einen soliden CEA⁺ Tumor entwickelt haben. Dabei spielt es offenbar keine Rolle, ob die Versuchstiere zuvor mit CEA⁺ Tumorzellen und mit T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor (#895) oder als Kontrolle mit nicht-transduzierten T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen ko-injiziert wurden. Die Höhe des Antikörpertiters im Blutserum ist nicht von der Größe des Tumors abhängig und entsprechend für alle Versuchstiere mit einem soliden Tumor gleich hoch. Jiang *et al.*, 2006, zeigten, dass in Mauseren der Versuchstiere drei Wochen nach der Vakzinierung mit h5T4⁺ replikationsdefizienten Adenoviren und dendritischen Zellen h5T4 und anschließender Ko-Injektion mit h5T4⁺ Tumorzellen und T-Zellen, ausgestattet mit dem anti-h5T4-

CD3 ζ Immunrezeptor, spezifische Antikörper gegen h5T4 detektiert wurden. Der dortige Ansatz diskriminiert jedoch nicht zwischen Versuchstieren mit und ohne Tumorentwicklung, wodurch nur der durchschnittliche und nicht der individuelle Antikörpertiter gezeigt wird.

In der Literatur ist bisher unbeantwortet geblieben, ob für den immuntherapeutischen Ansatz im Menschen der rekombinante Immunrezeptor humanisiert werden muss. Wir haben deswegen bei der weiteren Untersuchung der humoralen Immunantwort uns die Frage gestellt, ob die rekombinanten Immunrezeptoren selbst als Fremd-Antigene durch das Immunsystem der immunkompetenten C57-Black/6 Maus erkannt werden. Getestet wurden T-Zellen mit rekombinanten anti-CEA Rezeptoren mit ausschließlich humanen (#439), gemischt human-murinen (#895) oder ausschließlich murinen Domänen (#977). Hierfür wurden Versuchstiere nach einem festgelegten Schema (Abb. 58) mit murinen Rezeptor tragenden T-Zellen und bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen vakziniert und anschließend nach vier Wochen erneut mit Rezeptor-tragenden T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen injiziert („Challenge“). Wir haben durch die Untersuchung der gewonnenen Mausseren gezeigt, dass zwei Wochen nach der Ko-Injektion mit bestrahlten CEA⁺ Tumorzellen und mit Rezeptor-tragenden T-Zellen oder als Kontrolle mit nicht-transduzierten T-Zellen keine Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne und die humanisierte CEA spezifische Bindedomäne BW431/26 der Immunrezeptoren #439 und #895 generiert werden. Hingegen wurden in den Mausseren 7 und 14 Tage nach der wiederholten Applikation („Challenge“) mit Rezeptor-tragenden T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne detektiert. Hierbei handelte es sich um Versuchstiere, die zunächst mit T-Zellen mit dem humanen anti-CEA Immunrezeptor #439 und bestrahlten CEA⁺ Zellen vakziniert und anschließend erneut mit T-Zellen mit dem humanen Immunrezeptor #439 oder mit dem murinen Immunrezeptor #977 und CEA⁺ Zellen injiziert wurden („Challenge“). Es wurden keine Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne im Blutserum der Versuchstiere detektiert, die als Kontrolle ausschließlich mit T-Zellen mit dem murinen Rezeptor #977 vakziniert wurden. Offenbar werden unter den gegebenen Versuchsbedingungen Antikörper gegen die humane IgG-„spacer“ Domäne des rekombinanten Immunrezeptors #439 generiert. Gleichzeitig wurden keine Antikörper gegen die humanisierte CEA spezifische Bindedomäne BW431/26scFv der Rezeptoren #439 und #895 im Blutserum der Versuchstiere detektiert. Offensichtlich führen die humanen „framework Regionen“ zwischen den hypervariablen Regionen des Einzelketten-Antikörpers in der

Maus nicht zur Generierung von Antikörpern gegen die humanisierte anti-CEA Bindedomäne BW431/26scFv. Um jedoch die potentielle Immunogenität der murinen Bindedomäne in einer klinischen Studie auszuschließen, gibt es zwei Varianten, Antikörper mit murinen Ketten zu humanisieren (Gonzales *et al.*, 2005). Einerseits ist es möglich, die murinen „framework Regionen“ gegen humane auszutauschen, andererseits führt die Proteinstrukturanalyse zur Identifizierung der Aminosäuren im hypervariablen CDR Bereich (complementarity determining region), welche dem Antikörper die Bindungsspezifität zum Antigen verleihen. Aufgrund dieser Analyse werden die benötigten murinen hypervariablen Regionen in das Gerüst eines humanen Antikörpers integriert. Klinische Studien mit derartig humanisierten Antikörpern IDEC-131 (Kalunian *et al.*, 2002), OKT3 (Friend *et al.*, 1999), rhuMAb (Cobleigh *et al.*, 1999) und h-R3 (Crombet *et al.*, 2004), die zu ca.10 % murine Sequenzen enthalten, zeigen, dass der Einsatz in Patienten zu einer geringen oder keinen humoralen Antwort gegenüber dem humanisierten Antikörper führt, wobei die Antikörper Bestimmung mittels ELISA erfolgte. In anderen klinischen Studien wurde im Blutserum der Patienten mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz Methode (SPR) ein erhöhte Antikörpertiter gegen den humanisierten Antikörper, besonders gegen die hypervariablen Regionen im CDR Bereich, detektiert (Ritter *et al.*, 2001; Welt *et al.*, 2003). Offensichtlich besteht gegenwärtig kein einheitliches Bild zu diesem Thema in der Literatur. Dieses mag darauf beruhen, dass in manchen klinischen Studien der erfolgreiche Nachweis von anti-idiotypischen Antikörpern gegen die eingesetzten humanisierten Antikörperdomänen auf den Einsatz der sensitiveren SPR statt der ELISA Technik zurückzuführen ist.

4.4 Funktionelle Charakterisierung löslicher Antikörper mit Spezifität für humanes CEA und ErbB2 Protein.

Zahlreiche Tumor-assoziierte-Proteine (TAA), beispielsweise CEA und ErbB2 werden auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert, proteolytisch gespalten und freigesetzt, so dass eine erhöhte Konzentration des freigesetzten Proteins im Blut als Tumormarker detektiert werden kann (Gonda *et al.*, 2006). Daher ist es vorstellbar, dass T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptoren mit Spezifität für ein solches TAA durch das lösliche Antigenfragment in der Bindung an membranständiges TAA kompetitiv gehemmt werden. Um diese Frage zu beantworten, haben wir die Bindung der CEA und ErbB2

spezifischen Antikörper an membranständiges CEA und ErbB2 in Gegenwart eines löslichen Antigens als Kompetitor (ErbB2-hIgG und CEA) untersucht. Wir haben fünf ErbB2 spezifische Antikörper mit Spezifität für dasselbe Antigen Epitop, aber unterschiedlicher Affinität für ErbB2 (k_D : $3,2 \times 10^{-7} \text{ M}$ - $1,5 \times 10^{-11} \text{ M}$) generiert und miteinander verglichen. Zum Nachweis der Bindung an membranständiges ErbB2 wurden die Antikörper mit ErbB2⁺ Tumorzellen ko-inkubiert und die Bindung an die Tumorzellen mittels eines Detektionsantikörpers mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Dabei wurde gezeigt, dass die ErbB2 spezifischen Antikörper (#788, #789, #790 und #791) mit einer Dissoziationskonstante von $k_D \leq 1,2 \times 10^{-8}$ gleich stark an membranständiges ErbB2 binden. Die Bindung des niederaffinen anti-ErbB2 Antikörpers (#792) an membranständiges ErbB2 ist im Vergleich zu den höheraffinen anti-ErbB2 Antikörper (#788 bis #791) deutlich geringer. Im nachfolgenden Experiment wurden ErbB2 spezifische Antikörper durch die Zugabe des löslichen Kompetitors ErbB2-hIgG ab einer Konzentration von ca. $1 \mu\text{g/ml}$ kompetitiv gehemmt. Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an membranständiges ErbB2 erreicht ist, ist für alle verwendeten ErbB2 spezifischen Antikörper gleich und beträgt etwa $2,8 \mu\text{g/ml}$ des Kompetitors. Offensichtlich hängt die kompetitive Hemmung der Bindung ErbB2 spezifischer Antikörper an membranständiges ErbB2 der Tumorzellen nicht von der unterschiedlichen Affinität der anti-ErbB2 Antikörper ab.

Dass das ErbB2-Modell nicht auf das CEA-Modell übertragbar ist, haben wir bei der Untersuchung der CEA spezifischen Antikörper BW431/26scFv-hIgG (#443) und H10scFv-hIgG (#648) gezeigt, die für zwei unterschiedliche Epitope des CEA spezifisch sind. Im Kompetitionsassay haben wir gezeigt, dass CEA spezifische Antikörper durch die Zugabe des löslichen CEA [$0,1 \mu\text{g/ml}$ bis $10 \mu\text{g/ml}$] nicht in der Bindung an membranständiges CEA kompetitiv gehemmt werden. Vielmehr wird die Bindung CEA spezifischer Antikörper (#443 und #648) an membranständiges CEA durch die Zugabe des löslichen CEA verstärkt, was durch die gleichzeitige Bindung der dimeren anti-CEA Antikörper an gelöstes und membranständiges CEA erklärbar ist.

4.5 Einfluss des löslichen ErbB2 Proteins als Kompetitor auf die Rezeptor-vermittelte Aktivierung ErbB2 spezifischer T-Zellen.

Die Tatsache, dass zahlreiche TAA, beispielsweise ErbB2 (Myers *et al.*, 1996), proteolytisch gespalten, freigesetzt und in erhöhter Konzentration als Tumormarker im Patientenblut detektiert sind, führt zu der Frage, ob die Rezeptor-vermittelte Aktivierung humaner T-Zellen mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren durch die Zugabe des löslichen Kompetitors ErbB2 gehemmt wird. Hierfür wurden T-Zellen mit rekombinanten anti-ErbB2-CD3 ζ Immunrezeptoren C6-B1D2scFv-hIgG-mCD3 ζ (#710), C6ML3-9scFv-hIgG-mCD3 ζ (#744), C6.5scFv-hIgG-mCD3 ζ (#746), C6MH3-B1scFv-hIgG-mCD3 ζ (#748) und C6.5G98AscFv-hIgG-mCD3 ζ (#750) mit ErbB2⁺ Tumorzellen in Gegenwart des löslichen ErbB2 ko-inkubiert. Die Wirkung des löslichen Kompetitors auf die T-Zell Aktivierung wurde anhand der IFN- γ Sekretion und Messung des zytolytischen Effektes auf ErbB2⁺ Tumorzellen bestimmt. Wir haben gezeigt, dass humane CD3⁺ T-Lymphozyten mit ErbB2 spezifischen Immunrezeptoren #710, #744, #746, #748 und #750 durch die Ko-Inkubation mit ErbB2⁺ Tumorzellen zur IFN- γ Sekretion aktiviert werden, wobei T-Lymphozyten mit den hoch affinen ($k_D \leq 1,2 \times 10^{-8}$) Immunrezeptoren #710, #744, #746 und #748, gleich stark zur IFN- γ Sekretion induziert werden. T-Lymphozyten mit dem nieder affinen anti-ErbB2 Rezeptor #750 ($k_D = 3,2 \times 10^{-7}$ M) werden im Vergleich zu T-Zellen mit den höher affinen Immunrezeptoren für ErbB2 durch die Ko-Inkubation mit ErbB2⁺ Tumorzellen weniger stark zur IFN- γ Sekretion induziert. Die Zugabe des löslichen ErbB2 Antigens führt zur geminderten Induktion der IFN- γ Sekretion in Abhängigkeit von der Konzentration des löslichen Kompetitors, wobei die Rezeptor-vermittelte Induktion der IFN- γ Sekretion durch T-Zellen mit den hochaffinen Immunrezeptoren für ErbB2 #710, #744, #746 und #748 als auch mit dem niederaffinen Immunrezeptor #750 durch die Zugabe des löslichen Kompetitors mit gleicher Kinetik gehemmt wird. Dieses Resultat entspricht dem Ergebnis, das die Arbeitsgruppe um T. Sasaki mit Hilfe des CEA-Modells gezeigt hat (Sasaki *et al.*, 2006). Hierfür wurde ein CEA spezifischer Immunrezeptor mit einer kombinierten CD28-CD3 ζ generiert und in humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Anschließend wurden die T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor mit CEA⁺ Tumorzellen ko-inkubiert, wobei das lösliche CEA Antigen als Kompetitor in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wurde. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen mit dem anti-CEA-CD28-CD3 ζ Immunrezeptor durch die

Zugabe des löslichen CEA (2 µg/ml) nicht in der Aktivierung des zytolytischen Effekts auf CEA⁺ Tumorzellen gehemmt werden. Es ist anzumerken, dass die durchschnittliche Konzentration des CEA im Blut von Patienten mit Kolonkarzinom unter 1 µg/ml liegt. Hombach *et al.*, 1999, zeigten, dass murine T-Zellen der Linie MD45 mit dem anti-CEA-hIgG-γ Immunrezeptor durch Ko-Kultur mit CEA⁺ Tumorzellen zur Zytolyse dieser Tumorzellen und IL-2 Sekretion induziert werden, wobei die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der T-Zellen durch die Zugabe des löslichen CEA Proteins als Kompetitor (≤ 25 µg/ml) nicht gehemmt wurde. Hingegen hat die Arbeitsgruppe um T. Sasaki gezeigt, dass die Zugabe des löslichen CEA (2 µg/ml) die Induktion der Rezeptor-vermittelten IFN-γ Sekretion durch die CEA spezifischen T-Zellen mindert, was wir am ErbB2-Modell ebenfalls gezeigt haben. Die Arbeitsgruppe um T. Zhang untersuchte ebenfalls den Einfluss eines löslichen Kompetitors auf die Rezeptor-vermittelte T-Zell Aktivierung (Zhang *et al.*, 2006). Dabei wurde ein rekombinanter Immunrezeptor generiert, der sich aus der NKG2D Rezeptorbindedomäne der natürlichen Killerzellen (NK) und der CD3ζ Signalkette der T-Zellen zusammensetzt. Der NKG2D Immunrezeptor bindet den Liganden MICA, welcher als Stressprotein auf der Oberfläche zahlreicher Epitheltumore in einer erhöhten Dichte exprimiert wird. Die Tatsache, dass MICA proteolytisch gespalten und in einer erhöhten Konzentration (0,2 - 10 ng/ml) im Patientenblut vorkommt, veranlasste die Forscher der Frage nachzugehen, ob durch die Zugabe des löslichen MICA die Induktion der Rezeptor-vermittelten Zytolyse der MICA⁺ Tumorzellen durch T-Zellen mit dem NKG2D-CD3ζ Immunrezeptor gemindert wird. Dabei wurde gezeigt, dass eine Konzentration des Kompetitors von 1,5 µg/ml Inkubationsmedium nicht ausreichend ist, um eine Hemmung der spezifischen Zytolyse durch T-Zellen mit dem NKG2D-CD3ζ Immunrezeptor gegenüber MICA⁺ Tumorzellen zu induzieren. Erst ab einer Konzentration von 15 µg/ml, die um mehr als das 1000-fache den Blutwert eines durchschnittlichen Krebspatienten übersteigt, wurde eine Hemmung der Zytolyse registriert, womit erneut gezeigt wurde, dass bei einem immuntherapeutischen Ansatz am Patienten eine Hemmung der TAA spezifischen T-Zellen durch das lösliche Zielantigen nicht zu erwarten ist.

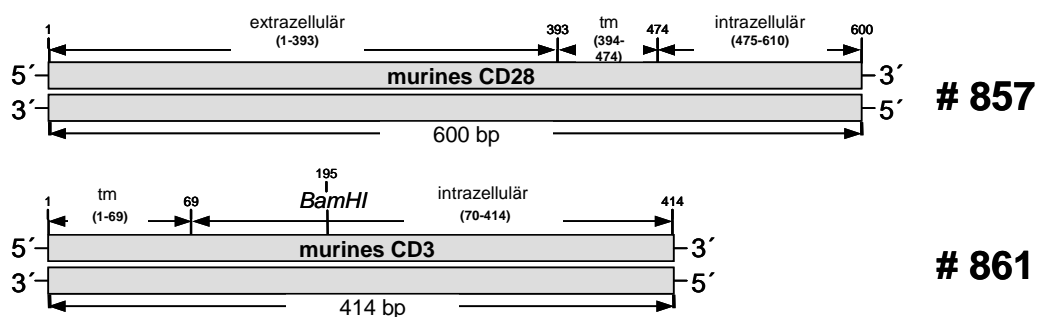
5 Zusammenfassung

Ein erfolgsversprechender Ansatz der adoptiven Immuntherapie zur Behandlung maligner Tumore beruht darauf, T-Zellen durch einen rekombinanten Rezeptor Spezifität für ein Tumor-assoziiertes-Antigen (TAA) zu verleihen. Derartige Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Bindedomäne, die von einem Einzelketten-Antikörper (scFv) abgeleitet ist und einer intrazellulären Signalkette, die der T-Zell Aktivierung dient. Zahlreiche Ansätze zur Evaluierung der Immunrezeptor-Strategie basierten bisher auf der Verwendung immundefizienter Maus-Modelle, die nur unzureichend die physiologische Immunsituation wiedergeben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Immunrezeptor-Strategie am Beispiel des anti-CEA Rezeptors in einem immunkompetenten Mausmodell zu evaluieren. Hierfür wurden murine Rezeptoren mit Spezifität für CEA und mit der CD3 ζ oder der kombinierten CD28-CD3 ζ Signalkette generiert und durch retroviralen Gentransfer in humanen und in murinen T-Zellen exprimiert. Die Rezeptor-vermittelte T-Zell Aktivierung wurde anhand der IFN- γ Sekretion und zytolytischen Aktivität *in vitro* charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass humane und murine T-Zellen mit den rekombinanten CD28-CD3 ζ Rezeptoren stärker zur IFN- γ Sekretion induziert werden als mit den CD3 ζ Rezeptoren, jedoch wird die spezifische lytische Aktivität gleich stark induziert. Durch die Ko-Injektion der CEA⁺ Tumorzellen mit CD8⁺ T-Zellen mit dem anti-CEA-CD3 ζ Rezeptor (#895) und T-Zellen mit dem anti-CEA-CD28-CD3 ζ Rezeptor (#907) wurden die CEA⁺ Tumore in der immunkompetenten Maus effizient eliminiert. Bei einer erneuten Injektion der CEA⁺ Tumorzellen blieben Tiere, die zuvor die Tumorzellen mit Hilfe der T-Zellen mit dem CD3 ζ Rezeptor (#895) eliminiert hatten, tumorfrei, wohingegen die Hälfte der Tiere, die zuvor mit T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ Rezeptor (#907) injiziert wurden, einen Tumor entwickelte. Diese und weitere Untersuchungen zeigen, dass T-Zellen mit dem anti-CEA-CD3 ζ Rezeptor (#895) zur Generierung eines Antigen spezifischen „immunologischen Gedächtnisses“ in C57-B1/6 Mäusen führen. Unsere Untersuchungen mit Hilfe immunkompetenter Mausmodelle legen nahe, dass die Immunrezeptorstrategie möglicherweise für die Vorbeugung früher Rezidive durch Ausbildung eines Antigen spezifischen Gedächtnisses geeignet sein könnte. Dieses würde die Indikation der Immunrezeptorstrategie erheblich erweitern.

6 Anhang

6.1 DNA Sequenzen der murinen CD3 ζ und CD28 Signalkette.

Gezeigt werden die cDNA Sequenzen für die murinen Proteine CD3 ζ und CD28, die in die Vektoren pCR 2.1-murine-CD3- ζ (# 861) und pCR 2.1-murine-CD28 (# 857) kloniert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird oberhalb der DNA Sequenz im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Ein “*” kennzeichnet das Stopcodon. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung dienten, sind durch Fett-Druck gekennzeichnet.



