

**Zielgerichtete therapeutische und diagnostische Ansätze für solide  
Tumore am Beispiel des EGF-Rezeptors**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin  
der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Bioingenieurin

**Judith Niesen**

aus Zell an der Mosel (Deutschland)

Berichter:                   Universitätsprofessor Dr. Rainer Fischer

                                  Universitätsprofessor Dr. Wilhelm Jahnen-Dechent

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

## Zusammenfassung

Solide Tumore, besonders im metastasierenden Stadium, sind schwer zu therapieren und gängige Behandlungen führen oft zu starken Nebenwirkungen. Daher ist die Entwicklung neuer, effizienter Behandlungsansätze dringend notwendig. Über zielgerichtete Therapien mit Immuntoxinen (IT) oder im besten Fall mit vollständig humanen zytolytischen Fusionsproteinen (hCFP), können spezifisch auch ruhende Tumorzellen getötet werden, ohne gesunde Zellen zu schädigen. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein auf Granzyme B (GrB)-basierendes hCFP evaluiert, das apoptotische Signalkaskaden in Tumorzellen auslösen kann. GrB wurde mit einem zellbindenden Antikörper (Ak)-Fragment, einem neuen humanen „single-chain Fragment variable“ (scFv), spezifisch für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) fusioniert, um die Bindung und anschließende Internalisierung an Rezeptor-tragende Zellen zu ermöglichen. Der EGFR ist auf einer Vielzahl von soliden Tumoren überexprimiert und oft mit einer schlechten Prognose assoziiert. Schwer zu therapierende Krebsarten wie das Rhabdomyosarkom (RMS), das Pankreas-, Prostata oder Plattenepithelkarzinom sowie die Brustkrebsform „triple negative breast cancer“ (TNBC) standen in dieser Arbeit im Fokus. Um initial die Funktionalität des humanen und eines zweiten neuen EGFR-spezifischen scFvs zu analysieren, wurden beide mit dem SNAP-Tag fusioniert und charakterisiert. Die Konstrukte scFv1711-SNAP abgeleitet vom humanen Panitumumab und scFv2112-SNAP abgeleitet vom chimären Cetuximab, beides in der klinischen Anwendung etablierte EGFR-spezifische monoklonale Antikörper (mAk), zeigten spezifische Bindung an die Zielzellen sowie effiziente und schnelle Internalisierung innerhalb von Minuten. Ein wichtiger Faktor im Hinblick auf IT und hCFP ist die Affinitätskonstante der eingesetzten scFvs. Um über die SPR-Methode die Affinität der scFv-SNAP Konstrukte messen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein regenerierbares System etabliert. Dabei wurde die schnelle und einfache Kopplung der scFv-SNAP-Fusionsproteine mit BG-Biotin und dem kommerziellen „Biotin CAPture Kit“ auf Basis der Biotin/Streptavidin Bindung kombiniert. Die scFvs zeigten  $K_D$ -Werte von etwa 4 nM. Zusätzlich wurde im Vergleich zu den parentalen mAk auch das Kompetitionsverhalten bestätigt. Um einen ersten Überblick über das Potential *in vivo* zu erhalten, wurde scFv2112-SNAP in einem subkutanen Prostatakarzinom-Mausmodell als NIR-Bildgebungssonde erfolgreich eingesetzt. Als „proof of concept“ wurden nach der funktionellen Charakterisierung beide scFvs mit einer verkürzten Form des bakteriellen Toxins *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') fusioniert. Mit Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten und EGFR-Expressionsraten, wurden nach spezifischer

Bindung und Internalisierung innerhalb von 30-60 min,  $IC_{50}$ -Werte im pikomolaren Bereich (4-460 pM je nach Zelllinie) erzielt. Die Zelllinie mit der am höchsten bestimmten EGFR-Rezeptordichte wurde in Zellviabilitätstests am effizientesten eliminiert. Beide IT induzierten ebenfalls statistisch signifikant Apoptose zwischen 60% und 80% gemessenen apoptotischen Zellen. Zusätzlich zeigten sie spezifische Bindung auf humanen Tumorbiopsien. Das Ziel dieser Arbeit, die Entwicklung und Evaluierung eines hCFP für die Behandlung solider Tumore, wurde mit GbR201K-scFv1711 unter Einsatz einer Serpin B9-resistenten GrB-Mutante, erfolgreich dargestellt. Nach der Expression mit Ausbeuten im Bereich von 17-30 mg/L wurden die spezifische Bindung und Internalisierung nach enzymatischer Aktivierung von GbR201K-scFv1711 auf ausgewählten Zelllinien nachgewiesen. Das hCFP zeigte hohe Serumstabilität auch nach 72h. Signifikante apoptotische (30% apoptotische Zellen) und anti-proliferative Effekte ( $IC_{50} = 133,3 \text{ nM}$ ) wurden mit GbR201K-scFv1711 auf A431-Zellen (Plattenepithelkarzinom) demonstriert. Unter Einsatz der endosomolytischen Substanz Chloroquin (CQ) wurde auch mit RD-Zellen (RMS) neben einer Apoptose-Induktion ein  $IC_{50}$ -Wert von 21 nM und mit A431-Zellen eine Verbesserung auf 45 nM bestätigt. Weiterhin wurde die spezifische Bindung auf humanen RMS-Biopsien nachgewiesen. Die vorliegenden Daten bestätigen, dass gerade dieses neuartige hCFP ein sehr interessanter Kandidat für weitere präklinische Untersuchungen ist.

## Summary

Solid tumors are difficult to treat, especially when they reach a metastatic stage. Standard therapies often show severe side-effects. Therefore, the evaluation of new and efficient treatment options are in urgent need. With targeted therapies using immunotoxins (IT) or in best case human cytolytic fusion proteins (hCFP), tumor cells could be killed specifically without affecting healthy cells. Hence, this work was focused on the evaluation of a Granzyme B (GrB)-based hCFP, which could induce apoptotic signal-cascades in tumor cells. GrB was fused to a cell-binding antibody-fragment, a new human epidermal growth factor receptor (EGFR)-specific single-chain Fragment variable (scFv), to demonstrate binding and subsequent internalization by receptor bearing cells. The EGFR is expressed on a variety of solid tumors and is associated with poor prognosis. Rhabdomyosarcoma (RMS), pancreatic-, prostate-, and epidermoid carcinoma, as well as the breast cancer type triple negative breast cancer (TNBC) are difficult to treat and were the main focus of this study. To initially analyze the functionality of the human and a second EGFR-specific scFv, both were fused to the SNAP-Tag and characterized. ScFv1711-SNAP was derived from Panitumumab and scFv2112-SNAP from Cetuximab, which are established EGFR-specific monoclonal antibodies (mAb) in the clinic. Both scFv-SNAP fusion proteins showed specific binding and internalization into the target cells within minutes. A critical factor concerning ITs and hCFPs is the affinity constant of the used scFvs. In order to use SPR for determining the affinity of the scFv-SNAP fusion proteins, a regenerative system was established. For this purpose, the fast and easy coupling reaction of BG-Biotin to the scFv-SNAP fusion was combined with the commercial available “Biotin CAPture kit”, which works on the basis of Streptavidin/Biotin binding. Both scFvs show  $K_D$ -values of  $\sim 4$  nM. Additionally the competitive behavior of the scFvs was tested and compared to the parental mAbs, respectively. To get a first hint of the *in vivo*-potential, scFv2112-SNAP was successfully tested as NIR-probe in a subcutaneous prostate cancer-mouse model. After the functional characterization of the new scFvs, both were fused to a truncated version of *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') as proof of concept. Using cell lines from different tumor entities and with varying EGFR-expression levels, specific binding, internalization within 30-60 min, as well as  $IC_{50}$ -values in the picomolar range (4-460 pM depending on the cell line) were determined. The cell line with the highest EGFR-expression level was most efficiently eliminated in cell viability assays. Both ITs also induced statistically significant apoptosis. In addition, specific binding on human tumor biopsies could be confirmed. The aim of the study was to develop and evaluate an hCFP for the treatment of solid tumors. This was demonstrated

by using GbR201K-scFv1711 with a Serpin B9-resistant mutated GrB-variant. After expression and purification with yields in the range of 17-30 mg/l protein, specific binding and internalization was confirmed on selected cell lines, by using enzymatically activated GbR201K-scFv1711. GbR201K-scFv1711 demonstrated a high serum stability, even after 72h. Significant apoptotic and anti-proliferative effects ( $IC_{50} = 133.3$  nM) were reached with A431-cells (epidermoid carcinoma). By using the endosomolytic substance Chloroquine (CQ) induction of apoptosis and an  $IC_{50}$ -value of 21 nM could be determined with RD-cells (RMS) as well. The  $IC_{50}$ -value of A431-cells improved to 45 nM. Furthermore, specific binding on human RMS-biopsies was demonstrated. These data confirm that especially this novel hCFP is an interesting candidate for further pre-clinical studies.

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

**1: Judith Niesen**, Grit Hehmann-Titt, Mira Woitok, Rolf Fendel, Stefan Barth, Rainer Fischer, Christoph Stein “A novel fully-human cytolytic fusion protein based on granzyme B shows in vitro cytotoxicity and ex vivo binding to solid tumors overexpressing the epidermal growth factor receptor”, *Cancer Letters* 2016 **374**(2):229-40

**2: Judith Niesen**, Christoph Stein, Hannes Brehm, Grit Hehmann-Titt, Rolf Fendel, Georg Melmer, Rainer Fischer, Stefan Barth “Novel EGFR-specific immunotoxins based on panitumumab and cetuximab show in vitro and ex vivo activity against different tumor entities”, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2015 **141**(12):2079-95

**3: Judith Niesen**, Hannes Brehm, Christoph Stein, Nina Berges, Alessa Pardo, Rainer Fischer, Andre Ten Haaf, Stefan Gattenlöhner, Mehmet K. Tur, Stefan Barth “In vitro effects and ex vivo binding of an EGFR-specific immunotoxin on rhabdomyosarcoma cells”, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2015 **141**(6):1049-61

**4: Manal Amoury\***, Tobias Blume\*, Hannes Brehm\*, **Judith Niesen\***, Niklas Tenhaef, Stefan Barth, Stefan Gattenlöhner, Wijnand Helfrich, Jenny Fitting, Thomas Nachreiner, Alessa Pardo “SNAP-tag based agents for preclinical in vitro imaging in malignant diseases“, *Current Pharmaceutical Design* 2013 **19**(30):5429-36 (\* geteilte Erstautorenschaft)

**5: Hannes Brehm**, Dmitrij Hristodorov, Alessa Pardo, Radoslav Mladenov, **Judith Niesen**, Rainer Fischer, Mehmet K. Tur, Stefan Barth “Targeted killing of rhabdomyosarcoma cells by a MAP-based human cytolytic fusion protein”, *Cancer Letters* 2015 **1;365**(2):149-55

**6: Radoslav Mladenov**, Dmitrij Hristodorov, Christian Cremer, Lea Hein, Fabian Kreutzer, Tim Stroisch, **Judith Niesen**, Hannes Brehm, Tobias Blume, Tim Brümmendorf, Edgar Jost, Theophilus Thepen, Rainer Fischer, Bernhard Stockmeyer, Stefan Barth, Christoph Stein “The Fc-alpha receptor is a new target antigen for immunotherapy of myeloid leukemia”, *International Journal of Cancer* 2015 **1;137**(11):2729-38

**7: Hannes Brehm**, **Judith Niesen**, Radoslav Mladenov, Christoph Stein, Alessa Pardo, Georg Fey, Wijnand Helfrich, Rainer Fischer, Stefan Gattenlöhner, Stefan Barth “A CSPG4-specific immunotoxin kills rhabdomyosarcoma cells and binds to primary tumor tissues”, *Cancer letters* 2014 **352**(2):228-35

**8:** Dmitrij Hristodorov, Manal Amoury, Radoslav Mladenov, **Judith Niesen**, Katharina Arens, Nina Berges, Lea Hein, Stefano di Fiore, Anh-Tuan Pham, Michael Huhn, Wijnand Helfrich, Rainer Fischer, Theo Thepen, Stefan Barth “EpCAM-selective elimination of carcinoma cells by a novel MAP-based cytolytic fusion protein”, *Molecular Cancer Therapeutics* 2014 **13**(9):2194-202

## **Poster Präsentation**

**Judith Niesen**, Florian Kampmeier, Grit Hehmann-Titt, Stefan Barth, Rainer Fischer, Georg Melmer „Specific Targeting of prostate cancer using prostate specific membrane antigen (PSMA)“, Biomedica Liège, 18.-19.04.2012, Liège, Belgien

## **Wissenschaftliche Veröffentlichungen außerhalb der Promotion**

Florian Kampmeier, **Judith Niesen**, Alexander Koers, Markus Ribbert, Andreas Brecht, Rainer Fischer, Fabian Kiessling, Stefan Barth, Theo Thepen “Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein”, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2010 **37**(10):1926-34

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1 Solide Tumore und deren Therapieformen</b> .....	<b>1</b>
I.1.1 Der EGF-Rezeptor und seine Bedeutung bei soliden Tumoren.....	2
I.1.2 Monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente und andere Therapeutika gerichtet gegen den EGFR .....	4
I.1.3 Zielgerichtete Immuntherapie solider Tumore .....	7
I.1.3.1 Immuntherapie über IT und ihr Wirkmechanismus.....	8
I.1.3.2 Humane zytolytische Fusionsproteine und die Steigerung ihrer Effizienz.....	11
<b>I.2 Diagnostik solider Tumore</b> .....	<b>14</b>
I.2.1 Optische Bildgebung über die SNAP-Tag Technologie .....	14
<b>I.3 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>II.1 Material</b> .....	<b>19</b>
II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	19
II.1.2 Enzyme, Standards und Reaktionskits.....	20
II.1.3 Geräte- und Apparaturenliste .....	21
II.1.4 Puffer und Lösungen .....	23
II.1.5 Nährlösungen, Medien und Zusätze für Bakterien und die Kultivierung eukaryotischer Zellen...	26
II.1.6 Antikörper, Antikörperfragmente und Antikörperkonjugate.....	27
II.1.7 Synthetische Oligonukleotide und Vektoren .....	27
II.1.8 Bakterienstämme .....	29
II.1.9 Zelllinien .....	30
II.1.10 Paraffinschnitte .....	31
II.1.11 Versuchstiere und Spezial-Experimentalfutter.....	31
II.1.12 Benzylguanin (BG) - modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe und BG-Biotin.....	31
<b>II.2 Methoden</b> .....	<b>32</b>
II.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	32
II.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA .....	32
II.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR.....	32
II.2.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	34
II.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	34
II.2.1.5 Restriktion von DNA .....	34
II.2.1.6 Reinigung der DNA.....	35



II.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	35
II.2.1.8	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien ( <i>E.coli</i> ).....	35
II.2.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien .....	35
II.2.1.10	Sequenzierung der DNA-Fragmente .....	36
II.2.1.11	Herstellung von scFv-Ak-Fragmenten über Synthetisierung .....	36
II.2.1.12	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	36
II.2.1.13	Transfektion von Plasmid-DNA in HEK 293T-Zellen.....	36
II.2.1.14	Stabile Transfektion von Prostatakarzinomzelllinien .....	37
II.2.1.15	Zellsortierung.....	37
II.2.2	Reinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen.....	37
II.2.2.1	Periplasmatische Stressexpression und Zellaufschluss von rekombinanten IT .....	37
II.2.2.2	Proteinreinigung IMAC .....	38
II.2.2.3	Detektion von Proteinen über Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung.....	39
II.2.2.4	Nachweis der gereinigten Proteine mittels Western Blot-Analyse .....	39
II.2.2.5	Quantifizierung und Konzentrationsbestimmung gereinigter rekombinanter Proteine .....	39
II.2.2.6	Markierung von scFv-SNAP Fusionsproteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen – Kopplungsreaktion.....	40
II.2.2.7	Enterokinase (EK)-Verdau .....	41
II.2.2.8	Kolorimetrischer GrB-Substratassay .....	41
II.2.3	Immunologische Methoden und Assays .....	41
II.2.3.1	Durchflusszytometrische Methoden .....	41
II.2.3.2	Zellviabilitätstest/Proliferationsassay.....	43
II.2.3.3	Apoptose-Assay mittels AnnexinV-Bindung .....	44
II.2.3.4	Internalisierungsstudien über Konfokalmikroskopie und den Opera® Hochdurchsatz- Analysator .....	45
II.2.3.5	Affinitätsbestimmung über Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) .....	45
II.2.4	Humanes Patientenmaterial .....	46
II.2.4.1	Ex vivo Bindung auf humanen Paraffinschnitten.....	46
II.2.4.2	Subkutanes Mausmodell .....	47
II.2.5	Statistische Analysen und Auswertungen .....	48
II.2.6	Bildbearbeitung.....	48
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>III.1</b>	<b>Der EGFR als Zielantigen für solide Tumore – Funktionalitätstest der gegen den EGFR gerichteten scFvs.....</b>	<b>49</b>
III.1.1	Herstellung und Charakterisierung der neuen scFv-SNAP-Fusionsproteine .....	49
III.1.2	Spezifische Bindung an die Zielzellen .....	51

III.1.3	Internalisierungsstudien.....	53
III.1.4	Kompetitionsverhalten und Affinitätsbestimmung im Vergleich zu den Vollängen-Ak.....	55
III.1.4.1	Kompetitionsverhalten der scFvs und parentalen mAk untereinander .....	55
III.1.4.2	Bestimmung der Affinität der scFvs und der parentalen mAk .....	56
III.1.5	<i>In vivo</i> Funktionalität von scFv2112-SNAP .....	60
<b>III.2</b>	<b>Der EGFR als Zielantigen für solide Tumore – Herstellung und funktionelle</b>	
	<b>Charakterisierung von ETA'-basierten IT .....</b>	<b>63</b>
III.2.1	Generierung, Expression und Reinigung von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' .....	63
III.2.2	<i>In vitro</i> Funktionalität der IT.....	65
III.2.3	Bindungseigenschaften der IT und Rezeptorexpression auf den Zielzellen.....	65
III.2.3.1	Internalisierungsverhalten der IT .....	66
III.2.3.2	Anti-proliferative Wirkung der IT.....	68
III.2.3.3	Spezifische Apoptose-Induktion der IT .....	70
III.2.4	<i>Ex vivo</i> Bindung der IT und der parentalen mAk auf Tumor-Biopsien .....	72
<b>III.3</b>	<b>Entwicklung eines gegen den EGFR gerichteten humanen zytolytischen</b>	
	<b>Fusionsproteins .....</b>	<b>74</b>
<b>III.4</b>	<b>Herstellung und funktionelle Charakterisierung von GbR201K-scFv1711 .....</b>	<b>74</b>
III.4.1.1	Aktivierung des Gr B – Fusionsproteins und seine Bindungsaktivität .....	76
III.4.1.2	Serumstabilität und Internalisierung .....	78
III.4.2	Steigerung der Effizienz von GbR201K-scFv1711 über die endosomolytische Substanz CQ .....	79
III.4.2.1	Nachweis der Einwirkung von GbR201K-scFv1711 auf die Zellproliferation und die Apoptose-Induktion.....	79
III.4.3	<i>Ex vivo</i> Bindungsbestätigung auf humanem Patientenmaterial .....	85
<b>IV.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>86</b>
<b>IV.1</b>	<b>Herstellung und funktionelle Charakterisierung der neuen EGFR-spezifischen scFvs.....</b>	<b>86</b>
IV.1.1	Vergleichende Studien mit den parentalen Vollängenantikörpern .....	88
IV.1.2	Die SNAP-Tag Technologie und ihr Einsatz in der <i>in vivo</i> Bildgebung .....	91
<b>IV.2</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung von scFv-basierten IT .....</b>	<b>95</b>
IV.2.1	Der EGFR als ideales Zielantigen für einen Therapieansatz mit IT .....	96
IV.2.2	Das toxische Potential von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' .....	97
<b>IV.3</b>	<b>IT der vierten Generation – hCFPs .....</b>	<b>100</b>
IV.3.1	hCFP im Vergleich zu IT der dritten Generation.....	100
IV.3.2	Der Einsatz von GrB in hCFP.....	101
IV.3.3	Charakterisierung von GbR201K-scFv1711 .....	104

IV.3.4	Das toxische Potential und die Steigerung der Effizienz von GbR201K-scFv1711 .....	107
<b>IV.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>110</b>
<b>V.</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>114</b>
<b>VI.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>128</b>
<b>VI.1</b>	<b>Vektorkarten und Sequenzen.....</b>	<b>128</b>
VI.1.1	Vektorkarten .....	128
VI.1.2	Sequenzen der scFv-Ak-Fragmente.....	130
<b>VI.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>132</b>
<b>VI.3</b>	<b>Index der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>134</b>
VI.3.1	Abbildungsverzeichnis.....	134
VI.3.2	Tabellenverzeichnis.....	136
<b>VI.4</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>137</b>
<b>VI.5</b>	<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>139</b>

## I. Einleitung

### I.1 Solide Tumore und deren Therapieformen

Weltweit führen Krebserkrankungen die Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken an. Im Jahre 2012 wurden weltweit 14 Millionen neue Krankheitsfälle und 8,2 Millionen Todesfälle durch Krebskrankheiten verursacht [1, 2]. Laut der Statistiken des Robert-Koch-Institutes sind in Deutschland für das Jahr 2014 mehr als 500.000 neue Krebsfälle aufgetreten. Unter den soliden Tumoren war Brustkrebs in 2012 die häufigste Krebsart bei Frauen und zeigte unter den Krebserkrankungen die höchste Mortalitätsrate. Pankreaskrebs stand bei Frauen an sechster Stelle und zeigte die viert-häufigste Todesursache, sowohl bei Frauen als auch bei Männern. Die am häufigsten vorkommende Krebsform bei Männern ist das Prostatakarzinom und in 2012 die dritt häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen (Zahlen nach Robert-Koch-Institut, Berlin; DKFZ, Heidelberg; IARC, UK). Bei den genannten soliden Krebsarten stiegen die Todesfälle in der EU bei Männern und Frauen von 2009 bis 2014 (prognostizierte Todesfälle) um 1000 bis 5000 Fälle an (Tabelle I-I), außer beim Brustkrebs dort blieben die Zahlen nahezu konstant.

**Tabelle I-I Zahlen der prognostizierten Todesfälle in der EU in 2014 im Vergleich zu 2009**

Zahlen entnommen aus: [3]

		Todesfälle in 2009	Prognostizierte Todesfälle in 2014
Männer	Pankreaskarzinom	39714	41300
	Prostatakarzinom	69036	70100
	alle Krebsarten	718355	742500
Frauen	Pankreaskarzinom	36725	41000
	Brustkrebs	89514	89300
	alle Krebsarten	563418	581100

Neben den Karzinomen die bis zu 80% der soliden Tumorerkrankungen ausmachen, existieren ebenso die sogenannten Sarkome, auch Weichteilsarkome genannt, welche vom Binde- und/oder Stützgewebe sowie vom Knochen- und/oder Knorpelgewebe aus entstehen. Zu den am häufigsten pädiatrisch vorkommenden Weichteilsarkomen gehört das Rhabdomyosarkom (RMS) mit bis zu 4,5 Fällen pro einer Millionen Kinder [4, 5]. Im Gegensatz zu den zuvor

aufgeführten soliden Tumorarten gehört das RMS zu den seltenen Krankheiten, da weniger als 15 Fälle in einer Population von 100.000 Menschen vorkommen [6]. Bezüglich der Therapie solider Tumore ist in den letzten Jahren die zielgerichtete Therapie immer mehr ins Interessenspektrum gerückt. Eine Strategie der zielgerichteten Tumorthherapie stützt sich unter anderem auf das Anvisieren von auf Tumorzellen überexprimierten Oberflächenmarkern, wie beispielsweise die des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR, epidermal growth factor receptor, dt.: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) [7].

### **I.1.1 Der EGF-Rezeptor und seine Bedeutung bei soliden Tumoren**

Etwa 30% aller humanen Tumore zeigen eine Überexpression des EGFR [8]. Der EGFR, auch ErbB1 genannt, ist einer der am besten charakterisierten Tyrosinkinase-Rezeptoren und gehört zur Familie der ErbB-Membran-Rezeptoren. Diese beinhalten ebenso HER-2/ErbB2, HER-3/ErbB3 und HER-4/ErbB4 [9]. Der EGFR, ein 170 kDa große Glykoprotein, ist einer der ersten Rezeptoren der mit humanen Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde [10-12]. Erstmals beschrieben wurde der EGFR von Stanley Cohen (Vanderbilt Universität) der zusammen mit Rita Levi-Montalcini im Jahre 1986 den Nobelpreis für diese Entdeckung gewann [13, 14]. Rezeptoren der ErbB-Familie bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, welche in vier Untereinheiten (DI-DIV) unterteilt ist, einer kurzen transmembran-Domäne und einer intrazellulären katalytischen Tyrosinkinase-Domäne mit mehreren freien Tyrosinresten [7]. Nach der Liganden-Bindung kommt es im Rezeptor zu Konformations-Änderungen der intrazellulären Domänen DI und DIII, sie werden zusammengeführt und eine intrinsische Kinase-Aktivierung wird ausgelöst, sowie eine Liganden-Binde Tasche ausgebildet [7, 15, 16]. Die Liganden-Bindung und Aktivierung des Rezeptors fördert auch die Hetero- oder Homodimerisierung, die zur Stimulierung der Zellproliferation und zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste in der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne führt [17]. Diese Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für die Rekrutierung von Signal-Überträgern und Aktivatoren der Transkription (STATS) und Downstream-Adapterproteinen, wie z.B. *ras* oder auch Enzymen, wie der Phospholipase-C. Diese stimulieren eine intrazelluläre Signal-Transduktions-Kaskade welche unter anderem zu zellulärer Adhäsion, Apoptose und Differenzierung führt [8]. Bisher sind sieben Liganden bekannt die an den EGFR binden, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF), sowie Amphiregulin, Epiregulin, Betazellulin und Epigen [17, 18]. Normale bzw. gesunde Zellen exprimieren bis zu  $1 \times 10^5$  EGF-Rezeptoren pro Zelle, Tumorzellen aber können das bis zu 200-fache dessen exprimieren [7, 8]. Diese Überexpression

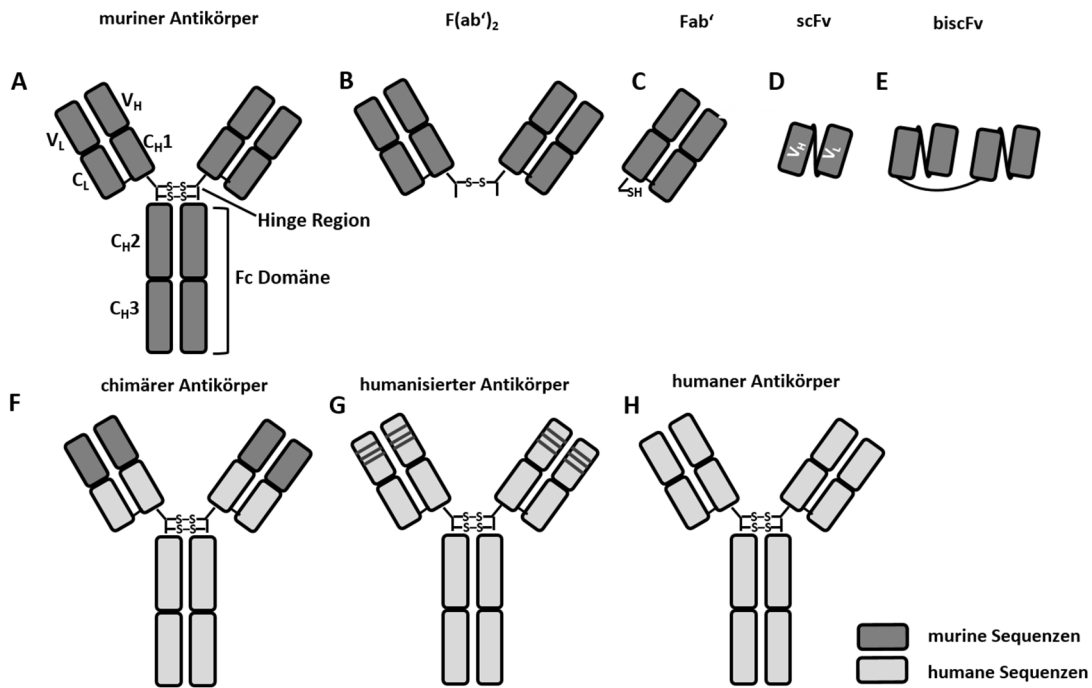
führt unter anderem zu einer erhöhten Aktivierung des EGFR-Signalwegs, welche wiederum aggressiveres Zellwachstum, höhere Liganden-Verfügbarkeit und erhöhte EGFR-Genexpression zur Folge hat [12, 19]. Ebenso können Mutationen im EGFR-Gen zu einem dauerhaft aktivierten Rezeptor führen [15, 16, 18, 20]. Beides führt zu einer schlechteren Prognose, einem höheren Risiko für metastasierende Phänotypen und ebenso der Entwicklung einer Resistenz gegenüber gängiger Chemotherapeutika [21-23].

Viele Formen des Prostatakarzinoms zeigen ein erhöhtes EGFR-Expressionslevel. Zudem steigt die EGFR-Expression rapide an, wenn die Krankheit von der lokalisierten Form in die metastasierende Form übergeht. Ebenso ist ein stark erhöhtes EGFR-Expressionslevel in Androgen-unabhängigen Stadien des Prostatakarzinoms zu beobachten [24, 25]. Ein schwer zu therapierender Brustkrebstyp ist der TNBC (triple-negative breast cancer), der bei bis zu 20% der Brustkrebspatientinnen diagnostiziert wird. Diese Form des Brustkrebses ist negativ für drei wichtige therapeutische Zielantigene: den Estrogen-Rezeptor, den Progesteron-Rezeptor und HER-2 [26]. Immunhistochemische- und Genexpressions-Studien haben gezeigt, dass bei 40-60% der TNBC-Fälle eine EGFR-Überexpression vorliegt und nur sehr selten EGFR-Mutationen [13]. Deswegen sind therapeutische und diagnostische Ansätze mit dem EGFR als Zielantigen für TNBC eine potentiell effektive Alternative, da weder auf HER-2-gerichtete etablierte Therapieansätze noch auf hormonelle-Therapien zurückgegriffen werden kann [27]. Das Pankreaskarzinom ist eine sehr aggressive und hoch maligne solide Krebsform mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5%. Diese hohe Mortalität entsteht durch die oftmals späte Diagnose im bereits fortgeschrittenen Stadium, durch eine frühe Metastasen-Entwicklung in den Lymphknoten oder der Leber und dem späten Auftreten von ersten Symptomen [23, 28]. Eine Überexpression des EGFR in Fällen von Pankreaskrebs steht im Zusammenhang mit der malignen Transformation und dem Ausbilden von Metastasen, besonders von Leber-Metastasen, sowie dem Wiederauftreten von Pankreaskrebs nach Remission [29]. Das RMS ist unterteilt in die embryonale Form (ERMS) und die alveolare Form (ARMS), beide hauptsächlich bei Kindern vorkommend, sowie in die pleomorphe Form (PRMS), welche überwiegend bei Erwachsenen auftritt [30, 31]. Mit bis zu 70% ist ERMS die am häufigsten vorkommende Form und obwohl die 5-Jahres Überlebensrate in den letzten Jahren von 25% auf bis zu 70% gestiegen ist, liegt diese für das ARMS immer noch bei nur 20-30%. Daher gilt das RMS als Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Bisher sind nur sehr wenige Zielantigene für die zielgerichtete RMS-Tumorthherapie validiert, wie beispielsweise der fetale Acetylcholinrezeptor (fAChR) [32]. Außerdem wurden erste Ergebnisse mit CSPG-4

(chondroitin sulfate proteoglycan-4) als Zielantigen publiziert [33]. Es konnte aber auch nachgewiesen werden, dass der EGFR in bis zu 76% der ERMS-Fälle und in bis zu 50% der aggressiveren ARMS-Form hoch exprimiert ist [6, 32, 34, 35]. Besonders aufgrund der minimalen Anzahl an zielgerichteten therapeutischen und diagnostischen Ansätzen für RMS ist der EGFR ein hoch interessantes Zielantigen für diese seltene Krebsart [5, 36].

## **I.1.2 Monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente und andere Therapeutika gerichtet gegen den EGFR**

Der Ursprung der zielgerichteten Krebstherapie geht auf Paul Ehrlich zurück, der vor über einem Jahrhundert das Konzept der Benutzung von sogenannten „magischen Kugeln“ auch unter „magic bullet“ bekannt, zur selektiven zielgerichteten Therapie von beispielsweise Tumoren diskutierte [37]. Das Konzept beruht ursprünglich auf der Anwendung von zielgerichteten Liganden, wie Antikörpern (Ak), aber auch deren Derivaten, welche spezifisch an einen Rezeptor binden der entweder einzigartig oder überexprimiert auf der Zielzelle ist. Wichtige Schlüsselfaktoren für die jeweiligen Liganden sind hierbei eine hohe Bindungsaktivität bzw. Affinität. Als 1975 die Hybridoma-Technologie zur Produktion monoklonaler Antikörper (mAk) ihren Durchbruch hatte, folgten in den Jahrzehnten darauf Fortschritte bei der Entwicklung von Plattformen für chimäre, humanisierte und voll-humane Ak (Abbildung I-1) [38, 39]. Chimäre therapeutische mAk besitzen die konstanten Regionen humaner Ak und die variablen Region aus der murinen Fab-Domäne (leichte und schwere Kette), welche für die Antigenbindung verantwortlich ist. Diese genetisch veränderten mAk zeigen in der Anwendung gleichbleibende Spezifität aber verminderte HAMA-Reaktionen (human anti-mouse antibody response), welche bei der therapeutischen Anwendung von murinen mAk im Menschen oft ein Problem darstellen [7, 8]. Humanisierte mAk werden meist über DNA-Technologie und anschließender Expression in Säugetierzellen hergestellt [8]. Weiterhin werden sie über die Methode des CDR-Austausches generiert, sodass nur noch die hypervariablen Domänen murinen Ursprungs sind. Weiterhin werden auch gentechnisch erzeugte transgene Mauslinien eingesetzt, in denen die mauseigenen Ak-Gene durch die humanen Genloci der leichten und schweren Ketten ersetzt werden. Auch über Phage-Display können die V-Regionen von humanen Bibliotheken selektiert werden [40, 41].



**Abbildung I-1: Schematische Darstellung von Ak und Ak-Fragmenten**

Das native IgG-Molekül (A, muriner Ak) kann enzymatisch zu F(ab)<sub>2</sub> (B) und Fab'-Fragmenten (C, fragment antigen binding) verdaut werden. Ein chemisch gekoppeltes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment ist ebenfalls möglich. Zu den rekombinanten Ak-Fragmenten gehört der scFv (D, single-chain fragment variable) und der bispezifische scFv (E, biscFv). Über Hybridoma-Technologie hergestellte Ak sind in der Regel murin (A). Inzwischen werden über verschiedene Techniken (z.B. Phage-Display oder Immunisierung von transgenen Mäusen) auch chimäre (F, konstante humane und variable murine Domänen), humanisierte (G, murine hypervariable Bereiche) oder komplett humane (H) Ak hergestellt. Abkürzungen: V<sub>L</sub>: variable leichte Kette; V<sub>H</sub>: variable schwere Kette; C<sub>L</sub>: konstante leichte Kette, C<sub>H1-3</sub>: konstante Regionen der schweren Kette; Fc-Domäne: konstantes Fragment des mAk. Illustration abgewandelt nach [42, 43].

Momentan sind für die Krebstherapie siebzehn mAks zugelassen (Stand Januar 2015, US Food and Drug Administration, FDA). Davon binden zwei an den EGFR (Cetuximab und Panitumumab) [44]. Cetuximab (Erbix®<sup>®</sup>, Merck KGaA) ist ein chimärer mAk (Typ IgG1) zugelassen für die Therapie des kolorektalen Karzinoms und von Kopf-Hals-Tumoren [45, 46]. Panitumumab (Vectibix®<sup>®</sup>, Amgen), der erste komplett humane mAk (Typ IgG2κ) welcher von der FDA zugelassen wurde, wird bei Patienten mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen mit nicht-mutiertem (Wildtyp) *KRAS*-Gen eingesetzt, welche auf vorherige Medikation nicht ansprechen [47, 48]. *KRAS* ist ein intrazelluläres Molekül welches bei der Signalwirkung von EGF eine Rolle spielt und der EGFR-Signalkaskade nachgeschaltet ist [49]. Die Wirkweise beider mAks ist die folgende: nach Bindung an die extrazelluläre Domäne des EGFR, verhindern sie die Anlagerung der Liganden und damit die Aktivierung des Rezeptors, inhibieren den Zellzyklus und die dazu gehörigen Signaltransduktionswege und zwingen so die Zielzelle in



die Apoptose [9, 15]. Cetuximab inhibiert die EGFR-Aktivierung indem er direkt mit EGF um seine Bindungsstelle an der Domäne III konkurriert und somit Liganden-Bindung verhindert. Er bindet an den EGFR, induziert Internalisierung und Degradation über begleitende Hochregulation von p27Kip1 und Blockierung des Zellzyklus in der G1 Phase. Apoptose wird ausgelöst, Angiogenese inhibiert und ADCC induziert [7]. ADCC (kurz für antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, dt.: Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität) ist ein Mechanismus bei dem der Fc-Teil der bindenden mAk mit Fc-Rezeptoren, welche unter anderem auf NK-Zellen (natürliche Killer-Zellen) exprimiert sind, interagiert und so Signalkaskaden auslöst. Diese führen dazu, dass Inhalte zytotoxischer Granula (z.B. Perforin) ausgeschüttet werden, welche dann in der Zielzelle Apoptose auslösen [38]. ADCC und CDC (kurz für complement-dependent cytotoxicity/cytotoxicity, dt.: komplementabhängige Zytolyse/Zytotoxizität), welche direkt in das Abtöten der Zielzelle über die Ausbildung eines MAC (membrane attack complex) resultieren kann, gelten als allgemeine Ak-Effektor-Funktionen [38, 50, 51]. Cetuximab jedoch löst hauptsächlich ADCC aus und das Auslösen von CDC ist nur sehr gemäßigt bis gar nicht zu beobachten [52, 53]. Panitumumab blockiert, ähnlich wie Cetuximab, komplett die Bindung von EGF und TGF $\alpha$  an den EGFR und inhibiert so die Autophosphorylierung welche von den Liganden ausgelöst worden wäre [7]. Als voll humaner Isotyp IgG2 kann Panitumumab die genannten Effektorfunktionen ADCC und CDC nicht oder nur schwach auslösen und wirkt somit ausschließlich über die Inhibierung der EGFR-Signalwege [38, 51, 54, 55].

Meist werden therapeutische mAk nicht als Einzelmedikation sondern in einer Kombinationstherapie mit anderen immunmodulatorischen Ansätzen verwendet, z.B. Chemo- und Radiotherapie, Vakzinen, anderen zielgerichteten Therapeutika oder auch Zytokinen [38]. Sowohl für das Prostata- und das Pankreaskarzinom als auch für TNBC gibt es bisher Therapieansätze basierend auf beiden oder einen der beiden mAk. In einer klinischen Studie der Phase-II bei Patienten mit EGFR<sup>+</sup> metastasierenden Kastrations-resistenten Prostatatumoren wurde gezeigt, das eine Kombinationstherapie von Cetuximab und Docetaxel zu einem längeren Überleben ohne ein Fortschreiten des Tumors führt [56]. Für TNBC gibt es momentan klinische Studien der Phase-II bei der Cetuximab in Kombination mit Ixabepilone oder Panitumumab, in einer Dreierkombination mit Gemcitabine und Carboplatin eingesetzt wird [13, 57]. Cetuximab zeigte beim Pankreaskarzinom in Kombinationstherapie mit Gemcitabine keinen besseren Therapieerfolg als Gemcitabine alleine [58]. In einer Studie der klinischen Phase I jedoch zeigte die Kombination von Panitumumab mit Gemcitabine-basierter

Chemo-Radiotherapie potentiellen klinischen Nutzen bei kontrollierbarer Toxizität [59]. Für das RMS gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt nur *in vitro* Studien in der Cetuximab in Kombination mit Actinomycin D auf RMS-Zelllinien eingesetzt wurde [60]. Ein weiterer Ansatz der EGFR-gerichteten Therapie sind ADCs (Antibody-drug-conjugates). Diese verbinden die zielgerichtete Spezifität eines mAk mit der zelltoxischen Wirkung von z.B. Chemotherapeutika, Zytokinen oder Radionukleotiden [61]. Hier existiert beispielsweise der Ansatz von Panitumumab kovalent konjugiert an Liposomen mit eingekapseltem Doxorubicin [62].

Obwohl einige mAk und ADC für den therapeutischen Einsatz in Menschen zugelassen sind, gibt es dennoch Limitierungen. Zum einen die Größe von mAk (150 kDa), welche unter anderem zu schlechter Tumor-Penetration führen kann [23, 63]. Viele humane anti-Maus Ak sind gegen die Fc-Domäne von therapeutischen mAk gerichtet, auf Grund dessen sind Ak-Fragmente (z.B. scFvs) für viele Anwendungen oft die bessere oder alternative Wahl [64-66]. Zusätzlich werden Vollängen mAk oft von Fc-Rezeptor exprimierenden Zellen aufgenommen und somit reduziert sich die Zahl von therapeutisch wirksamen mAk am Tumor. Daher sind Arbeiten mit Ak-Fragmenten und anderen Zielmolekülen in der Krebstherapie von großem Interesse. An Ak-Fragmenten existieren unter anderem  $F(ab')_2$  und  $Fab'$ , welche unter anderem durch enzymatische Spaltung oder durch chemische Kopplung von Fab-Fragmenten hergestellt werden, sowie scFvs oder auch bivalente scFvs welche über molekularbiologische Methoden hergestellt werden [64, 67]. ScFvs bestehen aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette des parentalen mAk, die über einen flexiblen Polypeptide-Linker verbunden sind (Abbildung I-1). Mit einer Größe von etwa 30 kDa erreichen die Moleküle im Vergleich zu mAk, eine deutlich bessere Tumorpenetration [21, 68]. Bezüglich der Herstellung sind scFvs in ihrer funktionellen Form einfach zu klonieren und können sowohl pro-als auch eukaryotisch exprimiert werden [64]. Fusionsproteine die auf scFvs und Toxinen basieren, nennt man rekombinante Immuntoxine (IT) und diese Fusionen sind vielversprechende zielgerichtete Krebstherapie-Alternativen [69].

### **I.1.3 Zielgerichtete Immuntherapie solider Tumore**

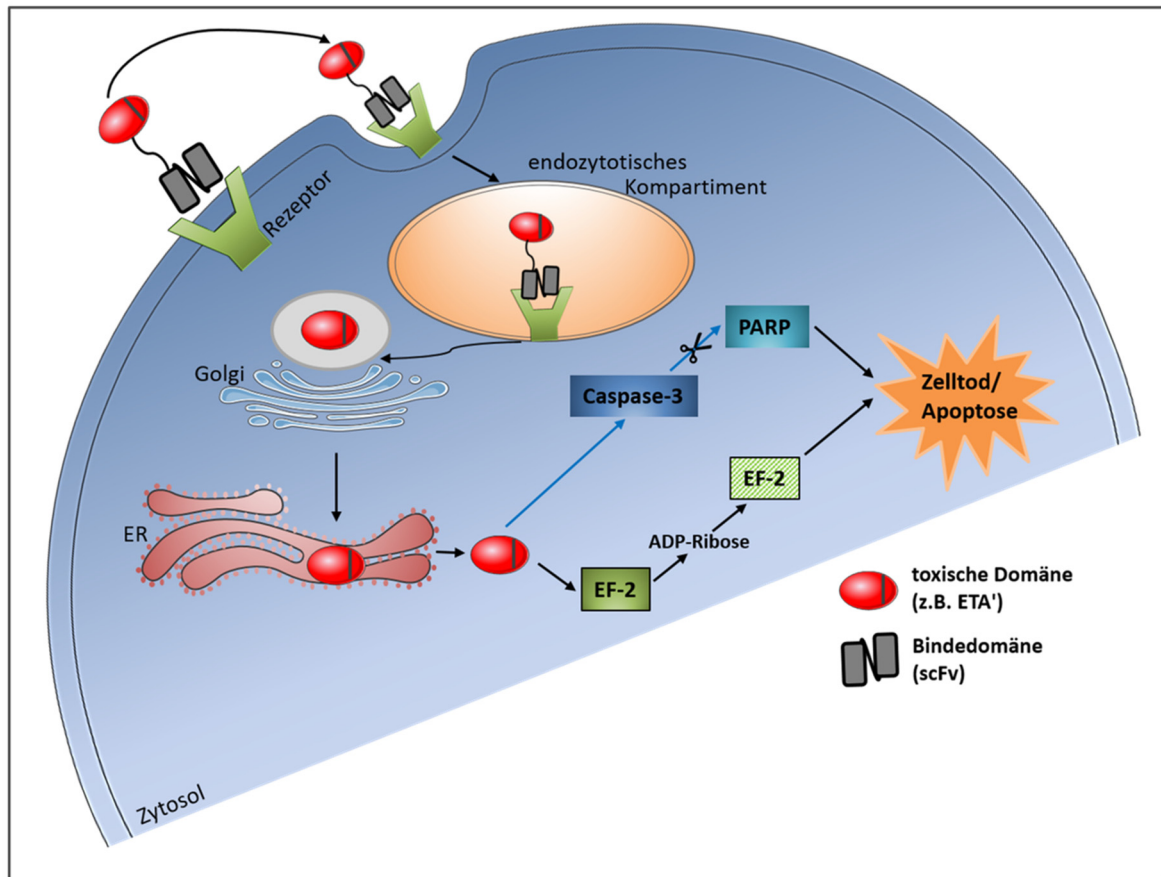
Die Entwicklung von Krebstherapeutika basiert auf den Markenzeichen von Krebszellen, den sogenannten „hallmarks of cancer“ und den damit zusammenhängenden molekularen Zielstrukturen. Die wichtigsten und als erste definierten „hallmarks of cancer“ sind folgende:

das Entkommen des programmierten Zelltods (Apoptose), die Proliferation, also die ständige Produktion wachstumsstimulierender Signale, gleichzeitig aber auch das Blockieren von wachstumshemmenden Signalen, die Bildung von Metastasen, ermöglicht durch Wanderung in zellfremdes Gewebe, das Auslösen von Angiogenese und das unbegrenzte Weitergeben von schädlichen Informationen an Tochterzellen [70]. Paul Ehrlich setzte mit seiner Idee des „magic bullet“ den Anfang der zielgerichteten Therapie [70, 71]. Denn bakterielle oder pflanzliche Toxine hemmen zwar die Proteinsynthese und lösen Apoptose mit nur einer geringen Anzahl an Molekülen aus, aufgrund der Nebenwirkungen ist es aber nicht möglich sie direkt einzusetzen. Daher müssen sie, um ein therapeutisches Fenster zu schaffen, über zielgerichtete Ak-Fragmente oder Zytokine in die Zielzellen transportiert werden [63, 70].

### **I.1.3.1 Immuntherapie über IT und ihr Wirkmechanismus**

Als IT werden rekombinante Fusionsproteine bezeichnet welche aus einer zielgerichteten Domäne und einem Toxin bestehen. Die zielgerichtete Domäne ist für die spezifische Bindung verantwortlich und wird meist durch Ak-Fragmente vertreten, kann aber auch von Wachstumsfaktoren oder löslichen Rezeptoren stammen. Die toxische Komponente stammt im Allgemeinen entweder von Bakterien (*Pseudomonas* Exotoxin A, ETA oder *Diphtheria* Toxin) oder auch von Pflanzen (z.B. *Ricin* oder *Gelonin*) [72]. ETA besitzt drei Domänen: über Domäne Ia bindet ETA an seinen nativen Rezeptor ( $\alpha$ -2-Makroglobulinrezeptor) auf eukaryotischen Zellen, Domäne II ist für die Translokation ins Zytosol verantwortlich und Domäne III ist eine katalytische Untereinheit welche den Elongationsfaktor-2 (EF-2) durch ADP-Ribosylierung inaktiviert [70, 73]. In rekombinanten IT wird die Domäne Ia häufig durch tumor-spezifische Ak-Fragmente, z.B. scFvs, ersetzt und das verkürzte Toxin als ETA' bezeichnet [73]. Rekombinante scFv-ETA' basierte IT binden an die Zelloberfläche und der Signalweg beginnt mit der Internalisierung über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Anschließend bewegt sich das IT durch das endolysosomale System und erreicht den Golgi-Apparat. Hier kommt es zum retrograden Transport zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Innerhalb dieses Prozesses wird über proteolytische Spaltung das katalytische Fragment von ETA' von der zellbindenden/zielgerichteten-Domäne abgespalten. Nach diesem Schritt wird das Toxin ins Zytosol freigesetzt und trifft dort auf den EF-2, der durch ADP-Ribosylierung inaktiviert wird (Abbildung I-2). Der EF-2 spielt eine essentielle Rolle in der Proteinsynthese und dessen Inaktivierung führt zum Translationsstopp und Zelltod [74]. Innerhalb dieses Prozesses wird auch Caspase-3 über einen nicht bekannten Mechanismus aktiviert. Caspase-3 katalysiert die Spaltung von PARP (poly(ADP-Ribose) Polymerase). Diese beiden Merkmale,

die Aktivierung von Caspasen und die Caspase-katalysierte Spaltung von bestimmten Substraten wie dem Kern-Reparaturenzym PARP, sind Zeichen des apoptotischen Zelltodes [75, 76]. Das ETA-Toxin tötet die Zelle also auf zwei Wegen, über die direkte Inhibierung der Proteinsynthese und über die Induktion von Apoptose (Abbildung I-2).



**Abbildung I-2: Intrazelluläre Wirkweise von scFv-basierten IT**

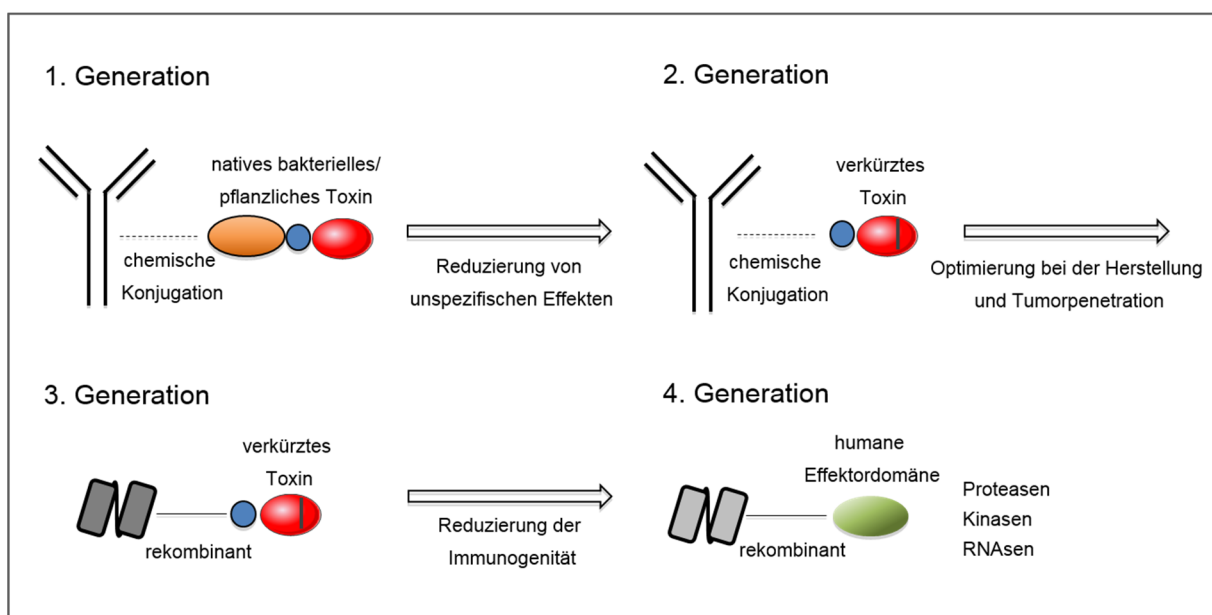
Das scFv-basierte IT bindet zielgerichtet an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche und wird über Rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen. Über das trans-Golgi Netzwerk gelangt das IT zum ER. Hier wird das Toxin proteolytisch gespalten und ins Zytosol freigesetzt, wo es eine irreversible Übertragung von ADP-Ribose auf den EF-2 (dunkelgrün) katalysiert. Dieser wird dadurch inaktiviert (hellgrün), die Proteinsynthese wird gestoppt und es kommt zum Auslösen des Zelltods. Ein zweiter Mechanismus beschreibt den Apoptose-auslösenden Effekt über die Aktivierung einer Gruppe von Cystein-Proteasen, wie Caspase-3 und die durch Caspasen ausgelöste Spaltung des Reparaturenzyms PARP. (Abkürzungen: IT: Immuntoxin, EF-2: Elongationsfaktor-2, ER: endoplasmatisches Retikulum, PARP: poly(ADP-ribose)-Polymerase). Illustration abgewandelt nach [72, 76, 77].

Einige der ersten gegen den EGFR gerichteten rekombinanten IT bestanden aus den Liganden EGF oder TGF $\alpha$  und ETA als Effektdomäne [78, 79]. Inzwischen existieren mehrere EGFR-spezifische scFv-ETA IT, wie D2C7-PE38KDEL welches sowohl an die extrazelluläre Domäne

des EGFR Wildtyps, als auch an EGFRvIII, eine konstitutiv aktivierte Rezeptorvariante bindet. Erste vorklinische Tests haben gezeigt, dass dieses Konstrukt aussichtsreich für die Therapie von Hirntumoren ist [80, 81]. Vielversprechende Ergebnisse wurden ebenfalls für das EGFR-spezifische IT 425(scFv)-ETA' dargestellt. Dieses IT zeigte zytotoxische Aktivität *in vitro* und *in vivo* auf Pankreaskrebszellen und Plattenepithelkarzinomzellen. [82, 83].

Inzwischen wurden IT bis in die vierte Generation weiter entwickelt (Abbildung I-3). Bei den IT der ersten Generation wurden die nativen Toxine chemisch an Ak gekoppelt. Diese IT waren jedoch *in vivo* meist nicht effektiv, denn neben der Instabilität und der Immunogenität dieser IT, lösen native Toxine schwere Nebenwirkungen in Patienten aus, da aufgrund ihrer unspezifischen Bindung auch gesunde Zellen angegriffen wurden. IT der zweiten Generation zeigten eine spezifischere Effektivität nachdem die zellbindende Domäne der Toxine deletiert und verkürzte Toxine für die Kopplung verwendet werden konnten. Diese IT mussten jedoch kostenintensiv produziert werden und die Tumorpenetration war aufgrund der Molekülgröße weiterhin eher schlecht. Mit IT der dritten Generation wurden diese Limitierungen zum größten Teil behoben (Abbildung I-3). Die zellbindende Domäne der toxischen Komponente wurde durch ein Ak-Fragment (z.B. scFv) ersetzt und beide Teile rekombinant fusioniert. Diese IT, mit einer nun geringeren Molekülgröße, werden meist in *E.coli* produziert, was auch die Herstellung großer Mengen in einem kostengünstigen Rahmen erlaubt [77]. Aber auch diese IT zeigen noch Limitierungen, wie z.B. die Immunogenität. Durch den Einsatz von humanen Ak-Fragmenten als Bindedomäne kann die Immunogenität auf dieser Ebene im Gegensatz zu murinen mAk reduziert werden, die toxische Domäne zeigte in klinischen Studien jedoch aufgrund ihres bakteriellen (oder pflanzlichen) Ursprungs noch immer eine hohe Immunogenität (Abbildung I-3) [72]. Das ETA-Toxin ist ein relativ großes Molekül welches schwer zu humanisieren ist. In hohen Konzentrationen kommt es oft zum sogenannten „Vascular leak syndrom“ (VLS) und unspezifischer Toxizität [84]. Auch eine Langzeittherapie oder sich wiederholende Zyklen mit tolerableren Konzentrationen sind auf Grund der Immunogenität des nicht-humanen Toxins schwierig. Die Spanne zwischen der minimal effektiven Dosis und der maximal tolerablen Dosis ist daher insbesondere bei soliden/Epithel-Tumoren, welche oft auch das Zielantigen in geringen Mengen im umliegenden Gewebe exprimieren, stark herabgesetzt. Um die Immunogenität der nicht-humanen Toxine zu umgehen wurde auf verschiedene Ansätze wie der Einsatz von Immunsuppressiva, die chemische Modifikation über PEGylation, sowie die Eliminierung von B- und T-Zellepitopen zurückgegriffen. Der Ansatz der Deletierung von B- und T-Zell-Epitopen resultiert in einer

modifizierten und verkürzten Form von ETA, dem PE38 welches aus den Aminosäuren 253-334 besteht. PE38 als modifizierte Form beinhaltet eine Mutation welche ein T-Zell-Epitop entfernt und acht Mutationen um die B-Zell-Epitope zu eliminieren [70]. Die Immunogenität von ETA-basierten IT konnte durch den Einsatz von PE38 zwar limitiert, aber nicht komplett unterbunden werden. Aufgrund dessen wird an der Entwicklung von IT der vierten Generation gearbeitet, die man als humane zytolytische Fusionsproteine (hCFP) bezeichnet. Diese hCFP bestehen aus voll-humanen Ak-Fragmenten als Zellbindedomäne und zytotoxischen Domänen humanen Ursprungs um ein komplett humanes Konstrukt zu generieren [87].



**Abbildung I-3: Die verschiedenen Generationen von IT- von alt zu neu**

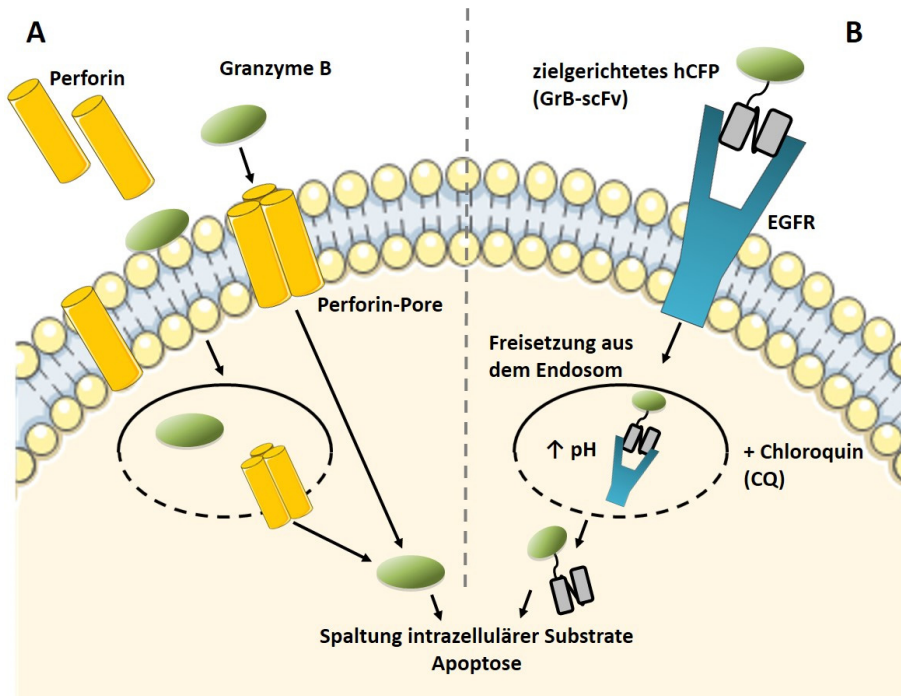
IT der ersten Generation bestehen aus nativen Toxinen und nativen Vollängen-Ak welche chemisch konjugiert waren. Den IT der zweiten Generation fehlt die zellbindende Domäne des nun verkürzten Toxins. Bei IT der dritten Generation werden Ak-Fragmente über Klonierungsstrategien an modifizierte Toxine fusioniert und rekombinante IT entstehen. IT der vierten Generation werden als humane zytolytische Fusionsproteine (hCFP) bezeichnet, hier sind sowohl Effektor-als auch Bindedomäne humanen Ursprungs. Illustration abgewandelt nach [85].

### I.1.3.2 Humane zytolytische Fusionsproteine und die Steigerung ihrer Effizienz

Rekombinante IT der dritten Generation führen effizient zum Zelltod der Zielzellen, dennoch ist der klinische Durchbruch solcher Therapieansätze nicht immer gewährleistet. Toxische Komponenten nicht-humanen Ursprungs führen wie beschrieben oft zu unerwünschten

Nebeneffekten. Der effizienteste Ansatz ist daher der Einsatz eines zytotoxischen Proteins humanen Ursprungs [86]. Zum Einsatz kommen hier unter anderem Proteasen (wie Granzyme B), RNasen (wie Angiogenin), Kinasen (wie die DAP-Kinase) oder auch das Microtubuli-assoziierte Protein MAP [87-89]. Die Serinprotease Granzyme B (GrB) wird natürlicherweise in zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen exprimiert. Es existieren fünf verschiedene Granzyme-Arten im Menschen (A, B, H, K und M), wovon Granzyme B am wichtigsten und einer der Hauptauslöser von Apoptose im angeborenen Immunsystem ist [84]. Die Apoptose-auslösende Aktivität von GrB wurde bereits genutzt, um nach der Fusion mit Ak-Fragmenten (scFv) oder Liganden als hCFP Krebszellen zu eliminieren [87, 90, 91]. GrB wird in den Zellen als inaktives Vorläufer-Protein produziert. Um die enzymatisch aktive Form zu erhalten wird das N-terminal gelegene Dipeptid Gly-Glu über die lysosomale Dipeptidyl-Peptidase I abgespalten und der so entstandene Amino-Terminus induziert eine allosterische Veränderung der Aktivierungsdomäne [92]. Die aktivierte Form lagert zusammen mit anderen Granzymes und Perforin in den lytischen Granula. Nach der Aktivierung der Effektorzellen werden die lytischen Granula polarisiert, binden an die Plasmamembran und geben ihren Inhalt in den synaptischen Spalt zwischen Effektor- und Zielzelle ab. Nach der Freisetzung dringt GrB über Perforin in die Zielzelle ein und induziert Apoptose [86] (Abbildung I-4). Die Induktion der Apoptose durch GrB nach der Internalisierung erfolgt Caspase-abhängig und unabhängig und basiert auf der proteolytischen Spaltung verschiedener nachgelagerter Caspasen wie der Pro-Caspase-3. Eine Prozessierung von Caspase-3 resultiert in der Spaltung einiger nachgeschalteter Substrate, wie den Inhibitor Caspase-aktivierender DNase (ICAD), PARP, der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und anderen. [40]. GrB kann sowohl Caspase-Substrate als auch Caspase-unabhängige Proteine wie Bid direkt spalten, welche zur Ausschüttung von Cytochrom-C und einer erhöhten Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran führen [87]. Weiterhin spaltet GrB direkt Bestandteile des Zytoskeletts, lamin B, PARP und Proteine die in die zelluläre Homöostase involviert sind. [86].

Die Behandlung von Krebszellen mit GrB-scFv-Fusionsproteinen resultiert in den typischen morphologische Änderungen ausgelöst durch die Apoptose-Aktivierung, wie Chromatin Kondensation, Membran-Durchlässigkeit, DNA-Fragmentierung oder Aktivierung von Effektor-Caspasen. Um aber eine Toxizität im nanomolaren oder picomolaren Bereich zu erreichen werden die Zellen häufig mit endosomolytischen Substanzen behandelt, wie z.B. mit Chloroquin (CQ) (Abbildung I-4).



**Abbildung I-4: Zelluläre Aufnahme von GrB und GrB Fusionsproteinen (hCFP)**

Perforin bindet an die Zielzellmembran, oligomerisiert und bildet durch Konformationsänderung transmembrane Poren. Diese können zur direkten Diffusion von GrB führen oder es kommt zu einer Ko-Internalisierung von Perforin und GrB in den vesikulären Raum, gefolgt von Perforin-vermittelter Freisetzung von GrB ins Zytosol (A). Zielgerichtete GrB-Fusionsproteine (GrB-scFv) binden spezifisch über das Ak-Fragment an Oberflächenantigene wie den EGFR. Rezeptor-vermittelte Endozytose führt zur Aufnahme ins Endosom. Eine effiziente Freisetzung und Translokation ins Zytosol kann durch den Einsatz von CQ erreicht werden. CQ reichert sich in Endosomen/Lysosomen an und wirkt auf das pH-Gleichgewicht ein, was zum osmotischen Aufbrechen der Vesikel führt. (B).

Illustration abgewandelt nach [86].

Der Einsatz von CQ als endosomolytische Substanz in Kombination mit Immuntherapeutika hat einen großen Vorteil. Schon seit 1947 wird CQ als effizientes Malaria-Medikament genutzt und ebenfalls für Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematosus oder Amöbenhepatitis eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Substanzen kann CQ somit in der Krebstherapie zum Einsatz kommen ohne vorherige Austestung auf tierexperimenteller Ebene bzw. dem Zwang einer Phase-I-Studie [93]. Als lysosomotrophische Substanz eingesetzt kann CQ die Zytotoxizität von IT um das bis zu 2500-fache verbessern. Es hemmt lysosomale DNasen, erhöht/neutralisiert den pH-Wert und macht die Zielzellen somit sensitiver für die IT- oder hCFP-Applikation [93, 94] (Abbildung I-4). Sowohl IT als auch hCFP basierend auf GrB wurden bisher erfolgreich in Kombination mit CQ eingesetzt [91, 95, 96]. Somit kann das Problem der endosomalen Freisetzung gelöst und die Zytotoxizität von hCFP basierend auf GrB verbessert werden. Dennoch limitiert eine Eigenschaft von GrB seinen klinischen Einsatz als



hCFP. Der natürlich vorkommende, endogene GrB Inhibitor Serpin B-9 (PI-9) schützt zytotoxische Lymphozyten vor fehlgesteuerten GrB-Molekülen während der Immunantwort. PI-9 wird jedoch nachweislich unter anderem auch von Brustkrebs-, Pankreaskarzinom- und Prostatakarzinomzellen überexprimiert, die dadurch der pro-apoptischen und zytotoxischen Wirkung von GrB-basierten hCFPs entkommen. [40]. Um diese Limitierung zu umgehen wurden PI-9 resistente Mutanten entwickelt, wobei die Mutante R201K (Austausch von Arginin gegen Lysin an Position 201) die am vielversprechendsten Ergebnisse zeigte [40, 97]. Mit GrBR201K-scFv basierten hCFP wurden zytotoxische Effekte auf PI-9 exprimierenden- und nicht exprimierenden Krebszellen erreicht [97, 98].

## **I.2 Diagnostik solider Tumore**

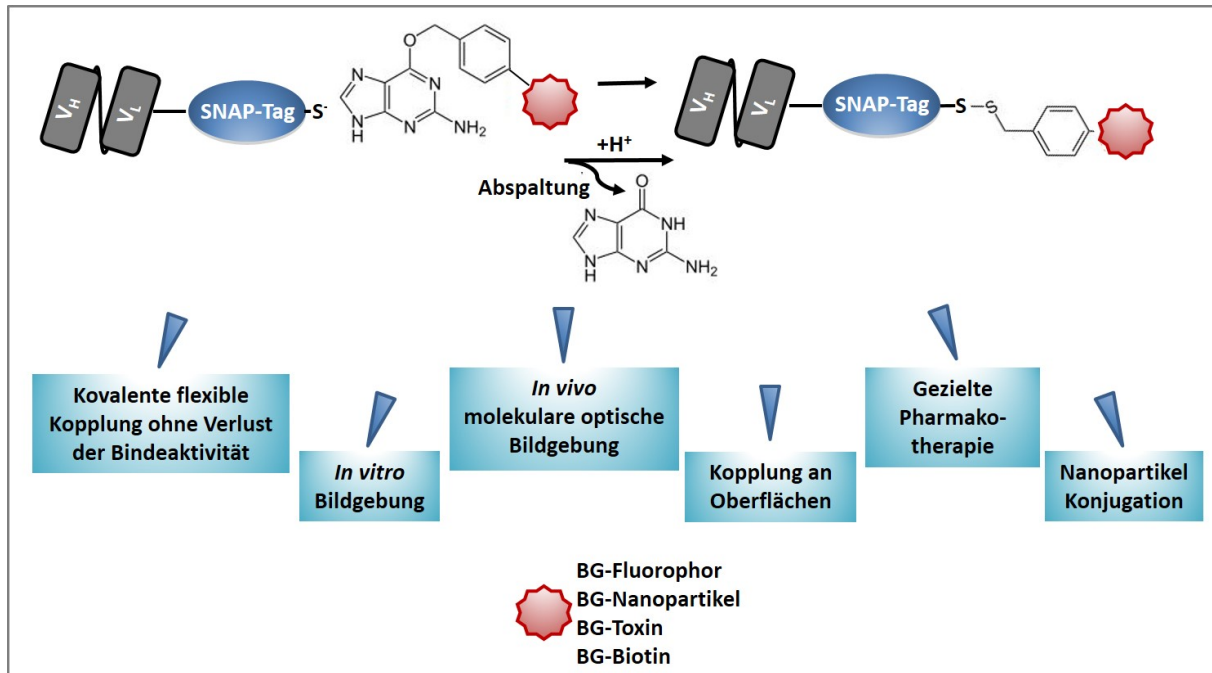
Neben dem therapeutischen Ansatz ist die Diagnostik ein wichtiges und herausforderndes Feld in der Onkologie. Die Diagnose und die Erkennung von Tumoren im Anfangsstadium sind ausschlaggebend für eine erfolgreiche Therapie und das Langzeitüberleben. Um die Tumorentstehung, Entwicklung und Metastasierung darzustellen, existiert für solide Tumore neben der Computer-Tomographie (CT), der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder der Magnetresonanztomographie (MRI) als klassische Methoden, auch die optische molekulare Bildgebung. Die Optische Bildgebung wird für das direkte Monitoring neuer Therapieformen, die nicht-invasive Einsichtnahme in lebende Organismen oder der Darstellung von Metabolisierungsprozessen und der Tumorentwicklung, hauptsächlich in der vor-klinischen Entwicklung, eingesetzt [99, 100]. Damit kann die Darstellung bestimmter Prozesse die charakteristisch für eine bestimmte Krankheit/Zelle sind, über die Expression und Gegenwart von spezifischen Markern visualisiert werden. Durch den Einsatz von Bildgebungssonden, die solche Marker erkennen ist es möglich Krankheitsentwicklungen nicht-invasiv und in einem frühen Stadium darzustellen [101, 102].

### **I.2.1 Optische Bildgebung über die SNAP-Tag Technologie**

Eine Methode um Fusionsproteine spezifisch mit organischen Fluorophoren zu koppeln und so ihre Verhalten *in vivo* zu demonstrieren ist die SNAP-Tag Technologie. Der SNAP-Tag ist ein Derivat des humanen Reparatur-Enzymes *O*(6)-Alkylguanin DNA Alkyltransferase (AGT). Substrate welche *O*(6)-Benzylguanin (BG) enthalten können kovalent, schnell und äußerst spezifisch mit einer 1:1 Stöchiometrie an den SNAP-Tag gebunden werden. Der SNAP-Tag reagiert mit *O*(6)-BG-Derivaten durch die Übertragung der Benzylgruppe über nukleophile

Substitution, an sein aktives Zentrum und entlässt durch diese Reaktion freies Guanin [103, 104]. Diese Reaktion ist irreversibel. Der SNAP-Tag als optimierte und mutierte Form des AGT besitzt eine 50-fach höhere Aktivität gegenüber BG als Wildtyp-AGT [105].

Momentan sind eine Vielzahl von BG-Fluoreszenzfarbstoffen, auch im nah-infraroten Bereich, verfügbar und die schnelle und dauerhafte Kopplungsmethode mit SNAP-Tag-Fusionsproteinen, erlaubt die Visualisierung verschiedenster Prozesse auf einfachem Wege *in vitro* und *in vivo* ohne die Bindungseigenschaft des Liganden zu beeinflussen. Die SNAP-Tag Technologie erlaubt es Fusionspartner wie z.B. spezifische scFvs mit vielen verschiedenen (Fluoreszenz)-Farbstoffen, Biotin, Effektormolekülen, chemisch modifizierten Oberflächen oder auch Nanopartikeln und Quantum-Dots zu koppeln und für verschiedenste Methoden, inklusive der molekularen Bildgebung, einzusetzen (Abbildung I-5). Die Fusion von Liganden/Ak-Fragmenten an den SNAP-Tag kann sowohl N-als auch C-terminal erfolgen [106]. Internalisierungsstudien z.B. über Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Zielzell-spezifische scFv-SNAP-Fusionsproteine, Bindungsstudien oder Kompetitionsmessungen sind ebenso unkompliziert möglich, wie der Einsatz *in vivo* im Tiermodell. Verschiedene mit BG-Farbstoff-markierte scFv-SNAP-Konstrukte wurden bereits erfolgreich in der optischen Bildgebung eingesetzt [68, 83, 103]. Weiterhin können auch Nanopartikel oder ähnliche Komponenten an SNAP-Fusionsproteine gebunden werden und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der optischen Bildgebung eingesetzt werden. Ein SNAP-scFv Fusionsprotein spezifisch für HER-2 wurde bereits erfolgreich mit einem Magnetfluoreszenz-Nanopartikel (MFN2) gekoppelt und *in vitro* getestet [107]. Ein weiteres interessantes Einsatzgebiet ist die gezielte Pharmakotherapie. EGFR-spezifischen scFv-SNAP Fusionsproteine wurden beispielsweise in der Photoimmuntherapie unter Einsatz von Chlorin e6 genutzt [108, 109].



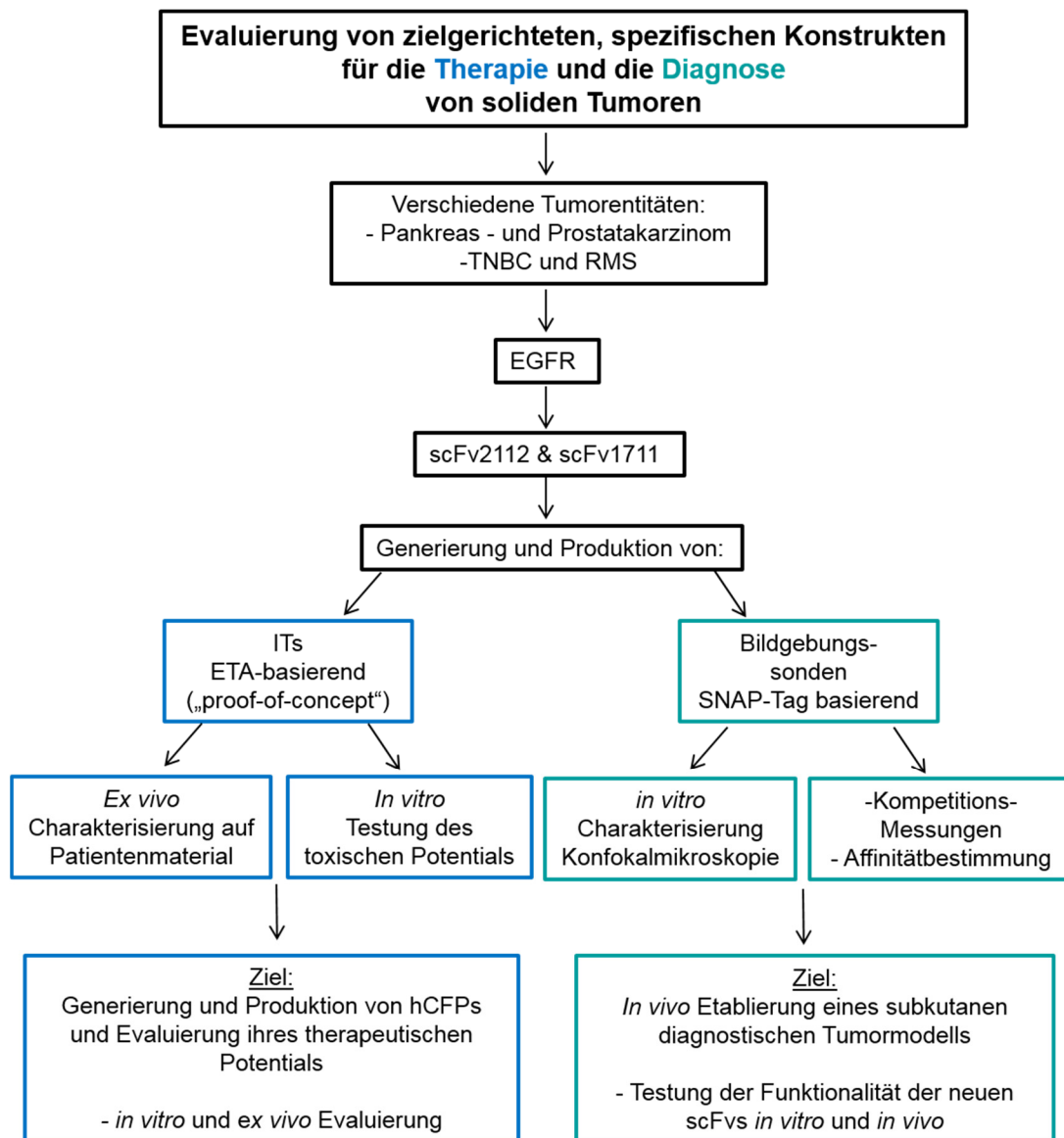
**Abbildung I-5: Die SNAP-Tag Technologie und ihre Verwendung**

O(6)-Benzylguanin (BG) Derivate werden über die Benzylgruppen durch nukleophile Substitution an den aktiven SNAP-Tag gebunden, wodurch Guanin frei wird. BG-modifizierte Farbstoffe/Fluorophore, aber auch BG-Nanopartikel/Qdots oder BG-modifizierte Toxine können ohne die Ak-Aktivität zu beeinflussen kovalent gebunden werden und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* z.B. in der Bildgebung eingesetzt werden. Weiterhin ist die Kopplung von scFv-SNAP Konstrukten an BG-modifizierte Oberflächen (Biosensoren, Microarrays) möglich. Illustration abgewandelt nach [103].

Die SNAP-Tag Technologie kann aber auch dazu eingesetzt werden um z.B. neue scFvs zu charakterisieren und zu evaluieren. Somit können mit dem System der SNAP-Tag Technologie auch Ak-Fragmente/Liganden verschiedener Spezifität einfach und schnell bezüglich ihrer Funktionalität und ihres therapeutischen oder diagnostischen Potentials evaluiert werden.

### I.3 Zielsetzung der Arbeit

In Deutschland wird pro Jahr bei etwa 470.000 Menschen ein solider Tumor diagnostiziert. Die Mehrzahl dieser Tumore zeigt eine Überexpression des EGFR, wie die Brustkrebsform TNBC, das Prostata-, das Pankreas- und das Plattenepithelkarzinom oder das Rhabdomyosarkom, eine seltene oft bei Kleinkindern vorkommende Krebsart. Da der EGFR eine gut erforschte Zielstruktur darstellt, sollte er in dieser Arbeit als Antigen für innovative und zielgerichtete Therapieansätze eingesetzt werden. Von den beiden zugelassenen EGFR-spezifischen mAk Cetuximab und Panitumumab sollten die scFv-Fragmente abgeleitet und als Bindedomäne eingesetzt werden. Neben dem therapeutischen Aspekt spielt eine frühe und gezielte Diagnose bei soliden Tumoren eine äußerst wichtige Rolle. Daher sollten beide scFvs rekombinant an den SNAP-Tag fusioniert und als Bildgebungssonden eingesetzt werden. Diese Fusionsproteine sollten somit zum einen genutzt werden um, über den Nachweis der spezifischen Bindeaktivität, der Bestimmung der Affinität und des Kompetitionsverhalten im Vergleich zu den parentalen mAk sowie der Internalisierungsrate, die *in vitro* Funktionalität der neuen scFvs zu überprüfen. Zum anderen sollte in einem subkutanen Tumormodell die *in vivo* Funktionalität mindestens eines scFv für den Einsatz als mögliche diagnostische Bildgebungssonde untersucht werden. In einem immuntherapeutischen Ansatz sollten beide scFvs mit dem etablierten bakteriellen Toxin ETA fusioniert und auf den beschriebenen Tumorentitäten als „proof of concept“ getestet werden. Da bakterielle Toxine aber auch nach vielen Jahren der Forschung und trotz Verbesserungen noch immer den limitierenden Faktor der Immunogenität aufweisen, sollte ein komplett humanes IT, ein sogenanntes hCFP, entwickelt werden. Dazu sollte der humane scFv abgeleitet von Panitumumab als Bindedomäne mit der humanen Serinprotease GrB fusioniert werden. Hier sollte eine PI-9 resistente Mutante von GrB (R201K) eingesetzt werden, da Serpin-B als natürlicher Inhibitor von GrB von vielen soliden Tumoren überexprimiert wird. Der Nachweis antiproliferativer und Apoptose-auslösender Effekte sollte dabei bei beiden Ansätzen im Fokus stehen. Des Weiteren sollte die Bindeaktivität auch *ex vivo* auf Patiententumormaterial getestet werden. Um die Effizienz und zytosolische Freisetzung des hCFP zu steigern, sollte zusätzlich die endosomolytische Substanz CQ auf ausgewählten Tumorentitäten eingesetzt und getestet werden. Ein komplett humaner therapeutischer Ansatz basierend auf GrB sollte final vorliegen und auf ausgewählten soliden Tumorentitäten *in vitro* und *ex vivo* für weiterführenden experimentelle Studien etabliert werden.