6.1.1 # 857: pCR 2.1-murine-CD28

	N	K	I	L	V	K	Q	S	P	L	L	V	V	D	S	N	E	V	S	L	S	C	R	Y
1	AACAAGATTTTG	GTAAAGCAGTCG	CCCCTGCTTGTG	GTAGATAGCAAC	GAGGTGAGCCTC	AGCTGCAGGTAT																		
	TTGTTCTAAAC	CATTTCGTCAGC	GGGACGAACAC	CATCTATCGTTG	CTCCAGTCGGAG	TCGACGTCCATA																		
	S	Y	N	L	L	A	K	E	F	R	A	S	L	Y	K	G	V	N	S	D	V	E	V	C
73	TCCTACAACCTT	CTCGCAAAGGAA	TTCCGGGCATCC	CTGTACAAGGGC	GTGAACAGCGAC	GTGGAAGTCTGT																		
	AGGATGTTGGAA	GAGCGTTTCCTT	AAGGCCCGTAGG	GACATGTTCCCG	CACCTTGTGCTG	CACCTTCAGACA																		
	V	G	N	G	N	F	T	Y	Q	P	Q	F	R	S	N	A	E	F	N	C	D	G	D	F
145	GTCGGGAATGGG	AATTTTACCTAT	CAGCCCCAGTTT	CGCTCGAATGCC	GAGTTCAACTGC	GACGGGGATTTT																		
	CAGCCCTTACCC	TTAAAATGGATA	GTCGGGGTCAAA	GCGAGCTTACGG	CTCAAGTTGACG	CTGCCCTAAAG																		
	D	N	E	T	V	T	F	R	L	W	N	L	H	V	N	H	T	D	I	Y	F	C	K	I
217	GACAACGAAACA	GTGACGTTCCTG	CTCTGGAATCTG	CAGTCAATCAC	ACAGATATTTAC	TTCTGCAAAATT																		
	CTGTTGCTTTGT	CACTGCAAGGCA	GAGACCTTAGAC	GTGCAGTTAGTG	TGTCTATAAATG	AAGACGTTTTAA																		
	E	F	M	Y	P	P	P	Y	L	D	N	E	R	S	N	G	T	I	I	H	I	K	E	K
289	GAGTTCATGTAC	CCTCCGCCTTAC	CTAGACAACGAG	AGGAGCAATGGA	ACTATTATTCAC	ATAAAAGAGAAA																		
	CTCAAGTACATG	GGAGGCGGAATG	GATCTGTTGCTC	TCCTCGTTACCT	TGATAATAAGTG	TATTTTCTCTTT																		
	H	L	C	H	T	Q	S	S	P	E	L	F	W	A	L	V	V	V	A	G	V	L	F	C
361	CATCTTTGTTCAT	ACTCAGTCATCT	CCTGAGCTGTTT	TGGGCACTGGTC	GTGGTTGCTGGA	GTCTGTTTTTGT																		
	GTAGAAACAGTA	TGAGTCAGTAGA	GGACTCGACAAA	ACCCGTGACCAG	CACCAACGACCT	CAGGACAAAACA																		
	Y	G	L	L	V	T	V	A	L	C	V	I	W	T	N	S	R	R	N	R	L	L	Q	S
433	TATGGCTTGCTA	GTGACAGTGGCT	CTTTGTGTTATC	TGGACAAATAGT	AGAAGGAACAGA	CTCCTTCAAAGT																		
	ATACCGAACGAT	CACTGTCACCGA	GAAACACAATAG	ACCTGTTTATCA	TCTTCCTTGTCT	GAGGAAGTTTCA																		
	D	Y	M	N	M	T	P	R	R	P	G	L	T	R	K	P	Y	Q	P	Y	A	P	A	R
505	GACTACATGAAC	ATGACTCCCCGG	AGGCCCTGGGCTC	ACTCGAAAGCCT	TACCAGCCCTAC	GCCCCTGCCAGA																		
	CTGATGTACTTG	TACTGAGGGGCC	TCCGGACCCGAG	TGAGCTTTTCGGA	ATGGTCCGGGATG	CGGGGACGGTCT																		
	D	F	A	A	Y	R	P	*																
577	GACTTTGCAGCG	TACCGCCCTGGA																						
	CTGAAACGTCCG	ATGGCGGGGACT																						

6.1.2 # 861: pCR 2.1-murine-CD3 ζ

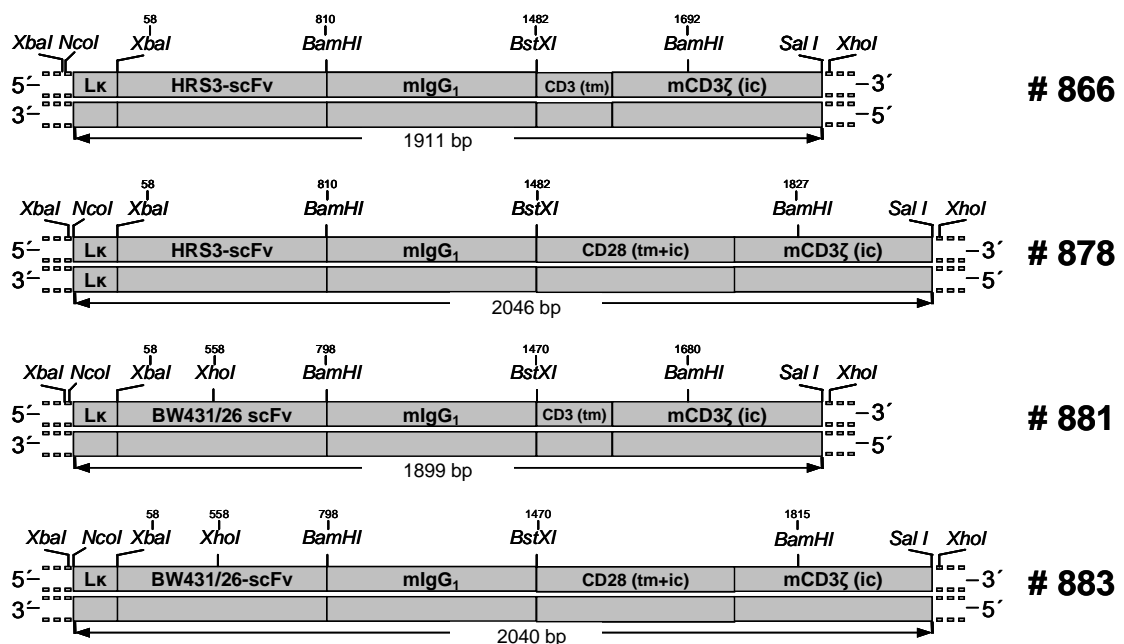
```

      D P K L C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L
1    GATCCCAAAC TC TGCTACTTGCTA GATGGAATCC TC TTCATCTACGGA GTCATCATCACA GCCCTGTACCTG
    CTAGGGTTTGAG ACGATGAACGAT CTACCTTAGGAG AAGTAGATGCCT CAGTAGTAGTGT CGGGACATGGAC
      R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L
73   AGAGCAAATTC AGCAAGGAGTGCA GAGACTGTGCC AACCTGCAGGAC CCCAACCAGCTC TACAATGAGCTC
    TCTCGTTTTAAG TCGTCTCACGT CTCTGACGACGG TTGGACGTCCTG GGGTTGGTCGAG ATGTTACTCGAG
                                     BamHI
                                     ~~~~~
      N L G R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K
145  AATCTAGGGCGA AGAGAGGAATAT GACGTCTTGGAG AAGAAGCGGGCT CGGGATCCAGAG ATGGGAGGCAAA
    TTAGATCCCGCT TCTCTCCTTATA CTGCAGAACCTC TTCTTCGCCCGA GCCCTAGGTCTC TACCCTCCGTTT
      Q Q R R R N P Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y
217  CAGCAGAGGAGG AGGAACCCCGAG GAAGCGTATAC AATGCACTGCAG AAAGACAAGATG GCAGAAGCCTAC
    GTCGTCTCCTCC TCCTTGGGGGTC CTTCCGCATATG TTACGTGACGTC TTTCTGTTCTAC CGTCTTCGGATG
      S E I G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T
289  AGTGAGATCGGC ACAAAGGCGAG AGGCGGAGAGGC AAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAG GGTCTCAGCACT
    TCACTCTAGCCG TGTTTTCCGCTC TCCGCCTCCG TTCCCCGTGCTA CCGGAAATGGTC CCAGAGTCGTGA
      A T K D T Y D A L H M Q T L A P R *
361  GCCACCAAGGAC ACCTATGATGCC CTGCATATGCAG ACCCTGGCCCT CGCTAA
    CGGTGGTTCTCG TGGATACTACGG GACGTATACGTC TGGGACCGGGGA GCGATT

```

6.2 DNA Sequenzen der rekombinanten Immunrezeptoren erster Generation mit Spezifität für CEA und CD30.

Gezeigt wird die DNA Sequenz der rekombinanten Immunrezeptoren pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD3 ζ (# 866), pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (# 878), pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD3 ζ (# 881) und pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3 ζ (# 883). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird oberhalb der DNA Sequenz im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Ein "*" kennzeichnet das Stopcodon. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienen, sind durch Fett-Druck gekennzeichnet.



6.2.1 # 866: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD3ζ

								<i>XbaI</i>
								~~~~~
	M D F Q	V Q I F	S F L L	I S A S	V I M S	R V A Q		
1	ATGGATTTCAG	GTGCAGATTTC	AGCTTCTCTGTA	ATCAGTGCCTCA	GTCATAATGTCT	<b>AGAGTGGCCCGAG</b>		
	TACCTAAAAGTC	CACGTCTAAAAG	TCGAAGGACGAT	TAGTCACGGAGT	CAGTATTACAGA	<b>TCTCACC</b>	GGGTC	
	V Q L Q	Q S G A	E L A R	P G A S	V K M S	C K A S		
73	GTGCAACTGCAG	CAGTCAGGGGCT	GAGCTGGCTAGA	CCTGGGGCTTCA	GTGAAGATGTCC	TGCAAGGCTTCT		
	CACGTTGACGTC	GTCAGTCCCCGA	CTCGACCGATCT	GGACCCCGAAGT	CACTTCTACAGG	ACGTTCCGAAGA		
	G Y T F	T T Y T	I H W V	R Q R P	G H D L	E W I G		
145	GGCTACACCTTT	ACTACCTACACA	ATACACTGGGTA	AGACAGAGGCCT	GGACACGATCTG	GAATGGATTGGA		
	CCGATGTGGAAA	TGATGGATGTGT	TATGTGACCCAT	TCTGTCTCCGGA	CCTGTGCTAGAC	CTTACCTAACCT		
	Y I N P	S S G Y	S D Y N	Q N F K	G K T T	L T A D		
217	TACATTAATCCT	AGCAGTGGATAT	TCTGACTACAAT	CAAAACTTCAAG	GGCAAGACCACA	TTGACTGCAGAC		
	ATGTAATTAGGA	TCGTCACCTATA	AGACTGATGTTA	GTTTGAAGTTC	CCGTTCTGGTTC	AAGTGGATTGGA		
	K S S N	T A Y M	Q L N S	L T S E	D S A V	Y Y C A		
289	AAGTCCTCCAAC	ACAGCCTACATG	CAACTGAACAGC	CTGACATCTGAG	GACTCTGCGGTC	TATTAAGTGGCA		
	TTCAGGAGGTTG	TGTCGGATGTAC	GTTGACTTGTCT	GACTGTAGACTC	CTGAGACGCCAG	ATAATGACACGT		
	R R A D	Y G N Y	E Y T W	F A Y W	G Q C T	T V T V		
361	AGAAGAGCGGAC	TATGGTAACTAC	GAATATACCTGG	TTTGCTTACTGG	GGCCAAGGGACC	ACGGTCACCGTC		
	TCTTCTCGCCTG	ATACCATTGATG	CTTATATGGACC	AAACGAATGACC	CCGGTTCCTCGG	TGCCAGTGGCAG		
	S S G G	G G S G	G G G S	G G G G	S D I E	L T Q S		
433	TCTCAGGTGGA	GGCGGTTACGGG	GGAGGTCGGCTCT	GGCGGTGGCGGA	TCCGACATCGAG	CTCACTCGCTCT		
	AGGAGTCCACCT	CCGCCAAGTCCG	CCTCCACCCGAGA	CCGCCACCCGCT	AGCCTGTAGCTC	GAGTGAAGTCAGA		
	P K F M	S T S V	G D R V	N V T Y	K A S Q	N V G T		
505	CCAAAATTCATG	TCCACATCAGTA	GGAGACAGGGTC	AACGTCACCTAC	AAGGCCAGTCAG	AATGTGGGTACT		
	GGTTTTAAGTAC	AGGTGTAGTCAT	CCTCTGTGCCAG	TTGCAGTGGATG	TTCCCGTTCGAG	TTACACCCATGA		
	N V A W	F Q Q K	P G Q S	P K V L	I Y S A	S Y R Y		
577	AATGTAGCCTGG	TTTCAACAAAAA	CCAGGGCAATCT	CCTAAAGTCTTG	ATTTACTCGGCA	TCTTACCGATAC		
	TTACATCGGACC	AAAGTTGTTTTT	GGTCCCCTTAGA	GGATTTCAAGAC	TAAATGAGCCGT	AGAATGGCTATG		
	S G V P	D R F T	G S G S	G T D F	T L T I	S N V Q		
649	AGTGGAGTCCCT	GATCGCTTCACA	GGCAGTGGATCT	GGAACAGATTTT	ACTCTCACCATC	AGCAATGTGCAG		
	TCACCTCAGGGA	CTAGCGAAGTGT	CCGTCACCTAGA	CCTTGTCTAAAG	TGAGAGTGGTAG	TCGTTACACGTC		
	S E D L	A E Y F	C Q Q Y	H T Y P	L T F G	G G T K		
721	TCTGAAGACTTG	GCAGAGTATTTT	TGTCAGCAATAT	CACACCTATCCT	CTCACCTTCGGA	GGGGGCACCAAG		
	AGACTTCTGAAC	CGTCTCATAAAG	ACAGTCTGTTATA	GTGTGGATAGGA	GAGTGAAGCCCT	CCCCCGTGGTTC		
								<i>BamHI</i>
								~~~~~
	L E I K	R A D P	V P R D	C G C K	P C I C	T V P E		
793	CTGGAATCAAAA	CGGGCGGATCCT	GTGCCCAGGGAT	TGTGGTTGTAAG	CCTTGCATATGT	ACAGTCCCAGAA		
	GACCTTTAGTTT	GCCCGCCTAGGA	CACGGGTCCCTA	ACACCAACATTC	GGAACGTATACA	TGTCAGGGTCTT		
	V S S V	F I F P	P K P K	D V L T	I T L T	P K V T		
865	GTATCACTGTC	TTCACTTCCCC	CCAAAGCCCAAG	GATGTGCTCACC	ATTACTTGACT	CCTAAGTCCAGC		
	CATAGTAGACAG	AAGTAGAAGGGG	GGTTTTCGGGTTC	CTACACGAGTGG	TAATGAGACTGA	GGATTCCAGTGC		
	C V V V	D I S K	D D P E	V Q F S	W F V D	D V E V		
937	TGTGTTGTGGTA	GACATCAGCAAG	GATGATCCCGAG	GTCCAGTTTCCAGC	TGGTTTGTAGAT	GATGTGGAGGTG		
	ACACAACACCAT	CTGTAGTCTGTT	CTACTAGGGCTC	AGGTCAGTTCG	ACCAAAACATCTA	CTACACTCCAC		
	H T A Q	T Q P R	E E Q F	N S T F	R S V S	E L P I		
1009	CACACAGCTCAG	ACGCAACCCCGG	GAGGAGCAGTTC	AACAGCACTTTC	CGCTCAGTCACT	GAACCTCCCATC		
	GTGTGTGCGATC	TGCGTTGGGGCC	CTCCTCGTCAAG	TTGTCGTGAAAG	GCGAGTCACTCA	CTTGAAGGGTAG		
	M H Q D	W L N G	K E F K	C R V N	S A A F	P A P I		
1081	ATGCACCAGGAC	TGGTCAATGGC	AAGGAGTTCAAA	TGCAGGGTCAAC	AGTGCACCTTTC	CCTGCCCCATC		
	TACGTGGTCCCTG	ACCGAGTTACCG	TTCCTCAAGTTT	ACGTCCCAGTTG	TCACGTGCAAAG	GGACGGGGTAG		
	E K T I	S K T K	G R P K	A P Q V	Y T I P	P P K E		
1153	GAGAAAACCATC	TCCAAAACCAA	GGCAGACCGAAG	GCTCCACAGGTG	TACACTTCCA	CCTCCCAAGGAG		
	CTCTTTTGGTAG	AGGTTTTGGTTT	CCGTCTGGCTTC	CGAGGTGTCCAC	ATGTGGTAAAGT	GGAGGGTTCCTC		
	Q M A K	D K V S	L T C M	I T D F	F P E D	I T V E		
1225	CAGATGGCCAAG	GATAAAGTCAGT	CTGACCTGCATG	ATAACAGACTTC	TTCCCTGAAGAC	ATTACTGTGGAG		
	GTCTACCGGTTT	CTATTTCACTCA	GACTGGACGTAC	TATTTGTCTGAAG	AAGGGACTTCTG	TAATGACACCTC		
	W Q W N	G Q P A	E N Y K	N T Q P	I M D T	D G S Y		
1297	TGGCAGTGGAAAT	GGGCAGCCAGCG	GAGAACTACAAG	AACACTCAGCCC	ATCATGGACACA	GATGGCTCTTAC		
	ACCGTCACTTTA	CCCGTCGGTCGC	CTCTTGATGTTT	TTGTGAGTCGGG	TAGTACTGTGT	CTACCGGAGAATG		
	F V Y S	K L N V	Q K S N	W E A G	N T F T	C S V L		
1369	TTCGTCTACAGC	AAGCTCAATGTG	CAGAAGGCAAC	TGGGAGGCAGGA	AATACTTTCACC	TGCTCTGTGTTA		
	AAGCAGATGTCG	TTCCAGTTACAC	GTCTTCTCGTTG	ACCCTCCGTCTT	TTATGAAAGTGG	ACGAGACACAAT		
								<i>BstXI</i>
								~~~~~
	H E G L	H N H H	T E K S	L S H S	P G I D	P K L C		
1441	CATGAGGGCCTG	CACAACCACCAT	ACTGAGAAGAGC	CTCTCCACTCT	<b>CCTGGTATTGAT</b>	CCCAAACCTCTGC		
	GTACTCCCGGAC	GTGTGGTGGTA	TGACTCTTCTCG	GAGAGGGTGAGA	<b>GGACCATAACTA</b>	GGGTTTGAGACG		
	Y L L D	G I L F	I Y G V	I I T A	L Y L R	A K F S		
1513	TACTTGTAGAT	GGAATCCTCTTC	ATCTACGGAGTC	ATCATCACAGCC	CTGTACTGAGA	GCAAAATTCAGC		
	ATGAACGATCTA	CCTTAGGAGAAG	TAGATGCCTCAG	TAGTAGTGTCCG	GACATGGACTCT	CGTTTTAAGTCCG		
	R S A E	T A A N	L Q D P	N Q L Y	N E L N	L G R R		
1585	AGGAGTGCAGAG	ACTGCTGCCAAC	CTGCAGGACCC	AACCAGCTCTAC	AATGAGCTCAAT	CTAGGGCGAAGA		
	TCCTCACGTCTC	TGACGACGGTTG	GACGTCCTGGGG	TTGGTCGAGATG	TTACTCGAGTTA	GATCCCGCTTCT		

**BamHI**

~~~~~

1657 E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R
 GAGGAATATGAC GTCTTGAGAAAG AAGCGGGCTCGG **GATCC**CAGAGATG GGAGGCAAACAG CAGAGGAGGAGG
 CTCCTTATACTG CAGAACCTCTCT TTCGCCGAGGCC **CTAGT**TCTCTAC CCTCCGTTTGTG GTCTCCTCCTCC
 N P Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T
 1729 AACCCCAAGGAA GGCGTATACAAT GCACTGCAGAAA GACAAGATGGCA GAAGCCTACAGT GAGATCGGCACA
 TTGGGGTCTCCTT CCGCATATGTTA CGTGACGTCTTT CTGTTCTACCGT CTTCGGATGTCA CTCTAGCCGTGT
 K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T
 1801 AAAGCGAGAGG CGGAGAGGCAAG GGGCACGATGGC CTTTACCAGGGT CTCAGCACTGCC ACCAAGGACACC
 TTTCCGCTCTCC GCCTCTCCGTTT CCGTGTCTACCG GAAAATGGTCCCA GAGTCGTGACGG TGGTTCCTGTGG
 Y D A L H M Q T L A P R \*
 1873 TATGATGCCCTG CATATGCAGACC CTGGCCCTCGC TAA
 ATACTACGGGAC GTATACGTCTGG GACCGGGGAGCG ATT

6.2.2 # 878: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ

XbaI

~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R V A Q  
 ATGGATTTCAG GTGCAGATTTTC AGTTCCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT **AGAGT**GGCCAG  
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTACAG **A** TCTCACC GGGT  
 V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S  
 73 GTGCAACTGCAG CAGTCAGGGGCT GAGCTGGCTAGA CCTGGGGCTTCA GTGAAGATGTCC TGCAAGGCTTCT  
 CACGTTGACGTC GTCAGTCCCCGA CTCGACCGATCT GGACCCCGAAGT CACTTCTACAGG ACGTTCCGAAGA  
 G Y T F T T Y T I H W V R Q R P G H D L E W I G  
 145 GGCTACACCTTT ACTACCTACACA ATACACTGGGTA AGACAGAGGCCT GGACACGATCTG GAATGGATTGGA  
 CCGATGTGGAAA TGATGGATGTGT TATGTGACCCAT TCTGTCTCCGGA CTGTGTCTAGAC CTTACCTAACCT  
 Y I N P S S G Y S D Y N Q N F K G K T T L T A D  
 217 TACATTAATCCT AGCAGTGGATAT TCTGACTACAAT CAAAACCTTCAAG GGCAAGACCACA TTGACTGCAGAC  
 ATGTAATTAGGA TCGTCACCTATA AGACTGATGTTA GTTTTGAAGTTC CCGTTCGTGGT AACTGACGCTG  
 K S S N T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A  
 289 AAGTCTCCAAC ACAGCCTACATG CAACTGAACAGC CTGACATCTGAG GACTCTGCGGTC TATTACTGTGCA  
 TTCAGGAGGTTG TGTCGGATGTAC GTTGACTGTGTC GACTGTAGACTC CTGAGACGCCAG ATAATGACACGT  
 R R A D Y G N Y E Y T W F A Y W G Q G T T V T V  
 361 AGAAGAGCGGAC TATGGTAACCTAC GAATATACCTGG TTTGCTTACTGG GGCCAAGGGAT ACAGTCAACGTC  
 TCTTCTCGCCTG ATACCATTGATG CTTATATGGACC AAACGAATGACC CCGGTTCCCTGG TGCCAGTGGCAG  
 S S G G G G S G G G G S G G G G S D I E L T Q S  
 433 TCCTCAGGTGGA GGCGGTTCCAGG GAGGTTGGCTCT GGCGGTGGCGGA TCGGACATCGAG CTCACTCAGTCT  
 AGGAGTCCACCT CCGCCAAGTCCG CCTCCACCGAGA CCGCCACCGCCT AGCCTGTAGCTC AGCTACCTCAGA  
 P K F M S T S V G D R V N V T Y K A S Q N V G T  
 505 CCAAAATTCATG TCCACATCAGTA GGAGACAGGGTC AACGTCACCTAC AAGGCCAGTCAG AATGTGGGTTACT  
 GGTTTTAAGTAC AGGTGTAGTCAT CCTCTGTCCCAG TTGCAAGTGGATG TTCCGGTTCAGT TACACCCATGA  
 N V A W F Q Q K P G Q S P K V L I Y S A S Y R Y  
 577 AATGTAGCCTGG TTTCAACAAAAA CCAGGGCAATCT CCTAAAGTTCTG ATTTACTCGGCA TCTTACCGATAC  
 TTACATCGGACC AAAGTTGTTTTT GGTCCCCTTAGA GGATTTCAAGAC TAAATGAGCCGT AGAATGGCTATG  
 S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q  
 649 AGTGGAGTCCCT GATCGCTTACA GGCAGTGGATCT GGAACAGATTTT ACTCTACCATC AGCAATGTGCAG  
 TCACCTCAGGGA CTAGCGAAGTGT CCGTCACTAGA CCTGTCTAAAG TGAGAGTGGTAG TCGTTACACGTC  
 S E D L A E Y F C Q Q Y H T Y P L T F G G G T K  
 721 TCTGAAGACTTG GCAGAGTATTTT TGTCAGCAATAT CACACCTATCCT CTCACGTTCCGA GGGGGCACCAAG  
 AGACTTCTGAAC CGTCTCATAAAG ACAGTCTGTATA GTGTGGATAGGA GAGTGAAGCCCT CCCCCTGGTTC

**BamHI**