**Abbildung I-6: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes als Flussdiagramm**

Abkürzungen: TNBC (triple negative breast cancer), RMS (Rhabdomyosarkom), EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), scFv (single-chain fragment variable), IT (Immuntoxine), hCFP (humanes zytolytisches Fusionsprotein)

## **II. Material und Methoden**

### **II.1 Material**

#### **II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel**

Alle verwendeten Chemikalien besaßen mindestens den Reinheitsgrad p.a. und wurden in der Regel von folgenden Firmen bezogen: Cambridge Research & Instrumentation, Licor Bioscience (Lincoln, USA), Inc (CRI) (Woburn, USA), Roth (Karlsruhe), BioRad (München), New England Biolabs (Frankfurt am Main), VWR (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Promega (Mannheim), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), ICN (Eschwege), Gibco BRL (Eggstein), BD Bioscience (Heidelberg), Invitrogen (San Diego, USA), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Die Verbrauchsmaterialien stammten in der Regel von folgenden Firmen: Eppendorf (Hamburg), Amersham Pharmacia (Freiburg), Nunc (Wiesbaden), Biozym (Oldendorf), Millipore (Eschborn), Whatman (Bender & Hobein, Bruchsal), Roth (Karlsruhe), Clontech (Heidelberg), Biozym (Oldendorf), BD Bioscience (Heidelberg), Greiner Bio-One (Frickhausen), Invitrogen (San Diego, USA), Pierce Biotechnology (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Schott (Mainz), Zeiss (Oberkochen).

Alle anderen nicht gesondert aufgeführten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien entsprachen den üblichen Laborstandards.

## II.1.2 Enzyme, Standards und Reaktionskits

Die in folgender Tabelle aufgeführten Enzyme, Standards und Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

**Tabelle II-I** Verwendete Enzyme, Standards und Reaktionskits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firmenname</b>
<i>Enzyme und Polymerasen</i>	
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main
Enterokinase, rekombinant	Novagen, über Merck, Darmstadt
Shrimps alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
High Fidelity Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt am Main
Quick-T4-DNA-Ligase oder T4-Ligase	NEB, Frankfurt am Main
<i>Standards</i>	
Prestained broadrange marker (Proteine)	NEB, Frankfurt am Main
Color prestained protein standard, broad range (Proteine)	NEB, Frankfurt am Main
2-log ladder (Nukleinsäuren)	NEB, Frankfurt am Main
<i>Reaktionskits</i>	
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II (DNA Reinigung)	Macherey & Nagel
NucleoSpin Plasmid <sup>®</sup> (Plasmid Isolation)	Macherey & Nagel

### II.1.3 Geräte- und Apparaturenliste

Autoklaven:	Varioklav (H+P) 135S (H+P Labortechnik GmbH Oberschleißheim), Systec HX-430 (Systec, Wettenberg)
Biacore™-Technik:	Oberflächenplasmonresonanz (SPR), Biacore™ T200 (GE Healthcare, Freiburg), Software: Biacore™ T200 Evaluation Software V1
Bildgebungsgerät:	MAESTRO™ <i>In-vivo</i> Imaging System CRi (Cambridge & Instrumentation, Inc., Woburn, MA, USA)
Durchflusszytometer:	FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg), FACSVerse™ (Becton Dickinson, Heidelberg), Software: BD Facsuite, WinMDI 2.9, CellQuest, BD
Eismaschine:	Icematic D201 (Castel Mac, Castelfranco Veneto, Italien)
Elektrophorese:	Mini-SUB® Cell GT (Bio-Rad, München) für Agarosegele, Mini-Protean® 3 Cell (Bio-Rad, München) für Protein-Gele, Mini Trans Blot® Cell (Bio-Rad, München) für Proteintransfer, Netzteil: Power Pac Basis/HC (Bio-Rad, München)
Elisa Reader:	Epoch (BioTek, Bad Friedrichshall)
FPLC:	ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Freiburg)
Heizblock:	QBT (Grant, Cambridge, UK)
Inkubatoren:	Function Line Typ UT12 (Heraeus, Hanau), CB210 (Binder, Tuttlingen)
Kryopräservationsmodul:	StrataCooler Cryo Preservation Module (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Mikroskope:	Leica DM2000 (Leica, Wetzlar), Leica TCS SP8 Konfokallasermikroskop (Leica, Wetzlar), Software: LAS AF, Leica DMR-HC (Leica, Wetzlar), Software: Leica QWin



MilliQ-Anlage:	Aquinta Ls Membra-Pure mit MemCap1, 0,2µm PES Reinstwasseranlage (Membra-Pure, Bodenheim)
Mikrowelle:	OMV330D-M (OK, Imtron GmbH, Ingolstadt)
PCR-Thermocycler:	Primus 96 Plus (MWG-Biotech, Martinsried)
Pipetten/Pipettierhilfen:	Transferpette -8/-12 electronic (Brand, Wertheim), CellMate II Pipettus (Matrix, Teil von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Pipetman Starter Kit (Gilson, Middleton, USA)
pH-Meter:	Basic Meter PB-11 (Sartorius, Göttingen)
Photometer:	Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
Scanner:	HP Scanjet 4890 (Hewlett Packard, Böblingen)
Schüttel- und Mixgeräte:	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA), Magnetrührer RCT basic (IKA, Staufen), Thermomixer „comfort“ und „compact“ (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), Innova TM 4430 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Hamburg)
Sterilbänke:	Biowizard 2 MSC (Kojair, Berkshire UK) mit Gasprofi 2 (WLD-TEC, Göttingen), Herasafe Typ HS-9 (Heraeus, Hanau)
Thermokonstanträume:	Krum-Schröder /Pfeiffer
Ultraschallgeräte:	JSP Digital Ultrasonic Cleaner, Model US21 Sonoplus, HD2070, Typ UW207 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
UV-Transilluminator:	Wellenlänge 302nm (Bio-Rad, München), Fotodokumentation Gel Doc XR System (Bio-Rad, München)
Waagen:	Präzisions- und Analysewaagen, Talent: TE6101, TE64, TE31025, TE12000 (Sartorius, Göttingen)
Wasserbad:	TW20 (Julabo, Seelbach)

Waschzentrifuge:	Dade Serocent (Dade, Liederbach)  Rotolavit; Serial Nr. 20000756 (Hettich Lab Technology, Tuttlingen)
Zellzähler:	Casy1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen)
Zentrifugen:	Eppendorf-Tischzentrifuge 5415D und 5415R (Eppendorf, Hamburg), Multifuge 1S und 3S-R (Heraeus, Hanau), Avanti J-25I Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld), Rotina 420 R (Hettich Lab Technology, Tuttlingen), Biofuge Pico (Heraeus, Hanau)

#### **II.1.4 Puffer und Lösungen**

Die verschiedenen Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* [110] mit Milli-Q-Wasser hergestellt und sind im Folgenden aufgeführt.

**Tabelle II-II Häufig verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Puffername</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Konzentration</b>
PBS (10x), pH 7,4	NaCl	1,37 M
	KCL	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	1 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM
PBST, pH 7,4	Tween 20 (in PBS)	0,05% (v/v)
Tris-Puffer, pH 7,4	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	200 mM
TGS (1x), pH 8,3	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1% (w/v)
TAE-Puffer, pH 8,5	Tris-HCl	40 mM
	Essigsäure	5,7% (v/v)
	EDTA	10 mM
Transferpuffer, pH 8,3	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
GrB Substratassaypuffer, pH 7,4	NaCl	100 mM
	HEPES	50 mM
	DTT	10 mM
	EDTA	1 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	CHAPS	0,1% (v/v)
Puffer und Lösungen für die periplasmatische Stressexpression:		
Lysepuffer, pH 8,0	Tris-HCl	75 mM
	NaCl	300 mM
	EDTA	10 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	(DTT)	(5 mM)
Puffer für die Reinigung von Proteinen über den Histidin-Tag:		
Inkubationspuffer(4x),pH 8,0	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM
	NaCl	1,2 M
	Imidazol	40 mM

## Material und Methoden

---

Elutionspuffer, pH 8,0	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Puffer/Lösungen für SDS-PAA-Gelelektrophorese und Coomassie Brilliant Blue Färbung:		
Trenngel, pH 8,8	Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)	12% (v/v)
	Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM
	SDS (10% w/v)	0,1% v/v
	TEMED	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (v/v)
Sammegel, pH 8,8	Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)	5% (v/v)
	Tris-HCl (pH 6,8)	150 mM
	SDS (10% w/v)	0,1% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (v/v)
Coomassie-Brilliant-Blue	Coomassie Brilliant Blue G250	0,25% (w/v)
Färbelösung	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	9% (v/v)
Puffer und Lösungen für den Western Blot:		
AP Puffer, pH 9,6	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NBT/BCIP	Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT)	3,33% (w/v)
	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indoly-phosphat p-Toluidinsalz (BCIP) in Dimethylformamid	1,65% (w/v)
Puffer für Apoptose-Assays:		
Annexin-Puffer (10x), pH 7,4	Hepes	0,1 M
	NaCl,	1,4 M
	CaCl	25 mM
HBS-EP Biacore™ -Laufpuffer	Hepes	10 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	3 mM
	Tween 20	0,005% (v/v)

---

## **II.1.5 Nährlösungen, Medien und Zusätze für Bakterien und die Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Zur Sterilisierung der Nährlösungen für Bakterien wurden diese autoklaviert und die entsprechenden Antibiotika wurden vor Benutzung hinzu gegeben.

### Nährlösungen und Zusätze für Bakterien:

#### LB-Medium, pH 7,0

1% (w/v) Bakto-Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, ((für LB-Platten 1,5% (w/v) Agar)

#### TB-Medium, pH 7,0

1,2% (w/v) Bakto-Trypton, 0,5% (v/v) Glycerin, 2,4% (w/v) Hefeextrakt

#### SOC-Medium

2,0% (w/v) Bakto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 25 mM KCl, 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

### Antibiotika-Zusätze:

- Ampicillin (100µg/µl Endkonzentration)
- Chloramphenicol (25µg/µl Endkonzentration)
- Kanamycin (50µg/µl Endkonzentration)

### Medien und Zusätze für die eukaryotische Zellkultivierung:

#### R-10 Medium

RPMI-1640 (Invitrogen) supplementiert mit 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 50 µg/µl Penicillin und 100 µg/µl Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (für die Kultivierung transfizierter Zelllinien zusätzlich 100 µg/µl Zeocin)

## II.1.6 Antikörper, Antikörperfragmente und Antikörperkonjugate

Die folgenden aufgeführten Ak und ihre Fragmente wurden im Laufe dieser Arbeit zur Detektion rekombinanter Proteine in Western Blot-Analysen (II.2.2.4), Durchflusszytometrie (II.2.3.1) und immunhistochemischen Färbungen (II.2.4.1), verwendet.

### Tabelle II-III Übersicht der verwendeten Ak

Abkürzungen: WB = Western Blot, DZ = Durchflusszytometrie, IHC = Immunhistochemie, AP = Alkalische Phosphatase, PE = Phycoerythin, FITC = Fluorescein, Ak = Antikörper.

Antikörperbezeichnung	Abkürzung	Firmenname	Anwendung
Penta-His AlexaFluor 488	$\alpha$ -His Alexa 488	Qiagen	DZ
Maus anti-hexa-His, IgG2b	$\alpha$ -His	Thermo Scientific	WB, IHC
Ziege anti-Maus IgG, Fc spezifisch AP	G $\alpha$ M <sup>AP</sup>	Sigma-Aldrich	WB, IHC
Ziege anti-Maus IgG F(ab') <sub>2</sub> PE	G $\alpha$ M <sup>PE</sup>	Dianova	DZ
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) AP	G $\alpha$ R <sup>AP</sup>	Dianova	WB
Ziege anti- Kaninchen IgG FITC	G $\alpha$ R <sup>FITC</sup>	Sigma-Aldrich	DZ
Ziege anti-Maus IgG (H+L) FITC	G $\alpha$ M <sup>FITC</sup>	Dianova	DZ
Maus anti-SNAP-tag	$\alpha$ -SNAP Ak	FhG-IME [111]	WB, DZ
Maus anti-ETA (TC-1)	TC-1	FhG-IME	WB, DZ, IHC
Ziege anti-human IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> FITC	G $\alpha$ H <sup>FITC</sup>	Chemicon	DZ
Ziege anti-human $\kappa$ -leichte Kette AP	G $\alpha$ H <sup>AP</sup>	Sigma-Aldrich	IHC
Maus anti-Granzyme B, IgG1 (2C5)	$\alpha$ -Gb Ak	Santa Cruz	WB, DZ
Kaninchen anti-human EGFR/ErbB1 (043)	A-EGFR Ak	Sino Biological Inc.	WB, DZ

Die beiden mAk Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) und Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>) wurden freundlicherweise von Dr. Agnieszka Weinandy, Neurochirurgische Klinik, Universitätsklinikum Aachen und von Martina Weichbrodt, Pharmakologie, Universitätsklinikum Aachen, zur Verfügung gestellt

## II.1.7 Synthetische Oligonukleotide und Vektoren

Die synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG-Biotech synthetisiert und sowohl zur DNA-Amplifikation über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als auch für die Sequenzierung verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle II-IV Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
scFv Pan rev	TGGTGGTGGCACCAAAGTTGAAATTAACG	PCR, Sequenzierung
scFv Pan fw	CGGCCAGGTTTCAGCTGCAAGAAAGCG	PCR, Sequenzierung
HinterHis-for (pMS)	CCAACAGCTGGCCTCGCAGACAG	Sequenzierung
pMS-Nb	GGCATGTACATCAAGTGTATCATATGCC	Sequenzierung
T7-promotor (pMT)	TAATACGACTCACTATAG	Sequenzierung
5'-pMT-Seq-for	GCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGC	Sequenzierung
5'-ETA'	CCTGCCACCTGCCGCTGG	Sequenzierung
3'-ETA'	CCAGCGGCAGGTGGCAGG	Sequenzierung
3' scFv2112 ( <i>NotI</i> )	CTAGCGGCCGCAGCCCGTTTTATTTCAGCTTG	PCR
5' scFv2112 ( <i>SfiI</i> )	GTAGGCCAGCCGGCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTG	PCR

In dieser Arbeit wurden neben dem pMT-Vektor für die periplasmatische Stress-Expression in *E.coli* ebenso der pMS-Vektor für die Expression in HEK 293T-Zellen verwendet. Zwischenklonierungsvektoren sind in den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt. Ursprünglich stammt der pMT-Vektor vom bakteriellen Expressionsvektor pET-27b (Novagen) ab. Im pMT-Vektor wird das IT über den N-terminalen pelB-Leader ins Periplasma sekretiert und damit die Expression des Proteins in löslicher Form ermöglicht. Ein N-terminaler His<sub>10</sub>-Tag erlaubt die Reinigung über IMAC. Der Vektor enthält somit N-terminal das Toxin (ETA') und C-terminal den Liganden (scFv) [73, 112, 113].

Der pMS-Vektor ist ein Derivat des pSECTag2B-Vektors (Invitrogen) [114]. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion beinhaltet der pMS-Vektor eine IVS/IRES-EGFP Sequenz (aus dem pIRESVektor). Die Igκ-Sequenz für die gezielte Sekretion der Proteine in den Zellkulturüberstand geht der eigentlichen Klonierungsstelle voraus. Ebenso enthält er am 3' Ende des Leserahmens Sequenzen für den His- und den Myc-Tag zur Detektion und Reinigung. Als Selektionsmarker enthält der pMS-Vektor sowohl ein Ampicillin- (AmpR) als auch ein

Zeocin-Resistenzgen (ZeoR). Die episomale Replikation der Plasmide in HEK 293T-Zellen wird über den SV40-Replikationsursprung (pSV40) ermöglicht.

**Tabelle II-V Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren**

Plasmid-Name	Ursprung	Verwendung
pMS-scFv2112-SNAP	pSECTag2B	zur Expression in Säugetierzellen (HEK 293T)
pMS-scFv1711-SNAP	pSECTag2B	
pMS-(E)GbR201K-scFv1711	pSECTag2B	
pMS-(E)GbR201K-scFvH22	pSECTag2B	
pMS-425(scFv)-SNAP	pSECTag2B	
<hr/>		
pMT-scFv2112-ETA'	pET-27b	zur Expression in <i>E. coli</i>
pMT-scFv1711-ETA'	pET-27b	
pMT-425(scFv)-ETA'	pET-27b	
<hr/>		
pT2tdKat2	Perry B. Hackett	zur stabilen Transfektion von Zellen mit Tandem-Katushka
pCMVSB11	(University of Minnesota)	

### II.1.8 Bakterienstämme

Für Klonierungsarbeiten und der Expression von Proteinen in *E. coli* wurden die nachfolgenden Bakterienstämme eingesetzt.

**Tabelle II-VI Verwendete Bakterienstämme**

Name/Stamm	Genotyp	Anwendung	Herkunft
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK $^-$ , mK $^+$ ) phoA supE44 $\lambda^-$ thi-1 gyrA96 relA1	Klonierung	Invitrogen
OneShot $^{\circledR}$ TOP10	F- mcrA $\Delta$ ( mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ ( araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG		
BL21 Star $^{\text{TM}}$ (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)	Expression	Invitrogen



## II.1.9 Zelllinien

Die nachfolgend aufgeführten Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Eine kurze Beschreibung, die Expression der relevanten Oberflächenrezeptoren und die Herkunft der Zelllinien werden ebenfalls aufgeführt.

**Tabelle II-VII Verwendete Zelllinien**

Abkürzungen: EGFR = Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, TNBC = triple-negative breast cancer

Name	Beschreibung	Rezeptor	Herkunft
HEK 293T	Zur Transfektion geeignete Zelllinie, abgeleitet von der humanen embryonalen Nieren-Primär-Zelllinie 293	-	ATCC, CRL-11268
U937	Humane Lymphomzelllinie gewonnen aus einem hystiozytischen Lymphom eines 37-jährigen Mannes	CD64	DSMZ, ACC5
L540cy	L540cy ist eine Mutante der Zelllinie L540, gewonnen durch Rekultivierung nach Injektion von L540-Zellen in Nacktmäusen	CD30	[115]
A431	Epidermoides Karzinom, Modellzelllinie mit hoher EGFR-Expression	EGFR	DSMZ, ACC91
L3.6pl	Humane Pankreaskarzinomzelllinie, stark metastasierend	EGFR	[116]
MDA-MB-468	Isoliert aus einem Pleuraerguss einer 51-jährigen Frau mit metastasierendem Brust-Adenokarzinom (TNBC)	EGFR	ATCC, HTB-132
RD	humane embryonale Rhabdomyosarkom-Zelllinie isoliert aus einer siebenjährigen Patientin	EGFR	DKFZ, Dr. Anette Paschen
PC-3	Prostatakarzinomzelllinie gewonnen aus Knochenmetastasen eines 62-jährigen Mannes (Adenokarzinom Grad IV)	EGFR	ATCC, CRL-1435
C4-2	Subzelllinie von LNCaP, kultiviert aus kastrierten Mäusen nach Injektion von LNCaP Zellen	EGFR	Uniklinik Freiburg, Prof. Dr. Elsässer-Beile,

### **II.1.10 Paraffinschnitte**

Die verwendeten FFPE- (Formalin fixierte Paraffin eingebettete) Gewebeschnitte wurden aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen & Marburg (Standort Gießen aus der Abteilung Pathologie, Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner/Dr. Mehmet Kemal Tur) bezogen. In Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki von 1975 wurde das Primärmaterial während der täglichen klinischen Routine am Universitätsklinikum Gießen entnommen, unter Zustimmung des zugehörigen Ethikkomitees. Es wurden Mamakarzinomschnitte, embryonale RMS-Schnitte, Prostatakarzinomschnitte und TURP-(transurethrale Resektion der Prostata) Prostataschnitte von verschiedenen Patienten genutzt.

### **II.1.11 Versuchstiere und Spezial-Experimentalfutter**

Für die *in vivo* Experimente wurden männliche Nacktmäuse (BALB-c-nu/nu, Charles River, Wilmington, MA; USA) verwendet. Diese Versuchstiere sind immundefizient, besitzen keinen Thymus, produzieren keine T-Zellen und werden vorwiegend in der Tumor- und Xenograftbiologie zur Implantation körperfremden Gewebes eingesetzt. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn etwa 6-8 Wochen alt und wurden zuvor unter Pathogen-freien Bedingungen gehalten. Einige Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mit folgendem Spezialfutter auf Diät gesetzt: Ssniff EF R/M AIN 93G, 10mm Pellets. Unter Einsatz dieses Futters kann ein mögliches Fluoreszenzsignal im Magen, ausgelöst von herkömmlichem Futter, limitiert werden. Für alle Injektionen wurden folgende Spritzen verwendet: Micro-Fine, U-40 Insulin 1 ml, BD Becton Dickinson AG. Die durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt (Aktenzeichen: AZ 87-51.04.2010.A278) und fanden im Rahmen des Projektes „Forschungs-Satellit-Tumor (ForSaTum): Qualitative und quantitative molekulare Bildgebung unter anti-angiogener Therapie“ statt.

### **II.1.12 Benzylguanin (BG) - modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe und BG-Biotin**

In dieser Arbeit wurden die folgenden Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Biotin-Markierungen (alle von New England Biolabs bezogen) verwendet und über das Standardprotokoll (II.2.2.6) an scFv-SNAP Fusionsproteine gekoppelt:

### **Tabelle II-VIII Verwendete BG-Farbstoffe und BG-Biotin**

Alle BG-Farbstoffe und BG-Biotin bezogen von:

New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main.

Farbstoffname	Abkürzung
SNAP-Surface®AlexaFluor®488	BG-488
SNAP-Surface®AlexaFluor®647	BG-647
SNAP-Surface®747	BG-747
BG-IRDye 800CW	BG-800CW
SNAP-Biotin®	BG-Biotin

## **II.2 Methoden**

### **II.2.1 Molekularbiologische Methoden**

Die aufgeführten Methoden wurden grundlegend nach standardisierten Techniken und Vorlagen nach Sambrook und Russel durchgeführt [110]. Gentechnischen Arbeiten unter der Sicherheitsstufe S2 wurden am Fraunhofer IME in der gentechnischen Anlage 64-K-1.50/05 (Anlagennummer 992) und unter der Sicherheitsstufe S1 in der gentechnischen Anlage 64-K-1.51/05 (Anlagennummer 993) durchgeführt.

#### **II.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde anhand der Herstellerangaben des NucleoSpin Plasmid Kits (II.1.2) durchgeführt. Hierfür wurden 3-5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin) mit Einzelkolonien der zuvor transformierten Bakterien beimpft und diese bei 37°C über Nacht in einem Rotationsinkubator inkubiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch anschließende Kontrollrestriktion verifiziert und die geschnittenen Fragmente über Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3) separiert.

#### **II.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR**

Die PCR wurde zur Klonierung des scFv2112-Konstruktes verwendet um geeignete Restriktionsschnittstellen am 5' und 3'-Ende über definierte Primer anzufügen. So wurde die Klonierung in das pMS-Vektorsystem ermöglicht. Die Primersequenzen sind in Tabelle II-IV aufgeführt. Die Sequenz des scFv2112 wurde wie in II.2.1.11 beschrieben, von Life

Technologies™ GeneArt® synthetisiert. Ein Zwischenklonierungsschritt mit dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben erfolgte nach dem Anfügen der Restriktionsschnittstellen durch die erste PCR.

**Tabelle II-IX PCR Reaktions-und Pipettierschema**

Reaktionskomponente	Finale Konzentration
5'-Primer	10 pM
3'-Primer	10 pM
dNTP-Mix (10mM)	500 µM
Phusion HF buffer (5x)	1x
Phusion DNA Polymerase	0,02 U/µl
Template-DNA	20 ng
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl

Alle PCR-Reaktionen wurden in 0,5 ml PCR Gefäßen in einem PCR-Thermocycler durchgeführt, der auf folgendes Programm eingestellt war:

**Tabelle II-X PCR-Cycler Einstellungen**

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1x
Denaturierung	98°C	10 s	} 25-35 x
Annealing	55-65°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	1x
Pause	4°C	unendlich	1x

Zur Kontrolle der erfolgreichen DNA-Amplifikation wurde im Anschluss eine Agarosegelelektrophorese (II.2.1.3) des PCR-Produktes durchgeführt (0,8-1,2 % (w/v) Agarosegel).

Bei einer Kolonie-PCR wurde jeweils 20 µl ddH<sub>2</sub>O in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und eine Einzelkolonie von den bewachsenen LB-Agar-Platten gepickt und eingesetzt. Nach einer Inkubationsphase von 15 min bei 95°C im PCR-Cycler wurden 10 µl dieses Ansatzes wie in der oben beschriebenen PCR-Reaktion als Template eingesetzt.

### **II.2.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Es wird zwischen analytischer und präparativer Agarosegelelektrophorese unterschieden. In der analytischen Gelelektrophorese wurden PCR-Produkte (II.2.1.2), Plasmid-DNA (II.2.1.1) oder Restriktionsfragmente (II.2.1.5) über 0,8% oder 1,2% (w/v) Agarose-Gelelektrophoretisch separiert. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer welcher 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Um eine Größenabschätzung zu ermöglichen wurden Längenstandards mit auf das Gel aufgetragen (2-log Marker, NEB). Fotodokumentation und Visualisierung der Banden erfolgte mittels des Gel Doc XR Systems (BioRad).

Wurde die Agarosegelelektrophorese für präparative Zwecke eingesetzt, wurden jeweils größerer Mengen an DNA geladen und separiert. Dies diente dazu das gewünschte DNA-Fragment nach der Enzym-Restriktion von unerwünschten Nebenprodukten zu separieren. Dazu wurde das jeweilige DNA-Fragment unter einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA über das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) extrahiert, gereinigt und bei -20°C gelagert.

### **II.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentration der DNA (II.2.1.1) wurde bei OD<sub>260nm</sub> photometrisch mit einem Epoch ELISA Reader (BioTek, Bad Friedrichshall) bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde anhand der Messung bei OD<sub>260/280nm</sub> bestimmt, welche sich aus den Absorptionsquotienten der Messungen bei beiden Wellenlängen ergibt. Dieser Wert sollte für reine DNA über 1,8 liegen.

### **II.2.1.5 Restriktion von DNA**

Für den Restriktionsverdau wurden bis zu 10 µg DNA (II.2.1.1) mit 5-10 Units Restriktionsenzym 2-3 h oder über Nacht bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert. Die Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen 10x Puffer sowie das BSA (Rinderserumalbumin) wurden von New England Biolabs bezogen. Die Restriktion mit dem Enzym *Sfi*I erfolgte bei 50°C. Die Restriktion von DNA erfolgte zum einen zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung, sodass Restriktionsmuster nach Verdau mit den gewählten Enzymen entstanden oder zum anderen zur Vorbereitung der DNA-Fragmente für die Ligation (II.2.1.7).

### **II.2.1.6 Reinigung der DNA**

Das NucleoSpin Extract II Kit (II.1.2) wurde zur Reinigung der DNA-Fragmente nach PCR (II.2.1.2) oder Restriktionsverdau (II.2.1.5), wie vom Hersteller vorgegeben, eingesetzt.

### **II.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente (II.2.1.1) und korrespondierende Vektoren wurden entweder über T4-DNA Ligase (New England Biolabs) oder über Quick-T4-Ligase (New England Biolabs) in dem vom Hersteller vorgeschlagenen Puffersystem in einem Gesamtvolumen von 20 µl ligiert. In der Regel wurde ein dreifach molarer Überschuss von DNA-Fragment zu Vektor-DNA eingesetzt, um eine erfolgreiche Ligation zu erreichen. Bei Verwendung der Quick-T4-Ligase erfolgte die Inkubation 5 min bei Raumtemperatur (RT), bei der Verwendung der T4-DNA Ligase 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde der komplette oder Teile des Ligationsansatzes in Hitzeschock-kompetente Bakterien transformiert. Zur Kontrolle wurde auch eine Re-Ligation der Vektoren durchgeführt, bei der statt dem Insert Wasser eingesetzt wurde.

### **II.2.1.8 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien (*E.coli*)**

Hitzeschock-kompetente *E.coli* DH5α oder TOP10 wurden nach Hanahan *et al.* [117] hergestellt und bei -80°C gelagert. Kompetente *E.coli* BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS wurden von Novagen (über Merck, Darmstadt) bezogen und bei -80°C in 6 µl Aliquots gelagert.

### **II.2.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien**

Für die Hitzeschock-Transformation wurde ein Aliquot (100µl) kompetente *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut und entweder der Ligationsansatz (II.2.1.7) oder 50-100 ng Plasmid-DNA zugegeben (II.2.1.1). Nachdem der Mix für 30 min auf Eis inkubiert wurde, erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s im Wasserbad. Nach einer zwei-minütigen Inkubation auf Eis wurden dem Mix 900 µl SOC-Medium (II.1.5) hinzu pipettiert. Für die Transformation von BL21 (DE3) Zellen wurden 3 µl kompetente Zellen pro Ansatz eingesetzt und mit nur 50 µl SOC-Medium versetzt. Der Transformationsansatz wurde 60 min auf einem Rotationsinkubator bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde entweder der komplette Ansatz durch Zentrifugation sedimentiert und das Zellpellet auf LB-Agarplatten ausplattiert oder verschiedene Volumina des Ansatzes auf einzelne Platten ausplattiert. Die LB-Agar Platten mit den jeweiligen Antibiotika wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **II.2.1.10 Sequenzierung der DNA-Fragmente**

Sequenzierungsanalysen wurden an der „Sequencing Facility“ am Fraunhofer IME in Aachen unter Benutzung eines „ABI Prism 3700 Capillary-Sequencer“ (Applied Biosystems) und dem „BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit“ durchgeführt. Das Programm „Applied Biosystems Sequencing Analysis“ wurde zur Auswertung genutzt. Sequenzierungen erfolgten nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger [118]. Für eine Sequenzierreaktion wurden 400-600 ng Plasmid-DNA (II.2.1.1) oder 140-160 ng/kb mit 20 pmol des jeweiligen Sequenzier-Primers (II.1.7) in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt.

### **II.2.1.11 Herstellung von scFv-Ak-Fragmenten über Synthetisierung**

Die beiden scFvs (scFv2112 und scFv1711) wurden von Life Technologies™ GeneArt® synthetisiert. Um eine maximale Effizienz der Expression in *E.coli* zu erreichen wurde die scFv-Sequenz mittels der GeneOptimizer® Software optimiert. Die Sequenz des scFv2112 wurde komplett aus folgendem Patent entnommen: US Patent 6,217,866 B1, 2001 [45]. Die CDR-Regionen der Sequenz des scFv1711 wurden aus folgendem Patent entnommen: US Patent 6,235,883 B1, 2001 [47]. Fehlende Sequenzen in den Keimbahn-Regionen wurden durch Aminosäuren aus den passenden Keimbahn-Regionen angepasst. Bei der Sequenz des scFv1711 wurden die Schnittstellen *SfiI* und *NotI* direkt mitsynthetisiert, bei der Sequenz des scFv2112 wurden diese über PCR-Amplifikation angefügt (II.2.1.2).

### **II.2.1.12 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Alle eingesetzten Zelllinien wurden in R-10 Medium (II.1.5) unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Passagierung erfolgte zweimal pro Woche, je nach Zustand der Zellen. Adhärent wachsende Zellen wurden mit sterilem PBS (Gibco, Invitrogen, San Diego, USA) gewaschen und mit Tryple Express (Invitrogen, San Diego, USA) oder Accutase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt (~5 min Inkubation im Brutschrank). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml R-10 Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5-1:10 mit frischem Medium versetzt. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde der „Casy1 Cell Counter“ (Schaerfe System, Reutlingen) nach den Herstellerangaben eingesetzt.

### **II.2.1.13 Transfektion von Plasmid-DNA in HEK 293T-Zellen**

HEK 293T-Zellen (II.1.9) wurden zur Expression rekombinanter Proteine (scFv2112-SNAP, scFv1711-SNAP, 425(scFv)-SNAP und GbR201K-scFv1711) mit den für die Proteine

codierenden pMS-Plasmidvektoren transient transfiziert. Hierzu wurden am Vortag der Transfektion HEK 293T-Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml pro Vertiefung in 12-Well Platten ausgesät. Die transiente Transfektion der Plasmid-DNA erfolgte am nächsten Tag mit Roti<sup>®</sup>-Fect (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Das DNA-Roti<sup>®</sup>-Fect Gemisch wurde 20-30 min bei RT inkubiert und anschließend auf die ausgesäten HEK 293T-Zellen gegeben. Nach 3-4 stündiger Inkubation wurde das serumfreie Medium mit serumhaltigen Medium ersetzt und die 12-Well Platte für bis zu drei Tage im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurden die frisch transfizierten HEK 293T-Zellen zur Anreicherung proteinproduzierender Zellen unter Selektionsdruck ((R10-Medium + Zeocin (II.1.5)) gesetzt. Der Selektionsdruck wurde mehrere Wochen aufrechterhalten, der Überstand gesammelt und steril aufbewahrt, bevor er mittels immobilisierter-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) (II.2.2.2) gereinigt wurde.

#### **II.2.1.14 Stabile Transfektion von Prostatakarzinomzelllinien**

Um Prostatakarzinomzelllinien (C4-2) stabil mit „Katushka/TurboFP635“ zu transfizieren wurden diese ähnlich wie bei der zuvor beschriebenen transienten Transfektion (II.2.1.13) mit pT2tdKat2 und zusätzlich mit dem Helferplasmid pCMVSB11 ko-transfiziert, welches in zehnfach geringerer Menge eingesetzt wurde. Mit dem Helferplasmid wurde die stabile Integration des pT2tdKat2-Plasmids in die genomische DNA vermittelt. Um eine optimale Leuchtkraft der Zellen zu gewährleisten, wurden diese nach Transfektion Fluoreszenz-abhängig sortiert (II.2.1.15).

#### **II.2.1.15 Zellsortierung**

Zur Zellsortierung wurde der FACSVantage Zellsortierer (Becton Dickinson, Heidelberg) eingesetzt. Sortiert wurden die „Katushka“-transfizierten Zelllinien (II.2.1.14) anhand ihrer Fluoreszenzintensität. Die leuchtenden Zellen wurden in eine 96-Well Platte sortiert, als Einzelzellen; fünf, zehn und mehr Zellen pro Vertiefung/Well. Anschließend wurden die sortierten Zellen nach Standardbedingungen kultiviert (II.2.1.12).

### **II.2.2 Reinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen**

#### **II.2.2.1 Periplasmatische Stressexpression und Zellaufschluss von rekombinanten IT**

Nach der Transformation (II.2.1.9) wurden die rekombinante Proteine (scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA') im Periplasma des *E.coli* Stamms Bl21 (DE3) Star unter Stressbedingungen



exprimiert. Dies erfolgte unter Anwesenheit kompatibler gelöster Stoffe in Anlehnung an Barth *et al.* [119]. In Kürze: Erreichten die Bakterien eine OD<sub>600</sub> von 1,6 wurden 0,5 M Sorbitol, 10 mM Betain und 4% (w/w) NaCl zugesetzt, um osmotischen Stress zu induzieren. Die Inkubation erfolgte bei 26°C für 30 min unter Schütteln bei 170 rpm. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und die Zellen wurden nach 16 h Inkubation unter Schütteln bei 26°C geerntet. Dazu wurden sie zentrifugiert (4000 x g, 20 min, 4°C) und das Pellet bei -80°C über Nacht gelagert. Anschließend wurde das Pellet in Lysepuffer (II.1.4) mit Proteaseinhibitor (1 Tablette/50 ml; Roche, Mannheim) bei 4°C resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch Ultraschall (6 Zyklen; 60 s; 200 W). Nach Zentrifugation (30.000 x g, 30 min, 4°C) der Zelltrümmer wurde der Überstand zur Vorbereitung auf die Reinigung des rekombinanten Proteins (II.2.2.2) über Nacht gegen PBS (II.1.4) dialysiert. Falls Lysepuffer ohne DTT und EDTA-freie Protease-Inhibitortabletten genutzt wurden, erfolgte die Reinigung direkt ohne vorherige Dialyse.

### **II.2.2.2 Proteinreinigung IMAC**

Die Reinigung der rekombinanten Proteine (prokaryotisch oder eukaryotisch exprimiert II.2.1.13 und II.2.2.1) erfolgte mittels des His-Tags über IMAC. Über den His-Tag binden die rekombinanten Proteine an die Nickel-Ionen einer Nitrilotriessigsäure-(NTA)-Matrix (NiNTA) und können so über das Histidinanalog Imidazol eluiert werden. Zur Reinigung von Bakterienlysat wurde die „XK 16/20 Column“, gepackt mit „Sepharose 6 Fast Flow Matrix“ (beides GE-Healthcare, Freiburg) und für die Reinigung von HEK 293T-Zellkulturüberständen die Säule „NiNTA-Superflow Cartridge 5 x 1ml“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Die rekombinanten Proteine wurden über ein „Äkta Purifier“ System (GE-Healthcare, Freiburg) gereinigt. Vor dem Auftragen wurden das Bakterienlysat bzw. der Zellkulturüberstand zentrifugiert (400 x g, 10-20 min, 4°C), über Filtration (Cellulose-acetate Filter 2-4,5 µm Porengröße) von noch vorhandenen Zelltrümmern gereinigt und anschließend mit 4-fach Inkubationspuffer (II.1.4) 1:3 versetzt. Die Flussrate bzw. Auftragsgeschwindigkeit betrug 1-6 ml/min. Nach dem kompletten Probenauftrag erfolgten Waschschriffe mit 1x-Inkubationspuffer mit einer Imidazolkonzentration von 10 mM, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Ein nachfolgender Waschschriff erfolgte in der Regel mit Inkubationspuffer (II.1.4) mit 40 mM Imidazol, um noch auf der Säule verbliebene unspezifisch gebundene Proteine abzuwaschen. Der Elutionsschriff erfolgte mit 100% Elutionspuffer (II.1.4) mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM. Die Elutionsfraktionen wurden gegen 1x PBS (scFv-ETA' und scFv-SNAP) oder

gegen Tris-Puffer (Gbr201K-scFv) über Nacht in einem Dialyseschlauch (Spectra/PorSpectrum Laboratories) dialysiert und falls nötig eingeeignet (Vivaspin 2, 10,000 MWCO PES, GE Healthcare).

### **II.2.2.3 Detektion von Proteinen über Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung**

Zur Detektion und Auftrennung von Proteinen (II.2.2.2) wurde eine denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE genutzt. In der Regel wurden 12%ige SDS-Gele verwendet, die sich aus Sammel- und Trenngel zusammensetzen (II.1.4). Vor dem Laden der Proteinproben auf das SDS-Gel wurden diese mit 5 x Protein Lade-Puffer versetzt und bei 100°C für 5 min aufgeköcht. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 150 V und einer Laufzeit von 60-70 min in Protean-II-Zellen unter Einsatz von 1 x Laufpuffer/TGS (II.1.4) aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der „Prestained Protein Marker, Broad Range“ (7-175 kDa, NEB, Frankfurt am Main) oder ein „Color Prestained Protein Standard, Broad Range“ (11-245 kDa, NEB, Frankfurt am Main) zusätzlich geladen. Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte anschließend über „Coomassie Brilliant Blue“-Färbung (II.1.4) nach 20 min Inkubation bei RT. Unspezifische Hintergrundfärbungen wurden über Waschschrte mit Wasser entfernt, bis die Proteinbanden klar sichtbar wurden. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem HP Scanjet 4890 aufgenommen und digital abgelegt.

### **II.2.2.4 Nachweis der gereinigten Proteine mittels Western Blot-Analyse**

Die Western Bot (WB)-Analyse wurde genutzt, um Proteine von Interesse (II.2.2.2) spezifisch über Ak nachzuweisen. Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das „Mini-Protean II Trans Blot-Modul“ von Bio-Rad verwendet. Dies erfolgte in Transferpuffer (II.1.4) bei 250 mA für 45-60 min bei 4°C. Nachfolgend wurde die Membran für eine Stunde bei RT oder bei 4°C über Nacht in Roti<sup>®</sup>-Block Lösung (Roth, Karlsruhe) auf einer Wippe inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran dreimal mit 1 x PBST (II.1.4) gewaschen und mit dem jeweiligen Erst-Ak für 60 min bei RT inkubiert ( $\alpha$ -his,  $\alpha$ -SNAP Ak,  $\alpha$ -Gb Ak, TC-1, alle 1:5000 verdünnt in PBS). Nach drei weiteren Waschschrten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Ak (GaM<sup>AP</sup>, 1:5000 in PBS). Die Visualisierung des Proteins erfolgte über den Umsatz des Substrates NBT/BCIP (1:100 in AP-Puffer, II.1.4) für 5 min bei RT. Die Membran wurde wie oben beschrieben gescannt.