~~~~~

793 L E I K R A D P V P R D C G C K P C I C T V P E
 CTGGAATCAAA CGGGCGGATCCT GTGCCAGGGAT TGTGGTTGTAAG CCTTGCAATATG ACAGTCCCAGAA
 GACCTTTAGTTT GCCCGCTAGGA CACGGGTCCCTA ACACCAACATTC GGAACGTATACA TGTCAGGGTCTT
 V S S V F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T
 865 GTATCATCTGTC TTCATCTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTCTGACT CCTAAGGTCACG
 CATAGTAGACAG AAGTAGAAGGGG GGTTCGGGTTTC CTACACGAGTGG TAATGAGACTGA GGATTCAGTGC
 C V V V D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V
 937 TGTGTTGTGGTA GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGC TGGTTTGTAGAT GATGTGGAGGTG
 ACACAACACCAT CTGTAGTCGTTT CTACTAGGGGCTC CAGGTCAAGTCG ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC
 H T A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I
 1009 CACACAGCTCAG ACGCAACCCCGG GAGGACGAGTTC AACAGCACTTTC CGCTCAGTCAGT GAACTTCCCATC
 GTGTGTCGAGTC TGCGTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTCGTGAAAG GCGAGTCAGTCA CTTGAAGGGTAG
 M H Q D W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I
 1081 ATGCCACAGGAC TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCCATC
 TACGTGCTCCTG ACCGAGTTACCG TTCTCAAGTTT ACCTCCAGTTG TCACGTCGAAAG GGACGGGGGTAG
 E K T I S K T K G R P K A P Q V Y T I P P P K E
 1153 GAGAAAACCATC TCCAAAACCAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TACACCATTCCTA CCTCCCAAGGAG
 CTCTTTTGGTAG AGGTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ATGTGGTAAGGT GGAGGGTTCTCT
 Q M A K D K V S L T C M I T D F I F P E D I F T V E
 1225 CAGATGGCCAAG GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAG
 GTCTACCGGTTT CTATTTAGTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC

1297 W Q W N G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y
 TGGCAGTGGAAAT GGGCAGCCAGCG GAGAACTACAAG AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC
 ACCGTCACCTTA CCCGTCGGTCCG CTCTTGATGTTT TGTGAGTCCGGG TAGTACTGTGT CTACCGAGAATG
 1369 F V Y S K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L
 TTCGTCTACAGC AAGTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTCACC TGCTCTGTGTTA
 AAGCAGATGTCC TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGTCTT TTATGAAAGTGG ACGAGACACAAT
BstXI
 ~~~~~  
 1441 H E G L H N H H T E K S L S H S P G I F W A L V  
 CATGAGGGCCTG CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCT **CCTGGTATTTTT** TGGGCACTGGTC  
 GACTCCCAGGAC GTGTTGGTGGTA TGACTTCTCTCG GAGAGGGTGAGA **GGACCATAAAAA** ACCCGTGACCAG  
 1513 V V A G V L F C Y G L L V T V A L C V I W T N S  
 GTGGTTGCTGGA GTCCCTGTTTTGT TATGGCTTGCTA GTGACAGTGGCT CTTTGTGTTATC TGGACAAATAGT  
 CACCAACGACCT CAGGACAAAACA ATACCGAACGAT CACTGTCACCGA GAAACACAATAG ACCTGTTTATCA  
 1585 R R N R L L Q S D Y M N M T P R R P G L T R K P  
 AGAAGGAACAGA CTCCTTCAAAGT GACTACATGAAC ATGACTCCCCGG AGGCCTGGGCTC ACTCGAAAGCCT  
 TCTTCTGTGCT GAGGAAGTTTCA CTGATGTACTTG TACTGAGGGGCC TCCGGACCCGAG TGAGCTTTCGGA  
 Y Q P Y A P A R D F A A Y R P L R A K F S R S A  
 1657 TACCAGCCCTAC GCCCTGCCAGA GACTTTGCAGCG TACCCGCCCTG AGAGCAAAATTC AGCAGGAGTGCA  
 ATGGTCGGGATG CGGGGACGGTCT CTGAAACGTCGC ATGGCGGGGGAC TCTCGTTTTAAG TCGTCTCACGT  
 E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E Y  
 1729 GAGACTGCTGCC AACCTGCAGGAC CCCAACAGCTC TACAATGAGCTC AATCTAGGGCGA AGAGAGGAATAT  
 CTCTGACGACGG TTGGACGTCCTG GGGTTGTCGAG ATGTTACTCGAG TTAGATCCCCTCT TCTCTCCTTATA  
**BamHI**  
 ~~~~~  
 1801 D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q
 GACGTCCTGGAG AAGAAGCGGGCT **CGGGATCC**CAGAG ATGGGAGGCAAA CAGCAGAGGAGG AGGAACCCCGAG
 CTGCAGAACCTC TTCTTCGCCCGA **GCCCTAGG**TCTC TACCCTCCGTTT GTCGTCCTCTCC TCCTTGGGGGTC
 E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E
 1873 GAAGGCATATAC AATGCATGCAG AAAGACAAGATG GCAGAAGCCTAC AGTGAGATCGGC ACAAAGGCGGAG
 CTTCCGCATATG TTACGTGACGTC TTTCTGTCTTAC CGTCTTCGGATG TCACTCTAGCCG TGTTTCCGCTC
 R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A
 1945 AGGCGGAGAGGC AAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAG GGTCTCAGCACT GCCACCAAGGAC ACCTATGATGCC
 TCCGCTCTCCG TTCCCCGTGCTA CCGGAAATGGTC CCAGAGTCGTGA CCGTGGTTCCCTG TGGATACTACGG
 L H M Q T L A P R \*
 2017 CTGCATATGCAG ACCCTGGCCCTC CGCTAA
 GACGTATACGTC TGGACCGGGGA GCGATT

6.2.3 # 881: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD3ζ

XbaI
 ~~~~~  
 1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H  
 ATGGATTTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCTCGTCA ATCAGTGCCTCA GTCATAATG**TCT** **AGAGGTGTCCAC**  
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTAC**AGA** **TCTCCACAGGTG**  
 S Q V Q L Q E S G P G L V R P S Q T L S L T C T  
 73 TCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGTCCAGGTCTT GTGAGACCTAGC CAGACCTGAGC CTGACCTGCACC  
 AGGGTCCAGGTT GACGTCCCTCAGT CCAGGTCCAGAA CACTCTGGATCG GTCCTGGACGTG GACTGACCTGG  
 V S G F T I S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E  
 145 GTGTCTGGCTTC ACCATCAGCAGT GGTATATAGCTGG CACTGGGTGAGA CAGCCACCTGGA CGAGGTCTTGAG  
 CACAGCCGAAG TGGTAGTCGTCA CCAATATCGACC GTGACCCACTCT GTCGGTGGACCT GCTCCAGAACTC  
 W I G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V T M L  
 217 TGGATTGGATAC ATACAGTACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAGTAGA GTGACAATGCTG  
 ACCTAACCTATG TATGTCATGTCA CCATAGTGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTTTCATCT CACTGTTACGAC  
 V D T S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y  
 289 VTAGACACCAGC AAGAACCAGTTC AGCCTGAGACTC AGCAGCGTGACA GCCCGGACACC GCGCTGATATT  
 CATCTGTGGTCCG TTCTTGGTCAAG TCGGACTCTGAG TCGTCGCACTGT CCGCGCTGTGG CGCCAGATAATA  
 C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T V S  
 361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGTCTGGGGC CAAGGGACCACG GTCACCGTCTCC  
 ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG CTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGACGAGG  
 S G G G S G S G G G S G D I Q L T Q S P  
 433 TCAGGAGGTGGT GGATCGGGCGGT GGCGGGTCCGGT GGCGGCGGATCT GACATCCAGCTG ACCCAGAGCCCA  
 AGTCCTCCACCA CCTAGCCCGCCA CCGCCAGCCCA CCGCCGCTAGA CTGTAGTCTGAG TGGGTCTCGGGT  
**XhoI**  
 ~~~~~  
 505 S S L S A S V G D R V T I T C S T S S S V S Y M
 AGCAGCTGAGC GCCAGCGTGGGT GACAGAGTGACC ATCACCTGTAGT ACCAG**CTCGAGT** GTAAGTTACATG
 TCGTCCGACTCG CGGTCCGACCCA CTGCTCACTAGT TAGTGGACATCA TGG**CTGAGCTC** CATTCAATGTAC
 H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L A S G
 577 CACTGGTACCAG CAGAAGCCAGGT AAGGCTCCAAAG CTGCTGATCTAC AGCACATCCAAC CTGGCTTCTGGT
 GTGACCATGGTC GTCTTCGGTCCA TTCCGAGGTTTT GACGACTAGATG TCGTGTAGGTTG GACCGAAGACCA
 V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E
 649 VTGCCAAGCAGA TTCAGCGGTAGC GGTAGCGGTACC GACTTACCTTC ACCATCAGCAGC CTCCAGCCAGAG
 CACGGTTCTGCT AAGTCGCCATCG CCATCGCCATGG CTGAAGTGAAG TGGTAGTCGTCG GAGGTCCGTCTC
 D I A T Y Y C H Q W S S Y P T F G Q G T K V E I
 721 GACATCGCCACC TACTACTGCCAT CAGTGGAGTAGT TATCCACGTTT GGCCAAGGGACC AAGGTGGAGATC
 CTGTAGCGGTGG ATGATGACGGTA GTCACCTCATCA ATAGGGTGCAAG CCGTTCCCTG TCCACCTCTAG

BamHI

~~~~~

K V D P V P R D G G C K P C I C T V P E V S S V  
 793 AAAGTGGATCCT GTGCCAGGGAT GGTGGTTGTAAG CCTTGCATATGT ACAGTCCCAGAA GTATCATCTGTC  
 TTTCACCTAGGA CACGGGTCCTA CCACCAACATTG GGAACGTATACA TGTCCAGGGTCTT CATAGTAGACAG  
 F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T C V V V  
 865 TTCATCTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTCTGACT CCTAAGGTCACG TGTGTTGTGGTA  
 AAGTAGAAGGGG GGTTCGGGTTTCTACACGAGTGG TAATGAGACTGA GGATTCCAGTGC ACACAACACCAT  
 D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T A Q  
 937 GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGC TGGTTTGTAGAT GATGTGGAGGTG CACACAGCTCAG  
 CTGTAGTCGTTTCTACTAGGGCTC CAGGTCAAGTCCG ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC GTGTGTCGAGTC  
 T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D  
 1009 ACGCAACCCCGG GAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTC CGCTCAGTCAGT GAACTTCCCATC ATGCACCAGGAC  
 TCGTTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTCGTGAAAG GCGAGTCAGTCA CTTGAAGGGTAG TACGTGGTCTGT  
 W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I  
 1081 TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCATC GAGAAAACCATC  
 ACCGAGTTACCG TTCTCAAGTTT ACGTCCAGTTG TCACGTCGAAAG GGACGGGGGTAG CTCTTTTGTAG  
 S K T K G R P K A P Q V C T I P P P K E Q M A K  
 1153 TCCAAAACCAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TGCACCAATCCA CCTCCCAAGGAG CAGATGGCCAAG  
 AGGTTTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ACGTGGTAAGGT GGAGGGTTTCCCTC GTCTACCGGTTT  
 D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E W Q W N  
 1225 GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTTC TTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAG TGGCAGTGGAA  
 CTATTTTCAGTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACTTC ACCGTCACTTA  
 G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V Y S  
 1297 GGGCAGCCAGCG GAGAACTACAAG AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC TTCGTCTAGAGC  
 CCCGTCGGTCCG CTCTTGATGTTT TTGTGAGTCGGG TAGTACCTGTGT CTACCAGAGAATG AAGCAGATGTCC  
 K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L H E G T I  
 1369 AAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTTACC TGCTCTGTGTGA CATGAGGGCCTG  
 TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGTCCT TTATGAAAGTGG ACGAGACACAAT GTACTCCCGGAC

**BstXI**

~~~~~

H N H H T E K S L S H S P G I D P K L C Y L L D
 1441 CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCT CCTGGTATTGAT CCCAAACTCTGC TACTTGCTAGAT
 GTGTTGGTGGTA TGACTCTTCTCG GAGAGGGTGAGA GGACCATAACTA GGGTTTGGAGCG ATGAACGATCTA
 G I L F I Y G V I I T A L Y L R A K F S R S A E
 1513 GGAATCCTCTTC ATCTACGGAGTC ATCATCACAGCC CTGTACCTGAGA GCAAAATTCAGC AGGAGTGCAGAG
 CCTTAGGAGAAG TAGATGCCTCAG TAGTAGTGTCCG GACATGGACTCT CGTTTTAAGTCG TCCTCACGTCTC
 T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E Y D
 1585 ACTGCTGCCAAC CTGCAGGACCCC AACCAGTCTAC AATGAGCTCAAT CTAGGGCGAAGA GAGGAATATGAC
 TGACGACGGTTG GACGTCCTGGGG TTGGTCGAGATG TTAICTCGAGTTA GATCCCGCTTCT CTCCTTATACTG

BamHI

~~~~~

V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E  
 1657 GTCTTGAGAGAAG AAGCGGGCTCGG GATCCAGAGATG GGAGGCAAACAG CAGAGGAGGAGG AACCCCCAGGAA  
 CAGAACCTCTTC TTCGCCCAGGCC CTAGGTCTCTAC CCTCCGTTTGTG GTCTCCTCTCC TTGGGGGTCTTT  
 G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R  
 1729 GCGGTATACAAT GCACCTGAGAAA GACAAGATGGCA GAAGCCTACAGT GAGACTGGCACA AAAGCCGAGAGG  
 CCGCATATGTTA CGTGACGTCTTT CTGTTCTACCGT CTTCCGATGTCA CTCTAGCCGTGT TTTCCGCTCTCC  
 R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L  
 1801 CGGAGAGGCAAG GGGCACGATGGC CTTTACCAGGGT CTCAGCACTGCC ACCAAGGACACC TATGATGCCTG  
 GCCTCTCCGTTT CCCGTGCTACCG GAAATGGTCCCA GAGTCGTGACGG TGGTTCTGTGG ATACTACGGGAC  
 H M Q T L A P R *  
 1873 CATATGCAGACC CTGGCCCTCGC TAA  
 GTATACGCTGG GACCGGGAGCG ATT

## 6.2.4 # 883: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD28-mCD3ζ

**XbaI**

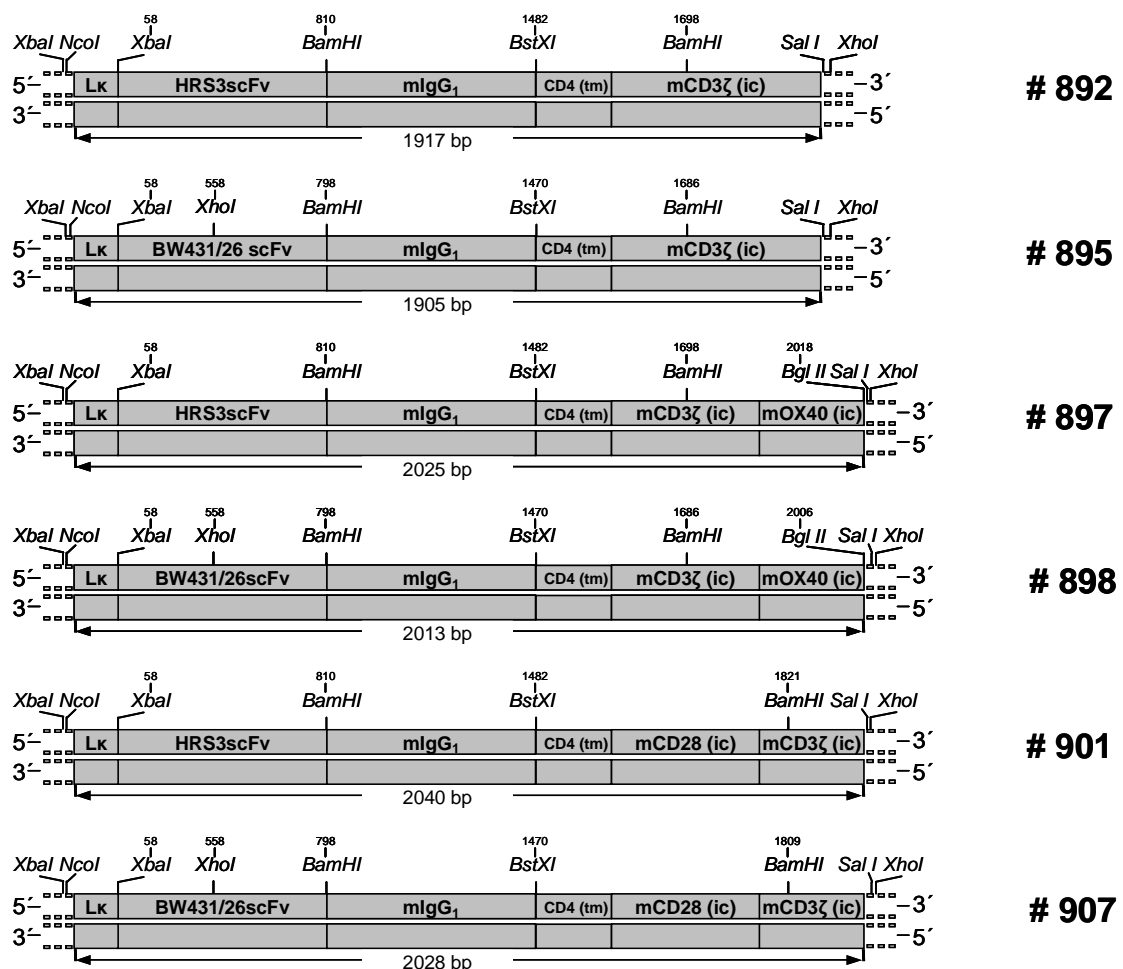
~~~~~

M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H
 1 ATGGATTTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCTCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT AGAGGTGTCCAC
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTACAGA TCTCCACAGGTG
 S Q V Q L Q E S G P G L V R P S Q T L S L T C T
 73 TCCCAGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGTCCAGGTCTT GTGAGACTAGC CAGACCCTGAGC CTGACCTGCACC
 AGGGTCCAGGTT GACGTCCTCAGT CCAGGTCCAGAA CACTCTGGATCG GTCTGGGACTCG GACTGGACGTGG
 V S G F T I S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E
 145 GTGTCTGGCTTC ACCATCAGCAGT GGTATAGCTGG CACTGGGTGAGA CAGCCACCTGGA CGAGGTCTTGAG
 CACAGACCGAAG TGGTAGTCGTC CCAATATCGACC GTGACCCACTCT GTCGGTGGACCT GCTCCAGAACTC
 W I G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V T M L
 217 TGGATTGGATAC ATACAGTACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAAGTAGA GTGACAATGCTG
 ACCTAACCTATG TATGTCATGTC CCAATATGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTTTCATCT CACTGTTTACGAC
 V D T S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y
 289 GTAGACACCAGC AAGAACCAGTTC AGCCTGAGACTC AGCAGCGTGACA GCCGCCGACACC GCGGTCTATTAT
 CATCTGTGGTCG TTCTTGGTCAAG TCGGACTCTGAG TCGTCGCACTGT CGCGGCTGTGG CGCCAGATAATA
 C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T V S
 361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGTCTGGGGC CAAGGGACCACG GTCACCGTCTCC
 ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG CTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGCAGAGG

| | | | | | | |
|------|---------------|--------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | S G G G | G S G G | G G S G | G G G S | D I Q L | T Q S P |
| 433 | TCAGGAGGTGGT | GGATCGGGCGGT | GGCGGGTGGGT | GGCGGGGATCT | GACATCCAGCTG | ACCCAGAGCCCA |
| | AGTCTCCACCA | CCTAGCCCGCCA | CCGCCACGCCA | CCGCCGCCTAGA | CTGTAGGTCGAC | TGGGTCTCGGGT |
| | XhoI | | | | | |
| | ~~~~~ | | | | | |
| | S S L S | A S V G | D R V T | I T C S | T S S S | V S Y M |
| 505 | AGCAGCCTGAGC | GCCAGCGTGGGT | GACAGAGTGACC | ATCACCTGTAGT | ACCAGCTCGAGT | GTAAGTTACATG |
| | TCGTCCGACTCG | CGGTCCGACCCA | CTGTCTCACTGG | TAGTGGACATCA | TGGTCCGAGCTCA | CATTCAATGTAC |
| | H W Y Q | Q K P G | K A P K | L L I Y | S T S N | L A S G |
| 577 | CACTGGTACCAG | CAGAAGCCAGGT | AAGGCTCCAAAG | CTGCTGATCTAC | AGCACATCCAAC | CTGGCTTCTGGT |
| | GTGACCATGGTC | GTCTTCGGTCCA | TTCCGAGGTTTC | GACGACTAGATG | TCGTGTAGGTTG | GACCGAAGACCA |
| | V P S R | F S G S | G S G T | D F T F | T I S S | L Q P E |
| 649 | GTGCCAAGCAGA | TTCAGCGGTAGC | GGTAGCGGTACC | GACTTCACCTTC | ACCATCAGCAGC | CTCCAGCCAGAG |
| | CACGGTTCGTCT | AAGTCGCCATCG | CCATCGCCATGG | CTGAAAGTGGAAAG | TGGTAGTCGTCTG | GAGGTCCGGTCTC |
| | D I A T | Y Y C H | Q W S S | Y P T F | G Q G T | K V M Q |
| 721 | GACATCGCCACC | TACTACTGCCAT | CAGTGGAGTAGT | TATCCACGTTTC | GGCCAAGGGACC | AAGGTGGAGATC |
| | CTGTAGCGGTGG | ATGATGACGTA | GTCACCTCATCA | ATAGGGTGCAAG | CCGGTTCCTCTG | TTCCACCTCTAG |
| | BamHI | | | | | |
| | ~~~~~ | | | | | |
| | K V D P | V P R D | G G C K | P C I C | T V P E | V S S V |
| 793 | AAAGTGGATCCT | GTGCCCAGGGAT | GGTGGTTGTAAG | CCTTGCATATGT | ACAGTCCCAGAA | GTATCATCTGTCT |
| | TTTCACTAGGA | CACGGTCCCTA | CCACCAACATTC | GGAACGTATAACA | TGTCAGGGTCTT | CATAGTAGACAG |
| | F I F P | P K P K | D V L T | I T L T | P K V T | C V E V |
| 865 | TTCATCTTCCCC | CCAAAGCCCAAG | GATGTGCTCACC | ATTACTCTGACT | CCTAAGGTACAG | TGTGTTGTGGTA |
| | AAGTAGAAGGGG | GGTTTCGGGTTC | CTACACGAGTGG | TAATGAGACTGA | GGATTCCAGTGC | ACACAACACCAT |
| | D I S K | D D P E | V Q F S | W F V D | D V E V | H T A Q |
| 937 | GACATCAAGCAAG | GATGATCCCGAG | GTCACAGTTCAGC | TGGTTTGTAGAT | GATGTGGAGGTC | GATCGAGCTCAG |
| | CTGTAGTCGTTC | CTACTAGGGCTC | CAGGTCAAGTCCG | ACCAAACATCTA | CTACACCTCCAC | GTGTGTCGAGTC |
| | T Q P R | E E Q F | N S T F | R S V S | E L P I | M H Q D |
| 1009 | ACGCAACCCCGG | GAGGAGCAGTTC | AACAGCACTTTC | CGCTCAGTCAGT | GAACTTCCCATC | ATGCACCAGGAC |
| | TGCGTTGGGGCC | CTCCTCGTCAAG | TTGTCGTGAAAG | GCGAGTCAGTCA | CTTGAAGGGTAG | TACGTGGTCTCTG |
| | W L N G | K E F K | C R V N | S A A F | P A P I | E K T I |
| 1081 | TGGCTCAATGGC | AAGGAGTTCAAA | TGCAGGGTCAAC | AGTGCAGCTTTC | CCTGCCCCCATC | GAGAAAACCATC |
| | ACCGAGTTACCG | TTCTCAAGTTT | ACGTCCAGTGT | TCACGTGCAAAAG | GGACGGGGGTAG | CTCTTTGGTAG |
| | S K T K | G R P K | A P Q V | C T I P | P P K E | C M A K |
| 1153 | TCCAAAACCAAA | GGCAGACCGAAG | GCTCCACAGGTG | TGCACCATCCA | CCTCCCAAGGAG | CAGATGGCCAAG |
| | AGGTTTTGGTTT | CCGTCTGGCTTC | CGAGGTGTCCAC | ACGTGGTAAGGT | GGAGGGTTCCCT | GTCTACCGTTC |
| | D K V S | L T C M | I T D F | F P E D | I T V E | W Q W N |
| 1225 | GATAAAGTCAGT | CTGACCTGCATG | ATAACAGACTTC | TTCCCTGAAGAC | ATTACTGTGGAG | TGGCAGTGAAT |
| | CTATTTCACTCA | GACTGGACGTAC | TATTGTCTGAAG | AAGGGACTTCTG | TAATGACACCTC | ACCGTCACTTA |
| | G Q P A | E N Y K | N T Q P | I M D T | D G S Y | F V Y S |
| 1297 | GGGCAGCCAGCG | GAGAACTACAAG | AACACTCAGCCC | ATCATGGACACA | GATGGCTCTTAC | TTCTGTACAGC |
| | CCCCTCGGTCCG | CTCTTGATGTTT | TTGTGAGTCGGG | TAGTACCTGTGT | CTACCGAAGAT | AAGCAGTCCG |
| | K L N V | Q K S N | W E A G | N T F T | C S V L | H E G L |
| 1369 | AAGCTCAATGTG | CAGAAGAGCAAC | TGGGAGGCAGGA | AATACTTTCACC | TGCTCTGTGTTA | CATGAGGGCCTG |
| | TTCGAGTTACAC | GTCTTCTCGTTG | ACCCTCCGTCTC | TTATGAAAGTGG | ACGAGACACAAT | GTACTCCCGGAC |
| | H N H H | T E K S | L S H S | P G I F | W A L V | V V A G |
| | BstXI | | | | | |
| | ~~~~~ | | | | | |
| | CACAACACCAT | ACTGAGAAGAGC | CTCTCCCACTCT | CCTGGTATTTTT | TGGGCCTGGTCT | GTGGTTGTCTGGA |
| 1441 | GTGTTGGTGGTA | TGACTCTTCTCG | GAGAGGTTGAGA | GGACCATAAAAA | ACCCGTGACCAG | CACCAACGACCT |
| | V L F C | Y G L L | V T V A | L C V I | W T N S | R R N R |
| 1513 | GTCCTGTTTTGT | TATGGCTTGCTA | GTGACAGTGGCT | CTTTGTGTTATC | TGGACAAATAGT | AGAAGGAACAGA |
| | CAGGACAAAACA | ATACCGAACGAT | CACTGTCAACCGA | GAAACACAATAG | ACCTGTTTATCA | TTCTCTTGTCT |
| | L L Q S | D Y M N | M T P R | R P G L | T R K P | Y Q P Y |
| 1585 | TCCTTCAAAAGT | GACTACATGAAC | ATGACTCCCCGG | AGGCCTGGGCTC | ACTCGAAAGCCT | TACCAGCCCTAC |
| | GAGGAAGTTTCA | CTGATGTACTTG | TACTGAGGGGCC | TCCGGACCCGAG | TGAGCTTTCGGA | ATGGTCCGGATG |
| | A P A R | D F A A | Y R P L | R A K F | S R S A | E T A A |
| 1657 | GCCCCTGCCAGA | GACTTTGCAGCG | TACCGCCCCCTG | AGAGCAAAATTC | AGCAGGAGTGCA | GAGACTGCTGCC |
| | CGGGGACGGTCT | CTGAAACGTCGC | ATGGCGGGGGAC | TCTCGTTTTAAG | TCGTTCTCACGT | CTCTGACGACGG |
| | N L Q D | P N Q L | Y N E L | N L G R | R E E Y | D V L E |
| 1729 | AACCTGCAGGAC | CCCAACCAGCTC | TACAATGAGCTC | AATCTAGGGCGA | AGAGAGGAATAT | GACCTCTTGGAG |
| | TTGGACGTCCCTG | GGGTTGGTCGAG | ATGTTACTCGAG | TTAGATCCCGCT | TCTCTCTTATA | CTGCAGAACCTC |
| | BamHI | | | | | |
| | ~~~~~ | | | | | |
| | K K R A | R D P E | M G G K | Q Q R R | R N P Q | E G V Y |
| 1801 | AAGAAGCGGGCT | CGGGATCCAGAG | ATGGGAGGCAAA | CAGCAGAGGAGG | AGGAACCCCCAG | GAAGGCGTATAC |
| | TTCTTCGCCCGA | GCCTAGGTCTC | TACCCTCCGTTT | GTCGTCTCCTCC | TCCTTGGGGGTC | TCCTCCGCATATG |
| | N A L Q | K D K M | A E A Y | S E I G | T K G E | R R R G |
| 1873 | AATGCACTGCAG | AAAGACAAGATG | GCAGAAGCCTAC | AGTGAATCGGC | ACAAAAGGCGAG | AGGCGGAGAGGC |
| | TTACGTGACGTC | TTTCTGTTCTAC | CGTCTTCGGATG | TCACTCTAGCCG | TGTTTTCCGCTC | TCCGCTCTCCG |
| | K G H D | G L Y Q | G L S T | A T K D | T Y D A | L H M Q |
| 1945 | AAGGGGCACGAT | GGCCTTTACCAG | GGTCTCAGCACT | GCCACCAAGGAC | ACCTATGATGCC | CTGCATATGCAG |
| | TTCCCCGTGCTA | CCGAAAATGGTC | CCAGAGTCGTGA | CGGTGGTTCTCTG | TGGATACTACGG | GACGTATACGTC |
| | T L A P | R * | | | | |
| 2017 | ACCCTGGCCCCCT | CGCTAA | | | | |
| | TGGGACCGGGGA | GCGATT | | | | |

6.3 DNA Sequenzen der rekombinanten Immunrezeptoren zweiter Generation mit Spezifität für CEA und CD30.

Gezeigt wird die DNA Sequenz der rekombinanten Immunrezeptoren pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (# 892), pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (# 895), pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -OX40 (# 897), pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -mOX40 (# 898), pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (# 901) und pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (# 907). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird oberhalb der DNA Sequenz im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Ein "\*" kennzeichnet das Stopcodon. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienen, sind durch Fett-Druck gekennzeichnet.



6.3.1 # 892: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ

XbaI
~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R V A Q  
 ATGGATTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT **AGAGTGGCCAG**  
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTACAGA **TCTCACCGGTC**

V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S  
 73 GTGCAACTGCAG CAGTCAGGGGCT GAGCTGGCTAGA CCTGGGGCTTCA GTGAAGATGTCC TGCAAGGCTTCT  
 CACGTTGACGTC GTCAGTCCCGA CTCGACCGATCT GGACCCCGAAGT CACTTCTACAGG ACGTTCGGAAGA  
 G Y T F T T Y T I H W V R Q R P G H D L E W I G  
 145 GGCTACACCTTT ACTACCTACACA ATACACTGGGTA AGACAGAGGCCT GGACACGATCTG GAATGGATTGGA  
 CCGATGTGGAAA TGATGGATGTGT TATGTGACCCAT TCTGTCTCCGGA CCTGTGCTAGAC CTTACCTAACCT  
 Y I N P S S G Y S D Y N Q N F K G K T T L T A D  
 217 TACATTAATCCT AGCAGTGGATAT TCTGACTACAAT CAAAACCTTCAAG GGCAAGACCACA TTGACTGCAGAC  
 ATGTAATTAGGA TCGTCACCTATA AGACTGATGTTA GTTTTGAAGTTC CCGTTCTGGTGT AACTGACGCTG  
 K S S N T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A  
 289 AAGTCTCCAAC ACAGCCTACATG CAACTGAACAGC CTGACATCTGAG GACTCTGCGGTCT TATTACTGTGCA  
 TTCAGGAGGTTG TGTCGGATGTAC GTTGACTTGTGCG GACTGTAGACTC CTGAGACGCCAG ATAATGACACGT  
 R R A D Y G N Y E Y T W F A Y W G Q G T T V T V  
 361 AGAAGAGCGGAC TATGGTAACTAC GAATATACCTGG TTTGCTTACTGG GGCCAAGGGACC ACGGTCACCGTC  
 TCTTCTCCCTG ATACCATTGATG CTTATATGGACC AAACGAATGACC CCGGTTCCCTGG TGCCAGTGGCAG  
 S S G G G G S G G G S G G G G S D I E L T Q S  
 433 TCCTCAGGTGGA GGCGGTTCCAGGC GGAGGTGGCTCT GGCGGTGGCGGA TCGGACATCGAG CTCACTCAGTCT  
 AGGAGTCCACCT CCGCCAAGTCCG CCTCCACCGAGA CCGCCACCGCCT AGCCTGTAGCTG GAGTGAGTCAGA  
 P K F M S T S V G D R V N V T Y N V G T  
 505 CCAAAATTCATG TCCACATCAGTA GGAGACAGGGTC AACGTCACCTAC AAGGCCAGTCAG AATGTGGGTACT  
 GGTTTTAAGTAC AGGTGTAGTCAT CCTCTGTCCCAG TTGCAGTGGATG TTCCGGTTCAGTC TTACACCCATGA  
 N V A W F Q Q K P G Q S P K V L I Y S A S Y R Y  
 577 AATGTAGCCTGG TTTCAACAAAAA CCAGGCAATCTG CCTAAAGTTCTG ATTTACTCGGCA TCTTACCGTAC  
 TTACATCGGACC AAAGTTGTTTTT GGTCCCCTTAGA GGATTTCAAGAC TAAATGAGCCGT AGAATGGCTATG  
 S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q  
 649 AGTGGAGTCCCT GATCGCTTCACA GGCAGTGGATCT GGAACAGATTTT ACTCTCACCATC AGCAATGTGCAG  
 TCACCTCAGGGA CTAGCGAAGTGT CCGTCACTAGA CCGTGTCTAAAG HTTGTCTGAG TGAGAGTGGTG TCGTACGGTCTC  
 S E D L A E Y F C Q Q Y H T Y P L T F G G G T K  
 721 TCTGAAGACTTG GCAGAGTATTTT TGTCAGCAATAT CACACCTATCCT CTCACGTTCCGGA GGGGGCACCAAG  
 AGACTTCTGAAC CGTCTCATAAAG ACAGTCGTTATA GTGTGGATAGGA GAGTGAAGCCCT CCCCCTGGTTC

**BamHI**

~~~~~

L E I K R A D P V P R D C G C K P C I C T V P E
 793 CTGGAATCAAAA CGGGCGGATCCT GTGCCAGGGAT TGTGGTTGTAAG CCTTGCATATGT ACAGTCCCAGAA
 GACVTTTATGTTT GCCCGCTAGGA CACGGGTCCCTA ACACCAACATTC GGAACGTATACA TGTACAGGCTCTT
 V S S V F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T
 865 GTATCATCTGTG TTCACTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTGTGACT CCTAAGGTACAG
 CATAGTAGACAG AAGTAGAAGGGG GGTTCCTGGGTTT CTACACGAGTGG TAATGAGACTGA GGATTVCCAGTGC
 C V V D I S K D D P E V Q F S W F V D V E V
 937 TGTGTTGTGGTA GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGC TGGTTTGTAGAT GATGTGGAGGTG
 ACACAACACCAT CTGTAGTCGTTT CACTAGGGCTC CAGGTCAAGTCG ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC
 H T A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I
 1009 CACACAGCTCAG ACGCAACCCCGG GAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTC CGCTCAGTCAGT GAATCTCCCATC
 GTGTGTGAGTGC TGCGTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTGCTGAAAAG GCGAGTCAAGTCA CTTGAAGGTAG
 M H Q D W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I
 1081 ATGCACCAGGAC TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCATC
 TACGTGGTCTCG ACCGAGTTACCG TTCTCAAGTTT ACCTCCAGTTG TCACGTCGAAAP GGAGGGGGTAG
 E K T I S K T K G R P K A P Q V Y T I P P P K E
 1153 GAGAAAACCATC TCCAAAACCAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TACACCATTCCA CCTCCCAAGGAG
 CTCTTTTGGTAG AGGTTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ATGTGGTAAGGT GGAGGGTTCTCT
 Q M A K D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E
 1225 CAGATGGCCAAG GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCCTGAAAGC ATTACTGTGGAG
 GTCTACCGGTTT CTATTTCACTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC
 W Q W N G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y
 1297 TGGCAGTGGAAAT GGGCAGCCAGCG GAGAACTACAAG AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC
 ACCGTACCTTA CCGCTCGGTCGC CTCTTGTGATGTTT TTTGTGAGTCGGG TAGTACTGTGT CTACCGAGAAATG
 F V Y S K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L
 1369 TTCGTCTACAGC AAGTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTCACC TGCTCTGTGTTA
 AAGCAGATGTCG TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGTCTT TATGAAAGTGG ACAGACACAAT

BstXI

~~~~~

H E G L H N H H T E K S L S H S P G I V F L A C  
 1441 CATGAGGGCCTG CACAACCACAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCACTCT CCTGGTATTGTG TTCTGGCTTGC  
 GTACTCCCGGAC GTGTTGGTGGTA TGACTCTTCTCG GAGAGGGTGA GAACCATAAAC AAGGACCGAACG  
 V L G G S F G F L G F L G L C I L C C V L R A K  
 1513 GTGCTGGGTGGC TCCTTCGGCTTT CTGGGTTTCTT GGGTCTGCATC CTCTGTGTGTG CTGAGAGCAAAA  
 CACGACCACCG AGGAAGCCGAAA GACCAAGGAA CCCGAGACGTAG GAGACGACACG GACTCTCGTTTT  
 F S R S A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L G  
 1585 TTCAGCAGGAGT GCAGAGACTGCT GCCAACCTGCAG GACCCCAACCAG CTCTACAATGAG CTCAATCTAGGG  
 AAGTCGTCTCA CGTCTCTGACGA CGGTTGGACGTC CTGGGGTTGGTC GAGATGTTACT GAGTTAGATCCC

**BamHI**

~~~~~

R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R
 1657 CGAAGAGAGGAA TATGACGTCTG GAGAAGAGCGG GCTCGGGATCCA GAGATGGGAGGC AAACAGCAGAGG
 GCTTCTCTCCTT ATACTGCAGAAC CTCTTCTTCGCG CGAGCCCTAGGT CTCTACCCTCCG TTTGTCTGCTCC
 R R N P Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I
 1729 AGGAGGAACCCC CAGGAAGGCGTA TACAATGCACTG CAGAAAGACAAG ATGGCAGAAGCC TACAGTGAGATC
 TCCTCTTGGGG GTCCCTCCGCAT ATGTTACGTGAC GTCTTCTGTTC TACCGTCTCCG ATGTCACTCTAG

1801 G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K
 GGCACAAAAGGC GAGAGGCGGAGA GGCAAGGGGCAC DATGGCCTTTAC CAGGGTCTCAGC ACTGCCACCAAG
 CCGTGTTTTCCG CTCTCCGCCTCT CCGTTCCCCGTG CTACCCGAAATG GTCCAGAGTCG TGACGGTGGTTC
 D T Y D A L H M Q T L A P R \*
 1873 GACACCTATGAT GCCCTGCATATG CAGACCCTGGCC CCTCGCTAA
 CTGTGGATACTA CGGGACGTATAC GTCTGGGACCGG GGAGCGATT

6.3.2 # 895: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ

XbaI
~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H  
 ATGGATTTCAG GTGCAGATTTTC AGTTCCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT **AGAGGTGTCCAC**  
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTAC**AGA TCTCCACAGGTG**  
 S Q V Q L Q E S G P G L V R P S Q T L S L T C T  
 73 TCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGTCCAGGTCTT GTGAGACCTAGC CAGACCCTGAGC CTGACCTGCACC  
 AGGGTCCAGGTT GACGTCTCAGT CCAGGTCCAGAA CACTCTGGATCG GTCTGGGACTCG GACTGGACGTGG  
 V S G F T I S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E  
 145 GTGTCTGGCTTC ACCATCAGCAGT GGTATAGCTGG CACTGGGTGAGA CAGCCACCTGGA CGAGGTCTTGAG  
 CACAGCCGAAG TGGTAGTCGTCA CCAATATCGACC GTGAGCCACTCT GTCGGTGGACCT GCTCCAGAACTC  
 W I G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V T M L  
 217 TGGATTGGATAC ATACAGTACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAGTAGA GTGACAATGCTG  
 ACCTAACCTATG TATGTATGTCA CCATAGTGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTTCATCT CACTGTTACGAC  
 V D T S K N Q F S L R L S S V T A A D T Y Y  
 289 GTAGACACCAGC AAGAACCAGTTC AGCCTGAGACTC AGCAGCGTGACA GCCGCCGACACC GCGGTCTATTAT  
 CATCTGTGGTCG TTCTTGGTCAAG TCGGACTCTGAG TCGTCGCACTGT CGGCGGTGTGG CGCCAGATAATA  
 C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T V S  
 361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGCTGGGGC CAAGGGACCACG GTCACCTCTCC  
 ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG CTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGCAGAGG  
 S G G G G S G G G G S G G S D I Q L T Q S P  
 433 TCAGGAGGTGGT GGATCGGGCGGT GGGGGTGGGGT GGGGGCGGATCT GACATCCAGCTG ACCCAGAGCCCA  
 AGTCTCCACCA CCTAGCCCGCCA CCGCCAGCCCA CCGCCGCTAGA CTGTAGGTCGAC TGGTCTCGGGT

*XhoI*  
~~~~~

505 S S L S A S V G D R V T I T C S T S S S V S Y M
 AGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGT GACAGAGTGACC ATCACCTGTAGT ACCAG**CTCGAGT** GTAAGTTACATG
 TCGTCGGACTCG CCGTCCGACCCA CTGTCTCACTGG TAGTGGACATCA TGGT**CGAGCTCA** CATTCAATGTAC
 H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L A S G
 577 CACTGGTACCAG CAGAAGCCAGGT AAGGCTCCAAAG CTGCTGATCTAC AGCACATCCAAC CTGGCTTCTGGT
 GTGACCATGGTC GTCTTCGGTCCA TTCCGAGGTTTC GAGCACTAGATG TCGTGTAGGTTG GACCGAAGACCA
 V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E
 649 GTGCCAAGCAGA TTCAGCGGTAGC GGTAGCGGTACC GACTTCACCTTC ACCATCAGCAGC CTCCAGCCAGAG
 CACGGTTCGTCT AAGTCGCCATCG CCATCGCCATGG CTGAAGTGGAAAG TGGTAGTCGTG GAGGTCCGGTCTC
 D I A T Y Y C H Q W S S Y P T F G Q V E I
 721 GACATCGCCACC TACTACTGCCAT CAGTGGAGTAGT TATCCACGTTT GGCCAAGGGACC AAGGTGGAGATC
 CTGTAGCGGTGG ATGATGACGGTA GTCACCTCATCA ATAGGGTGCAAG CCGGTTCCCTGG TTCCACCTCTAG

BamHI
~~~~~

793 K V D P V P R D G G C K P C I C T V P E V S S V  
 AAAGT**GGATCCT** GTGCCAGGGAT GGTGGTTGTAAG CCTTGCATATGT ACAGTCCAGAA GTATCATCTGTC  
 TTT**CACTAGGA** CACGGGTCCCTA CCACCAACATTC GGAACGTATACA TGTCAGGGTCTT CATAGTAGACV  
 F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T C V V V  
 865 TTCATCTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTCTGACT CCTAAGGTACAG TGTGTTGTGGTA  
 AAGTAGAAGGGG GGTTCGGGTTTC CTACACGAGTGG TAATGAGACTGA GGATTCCAGTGC ACACAACCCAT  
 D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T A Q  
 937 GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGT TGGTTTGTAGAT GATGTGAGGTTG CACACAGCTCAG  
 CTGTAGTCGTTT CTA**CTAGGGCTC** CAGGTCAAGTCCG ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC GTGTGTCGAGTC  
 T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D  
 1009 ACGCAACCCCGG GAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTC CGCTCAGTCAGT GAACTTCCCATC ATGCACCAGGAC  
 TCGGTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTCGTGAAAG GCGAGTCAGTCA CTTGAAGGGTAG TACGTGGTCTG  
 W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I  
 1081 TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCATC GAGAAAACCATC  
 ACCGATTACCG TTCTCAAGTTT ACGTCCAGTTC TCACGTGCAAAAG GGACGGGGTAG CTCTTTTGGTAG  
 S K T K G R P K A P Q V C T I P P K E Q M A K  
 1153 TCCAAAACAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TGCACCATCCA CCTCCAAAGGAG CAGATGGCCAAAG  
 AGGTTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ACGTGGTAAGGT GGAGGGTTCCCTC GTCTACCGTTC  
 D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E W Q W N  
 1225 GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAG TGGCAGTGGAAAT  
 CTATTCTCAGTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC ACCGTCACTTA  
 G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V Y S  
 1297 GGGCAGCCAGCG GAGA**ACTACAAG** AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC TTCGTCTACAGC  
 CCCGTCGGTCCG CTCTT**GATGTTT** TTGTGAGTCGGG TAGTACCTGTGT CTACCGAGAAT AAGCAGATGTCCG  
 K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L H E G L  
 1369 AAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTCACC TGCTCTGTGTTA CATGAGGGCCTG  
 TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCGTCTCT TTATGAAAGTGG ACGAGACACAAT GTACTCCCGGAC

**BstXI**

~~~~~

1441 H N H H T E K S L S H S P G I V F L A C V L G G
 CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCC**CACTCT** **CCTGG**TATTGTG TTCCTGGCTTGC GTGTGGGTGGC
 GTGTTGGTGGTA TGACTCTTCTCG GAGAG**GGTGAGA** **GGACC**ATAACAC AAGGACCGAAC CACGACCCACCG
 S F G F L G F L G L C I L C C V L R A K F S R S
 1513 TCCTTCGGCTTT CTGGGTTTCTT GGGCTCTGCATC CTCTGCTGTGTC CTGAGACAAAA TTCAGCAGGAGT
 AGGAAGCCGAAA GACCCAAAGGAA CCGGAGACGTAG GAGACGACACAG GACTCTCGTTTT AAGTCGCTCTCA
 A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E
 1585 GCAGAGACTGCT GCCAACCTGCAG GACCCCAACCAG CTCTACAATGAG CTCAATCTAGGG CGAAGAGAGGAA
 CGTCTCTGACGA CGGTTGGACGTC CTGGGGTTGGTC GAGATGTTACTC GAGTTAGATCCC GC'TTCTCTCCTT