### **II.2.2.5 Quantifizierung und Konzentrationsbestimmung gereinigter rekombinanter Proteine**

Für die densitometrische Konzentrationsbestimmung wurde zusätzlich zu den zu bestimmenden Proteinen, eine BSA-Standardreihe (200-2000 ng) auf ein SDS-Gel (II.2.2.3) aufgetragen und nach „Coomassie Brilliant Blue“- Färbung miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte mit der AIDA Image Analyzer Software (v.4.27.039). Zum anderen wurde die Konzentration der Proteine mit dem Bradford-Assay oder der BCA-Assay-Methode (Bicinchoninic acid assay) nach Herstellerangaben bestimmt. Hierfür wurde neben den Proben eine Eichreihe bekannter BSA-Konzentrationen eingesetzt und die Proteinkonzentration über die Messung der Extinktion (E) bei 630 nm in einem „ELISA-Reader“ gemessen. Die Auswertung der Daten anhand der BSA-Standardreihe erfolgte über die Microsoft Office Excel 2010 Software, wobei der Quotient aus 280/260 nm ermittelt wurde. Weiterhin wurde die Bradford ähnliche Methode mit dem Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit per Mikrowellplattenprozedur nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte analog zum Bradford-Assay.

### **II.2.2.6 Markierung von scFv-SNAP Fusionsproteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen – Kopplungsreaktion**

Die verwendeten scFv-SNAP-Fusionsproteine (II.2.2.2) wurden mit verschiedenen BG-Fluoreszenzfarbstoffen und mit BG-Biotin konjugiert, welche in Tabelle II-VIII aufgelistet sind. Alle Farbstoffe wurden in DMSO nach Herstellerangaben gelöst und die scFv-SNAP Fusionsproteine vor der Kopplung mit 1 mM DTT versetzt um die Effizienz der Kopplung zu erhöhen. In der Regel wurden die Farbstoffe oder BG-Biotin in einem 1,5 molaren Überschuss zum Protein eingesetzt und mindestens 3 h bei RT und/oder über Nacht bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Um ungebundenen Farbstoff oder BG-Biotin zu entfernen, wurden die gekoppelten Konstrukte auf verschiedene Weise, je nach Volumen, behandelt. Bei Volumina ab 500 µl wurde ungebundener Farbstoff mit Hilfe von PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben entfernt. Bei kleineren Volumina wurde mit Dialysemembranen über Nacht gegen PBS dialysiert oder Zeba<sup>™</sup> Spin Entsalzungssäulen 0,5 ml (Thermo Fisher/Life Technologies, Schwerte) verwendet. Die gekoppelten Proben wurden bei -20°C oder bei -80°C gelagert. Die Kopplungseffizienz wurde photometrisch bestimmt indem der Absorptionsgrad bei der Wellenlänge des jeweiligen Farbstoffs und der Absorptionsgrad des Proteins bei 280 nm ermittelt wurde. Die finale Kalkulation der Kopplungseffizienz erfolgte nach Herstellerangaben der Protokolle von New England Biolabs, Frankfurt am Main. Um eine erfolgreiche Kopplung darzustellen wurden die Proben auf ein

SDS-Gel geladen und vor der Coomassie-Färbung (II.2.2.3) mit dem MAESTRO™ In-vivo Imaging System CRi (Cambridge & Instrumentation, Inc., Woburn, MA, USA) unter Benutzung der folgenden Filtersets aufgenommen: blaues Filterset, 500-720 nm, gelbes Filterset, 630-850 nm, tiefrotes Filterset, 700-950 nm und dem nah-infraroten Filterset 710-760 nm - 800 nm. Die Lagerung der EGFR-spezifischen scFv-SNAP Fluoreszenzfarbstoff/Biotin-markierten Konstrukte erfolgte bei -80°C oder bei 4°C zur Kurzzeitlagerung.

### **II.2.2.7 Enterokinase (EK)-Verdau**

Ein EK-Verdau wurde zur Aktivierung des GrB durchgeführt. Zur Freisetzung von GrB verfügen die GrB-scFv-Fusionsproteine (II.2.2.2) über eine Enterokinase-Erkennungssequenz. Das GrB-Konstrukt GbR201K-scFv1711 wurde nach der Reinigung über IMAC (II.2.2.2) gegen Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl) dialysiert (Dialyseschlauch, Spectra/Por, Spectrum Laboratories) und bei -80°C gelagert. Die EK (Novagen/Merck, Darmstadt) wurde mit einer Konzentration von 0,06 U/µg Protein eingesetzt. Zusätzlich wurden 2 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben. Die Inkubation wurde bei 23°C über Nacht durchgeführt. Der Nachweis der Aktivität erfolgte über einen Substratassay (II.2.2.8). In der Regel wurden die verdauten Proteine sofort ohne Zwischenlagerung verwendet.

### **II.2.2.8 Kolorimetrischer GrB-Substratassay**

Die Aktivität der GbR201K-scFv Konstrukte nach EK-Verdau wurde über den kolorimetrischen Substratassay nachgewiesen. Dieser basiert auf dem Protokoll des Caspase-8 Assay Kits (Calbiochem/Merck, Darmstadt) in dem über die Spaltung von 200 µM des synthetischen Substrates Ac-IETD-pNA (Calbiochem/Merck, Darmstadt) die Spaltprodukte von Pro-Caspase 3 nachgeahmt werden. In 96-Well-Platten wurden 100-200 nM des GbR201K-scFv-Konstruktes und des unverdauten (E)GbR201K-scFv-Konstruktes eingesetzt. Substratassaypuffer (II.1.4) und ein GrB-Standard (GrB human recombinant, Clabiochem/Merck, Darmstadt) wurden als Kontrollen zusätzlich mitgeführt. Die Reaktion wurde in einem ELISA-Reader bei 37°C für 1 h in 2 min Intervallen als Kinetik ausgelesen. Anschließend wurde die Zeit gegen die gemessene Absorption aufgetragen, um die Änderungen in der Aktivität darzustellen.

## **II.2.3 Immunologische Methoden und Assays**

### **II.2.3.1 Durchflusszytometrische Methoden**

Alle durchflusszytometrischen Methoden wurden am BD FACSVERSE (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) oder am FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) unter Benutzung der dazugehörigen Software durchgeführt (WinMDI, v2.8 für die Messung am FACSCalibur und FACSSuite Software für die Messung am BD FACSVERSE). Für alle Experimente wurden FACS-Röhrchen (Round Bottom-tubes, BD Falcon Bioscience) verwendet

#### **II.2.3.1.1 Durchflusszytometrie zum Nachweis der Bindung der rekombinanten Proteine an die Zielzellen**

Die spezifische Bindung der rekombinanten Fusionsproteine (II.2.2.2) an die Oberfläche der Zielzellen wurde wie folgt durchflusszytometrisch nachgewiesen:  $4 \times 10^5$  Zellen/ml wurden mit 500-800 ng (70-170 nM je nach Konstrukt) scFv-ETA', scFv-SNAP oder GbR201K-scFv-Fusionsproteinen in PBS (II.1.4) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Erst-Ak (TC-1 für scFv-ETA'-Fusionsproteine oder  $\alpha$ -SNAP-Ak für scFv-SNAP-Fusionsproteine) oder dem direkt fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -His Alexa 488 für GbR201K-scFv-Fusionsproteine, für 30 min auf Eis. Die parentalen mAk Cetuximab und Panitumumab wurden ebenfalls über einen direkt markierten Ak nachgewiesen, dem GaH<sup>FITC</sup>. Alle Nachweis-Ak wurden 1:100 in 50  $\mu$ l PBS verdünnt eingesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit dem Detektions-/Zweit-Ak ebenfalls für 30 min auf Eis inkubiert (GaM<sup>PE</sup> oder GaM<sup>FITC</sup> für die scFv-ETA'-und scFv-SNAP-Konstrukte) und nach einem weiteren Waschschrift für die Messung vorbereitet. Als Kontrolle wurde bei jeder Messung eine Probe ohne Protein aber mit Sekundär/Detektions-Ak mitgemessen, um eine unspezifische Hintergrundbindung auszuschließen.

#### **II.2.3.1.2 Bestimmung der Rezeptordichte auf der Oberfläche der Zielzellen**

Die Bestimmung der Rezeptordichte der EGFR- exprimierenden Zielzellen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QifiKit (Dako, Hamburg). Die Zellen wurden wie in II.2.3.1.1 beschrieben mit den  $\alpha$ -EGFR-SNAP Konstrukten behandelt.

#### **II.2.3.1.3 Kompetitionsassays**

Kompetitionsassays wurden mit den mAk Cetuximab und Panitumumab und den EGFR-spezifischen scFvs, scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP durchgeführt. Die mAk wurden im

Voraus nach Herstellerangaben mit „EZ-Link<sup>®</sup>Hydrazide Biotins“ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) biotinyliert. Die scFv-SNAP Konstrukte wurden, wie in II.2.2.6 beschrieben, mit BG-Farbstoffen gekoppelt.

Für die Messung wurden die Zielzellen entweder mit einer konstanten oder mit steigenden Konzentrationen von nicht markiertem scFv-SNAP oder mAk als Kompetitor vor-inkubiert. Anschließend wurde eine konstante Konzentration im 5-10 fachen molaren Überschuss von biotinylierten mAk oder fluoreszenzmarkierten-scFv-SNAP Konstrukten eingesetzt. Die Inkubation erfolgte jeweils 30 min bei 4°C. Im Folgenden wurde wie in II.2.3.1.1 beschrieben verfahren. Die biotinylierten mAk wurden über das Streptavidin Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Konjugat (Life Technologies, Schwerte) detektiert, im folgenden Streptavidin-FITC genannt. Die Detektion der scFv-SNAP Fusionen erfolgte direkt über die Farbstoffmarkierung.

#### **II.2.3.1.4 Internalisierung von IT**

Die Internalisierungsrate der IT (II.2.2.1) und hCFP (II.2.2.2) wurde nach einem Protokoll von Cizeau *et al.* bestimmt [120].  $4 \times 10^5$  Zellen/ml wurden mit denselben Konzentrationen der verschiedenen IT (800 ng/100 nM) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte eine Inkubation für verschiedene Zeitpunkte (15, 30, 60, 120, 180 und 240 min) bei 37°C in Zellkulturmedium (II.1.5). Die Proben wurden nach Ablauf der jeweiligen Zeiten, bis zur Messung bei 4°C gelagert, um die Internalisierung zu stoppen. Eine Probe wurde als Referenzprobe durchgehend bei 4°C inkubiert. Zur Detektion wurden dieselben Ak wie in II.2.3.1.1 genutzt. Um das noch an der Oberfläche befindliche Protein zu messen wurde wie in II.2.3.1.1 verfahren. Als Ergebnisse wurde die prozentuale Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI; geo mean fluorescence intensity) über die Zeit dargestellt. Dabei galt der MFI-Wert der 4°C-Kontrolle bei der Berechnung als 100% Referenz-Wert, der Wert der Sekundärantikörperkontrolle wurde als 0 min Wert aufgetragen.

#### **II.2.3.1.5 Serumstabilitätstest**

Um die Serumstabilität der hCFPs zu überprüfen wurden diese mit 50% humanen Serum (Sigma, human male AB plasma) in einem Ansatz mit 500 ng Protein zu verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurde eine 100-fache Verdünnung zu den Zielzellen gegeben und eine durchflusszytometrische Messung wie in II.2.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Der MFI-Wert einer frisch angesetzten Probe wurde als 100% Bindung definiert. Die prozentuale Menge an bindendem Protein nach Inkubation im Serum wurde anhand dieser Referenz ermittelt.

### **II.2.3.2 Zellviabilitätstest/Proliferationsassay**

Die zytotoxische Aktivität und Wirkung der IT scFv1711-ETA', scFv2112-ETA' und 425(scFv)-ETA', sowie des hCFP GbR201K-scFv1711 wurden in einem Zell-Proliferationstest mittels XTT-Substratumsetzung untersucht. Die Durchführung erfolgte in angepasster Form wie bereits beschrieben [87]. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in eine 96-well Mikrotiterplatte ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungsreihen der IT und hCFP für 72 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Für die hCFP wurden zusätzlich CQ behandelte Zellen eingesetzt. Diese wurde mit 50 µM CQ versetzt und die Inkubation erfolgte wie beschrieben. Unbehandelte Zellen, die jeweiligen scFv-SNAP Konstrukte, mock-ETA' und GbR201K-mock Konstrukte, sowie die parentalen mAk Cetuximab und Panitumumab wurden als Kontrollen verwendet und äquivalent behandelt. Zum Auslesen des Zellviabilitätstests wurde die Substratumsetzung nach der Zugabe von 50 µl XTT/phenanzine methosulfate (100:1, Serva und Sigma, Steinheim) in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte gemessen. Die Platten wurden 2-4 h, je nach Zelllinie, bei 37°C inkubiert. Der Absorptionsgrad wurde bei 450 nm und 630 nm Referenzwellenlänge in einem Epoch Mikroplatten Spektrophotometer (Biotek, Bad Friedrichshall) gemessen. Alle Experimente wurden mindestens drei-bis viermal in Duplikaten, Triplikaten oder in Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Konzentration welche notwendig war um eine 50%ige Herabsetzung der Proteinsynthese in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen (IC<sub>50</sub>) zu erreichen, wurde über die Hill-Gleichung mit der GraphPad Prism v5 Software bestimmt. Mit dieser Software wurde auch das Konfidenzintervall (95% CI, confidence interval) der Werte bestimmt.

### **II.2.3.3 Apoptose-Assay mittels AnnexinV-Bindung**

Mit dem AnnexinV (AV)-Apoptose Assay kann der Nachweis eines pro-apoptotischen Effektes der IT (II.2.2.1) und hCFP (II.2.2.2) bestimmt werden. Beim programmierten Zelltod, der Apoptose, wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite umgelagert und kann über die spezifische kalziumabhängige Bindung von AV an Phosphatidylserin nachgewiesen werden. In diesem Fall können somit die apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch über die Markierung mit AV-GFP detektiert werden [90]. Dazu wurden  $4 \times 10^5 - 7,5 \times 10^4$  Zellen/ml in 300 µl Medium in 24-well Platten ausgesät und mit definierten Konzentration von IT (80 nM) oder hCFP (100-300 nM, 300 nM entspricht 5µg/ml) für 48 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Als Negativ-Kontrollen dienten die parentalen mAk, mock-ETA' oder GbR201K-mock, PBS oder

Tris-Puffer, sowie die EGFR-Zelllinie U937 und als Positivkontrolle Camptothecin oder Zeocin. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig mittels Trypsin- oder Accutasebehandlung abgelöst und zusammen mit dem Überstand in FACS-Röhrchen gegeben und mit 1 x Annexinpuffer (II.1.4) in einer Rotina 420 R (Hettich Lab Technology, Tuttlingen) Zentrifuge gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 450 µl AV-GFP und 50 µl 10 x Annexinpuffer für 15-30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 1 x Annexinpuffer mit dem Zusatz von 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) versetzt und durchflusszytometrisch mit dem BD FACSVVERSE-Gerät analysiert. Die Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal in Duplikaten durchgeführt. Eine Signifikanzbestimmung (two-tailed unpaired Student's *t* test) erfolgte über GaphPad Prism v5 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

#### **II.2.3.4 Internalisierungsstudien über Konfokalmikroskopie und den Opera®**

##### **Hochdurchsatz-Analysator**

Um die Internalisierung und Bindung von scFv2112-, scFv1711- und 425(scFv)-SNAP gekoppelt an BG-488 (II.2.2.6) nachzuweisen, wurden diese über Konfokalmikroskopie oder Hochdurchsatzmessungen analysiert. Für die Messung über Konfokalmikroskopie wurden die scFv-SNAP-Sonden in einer Konzentration von 1 µg in 200 µl (100 nM) zu den Zielzellen, welche mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml am Tag zuvor in 8-well „chamber slides“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ausgesät worden, zugegeben. Die Inkubation der „chamber slides“ erfolgte bei 37°C für 10-120 min oder bei 4°C, je nach Ansatz. Anschließend wurde das Medium in den „chamber slides“ durch frisches Medium ersetzt. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder DRAQ5™ (Biostatus, Leicestershire, UK) für die Konfokalmikroskopie oder über 4',6-diamidino-2-phenylindole, (DAPI; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für die Hochdurchsatzmessung gegengefärbt. Die Internalisierung in den „chamber slides“ wurde direkt mit dem LEICA TCS SP8 Konfokalmikroskop mikroskopiert. Für die Hochdurchsatzmessung am „PerkinElmer Opera® automated image acquisition system“ wurden die Zellen in schwarze 96-well Zellkulturmikrotiterplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) ausplattiert, mit derselben Konzentration an scFv-SNAP wie oben inkubiert und mit der zugehörigen „A Capella Software“ aufgenommen und vermessen. Die Hochdurchsatzmessung ermöglicht eine vollautomatische Zellanalyse in subzellulärer Auflösung.



### **II.2.3.5 Affinitätsbestimmung über Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)**

Für die Affinitätsbestimmung der scFv-SNAP Konstrukte und der parentalen mAk (Cetuximab und Panitumumab) wurde das Biacore T200 Instrument (Biacore, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Alle Messungen erfolgten in HBS-EP Puffer als Laufpuffer (II.1.4) bei 10°C. Die Messdaten wurden über die Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) ausgewertet und bearbeitet. Für die mAk wurde der CM5-S-Series Sensor Chip funktionalisiert mit Protein-A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), gemäß Standardeinstellungen verwendet. Als Antigen wurde EGFR-his genutzt, welches von Magdalena Bialon am Fraunhofer IME aus der mRNA von A431 Zellen hergestellt und in HEK 293T-Zellen exprimiert wurde. Verschiedene Konzentrationen von EGFR-his (120 nM, 1:2 seriell verdünnt bis zu 0,94 nM) wurden bei einer Flussrate von 30 µl/min für 150 s injiziert. Die Dissoziation folgte für 480 s. Zwischen den Messungen wurde die Oberfläche des CM5-S-Series Sensor Chip mit 30 mM HCl regeneriert. Für die Messung der scFv-SNAP Konstrukte (scFv1711-SNAP und scFv2112-SNAP) wurde das Biotin CAPture Kit (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Dazu wurden die scFv-SNAP Konstrukte zuvor mit BG-Biotin gekoppelt (II.2.2.6). Das Biotin CAPture Kit besteht aus einem Sensor Chip CAP, der Biotin-CAPture-Reagenz und zwei Regenerationslösungen. Der Sensor Chip ist aus einer carboxymethylierten Dextran-Matrix aufgebaut, auf der ein Einzelstrang-DNA Moleküle vorimmobilisiert wurde. Das Biotin-CAPture-Reagenz besteht aus Streptavidin konjugiert mit dem komplementären Einzelstrang-DNA-Molekül. Bei der Kopplungsprozedur wird zuerst das Biotin CAPture-Reagenz injiziert und auf der Oberfläche des Sensor-Chips hybridisiert. Anschließend wird das biotinylierte scFv-SNAP-Fusionsprotein injiziert und gefangen. Abschließend wird das Antigen EGFR-his injiziert. Dissoziations- und Assoziations-Flussraten sowie die Konzentrationen des Antigens EGFR-his wurden wie bei der Messung der mAk über den Protein-A konjugierten Chip beibehalten.

## **II.2.4 Humanes Patientenmaterial**

### **II.2.4.1 Ex vivo Bindung auf humanen Paraffinschnitten**

FFPE-Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung wie beschrieben behandelt [5, 121]. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte mit einem speziellen Stift, dem Dako-pen (Dako, Hamburg), eingekreist. Die Schnitte wurden für eine Stunde in Blockierungslösung (PBS + 1% (v/v) Ziegenserum) inkubiert und danach abgeklopft. Anschließend wurden die Schnitte mit den IT (II.2.2.1), den hCFP (II.2.2.2) oder den parentalen mAk (für alle 1 µg in 200µl PBS)

über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei Waschriffe mit PBS für jeweils 5 min. Die Schnitte markiert mit den IT wurden nun mit dem Primär-Ak TC-1 (1:40 in Blockierungslösung) für bis zu 12 h bei 16°C inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschriff mit PBS. Hier folgte ein zweiter Inkubationsschritt mit einem GaM<sup>AP</sup>-Ak (1:50 in Blockierungslösung) bei 4°C über Nacht. Die hCFP wurden mit einem  $\alpha$ -his-Ak als Primär-Ak inkubiert. Als Sekundär-Ak diente ebenfalls der GaM<sup>AP</sup>. Die parentalen mAk wurden mit dem direkt markierten GaH<sup>AP</sup> (1:50 in Blockierungslösung) ebenfalls über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschriff mit PBS. Die AP-Aktivität wurde über das Substrat Naphtol AS-Bi Phosphat (Natriumsalz 50 mg/100 ml; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und New Fuchsin (gelöst in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5; Merck, Darmstadt) als Chromogen nachgewiesen. Die endogene AP-Aktivität wurde durch die Zugabe von 0,35 mg/ml Levamisole (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inhibiert. Schließlich wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (H&E; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gegengefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem Leica DMR-HC Licht-Mikroskop und der dazugehörigen Software Leica QWin (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar).

#### **II.2.4.2 Subkutanes Mausmodell**

Beim subkutanen Mausmodell (II.1.11) wurde zwölf Tieren  $1 \times 10^7$  C4-2-Zellen/ml (Katushka-transfiziert II.2.1.14) in beide Flanken injiziert, zwölf Tieren  $5 \times 10^6$  Zellen/ml PC3-Zellen in beide Hinterläufe und fünf Tieren  $6 \times 10^7$  L540-Zellen/ml gelöst in BD-Matrigel<sup>TM</sup>-Matrix (BD Bioscience, Heidelberg) in je einen Hinterlauf injiziert. Die Tiere wurden fortwährend beobachtet und nach 14-16 Tagen Tumorwachstum, je nach Zelllinie, wurde mit der Injektion der Bildgebungssonden (scFv-SNAP Fusionsproteine) begonnen [68]. Die Bildgebungssonden (2 nmol) wurden intravenös retro-orbital in den Sinus plexus (*Plexus caroticus internus*) des rechten Auges injiziert. Die Injektion der Sonden erfolgte nur in Versuchstiere mit sichtbarem Tumor:

Gruppe 1 - PC-3, Tumordinjektion:

- 6 Versuchstiere (von 12), Injektion von scFv2112-SNAP BG-800, rechtes Auge

Gruppe 2 - L540cy, Tumordinjektion:

- 3 Versuchstiere (von 5), Injektion scFv2112-SNAP BG-747, rechtes Auge

Gruppe 3 - C4-2 Katushka, Tumordinjektion:

- kein Tier hat einen sichtbaren Tumor entwickelt

Die Messzeitpunkte nach Injektion der Bildgebungssonden waren 30 min, 10 h, 24 h, 36 h und 72 h. Danach oder früher, je nach Tumorgröße, wurden die Versuchstiere geopfert, Organe und Tumore in PBS gewaschen und in Einbettmedium (Jung Tissue Freezing medium, Leica Biosystems, Nussloch GmbH) gegeben und schließlich in flüssigem Stickstoff für die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  vorbereitet. PC-3 Tumore wurde re-kultiviert und die angewachsene daraus entstandene Zelllinie kryokonserviert.

Um die Akkumulation und optische Signalstärke der Bildgebungssonde scFv2112-SNAP BG-800 an den subkutanen Tumoren darzustellen und zu messen wurde das MAESTRO™ *In-vivo* Imaging System CRi (Cambridge & Instrumentation, Inc., Woburn, MA, USA) genutzt, im folgenden Maestro-Gerät genannt. Für die Aufnahmen der Bildgebungssonde scFv2112-SNAP BG-800 wurde das Nah-infrarot-Filterset mit 710-760 nm (Anregung) und 800 nm (longpass, Emission) genutzt und für BG-747 das tiefrote Filterset 616-661 nm (Anregung) und 700 nm (longpass, Emission). Für ein mögliches Katushka-Signal sollte das gelbe Filterset mit 575-605 nm (Anregung) und 645 nm (longpass, Emission) eingesetzt werden. Die Messungen erfolgten entsprechend der empfohlenen Einstellungen und Arbeitsschritte des Maestro-Gerätes CRI Inc. Die Cube-Aufnahmen (von Computersoftware verarbeitete zusammengesetzte Bilder im jeweiligen Wellenlängenbereich in 10 nm Schritten) wurde mit einer Belichtungszeit von 1000 und 5000 ms aufgenommen. Zu jeder Aufnahme wurde jeweils ein Weißlichtbild aufgenommen. Die Bildbearbeitung und Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgte nach Bedienungsanleitung mit der Maestro Software 2.6.0.

### **II.2.5 Statistische Analysen und Auswertungen**

Statistische Auswertungen erfolgten mit dem Programm Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) und Microsoft Excel 2010. Es wurde sowohl die Standardabweichung ( $\pm$  SD) oder der Fehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) berechnet. Für die statistischen Auswertungen wurde der studentische *t*-Test verwendet ( $p^* \leq 0,05$ ,  $p^{**} \leq 0,01$  und  $p^{***} \leq 0,001$ , Änderungen sind einzeln aufgeführt).

### **II.2.6 Bildbearbeitung**

Die Bildbearbeitung der Konfokalaufnahmen und die der Opera®-Messung erfolgte mit der Software Image J 1,49j (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Mit dieser Software wurden die einzelnen Bilder von Zellkern und Zelle der Opera®-Messung

übereinandergelegt und wie auch bei der Konfokalmikroskopie die Maßstabskala nach Eingabe der Meta-Daten der jeweiligen Aufnahme eingefügt.

Die Aufnahmen der Gewebeschnitte wurden mit Adobe Photoshop CS5.1 Extended Software bearbeitet. Hier wurde zur besseren Darstellung die rote Farbe (positive Färbung) markiert, ausgewählt und der Hintergrund abgezogen.

### III. Ergebnisse

#### III.1 Der EGFR als Zielantigen für solide Tumore –

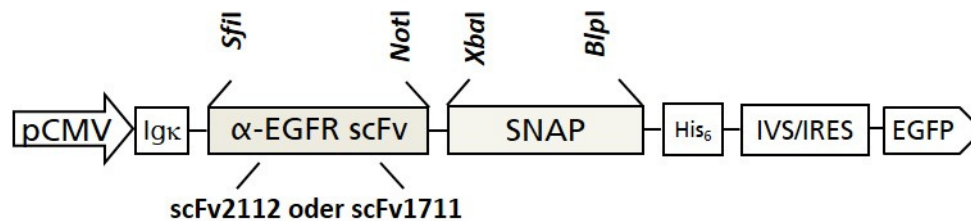
##### Funktionalitätstest der gegen den EGFR gerichteten scFvs

Der EGFR welcher auf unterschiedlichen, schwer zu therapierenden, soliden Tumoren hoch exprimiert wird wurde als Zielantigen für die Entwicklung neuer Ak-abgeleiteter Therapieansätze ausgewählt. Von den beiden bereits in der Klinik eingesetzten EGFR-spezifischen mAk Cetuximab und Panitumumab wurden die  $V_H$  - und  $V_L$ -Sequenzen identifiziert, generiert und in vorhandene Vektorsysteme kloniert. So wurden sowohl diagnostisch, als auch therapeutisch relevante scFv-Fusionsproteine generiert, die im Folgenden auf ihre Eigenschaften getestet wurden.

##### III.1.1 Herstellung und Charakterisierung der neuen scFv-SNAP-Fusionsproteine

Die von den mAk abgeleiteten Ak-Fragmente (scFvs) wurden wie in II.2.1.11 beschrieben hergestellt. Das vom chimären Cetuximab abgeleitete Ak-Fragment wurde als scFv2112 bezeichnet und die geeigneten Schnittstellen *SfiI* und *NotI* über PCR angefügt (II.2.1.2). Das als scFv1711 bezeichnete Ak-Fragment wurde vom humanen Panitumumab abgeleitet und die im Patent fehlenden „framework“-Regionen wurden, adaptiert an publizierte Keimbahnregionen, eingefügt. Die benötigten Schnittstellen am 3'-und 5' Ende wurden über Synthetisierung ergänzt (II.2.1.11).

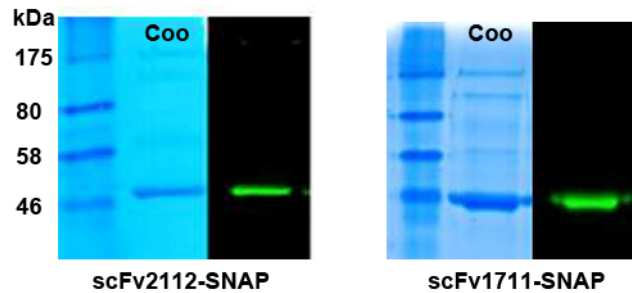
Um EGFR-spezifische scFv-SNAP Fusionen zu erhalten wurde ein bereits vorhandener Ausgangsvektor genutzt und die Liganden scFv2112 oder scFv1711 über *SfiI/NotI*-Restriktion eingefügt, sodass pMS-scFv2112-SNAP und pMS-scFv1711-SNAP als Konstrukte zur Verfügung standen (Abbildung III-1).



**Abbildung III-1: Expressionsvektor von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP**

Die Kodierungssequenzen von scFv2112 oder scFv1711 wurden über *SfiI/NotI*-Restriktion in den pMS-SNAP-Vektor eingefügt. Über die im Vektor vorhandene Ig $\kappa$ -Sequenz werden die Fusionsproteine nach Transfektion in den Zellkulturüberstand sekretiert (II.2.1.13). Der C-terminale Histidin-Tag dient zur Reinigung und Detektion der Fusionsproteine. Über die eGFP-Fluoreszenz erfolgte eine visuelle Selektion auf erfolgreich transfizierte Zellen. Abkürzungen: pCMV: Cytomegalievirus-Promotor, IVS/IRES: synthetisches Intron und interne ribosomale Eintrittsstelle zur Überprüfung der Transkription, EGFP: „enhanced green fluorescent protein“/verstärktes grün fluoreszierendes Protein.

Über die SNAP-Tag Technologie kann sowohl Bindungs- als auch Internalisierungsverhalten der Fusionsproteine und somit ihre Verwendbarkeit für diagnostische und potentielle therapeutische Ansätze geprüft werden. Hierfür wurden scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP in transient transfizierten HEK 293T-Zellen exprimiert (II.2.1.13). Nach der Anreicherung der Proteine wurden diese aus den gesammelten Zellkulturüberständen über den His<sub>6</sub>-Tag mittels IMAC gereinigt (II.2.2.2). Die Proteinausbeute lag für scFv2112-SNAP bei etwa 5 mg/L Zellkulturüberstand und für scFv1711-SNAP bei bis zu 10 mg/L Zellkulturüberstand, je nach Reinigung. Die Reinheit lag jeweils zwischen 70% und 90%. Beide Parameter wurden densitometrisch bestimmt (II.2.2.5). Die Proteine der jeweiligen Elutionsfraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Gesamtproteine über Coomassie-Färbung visualisiert (II.2.2.3). ScFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP wurden mit BG-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert (II.2.2.6) und die erfolgreiche Kopplungsreaktion durch Aufnahme im Maestro-Gerät nachgewiesen. Dabei entsprach die beobachtete Laufhöhe der beiden Fusionsproteine dem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 48 kDa. Abbildung III-2 zeigt neben der Coomassie-Färbung die beispielhafte Kopplung beider Konstrukte an BG-488.

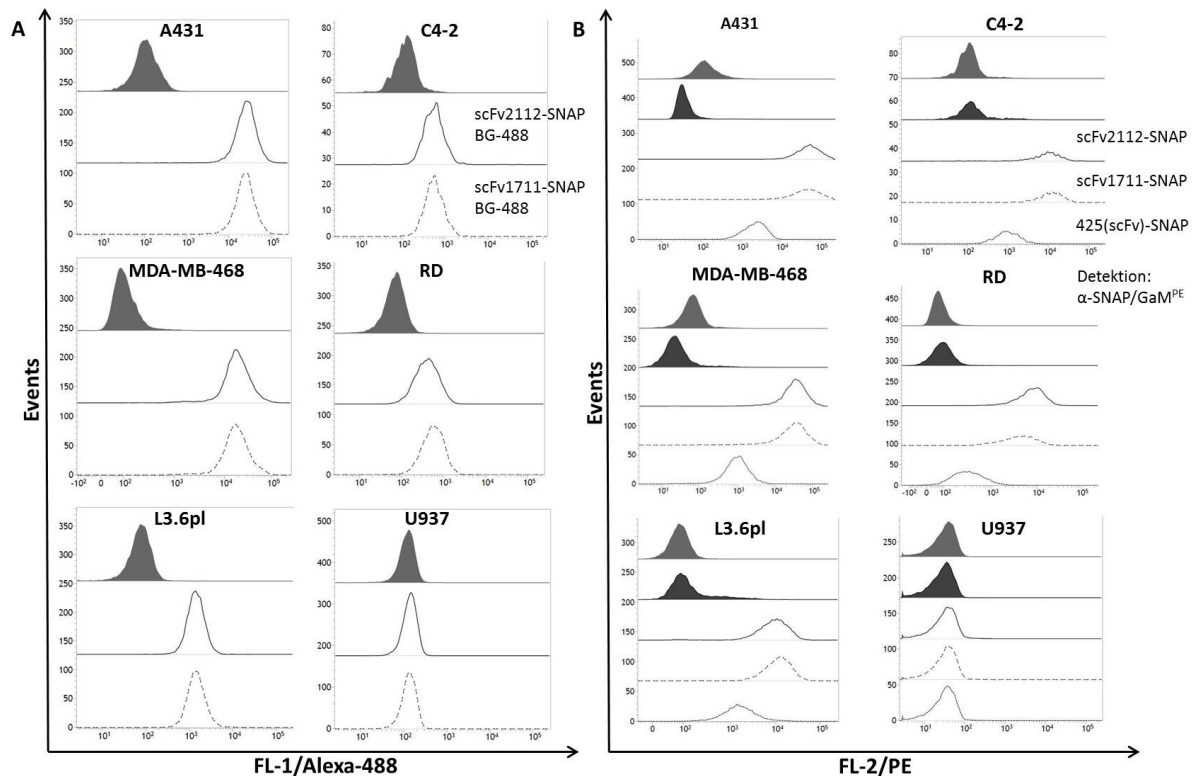


**Abbildung III-2: Reinigung von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP und Markierung mit BG-Fluorophoren**

Der Nachweis der Proteine und ihrer Reinheit nach Reinigung erfolgte über SDS-PAGE und „Coomassie Brilliant Blue“-Färbung (II.2.2.3). Dazu wurden je 500 ng rekombinantes Protein geladen. Die Kopplung an BG-488 wurde vor Coomassie-Färbung über Visualisierung mittels des Maestro-Bildgebungssystem und der dazugehörigen Software nachgewiesen. Unter Einsatz des blauen Filtersets (500-720 nm) wurden die markierten scFv2112-SNAP-BG-488 und scFv1711-SNAP-BG-488 Sonden mittels einer grünen Bande sichtbar gemacht. Die kalkulierte Größe von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP liegt bei etwa 48 kDa. Illustration abgewandelt nach [121].

### III.1.2 Spezifische Bindung an die Zielzellen

Die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Konstrukte scFv2112-SNAP-BG-488 und scFv1711-SNAP-BG-488 wurden auch für den direkten Nachweis der spezifischen Bindungsaktivität genutzt (III.1.2). Die Bindungsaktivität der Proteine wurde sowohl direkt über den kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (Abbildung III-3, A), als auch indirekt über die Detektion mit dem SNAP-Tag spezifischen Ak  $\alpha$ -SNAP (Abbildung III-3, B) nachgewiesen. Als Referenz wurde in einigen Experimenten das bereits etablierte EGFR-spezifische Konstrukt 425(scFv)-SNAP eingesetzt [68, 103]. Diese durchflusszytometrischen Messungen bestätigen die spezifische Bindung von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP auf folgenden EGFR-exprimierenden Zelllinien verschiedener Tumorentitäten: A431, MDA-MB-468, L3.6pl, C4-2 und RD (II.1.9). Fluoreszenzsignale der BG-488-Farbstoff gekoppelten Fusionsproteine und der nicht gekoppelten Fusionsproteine wurden auf allen Zielzelllinien dargestellt, wohingegen keine Bindungsaktivität auf der EGFR<sup>-</sup> Zelllinie U937 detektiert wurde.



**Abbildung III-3: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsaktivität der scFv2112-SNAP, scFv1711-SNAP und 425(scFv)-SNAP Fusionsproteine**

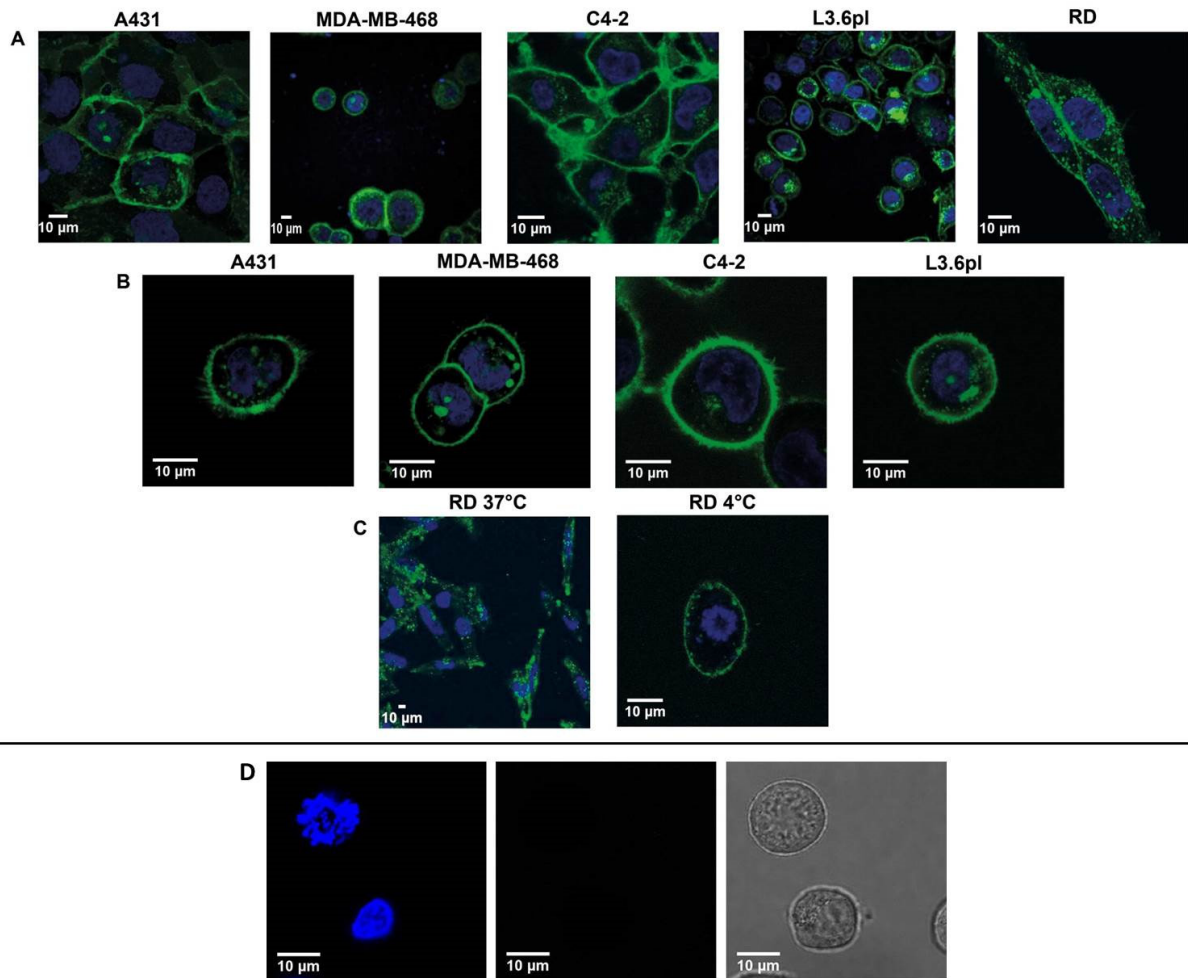
Die spezifische Bindungsaktivität der scFv-SNAP Fusionsproteine (II.2.2.2) wurde über Durchflusszytometrie nachgewiesen (II.2.3.1.1). Abbildung A zeigt die Bindung von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP über die Fluoreszenzmarkierung mit BG-488 im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1/Alexa-488). Die ausgefüllten grauen Kurven demonstrieren die unbehandelten Zellen, die schwarze Kurve zeigt die Bindung von scFv2112-SNAP BG-488 und die gestrichelte Kurve demonstriert die Bindung von scFv1711-SNAP BG-488. In Abbildung B ist die Bindung der Konstrukte über die indirekte Detektion mit  $\alpha$ -SNAP/G $\alpha$ M<sup>PE</sup> im Fluoreszenzkanal 2 (FL-2/PE) dargestellt. Die ausgefüllte graue Kurve zeigt die unbehandelten Zellen, die ausgefüllte schwarze Kurve die Hintergrundkontrolle (Zellen inkubiert mit Detektions-Ak). Die schwarze Kurve zeigt die spezifische Bindung von scFv2112-SNAP, die schwarz gestrichelte die von scFv1711-SNAP und die graue Kurve die von 425(scFv)-SNAP.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) war auf den mit scFv2112-SNAP-BG-488 oder scFv1711-SNAP-BG-488 inkubierten Zielzellen 10-200 mal höher im Vergleich zur Negativzelllinie oder der Hintergrundkontrolle. Bei der Bindungsanalyse der scFv-SNAP Fusionsproteine über die Detektion mit den beschriebenen Nachweis-Ak ( $\alpha$ -SNAP und G $\alpha$ M<sup>PE</sup>), wurden höhere MFI-Werte gemessen. Für scFv2112-SNAP 100-500 mal höher im Vergleich zur Negativzelllinie oder der Hintergrundkontrolle, für scFv1711-SNAP 50-500 mal höher und für 425(scFv)-SNAP 10-80 mal höher.



### III.1.3 Internalisierungsstudien

Nachdem die erfolgreiche Kopplung an BG-modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe und die spezifische Bindung von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP nachgewiesen werden konnte (III.1.2), wurde das Internalisierungsverhalten beider Konstrukte untersucht. Hierzu wurden beide scFv-SNAP Fusionsproteine mit BG-488 markiert und mit unterschiedlichen EGFR<sup>+</sup> Zelllinien inkubiert (II.2.3.4). Die über Konfokalmikroskopie oder Hochdurchsatzmessungen (II.2.3.4) erstellten Internalisierungsaufnahmen zeigten für scFv2112-SNAP (Abbildung III-4, A) und scFv1711-SNAP (Abbildung III-4, B) nach 60 min Inkubation bei 37°C, Internalisierung in die Zielzellen. Die Internalisierung für das Referenzkonstrukt 425(scFv)-SNAP wurde nach 80 min Inkubation bei 37°C nachgewiesen (Abbildung III-4, C). Es wurde keine Internalisierung in die EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937 detektiert. Dies ist exemplarisch für scFv2112-SNAP dargestellt (Abbildung III-4, D). Ebenso wurde keine Internalisierung nach Inkubation bei 4°C gemessen, beispielhaft für 425(scFv)-SNAP auf RD Zellen in Abbildung III-4, C dargestellt. Die schnellste Internalisierungsrate aller scFv-SNAP Fusionsproteine wurde mit RD-Zellen beobachtet, da hier nach 60 min kaum noch Membranfärbung sichtbar war.



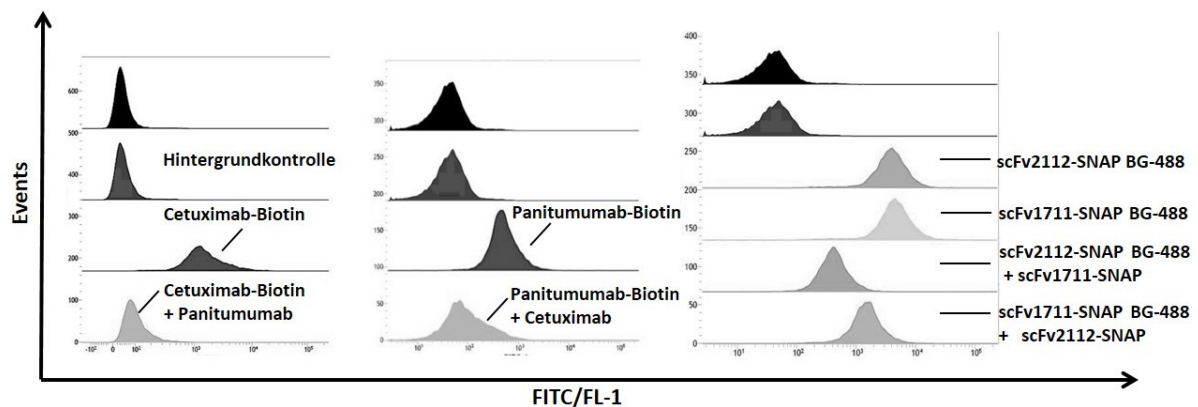
**Abbildung III-4: Internalisierungsverhalten von scFv2112-SNAP, scFv1711-SNAP und 425(scFv)-SNAP**

Die Internalisierung von scFv2112-SNAP, scFv1711-SNAP und 425(scFv)-SNAP markiert mit BG-488 (II.2.2.6) in verschiedene EGFR<sup>+</sup> Zelllinien (II.1.9) wurde entweder über Konfokalmikroskopie oder Hochdurchsatzmessungen aufgenommen (II.2.3.4). Die Zellkerne (in blau) wurden über Gegenfärbung mit Hoechst 33342 oder DAPI visualisiert. Die Internalisierung von scFv2112-SNAP (**A**) und scFv1711-SNAP (**B**) wurde nach 60 min Inkubation bei 37°C aufgenommen. Für das als Kontrollkonstrukt eingesetzte 425(scFv)-SNAP Fusionsprotein, wurde die Internalisierung nach 80 min bei 37°C und nach 30 min bei 4°C (Nicht-Internalisierungskontrolle) gemessen (**C**). In Abbildung **D** ist die Negativzelllinie U937 inkubiert mit scFv2112-SNAP dargestellt (Maßstabskala: 10 µm). Illustration abgewandelt nach [121].

### III.1.4 Wettbewerbsverhalten und Affinitätsbestimmung im Vergleich zu den Volllängen-Ak

#### III.1.4.1 Wettbewerbsverhalten der scFvs und parentalen mAk untereinander

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der neuen scFvs wurden sowohl das Wettbewerbsverhalten als auch die Affinitäten im Vergleich zu den parentalen Volllängen-Ak bestimmt. Cetuximab und Panitumumab binden überlappende oder benachbarte Epitope, welche aber nicht identisch sind [9, 122]. Das Wettbewerbsverhalten wurde wie in II.2.3.1.3 beschrieben über durchflusszytometrische Messungen, beispielhaft auf MDA-MB-468 Zellen, untersucht. Die biotinylierten parentalen mAk wurden über Streptavidin-FITC detektiert. Die Bindung der scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP Fusionsproteine wurde direkt über die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Cetuximab/Panitumumab und scFv2112-SNAP/scFv1711-SNAP, ebenso in umgekehrter Reihenfolge, inhibierten sich gegenseitig. Bei einer Präinkubation mit Cetuximab bzw. scFv2112-SNAP als Kompetitor wurde ein schwächerer Effekt beobachtet (Abbildung III-5).

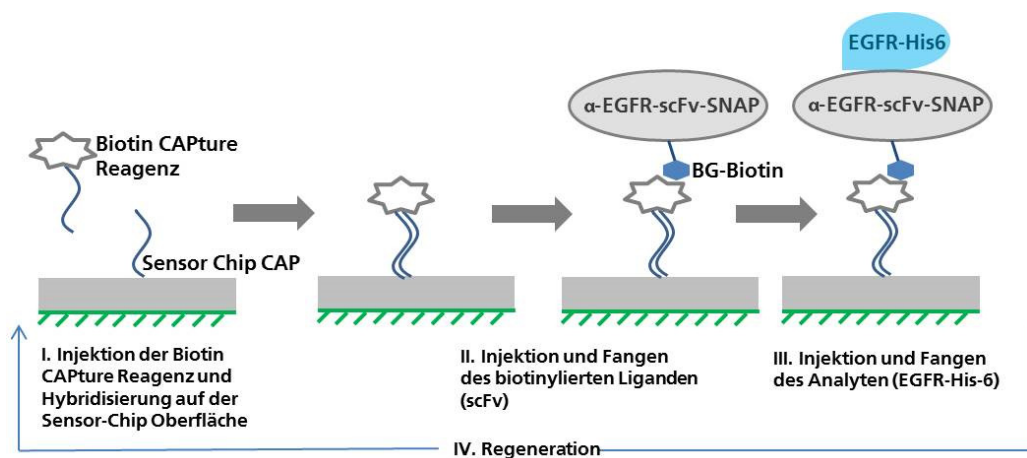


**Abbildung III-5: Bestimmung des Wettbewerbsverhaltens der Volllängen-Ak und der abgeleiteten scFvs**

MDA-MB-468 Zellen wurden zur Wettbewerbsmessung wie in II.2.3.1.3 beschrieben behandelt. Die Bindung wurde jeweils mit ungefärbtem Ak oder scFv im Überschuss kompetitiert. Die biotinylierten mAk (dunkelgrau, linkes und mittleres Histogramm) oder Farbstoff-markierten scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP-Konstrukte (hellgrau, rechtes Histogramm) wurden jeweils gesondert bei den Messungen mitgetestet, um unvollständige Biotin-und/oder Fluoreszenzfarbstoffkopplungen auszuschließen und als Referenz für die nicht kompetitive Bindung. Gemessen wurde im Fluoreszenzkanal FL-1.

### III.1.4.2 Bestimmung der Affinität der scFvs und der parentalen mAk

Die Avidität/Gesamtbindungsstärke nimmt ab wenn von einem parentalen Ak das scFv-Format generiert wird. Ebenso ist bekannt, dass sich die Affinität von scFvs als Teil von Fusionsproteinen aufgrund einer möglichen Konformationsänderung verschlechtern kann. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Messung über das „Biotin CAPture Kit“ etabliert, um die Affinität von scFv-SNAP Fusionsproteinen direkt über SPR-Messungen mit dem Biacore T200 Instrument darzustellen (II.2.3.5). Hierfür wurden die scFv-SNAP Fusionsproteine mit BG-Biotin markiert (II.2.2.6). Die Vorgehensweise unter Benutzung des „Biotin CAPture Kits“ und der Versuchsablauf sind in Abbildung III-6 schematisch dargestellt und in II.2.3.5 beschrieben. Als Antigen wurde die extrazelluläre Domäne des EGFR (EGFR-His<sub>6</sub>) verwendet. Die Oberfläche der Sensor Chips trägt einzelsträngige DNA welche kovalent an eine Dextran-Matrix angefügt ist. Die „Biotin CAPture“-Reagenz beinhaltet Streptavidin konjugiert mit dem komplementären ss-DNA-Molekül. Der Prozess besteht aus Injektion und Hybridisierung der Reagenz auf der Sensorchip-Oberfläche, der Injektion und dem Fangen des biotinylierten scFv-SNAP Konstruktes und der nachfolgenden Injektion des Analyten/Antigens (Abbildung III-6).

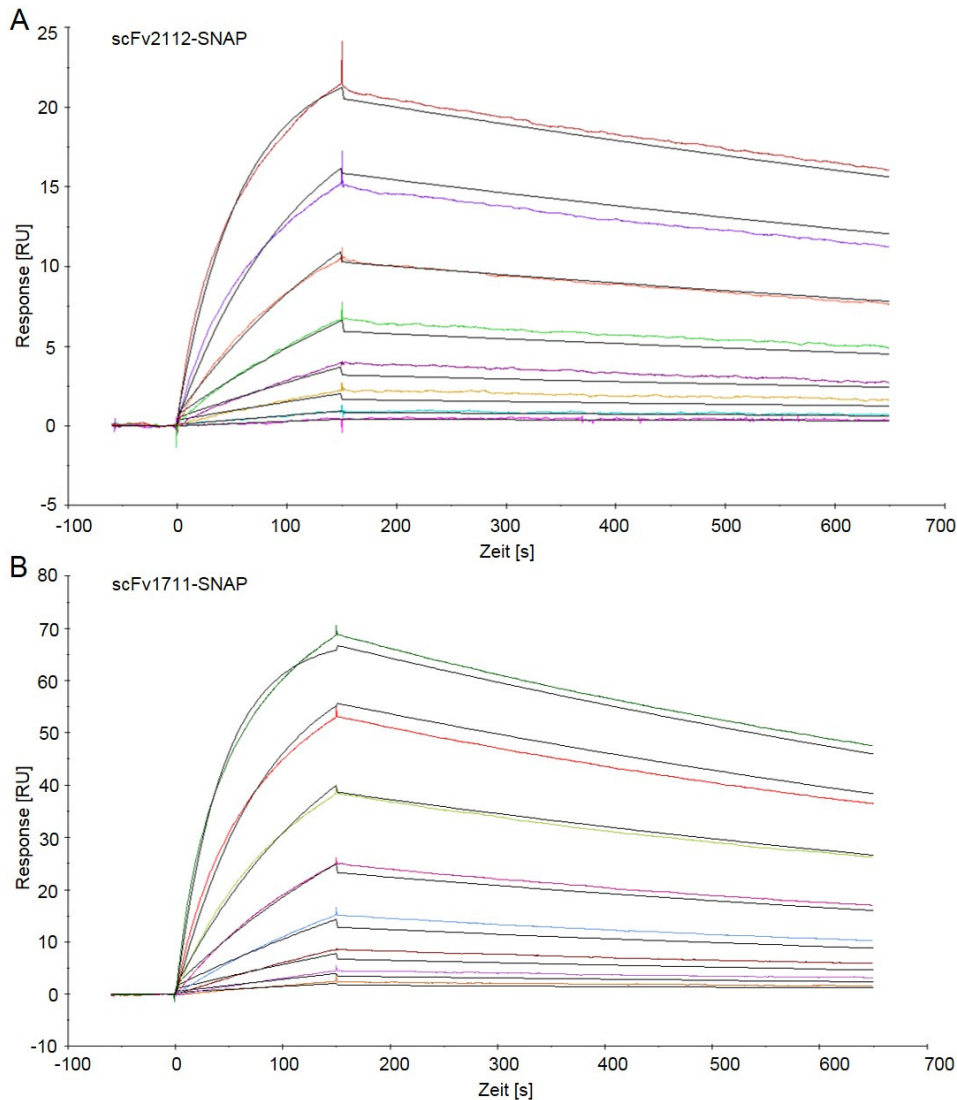


**Abbildung III-6: Schematische Darstellung der Affinitätsbestimmung der abgeleiteten scFv-SNAP Fusionsproteine über das „Biotin CAPture Kit“**

Der Versuchsaufbau für die Messung der Affinität der scFv-SNAP Fusionsproteine über SPR mit dem Biotin CAPture Kit (II.2.3.5) ist graphisch dargestellt. Das System ist regenerierbar. Das Biotin CAPture Reagenz besteht aus Streptavidin konjugiert an ss-DNA komplementär zu einzelsträngiger DNA auf der Chip-Oberfläche.

Das Messsignal entsteht aus der Massezunahme nach Bindung des Antigens an das immobilisierte Ak-Fragment. Die Signalstärke ist direkt proportional zur gebundenen Masse

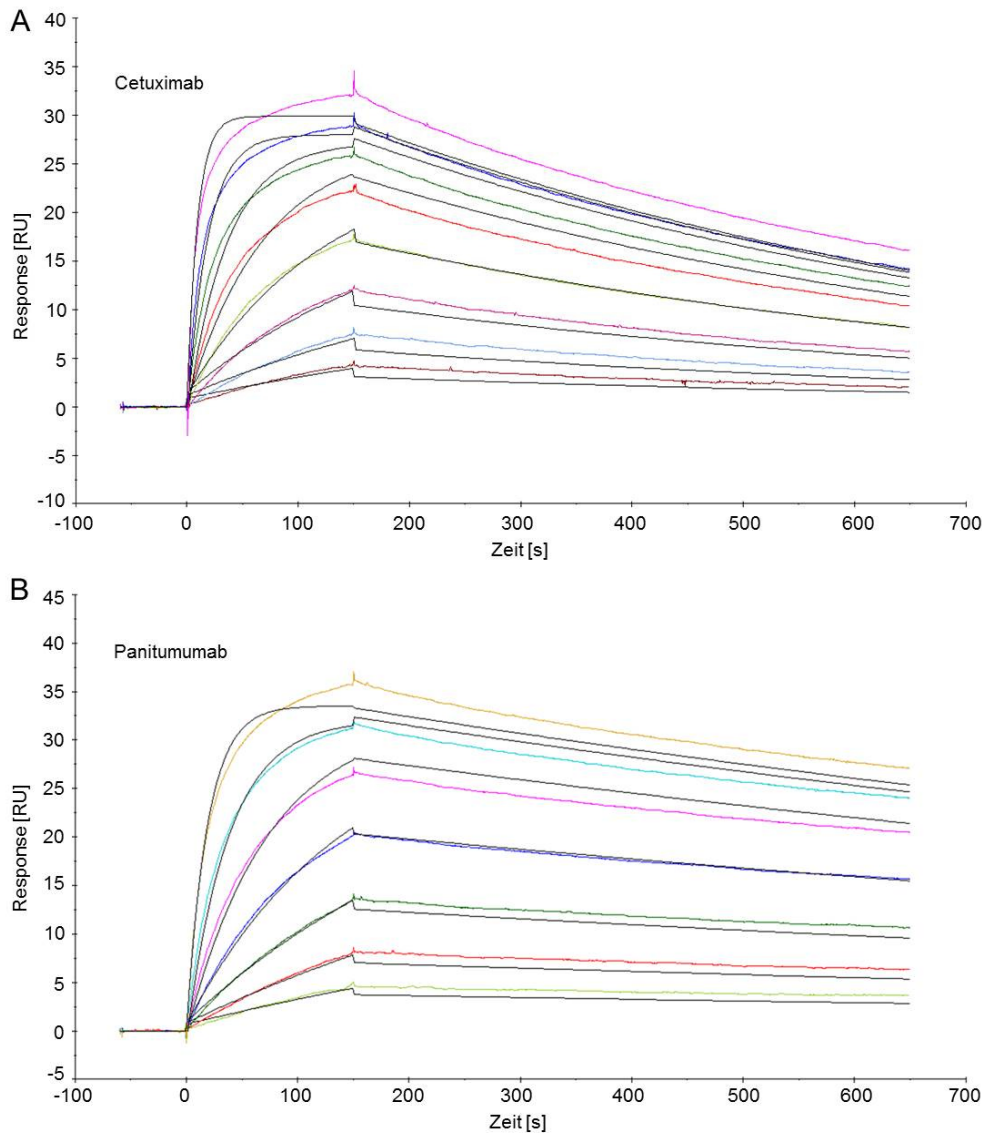
auf der Sensoroberfläche und wird als Response Unit (RU) angegeben und zeitabhängig dargestellt (Abbildung III-7). Aus den erhaltenen Bindungskinetiken können die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ( $K_D$ ) ermittelt werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle III-I aufgelistet. Für scFv2112-SNAP wurde ein  $K_D$ -Wert von 3,95 nM und für scFv1711-SNAP ein  $K_D$ -Wert von 3,99 nM bestimmt (Tabelle III-I).



**Abbildung III-7: SPR-Sensogramm von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP – Biotin CAPture Kit**

Das Sensogramm der kinetischen Messung von scFv2112-SNAP ist in **A** dargestellt und von scFv1711-SNAP in **B** (II.2.3.5). Die farbigen Kurven demonstrieren die verschiedenen Konzentrationen von eingesetztem Analyten (EGFR-His<sub>6</sub>), mit einer Startkonzentration von 120 nM, 1:2 seriell verdünnt bis zu einer Konzentration von 0,94 nM. Die Messung wurde als zeitabhängige Änderung der Signalintensität, die als Response Unit (RU) angegeben wurde, dargestellt. Die theoretischen Kurvenverläufe des mathematischen Fittings sind in schwarz zusätzlich zu den gemessenen farbigen Kurven dargestellt (die untersten Kurven zeigen die niedrigste Konzentration). Alle Messungen erfolgten bei einer Flussrate von 30 µl/min.

Die SPR-Messungen über den mit Protein-A funktionalisierten Chip (II.2.3.5) für die parentalen Vollängen-Ak ergaben für Cetuximab einen  $K_D$ -Wert von 1,67 nM und für Panitumumab einen  $K_D$ -Wert von 1,25 nM (Tabelle III-I). Die gefangenen „Response Units“ lagen bei 30 RU für Cetuximab und 34 RU für Panitumumab (Abbildung III-8).



**Abbildung III-8: SPR-Sensogramm von Cetuximab und Panitumumab – Protein A Chip**

In **A** ist das Sensogramm von Cetuximab und in **B** das von Panitumumab dargestellt, nach der Messung über SPR (II.2.3.5). Von Cetuximab wurden 30 RU und von Panitumumab 34 RU auf der immobilisierten Protein A Oberfläche gefangen. EGFR-His<sub>6</sub>-wurde wie vorher in einer seriellen 1:2 Verdünnung eingesetzt (II.2.3.5). Die zeitabhängige Änderung der Signalintensität (RU) ist graphisch dargestellt. In dem Sensogramm von Panitumumab fehlt die geringste Konzentration von 0,94 nM EGFR-His<sub>6</sub> aufgrund eines Messfehlers.

Die aus den SPR-Messungen hervorgegangenen Werte der Assoziationskonstante ( $k_a$ ), der Dissoziationskonstante ( $k_d$ ), der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten/Affinitätskonstante ( $K_D$ ;  $k_a/k_d$ ) und der theoretischen und gefitteten  $R_{max}$ -Werte (in RU) sind in Tabelle III-I aufgelistet.

**Tabelle III-I Auflistung der Werte nach Affinitätsbestimmung über SPR-Analyse**

Abkürzungserklärungen:  $k_a$  (Assoziationskonstante),  $k_d$  (Dissoziationskonstante), RU (Response Unit),  $K_D$  (Affinitätskonstante ( $k_a/k_d$ ))

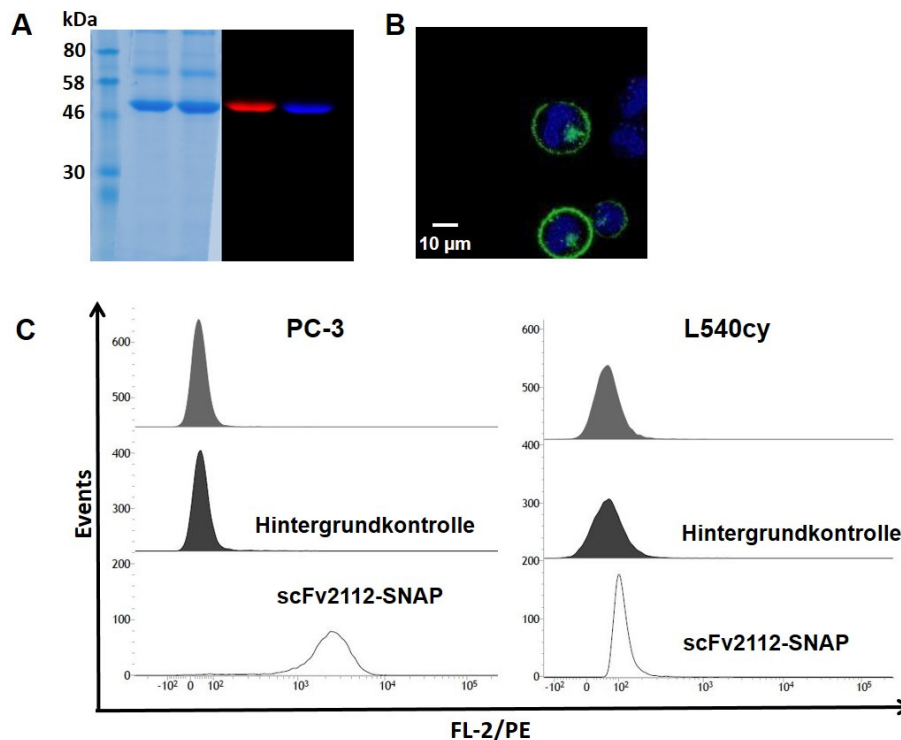
Konstrukt	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	$R_{max}$ (RU)	$R_{max}$ (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
				gefittet	theoretisch	
Cetuximab	877200	0,001468	1,67	29,6	41,2	1,25
scFv2112-SNAP	138900	0,000549	3,95	33,62	36,9	0,178
Panitumumab	435500	0,0005454	1,25	22,95	30,1	1,01
scFv1711-SNAP	187400	0,0007476	3,99	71,15	75,3	1,65

Die gemessenen  $K_D$ -Werte der beiden neuen scFvs waren nahezu identisch und auch die der parentalen mAk lagen in einem vergleichbaren Bereich (Tabelle III-I).

### III.1.5 *In vivo* Funktionalität von scFv2112-SNAP

Um einen potentiellen diagnostischen Nutzen der generierten  $\alpha$ -EGFR spezifischen scFv-SNAP Sonden nachzuweisen, wurde scFv2112-SNAP beispielhaft in einem subkutanen Prostata-Tumormodell *in vivo* getestet (II.2.4.2). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden bereits subkutane Tumormodelle mit den EGFR<sup>+</sup> Zelllinien A413 und L3.6pl Zellen etabliert. [68, 82, 83, 88], sowie im Rahmen anderer Dissertationen subkutane RMS- und TNBC-Tumormodelle (u.a. mit RD- und MDA-MB-468-Zellen, nicht publizierte Daten). Für die Etablierung eines Prostata-Tumormodells wurde die ebenfalls EGFR-exprimierende Zelllinie PC-3 eingesetzt. Mit der zuvor in den Experimenten verwendeten Zelllinie C4-2 kam es in den Mäusen zu keinem Tumorwachstum. Die vorbereitenden *in vitro* Daten von scFv2112-SNAP auf PC-3 Zellen sind in Abbildung III-9 dargestellt. Das Fusionsprotein scFv2112-SNAP wurde mit BG-800 (blaue Bande im SDS-Gel, Abbildung III-9, A) und BG-747 (rote Bande) gekoppelt. Der BG-800 und der BG-747 Farbstoff wurden für die *in vivo*-Anwendung ausgewählt, da im nah-infraroten Wellenlängenbereich der Absorptionskoeffizient von Gewebe niedriger und die Gewebepenetration besser ist [68]. Neben der Kopplung mit den langwelligen Fluoreszenzfarbstoff ist in Abbildung III-9, B die erfolgreiche Internalisierung (II.2.3.4) von scFv2112-SNAP in PC-3 Zellen nach 30 min Inkubation bei 37°C gezeigt. Hierfür wurde das mit BG-488 markierte scFv2112-SNAP Konstrukt eingesetzt, welches schon in III.1.3 für die Internalisierungsstudien verwendet wurde. In Abbildung III-9, C ist die durchflusszytometrisch bestimmte spezifische Bindung beispielhaft von scFv2112-SNAP BG-800 auf PC-3 Zellen dargestellt. Die Detektion erfolgte in diesem Fall über  $\alpha$ -SNAP/G $\alpha$ M<sup>PE</sup>, da der BG-800- und der BG-747 Fluoreszenzfarbstoff über das Durchflusszytometer FACSVerse™ (Becton Dickinson, Heidelberg) auf Grund der Filterkapazität, nicht detektiert werden können. Als Negativzelllinie wurde die CD-30 exprimierende Hodgkin Lymphom Zelllinie L540cy eingesetzt, mit der keine unspezifische Bindungsaktivität detektiert wurde. L540cy sollte als EGFR<sup>-</sup>-Negativzelllinie im subkutanen Tumormodell eingesetzt werden, da diese intern bereits *in vivo* etabliert wurde [123]. Mit dieser Zelllinie wurde scFv2112-SNAP mit BG-747 gekoppelt eingesetzt.



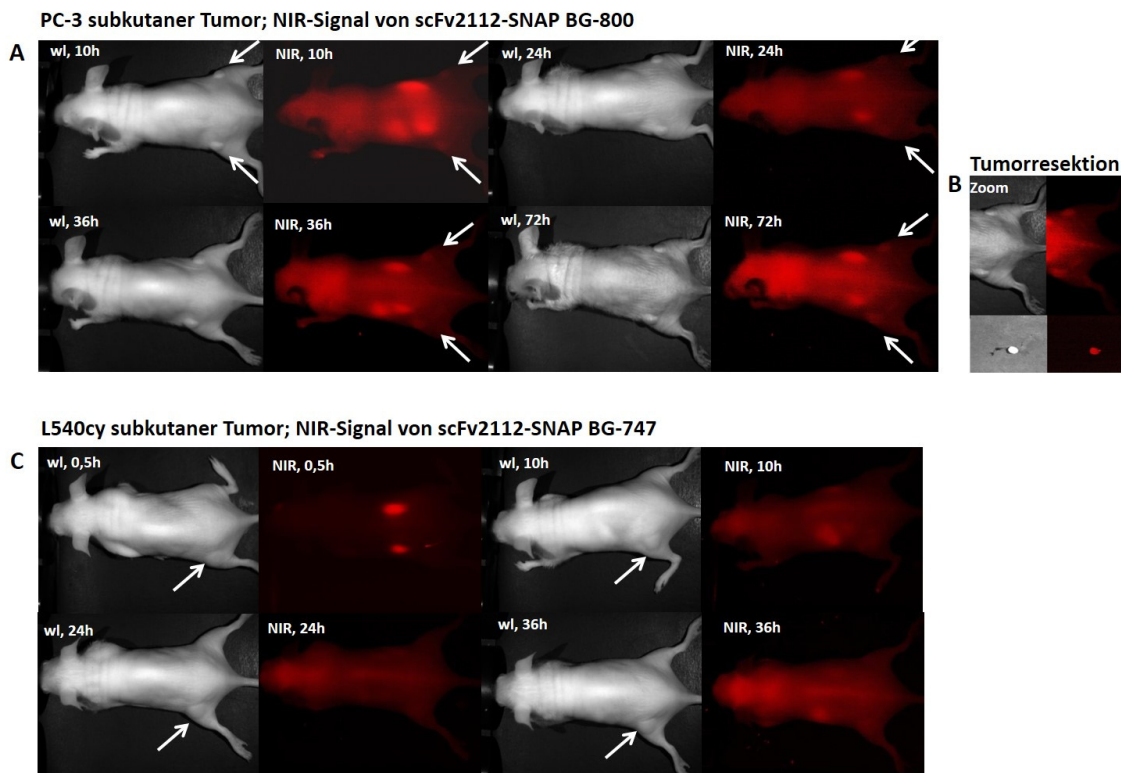


**Abbildung III-9: *In vitro* Binde- und Internalisierungseigenschaften von scFv2112-SNAP mit PC-3 Zellen**

In **A** ist scFv2112-SNAP markiert mit BG-747 (rote Bande) und BG-800 (blaue Bande) dargestellt (II.2.2.6), aufgenommen nach „Coomassie Brilliant Blue“-Färbung (links) und im Maestro-Bildgebungsgerät (rechts). Die Internalisierung von scFv2112-SNAP gekoppelt an BG-488 ist mit PC-3 Zellen nach 30 min bei 37°C in **B** dargestellt. Der Zellkern wurde mit DraQ5 gegengefärbt (blau) und die Aufnahme erfolgte über Konfokalmikroskopie (II.2.3.4). Die Bindungseigenschaften der scFv2112-SNAP BG-800 Sonde auf PC-3 Zellen detektiert über  $\alpha$ -SNAP/G $\alpha$ M<sup>PE</sup> ist in **C** dargestellt. Die hellgraue ausgefüllte Kurve zeigt die unbehandelten Zellen, die dunkelgraue ausgefüllte Kurve die Hintergrundkontrolle (Zellen inkubiert mit den Detektions-Ak) und die dunkelgraue Linie demonstriert die Fluoreszenzintensität von PC-3 und L540cy-Zellen inkubiert mit scFv2112-SNAP-BG-800.

Nachdem den Versuchstieren wie in II.2.4.2 beschrieben, PC-3- und L540cy Zellen subkutan injiziert wurden und die Tumore eine für die optische Bildgebung adäquate Größe erreicht hatten, wurde mit der retro-orbitalen Injektion der scFv-SNAP Sonden begonnen. Das subkutane Tumorwachstum von PC-3 Zellen an beiden Hinterläufen der Versuchstiere ist mit Pfeilen in Abbildung III-10, A markiert, ebenso wie das der L540cy Zellen. Jedoch wurde hier eine Tumordinjektion nur an einem Hinterlauf durchgeführt (Abbildung III-10, C). Es wurden Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 10 h, 24 h, 36 h und 72 h) nach Injektion unter Benutzung des nah infraroten (NIR)- und tief-roten Filtersets durchgeführt. Die Akkumulation der Bildgebungssonde scFv2112-SNAP BG-800 an den PC-3 subkutanen Tumoren ist beispielhaft in Abbildung III-10, A optisch dargestellt. Auch nach 72 h wurde noch

ein Signal am Tumor nachgewiesen, eine vergrößerte Aufnahme dazu und die Resektion des Tumors zeigt Abbildung III-10, B. Eine Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Nieren war direkt (0,5 h) nach Injektion der Sonden zu erkennen. Abbildung III-10, C zeigt ein L540cy-subkutanen Tumor-tragendes Versuchstier, aufgenommen mit dem tief-roten-Filterset. Keine unspezifischen Akkumulationen der scFv2112-SNAP-BG-747 Sonde wurde nachgewiesen (kein Fluoreszenzsignal am Tumor, Abbildung III-10, C). Hier ist neben der 10 h, der 24 h und der 36 h Aufnahme auch die 0,5 h Aufnahme aufgeführt. Aufgrund der Tumorgroße mussten die L540cy-Tumor tragenden Tiere vor der Aufnahme des 72 h-Wertes geopfert werden. Auch hier wurde ein Fluoreszenzsignal in den Nieren kurz nach Injektion der Sonde nachgewiesen, welches sich nach 36 h abschwächte.



**Abbildung III-10: *In vivo* Fluoreszenz-Bildgebung von PC-3 und L540cy subkutanen Tumoren**

ScFv2112-SNAP-BG-800 (II.2.2.6) wurde retro-orbital in PC-3- und scFv2112-SNAP-BG-747 in L540cy-Tumor-tragende Versuchstiere injiziert und die Aufnahmen erfolgten 0,5 h bis 72 h nach Sondeninjektion (II.2.4.2). Die Messung wurde am MAESTRO™ *In-vivo* Imaging System durchgeführt. Es sind die Durchlichtaufnahmen (wl) und die Aufnahmen mit dem nah-infrarotem-Filterset (NIR) sowie mit dem tiefroten Filterset dargestellt. Die Akkumulation der scFv2112-SNAP BG-800 Sonde an den Tumorzellen/subkutanen Tumoren der EGFR-exprimierenden PC-3 Zellen, ist in **A** durch Markierung mit Pfeilen dargestellt. Abbildung **B** demonstriert eine vergrößerte Aufnahme der 72 h Aufnahme, sowie die Resektion des Tumors nach dem Ende der Messreihe. In **C** ist ein L540cy-Tumor tragendes Tier nach Injektion von scFv2112-SNAP-BG-747 über die Zeitpunkte 0,5 h, 10 h, 24 h und 36 h dargestellt, die Lokalisation des Tumors ist ebenfalls mit einem Pfeil markiert.

Mit diesem Datensatz wurde die Verträglichkeit und ein erfolgreicher *in vivo* Einsatz beispielhaft für einen der neuen scFvs, den scFv2112-SNAP, dargestellt.

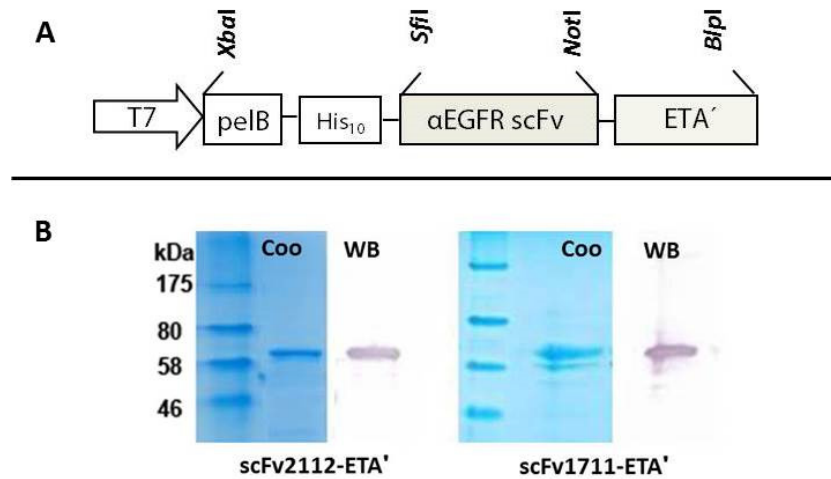
### **III.2 Der EGFR als Zielantigen für solide Tumore – Herstellung und funktionelle Charakterisierung von ETA'-basierten IT**

Für einen potentiell therapeutischen Einsatz wurden ETA'-basierte IT mit scFv2112 und scFv1711 generiert und sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* charakterisiert, um im finalen Schritt ein humanes zytolytisches Fusionsprotein zu entwickeln. Hierzu wurde eine etablierte verkürzte Form von *Pseudomonas* Exotoxin A, ETA', eingesetzt [23]. Ähnlich wie bei den SNAP-Fusionsproteinen wurde auch hier eine interne Referenz, das bereits etablierte und eingehend charakterisierte IT 425(scFv)-ETA' mitgeführt [23, 82, 83].

#### **III.2.1 Generierung, Expression und Reinigung von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA'**

Die beiden IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' wurden in den sogenannten pMT-Expressionsvektor kloniert [112, 119]. Durch die N-terminale pelB-Leader-Sequenz werden die IT ins Periplasma transportiert und die Proteine können in löslicher Form exprimiert werden. Um scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' zu erhalten wurden im Ausgangsvektorkonstrukt (425(scFv)-ETA') die scFvs über *SfiI* und *NotI* Verdau ausgetauscht (Abbildung III-11, A).

Sowohl scFv2112-ETA' als auch scFv1711-ETA' wurden nach dem Protokoll zur periplasmatischen Stressexpression (II.2.2.1) in *E.coli* BL-21 Star (DE3) exprimiert. Beide Proteine wurden erfolgreich unter nativen Bedingungen mittels IMAC über den His<sub>10</sub>-Tag gereinigt (II.2.2.2). Die Reinheit der angereicherten Fusionsproteine wurde über SDS-PAGE und WB-Analyse ermittelt. Beide IT wurden im WB über den ETA'-spezifischen Ak TC-1 nachgewiesen (Abbildung III-11, B). Das erwartete Molekulargewicht für die beiden IT lag bei etwa 72 kDa und eine Bande auf der korrekten Höhe wurde sowohl im SDS-Gel als auch in der WB-Analyse detektiert.



**Abbildung III-11: Schema des scFv-ETA' Expressionsvektors, SDS-PAGE und WB-Analyse der gereinigten IT**

**A:** Der Expressionsvektor (II.1.7) für scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' enthält einen T7-Promotor und eine N-terminale pelB-Leader-Sequenz zur Einschleusung des IT ins Periplasma. Der His<sub>10</sub>-Tag dient zur Reinigung über IMAC (II.2.2.2) und zur Detektion.

**B:** Nach der periplasmatischen Expression wurden die IT über IMAC (II.2.2.2) gereinigt. Die Reinheit von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' wurde über SDS-PAGE und „Coomassie Brilliant Blue“- Färbung überprüft (Coo) (II.2.2.3). Die Anreicherung der beiden IT wurde über WB-Analyse bestätigt (WB) und mittels TC-1/GαM<sup>AP</sup> detektiert (II.2.2.4). Die erwartete Größe beider Konstrukte liegt bei etwa 72 kDa. Illustration abgewandelt nach [121].

Die Ausbeute für scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' lag im Bereich von 0,2-0,3 mg/L Bakterienkultur, die Konzentration wurde densitometrisch bestimmt (II.2.2.5).

## III.2.2 In vitro Funktionalität der IT

### III.2.3 Bindungseigenschaften der IT und Rezeptorexpression auf den Zielzellen

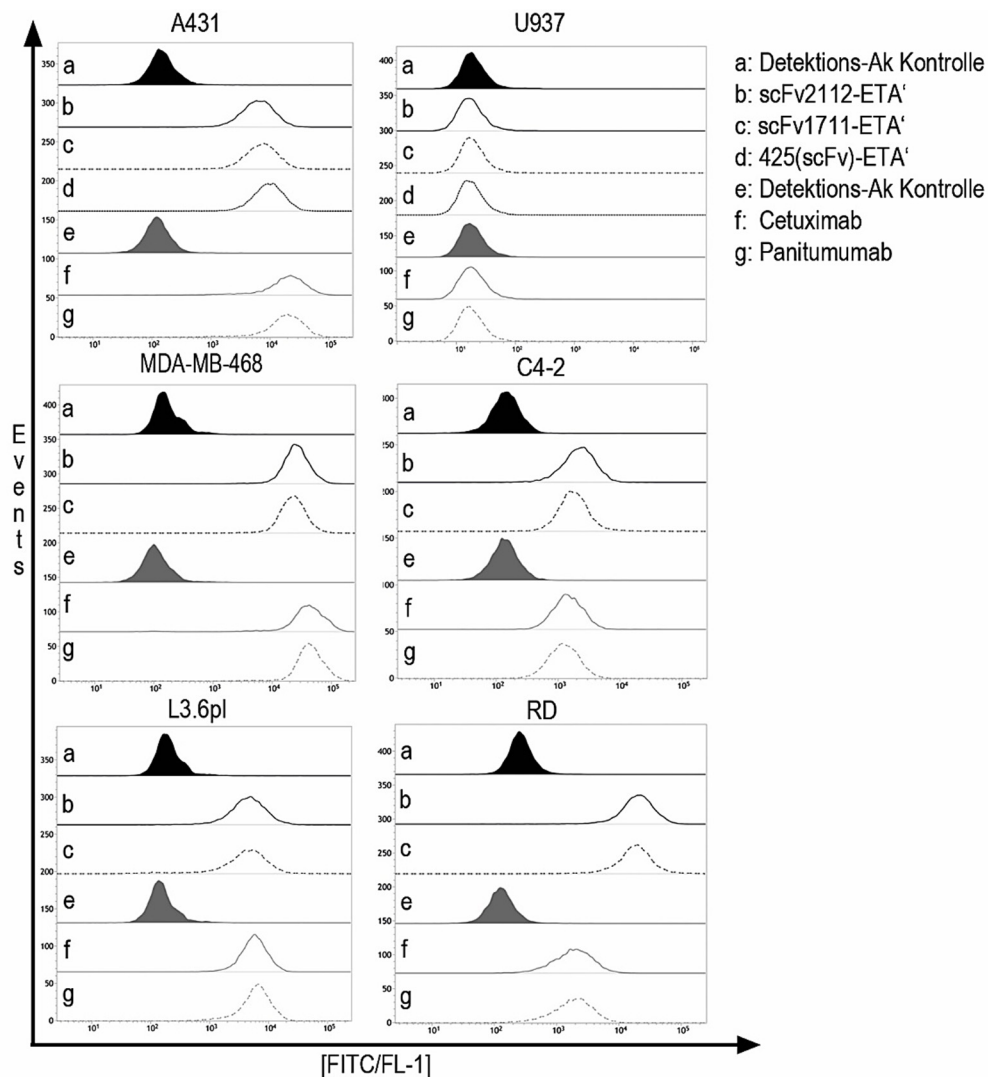
Um einen Überblick über die Expressionsrate des EGFR auf den eingesetzten Zelllinien zu erhalten, wurde die Zelloberflächendichte jeder Zelllinie über ein kommerziell erhältliches Kit bestimmt (QifiKit<sup>®</sup>, DAKO; II.2.3.1.2). Mit etwa 150.000 Rezeptoren pro Zelle wurde das höchste EGFR-Expressionslevel auf A431 Zellen nachgewiesen, gefolgt von MDA-MB-468, C4-2, L3.6pl und RD-Zellen (Tabelle III-II).