BamHI

~~~~~

1657 Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P  
 TATGACGTCTTG GAGAAGAAGCGG GCTCG**GGATCCA** GAGATGGGAGGC AAACAGCAGAGG AGGAGGAACCCC  
 ATACTGCAGAAC CTCTTCTTCGCC CGAGC**CCTAGGT** CTCTACCCTCCG TTTGTCTCTCC TCCTCCTTGGGG  
 Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G  
 1729 CAGGAAGCGGTA TACAATGCACTG CAGAAAGACAAG ATGGCAGAAGCC TACAGTGAGATC GGCACAAAAGGC  
 GTCCTTCCGCAT ATGTTACGTGAC GTCTTTCTGTTT TACCGTCTTCGG ATGTCACCTCTAG CCGTGT'TTTCG  
 E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D  
 1801 GAGAGGCGGAGA GGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTAC CAGGGTCTCAGC ACTGCCACCAAG GACACCTATGAT  
 CTCTCCGCCTCT CCGTTCCCGTG CTACCGGAAATG GTCCACAGAGTCG TGACGGTGGTTC CTGTGGATACTA  
 A L H M Q T L A P R *  
 1873 GCCCTGCATATG CAGACCCTGGCC CCTCGCTAA  
 CGGGACGTATAC GTCTGGGACCGG GGAGCGATT

## 6.3.3 # 897: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40

**XbaI**

~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R V A Q
 ATGGATTTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCTCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATG**CTCT** **AGAGT**GGCCAG
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTAC**AGA** **TCTC**ACCGGGTC
 V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S
 73 GTGCAACTGCAG CAGTCAGGGGCT GAGCTGGCTAGA CCTGGGGCTTCA GTGAAGATGTCC TGCAAGGCTTCT
 CACGTTGACGTC GTCAGTCCCGA CTCGACCGATCT GGACCCCGAAGT CACTTCTACAGG ACGT'TCCGAAGA
 G Y T F T T Y T I H W V R Q R P G H D L E W I G
 145 GGCTACACCTTT ACTACCTACACA ATACACTGGGTA AGACAGAGGCCT GGACACGATCTG GAATGGATTGGA
 CCGATGTGGAAA TGATGGATGTGT TATGTGACCCAT TCTGTCTCCGGA CCTGTGCTAGAC CTTACCTAACCT
 Y I N P S S G Y S D Y N Q N F K G K T T L T A D
 217 TACATTAATCCT AGCAGTGGATAT TCTGACTACAAT CAAAACCTTCAAG GGCAAGACCACA TTGACTGCAGAC
 ATGTAATTAGGA TCGTCACCTATA AGACTGATGTTA GTTTTGAAGTTC CCGTTCTGGTGT AACTGACGTCTG
 K S S N T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A
 289 AAGTCTCCAAC ACAGCTACATG CAACTGAACAGC CTGACATCTGAG GACTCTGCGGTC TATTACTGTGCA
 TTCAGGAGGTTG TGTCGGATGTAC GTTGACTTGTCTG GACTGTAGACTC CTGAGACGCCAG ATAATGACACGT
 R R A D Y G N Y E Y T W F A Y W G Q G T T V T V
 361 AGAAGAGCGGAC TATGGTAACTAC GAATATACCTGG TTTGCTTACTGG GGCCAAGGGACC ACGGTCACCGTC
 TCTTCTCGCCTG ATACCATTGATG CTTATATGGACC AAACGAATGACC CCGGTTCCCTGG TGCCAGTGGCAG
 S S G G G G S G G G S G G G G S D I E L T Q S
 433 TCCTCAGGTGGA GGCGTTCAGGC GGAGGTGGCTCT GGCGGTGGCGGA TCGGACATCGAG CTCACTCAGTCT
 AGGAGTCCACCT CCGCCAAGTCCG CCTCCACCGAGA CCGCCACCGCCT AGCCTGTAGCTC GAGTGAGTCAGA
 P K F M S T S V G D R V N V T Y N K A S Q N V G T
 505 CCAAAATTCATG TCCACATCAGTA GGAGACAGGGTC AACGTCACCTAC AAGGCCAGTCAG AATGTGGGTACT
 GGT'TTTAAGTAC AGGTGTAGTCAT CCTCTGTCCCAG TTGCAGTGGATG TTCCGGTTCAGTC TTACACCCATGA
 N V A W F Q Q K P G Q S P K V L I Y S A S Y R Y
 577 AATGTAGCCTGG TTTCAACAAAA CAGGGCAATCT CPTAAAGTTCTG ATTTACTGATAC TCTTACCGTAC
 TTACATCGGACC AAAGTGT'TT'TT GGTCCCGTTAGA GGATTTCAAGAC TAAATGAGCCGT AGAATGGCTATG
 S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q
 649 AGTGGAGTCCCT GATCGCTTCACA GGCAGTGGATCT GGAACAGATTTC ACTCTCACCATC AGCAATGTGCAG
 TCACCTCAGGGA CTAGCGAAGTGT CCGTCACCTAGA CCTTGTCTAAAG TGAGAGTGTAG TCGTTACACGTC
 S E D L A E Y F C Q Q Y H T Y P L T F G G T T K
 721 TCTGAAGACTTG GCAGAGTATTC TGTCAGCAATAT CACACCTATCCT CTCACGTTCCGA GGGGACCAAG
 AGACTTCTGAAC CGTCTCATAAAG ACAGTCTGTATA GTGTGGATAGGA GAGTGCAAGCCCT CCCCCTGGTTC

BamHI

~~~~~

793 L E I K R A D P V P R D C G C K P C I C T V P E  
 CTGGAATCAAA CGGG**CGATCC**T GTGCCAGGGAT TGTGGTTGTAAG CCTTGCATATGT ACAGTCCCAGAA  
 GACCTTTAGTTT GCCCG**CCTAGGA** CACGGTCCCTA ACACCAACATTC GGAACGTATACA TGTACGGGTCTT  
 V S S V F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T  
 865 GTATCATCTGTC TTCATCTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTCTGACT CCTAAGGTCACG  
 CATAGTAGACAG AAGTAGAAGGGG GGT'TTCCGGTTC CTACACGAGTGG TAATGAGACTGA GGAT'TCCAGTGC  
 T V V V D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V  
 937 TGTGTTGTGGTA GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGC TGGTTTGTAGAT GATGTGAGGVTG  
 ACACAACACCAT CTGTAGTCGTTC CTACTAGGGCTC CAGGTCAAGTCG ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC  
 H T A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I  
 1009 CACACAGCTCAG ACGCAACCCCGG GAGGACGAGTTC AACAGCAC'TTTC CGCTCAGTCAGT GAACTTCCCATC  
 GTGTGTCGAGTC TGCGTTGGGGCC CTCTCTCGTCAAG TTGTCGTGAAAG GCGAGTCAGTCA CTTGAAGGGTGA

1081 M H Q D W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I  
 ATGCACCAGGAC TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCCATC  
 TACGTGGTCCCTG ACCGAGTTACCG TTCCTCAAGTTT ACCTCCAGTTG TCACGTGCAAAG GGAGGGGGGTAG  
 1153 E K T I S K T K G R P K A P Q V Y T I P P P K E  
 GAGAAAACCATC TCCAAAACCAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TACACCATTCCA CCTCCCAAGGAG  
 CTCTTTTGGTAG AGGTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ATGTGGTAAGGT GGAGGGTTCCTC  
 1225 Q M A K D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E  
 CAGATGGCCAAG GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAG  
 GTCTACCGGTTCT CTATTTTCAGTCA GACTGGACGTAC TATGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC  
 1297 W Q W N G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y  
 TGGCAGTGGAAAT GGGCAGCCAGCG GAGAACAAGAA AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GTTCGGCTTTAC  
 ACCGTACACCTTA CCCGTCGGTCCG CTCTTGATGTTC TTGTGAGTCGGG TAGTACCTGTGT CTACCGAGAATG  
 F V Y S K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L  
 1369 TTCGTCTACAGC AAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTTACC TGCTCTGTGTGA  
 AAGCAGATGTCC TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGTCTT TATGAAAGTGG ACAGACACAAT

**BstXI**

~~~~~

1441 H E G L H N H H T E K S L S H S P G I V F L A C
 CATGAGGGCCTG CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCT **CCTGGTATTGTG** TTCCTGGCTTGC
 GTACTCCCGGAC GTGTGGTGGTA TGACTTCTCTCG GAGAGGGT**GAGA** **GGACCATAACAC** AAGGACCGAACG
 V L G G S F G F L G F L G L C I L C C V L R A K
 1513 GTGCTGGGTGGC TCCTTCGGCTTT CTGGGTTTCTTT GGGCTCTGCATC CTCTGTGTGTG CTGAGAGCAAAA
 CACGACCCACCG AGGAAGCCGAAA GACCAAAAGGAA CCGGAGACGTAG GAGACTCTCGTTT
 F S R S A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L G
 1585 TTCAGCAGGAGT GCAGAGACTGCT GCCAACCTGCAG GACCCCAACCG CTCTACAATGAG CTCAATCTAGGG
 AAGTCGTCTCTCA CGTCTCTGACGA CGGTTGGACGTC CTGGGGTTGGTC GAGATGTTACTC GAGTTAGATCCC

BamHI

~~~~~

1657 R R E E Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R  
 CGAAGAGAGGAA TATGACGTCTTG GAGAAGAAGCGG GCTCG**GGATCCA** GAGATGGGAGGC AAACAGCAGAGG  
 GCTTCTCTCCTT ATACTGCAGAAC CTCTTCTTCGCC CGAGC**CCTAGGT** CTCTACCCCTCG TTTGTCTCTCC  
 1729 R R N P Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I  
 AGGAGGAACCCC CAGGAAGGCGTA TACAATGCACTG CAGAAAGACAAG ATGGCAGAAGCC TACAGTGAGATC  
 TCCTCTTTGGGG GTCTTCCGCAT ATGTTACGTGAC GTCTTCTGTTC TACCGTCTTCGG ATGTCACCTAG  
 G T K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K  
 1801 GGCACAAAAGGC GAGAGGCGGAGA GGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTAC CAGGGTCTCAGC ACTGCCACCAAG  
 CCGTGTTTTCCG CTCTCCGCCTCT CCGTTCGCCGTG CTACCGGAAATG GTCCAGAGTCG TGACGGTGGTTC  
 D T Y D A L H M Q T L A P R R K A W R L P N T P  
 1873 GACACCTATGAT GCCCTGCATATG CAGACCTGGCC CCTCGCCGGAAG GCTTGGAGATTG CCTAACCTCCC  
 CTGTGGATACTA CGGGACGTATAC GTCTGGGACCGG GGAGCGGCCTTC CGAACCTCTAAC GGATTTGTGAGGG  
 K P C W G N S F R T P I Q E E H T D A H F T L A  
 1945 AAACCTTGTGGT GGAAACAGCTTC AGGACCCCGATC CAGGAGGAACAC ACAGACGCACAC TTTACTCTGGCC  
 TTTGGAACAACC CCTTTGTGCAAG TCCTGGGGCTAG GTCTCTCTGTG TGTCTGCGTGTG AAATGAGACCCG

**BglII**

~~~~~

K I \*
 2017 **AAGATCTGA**
TTCTAGACT

6.3.4 # 898: pBullet-BW431/26scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40

XbaI

~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H  
 ATGGATTTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCTCTGTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT **AGAGGTGTCCAC**  
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTAC**AGA** **TCTCCACAGGTG**  
 73 S Q V Q L Q E S G P G L V R P S Q T L S L T C T  
 TCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGTCCAGGTCTT GTGAGACCTAGC CAGACCCTGAGC CTGACCTGACC  
 AGGGTCCAGGTT GACGTCCCTCAGT CCAGGTCCAGAA CACTCTGGATCG GTCTGGGACTCG GACTGGACTGCG  
 V S G F T I S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E  
 145 GTGTCTGGCTTC ACCATCAGCAGT GGTATAGCTGG CACTGGGTGAGA CAGCCACCTGGA CGAGGTCTTGAG  
 CACAGACCGAAG TGGTAGTCGTCA CCAATATCGACC GTGACCCACTCT GTCGGTGGACCT GCTCCAGAACTC  
 W I G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V T M L  
 217 TGGATTGGATAC ATACAGTACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAGTAGA GTGACAACTGTG  
 ACCTAACCTATG TATGTCATGTCA CCATAGTGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTTCATCT CACTGTTAGCAG  
 V D T S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y  
 289 GTAGACACCAGC AAGAACCAGTTC AGCCTGAGACTC AGCAGCGTGACA GCCGCCGACACC GCGTCTATTAT  
 CATCTGTGGTCG TTCTTGGTCAAG TCGACTCTGAG TCGTCCGACTGT CGGCGGTGTGT CGCCAGATAATA  
 C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T V T V S  
 361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGTCTGGGGC CAAGGGACCACG GTCACCGTCTCC  
 ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG CTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGCAGAGG  
 S G G G S G S G G G S G G G S D I Q L T Q S P  
 433 TCAGGAGGTGGT GGATCGGGCGGT GCGGGTTCGGGT GCGCGCGGATCT GACATCCAGT ACCCAGAGCCCA  
 AGTCTCCACCA CCTAGCCCGCCA CCGCCAGCCCA CCGCCGCTAGA CTGTAGTTCGAC TGGGTCTCGGGT



## 6.3.5 # 901: pBullet-HRS3scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ

		<i>XbaI</i>						
		~~~~~						
		M D F Q	V Q I F	S F L L	I S A S	V I M S	R V A Q	
1		ATGGATTTTCAG	GTGCAGATTTTC	AGCTTCCTGCTA	ATCAGTGCCTCA	GTCATAATG CTC	AGAGT GGCCAG	
		TACCTAAAAGTC	CACGTCTAAAAG	TCGAAGGACGAT	TAGTCACGGAGT	CAGTATTAC AGA	TCTC ACCGGGTC	
		V Q L Q	Q S G A	E L A R	P G A S	V K M S	C K A S	
73		GTGCAACTGCAG	CAGTCAGGGGCT	GAGCTGGCTAGA	CCTGGGGCTTCA	GTGAAGATGTCC	TGCAAGGCTTCT	
		CACGTTGACGTC	GTCAGTCCCCGA	CTCGACCGATCT	GGACCCCGAAGT	CACCTTACAGG	ACGTTCCGAAGA	
		G Y T F	T T Y T	I H W V	R Q R P	G H D L	E W I G	
145		GGCTACACCTTT	ACTACCTACACA	ATACACTGGGTA	AGACAGAGGCCT	GGACACGATCTG	GAATGGATTGGA	
		CCGATGTGAAAA	TGATGGATGTGT	TATGTGACCCAT	TCTGTCTCCGGA	CCTGTGCTAGAC	CTTACCTAACCT	
		Y I N P	S S G Y	S D Y N	Q N F K	G K T T	L T A D	
217		TACATTAATCCT	AGCAGTGGATAT	TCTGACTACAAT	CAAAACTTCAAG	GGCAAGACCACA	TTGACTGCAGAC	
		ATGTAATTAGGA	TCGTCACCTATA	AGACTGATGTTA	GTTTTGAAGTTC	CCGTTCTGGTGT	AACTGACGCTCTG	
		K S S N	T A Y M	Q L N S	L T S E	D S A V	Y Y C A	
289		AAGTCCCTCAAC	ACAGCCTACATG	CAACTGAACAGC	CTGACATCTGAG	GACTCTGCGGTC	TATTACTGTGCA	
		TTCAGGAGGTTG	TGTCGGATGTAC	GTTGACTTGTCC	GACTGTAGACTC	CTGAGACGCCAG	ATAATGACACGT	
		R R A D	Y G N Y	E Y T W	F A Y W	G Q G T	T V T V	
361		AGAAGAGCGGAC	TATGGTAACCTAC	GAATATACCTGG	TTTGTCTACTGG	GGCCAAGGGACC	ACGTCACCGTC	
		TCTTCTCGCCTG	ATACCATTGATG	CTTATATGGACC	AAACGAATGACC	CCGGTTCCCTGG	TGCCAGTGGCAG	
		S S G G	G S G G	G G G S	G G G G	S D I E	L T Q S	
433		TCCTCAGGTGGA	GGCGGTTCCAGG	GGAGGTGGCTCT	GGCGGTGGCGGA	TCGGACATCGAG	CTCACTCAGTCT	
		AGGAGTCCACCT	CCGCCAAGTCCG	CCTCCACCCGAGA	CCGCCACCCGCT	AGCCTGTAGCTC	GAGTGAGTCAGA	
		P K F M	S T S V	G D R V	N V T Y	K A S Q	N V G T	
505		CCAAAATTCATG	TCCACATCAGTA	GGAGACAGGGTC	AACGTCACCTAC	AAGGCCAGTCAG	AAATGTGGGTACT	
		GGTTTTAAGTAC	AGGTGTAGTCAT	CCTCTGTCCCAG	TTGCAGTGGATG	TTCCGGTTCAGTC	TTACACCCATGA	
		N V A W	F Q Q K	P G Q S	P K V L	I Y S A	S Y R Y	
577		AATGTAGCCTGG	TTTCAACAAAAA	CCAGGGCAATCT	CCTAAAGTTCTG	ATTTACTCGGCA	TCTTACCGATAC	
		TTACATCGGACC	AAAGTTGTTTTT	GTCCTCCGTTAGA	GGATTTCAAGAC	TAAATGAGCCGT	AGAATGGCTATG	
		S G V P	D R F T	G S G S	G T D F	T L T I	S N V Q	
649		AGTGGAGTCCCT	GATCGCTTACACA	GGCAGTGGATCT	GGAACAGATTTC	ACTCTCACCATC	AGCAATGTGCAG	
		TCACCTCAGGGA	CTAGCGAAGTGT	CCGTCACCTAGA	CCTTGTCTAAAG	TGAGAGTGGTAG	TCGTTACACGTC	
		S E D L	A E Y F	C Q Q Y	H T Y P	L T F G	G G T K	
721		TCTGAAGACTTG	GCAGAGTATTTT	TGTCAGCAATAT	CACACCTATCCT	CTCACGTTCCGGA	GGGGGCACCAAG	
		AGACTTCTGAAC	CGTCTCATAAAG	ACAGTCTGTATA	GTGTGGATAGGA	GAGTGCAAGCCT	CCCCGTGGTTCC	
		<i>BamHI</i>						
		~~~~~						
		L E I K	R A D P	V P R D	C G C K	P C I C	T V P E	
793		CTGGAATCAAAA	CGGGC <b>GGATCCT</b>	GTGCCCAGGGAT	TGTGGTTGTAAG	CCTTGATATATG	ACAGTCCCAGAA	
		GACCTTTAGTTT	GCCCC <b>CCTAGGA</b>	CACGGGTCCCTA	ACACCAACATTC	GGAACGTATACA	TGTCAGGGTCTT	
		V S S V	F I F P	P K P K	D V L T	I T L T	P K V T	
865		GTATCATCTGTG	TTCATCTTCCCC	CCAAAGCCCAAG	GATGTGCTCACC	ATTACTCTGACT	CCTAAGGTCACG	
		CATAGTAGACAG	AAGTAGAAGGGG	GGTTTTCGGGTTC	CTACACGAGTGG	TAATGAGACTGA	GGATTCCAGTGC	
		C V V V	D I S K	D D P E	V Q F S	W F V D	D V E V	
937		TGTGTTGTGGTA	GACATCAGCAAG	GATGATCCCGAG	GTCCAGTTCAGC	TGGTTTGTAGAT	GATGTGGAGGTG	
		ACACAACACCAT	CTGTAGTCGTTT	CTACTAGGGCTC	CAGGTCAAGTCG	ACCAAACATCTA	CTACACCTCCAC	
		H T A Q	T Q P R	E E Q F	N S T F	R S V S	E L P I	
1009		CACACAGCTCAG	ACGCAACCCCGG	GAGGAGCAGTTC	AACAGCACTTTC	CGCTCAGTCAGT	GAACTTCCCATC	
		GTGTGTCGAGTC	TGCGTTGGGGCC	CTCCTCGTCAAG	TTGTCTGTGAAAG	GCGAGTCAGTCA	CTTGAAGGGTAG	
		M H Q D	W L N G	K E F K	C R V N	S A A F	P A P I	
1081		ATGCACCAGGAC	TGGCTCAATGGC	AAGGAGTTCAAA	TGCAGGGTCAAC	AGTGCAGCTTTC	CCTGCCCCCATC	
		TACGTGTCCTTG	ACCGAGTTACCG	TTCTCAAGTTT	ACGTCACAGTTG	TCACGTCGAAAG	GGACGGGGGTAG	
		E K T I	S K T K	G R P K	A P Q V	Y T I P	P P K E	
1153		GAGAAAACCATC	TCCAAAACCAAA	GGCAGACCCGAA	GCTCCACAGGTG	TACACCATTTCCA	CCTCCCAAGGAG	
		CTCTTTTGGTAG	AGGTTTTGGTTT	CCGTCCTGGCTTC	CGAGGTGTCCAC	ATGTGGTAAGGT	GGAGGGTTCCTC	
		Q M A K	D K V S	L T C M	I T D F	F P E D	I T V E	
1225		CAGATGGCCAAG	GATAAAGTCAGT	CTGACCTGCATG	ATAACAGACTTC	TTCCCTGAAGAC	ATTACTGTGGAG	
		GTCTACCGGTTT	CTATTTTACGTCA	GACTGGACGTAC	TATTGTCTGAAG	AAGGGACTTCTG	TAATGACACCTC	
		W Q W N	G Q P A	E N Y K	N T Q P	I M D T	D G S Y	
1297		TGGCAGTGGAAT	GGGCAGCCAGCG	GAGAACTACAAG	AACACTCAGCCC	ATCATGGACACA	GATGGCTCTTAC	
		ACCGTCACCTTA	CCCGTCGGTCCG	CTCTTGTAGTTC	TTGTGAGTCGGG	TAGTACCTGTGT	CTACCGGAGATG	
		F V Y S	K L N V	Q K S N	W E A G	N T F T	C S V L	
1369		TTCGTCTACAGC	AAGCTCAATGTG	CAGAAGAGCAAC	TGGGAGGCAGGA	AATACTTTCACC	TGCTCTGTGTTA	
		AAGCAGATGTGC	TTTCGAGTTACAC	GTCTTCTCGTTG	ACCTCCGTCCCT	TTATGAAAGTGG	ACGAGACACAAT	
		<i>BstXI</i>						
		~~~~~						
		H E G L	H N H H	T E K S	L S H S	P G I V	F L A C	
1441		CATGAGGGCCTG	CACAACCACCAT	ACTGAGAAGAGC	CTCTC CCACTCT	CCTGGT ATTGTG	TTCTGGCTTGC	
		GTACTCCCGGAC	GTGTTGGTGGTA	TGACTCTTCTCG	GAGAGGGT GAGA	GGACC ATAAC	AAGACCGAACG	
		V L G G	S F G F	L G F L	G L C I	L C C V	N S R R	
1513		GTGCTGGGTGGC	TCCTTCGGCTTT	CTGGGTTTCTTT	GGGCTCTGCATC	CTCTGCTGTGTC	AATAGTAGAAGG	
		CACGACCCACCG	AGGAAGCCGAAA	GACCCAAAGGAA	CCCAGACGCTAG	GAGACGACACAG	TTATCATCTTCC	


```

T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D
1009 ACGCAACCCCGG GAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTT CGCTCAGTCAGT GAACTTCCCATC ATGCACCAGGAC
TGCGTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTCTGTGAAAG GCGAGTCAGTCA CTTGAAGGGTAG TACGTGGTCTCTG
W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I
1081 TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCCATC GAGAAAACCATC
ACCGAGTTACCG TTCCTCAAGTTT ACGTCCCAGTTG TCACGTGCGAAAG GGACGGGGGTAG CTCTTTTGGTAG
S K T K G R P K A P Q V C T I P P P K E Q M A K
1153 TCCAAAACCAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TGCACCATTCCA CCTCCCAAGGAG CAGATGGCCAAG
AGGTTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ACGTGGTAAGGT GGAGGGTTCCTC GTCTACCGGTTT
D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E W Q W N
1225 GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCTGAAGAC ATTACTGTGGAG TGGCAGTGGAAAT
CTATTTTCAGTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC ACCGTCACCTTA
G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V Y S
1297 GGGCAGCCAGCG GAGAACTACAAG AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC TTCGTCTACAGC
CCGTCGGTCCG CTCTTGATGTTT TTGTGATCGGG TAGTACCTGTGT CTACCGAGAATG AAGCAGATGTCG
K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L H E G L
1369 AAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTTACC TGCTCTGTGTTA CATGAGGGGCTG
TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGCTCT TTATGAAAGTGG ACGAGACACAAT GTACTCCCGGAC