**Tabelle III-II EGFR Expressions-Level**

Anzahl der EGF-Rezeptoren pro Zelle (II.2.3.1.2). Abkürzungen: SD (standard deviation/Standardabweichung).

Zelllinie	A431	MDA-MB-468	C4-2	L3.6pl	RD	U937
<b>EGFR-Expression</b>	148.723 (± 15.992 SD)	85.891 (± 17.973 SD)	22.902 (± 2775 SD)	21.290 (± 5257 SD)	12.490 (± 4220 SD)	54 (± 23 SD)

Die Bindungseigenschaften der rekombinanten IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' wurden über Durchflusszytometrie bestimmt (II.2.3.1.1). Die spezifische Bindungsaktivität von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' auf den EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien A431, MDA-MB-468, L3.6pl, C4-2 und RD wurde erfolgreich nachgewiesen. Die spezifische Bindung der Referenz 425(scFv)-ETA' ist repräsentativ auf A431-Zellen dargestellt (Abbildung III-12). Keine unspezifische Bindung wurde auf der EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937 detektiert. Die MFI war auf den mit IT inkubierten Zielzellen im Vergleich zu der Negativ-Zelllinie U937 oder zur Hintergrundkontrolle (Detektions-Ak Kontrolle) 15-200 mal stärker. Die differierenden MFI-Werte hängen von Zelllinie und EGFR-Expressionslevel ab (Abbildung III-12). Auch die parentalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab wurden als Positivkontrolle gemessen. Diese bestätigten die Ergebnisse der IT und zeigten ebenfalls keine unspezifischen Bindungseigenschaften auf der Negativzelllinie (Abbildung III-12).



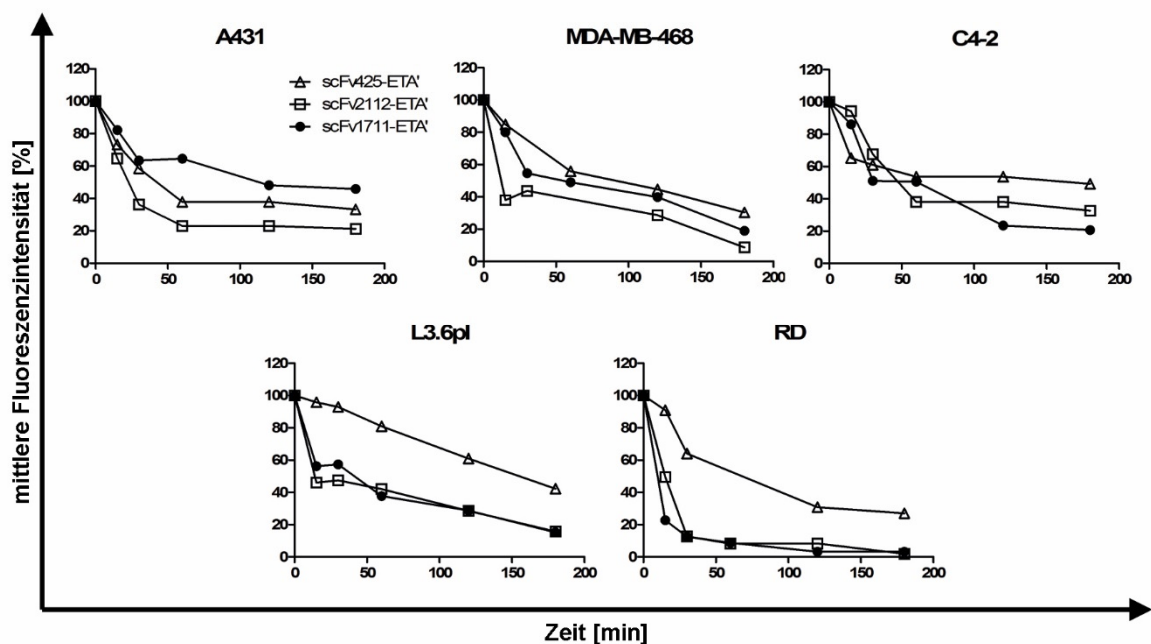
**Abbildung III-12: Spezifische Bindungseigenschaften der rekombinanten IT und der parentalen mAk**

Die rekombinanten IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' (II.2.2.2) wurden über den ETA-spezifischen Ak TC-1 und  $\alpha M^{FITC}$  und die parentalen mAk direkt über  $\alpha H^{FITC}$  detektiert. Die Aufnahmen erfolgten im Fluoreszenzkanal FL-1. Kurve (a) zeigt die Hintergrundkontrolle. Die spezifische Bindung von scFv2112-ETA' ist durch Kurve (b) und die von scFv1711-ETA' durch Kurve (c) dargestellt. Auf A431 und U937 wurde beispielhaft die spezifische Bindung von 425(scFv)-ETA' gemessen (d). Die graue ausgefüllte Kurve (e) demonstriert die Hintergrundkontrolle für die Bindungsanalyse der parentalen mAk. Kurve (f) zeigt die Bindung von Cetuximab, Kurve (g) die von Panitumumab. Illustration abgewandelt nach [121].

### III.2.3.1.1 Internalisierungsverhalten der IT

Nachdem die spezifische Bindung an die Zielzellen nachgewiesen werden konnte, wurde das Internalisierungsverhalten der IT bestimmt, denn Voraussetzung für ein effizientes IT ist eine schnelle und effektive Internalisierung. Um dies zu untersuchen wurden EGFR<sup>+</sup>- Zelllinien mit den IT auf Eis vor-inkubiert und nach einem Waschschrift über verschiedene Zeitpunkte bei

37°C in Zellkulturmedium inkubiert. Die bei 37°C inkubierten Proben wurden bezüglich ihres Internalisierungsverhaltens analysiert. Als Referenz und Nicht-Internalisierungskontrolle dienten Zellen die mit den IT durchgängig bei 4°C inkubiert wurden. Die von der 4°C-Referenz im Durchflusszytometer gemessene Signalstärke wurde als 100% MFI-Wert definiert und alle nachfolgenden Werte relativ zu dieser Kontrolle berechnet (II.2.3.1.4). RD-Zellen internalisieren bis zu 90% von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' innerhalb von 60 min, jedoch wurden nur etwa 50% von 425(scFv)-ETA' innerhalb dieser Zeit aufgenommen. Nach 60 min wurden über die C4-2 Zelllinie etwa 60% scFv2112-ETA' und etwa 50% scFv1711-ETA' aufgenommen, die Internalisierung von 425(scFv)-ETA' war auch hier langsamer. L3.6pl internalisieren nach 60 min etwa 60% beider neuen IT und MDA-MB-468 etwa 60% scFv2112-ETA' und etwa 50% scFv1711-ETA'. 425(scFv)-ETA' wurde wiederum deutlich langsamer internalisiert (Abbildung III-13). Die Modellzelllinie A431 zeigte im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien ein anderes Verhalten. Hier wurden nach 60 min etwa 80% von scFv2112-ETA' und 60 % von 425(scFv)-ETA', aber nur 40% von scFv1711-ETA', aufgenommen.



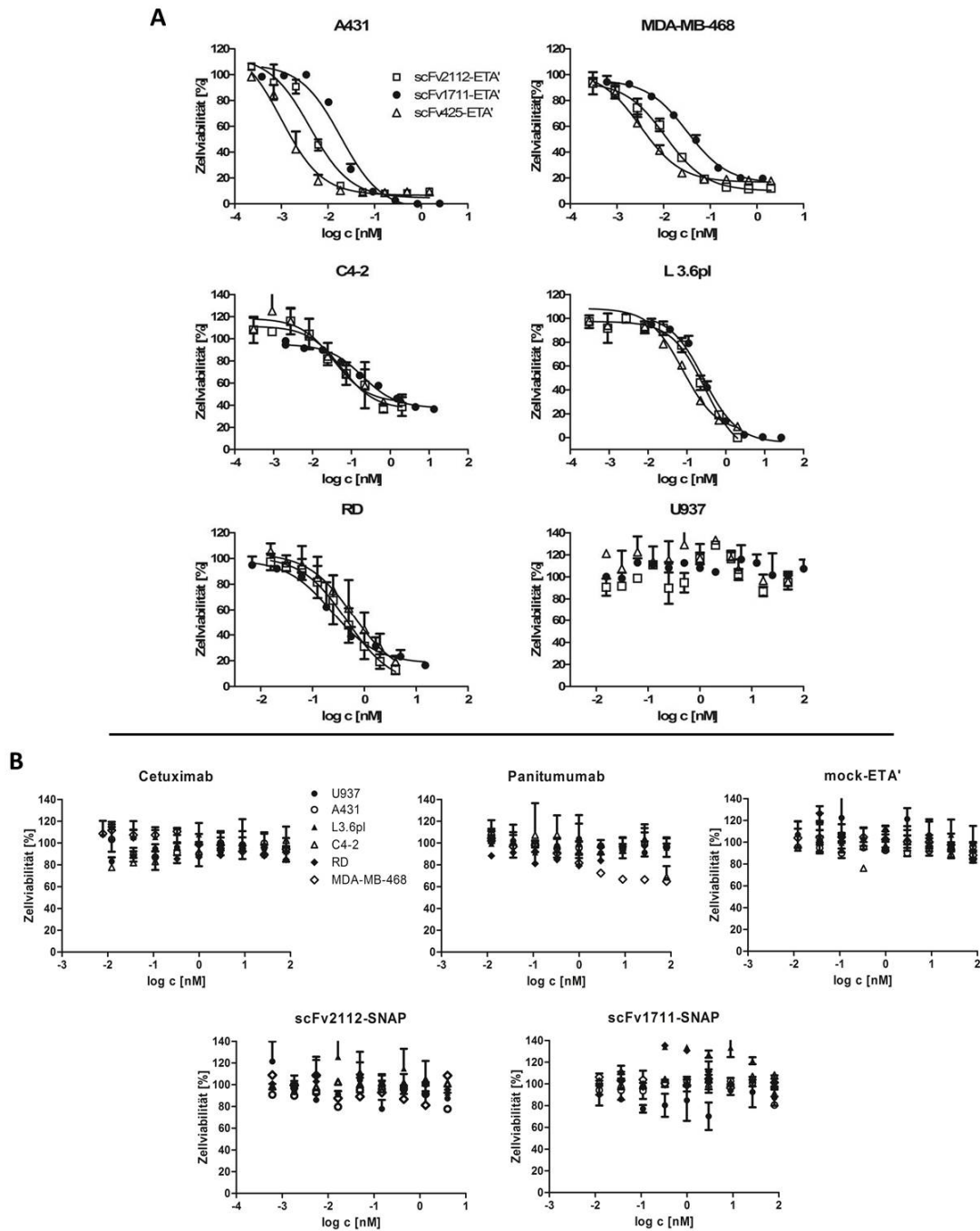
**Abbildung III-13: Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA' in verschiedene EGFR<sup>+</sup> - Zelllinien**

Die Internalisierungseffizienz von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und des Standards 425(scFv)-ETA' (II.2.2.2) wurde über Durchflusszytometrie bestimmt (II.2.3.1.4). Der Mittelwert der gemessenen MFI von verschiedenen Messungen ist nach den fünf gemessenen Zeitpunkten prozentual aufgetragen. Zellen inkubiert mit den IT bei 4°C wurden als 100% Wert gesetzt. Die Detektion der IT erfolgte mit dem ETA-spezifischen TC-1 Ak und GαM<sup>FITC</sup> als Sekundär-Ak. Illustration abgewandelt nach [121].

### III.2.3.2 Anti-proliferative Wirkung der IT

Die neuen IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' zeigten auf allen fünf ausgewählten EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien spezifische Bindung und Internalisierung. Im nächsten Schritt wurde das zytotoxische Potential *in vitro* analysiert. Hierfür wurde ein XTT-basierter kolorimetrischer Zellviabilitätstest durchgeführt um den spezifischen anti-proliferativen Effekt der IT zu messen. Die Proliferation wurde in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen nach einer Inkubation von 72 h bei 37°C gemessen. Dieser Proliferationstest basiert darauf, dass nur lebende Zellen das XTT-Tetrazoliumsalz in den Farbstoff Formazan umsetzen und der entstandene Farbumschlag photometrisch bestimmt werden kann (II.2.3.2). Wie in Abbildung III-14, A dargestellt, wurde die Vitalität der Zielzellen in Gegenwart der IT dosisabhängig reduziert, wohingegen die EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937 in ihrer Proliferationsrate nahezu unbeeinflusst blieb. In einem direkten Vergleich zur Überprüfung des spezifischen zytotoxischen Einflusses der beiden neuen IT auf den Zelllinien, wurde ebenfalls ein nicht-EGFR-bindendes IT (mock-ETA') eingesetzt. Dadurch kann ein potentiell unspezifischer, ETA'-vermittelter, anti-proliferativer Effekt ausgeschlossen werden. Bei diesem Konstrukt handelte es sich um das bereits etablierte H22(scFv)-ETA' [112, 124]. Weiterhin wurden beide scFv-SNAP Fusionsproteine und die dazugehörigen parentalen mAk als Kontrollen eingesetzt (Abbildung III-14, B). Da von keinem der aufgeführten Kontrollen eine nennenswerte Toxizität ausging, wurde eine unspezifische zytotoxische Wirkung des Toxins ETA' und der scFvs ausgeschlossen (Abbildung III-14, B).





**Abbildung III-14: XTT-Zytotoxizitätsstudien von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und der Referenz 425(scFv)-ETA' auf verschiedenen Zelllinien**

Die Toxizität der IT (II.2.2.2) wurde über einen Zellviabilitäts-XTT-Assay bestimmt (II.2.3.2). Die benötigte Konzentration um eine 50-prozentige Reduktion der Proteinsynthese ( $IC_{50}$ ) relativ zu den unbehandelten Zellen zu erhalten wurde über die GraphPad Prism Software bestimmt. Dosisabhängige Toxizität beider IT und der Referenz wurde mit allen Zelllinien bestätigt (A), jedoch nicht mit der Negativzelllinie U937. Keine unspezifischen Effekte der parentalen Ak, der scFv-SNAP Fusionsproteine und eines mock-ETA' Konstruktes wurde nachgewiesen (B). In B sind pro Konstrukt alle Zelllinien in einem Graphen zusammengefasst dargestellt. Die Messungen wurden in unabhängigen Experimenten in einer Dreifach- oder Vierfachbestimmung durchgeführt und mindestens viermal wiederholt ( $n=4$ ). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (standard error of mean). Illustration abgewandelt nach [121].

Die erzielten IC<sub>50</sub>-Werte für scFv2112-ETA' lagen zwischen 4 pM auf A431 Zellen und 11 pM auf MDA-MB-468 Zellen, welche beide eine hohe EGFR-Expression aufweisen. Auf RD Zellen, den Zellen mit der niedrigsten gemessenen Rezeptorexpression, lag der Wert bei 460 pM (Tabelle III-II und Tabelle III-III). Die IC<sub>50</sub>-Werte für scFv1711-ETA' reichen von 18 pM auf A431 Zellen und 32 pM auf MDA-MB-468 Zellen bis zu 240 pM auf RD Zellen. Das als Referenz eingesetzte 425(scFv)-ETA'-Konstrukt zeigte vergleichbare Werte. Die höchste eingesetzte Startkonzentration der IT lag bei 80 nM, bei dieser Konzentration wurden keine unspezifischen Effekte auf der EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937 nachgewiesen. Bei höheren IT-Konzentrationen als 80 nM ebenfalls nicht (Abbildung III-14, B).

**Tabelle III-III IC<sub>50</sub>-Werte von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA'**

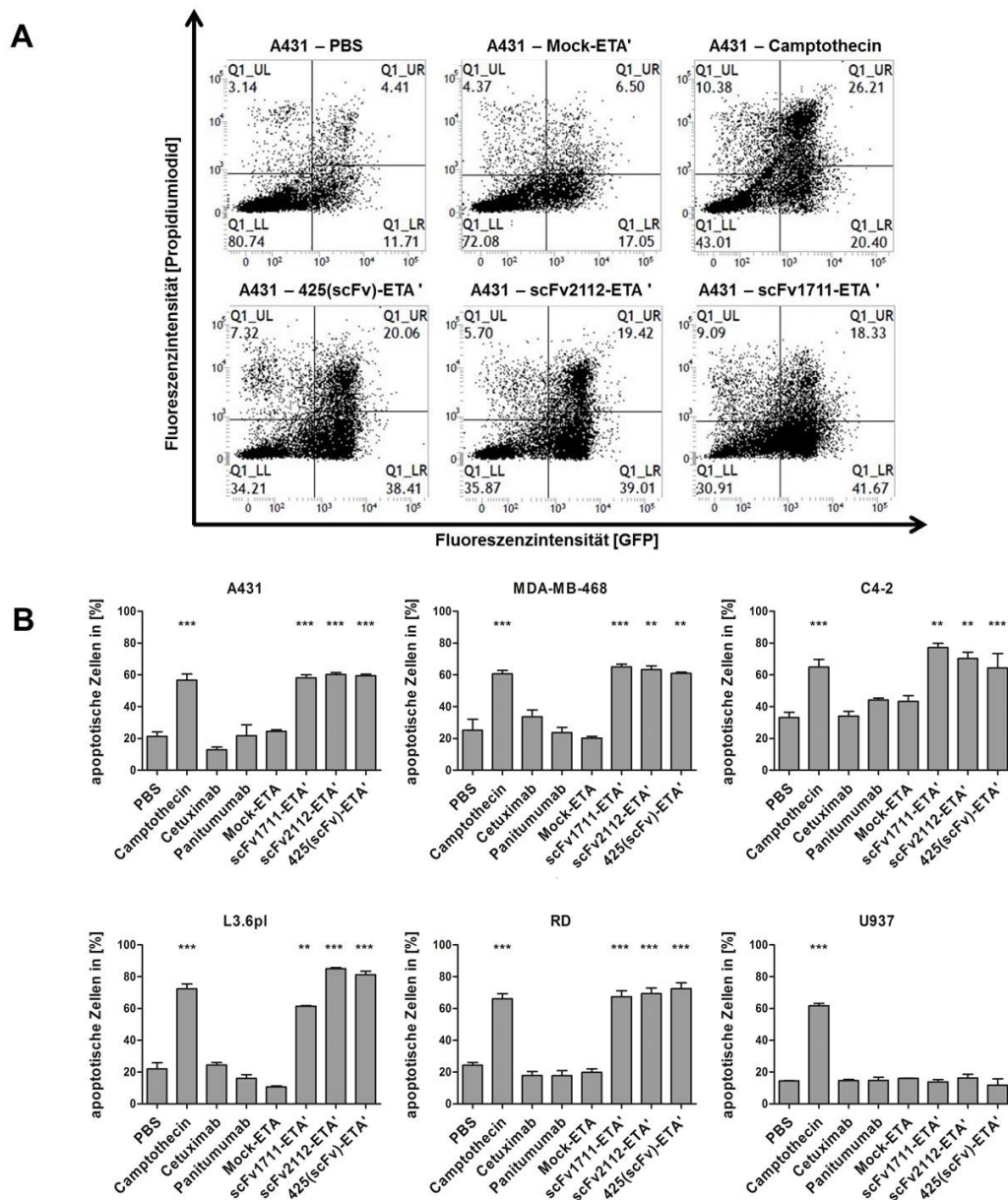
Abkürzungen: IC<sub>50</sub> ( mittlere inhibierende Konzentration), CI (Konfidenzintervall).

<b>Konstrukt</b>	<b>A431</b>	<b>MDA-MB-468</b>	<b>C4-2</b>	<b>L3.6pl</b>	<b>RD</b>
	<b>IC<sub>50</sub> (pM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (pM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (pM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (pM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (pM)</b>
	<b>[95% CI]</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>[95% CI]</b>	<b>[95% CI]</b>
<b>scFv2112-ETA'</b>	4 [3-7]	11 [9-14]	55 [18-165]	290 [170-497]	460 [266-487]
<b>scFv1711-ETA'</b>	18 [12-34]	32 [26-39]	192 [143-258]	260 [186-385]	240 [132-427]
<b>425(scFv)-ETA'</b>	2 [1-2]	4 [3-4]	35 [10-121]	80 [46-134]	598 [288-1245]
<b>EGFR Expression</b>	hoch	—————→			moderat

### III.2.3.3 Spezifische Apoptose-Induktion der IT

Um zu überprüfen ob der beobachtete inhibierende Effekt der IT auf einer Apoptose-Induktion in den Zielzellen zurück zu führen war, wurden die Konstrukte in einem AV/PI-Assay getestet. Die Zellen wurden wie beschrieben (II.2.3.3) mit scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA' für 48 h inkubiert, um Zellen nach AV-EGFP und PI-Färbung in der früh-und spätapoptotischen/nekrotischen Phase zu detektieren. Beide neu generierten IT reduzierten statistisch signifikant die Zellzahl in einer Konzentration von 80 nM (entspricht 1,4 µg/ml) (Abbildung III-15). Exemplarisch sind die „dot blots“ der Messung für die Zelllinie A431 aufgeführt. Der untere linke Quadrant demonstriert die lebenden Zellen, der untere rechte die frühapoptotischen und der obere rechte die spätapoptotischen/nekrotischen Zellen (Abbildung III-15, A). Die Population früh-und spätapoptotischer Zellen stieg nach Inkubation mit den IT

statistisch signifikant an (Abbildung III-15, B). Somit wurde ein pro-apoptotischer Effekt bestätigt.



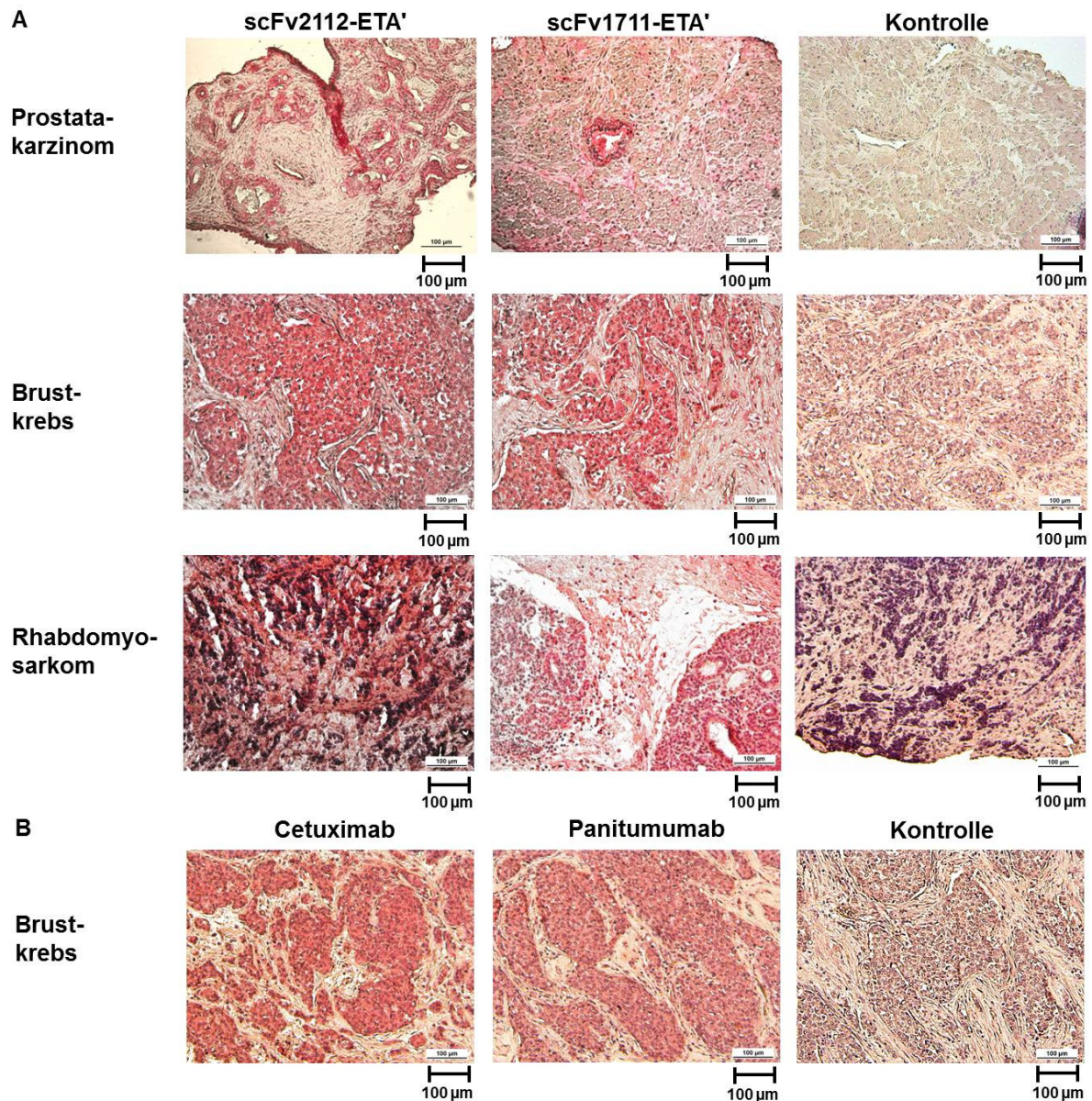
**Abbildung III-15: Bestimmung der pro-apoptotischen Aktivität von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA' über AV-EGFP/PI-Färbung**

Alle Zelllinien wurden für 48 h mit den IT, der Pufferkontrolle PBS und dem mock-ETA' Konstrukt als Negativkontrolle und Camptothecin als Positivkontrolle inkubiert. Als zusätzliche Kontrollen wurden die Vollängen-Ak eingesetzt (II.2.3.3). Früh- und spätapoptotische Effekte sind in einem Balkendiagramm für die jeweilige Zelllinie zusammengefasst (B) und eine beispielhafte Darstellung der „dot blots“ ist in A aufgeführt. Hier gibt die Zahl in jedem der vier Quadranten die prozentuale Zellpopulation in der jeweiligen Kategorie an (unten links: lebende Zellen, unten rechts: früh-apoptotische Zellen und oben rechts spätapoptotische/nekrotische Zellen). Die Daten sind als Mittelwerte dargestellt ( $\pm$ SEM). Die statistische Signifikanz wurde über einen „unpaired two-tailed student's *t*-test“ evaluiert (\*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und mindestens viermal wiederholt ( $n=4$ ). Illustration abgewandelt nach [121].

Sowohl scFv2112-ETA' als auch scFv1711-ETA' zeigten auf etwa 60% der A431 und MDA-MB-468 Zellen einen apoptotischen Effekt. Nach 48 Stunden wurden bis zu 80% der C4-2 Zellen eliminiert. Auf L3.6pl-Zellen wurden nach Inkubation mit scFv2112-ETA' bis zu 80% apoptotische Zellen gemessen und mit scFv1711-ETA' bis zu 60%. In RD-Zellen verhielten sich alle eingesetzten IT ähnlich und erreichten eine etwa 70%ige Apoptose-Induktion (Abbildung III-15, B). Beide IT zeigten keine Apoptose-auslösenden Effekte mit der Negativzelllinie U937. Die Pufferkontrolle (PBS), die parentalen mAk und das mock-ETA'-Konstrukt zeigten entweder keine oder nur geringe Effekte, die jedoch nicht statistisch signifikant waren.

### **III.2.4 Ex vivo Bindung der IT und der parentalen mAk auf Tumor-Biopsien**

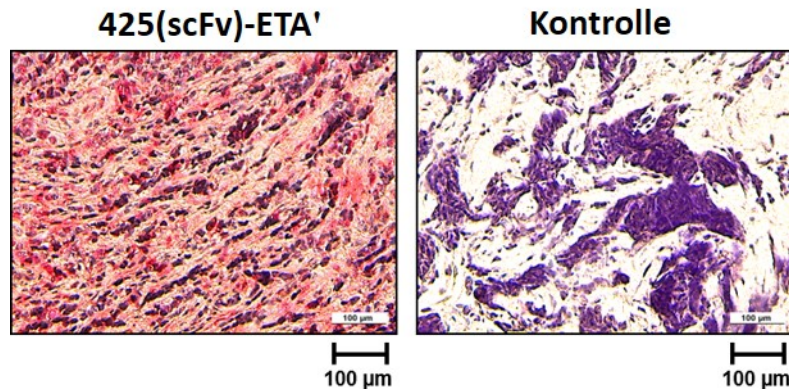
Um weitere Information über die klinische Relevanz der neu etablierten IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' zu erhalten, wurde deren Bindungseigenschaften auf Primärzellen von FFPE-Schnitten von Brust-, Prostata- und RMS-Biopsien untersucht. Die EGFR-spezifische Bindung der IT wurde über die Färbung mit New Fuchsin nachgewiesen. New Fuchsin führt zu einer unlöslichen Rot/Magenta-Färbung an der Bindungsstelle des Zielantigens. Durch die Zugabe von Levamisol werden unspezifische Färbungen, die aufgrund der endogenen AP-Aktivität in AP-basierten IHC-Färbungen entstehen können, unterbunden. Eine Färbung mit H&E bestätigt das Vorhandensein von Tumorzellen. Die Schnitte wurden mit den IT und den Detektions-Ak (TC-1 Ak und G $\alpha$ M<sup>AP</sup>) wie in II.2.4.1 beschrieben behandelt und inkubiert. Beide IT zeigten spezifische Bindung auf den drei Tumorentitäten, was durch die Kontrollen (Inkubation ohne IT aber mit Detektionsantikörper) bestätigt wurde (Abbildung III-16, A), da keine Rot/Magenta-Färbung nach New Fuchsin Behandlung sichtbar war. Exemplarisch wurde auch die Bindung der parentalen mAk auf einer Tumorentität (Brustkrebs) untersucht (Abbildung III-16, B).



**Abbildung III-16: Bindung der neuen IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' und der parentalen mAk auf Primärmaterial**

Tumorbiopsien (II.1.10) von verschiedenen Patienten und Tumorentitäten wurden getestet (Prostatakarzinom, Brustkrebs und RMS) und ausgewählte Aufnahmen der Schnitte dargestellt. Nach Inkubation mit den IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' (II.2.2.2) oder den parentalen mAk (II.1.6) und der Färbung mit New Fuchsin Substrat sowie H&E wurden die Schnitte mikroskopisch (Objektiv: 10x) aufgenommen (II.2.4.1). Die spezifische Bindung der beiden IT wurde durch eine Rot/Magenta-Färbung der EGFR-positiven Tumorzellen nachgewiesen (A). Zur Detektion dienten der ETA-spezifische TC-1 Ak und  $G\alpha M^{AP}$  (II.1.6), welche auch für die Kontrollschnitte in Abwesenheit der IT genutzt wurden um unspezifische Färbungen auszuschließen (dritte Spalte, Kontrolle). Beispielhaft ist die spezifische Bindung der parentalen mAk auf Brustkrebspatientenbiopsien dargestellt (B), welche mit  $G\alpha H^{AP}$  detektiert wurden. Illustration abgewandelt nach [121].

Übereinstimmend mit den Bindungseigenschaften der IT *in vitro* (III.2.3) wurde somit auch die spezifische Bindung von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und der Referenz 425(scFv)-ETA' (Abbildung III-17) *ex vivo* auf ausgewähltem Primärmaterial bestätigt.



**Abbildung III-17: Spezifische Bindung von 425(scFv)-ETA' auf RMS-Tumorbiopsien**

Das Referenz-IT 425(scFv)-ETA' (II.2.2.2) wurde wie in III.2.4 beschrieben ebenfalls auf seine Bindungseigenschaften *ex vivo* getestet. Beispielhaft ist hier die Bindung auf RMS-Tumorbiopsien dargestellt, die Aufnahme rechts zeigt die Kontrolle, wie zuvor beschrieben (III.2.4).

### III.3 Entwicklung eines gegen den EGFR gerichteten humanen zytolytischen Fusionsproteins

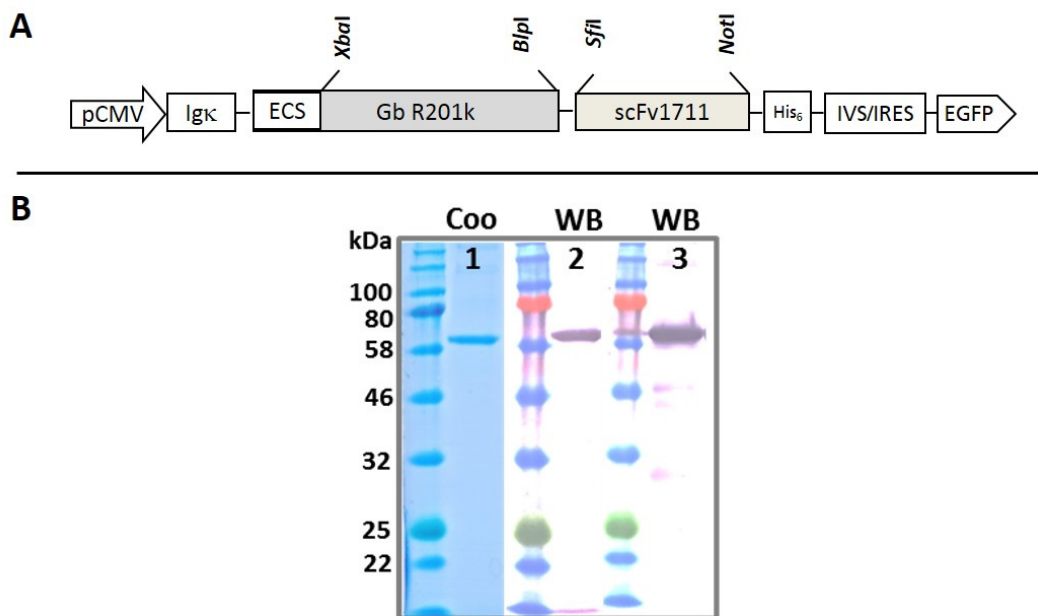
Nachdem ein potentiell therapeutischer Einsatz der beiden EGFR-spezifischen scFvs mit ETA' als Goldstandard erfolgreich dargestellt wurde, sollte nun eine humanes zytolytisches Fusionsprotein (hCFP) basierend auf scFv1711 generiert und charakterisiert werden. Als Effektordomäne wurde eine modifizierte Version des humanen GrB gewählt, GbR201K genannt. Diese GrB-Variante ist aufgrund eines Aminosäureaustausches an Position 201 resistent gegenüber PI-9, dem natürlichen Inhibitor von GrB [97].

### III.4 Herstellung und funktionelle Charakterisierung von GbR201K-scFv1711

Zur Expression in HEK 293T-Zellen wurde das Konstrukt (E)GbR201K-scFv1711 in den pMS-Expressionsvektor kloniert. Zur Generierung wurde in dem bereits etablierten Konstrukt (E)GbR201K-scFvH22, über die Schnittstellen *SfiI* und *NotI* der scFvH22 durch den scFv1711 ersetzt (Abbildung III-18; A). Da sich die HEK 293T-Zelllinie für die Expression von GrB-basierten scFv-Fusionsproteinen am geeignetsten erwiesen hat, wurde das hCFP darin

produziert (II.2.1.13), wie auch die scFv-SNAP Fusionsproteine (III.1.1). Die Reinigung aus dem Zellkulturüberstand erfolgte über IMAC (II.2.2.2). Es wurden für (E)GbR201K-scFv1711 hohe Expressionsraten mit einer Ausbeute von 17-30 mg/L Zellkulturüberstand, je nach Expression und Reinigung und einer Reinheit zwischen 70 und 80%, erreicht. Die Anreicherung von GbR201K-scFv1711 wurde über SDS-PAGE und WB analysiert (Abbildung III-18).

Wie zuvor für die ETA'-basierten IT beschrieben (III.2.3.2), wurde auch für das hCFP ein nicht-bindendes Kontrollkonstrukt eingesetzt. Auch hier wurde auf das, bereits für die Klonierung verwendete, GbR201K-scFvH22 als GbR201K-mock Konstrukt zurückgegriffen und in den verschiedenen Experimenten eingesetzt [98]. Das Konstrukt wurde aus laufenden Versuchen der Pharmedartis GmbH am Fraunhofer IME zur Verfügung gestellt.



**Abbildung III-18: Expressionsvektor von GbR201K-scFv1711, Analyse über SDS-PAGE und WB**

In **A** ist schematisch die Struktur des eukaryotischen Expressionsvektors pMS-GbR201K-scFv1711 (II.1.7) dargestellt. pCMV: Cytomegalievirus-Promotor Igκ: Igκ Signalsequenz zur gezielten Sekretion in den Zellkulturüberstand, ECS: Enterokinase Spaltsequenz, GbR201K: mutierte GrB-Sequenz, His<sub>6</sub>: 6x Histidin-Tag, IVS/IRES: synthetisches Intron und interne ribosomale Eintrittsstelle zur Überprüfung der Transkription, EGFP: „enhanced green fluorescent protein“/verstärktes grün fluoreszierendes Protein

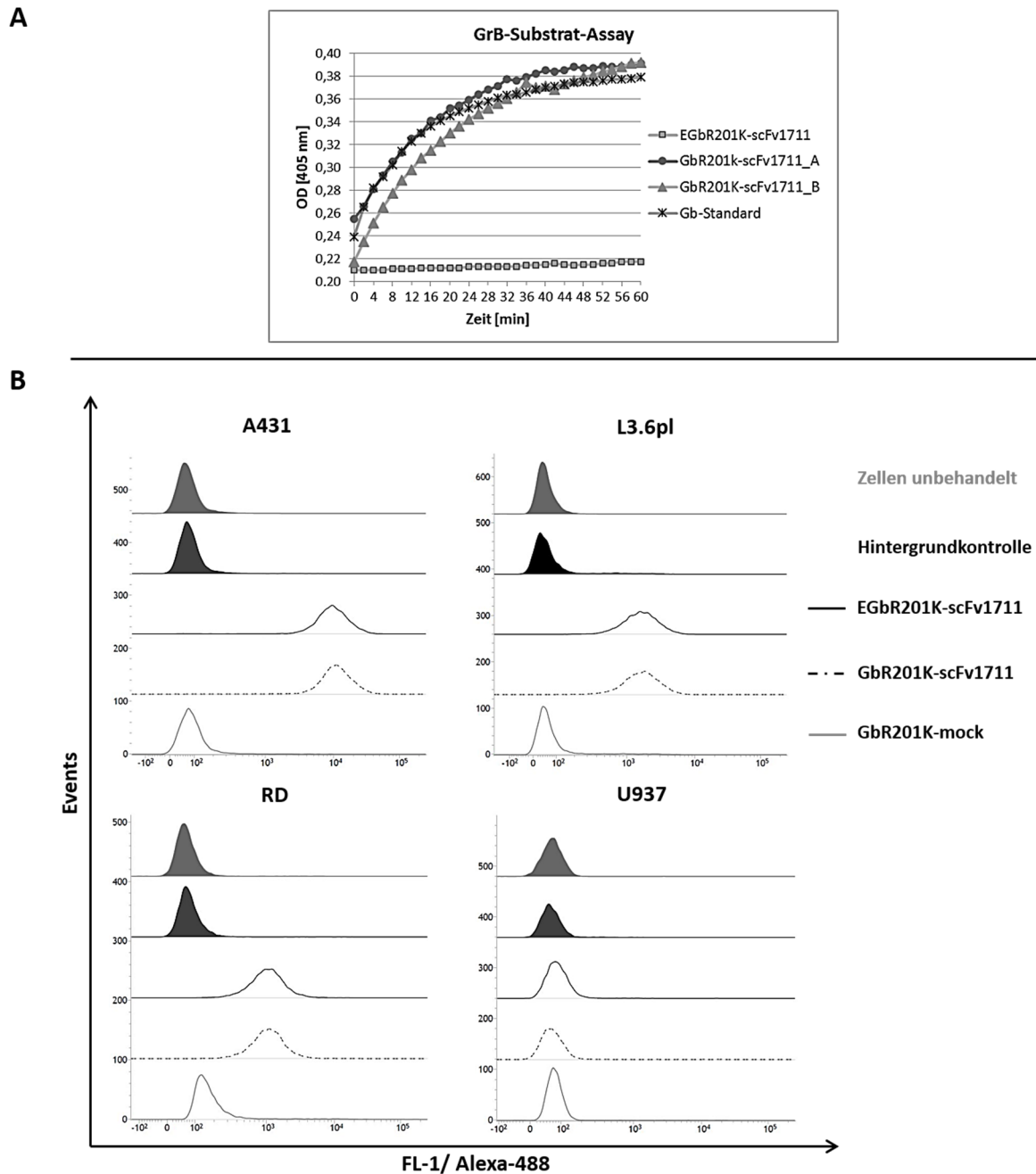
In **B** ist GbR201K-scFv1711 nach Expression in HEK 293T-Zellen (II.2.1.13) und der Reinigung über IMAC (II.2.2.2) in SDS-PAGE (II.2.2.3) nach „Coomassie Brilliant Blue“-Färbung (Coo) und WB-Analyse (II.2.2.4), detektiert mit α-his/GaM<sup>AP</sup> (Spur 2) oder α-Gb/GaM<sup>AP</sup> (Spur 3), dargestellt. Die erwartete Größe von GbR201K-scFv1711 liegt bei etwa 59 kDa.