```

BstXI
~~~~~

```

H N H H T E K S L S H S P G I V F L A C V L G G
1441 CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCT CCTGGTTATTGTG TTCCTGGCTTGC GTGCTGGGTGGC
GTGTTGGTGGTA TGACTTCTCTCG GAGAGGGTGAGA GGACCATAACAC AAGGACCGAAGC CACGACCCACCG
S F G F L G F L G L C I L C C V N S R R N R L L
1513 TCCTTCGGCTTT CTGGGTTTCTT GGGCTCTGCATC CTCTGCTGTGTC AATAGTAGAAGG AACAGACTCCTT
AGGAAGCCGAAA GACCCAAAGGAA CCCGAGACGTAG GAGACGACACAG TTATCATCTTCC TTGTCTGAGGAA
Q S D Y M N M T P R R P G L T R K P Y Q P Y A P
1585 CAAAGTGACTAC ATGAACATGACT CCCCAGGAGCCT GGGCTCACTCGA AAGCCTTACCAG CCCTACGCCCTT
GTTTCACTGATG TACTTGTACTGA GGGCCTCCGGA CCCGAGTGAGCT TTCGGAATGGTC GGGATGCGGGGA
A R D F A A Y R P L R A K F S R S A E T A A N L
1657 GCCAGAGACTTT GCAGCGTACCGC CCCCTGAGAGCA AAATTCAGCAGG AGTGAGAGACT GCTGCCAACCTG
CGGTCTCTGAAA CGTCGCATGGCG GGGGACTCTCGT TTTAAGTCGTCC TCACGTCTCTGA CGACGGTTGGAC
Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K
1729 CAGGACCCCAAC CAGCTCTACAAT GAGCTCAATCTA GGGCGAAGAGAG GAATATGACGTC TTGAGAAGAAG
GTCCTGGGGTTG GTCGAGATGTTA CTCGAGTTAGAT CCCGCTTCTCTC CTTATACTGCAG AACCTCTTCTTC

```

**BamHI**  
~~~~~

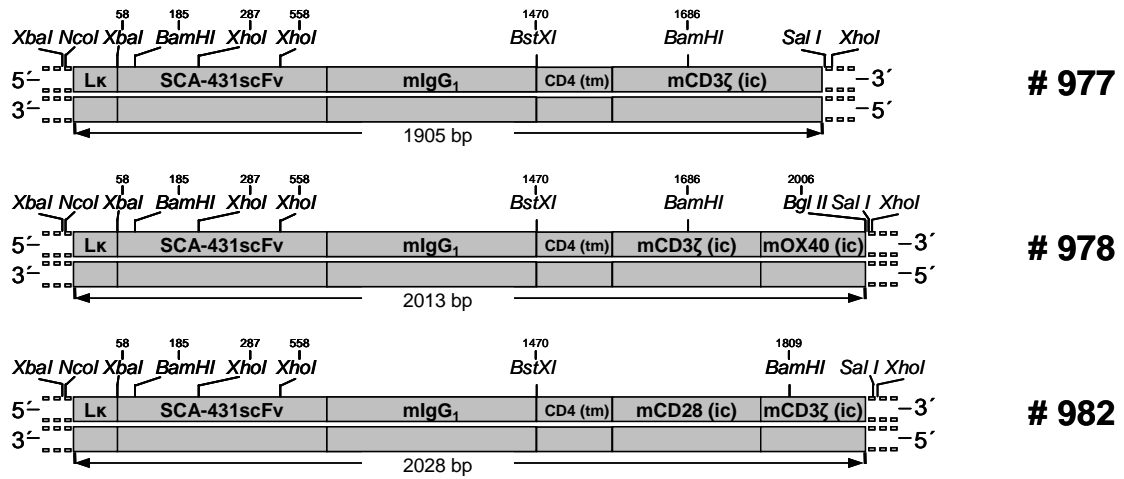
```

R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y N A
1801 CGGGCTCGGGAT CCAGAGATGGGA GGCAAACAGCAG AGGAGGAGGAAC CCCCAGGAAGGC GTATAACAATGCA
GCCCCAGCCCTA GGTCTCTACCTT CCGTTTGTCTGTC TCCTCCTCCTTG GGGGTCTTCCG CATATGTTACGT
L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G
1873 CTGCAGAAAGAC AAGATGGCAGAA GCCTACAGTGAG ATCGGCACAAAA GGCGAGAGGGCG AGAGGCAAGGGG
GACGTCTTTCTG TTCTACCGTCTT CGGATGTCACCT TAGCCGTGTTTT CCGCTCTCCGG TCTCCGTTCCCT
H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q T L
1945 CACGATGGCCTT TACCAGGGTCTC AGCACTGCCACC AAGGACACCTAT GATGCCCTGCAT ATGCAGACCCTG
GTGCTACCGGAA ATGGTCCCAGAG TCGTGACGGTGG TTCCTGTGGATA CTACGGGACGTA TACGTCTGGGAC
A P R *
2017 GCCCCTCGCTAA
CGGGGAGCGATT

```

6.4 DNA Sequenzen der rekombinanten Immunrezeptoren mit Spezifität für CEA, die aus murinen Domänen bestehen.

Gezeigt wird die DNA Sequenz der rekombinanten Immunrezeptoren pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ (#977), pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3 ζ -OX40 (#978) und pBullet-SCA-431-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3 ζ (#982). Die abgeleitete Aminosäure-sequenz wird oberhalb der DNA Sequenz im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Ein “*” kennzeichnet das Stopcodon. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienten, sind durch Fett-Druck gekennzeichnet.



6.4.1 # 977: pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ

XbaI
~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H  
ATGGATTTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATG**TCT** **AGAGGTGTCCAC**  
TACCTAAAAGTC CACGCTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTAC**AGA** **TCTCCACAGGTG**  
S Q V Q L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T  
73 TCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGACCTGACCTG GTGAAACCTTCT CAGTCACTTTCA CTCACCTGCACT  
AGGGTCCAGGTT GACGTCTCAGT CCTGGACTGGAC CACTTTGGAAGA GTCAGTGAAAGT GAGTGGACGTGA

*BamHI*  
~~~~~

145 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G N K L E
GTCAC**TGG**TAC TCCATCACCAGT GGTTATAGCTGG CACT**TGGATCCGG** CAGTTTCCAGGA AACAAACTGGAA
CAGTGACCGATG AGGTAGTGGTCA CCAATATCGACC GTG**ACCTAGGCC** GTCAAAGGTCTT TTGTTTGACCTT

XhoI
~~~

217 W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R I S I T  
TGGATGGGCTAC ATACAATACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAAGT**CGA** ATCTCTATCA**CT**  
ACCTACCCGATG TATGTTATGTCA CCATAGTGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTT**CAGCT** TAGAGATAGT**GA**

*XhoI*  
~~~~~

289 R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y
CGAGACACATCC AAGAACCAGTTC TTCTGCGAGTTG AATTCTGTGACT ACTGAGGACACA GCCACATATTAC
GCTCTGTGTAGG TTCTTGGTCAAG AAGGACGTCAAC TTAAGACACTGA TGACTCCTGTGT CGGTGTATAATG
C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T V S
361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGCTGGGGC CAAGGACCACG GTCACCTCTCC
ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG CTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGCAGAGG
S G G G G S G G G G G S G S D I Q L T Q S P
433 TCAGGAGGTGGT GGATCGGGCGGT GCGGGGTGCGGT GCGGGCGGATCT GACATCCAGCTG ACCCAGTCTCCA
AGTCTCCACCA CCTAGCCCGCCA CCGCCAGCCCA CCGCCGCTAGA CTGTAGGTCGAC TGGTCCAGAGGT

XhoI
~~~~~

505 A I M S A S L G E E I T L T C S A S S S V S Y M  
GCAATCATGTCT GCATCTCTAGGG GAGGAGATCACC CTAACCTGCAGT GCCAG**CTCGAGT** GTAAGTTACATG  
CGTTAGTACAGA CGTAGAGATCCC CTCCTCTAGTGG GATTGGACGTCA CGG**TCGAGCTCA** CATTCAATGTAC  
H W Y Q Q K S G T S P K L L I Y S T S N L A S G  
577 CACTGGTACCAG CAGAAGTCAGGC ACTTCTCCAAA CTCTTGATTTAT AGCACATCCAAC CTGGCTTCTGGA  
GTGACCATGGTC GTCTTCAGTCCG TGAAGAGGGTTT GAGA**ACTAAATA** TCGTGTAGGTTG GACCGAAGACCT  
V P S R F S G S G S G T F Y S L T I S S V E A E  
649 GTCCCTTCTCGC TTCAGTGGCAGT GGGTCTGGGACC TTTTATTCTCTC ACAATCAGCAGT GTGGAGGCTGAA  
CAGGGAAAGCGC AAGTCAACCGTCA CCCAGACCTGG AAAATAAGAGAG TGTAGTGTCTCA CACCTCCGACTT  
D A A D Y Y C H Q W S S Y P T F G G T F K L E I T  
721 GATGCTGCCGAT TATTACTGCCAT CAGTGGAGTAGT TATCCACGTTT GGAGGGGGGACC AAGTGGAGATC  
CTACGACGGCTA ATAATGACGGTA GTCACCTCATCA ATAGGGTGCAAG CCTCCCCCTGG TTCGACCTTAG  
K V D P V P R D G G C K P C I C T V P E V S S V  
793 AAAGTATCCCT GTGCCCAGGAT GGTGGTTGTAAG CCTTGCATATGT ACAGTCCCAGAA GTATCATCTGTC  
TTTCATCTAGGA CACGGTCCCTA CCACCAACATTC GGAACGTATACA TGTCAGGGTCTT CATAGTAGACAG  
F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T C V V V  
865 TTCATCTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTCTGACT CCTAAGGTCACG TGTGTTGTGGTA  
AAGTAGAAGGGG GGTTCGGGTTT CTACACGAGTGA TAATGAGACTGA GGATTCAGTGC ACACAACCCAT  
D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T A Q  
937 GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGC TGGTTTGTAGAT GATGTGGAGGTG CACACAGCTCAG  
CTGTAGTCGTTT CTACTAGGGCTC CAGGTCAAGTGC ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC GTGTGTCGAGTC

T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D  
 1009 ACGCAACCCCGG GAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTC CGCTCAGTCAGT GAACTTCCCATC ATGCACCAGGAC  
 TGCGTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTCGTGAAAAG CCGAGTCAAGTCA CTTGAAGGGTAG TACGTGGTCTGT  
 W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I  
 1081 TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCCATC GAGAAAACCATC  
 ACCGAGTTACCG TTCCTCAAGTTT ACGTCCCAGTTG TCACGTGCGAAAAG GGACGGGGGTAG CTCTTTTGGTAG  
 S K T K G R P K A P Q V C T I P P P K E Q M A K  
 1153 TCCAAAACCAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TGCACCATTTCA CCTCCCAAGGAG CAGATGGCCAAG  
 AGGTTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCCAC ACCTGGTAAGGT GGAGGGTTCCTC GTCTACCGGTTT  
 D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E W Q W N  
 1225 GATAAAGTCAGT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCTGAAGAC ATTACTGTGGAG TGGCAGTGAAT  
 CTATTTTCAGTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC ACCGTCACCTTA  
 G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V Y S  
 1297 GGGCAGCCAGCG GAGAACTACAAG AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC TTCGTCTACAGC  
 CCGTTCGGTTCG CTCTTGATGTTT TTGTGAGTCGGG TAGTACCTGTGT CTACCGAGAATG AAGCAGATGTCTG  
 K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L H E G L  
 1369 AAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AACTACTTTCACC TGCTCTGTGTTA CATGAGGGCTGT  
 TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGTCCT TTATGAAAGTGG ACGAGACACAAT GTACTCCCAGGAC

**BstXI**

~~~~~

H N H H T E K S L S H S P G I V F L A C V L G G
 1441 CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCT **CCTGGT**TATTGTG TTCCTGGCTTGC GTGTGGGTGGC
 CTGTTGGTGGTA TGACTTCTCTCG GAGAGGGT**GAGA** **GGACCATA**ACAC AAGGACCGAAGC CACGACCCACCG
 S F G F L G F L G L C I L C C V L R A K F S R S
 1513 TCCTTCGGCTTT CTGGGTTTCTTT GGGCTCTGCATC CTCTGCTGTGTC CTGAGAGCAAAA TTCAGCAGGAGT
 AGGAAGCCGAAA GACCCAAAGGAA CCCGAGACGTAG GAGACGACACAG GACTCTCGTTTT AAGTCGTCCTCA
 A E T A A N L Q D P N Q L Y N E L N L E R R E E
 1585 GCAGAGACTGCT GCCAACCTGCAG GACCCCAACCAG CTCTACAATGAG CTCAATCTAGGG CGAAGAGAGGAA
 CGTCTCTGACGA CGGTTGGACGTC CTGGGGTTGGTC GAGATGTTACTC GAGTTAGATCCC GCTTCTCTCTTT

BamHI

~~~~~

Y D V L E K K R A R D P E M G G K Q Q R R R N P  
 1657 TATGACGTCTTG GAGAAGAAGCGG GCTCG**GGATCCA** GAGATGGGAGGC AAACAGCAGAGG AGGAGGAACCCC  
 ATACTGCAGAAC CTCTTCTTCGCG CGAGCC**TAGGT** CTCTACCCCTCC TTTGTCTGTECC TCCTCTTGGGG  
 Q E G V Y N A L Q K D K M A E A Y S E I G C T K G  
 1729 CAGGAAGGCGTA TACAATGCACTG CAGAAAGACAAG ATGGCAGAAGCC TACAGTGAGATC GGCACAAAAGGC  
 GTCCTTCGCGAT ATGTTACGTGAC GTCTTTCTGTTC TACCGTCTTCGG ATGTCACCTCTAG CCGTGTTCCTCCG  
 E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D  
 1801 GAGAGGCGGAGA GGCAAGGGGCAC GATGGCTTTAC CAGGTCTCAGC ATGGCCACCAAG GACACCTATGAT  
 CTCTCCGCTCT CCGTTCCTCCGTC CTACCGGAAATG GTCCAGAGTCG TGACGGTGGTTC CTGTGGATACTA  
 A L H M Q T L A P R \*  
 1873 GCCCTGCATATG CAGACCCTGGCC CCTCGCTAA  
 CGGGACGTATAC GTCTGGGACCGG GGAGCGATT

## 6.4.2 # 978: pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD3ζ-mOX40

**XbaI**

~~~~~

M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H
 1 ATGGATTTTCAG GTGCAGATTTTC AGCTTCCTGCTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT **AGAGGT**GTCCAC
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTAC**AGA** **TCTCCAC**AGGTG
 S G V Q L Q E S G P D L V K P S Q S L T C T
 73 TCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGACCTGACCTG GTGAAACCTTCT CAGTCACTTTCA CTCACCTGCACT
 AGGGTCCAGGTT GACGTCTCTCAGT CCTGGACTGGAC CACTTTGGAAGA GTCAGTGAAAGT GAGTGGACGTGA

BamHI

~~~~~

V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G N K L E  
 145 GTCACCTGGCTAC TCCATCACCAGT GGTATAGCTGG **CACTGGATCCGG** CAGTTTCCAGGA AACAACTGGAA  
 CAGTGACCGATG AGGTAGTGGTCA CCAATATCGACC **GTGACCTAGGCC** GTCAAAGGTCTT TTGTTTGACTCT

**XhoI**

~~~

W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R I S I T
 217 TGGATGGGCTAC ATACAATACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAGTTCGA ATCTCTAT**CACT**
 ACCTAACCCGATG TATGTTATGTCA CCATAGTGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTTTCAGCT TAGAGATAG**TGA**

XhoI

~~~~~

R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y  
 289 **CGAGAC**CACATCC AAGAACCAGTTC TTCCTGCAGTTG AATTCTGTGACT ACTGAGGACACA GCCACATATTAC  
**GCCTC**TGTGTAGG TTCTTGGTCAAG AAGGACGTCAAC TTAAGACACTGA TGACTCTGTGT CCGTGTATAATG  
 C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T V S  
 361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGCTGGGGC CAAGGGACCACG GTCACCGTCTCC  
 ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG CTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGCAGAGG  
 S G G G S G G G G S G G G G S G G Q S D I Q L T Q S P  
 433 TCAGGAGGTGGT GGATCGGGCGGT GCGGGTCTGGGT GCGGGCGGATCT GACATCCAGCTG ACCCAGTCTCCA  
 AGTCTCTCCACCA CCTAGCCCGCCA CCGCCAGCCCA CCGCCGCCTAGA CTGTAGGTGCAC TGGGTCTAGAGT

								<i>XhoI</i>																	
								~~~~~																	
	A	I	M	S	A	S	L	G	E	E	I	T	L	T	C	S	A	S	S	S	V	S	Y	M	
505	GCAATCATGTCT	GCATCTCTAGGG	GAGGAGATCACC	CTAACCTGCAGT	GCCAGCTCGAGT	GTAAAGTTACATG																			
	C	G	T	T	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	H	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P	K	L	L	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	
577	CACTGGTACCCAG	CAGAAGTCAGGC	ACTTCTGCCAAA	CTCTTGATTAT	AGCACATCCAAC	CTGGCTTCTGGA																			
	G	T	G	A	G	T	C	A	G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	
	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	F	Y	S	L	T	I	S	S	V	E	A	E	
649	GTCCCTTCTCGC	TTCAGTGGCAGT	GGGTCTGGGACC	TTTTATTCTCTC	ACAATCAGCAGT	GTGGAGGCTGAA																			
	C	A	G	G	A	A	G	A	C	C	A	G	A	A	A	A	T	G	T	A	G	T	A	G	
	D	A	A	D	Y	Y	C	H	Q	W	S	S	Y	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	
721	GATGCTGCCGAT	TATTACTGCCAT	CAGTGGAGTAGT	TATCCACGTTT	GGAGGGGGGACC	AAGCTGGAGATC																			
	C	T	A	C	A	T	A	T	G	T	C	A	A	T	A	G	C	C	T	C	T	T	C	C	
	K	V	D	P	V	P	R	D	G	V	C	K	P	C	I	C	T	V	P	E	V	S	S	T	
793	AAAGTAGATCCT	GTGCCCAGGGAT	GGTGGTTGTAAG	CCTTGCATATGT	ACAGTCCCAGAA	GTATCATCTGTC																			
	T	T	C	A	C	A	C	C	A	A	C	A	T	T	C	A	T	T	C	A	T	T	C	A	
	F	I	F	P	P	K	P	K	D	V	L	T	I	T	L	T	P	K	V	T	C	V	V	V	
865	TTCAATCTCCCC	CCAAAGCCCAAG	GATGTGCTCAC	ATTACTCTGACT	CCTAAGTCTAC	TGTGTGTGTGTA																			
	A	A	G	T	G	G	T	T	C	T	A	C	A	A	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	
	D	I	S	K	D	D	P	E	V	Q	F	S	W	F	V	D	D	V	E	V	H	T	A	Q	
937	GACATCAGCAAG	GATGATCCCGAG	GTCAGTTCAGC	TGGTTTGTAGAT	GATGTGGAGGTG	CACACAGCTCAG																			
	C	T	G	T	C	T	A	C	C	A	G	T	A	C	C	A	C	T	A	C	C	T	A	C	
	T	Q	P	R	E	E	Q	F	N	S	T	F	R	S	V	S	E	L	P	I	M	H	Q	D	
1009	ACGCAACCCCGG	GAGGAGCAGTTC	AACAGCACTTTC	CGCTCAGTCACT	GAACCTCCCATC	ATGCACCAGGAC																			
	T	G	C	G	C	T	C	G	T	C	A	A	G	C	A	G	A	C	T	A	G	C	A		
	W	L	N	G	K	E	F	K	C	R	V	N	S	A	A	F	P	A	A	F	P	A	A	F	
1081	TGGCTCAATGGC	AAGGAGTTCAAA	TGCAGGGTCAAC	AGTGCAGCTTTC	CCTGCCCCATC	GAGAAAACCATC																			
	A	C	C	G	A	G	G	A	A	C	T	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	
	S	K	T	K	G	R	P	K	A	P	Q	V	C	T	I	P	P	P	K	E	Q	M	A	K	
1153	TCCAAAACCAAAA	GGCAGACCGAAG	GCTCCACAGGTG	TGCACCATTC	CCTCCAAGGAG	CAGATGGCCAAG																			
	A	G	G	T	C	C	G	T	C	C	A	G	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	
	D	K	V	S	L	T	C	M	I	T	D	F	F	P	E	D	I	T	V	E	W	Q	W	N	
1225	GATAAAGTCAGT	CTGACCTGCATG	ATAACAGACTTC	TTCCTGAAGAC	ATTACTGTGGAG	TGGCAGTGGAAAT																			
	C	T	A	T	G	A	C	T	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	
	G	Q	P	A	E	N	Y	K	N	T	Q	P	I	M	D	T	D	G	S	Y	F	V	Y	S	
1297	GGGCAGCCAGCG	GAGAACTACAAG	AACACTCAGCCC	ATCATGGACACA	GATGGCTCTTAC	TTCTGCTACAGC																			
	C	C	C	G	C	T	T	G	A	T	G	T	T	G	A	T	T	G	A	T	T	G	A		
	K	L	N	V	Q	K	S	N	W	E	A	G	N	T	F	T	C	S	V	A	H	E	G	L	
1369	AAGCTCAATGTG	CAGAAGAGCAAC	TGGGAGGCAGGA	AATACTTTCACC	TGCTCTGTGTTA	CATGAGGGCCTG																			
	T	T	C	G	G	T	T	C	G	T	T	A	C	C	T	A	C	C	T	A	C	C	T		
								<i>BstXI</i>																	
								~~~~~																	
	H	N	H	H	T	E	K	S	L	S	H	S	P	G	I	V	F	L	A	C	V	L	G	G	
1441	CACAACCACCAT	ACTGAGAAGAGC	CTCTCCACTCT	CCTGGTATTGTG	TTCCTGGCTTGC	GTGCTGGGTGGC																			
	G	T	G	T	T	G	T	G	T	G	A	G	G	G	A	A	A	A	G	A	A	A	G	A	
	S	C	T	T	L	G	F	L	G	L	C	I	L	C	C	V	L	R	A	K	L	R	A	K	
1513	TCCTTCCGCTTT	CTGGGTTTCTTT	GGGCTCTGCATC	CTCTGCTGTGTC	CTGAGAGCAAAA	TTCAGCAGGAGT																			
	A	G	G	A	G	A	C	A	C	C	C	A	G	A	C	A	G	A	C	A	G	A	C	A	
	A	E	T	A	A	N	L	Q	D	P	N	Q	L	Y	N	E	L	N	L	G	R	R	E	E	
1585	GCAGAGACTGCT	GCCAACCTGCAG	GACCCCAACCAG	CTCTACAATGAG	CTCAATCTAGGG	CGAAGAGAGGAA																			
	C	G	T	C	T	G	A	C	T	G	G	G	T	G	G	T	G	A	G	A	G	A	G	A	
								<i>BamHI</i>																	
								~~~~~																	
	Y	D	V	L	E	K	K	R	A	R	D	P	E	M	G	G	K	Q	Q	R	R	R	N	P	
1657	TATGACGTCTTG	GAGAAGAAGCGG	GCTCGGATCCA	GAGATGGGAGGC	AAACAGCAGAGG	AGGAGGAACCCC																			
	A	T	A	C	T	C	T	T	C	G	A	G	C	T	C	T	T	T	C	T	C	T	C		
	Q	E	G	V	Y	N	A	L	Q	K	D	K	M	A	E	A	Y	S	E	I	G	T	K	G	
1729	CAGGAAGCGGTA	TACAATGCACTG	CAGAAAGACAAG	ATGGCAGAAGCG	TACAGTGAGATG	GGCACAAGAGGC																			
	G	T	C	T	A	T	G	T	G	T	C	T	T	A	C	C	T	A	C	T	A	G	T	G	
	E	R	R	R	G	K	G	H	D	G	L	Y	Q	G	L	S	T	A	T	K	D	T	Y	D	
1801	GAGAGGCGGAGA	GGCAAGGGGCAC	GATGGCCTTTAC	CAGGGTCTCAGC	ACTGCCACCAAG	GACACCTATGAT																			
	C	T	C	C	C	G	T	C	C	C	G	T	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C			
	A	L	H	M	Q	T	L	A	P	R	R	K	A	W	R	L	P	N	T	P	K	P	C	W	
1873	GCCCTGCATATG	CAGACCCTGGCC	CCTCGCCGGAAG	GCTTGGAGATTG	CCTAACACTCCC	AAACCTTGTGG																			
	C	G	G	A	C	T	G	G	A	C	C	G	G	A	A	C	C	T	A	A	A	C	T		
								<i>BglII</i>																	
								~~~~~																	
	G	N	S	F	R	T	P	I	Q	E	E	H	T	D	A	H	F	T	L	A	K	I	*		
1945	GGAAAACAGCTTC	AGGACCCCGATC	CAGGAGGAACAC	ACAGACGCACAC	TTTACTCTGGCC	AAAGATCTGA																			
	C	C	T	T	T	G	T	C	G	A	A	G	T	G	T	C	A	A	A	T	G	A	A		

## 6.4.3 # 982: pBullet-SCA-431scFv-mIgG-mCD4-mCD28-mCD3ζ

**XbaI**  
~~~~~

1 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G V H
 ATGGATTTCAG GTGCAGATTTC AGCTTCTCTGTA ATCAGTGCCTCA GTCATAATGTCT **AGAGGTGTCCAC**
 TACCTAAAAGTC CACGTCTAAAAG TCGAAGGACGAT TAGTCACGGAGT CAGTATTACAGA **TCTCCACAGGTG**
 S Q V Q L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
 73 TCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCA GGACCTGACCTG GTGAAACCTTCT CAGTCACTTTCA CTCACTGCCT
 AGGGTCCAGGTT GACGTCCTCAGT CCTGGACTGGAC CACTTTGGAAGA GTCAGTGAAAGT GAGTGGACGTGA

BamHI
~~~~~

145 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G N K L E  
 GTCACCTGGCTAC TCCATCACCAGT GGTTATAGCTGG CACT**GGATCCGG** CAGTTTCCAGGA AACAAACTGGAA  
 CAGTGACCGATG AGGTAGTGGTCA CCAATATCGACC GTG**ACCTAGGCC** GTCAAAGGTCTT TTGTTTGACCTT

**XhoI**  
~~

217 W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R I S I T  
 TGGATGGGCTAC ATACAATACAGT GGTATCACTAAC TACAACCCCTCT CTCAAAGTTCGA ATCTCTATCACT  
 ACCTACCCGATG TATGTTATGTCA CCATAGTGATTG ATGTTGGGGAGA GAGTTTTCAGCT TAGAGATAGTGA

**XhoI**  
~~~~~

289 R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y
CGAGACACATCC AAGAACCAGTTC TTCCTGCAGTTG AATTCTGTGACT ACTGAGGACACA GCCACATATTAC
GCTCTGTGTAGG TTCTTGGTCAAG AAGGACGTCAAC TTAAGACACTGA TGACTCCTGTGT CCGTGTATAATG
 C A R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T V S
 361 TGTGCAAGAGAA GACTATGATTAC CACTGGTACTTC GATGTCTGGGGC CAAGGGACCACG GTCACCGTCTCC
 ACACGTTCTCTT CTGATACTAATG GTGACCATGAAG GTACAGACCCCG GTTCCCTGGTGC CAGTGGCAGAGG
 S G G G G S G G G G S G G G S D I Q L T Q S P
 433 TCAGGAGGTGGT GGATCGGGCGGT GCGGGTTCGGGT GCGGGCGGATCT GACATCCAGCTG ACCCAGTCTCCA
 AGTCTCCACCA CCTAGCCCGCCA CCGCCAGCCCA CCGCCGCCTAGA CTGTAGTTCGAC TGGGTCCAGAGT

XhoI
~~~~~

505 A I M S A S L G E E I T L T C S A S S S V S Y M  
 GCAATCATGTCT GCATCTCTAGGG GAGGAGATCACC CTAACCTGCAGT GCCAG**CTCGAGT** GTAAGTTACATG  
 CGTTAGTACAGA CGTAGAGATCCC CTCCTCTAGTGG GATTGGACGTCA CGGT**CGAGCTCA** CATTCAATGTAC  
 H W Y Q Q K S G T S P K L L I Y S T S N L A S G  
 577 CACTGGTACCAG CAGAAGTCAGGC ACTTCTCCAAA CTCTTGATTAT AGCACATCCAAC CTGGCTTCTGGA  
 GTGACCATGGTC GTCTTCAGTCCG TGAAGAGGGTTT GAGAACTAAATA TCGTGTAGSTTG GACCGAAGACCT  
 V P S R F S G S G S G T F Y S L T I I S V A E  
 649 GTCCCTTCTCGC TTCAGTGGCAGT GGGTCTGGGACC TTTTATTCTCTC ACAATCAGCAGT GTGGAGGCTGAA  
 CAGGGAAGAGCG AAGTCACCGTCA CCCAGACCCTGG AAAATAAGAGAG TGTTAGTCGTCA CACCTCCGACTT  
 D A A D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E I  
 721 GATGCTGCCGAT TATTACTGCCAT CAGTGGAGTAGT TATCCCACGTTT GAGGGGGGACC AAGCTGGAGATC  
 CTACGACGGCTA ATAATGACGGTA GTCACCTCATCA ATAGGGTGC AAG CCTCCCCCTGG TTCGACCTTAG  
 K V D P V P R D G G C K P C I C T V P E V S S V  
 793 AAAGTAGATCCT GTGCCAGGGAT GGTGGTTGTAAG CCTTGCATATGT ACAGTCCCAGAA GTATCATCTGTC  
 TTTTACTAGGA CACGGTCCCTA CCACCAACATT GGAACGTATACA TGTCAAGTCTT CATAGTACAG  
 F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T C V V V  
 865 TTCATCTTCCCC CCAAAGCCCAAG GATGTGCTCACC ATTACTCTGACT CCTAAGTCCAG TGTGTTGTGGTA  
 AAGTAGAAGGGG GGTTCGGGTTT CTACACGAGTGG TAATGAGACTGA GGATTCCAGTGC ACACAACCCAT  
 D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E H T A Q  
 937 GACATCAGCAAG GATGATCCCGAG GTCCAGTTCAGC TGGTTGTAGAT GATGTGGAGGTG CACACAGCTCAG  
 CTGTAGTCGTTT CTAAGAGGCTC CAGGTCAAGTCG ACCAAACATCTA CTACACCTCCAC GTGTGTCGAGTC  
 T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D  
 1009 ACGCAACCCCGG GAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTT CGCTCAGTCACT GAACTTCCCATC ATGCACCAGGAC  
 TGCCTTGGGGCC CTCCTCGTCAAG TTGTCTGAAAAG GCGAGTCACTCA CTTGAAGGGTAG TACGTGGTCTGT  
 W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I  
 1081 TGGCTCAATGGC AAGGAGTTCAAA TGCAGGGTCAAC AGTGCAGCTTTC CCTGCCCCATC GAGAAAACCCATC  
 ACCGAGTTACCG TTCCTCAAGTTT ACGTCCCAGTTG TCACGTCGAAAG GGACGGGGTAG CTCTTTTGGTAG  
 S K T K G R P K A P Q V C T I P P P K E Q M A K  
 1153 TCCAAAACCAAA GGCAGACCGAAG GCTCCACAGGTG TGCACCATCCA CCTCCCAAGGAG CAGATGGCCAAG  
 AGGTTTTGGTTT CCGTCTGGCTTC CGAGGTGTCAC ACGTGGTAAGGT GGAGGGTTCCCT GTCTACCGGTTT  
 D K V S L T C M I T D F I P E D I T V E W Q W N  
 1225 GATAAAGTCACT CTGACCTGCATG ATAACAGACTTC TTCCTGAAAGAC ATTACTGTGGAG TGGCAGTGGAAAT  
 CTATTTCACTCA GACTGGACGTAC TATTGTCTGAAG AAGGGACTTCTG TAATGACACCTC ACCGTCACCTTA  
 G Q P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V Y S  
 1297 GGGCAGCCAGCG GAGAATAACAAG AACACTCAGCCC ATCATGGACACA GATGGCTCTTAC TTCGTCTACAGC  
 CCCGTCCGTCCG CTCTTGATGTTT TTGTGAGTCGGG TAGTACCTGTGT CTACCCGAGAATG AAGCAGATGTCG  
 K L N V Q K S N W E A G N T F T C S V L H E G L  
 1369 AAGCTCAATGTG CAGAAGAGCAAC TGGGAGGCAGGA AATACTTTTACC TGCTCTGTGTTA CATGAGGGCCTG  
 TTCGAGTTACAC GTCTTCTCGTTG ACCCTCCGTCCT TTATGAAAGTGG ACGAGACACAAT GTACTCCCGGAC  
 H N H H T E K S L S H S P G I V F L A C V L G G

**BstXI**  
~~~~~

1441 CACAACCACCAT ACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCT **CCTGGTATTGTG** TTCCTGGCTTGC GTGCTGGGTGGC
 GTGTTGGTGGTA TGACTCTTCTCG GAGAGGGT**GAGA** **GGACCATAACAC** AAGGACCGAAGC CACGACCCACCG

S F G F L G F L G L C I L C C V N S R R N R L L
 1513 TCCTTCGGCTTT CTGGGTTTCCTT GGGCTCTGCATC CTCTGCTGTGTC AATAGTAGAAGG AACAGACTCCTT
 AGGAAGCCGAAA GACCCAAAAGGAA CCCGAGACGTAG GAGACGACACAG TTATCATCTTCC TTGTCTGAGGAA
 Q S D Y M N M T P R R P G L T R K P Y Q P Y A P
 1585 CAAAGTGACTAC ATGAACATGACT CCCCGAGGGCCT GGGCTCACTCGA AAGCCTTACCAG CCCTACGCCCTT
 GTTCTACTGATG TACTTGTACTGA GGGGCTCCGGA CCCGAGTGAGCT TTCGGAATGGTC GGGATGCGGGGA
 A R D F A A Y R P L R A K F S R S A E T A A N L
 1657 GCCAGAGACTTT GCAGCGTACCGC CCCCTGAGAGCA AAATTCAGCAGG AGTGCAGAGACT GCTGCCAACCTG
 CGGTCTCTGAAA CGTCGCATGGCG GGGGACTCTCGT TTTAAGTCGTCC TCACGTCTCTGA CGACGGTTGGAC
 Q D P N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K
 1729 CAGGACCCCAAC CAGCTCTACAAT GAGCTCAATCTA GGGCGAAGAGAG GAATATGACGTC TTGAGAAGAAG
 GTCTGGGGTTG GTCGAGATGTTA CTCGAGTTAGAT CCCGCTTCTCTC CTTATACTGCAG AACCTCTTCTTC
BamHI
 ~~~~~  
 R A R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y N A  
 1801 CGGGCTCGGGAT **CCAGAGATGGGA** GGCAAACAGCAG AGGAGGAGGAAC CCCAGGAAGGC GTATACAATGCA  
 GCCCAGAG**CCCTA** **GGTCTCTACCCT** CCGTTTGTCTGTC TCCTCCTCCTTG GGGGTCTTCCG CATATGTTACGT  
 L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E R R R G K G  
 1873 CTGCAGAAAGAC AAGATGGCAGAA GCCTACAGTGAG ATCGGCACAAAA GGCGAGAGGCGG AGAGGCAAGGGG  
 GACGTCTTTCTG TTCTACCGTCTT CGGATGTCACTC TAGCCGTGTTTT CCGCTCTCCGCC TCTCCGTTCCCC  
 H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q T L  
 1945 CACGATGGCCTT TACCAGGGTCTC AGCACTGCCACC AAGGACACCTAT GATGCCCTGCAT ATGCAGACCCTG  
 GTGCTACCCGAA ATGGTCCCAGAG TCGTGACGGTGG TTCCTGTGGATA CTACGGGACGTA TACGTCTGGGAC  
 A P R \*  
 2017 GCCCCTCGCTAA  
 CGGGGAGCGATT

## 7 Literaturverzeichnis

### A

Adams, G. P.; Schier, R.; McCall, A. M.; Simmons, H. H.; Horak, E. M.; Alpaugh, R. K.; Marks, J. D.; Weiner, L. M. (2001): High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules, *Cancer Research*, 61(12): 4750-4755.

Altenschmidt, U.; Klundt, E.; Groner, B. (1997): Adoptive transfer of *in vitro*-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression, *Journal of Immunology*, 159: 5509-5515.

Arakawa, F.; Shibaguchi, H.; Xu, Z.; Kuroki, M. (2002): Targeting of T cells to CEA-expressing tumor cells by chimeric immune receptors with a highly specific single-chain anti-CEA activity, *Anticancer Research*, 22(6C): 4285-4289.

### B

Baniyash, M.; Garcia-Morales, P.; Luong, E.; Samelson, L. E., Klausner R. D. (1988): The T cell antigen receptor  $\zeta$  chain is tyrosine phosphorylated upon activation, *Journal of Biological Chemistry*, 263: 18225-18230.

Beauchemin, N.; Draber, P.; Dveksler, G.; Gold, P.; Gray-Owen, S.; Grunert, F.; Hammarstrom S.; Holmes, K. V.; Karlsson, A.; Kuroki, M.; Lin, S. H.; Lucka, L.; Najjar, S. M.; Neumaier, M.; Obrink, B.; Shively, J. E.; Skubitz, K. M.; Stanners, C. P.; Thomas, P.; Thompson, J. A.; Virji, M.; von Kleist, S.; Wagener, C.; Watt, S.; Zimmermann, W (1999): Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family, *Experimental Cell Research*, 252(2): 243-249.

Bieganowska, K.; Hollsberg, P.; Buckle, G. J.; Greten, T. F.; Schneck, J.; Altmann, J. D.; Jacobson, S.; Ledis, S.L.; Hanchard, B.; Chin, J.; Morgan, O.; Roth, P. A.; Hafler, D. A. (1999): Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy, *Journal of Immunology*, 162(3): 1765-1771.

Bonnevier, J. L.; Yarke, C. A.; Mueller, D. L. (2006): Sustained B7/CD28 interactions and resultant phosphatidylinositol 3-kinase activity maintain G1  $\rightarrow$  S phase transitions at an optimal rate, *European Journal of Immunology*, 36(6): 1583-1597.

Brentjens, R. J.; Latouche, J. B.; Santos, E.; Marti, F.; Gong, M. C.; Lyddane, C.; King, P. D.; Larson, S.; Weiss, M.; Riviere, I.; Sadelain, M. (2003): Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and Interleukin-15, *Nature medicine*, 9(3): 279-286.

### C

Canham, M. & Talbot, S. J. (2004): A naturally occurring C-terminal truncated isoform of the latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus does not associate with viral episomal DNA, *Journal of General Virology*, 85(Pt6): 1369-1369.

Chmielewski, M.; Hombach, A.; Heuser, C.; Adams, G. P.; Abken, H. (2004): T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain



fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity, *173*(12): 7647-7653.

Cobleigh, M. A.; Vogel, C. L.; Tripathy, D.; Robert, N. J.; Scholl, S.; Fehrenbacher, L.; Wolter, J. M.; Paton, V.; Shak, S.; Liebermann, G.; Slamon, D. J. (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER-2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease, *Journal of clinical Oncology*, *17*: 2639-2648.

Constant, S.L.; Bottomly, K. (1997): Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches, *Annual review of Immunology*, *15*: 297-322.

Croft, M. (2003): Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity ?, *Nature Reviews Immunology*, *3*(8): 609-620.

Crombet, T.; Osorio, M.; Cruz, T.; Rosa, C.; del Castillo, R.; Mon, R.; Iznaga,-Escobar, N.; Figueredo, R.; Koropatnick, J.; Renginfo, E.; Fernandez, E.; Alvarez, D.; Torres, O.; Ramos, M.; Leonard, I.; Perez, R.; Lage, A. (2004): Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients, *Journal of clinical Oncology*, *22*: 1646-1654.

## **D**

Darcy, P. K.; Haynes, N.M.; Snook, M. B.; Trapani, J. A.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Smyth (2000): Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL, *Journal of Immunology*, *164*(7): 3705-3712.

Dudley, M. E.; Wunderlich, J. R.; Shelton, T. E. (2003): Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive therapy for melanoma patients, *Journal of Immunotherapy*, *26*(4): 332-342.

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; Topalian, S. L.; Restifo, N. P.; Royal, R. E.; Kammula, U.; White, D. E.; Mavroukakis, S. A.; Gracia, G. J.; Mangiamelli, D. P.; Pelletier, M. M.; Gea-Banacloche, J.; Robinson, M. R.; Berman, D. M.; Filie, A. C.; Abati, A.; Rosenberg, S. A. (2005): Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma, *Journal of Clinical Oncology*, *23*(10): 2346-2357.

Dwenger, A.; Lindemann, A.; Mertelsmann, R. (1996): Minimal residual disease: detection, clinical relevance, and treatment strategies, *Journal of Hematotherapy*, *5*(5): 537-548.

## **E**

Eades-Perner, A. M.; van der Putten, H.; Hirth, A.; Thompson, J.; Neumaier, M; von Kleist, S.; Zimmermann, W. (1994): Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern, *Cancer Research*, *54*(15): 4169-4176.

Eck, S. C.; Chang, D.; Wells, A. D.; Turka, L. A. (1997): Differentiation down-regulation of CD28 by B7-1 and B7-2 engagement, *Transplantation*, *64*(10): 1497-1499.

Erkanli, A.; Taylor, D. D.; Dean, D.; Eksir, F.; Egger, D.; Geyer, J.; Nelson, B. H.; Stone, B.; Fritsche, H. A.; Roden R. B. (2006): Application of Bayesian modeling of autologous antibody responses against ovarian tumor-associated antigens to cancer detection, *Cancer Research*, 66(3): 1792-1798.

Eshhar, Z.; Waks, G.; Gross, G.; Schindler, D. G. (2001): Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells, *Journal of Immunological Methods*, 248: 67-76.

## **F**

Fan, Y.; Ge, Y.; Wang, Y.; Yang, B.; Zhuang, Y.; Ma, H.; Zhang, X. (2004): Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against CD40L: epitope and functional studies on cell membrane CD40L and studies on the origin of soluble serum CD40L, *Tissue Antigens*, 64(3): 257-263.

Finney, H. M.; Akbar, A. N.; Lawson, A. D. (2004) Activation of resting primary human T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain, *Journal of Immunology*, 172(1): 104-113.

Fletcher, R. H. (1986): Carcinoembryonic antigen, *Annals of Internal Medicine*, 104(1): 66-73.

Friedmann-Morvinski, D.; Bendavid, A.; Waks, T.; Schindler, D.; Eshhar, Z. (2005): redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation, *Blood*, 105(8): 3087-3093.

Friend, P. J.; Hale, G.; Chatenoud, L.; Rebello, P.; Bradley, J.; Thiru, S.; Phillips, J. M.; Waldmann, H. (1999): Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection, *Transplantation*, 68: 1632-1637.