### III.4.1.1 Aktivierung des GrB – Fusionsproteins und seine Bindungsaktivität

Die proteolytische Aktivität von GrB, beziehungsweise der in dieser Arbeit verwendeten GrB Mutante GbR201K, ist maßgeblich von einem freien N-Terminus abhängig. Daher wurde ein EK-Verdau (II.2.2.7) zur Aktivierung der proteolytischen Funktion von GbR201K durchgeführt und in einem GrB-Substratassay bestätigt. In diesem Assay wird die proteolytische Aktivität über die Umsetzung des GrB-Substrates Ac-IETD-*p*NA, welches auf der Protease-Erkennungssequenz von Procaspase-3 basiert, bestimmt. Die proteolytische Freisetzung von *p*-Nitroaniline durch GrB kann bei OD-405nm in einem ELISA-Reader spektrophotometrisch verfolgt werden. Durch einen parallelen Einsatz eines rekombinanten GrB-Standards (Calbiochem) sowie EK-verdaulichem- und unverdaulichem GbR201K-Fusionsprotein wurde die proteolytische Aktivität verglichen und für GbR201K-scFv1711 bestätigt (Abbildung III-19, A, GbR201K-scFv1711\_A). Um den Einfluss der Lagerungsbedingungen des EK-verdaulichen GbR201K-scFv1711 zu prüfen wurde die Funktionalität nach drei Monaten der Lagerung bei -80°C ebenfalls untersucht (Abbildung III-19, GbR201K-scFv1711\_B). Die Proteine und der in äquimolarer Menge eingesetzte GrB-Standard verhielten sich in ihrer enzymatischen Aktivität nahezu gleich. Das nicht verdaute Konstrukt EGbR201K-scFv1711 zeigte keine enzymatische Aktivität.

Die GbR201K-Fusionsproteine wurden ebenfalls auf ihre Bindungsaktivität auf ausgewählten Tumorzelllinien über Durchflusszytometrie getestet. Die Bindungsaktivität von GbR201K-scFv1711 wurde durch den EK-Verdau nicht beeinflusst (Abbildung III-19, B). Sowohl das nicht verdaute EGbR201K-scFv1711 als auch das verdaute GbR201K-scFv1711 zeigten auf den drei ausgewählten EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien A431, L3.6pl und RD eine vergleichbare Bindungsaktivität. Das als nicht-bindendes Kontrollkonstrukt eingesetzte GbR201K-mock zeigte keine Bindung. Ebenso wurden keine unspezifischen Bindungseigenschaften aller Konstrukte auf der Negativzelllinie U937 beobachtet.



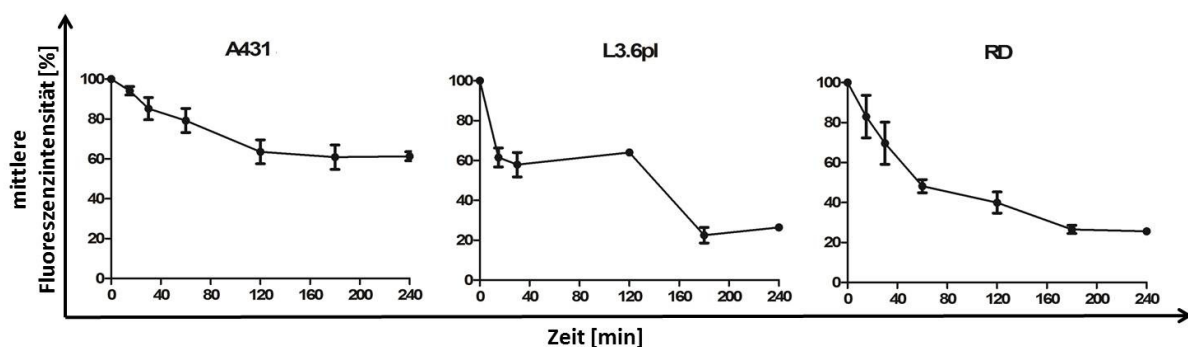


**Abbildung III-19: Enzymatische Aktivität von GbR201K-scFv1711 und seine spezifische Bindungseigenschaft**

Die proteolytische Aktivität von aktiviertem GbR201K-scFv1711 (II.2.2.2) wurde über einen kolorimetrischen auf dem synthetischen GrB-Substrat Ac-IETD-*p*NA, basierenden Assay (II.2.2.8), getestet (A). In einem ELISA-Reader wurde die Kinetik über 1 h in 2 min Intervallen bei 405 nm gemessen (II.2.2.8). Die spezifische Bindungsaktivität des EK-verdauten und nicht-verdauten (E)GbR201K-scFv1711 sowie die von GbR201K-mock wurde über Durchflusszytometrie getestet (II.2.3.1.1). Die Konstrukte wurden mit den EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien (A431, L3.6pl und RD) und den Kontrollzellen (U937) inkubiert und mit  $\alpha$ -his Alexa-488 detektiert (B).

### III.4.1.2 Serumstabilität und Internalisierung

Nachdem der Erhalt der Funktionalität des hCFP nach EK-Verdau dargestellt werden konnte (III.4.1.1), wurde das Internalisierungsverhalten und die Serumstabilität von GbR201K-scFv1711 experimentell untersucht. Die Internalisierung von GbR201K-scFv1711 wurde wie in II.2.3.1.4 beschrieben, durchflusszytometrisch bestimmt. Hier erfolgte die Detektion mit dem  $\alpha$ -his Alexa 488 Ak. Ähnlich wie auch schon für die scFv-ETA' IT beobachtet (III.2.3.1.1), zeigte sich auch für GbR201K-scFv1711 die schnellste Internalisierungsrate mit RD-Zellen, gefolgt von L3.6pl und A431 (Abbildung III-20).



**Abbildung III-20: Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von GbR201K-scFv1711**

Die drei EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien A431, L3.6pl und RD (II.1.9) wurden mit 500 nM von GbR201K-scFv1711 bei 4°C für 30 min inkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 240 min bei 37°C inkubiert (II.2.3.1.4). Detektiert wurde über  $\alpha$ -his Alexa 488. Die als Kontrolle mitgeführte Probe, dauerhaft inkubiert bei 4°C, wurde in der Auswertung als 100%-Wert gesetzt. Die Messungen erfolgten in Duplikaten und wurden mindestens dreimal wiederholt, die Fehlerbalken stellen die Abweichung vom Mittelwert dar.

Die Stabilität von GbR201K-scFv1711 in humanem Serum wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Bestimmung erfolgte indirekt über die residuelle Bindungsaktivität nach Inkubation in Serum (II.2.3.1.5). Um die Bindung des hCFP nachzuweisen erfolgte die Detektion über  $\alpha$ -his Alexa 488, wie auch schon für die Messung der Bindungsaktivität (III.4.1.1) beschrieben. Nach einem Tag Inkubation mit Serum wurde noch etwa 85% Bindungsaktivität nachgewiesen. Auch nach 3 Tagen lag die Bindungsaktivität noch bei über 50%. (Tabelle III-IV).

**Tabelle III-IV Serumstabilität von GbR201K-scFv1711 in humanem Serum**

Abkürzungen: SD (standard deviation/Standardabweichung)

Zeit (Tage)	Bindungsaktivität in %
1	84,930 ( $\pm$ 13,309 SD)
2	67,519 ( $\pm$ 3,562 SD)
3	53,690 ( $\pm$ 0,012 SD)
4	37,845 ( $\pm$ 11,749 SD)
5	7,131 ( $\pm$ 1,881 SD)

### III.4.2 Steigerung der Effizienz von GbR201K-scFv1711 über die endosomolytische Substanz CQ

Um die Effizienz des hCFP GbR201K-scFv1711 zu steigern wurde die endosomolytische Substanz CQ eingesetzt. Mit Hilfe von CQ sollte die endosomale Freisetzung von GbR201K-scFv1711 verbessert und so eine gesteigerte Wirkung des hCFP im Zytosol erreicht werden. In Vorversuchen wurden die zu verwendeten Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an CQ austitriert, um die Menge zu bestimmen bei der CQ keinen proliferationshemmenden Effekt auf die hier eingesetzten Zelllinien hat. Dies war bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M der Fall (Daten nicht gezeigt). In den nachfolgenden Experimenten zum Test der zytotoxischen Aktivität des neuen hCFP GbR201K-scFv1711 wurden jeweils die behandelten und unbehandelten Zellen (nicht mit CQ inkubierten Zellen) verglichen.

#### III.4.2.1 Nachweis der Einwirkung von GbR201K-scFv1711 auf die Zellproliferation und die Apoptose-Induktion

Das zytotoxische Potential des neuen hCFP GbR201K-scFv1711 auf den ausgewählten Zelllinien A431, L3.6pl und RD wurde zum einen über einen Zellviabilitäts-Test und zum anderen über einen AV/PI-Apoptose-Assay gemessen (III.2.3.2). Für den Zellviabilitätstest wurden die drei EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien und die Kontrollzelllinie für 72 h mit dem aktiven EK-verdauten hCFP GbR201K-scFv1711 in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Parallel wurde zur Kontrolle auch das Ursprungs-Fusionsprotein EGbR201K-scFv1711, welches nicht aktiviert wurde, sowie das GbR201K-mock Konstrukt eingesetzt. In jedem Experiment wurden

unbehandelte und mit 50  $\mu\text{M}$  CQ behandelte Zellen verwendet, um eine Änderung des Proliferationsverhaltens bestimmen zu können. Eine gesteigerte Proliferationsinhibierung durch GbR201K-scFv1711 auf A431 und RD Zellen wurde nach CQ-Behandlung nachgewiesen (Abbildung III-21). Auf A431-Zellen wurde nach CQ-Behandlung ein etwa 3-fach höherer  $\text{IC}_{50}$ -Wert erreicht (45,28 nM im Vergleich zu 133,3 nM; Tabelle III-V). Mit RD-Zellen wurde ohne CQ Behandlung nur ein schwacher antiproliferativer Effekt von GbR201K-scFv1711 gemessen. Ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert konnte nicht berechnet werden wohingegen mit CQ behandelten RD-Zellen ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 21,13 nM erreicht wurde. Auf L3.6pl-Zellen wurde ebenfalls ein Effekt von GbR201K-scFv1711 mit und ohne CQ-Behandlung gemessen. Dieser jedoch war so gering, dass kein  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt werden konnte. Die Proliferation der EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937 wurde weder ohne noch mit CQ-Behandlung durch GbR201K-scFv1711 gehemmt (Abbildung III-21). Das zum Vergleich und als Kontrolle eingesetzte EGbR201K-scFv1711 zeigte auf mit CQ behandelten EGFR<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls einen anti-proliferativen Effekt, der jedoch im Vergleich zu GbR201K-scFv1711 schwächer war, ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert konnte nicht bestimmt werden.



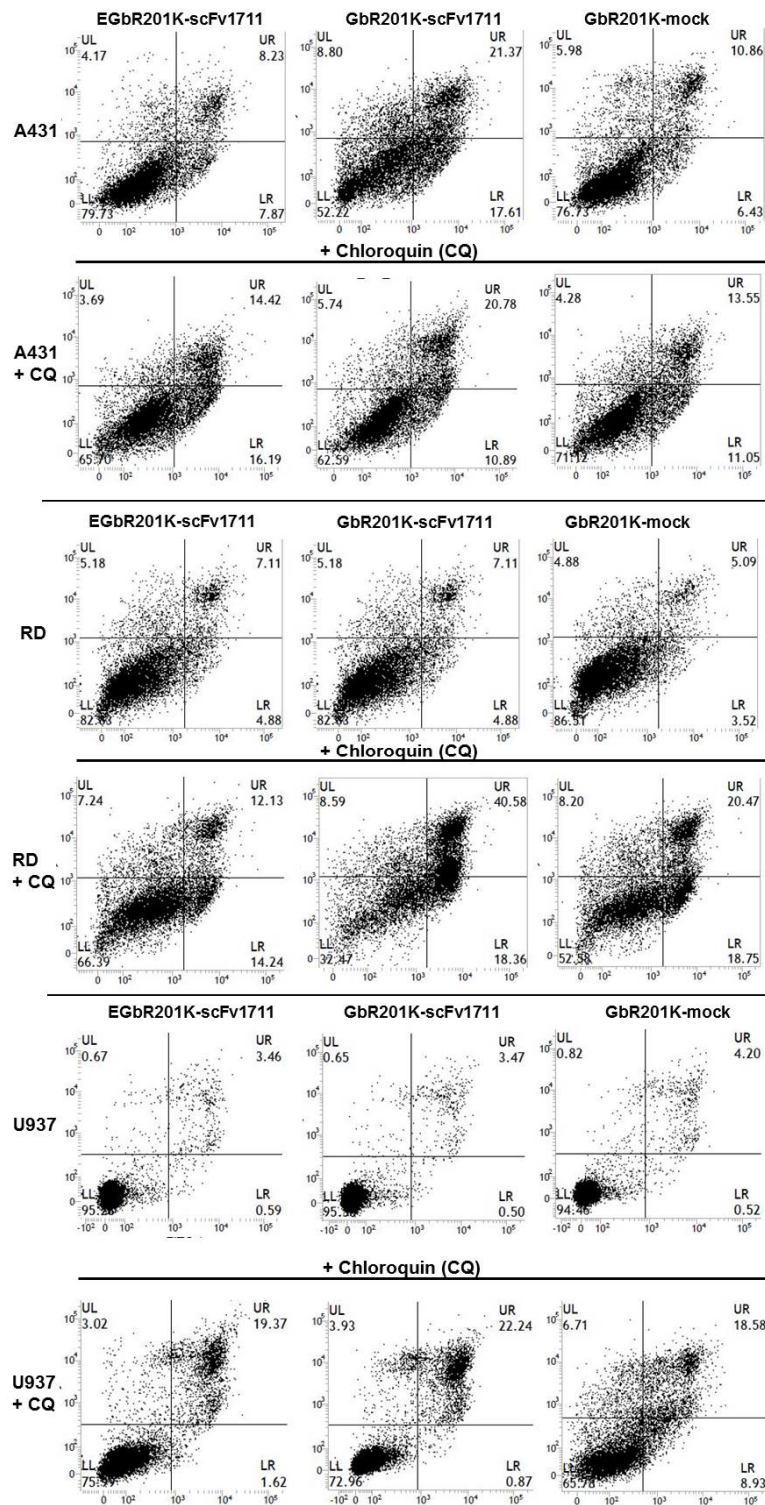
Die rechte Spalte von Abbildung III-21 zeigt die Wirkung von GbR201K-mock auf CQ-unbehandelten und behandelten Zellen. Zusätzlich ist die Pufferkontrolle mit CQ behandelten Zellen aufgeführt. Diese wurde eingesetzt um einen Effekt von CQ auf nicht mit hCFP inkubierten Zellen auszuschließen, auch wenn diese zuvor austitriert wurden. Keine unspezifischen Effekte auf die Zellproliferation wurden gemessen.

**Tabelle III-V IC<sub>50</sub>-Werte von GbR201K-scFv1711 auf den EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien**

Abkürzungen: n.d. (nicht definiert), CQ (Chloroquin), CI (Konfidenzintervall), IC<sub>50</sub> (mittlere inhibierende Konzentration).

<b>Zelllinie:</b>	<b>A431</b>	[95% CI]	<b>RD</b>	[95% CI]:	<b>L3.6pl</b>	[95% CI]:
<b>IC<sub>50</sub> (nM):</b>	133,3	[82,28-216,1]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Zelllinie:</b>	<b>A431</b>	[95% CI] + CQ:	<b>RD</b>	[95% CI] + CQ:	<b>L3.6pl</b>	[95% CI] + CQ:
<b>IC<sub>50</sub> + CQ (nM):</b>	45,28	[32,29-63,51]	21,13	[15,05-29,65]	n.d.	n.d.

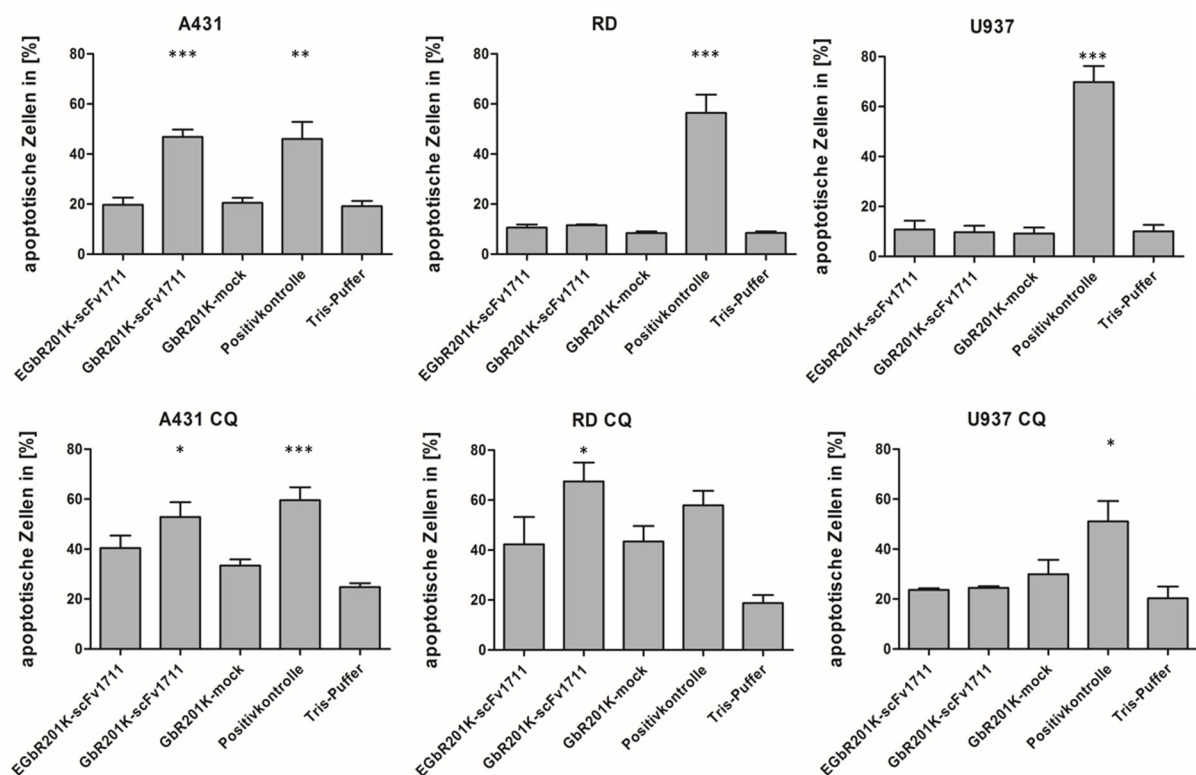
Um das Auslösen von Apoptose von GbR201K-scFv1711 zu bestätigen, wurde neben dem Zellviabilitätstest ein AV/PI-Apoptose Assay durchgeführt. Durch eine spezifische Färbung von Phosphatidylserin über AV-EGFP und eine Kombination mit PI-Färbung wurde wie in (II.2.3.3) beschrieben pro-apoptotische Effekte des hCFP nachgewiesen. Auch hier wurde zwischen den unbehandelten und mit 50 µM CQ behandelten Zellen unterschieden und verglichen. In Abbildung III-22 sind die pro-apoptotischen Effekte von EGbR201K-scFv1711, GbR201K-scFv1711 und GbR201K-mock nach 48 h Inkubation auf den Zielzellen, beispielhaft für eine Messreihe, dargestellt. Da zuvor auf L3.6pl-Zellen keine anti-proliferativen Effekte nachgewiesen wurde, sind für den AV/PI-Apoptose Assay nur A431, RD und U937 aufgeführt.



**Abbildung III-22: Apoptoseinduktion von GbR201K-scFv1711 auf den EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien mit und ohne CQ-Behandlung**

300 nM GbR201K-scFv1711, EGbR201K-scFv1711 und GbR201K-mock (II.2.2.2) wurden für 48 h bei 37° auf mit CQ-behandelten (50 µM) und unbehandelten Zellen inkubiert. Die apoptotischen Effekte wurden über AV/PI – Färbung durchflusszytometrisch gemessen (II.2.3.3). Unterer linker Quadrant: vitale Zellen; unterer rechter Quadrant: früh-apoptotische Zellen; oberer rechter Quadrant: spät-apoptotische/nekrotische Zellen. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentwert an Zellen in der jeweiligen Kategorie an.

In Abbildung III-23 sind die früh- und spätapoptotischen/nekrotischen Effekte der hCFP, der Negativkontrolle GbR201K-mock und des Tris-Puffers sowie die der Positivkontrolle (Camptothecin oder Zeocin) in Balkendiagrammen zusammengefasst dargestellt. Sowohl auf den unbehandelten als auch auf den mit CQ-behandelten A413-Zellen wurde statistisch signifikant Apoptose nachgewiesen. Auf RD-Zellen wurde auf unbehandelten Zellen kein Effekt beobachtet, wohingegen auf CQ-behandelten RD-Zellen bis zu 80% apoptotische Zellen gemessen wurden (entspricht ~ 30% höhere Apoptose-Induktion als bei GbR201K-mock und ~60 % höhere als beim Tris-Puffer). In beiden Zelllinien zeigte das nicht aktivierte EGbR201K-scFv1711 auf CQ-behandelten Zellen ebenfalls einen erhöhten apoptotischen Effekt, welcher aber nicht statistisch signifikant war. Auf beiden Zelllinien lag dieser Apoptose-auslösende Effekt bei ca. 40%, wohingegen der Effekt nach Inkubation mit aktivierten GbR201K-scFv1711 immer höher lag (Abbildung III-23).



**Abbildung III-23: Darstellung der früh- und spät-apoptotischen Effekte von GbR201K-scFv1711**

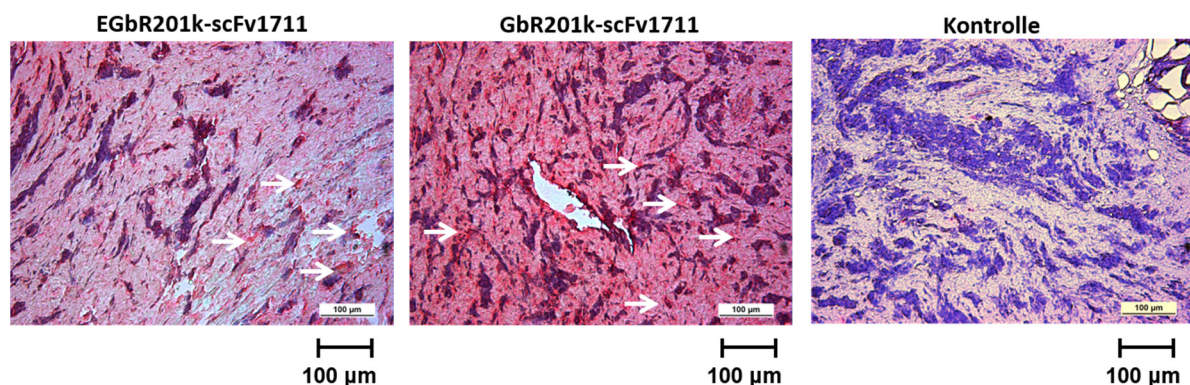
Die Balkendiagramme zeigen die Summe früh- und spätapoptotischer/nekrotischer Zellen (Abbildung III-22) nach Behandlung mit EGbR201K-scFv1711, GbR201K-scFv1711, GbR201K-mock (II.2.2.2), der Positivkontrolle oder Puffer. Die Experimente wurden in Duplikaten mindestens dreimal durchgeführt (II.2.3.3). Die Abweichung vom Mittelwert wird über die Fehlerbalken demonstriert. Statistische Analysen wurden mittels des „two-tailed Student's *t* test“ durchgeführt, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  im Vergleich zur jeweiligen Gb-mock Kontrolle. (n=3)



Generell wurden nach Behandlung der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  CQ auf allen Zelllinien inklusive der EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937, schon mit der Pufferkontrolle 20 % mehr Apoptose gemessen wie mit unbehandelten Zellen. Dies war aufgrund der Apoptose-auslösenden Eigenschaft von CQ zu erwarten.

### III.4.3 Ex vivo Bindungsbestätigung auf humanem Patientenmaterial

Die Bindungseigenschaft des neuen hCFPs auf Primärmaterial (FFPE-Schnitte) wurde beispielhaft auf RMS-Biopsien dargestellt. Es wurden aktiviertes GbR201K-scFv1711 und nicht-aktiviertes EGbR201K-scFv1711 eingesetzt und auf den Schnitten inkubiert (II.2.4.1). Die Detektion erfolgte für EGbR201K-scFv1711 und GbR201K-scFv1711 über den  $\alpha$ -his-Ak und  $\text{G}\alpha\text{M}^{\text{AP}}$ . Die spezifische Bindung des hCFPs wurde über New Fuchsin-Färbung und das Vorhandensein von Tumorzellen über H&E Färbung nachgewiesen. Die Negativ-Kontrolle zeigte keine unspezifische Färbung (Abbildung III-24).



**Abbildung III-24: Bindung von EGbR201K-scFv1711 und GbR201K-scFv1711 auf Primärmaterial**

Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Primärtumormaterial mit EGbR201K-scFv1711 und GbR201K-scFv1711 (II.2.4.1). Die rot-gefärbten EGFR<sup>+</sup>-Tumorzellen der RMS-Biopsien sind über Pfeile beispielhaft markiert. Als Kontrolle wurde nur der Detektions-Ak ohne hCFP inkubiert ( $\alpha$ -his/ $\text{G}\alpha\text{M}^{\text{AP}}$ ). Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ , Objektiv: 10 x

Mit diesem Ergebnis wurde neben der beschriebenen spezifischen Bindungsaktivität auf verschiedenen ausgewählten EGFR<sup>+</sup>-Zellen *in vitro* (III.4.1.1), die Bindung von GbR201K-scFv1711 auch *ex vivo* auf einer ausgewählten Tumorentität dargestellt.

## IV. Diskussion

Der EGFR als Tumor-assoziiertes Oberflächenantigen eignet sich ideal als Zielstruktur für Ak-basierte therapeutische und diagnostische Ansätze, da der Rezeptor in einer Vielzahl von soliden Tumoren überexprimiert, in gesunden Zellen aber nur gering exprimiert wird [48]. EGFR-spezifische mAk wie Cetuximab und Panitumumab sind als Therapeutikum zugelassen. Um unter anderem die Gewebspenetration zu erhöhen wurde im Rahmen dieser Arbeit von diesen mAk abgeleitete scFvs konstruiert und ihr Potential für zielgerichtete diagnostische und therapeutische Ansätze getestet. Die Funktionalität der neuen scFvs wurde in Fusion mit dem SNAP-Tag *in vitro* und *in vivo* untersucht. Nach den erfolgreichen Funktionalitätsstudien wurden diese scFvs als „proof of concept“ mit dem bereits etablierten Toxin ETA' fusioniert. Rekombinante IT und hCFP auf Basis von Ak-Fragmenten wie scFvs sind als spezifische zielgerichtete therapeutische Ansätze in soliden Tumoren von großem Interesse. Die resultierenden IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' verbanden die spezifischen Bindungseigenschaften des Vollängenantikörpers mit der zell-eliminierenden Funktion des Toxins ETA'. Beide IT konnten *in vitro* und *ex vivo* auf diversen soliden Tumoren charakterisiert werden, Zielzellen-spezifische Bindung, Zytotoxizität und Apoptose-Induktion wurden im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich nachgewiesen. Um die Immunogenität zu reduzieren wurde unter Benutzung des humanen Ak-Fragments, dem scFv1711, ein Fusionsprotein mit der humanen Serinprotease GrB entwickelt. Somit wurde ein neues hCFP das GbR201K-scFv1711 generiert, welches zytotoxische und pro-apoptotische Effekte auf ausgewählten soliden Tumorzelllinien zeigte.

### IV.1 Herstellung und funktionelle Charakterisierung der neuen EGFR-spezifischen scFvs

Eine große Herausforderung und ein Hindernis für die erfolgreiche Behandlung von soliden Tumoren besteht in den ruhenden und meist Chemotherapie-resistenten Krebszellen bzw. Tumorstammzellen welche Hauptgrund für das Wiederauftreten des Tumors und dem Ausbilden von Metastasen sind [77, 125]. Die Entwicklung alternativer Therapieformen welche gezielt Tumorzellen und Tumorstammzellen töten, ist daher von großer Notwendigkeit. Zwar finden die spezifisch an den EGFR bindende mAk Cetuximab und Panitumumab, in der Klinik Verwendung, jedoch zeigt der Einsatz eines einzelnen mAk in Patienten mit soliden Tumoren oft eine schlechte Therapie-Effizienz. An der Kombination von mAk mit Zell-eliminierenden Komponenten wird daher gearbeitet [44, 82]. Rekombinante IT die als Bindedomäne einen scFv

anstelle eines Vollängen-Ak besitzen sind gerade bei der Therapie von soliden Tumoren von Vorteil. Neben der verbesserten Tumorpenetration, verursachen sie aufgrund der wegfallenden Fc-Domäne weniger unerwünschte Nebeneffekte, die Herstellung ist einfacher und die spezifische Bindungseigenschaft des Vollängen-Ak bleibt erhalten [7, 33, 126].

Aufgrund dessen wurden von den beiden zugelassenen mAk Panitumumab und Cetuximab die scFv-Sequenzen abgeleitet und die entsprechenden DNA-Konstrukte synthetisiert. Um vor dem therapeutischen Einsatz die Funktionalität der neuen scFvs zu testen, wurden diese in N-terminaler Orientierung mit dem SNAP-Tag fusioniert und erfolgreich in HEK 293T-Zellen exprimiert. Die transiente Expression über das pMS-Vektor-System erlaubt eine schnelle Selektion der erfolgreich transfizierten und Protein-produzierenden Zellen. Das Vektorsystem beinhaltet ein EGFP-Reportergen, welches mit dem Zielprotein auf einer bicistronischen Boten-RNA (mRNA, messenger RNA) über eine interne ribosomale Eintrittsstelle ko-exprimiert wird. So kann das Expressionslevel des Zielproteins direkt über die Korrelation der Expression von EGFP abgeschätzt werden [114, 121]. Die Ausbeute für die gereinigten Proteine lag für scFv2112-SNAP bei 5 mg/L und für scFv1711-SNAP bei bis zu 10 mg/L (Abbildung III-2, [121]). Diese Ausbeuten liegen im gleichen Rahmen oder sind höher wie die von bereits publizierten, in HEK 293T-Zellen exprimierten scFv-SNAP Fusionsproteinen [103, 104]. SNAP-Tag Fusionsproteine wurden auch in prokaryotischen Zellen (*E.coli*) und Hefen produziert, aber es konnten keine hohen Proteinausbeuten erreicht werden [127]. Mit den in Hefen produzierten SNAP-scFv800E6 spezifisch für HER-2 wurde eine geringe Ausbeute von 1,5 mg/L erreicht und es zeigten sich Probleme in der Protein-Expressionsrate und Stabilität [107]. Die neuen scFv-SNAP Fusionsproteine zeigten neben der besseren Ausbeute auch einen hohen Reinheitsgrad von 70-90% je nach Reinigung und Konstrukt, was besonders für einen *in vivo* Einsatz vorteilhaft ist und weiterhin zusätzliche Reinigungsschritte nicht zwingend notwendig macht. Um das Potential von neuen scFvs zu bestimmen ist es wichtig ihre spezifische Bindungseigenschaft und das Internalisierungsverhalten zu Beginn zu analysieren. Für rekombinante scFv-basierte IT ist nach der spezifischen Bindung an die Zellmembran eine effiziente Internalisierung nötig um einen starken zytotoxischen Effekt in den Zielzellen zu erreichen [72]. Genau zu diesem Zweck sollten beide scFvs als SNAP-Tag Fusionsproteine für Funktionalitätstests vorliegen. Der SNAP-Tag erlaubt eine schnelle, einfache, spezifische und flexible Methode, um Proteine stabil mit Fluorophoren kovalent zu koppeln und für verschiedenen Fragestellungen einzusetzen [103, 105]. Die Aktivität des SNAP-Tags nach Kopplung der beiden Fusionsproteine mit BG-488 wurde erfolgreich dargestellt. Die

spezifische Bindeaktivität an die verschiedenen Zielzellen wurde sowohl direkt über die Farbstoffmarkierung mit BG-488 als auch über die indirekte Detektion mit dem SNAP-spezifischen Ak im Durchflusszytometer nachgewiesen. Dabei wurden über die Detektion mit den beschriebenen Nachweis-Ak im Vergleich zu den mit BG-488 markierten SNAP-Fusionen, aufgrund der höheren Fluoreszenzintensität von PE stärkere Signale gemessen. Ein weiterer Grund für die höheren MFI-Werte ist die Amplifikation des Signals aufgrund mehrerer Bindungsstellen bei der indirekten Detektion (Abbildung III-3). Es wurden Zelllinien von vier verschiedenen soliden Tumorentitäten getestet (Prostata- und Pankreaskarzinom, RMS und Brustkrebs). A431 wurde zusätzlich als stark EGFR-exprimierende Plattenepithelkarzinom-Modellzelllinie in allen Messungen mitgeführt. Keine unspezifische Reaktion wurde auf der EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie U937 beobachtet. Beide neuen scFvs behielten also auch nach der Übertragung in das scFv-Format und nach der Fusion mit dem SNAP-Tag ihre spezifischen Bindeeigenschaften bei und es kam nicht zu einer Konformationsänderung die die Bindeaktivität beeinflussen könnte. Weiterhin wurde Internalisierungsverhalten und Zeitpunkt bestimmt. Sowohl bei scFv1711-SNAP als auch bei scFv2112-SNAP wurde bereits nach weniger als 30 min Internalisierung in RD Zellen beobachtet. Nach 60 min zeigte sich Internalisierung in allen Zelllinien (Abbildung III-4). Das als Referenzkonstrukt eingesetzte 425(scFv)-SNAP zeigte erst nach 80 min Internalisierung (Abbildung III-4, [121]). Ein ähnliches Verhalten von 425(scFv)-SNAP wurde in vorangegangenen Studien bei der Internalisierung in RD-Zellen dargestellt und mit L3.6pl Zellen wurde Internalisierung nach 60 min gemessen [5, 68]. Im Vergleich zu anderen scFv-SNAP Fusionsproteinen war die Internalisierungszeit von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP vergleichbar oder schneller. Beispielsweise zeigten Colombo *et al.* mit dem Konstrukt SSMFN (SNAP-scFv800E6 konjugiert an magnetische fluoreszierenden Nanokristalle, MFN) nach 60 min Inkubation Internalisierung in HER-2 positive Brustkrebszelllinien [107]. Die im Vergleich dazu schnelle Internalisierungsrate der neuen scFvs hat auch Auswirkungen auf den Einsatz der scFvs in IT oder hCFP. Dies wird in Zusammenhang mit diesen Konstrukten später diskutiert.

#### **IV.1.1 Vergleichende Studien mit den parentalen Volllängenantikörpern**

Die Epitope die von Cetuximab und Panitumumab erkannt werden sind ähnlich aber nicht vollkommen gleich. Cetuximab erkennt ein konformationelles Epitop der extrazellulären Domäne III, wohingegen die exakte Bindungsstelle von Panitumumab bisher noch nicht vollständig entschlüsselt wurde [122]. Beide mAks binden vermutlich benachbarte Epitope und es wird vermutet, dass das von Panitumumab erkannte Epitop teilweise mit dem von Cetuximab

überlappt [9, 122, 128]. Bezüglich des Wettbewerbsverhaltens zeigten die neuen scFvs und die parentalen mAk wie erwartet ein vergleichbares Verhalten. ScFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP inhibieren sich wie die mAk gegenseitig, bei beiden Paarungen auch in entgegengesetzter Kombination (Abbildung III-5). Diese Beobachtung machten auch Alvarenga *et al.* in SPR und ITC (isothermal titration calorimetry)-Studien, es wurde gezeigt, dass beide mAk sich gegenseitig in Ihrer Bindung an die extrazelluläre EGFR-Domäne hindern [128]. Jedoch war in unseren Messungen zu beobachten, dass bei einer Präinkubation eines 5-10 fachen molaren Überschusses von Cetuximab oder scFv2112-SNAP als Kompetitor ein schwächerer Effekt der Inhibierung auftrat (Abbildung III-5). Um eine klare Aussage zu treffen wieso dieser schwächere Inhibierungseffekt zu Stande kommt, sind weitere Experimente besonders im Bereich der Epitopbestimmung nötig. Bezüglich der Affinitäten ist bekannt das Panitumumab (50 pM) eine höhere Affinität aufweist als Cetuximab (200, 390 oder 490 pM) [129-131]. Saxena *et al.* bestätigten das Panitumumab zwar eine höhere Affinität aufweist als Cetuximab oder Necitumumab, einem weiteren humanen EGFR-spezifischen mAk, aber dies führte nicht zu einer verbesserten Blockierung der Rezeptoraktivierung [132, 133]. In unseren Messungen mit einem rekombinanten EGFR-his-Antigen, dessen Sequenz aus A431-Zellen isoliert wurde, erreichten wir für Panitumumab (1,25 nM) und Cetuximab (1,67 nM) höhere  $K_D$ -Werte als beschrieben (Abbildung III-8). Die besten Messergebnisse mit den scFv-SNAP Fragmenten wurden unter Benutzung von HBS-EP Laufpuffer an Stelle von PBS und bei 10°C statt 37°C erreicht. Demnach wurden die SPR-Messungen der parentalen mAk an diese Konditionen angepasst, was nicht unbedingt den Standard-SPR Bedingungen für die Messung von therapeutischen Ak entsprach. Zudem wurden die publizierten  $K_D$ -Werte für Panitumumab beispielsweise mit membran-ständigen EGFR, welches aus Bakulovirus-infizierten Insektenzellen gewonnen wurde, gemessen und sind damit nicht direkt vergleichbar [134, 135]. Jedoch zeigte Alvarenga *et al.* in einer Messung für Cetuximab eine  $K_D$  von 1,24 nM und für Panitumumab eine  $K_D$  von 0,95 nM. Die SPR-Messung erfolgte über einen Protein-A Chip und mit der extrazellulären Domäne des EGFR isoliert aus A431-Zellen [128]. Die Messungen wurden unter ähnlichen Pufferbedingungen und ähnlichen Zeiten für das Fangen der mAk auf der Protein-A-Oberfläche gemessen wie die unsrigen. Diese Werte nähern sich den von uns erzielten viel besser an als die zuvor genannten. Weiterhin ist ein Dimerisierungs-Effekt des EGFR bzw. der extrazellulären Domäne nach Ligandenbindung bekannt und die Dimerisierung kann einen Einfluss auf die Affinität haben [136]. Zusätzlich könnte die Reinigung der extrazellulären Domäne des EGFR über den His-tag, zu Problemen in der Protein-Aktivität

geführt haben [137]. Die Werte von Alvarenga *et al.* wurden mit unseren Messungen bestätigt. Die sonstigen hier aufgeführten Gründe könnten zu den Unterschieden der anderen publizierten Werte und den hier beschriebenen geführt haben.