## **G**

Gonda, T.; Okada, N.; Nakada, H.; Yokoyama, M.; Miyazaki, T.; Ishibashi, K.; Ishida, H.; Matsumoto, Y.; Miura, T. (2006): [The relationship between plasma level of VEGF or soluble Flt-1 and efficacy of hepatic arterial chemotherapy in patients with liver metastasis of colorectal cancer], *Gan To Kagaku Ryoho*, 33(12): 1841-1844.

Gonzales, N. R.; De Pascalis, R.; Schlom, J.; Kashmiri, S. V. (2005) : Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application, *Tumour biology*, 26(1): 31-43.

Gramaglia, I.; Weinberg, A. D.; Lemon, M.; Croft, M. (1998): OX-40 ligand a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses, *Journal of Immunology*, 161(12): 6510-6517.

## **H**

Hatada, M. H.; Lu, X.; Laird, E. R.; Green, J.; Morgenstern, J. P.; Lou, M.; Marr, C. S.; Phillips, T. B.; Ram, M. K.; Theriault, K. (1995): Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor, *Nature*, 377: 32-38.

Haynes, N. M.; Snook, M. B.; Trapani, J. A.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Smyth, M. J.;

Darcy, P. K. (2001): Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma, *Journal of Immunology*, 166(1): 182-187.

Haynes, N. M.; Trapani, J. A.; Teng, M. W.; Jackson, J. T.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Kershaw, M. H.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. (2002): Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors, *Blood*, 100(9): 3155-3163.

Haynes, N.M.; Trapani, J. A.; Teng, M. W.; Jackson, J. T.; Cerruti, L.; Jane, S. M.; Kershaw, M. H.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. (2002): Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation, *Journal of Immunology*, 169(10): 5780-5786.

Hombach, A.; Sircar, R.; Heuser, C.; Tillmann, T.; Kruis, W.; Diehl, V.; Pohl, C.; Abken, H. (1998): Chimeric anti-TAG72 receptors with immunoglobulin constant Fc domains and gamma or zeta signalling chains, *International Journal of Molecular Medicine*, 2(1): 99-103.

Hombach, A.; Koch, D.; Sircar, R.; Heuser, C.; Diehl, V.; Kruis, W.; Pohl, C.; Abken, H. (1999): A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA, *Gene Therapy*, 6(2): 300-304.

Hombach, A.; Heuser, C.; Gerken, M.; Fischer, B.; Lewalter, K.; Diehl, V.; Abken, H. (2000): T cell activation by recombinant Fc epsilon RI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition, *Gene Therapy*, 7(12): 1067-1075.

Hombach, A.; Schneider, C.; Sent, D.; Koch, D.; Willemsen, R. A.; Diehl, V.; Kruis, W.; Bolhuis, R. L.; Pohl, C.; Abken, H. (2000): An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood T cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells, *International Journal of Cancer*, 88(1): 115-120.

Hombach, A.; Wieczarkowicz, A.; Marquardt, T.; Heuser, C.; Usai, L.; Pohl, C.; Seliger, B.; Abken, H. (2001): Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule, *Journal of Immunology*, 167(11): 6123-6131.

Huston, J. S. & George, A. J. (2001): Engineered antibodies take center stage, *Human Antibodies*, 10(3-4): 127-142.

Hombach, A.; Heuser, C.; Abken, H. (2002): The recombinant T cell receptor strategy: insights into structure and function of recombinant immunoreceptors on the way towards an optimal receptor design for cellular immunotherapy, *Current Gene Therapy*, 2(2): 211-226.

Hwu, P.; Yang, J. C.; Cowherd, R.; Treisman, J.; Shafer, G. E.; Eshhar, Z.; Rosenberg,

S. A. (1995): In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes, *Cancer Research*, 55(15): 3369-3373.

## **I**

Imai, C.; Mihara, K.; Andreansky, M.; Nicholson, I. C.; Pui, C. H.; Geiger, T. L.; Campana, D. (2004): Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 18(4): 676-684.

Ito, T.; Wang, Y. H.; Duramad, O.; Hanabuchi, S.; Perng, O. A.; Gilliet, M.; Qin, F. X.; Liu, Y. J. (2006): OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells, *PNAS*, 103(35): 13138-13143.

Ito, T.; Wang, Y. H.; Duramand, O.; Hori, T.; Delespesse, G. J.; Watanabe, N.; Qin, F. X.; Yao, Z.; Cao, W.; Liu, Y. (2005): TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand, *Journal of experimental medicine*, 202(9): 1213-1223.

Itoh, K.; Inoue, K.; Tezuka, T.; Tada, H.; Hashimoto, Y.; Masuko, T.; Suzuki, T. (2003): Molecular structural and functional characterization of tumor suppressive anti-ErbB-2 monoclonal antibody by phage display system, *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 133(2): 239-245.

Iwashima, M.; Irving, B. A.; van Oers, N. S.; Chan, A. C.; Weiss, A. (1994): Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases, *Science*, 263: 1136-1139.

## **J**

Jiang, H. R.; Gilham, D. E.; Mulryn, K.; Kirillova, N.; Hawkins, R. E.; Stern, P. L. (2006): Combination of vaccination and chimeric receptor expressing T cells provides improved active therapy of tumors, *Journal of Immunology*, 177(7): 4288-4298.

## **K**

Kalunian, K. C.; Davis, J. C.; Merrill, J. T.; Totoristis, M. C.; Wofsy, D. (2002): Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis and Rheumatism*, 46: 3251-3258.

Kershaw, M. H.; Westwood, J. A.; Zhu, Z.; Witte, L.; Libutti, S. K.; Hwu, P. (2000): Generation of gene-modified T cells reactive against the angiogenic kinase insert domain-containing receptor (KDR) found on tumor vasculature, *Human Gene Therapy*, 11(18): 2445-2452.

Kershaw, M. H.; Westwood, J. A.; Hwu, P. (2002): Dual-specific T combine proliferation and antitumor activity, *Nature Biotechnology*, 20: 1221-1227.

Kershaw, M. H.; Teng, M. W.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. (2005): Supernatural T cells: Genetic modification of T cells for Cancer Therapy, *Nature reviews Immunology*, 5(12): 928-940.

Kiem, H. P.; Sillers, S.; Thomasson, B.; Morris, J. C.; Tisdale, J. F.; Horn, P. A.; Hematti, P.; Adler, R.; Kuramoto, K.; Calmels, B.; Bonifacino, A.; Hu, J.; von Kalle,

C.; Schmidt, M.; Sorrentino, M., Nienhuis, A.; Blau, C. A.; Andrews, R. G.; Donahue, R. E.; Dunbar, C. E. (2004): Long-term clinical and molecular follow-up of large animals receiving retrovirally transduced stem and progenitor cells: no progression to clonal hematopoiesis or leukemia, *Molecular Therapy*, 9(3): 389-395.

Kinugasa, T.; Kuroki, M.; Takeo, H.; Matsuo, Y.; Ohshima, K.; Yamashita, Y.; Shirakusa, T.; Matsuoka, Y. (1998): Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas, *International Journal of Cancer*, 76(1): 148-153.

## **L**

Lamers, C. H.; Willemsen, R. A.; Luider, B. A.; Debets, R.; Bolhuis, R. L. (2002): Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer, *Cancer Gene Therapy*, 9: 613-623.

Levin, L. V. & Griffin, T. W. (1991): Specific adhesion of carcinoembryonic antigen-bearing colorectal cancer cells to immobilized carcinoembryonic antigen, *Cancer Letters*, 60(2): 143-152.

Litvinov, I. V.; Vander Griend D.; J., Xu, Y.; Antony, L.; Dalrymple, S. L.; Isaacs, J. T. (2006): Lo-calcium serum-free defined medium selects for growth of normal prostatic epithelial stem cells, *Cancer Research*, 66(17): 8598-8607.

Lou, Y.; Wang, G.; Lizee, G.; Kim, G. J.; Finkelstein, S. E.; Feng, C.; Restifo, N. P.; Hwu, P. (2004): Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo, *Cancer Research*, 64(18): 6783-6790.

## **M**

Maher, J.; Brentjens, R. J.; Gunset, G.; Riviere, I.; Sadelain, M. (2002): Human T-lymphocytes cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR $\zeta$ /CD28 receptor, *Nature biotechnology*, 20: 70-75.

Mandruzzato, S.; Brasseur, F.; Andry, G.; Boon, T.; van der Bruggen, P. (1997): A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma, *Journal of experimental medicine*, 186(5): 785-793.

Matsuoka, Y.; Matsuo Y.; Okamoto, N.; Kuroki, M.; Ikehara, Y. (1991): Highly effective extraction of carcinoembryonic antigen with phosphatidylinositol-specific phospholipase C, *Tumour Biology*, 12(2): 91-98.

McGuinness, R. P.; Ge, Y.; Patel, S. D.; Kashmiri, S. V.; Lee, H. S.; Hand, P. H.; Schlom, J.; Finer, M. H.; McArthur, J. G. (1999): Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49-zeta chimeric immune receptor, *Human Gene Therapy*, 10(2): 165-173.

Moeller, M.; Haynes, N. M.; Kershaw, M. H.; Jackson, J. T.; Teng, M. W.; Street, S. E.; Cerutti, L.; Jane, S. M.; trapani, J. A.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. (2005): Adoptive transfer of gene-engineered CD4<sup>+</sup> helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection, *Blood*, 106(9): 2995-3003.

Moertel, C. G.; O'Fallon, J. R. ; Go, V. L.; O'Connell, M. J.; Thynne, G. S. (1986): The

preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer, *Cancer*, 58(3): 603-610.

Mor, F.; Cohen, I. R. IL-2 rescues antigen specific T-cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2, *Journal of Immunology*, 156, 515-522.

Moritz, D. and Groner, B. (1995): A spacer region between the single chain antibody and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signalling activity, *Gene Therapy*, 2: 539-546.

Muramatsu, H.; Yoshikawa, K.; Hayashi, T.; Takasu, S.; Kawada, Y.; Uchida, K.; Sato, S.; Takahashi, T.; Saga, S.; Ueda, R. (2005): Production and characterization of an active single-chain variable fragment antibody recognizing CD25, *Cancer Letters*, 225(2): 225-236.

Myers, R. B.; Brown, D.; Oelschlager, D. K.; Waterbor, J. W.; Marshall, M. E.; Srivasava, S.; Stockard, C. R.; Urban, D. A.; Grizzle, W. E. (1996): Elevated serum levels of p105(erbB-2) in patients with advanced-stage prostatic adenocarcinoma, *International journal of Cancer*, 69(5): 398-402.

## **N**

Neumann, E.; Engelsberg, A.; Decker, J.; Storkel, S.; Jaeger, E.; Huber, C.; Seliger, B. (1998): Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens to cancer detection, *Cancer Research*, 58(18): 4090-4095.

Niedermann, T. M.; Ghogawala, Z.; Carter, B. S.; Russell, M. M.; Mulligan, R. C. (2002): Antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes engineered to target vascular endothelial growth factor receptors, *PNAS*, 99(10): 7009-7014.

## **O**

van Oers, N. S.; Killeen, N.; Weiss, A. (1996): Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes, *Journal of experimental Medicine*, 183: 1053-1062.

## **P**

Palmer, D. C.; Balasubramaniam, S.; Hanada, K.; Wrzesinski, C.; Yu, Z.; Farid, S.; Theoret, M. R.; Hwang, L. N.; Klebanoff, C. A.; Gattinoni, L.; Goldstein, A. L.; Yang, J. C.; Restifo, N. P. (2004): Vaccine-stimulated, adoptively transferred CD8+ T cells traffic indiscriminately and ubiquitously while mediating specific tumor destruction, *Journal of Immunology*, 173(12): 7209-7216.

Pavoni, E.; Flego, M.; Dupuis, M. L.; Barca, S.; Petronzelli, F.; Anastasi, A. M.; D'Alessio, V.; Pellaccia, A.; Vaccaro, P.; Monteriu, G.; Ascione, A.; De Santis, R.; Felici, F.; Cianfriglia, M.; Minenkova, O. (2006): Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein, *BMC Cancer*, 24; 6:41.

## **Q**

Qin, S.; Cobbold, S.; Tighe, H.; Benjamin, R.; Waldmann, H. (1987): CD4 monoclonal antibody pairs for immunosuppression and tolerance induction, *European journal of Immunology*, 17(8): 1159-1165.

## R

Radvanyi, M.E.; Shi, Y.; Vaziri, H.; Sharma, A.; Dhala, R.; Mills, G. B.; Miller, R. G. (1996): CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response, *Journal of Immunology*, 156: 1788-1798.

Reinhold, U.; Liu, L.; Ludtke-Handjery, H. C.; Heuser, C.; Hombach, A.; Wang, X.; Tilgen, W.; Ferrone, S.; Abken, H. (1999): Specific lysis of melanoma cells by receptor grafted T cells is enhanced by anti-idiotypic monoclonal antibodies directed to the scFv domain of the receptor, *Journal of Investigative Dermatology*, 112(5): 744-750.

Ren-Heidenreich, L.; Hayman, G. T.; Trevor, K. T. (2000): Specific targeting of EGP-2<sup>+</sup> tumor cells by primary lymphocytes modified with chimeric T cell receptors, *Human Gene Therapy*, 11: 9-19.

Ritter, G.; Cohen, L. S.; Williams, C.; Richards, E. C.; Old, L. J.; Welt, S. (2001): Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33, *Cancer Research*, 61: 6851-6859.

Rossig, C.; Bollard, C. M.; Nuchtern, J. G.; Merchant, D. A.; Brenner, M. K. (2001): Targeting of GD2-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes, *International Journal of Cancer*, 94: 228-236.

## S

Saha, A.; Chatterjee, S. K.; Foon, K. A.; Bhattacharya-Chatterjee, M. (2006): Anti-idiotypic antibody induced cellular immunity in mice transgenic for human carcinoembryonic antigen, *Immunology*, 118(4): 483-496.

Sasaki, T.; Ikeda, H.; Sato, M.; Ohkuri, T.; Abe, H.; Kuroki, M.; Onodera, M.; Miyamoto, M.; Kondo, S.; Nishimura, T. (2006): Antitumor activity of chimeric immunoreceptor gene-modified Tc1 and Th1 cells against autologous carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer cells, *Cancer Science*, 97(9): 920-927.

Schier R.; McCall, A.; Adams, G. P.; Marshall, K. W.; Merritt, H.; Yim, M.; Crawford, R. S.; Weiner, L. M.; Marks, C.; Marks, J. D. (1996): Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site, *Journal of molecular Biology*, 263(4): 551-567.

Seliger, B.; Maeurer, M. J.; Ferrone, S. (2000) TAP off – tumors on, *Immunology Today*, 18: 292-298.

Seliger B. (2005): Strategies of tumor immune evasion, *BioDrugs (clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy)*, 19(6) : 347-354.

Selinka, H. C.; Zibert, A.; Wimmer, E. (1992): A chimeric poliovirus/CD4 receptor confers susceptibility to poliovirus on mouse cells, *Journal of Virology*, 66(4): 2523-2526.

Stancovski, I.; Schindler, D. G.; Waks, T.; Yarden, Y.; Sela, M.; Eshhar, Z. (1993): Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain

Fv receptors, *Journal of Immunology*, 151(11): 6577-6582.

Sugamura, K.; Ishii, N.; Weinberg, A. D. (2004): Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40, *Nature Reviews Immunology*, 4(6): 420-431.

Spagnoli, G. C.; Adamina, M.; Bolli, M.; Weber, W. P.; Zajac, P.; Oertli, D.; Heberer, M.; Harder, F. (2005): Active antigen-specific immunotherapy of melanoma: from basic science to clinical investigation, *World Journal of Surgery*, 29(6): 692-699.

## T

Tai, C. K.; Wang, W. J.; Chen, T. C.; Kasahara, N. (2005): Single-shot, multicycle suicide gene therapy by replication-competent retrovirus vectors achieves long-term survival benefit in experimental glioma, *Molecular Therapy*, 12(5): 842-851.

Takami, N.; Misumi, Y.; Kuroki, M.; Matsuoka, Y.; Ikehara, Y. (1988): Evidence for carboxyl-terminal processing and glycolipid-anchoring of human carcinoembryonic antigen, *Journal of Biological Chemistry* 263(25): 12716-12720.

Tang, Y.; Zhang, L.; Yuan, J.; Akbulut, H.; Maynard, J.; Linton, P. J.; Deisseroth, A. (2004): Multistep process through which adenoviral vector vaccine overcomes anergy to tumor-associated antigens, *Blood*, 104(9): 2704-2713.

Teng, M. W.; Kershaw, M. H.; Moeller, M.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K. (2004): Immunotherapy of cancer using systemically delivered gene-modified human T lymphocytes, *Human Gene Therapy*, 15: 699-708.

Thompson, J. A.; Eades-Perner, A. M.; Ditter, M.; Muller, W. J.; Zimmermann, W. (1997): Expression of transgenic carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor-prone mice: an animal model for CEA-directed tumor immunotherapy, *International Journal of Cancer*, 72(1), 197-202.

Thompson, J.; Epting, T.; Schwarzkopf, G.; Sninghofen, A.; Eades-Perner, A. M., van der Putten, H.; Zimmermann, W. (2000): A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy, *International Journal of Cancer*, 86(6): 863-869.

## U

Utermohlen, O.; Schulze-Garg, C.; Warnecke, G.; Gugel, R.; Lohler, J.; Deppert, W. (2001): Simian virus 40 large-T-antigen-specific rejection of mKSA tumor cells in BALB/c mice is critically dependent on both strictly tumor-associated, tumor-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes and CD4(+) T helper cells, *Journal of Virology*, 75(22): 10593-10602.

## V

## W

Weijtens, M. E.; Willemsen, R. A.; Valerio, D.; Stam, K.; Bolhuis, R. L. (1996): Single chain Ig $\gamma$  gene-redirected human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity, *Journal of Immunology*, 157: 836-843.

Weiss, A. & Littmann, D. R. (1994): Signal transduction by lymphocyte antigen



receptors, *Cell*, 76: 1053-1062.

Welt, S.; Ritter, G.; Williams, C.; Cohen, L. S.; John, M.; Jungbluth, A.; Richards, E. A.; Old, L. J.; Kemeny, N. E. (2003): Phase I study of anticolon cancer humanized antibody A33, *Clinical Cancer Research*, 9: 1338-1346.

## **X**

## **Y**

Yazdi, A. S.; Morstedt, K.; Puchta, U.; Ghoreschi, K.; Flaig, M. J.; Rocken, M.; Sander, C. A. (2006): Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas, *Journal of Investigative Dermatology*, 126(2): 393-398.

Yun, C. O.; Nolan, K. F. ; Beecham, E. J.;Reisfeld, R. A.; Junghans, R. P. (2000): Targeting of T lymphocytes to melanoma cells through chimeric anti-GD3 immunoglobulin T-cell receptors, *Neoplasia*, 2: 449-459.

## **Z**

Zhang, T.; Barber, A.; Sentman, C. L. (2006): Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor, *Cancer Research*, 66(11): 5927-5933.

Zhang, W.; Sloan-Lancaster, J.; Kitchen, J.; Tribble, R. P.; Samelson, L. E. (1998): LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation, *Cell*, 92(1): 83-92.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hinrich Abken danke ich sehr herzlich für die Ermöglichung dieser Arbeit und die kontinuierliche Förderung während meiner Promotionszeit. Er war jederzeit offen für Fragen, Diskussionen und Anregungen und sorgte für ein sehr angenehmes Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe Tumorgenetik. Ich empfand die freundschaftliche Zusammenarbeit als sehr angenehm. Desweiteren bedanke ich mich bei Ihm für die Begutachtung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Thomas Langer danke ich für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu übernehmen und für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Jens C. Brüning möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Weiter danke ich Frau Dr. Lichtenberg, die als Mitglied der Prüfungskommission mir Ihre Zeit gewidmet hat.

An dieser Stelle will ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Herrn Dr. Andreas Hombach danke ich für die konstruktiven und hilfreichen Diskussionen. Meinem Freund Samir Tawadros danke ich sehr herzlich für seine ständige Bereitschaft mich bei der Arbeit zu unterstützen. Herrn Frank Steiger danke ich sehr für seine zahlreichen Hilfestellungen.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Tumorgenetik für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ein liebes Dankeschön an meine Eltern und meinen Bruder für deren uneingeschränkte Unterstützung.

Mojej kochanej Ani dziękuję serdecznie za pomoc i cierpliwość.

## Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Hinrich Abken und Prof. Dr. Thomas Langer betreut worden.

Köln, den 12. März 2007

---

Markus Chmielewski

Teilpublikationen (submitted):

**Adoptive transfer of engineered T cells induces memory of pre-defined specificity**

Markus Chmielewski, Andreas Hombach and Hinrich Abken

**CD28 costimulation does not alter the binding affinity dependent threshold in T cell activation via recombinant immunoreceptor**

Markus Chmielewski, Andreas Hombach and Hinrich Abken

**T-cells redirected against Hepatitis B Virus surface proteins eliminate HBV infected hepatocytes**

Felix Bohne, Eva Gückel, Markus Chmielewski, Katja Wiegmann, Timo Kürschner, Andreas Schulze, Stefan Urban, Martin Krönke, Hinrich Abken and Ulrike Protzer

**Breaking Natural Killer Cell Tolerance to HER-2 Expressing Carcinomas**

Anna Kruschinski, Markus Chmielewski, Thomas Blankenstein, Hinrich Abken and Jehad Charo

# Lebenslauf

Name: Markus Chmielewski  
Geburtsdatum: 30. September 1975  
Geburtsort: Lötzen (Ostpreußen)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Vitalisstrasse 21, 50827 Köln  
e-mail: [markus.chmielewski@uk-koeln.de](mailto:markus.chmielewski@uk-koeln.de)  
Telefon: 0176 / 23 53 93 52

## **Schulische Ausbildung:**

1982 - 1987 Volksschule in Lötzen (Ostpreußen)  
1987 - 1988 Katholische Hauptschule in Köln  
1988 - 1996 Heinrich-Mann-Gymnasium in Köln, Abschluss: Abitur

## **Zivildienst:**

1996 – 1997 Marie-Juchacz-Altenzentrum in Köln

## **Akademische Ausbildung:**

1997 – 2003 Biologiestudium an der Universität zu Köln, Diplom (Note: sehr gut)  
2004 Publikation der Ergebnisse aus der Diplomarbeit:  
Chmielewski, M.; Hombach, A.; Heuser, C.; Adams, G.P. and Abken, H.; T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: Increase in Affinity of the Single-Chain Fragment Domain above Threshold Does Not Increase T Cell Activation against Antigen-Positive Target Cells but Decreases Selectivity.  
*The Journal of Immunology*, 2004, 173: 7647-7653.  
seit 11/2003 Promotionsstudium am Institut für Genetik; externe Doktorarbeit am Klinikum der Universität zu Köln, Klinik I für Innere Medizin, Labor für Tumorgenetik und Immunologie, Univ.-Prof. Dr. med. Hinrich Abken

Köln, den 12. März 2007

---

Markus Chmielewski