Da scFvs im Gegensatz zu mAks nur eine Bindungsdomäne besitzen, reduziert dies die Avidität/Gesamtbindingstärke und somit wird auch eine geringere Affinitätskonstante erwartet [42, 64]. Je höher die Affinität eines Liganden in einem Konjugat aus Ligand und Toxin ist, desto niedriger wird die einzusetzende Konzentration des Konjugates. Ein scFv als Teil eines IT mit einer nanomolaren Affinität belegt in einer bis zu 1000-fach geringeren Konzentration die Rezeptor-Bindestellen als einer mit einer mikromolaren Affinität [138]. Srinivasarao *et al.* empfehlen das eine  $K_D$  welche geringer als  $\sim 10$  nM ist, für Liganden die in der zielgerichteten Therapie eingesetzt werden, angestrebt werden sollte [138]. Es existieren Ansätze zur Bestimmung der Affinität von scFvs über SPR, wie z.B. über die EDC/NHS - Chemie und der direkten Immobilisierung des Sensor-Chips mit dem Antigen oder auch über Biotin/Streptavidin-Kopplung [139, 140]. Ein System zur Ausnutzung des SNAP-Tags für die Bestimmung der Affinität von scFvs stand bisher jedoch noch nicht zur Verfügung. Daher war ein Ziel dieser Arbeit ein simples, schnelles und regenerierbares System für diese Messung zu etablieren. Es wurde ein System unter Benutzung des sogenannten „Biotin CAPture Kits“ eingesetzt. Die kovalente Markierung von scFv-SNAP Fusionsproteinen mit BG-Biotin ist eine schnelle und einfache Reaktion und scFv-SNAP-BG-Biotin kann so auf der Oberfläche des Sensorchips gefangen werden. Das System ist regenerierbar und wurde über die beiden genutzten scFvs etabliert und die geeignetsten Messbedingungen austitriert, so dass einfach und schnell viele weitere scFv-SNAP Fusionsproteine auf ihre Affinität hin getestet werden könnten. Die von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP gemessenen  $K_D$ -Werte lagen für beide in etwa bei 3,9 nM (Abbildung III-7), was für scFvs ein sehr guter Wert ist. Zhou *et al.* verglichen  $K_D$ -Werte von acht verschiedenen EGFR-spezifischen scFvs, den dazugehörigen Fab-Fragmenten und den Ak. Die  $K_D$ -Werte der scFvs lagen zwischen etwa 264 und 1 nM, die dazugehörigen  $K_D$ -Werte der Ak lagen zwischen 1,17 und 0,006 nM [141]. Der C10 mAks zeigte beispielsweise eine  $K_D$  von 1,17 nM und der dazugehörige scFv eine  $K_D$  von etwa 264 nM, P2/2 mAks eine  $K_D$  von 0,0077 nM und P2/2-scFv eine  $K_D$  von 17,01 nM [141]. Der Verlust an Affinität im Vergleich zu den mAks von scFv1711 und scFv2112 war nur sehr gering, nicht wie bei Zhou *et al.* dargestellt. Der Aufbau des Assays ist aber auch nicht direkt vergleichbar. Die Messung erfolgte über einen sogenannten „Kinetic exclusion Assay“ auf A431 Zellen und nicht über SPR-Messung. Weiterhin wurden in unseren Messungen zwei unterschiedliche Chip-

Systeme verwendet. Zum einen ein Chip mit einer Protein-A Oberfläche für die mAk und zum anderen der Sensor Chip-CAP des „Biotin CAPture“ Kits für die scFv-SNAP Konstrukte, was ein Grund für die geringen Unterschiede in den gemessenen Werten sein kann. Mit der Bestimmung der Affinität beider neuen scFvs wurde dennoch ein weiterer wichtiger Funktionalitätstest etabliert.

#### **IV.1.2 Die SNAP-Tag Technologie und ihr Einsatz in der *in vivo***

##### **Bildgebung**

Für den Einsatz von scFv2112-SNAP in der *in vivo* Bildgebung sollte ein subkutanes Prostatatumormodell etabliert werden. Laut Literatur existieren zwar einige Ansätze in der *in vivo* optischen Bildgebung auf Basis des EGFR, aber nur wenige im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom. Beispielsweise wurden Panitumumab, der natürliche Ligand EGF und ein EGFR-spezifischer „Affibody“ mit dem IRDye-800CW Farbstoff markiert und *in vivo* untersucht, sowohl als Bildgebungsprobe für den Wildtyp-EGFR als auch für die mutierte Form EGFRvIII. EGF-800CW wurde darüber hinaus auch in orthotopen Prostatakarzinommodellen mit PC-3M-LN4 Zellen eingesetzt [142, 143]. Cetuximab wurde ebenfalls sowohl als optische Bildgebungssonde markiert mit Cy5.5 oder auch in der PET-oder SPECT-Bildgebung analysiert [144]. Verschiedene scFvs wurden bereits mit Fluoreszenz-Markern oder Quantum Dots gekoppelt und *in vivo* eingesetzt. Das Qdot-GRP78-scFv Konjugat beispielsweise wurde in einem Brustkrebs-Xenograft Tumormodell erfolgreich evaluiert. GRP78 ist ein im ER vorkommendes Protein welches eine wichtige Rolle in der Proliferation und Angiogenese von Krebszellen spielt [145]. Der Einsatz von scFvs als Bildgebungssonde in Verbindung mit dem SNAP-Tag *in vivo* hat mehrere Vorteile. Erstens zeigt ein scFv im Gegensatz zu anderen Ak-Formaten, wie z.B. Vollängen-Ak, durch seine geringe Größe eine bessere Tumورpenetration. Damit verbunden ist also auch eine gute Anreicherung im Tumorgewebe. Die schnelle Internalisierung *in vitro* von scFv-SNAP Fusionen könnte ebenfalls zur erhöhten Akkumulation am Tumor beitragen [68]. Zweitens zeigen scFv-Fusionen eine schnelle Ausscheidung aus dem Blutkreislauf innerhalb von Minuten bis Stunden [66]. Durch die Fusion mit dem SNAP-Tag entsteht ein Molekül mit einer Größe von etwa 48 kDa. Proteine die kleiner als 60 kDa zeigen im Allgemeinen eine schnellere renale Filtrationsrate als größere Proteine [146]. Dies stellt beispielsweise einen pharmakokinetischen Vorteil in der Radiotherapie gegenüber mAk dar. Die schnelle Ausscheidung minimiert den Kontakt von radioaktiven Proben mit gesundem Gewebe und damit mögliche unerwünschte Nebenwirkungen [66]. Drittens werden durch die Fusion mit dem SNAP-Tag die Bindungseigenschaften des scFv nicht beeinflusst und es

entstehen dadurch keine unspezifischen Bindeaktivitäten [68, 108]. Vollängen-Ak werden meist chemisch modifiziert und konjugiert um als Bildgebungssonden oder in der Pharmakokinetik eingesetzt zu werden. Die chemische Modifikation über „cross-linking“ ist aber nicht ortsspezifisch („site-specific“) und kann zu inhomogenen Produkten führen. Weiterhin müssen bei diesen Kopplungsreaktionen oft reaktive Reagenzien eingesetzt werden, um eine nukleophile Reaktion der Ak mit den Konjugat zu ermöglichen, diese aggressiven Stoffe können möglicherweise zu einer Auffaltung führen. Dies kann negativen Einfluss auf das Bindungs- und Internalisierungsverhalten der konjugierten mAk haben [68, 109]. Der Einsatz von sogenannten „self-labeling“ Proteinen wie dem SNAP-Tag erlaubt somit eine genaue und homogene Kopplung der Fusionsproteine mit Farbstoffen oder anderen Konjugaten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein subkutanes Prostatakarzinom-Mausmodell gewählt. Sowohl in Pankreas-Tumormodellen als auch in einem Tumormodell mit A431-Zellen wurden bereits scFv-SNAP Fusionsproteine erfolgreich als Bildgebungssonden eingesetzt, unter anderem auch das als Referenzkonstrukt eingesetzte 425(scFv)-SNAP Fusionsprotein [68, 83, 147]. Für das Prostatakarzinom-Modell wurde die, bereits in den *in vitro* Experimenten eingesetzte C4-2 Zelllinie stabil mit dem rot fluoreszierenden Protein Katushka transfiziert. In vorangegangenen Versuchen wurden ebenfalls Katushka-transfizierte oder GFP-transfizierte Tumorzellen in subkutanen Tumormodellen erfolgreich eingesetzt [68, 83]. Über die direkte Fluoreszenzmarkierung der Tumorzellen und der Ko-Lokalisierung mit den scFv-SNAP Sonden wird die Visualisierung des Tumorwachstums ermöglicht. Jedoch kam es weder mit transfizierten C4-2 Zellen noch mit nicht-transfizierten Zellen zu einer Tumorakkumulation in den Versuchstieren, auch nach Änderung der Zellzahl und dem Einsatz von Matrigel. C4-2 Zellen wurden bereits *in vivo* eingesetzt, jedoch in SCID-Mäusen. In dieser Arbeit wurden BALB-c nu/nu Tiere eingesetzt, da bei Nacktmäusen nicht das Problem der Hintergrundfluoreszenz des Fells auftritt. [148]. Im Unterschied zu SCID-Mäusen besitzen BALB-c nu/nu Mäuse funktionale B-Lymphozyten. Es könnte bei diesem Mausstamm also zu einer Ak-Antwort gegen die Tumorzellen und damit zu einer Abstoßung der Tumorzellen kommen. Probleme beim Anwachsen von LNCaP-Zellen und deren Subzelllinien wie C4-2 im Tiermodell, auch in BALB-c nu/nu Mäusen, sind beschrieben und der Einsatz von z.B. Matrigel (welches auch in den vorliegenden Experimenten eingesetzt wurde) wird empfohlen. Matrigel ist eine basalmembranartige Matrix, die als Wachstumsgrundlage dient und die Effizienz des Anwachsens von Tumorzellen *in vivo* erhöhen kann [149]. Zusätzlich sind Unterschiede von in



verschiedenen Laboren *in vitro* kultivierten LNCaP-Zellen bekannt [150]. Dies könnten Gründe für das Nicht-Anwachsen der Zellen gewesen sein. Aufgrund dessen wurde eine alternative EGFR-exprimierende Prostatakarzinomzelllinie eingesetzt, die aus Knochenmetastasen isolierte Zelllinie PC-3. Mit dieser Zelllinie, welche nicht mit dem Katushka-Protein transfiziert war, kam es zu einer Tumorakkumulation in den Versuchstieren. Die Verdopplungszeit von PC-3-Zellen liegt bei etwa 38,5 h und die von LNCaP bei etwa 60 h. Weiterhin gilt PC-3 als stark metastasierende Zelllinie und LNCaP als kaum metastasierend und nicht-invasive Zelllinie [151]. Liu *et al.* untersuchten das Invasionsverhalten von PC-3 im Vergleich zu LNCaP auf einem *in vitro* Gewebemodell und demonstrierten eine geringere Invasionsrate- und Effizienz von LNCaP im Vergleich zu PC-3 [151]. Auch wenn dies nicht direkt mit einem *in vivo* Modell vergleichbar ist, könnte es einen Anhaltspunkt bezüglich des Nicht-Anwachsens der C4-2 Zellen und das Anwachsen der PC-3 Zellen sein. Ein direkter Vergleich von C4-2 und PC-3 Zellen wurde in der Literatur nicht gefunden. Das scFv2112-SNAP Konstrukt wurde in Vorversuchen mit der PC-3 Zelllinie *in vitro* getestet und zeigte spezifische Bindung und schnelle Internalisierung (Abbildung III-9). ScFv2112-SNAP wurde mit dem NIR-Farbstoff BG-800CW und ebenfalls mit dem tief-roten Farbstoff BG-747 markiert. Die Injektion und Messung über das Maestro-Bildgebungsgerät erfolgte in Anlehnung an Kampmeier *et al.* [68]. Fluorophore im nah-infraroten und tief-roten Bereich haben eine hohe Gewebspenetration und wenig Autofluoreszenz. Daher können Tumore und Metastasen auch in tieferen Gewebsschichten optisch dargestellt werden [152]. Potentiell können das Katushka Signal welches im rot fluoreszierenden Bereich liegt ( Ex 588 nm, Em 635 nm) und ein NIR-Signal von BG-800CW (Ex 774 nm, Em 795 nm) optimal entmischt und voneinander unterschieden werden, auch eine Entmischung mit dem BG-747 Farbstoff im tief-roten Bereich ist noch möglich. Neben der EGFR<sup>+</sup> PC-3-Zelllinie wurde ebenfalls die EGFR<sup>-</sup>-Zelllinie L540cy als Kontrollzelllinie eingesetzt. Nach der retro-orbitalen Injektion von scFv2112-SNAP-BG-800CW wurde in der ersten Aufnahme im Maestro-Bildgebungsgerät 30 min nach Injektion eine Akkumulation in der Niere detektiert. Die Anreicherung von Fluoreszenzfarbstoffen in der Niere deutet auf die typische Ausscheidung über die renale Filtration hin [68, 153]. Darüber hinaus wurden Signale in der Blase und im Urin nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), das Signal in den Nieren blieb bei den PC-3 tumortragenden Versuchstieren länger detektierbar als bei den L540cy-tumortragenden Versuchstieren in denen scFv2112-SNAP-BG-747 eingesetzt wurde. Der BG-747 Farbstoff scheint weniger Hintergrundfluoreszenz und eine kürzere Verweilzeit zu besitzen, denn ein Signal in den Nieren konnte nach 24h nicht mehr detektiert werden,

wohingegen bei den PC-3-Tumortragenden Tieren mit scFv2112-BG-800CW noch nach 72 h ein schwaches Signal in den Nieren detektiert wurde. Da der BG-747 Farbstoff kommerziell nicht mehr verfügbar war, stand der BG-800CW Farbstoff im Fokus der Versuche mit der Positivzelllinie. Weiterhin war ein Signal im Bereich des Magens sichtbar (PC-3 Tumortragende Tiere, 10 h und 36 h Aufnahme, Abbildung III-10). Alle Versuchstiere wurden zuvor auf eine Diät mit Spezialfutter gesetzt um die Hintergrundfluoreszenz im Verdauungstrakt gering zu halten. Das trotzdem hier sichtbare Signal könnte dadurch erklärbar sein, dass in Säugetieren Fluorophore, Toxine o.ä. ständig über die Leber abgebaut und über die Galle abgesondert werden und so in den Verdauungstrakt gelangen können [68]. Der Erfolg des subkutanen Modells in Kombination mit scFv2112-SNAP-BG-800CW konnte über die Akkumulation und Detektion des BG-800CW-Signals in den subkutanen Tumoren in beiden Flanken dokumentiert werden. Auch 72 h nach Injektion konnte noch ein schwaches Signal im Tumor detektiert werden (Abbildung III-10). Der BG-800CW Farbstoff wies jedoch einen unvorteilhaft hohen Hintergrund auf, so dass eine vollständige Entmischung und die Bestimmung eines Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisses nicht möglich war. Die hohe Hintergrundfluoreszenz unter Benutzung von BG-800CW im Gewebe wurde ebenfalls von Gong *et al.* dokumentiert, hier wurde das Fusionsprotein SNAP<sub>f</sub>-ADR $\beta$ 2 (adrenerger Rezeptor) mit BG-800CW in SK-OV-3 Xenograft Mausmodellen eingesetzt. SNAP<sub>f</sub> ist eine mutierte „fast labeling“ Variante des SNAP-Tags [154, 155].

Ein zusätzlicher Vorteil der SNAP-Tag Technologie ist der humane Ursprung des SNAP-Tags, basierend auf dem humanen AGT-Protein. Dadurch wird das Risiko von Immunantworten reduziert, denn scFv-SNAP Fusionsproteine können potentiell auch in der Theranostik, der simultanen Diagnostik und Behandlung, eingesetzt werden [108, 109]. Photoimmun-Theranostika-Ansätze wie das Konstrukt 425(scFv)-SNAP-Ce6 können über die SNAP-Tag Technologie kontrolliert hergestellt werden und die molekulare Bildgebung kann mit der Photoimmuntherapie verknüpft und kombiniert werden. Dieses Photoimmun-Theranostika zeigte auf EGFR-exprimierenden Brustkrebs-Zelllinien und auf A431-Zellen nach Bestrahlung mit NIR-Licht eine spezifische dosisabhängige Inhibierung der Zellviabilität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 48 nM mit A431 oder 38 nM mit MDA-MB-468-Zellen. Caspase-abhängige apoptotische Effekte konnten ebenfalls nachgewiesen werden [108]. Weitere Ansätze von scFv-SNAP Fusionsproteinen im Bereich der Theranostik sind demnach durchaus denkbar. Ein weiterer interessanter Ansatz ist das sogenannte Pre-Targeting [156]. Leonidova *et al.* evaluierten in diesem Zusammenhang einen Ansatz mit Cetuximab. Dieser mAk wurde mit PNA (peptid

nucleic acid) kombiniert und tumortragenden Mäusen (A431-Zellen) injiziert. Daraufhin reicherte sich das Ak-PNA-Konjugat am Tumor an. Danach erfolgte die Gabe des komplementären radioaktiv mit Technetium-99 markierten, PNA-Molekül, welches mit dem mAk-PNA-Konjugat am Tumor hybridisieren konnte. Diese schnelle und effiziente *in vivo* Hybridisierung führte zu hoch spezifischer Akkumulation am Tumor [156]. In einem anderen Zusammenhang entwickelten Gholami *et al.* BG-modifizierte SNAP-PNA Konstrukte um das Verklumpungs-Verhalten von Fusionsproteinen mit und ohne Fluoreszenzmarkierung zu untersuchen [157]. Würde man beide Ansätze kombinieren, könnte man den SNAP-Tag und möglicherweise auch scFv2112-SNAP oder scFv1711-SNAP in dem von Leonidova *et al.* vorgestellten Pre-Targeting Ansatz effizient einsetzen.

## **IV.2 Herstellung und Charakterisierung von scFv-basierten IT**

Der Einsatz von IT oder Immunkonjugaten, welche die Zielzellen nach Internalisierung direkt in den Zelltod zwingen, hat in der zielgerichteten Therapie solider Krebsarten mehr und mehr an Bedeutung gewonnen [69, 158]. Gerade solide Tumore sind schwer zu therapieren, da die Tumorpenetration von großen Molekülen durch die physikalischen und biologischen Eigenschaften von soliden Tumoren inhibiert wird, wie das Fehlen funktioneller Lymphgefäße oder unregelmäßige Vaskularisierung [159]. Durch die Entwicklung rekombinanter IT mit scFvs als Bindedomäne konnte aufgrund ihrer Größe die schlechte Tumorpenetration von IT der I. oder II. Generation oder auch die der mAk umgangen werden [71]. Aufgrund dessen wurden beide neuen, über die SNAP-Tag Technologie evaluierten, EGFR-spezifischen scFvs als rekombinante IT mit einer verkürzten Form der toxischen Domäne ETA' fusioniert, resultierend in scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA'. Da die Toxine Säugetierzellen töten würden, müssen sie in anderen Systemen produziert werden. *E.coli* stellt dafür ein übliches Expressionssystem dar, da bakterielle Systeme resistent gegen die gängigen Toxine sind [69, 71]. Die funktionalen IT wurden dementsprechend aus dem Periplasma von *E.coli* unter osmotischen Stressbedingungen erfolgreich isoliert. Die Ausbeute nach der Reinigung lag bei 0,2-0,3 mg/L Bakterienkultur (Abbildung III-11, [121]). Dies war vergleichbar oder höher wie die Ausbeuten von anderen rekombinanten scFv-ETA-IT [148, 160-162]. Die spezifische Bindung an die fünf ausgewählten Zelllinien konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine unspezifische Bindung an EGFR<sup>-</sup>-Zellen wurde nicht beobachtet (Abbildung III-12, [121]). Eine schnelle und effiziente Internalisierung in die Zielzellen ist wichtig für die Aktivität von rekombinanten IT. Folglich wurde die Aufnahme von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' in unterschiedliche Tumor-abgeleiteten Zelllinien über Durchflusszytometrie untersucht. MDA-

MB-468, C4-2 und L3.6pl zeigten nach 60 min eine 50%ige Internalisierung von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA', RD zeigten dies bereits nach 30 min und nach 180 min war eine beinahe 90%ige Aufnahme nachzuweisen (Abbildung III-13). Die schnelle Internalisierung in RD-Zellen wurde ebenfalls mit den korrespondierenden scFv-SNAP Fusionsprotein beobachtet (Abbildung III-4). Wiederum wurde mit dem Referenzkonstrukt 425(scFv)-ETA' eine langsamere Internalisierungsrate (außer auf A431) gemessen, wie auch schon zuvor in den Konfokal-Messungen mit 425(scFv)-SNAP. Auf A431-Zellen wurde nach 60 min eine etwa 70%ige Aufnahme von scFv2112-ETA' und eine etwa 40%ige Aufnahme von scFv1711-ETA' demonstriert (Abbildung III-13, [121]). Vergleichende Internalisierungszeiten wurden für andere ETA-basierte IT beschrieben [33, 120]. Eine klare Korrelation von Internalisierungsverhalten und Zytotoxizität wurde überwiegend für Ricin- oder Gelonin-basierte IT beschreiben [163, 164]. Beide neuen IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' zeigten die schnellste Internalisierungsart in RD Zellen, in diesen Zellen aber einen höheren IC<sub>50</sub>-Wert und damit niedrigere Zytotoxizität als in den Zelllinien mit einer langsameren Internalisierungsrate. Dies weist auf ein unterschiedliches Ansprechen der Zelllinien im Bezug auf Internalisierung und Zytotoxizität hin. Mason-Osann *et al.* haben in dem Zusammenhang der Internalisierung und des toxischen Potentials, eine vielversprechende durchflusszytometrische Methode für die Untersuchung *in vivo* etabliert. Das IT RG7787 bestehend aus ETA und einem Ak-Fragment welches gegen Mesothelin gerichtet ist, wurde für diese Studien eingesetzt. Über die neue Methode wurde die Menge an zytotoxischen Molekülen von RG7787 bestimmt, die pro Zelle von seziiertem Tumormaterial internalisiert wurde und so wurde eine funktionelle Korrelation zwischen der Menge an IT welches *in vivo* internalisiert wurde und der Äquivalentdosis *in vitro* bestimmt [159]. Dieser Assay könnte für *in vivo* Studien mit IT oder insbesondere mit hCFPs interessant sein.

#### **IV.2.1 Der EGFR als ideales Zielantigen für einen Therapieansatz mit IT**

Nachdem die Bindedomäne, in diesem Fall scFv2112 und scFv1711, an den Rezeptor auf der Krebszelloberfläche gebunden hat, erfolgt die Internalisierung des IT ins endozytotische Kompartiment [72, 138]. Nach dieser Rezeptor-vermittelten Endozytose erfolgt die Freigabe in den endozytotischen Raum, wie z.B. in regenerierbare Endosomen, in einem Kompartiment der Abkopplung von Rezeptor und Ligand (CURL) oder in Lysosomen [138, 165]. Beim sogenannten CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand) werden Rezeptor und Ligand voneinander getrennt und dissoziieren in unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente. Dies führt dazu, dass der Rezeptor entweder degradiert wird oder für eine

weitere Endozytose zurück an die Zelloberfläche transportiert wird. Die Verfügbarkeit von Rezeptoren auf der Zelloberfläche hängt davon ab, wieviel ungebundene Rezeptoren von den intrazellulären Endosomen an die Oberfläche zurückkehren. Ein idealer Rezeptor wird also dauerhaft recycelt oder schnell re-synthetisiert bzw. zu den Endosomen oder Lysosomen für die Degradation transportiert, der EGFR gehört zu diesen Rezeptorformen [138, 166]. Neben dieser Eigenschaft besitzt der EGFR eine weitere Funktion eines idealen Zielantigens für eine Ak-basierte Therapie, nämlich die Expression auf der Zelloberfläche und nicht im Zytoplasma oder im Zellkern. Die dauerhafte Aktivierung des Rezeptors in Krebszellen führt zu verschiedenen Prozessen welche zu einem erhöhten Tumorstadium führen wie Proliferation, Angiogenese, Metastasenbildung und die Inhibierung von Apoptose. Dies und die Überexpression in einer Vielzahl von soliden Tumoren machen ihn zusätzlich zu einem idealen Zielantigen für den therapeutischen Einsatz [48, 167].

#### **IV.2.2 Das toxische Potential von scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA'**

Bei einem zielgerichteten Therapieansatz bei dem der Rezeptor überexprimiert wird, beim EGFR bis zu 100-fach im Vergleich zu normalen Zellen, kommt es somit auch zu einer stärkeren Ausschüttung des IT in die Krebszellen. Gesunde Zellen werden aufgrund der geringeren Menge an verfügbarem Rezeptor daher weniger angegriffen, ein deutlicher Vorteil gegenüber nicht zielgerichteten Therapien [138]. IT sind unter anderem deshalb interessante und vielversprechende therapeutische Ansätze, da aufgrund ihres katalytischen Verhaltens, nur wenige Moleküle des Toxins ausreichen und von der Krebszelle aufgenommen werden müssen, um diese zu eliminieren [42]. Ein IT-Molekül mit einem Toxin pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs kann beispielsweise mehr als 200 Ribosomen oder 200 EF-2-Moleküle pro Minute inaktivieren und zeigt damit mehr Wirksamkeit als ein Chemotherapeutikum von dem  $10^4$ - $10^5$  Moleküle benötigt werden [71]. Die Affinität des bindenden Liganden bestimmt wie lange die Bindung mit dem Zelloberflächenantigen oder-Rezeptor bestehen bleibt. Demnach, je höher die Affinität je mehr aktives IT kann in die Zielzellen gelangen [69]. Die Affinität beider scFvs fusioniert mit dem SNAP-Tag wurde zuvor bestimmt und zeigte eine für scFvs sehr gute Affinität mit etwa 4 nM. Eine ähnliche Affinität kann auch für die Fusion der scFvs mit ETA' erwartet werden, denn große Unterschiede in der Affinität bestehen in der Regel nur zwischen dem Ak-Fragment alleine und einer Fusion. Stein *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang ähnliche  $K_D$ -Werte von 21 nM für die Fusion des scFvCD123 mit ETA und von 16 nM für die Fusion mit einem weiteren scFv, dem scFvCD16 [162].

Es wurde nachgewiesen das die beiden neuen IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' spezifische und hohe Zytotoxizität gegen alle ausgewählte EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien zeigten, mit IC<sub>50</sub>-Werten im pikomolaren Bereich. Mit A431-Zellen, der Zelllinie mit der höchsten EGFR-Expressionsrate, zeigten beide IT mit 4 und 18 pM auch die beste Zytotoxizität und auf L3.6pl und RD-Zellen, Zelllinien mit einer geringeren EGFR-Expressionsrate, zeigten beide wie erwartet die geringste Zytotoxizität (Abbildung III-14, [121]). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Korrelation von Rezeptorexpression und toxischen Potential, wurden für das EGFR-spezifische IT SE, welches aus dem EGF-Ligand als Bindedomäne und Saporin-3 als Effektormolekül besteht, gegen verschiedene humane Zervixkarzinom-Zelllinien, gezeigt [168]. Diese Abhängigkeit von der Rezeptorexpression wurde auch von Hristodorov *et al.* mit dem Referenzkonstrukt 425(scFv)-ETA' auf L3.6pl-Zellen im Vergleich zu einem EGF-Liganden basierten hCFP bestätigt [169]. Die mit den neuen IT erreichten IC<sub>50</sub>-Werte waren vergleichbar oder besser wie bereits publizierte Werte, die mit IT gerichtet gegen andere Oberflächenrezeptoren erzielt wurden [33, 126, 170-173]. Neben IC<sub>50</sub>-Werten im pikomolaren Bereich erreichten beide IT außerdem eine signifikante Apoptose-Induktion in allen EGFR<sup>+</sup>-Zielzellen, mit bis zu 80% gemessenen apoptotischen Zellen bei einer IT Konzentration von 1,4 µg/ml (Abbildung III-15, [121]). Sowohl im Zellviabilitätstest als auch im Apoptose-Assay zeigte das nichtbindende mock-ETA'-Konstrukt keine oder nur sehr schwache Effekte, ebenfalls zeigten die scFv-SNAP Fusionsproteinen keine zytotoxischen Aktivitäten. Schwache Effekte mit einer bis zu 100-fach höheren Konzentration im Gegensatz zu den spezifischen IT sind für den Einsatz von mock-ETA Konstrukten bekannt [174]. Verschiedene ETA-basierte IT zeigten ebenfalls ähnliche apoptotische Effekte auf den jeweiligen Zielzellen, beispielsweise wurde mit einem CD89(scFv)-ETA' IT bei Konzentration über 1 µg/ml bis zu 75% Apoptose auf stimulierten HL-60 Zellen ausgelöst. [33, 79, 172]. Verschiedene Gruppen arbeiten mit EGFR-spezifischen IT und darunter auch einem IT basierend auf der scFv-Sequenz des mAk C225, dem Ursprungs-Ak des Cetuximab [80, 175]. Diese scFv-Sequenz wurde über cDNA-Synthese aus 225-Hybridomazellen gewonnen. Für diese Arbeit wurde die Sequenz des scFv2112 von der optimierten Cetuximab-Sequenz aus dem dazugehörigen Patent entnommen, die sich von der des scFvC225 unterscheidet [45]. Einige rekombinante scFv-ETA basierte IT befinden sich in der klinischen Evaluation, ebenfalls auch gegen die EGFR-Familie gerichtete [63, 79, 158]. Das IT scFv(FRP5)-ETA beispielsweise, spezifisch für HER-2/ErbB2, zeigte IC<sub>50</sub>-Werte von ~10 pM bis 1 nM auf Plattenepithelkarzinomzellen [175]. Die IC<sub>50</sub>-Werte von scFv1711-ETA' und scFv2112-ETA' lagen auf der Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 bei 4

pM und 18 pM, also im gleichen oder sogar besseren Bereich wie die von scFv(FRP5)-ETA. In einer klinischen Studie der Phase I in Patienten mit fortgeschrittenem solidem Malignom, wurde scFv(FRP5)-ETA in einer Dosis von 12,5 µg/kg pro Tag erfolgreich eingesetzt [176]. Weiterhin zeigte ein scFv-basiertes EGFR-spezifisches IT auf Glioblastoma-Zellen potente Wirkung (D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL) [80, 81]. Momentan befinden sich mehrere IT in der klinischen Phase, davon ist eines (Denileukin Difitox) von der FDA für die Behandlung von kutaner T-Zell Leukämie (CTCL) seit 2001 zugelassen. Die weiteren IT in offenen Studien der Phase I-III sind meist gegen hämatologische Krebsarten gerichtet, wie verschiedene Leukämien oder Non-Hodgkin Lymphome. Eine Ausnahme ist SS1P welches sich in der klinischen Phase II befindet und als Therapie für das Mesotheliom, einem seltenen Bindegewebstumor Wirkung zeigte [72, 158]. SS1P ist laut Alewine *et al.* aktuell das einzige IT welches sich für die Therapie solider Tumore in der klinischen Phase befindet. Es ist zusammengesetzt aus ETA' und dem Fv-Teil des Ak SS1 anti-Mesothelin (anti-MSLN) [72, 177].

Neben den mAk als zielgerichtete EGFR-spezifische Therapieform und IT existiert auch der Ansatz der sogenannten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI). TKI gehören zu den sogenannten „small molecules“, die an die ATP-Bindestelle der Kinase-Domäne binden und so die enzymatische Aktivität inhibieren. TKI ahmen ATP nach, welches als Phosphatquelle für den Phosphorylierungsprozess dient. Sie binden entweder reversibel oder irreversibel und ihre Spezifität kann sowohl den EGFR alleine, verschiedene ErbB-Familienmitglieder oder natürlich auch andere Tyrosinkinasen betreffen [15, 20]. Gefitinib (ZD 1839, Iresa<sup>®</sup>) und Erlotinib (OSI-774, Traceva<sup>®</sup>) sind reversible EGFR-spezifische TKI welche klinisch zugelassen sind, sowohl für NSCLC (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom) als auch für das Pankreaskarzinom [20]. Mutationen in der intrazellulären Kinasedomäne des EGFR können jedoch die Effizienz von Gefitinib oder Erlotinib negativ beeinflussen [178]. In Bezug auf das RMS wurde auch dargestellt, das obwohl keine Mutationen des EGFR in Tumorbiopsien detektiert wurden, Erlotinib trotzdem keinen hemmenden Einfluss auf das Tumorwachstum in einem ARMS-Mausmodell hatte [34, 179]. Weiterhin zeigten Erlotinib oder Gefitinib keine gesteigerte oder zusätzliche Wirkung wenn sie in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt wurden [54]. Im Gegensatz zu TKI wurde im Rahmen dieser Arbeit aber *in vitro* eine Inhibition der Zellproliferation von RMS-Zellen über IT nachgewiesen. Generell sind im Bezug auf das RMS in der Literatur wenig therapeutische Ansätze als rekombinante IT mit dem EGFR als Zielantigen bekannt. Lediglich Ricci *et al.* zeigte einen indirekten therapeutischen EGFR-spezifischen IT-Ansatz beim RMS. Dieser bestand aus einem ersten murinen mAk spezifisch

für den EGFR und einem zweiten F(ab')<sub>2</sub> anti-Maus Fragment welches mit Saporin-S6 über eine Disulfid-Brücke verbunden war. In diesem Experiment wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 950 pM auf RD-Zellen gemessen [36]. Vielversprechende Zell-inhibierende Effekte wurden sowohl mit 425(scFv)-ETA' auf verschiedenen RMS-Zelllinien als auch mit scFv1711-ETA' und scFv2112-ETA' auf der RMS-Zelllinie RD mit IC<sub>50</sub>-Werten von 240 und 460 pM, als Teil dieser Arbeit, dargestellt [5, 121]. Eine Resistenz gegen Gefitinib, Erlotinib oder Lapatinib konnte auch bei Glioblastoma Patienten nachgewiesen werden. Das bereits beschriebene IT D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL ist in seiner Wirkweise jedoch unabhängig von der Tyrosinkinase Signalkaskade die vom EGFR ausgelöst wird und zeigte Wirkung in der Therapie von Glioblastoma [80, 81]. Die Effizienz von IT ist also unabhängig von intrazellulären Tyrosinkinase-Mutationen [180]. Dies stellt einen weiteren Vorteil für den Einsatz von rekombinanten IT in soliden Tumoren dar. Aus diesem Grund wurden IT in Kombination mit TKI eingesetzt, um deren Effizienz zu steigern. TKI der Src-Familie wie SU6656 und Bosatinib erhöhten die Zell-eliminierende Funktion der ETA-basierten IT SSP1 mit Mesothelin-exprimierenden Zellen und von HA22 mit CD-22 exprimierenden Zellen [181]. Src-Inhibitoren ahmen den Knockdown-Effekt von HCK, einem Mitglied der Src-Familie, nach. Dieser Effekt verbessert beispielsweise die Furin-Spaltung und kann so den Zell-eliminierenden Effekt von SSP-1 erhöhen, denn über die Furin-Spaltung wird die toxische Domäne vom Fv-Teil getrennt und ETA kann so seine Wirkung freisetzen [181]. In bestimmten Fällen ist es also möglich TKI mit IT als Kombinationstherapie einzusetzen um die Effizienz der IT so zu erhöhen, dass geringere Mengen an IT eingesetzt werden können.

### **IV.3 IT der vierten Generation – hCFPs**

#### **IV.3.1 hCFP im Vergleich zu IT der dritten Generation**

Auch wenn IT der dritten Generation eine bedeutende Weiterentwicklung im Bereich der zielgerichteten Therapie darstellen, gibt es dennoch Limitierungen. Bakterielle und pflanzliche Toxine sind von Natur aus immunogen und können daher Immunantworten auslösen [70, 79, 182]. Der Einsatz von rekombinanten IT mit scFvs als Bindedomäne und die Verwendung verkürzter Sequenzen von ETA mit deletierten B- und T-Zell Epitopen setzten die Immunogenität stark herab. Zudem führt die geringe Größe der IT zu einer kürzeren Halbwertszeit im Blutkreislauf, was dazu führt das Schäden an Endothel-Zellen vermieden werden und es somit seltener zum VLS kommt. In klinischen Studien zeigte sich zudem, das



ETA-basierte IT mildere VLS-Symptome auslösten als beispielsweise Ricin-basierte IT [72]. Trotz der Verwendung von IT der dritten Generation zeigte sich nach einem ersten Einsatz in Patienten mit soliden Tumor eine Immunogenität in 50-100% der Fälle, im Vergleich zu nur 0-40% bei Patienten mit hämatologischen Tumoren. Bei letzteren bleibt die Bildung von anti-IT-Ak meist aus, da diese Krebsformen sehr häufig mit einem stark eingeschränkten Immunsystem der Patienten einhergehen. [72, 79]. Jedoch kann eine Vormedikation mit Dexamethason, welches zu den Glukokortikoiden zählt und immunsupprimierend wirkt, dazu führen das VLS-Symptome verringert werden [72, 183]. Ebenfalls wurde dargestellt, dass der Einsatz der Lymphozyten-verringernenden Agenzien, Pentostatin und Cyclophosphamid, die Bildung von neutralisierenden anti-IT Ak in soliden Tumoren hemmte. In einer klinischen Pilotstudie wurde gezeigt, dass bei acht von zehn Patienten durch diese Kombinationstherapie erstmals eine wiederholte Gabe von IT (dem bereits beschriebenen SSP-1) bei Patienten mit soliden Tumoren möglich war [71, 72, 184]. Weitere Limitierungen im klinischen Einsatz von rekombinanten IT waren auch auf die nicht-humanen Bindedomänen zurückzuführen. Durch den Einsatz einer humanen Bindedomäne, wie in diesem Fall dem humanen scFv1711, kann die HAMA-Antwort welche in Patienten oft durch den Einsatz von Ak-Fragmenten murinen Ursprungs ausgelöst wird, unterbunden werden [65]. Diese Immunantwort limitiert nicht nur die Therapieeffizienz, sondern kann auch zu allergischen Reaktionen und schwerwiegenden Komplikationen beim Patienten führen [40, 42]. Weiterhin zeigt das Fehlen der Fc-Region bei der Verwendung von scFvs einen weiteren Vorteil für deren Einsatz in IT [64, 65].

IT der vierten Generation überwinden die Probleme der unerwünschten Begleittoxizität und der Immunogenität. Neben dem Einsatz von Bindedomänen humanen Ursprungs, werden auch toxische Domänen humanen Ursprungs eingesetzt. Hier werden RNasen wie Angiogenin, Kinasen wie DAPK2, Mikrotubuli-assoziierte Proteine oder die Serinprotease GrB eingesetzt [71, 92]. Verschiedene Fusionen dieser Art mit scFvs oder Liganden sind bisher *in vitro* und *in vivo* charakterisiert worden [87-91, 123, 124, 185]. Am Beispiel des EGFR wurde ein Konstrukt bestehend aus dem humanen natürlichen Liganden EGF und dem Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP beschrieben, welches *in vivo* in einem L3.6pl subkutanen Mausmodell spezifisch zu einer Tumorreduktion führte [169].

### **IV.3.2 Der Einsatz von GrB in hCFP**

Tumorzellen sind oft in der Lage der Apoptose-Induktion durch verschiedene Mechanismen zu entgehen, was zu einer Verringerung der Effizienz von Tumortheraeutika führen kann.

Tumorzellen regulieren Apoptose indem sie verschiedene anti-apoptotische Proteine überexprimieren, Proteine der Bcl-2 Familie die die Apoptose mitochondrial regulieren, IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) welche die Caspase-Aktivität inhibieren oder auch FLIPs (FLICE-inhibitory proteins) welche in die Signaltransduktionswege von Effektorrezeptoren eingreifen [40]. GrB jedoch nutzt, im Gegensatz zu anderen humanen pro-apoptotischen Enzymen, unterschiedliche Apoptose-induzierende Mechanismen die es direkt aktiviert und deswegen ist es wahrscheinlich, dass GrB die Resistenzen von Tumorzellen umgehen kann [40, 186]. Da GrB unter anderem diesen Vorteil mit sich bringt wurde es im Rahmen dieser Arbeit als humane Effektordomäne ausgewählt. Neben dieser Eigenschaft wirkt GrB unabhängig von der Zellproliferation und kann damit im Gegensatz zu dem zuvor erwähnten MAP, welches nur sich teilende Zellen tötet, auch auf die ruhenden Tumorstammzellen einwirken [123]. Neben seinen Vorteilen als humane Effektordomäne besitzt GrB aber auch eine strukturelle Eigenschaft, die das therapeutische Potential limitieren kann. Der endogene GrB-Inhibitor Serpin B-9, auch PI-9 genannt, schützt zytotoxische T-Lymphozyten vor fehlgesteuertem GrB während der Immunantwort. PI-9 inhibiert GrB irreversibel [40, 97, 187]. Einige solide Tumorarten machen sich dies zu Nutze und exprimieren PI-9, darunter Pankreas- und Prostatakarzinome, Brust- und Lungenkrebszellen oder auch Melanomzellen [40]. In vorangegangenen Arbeiten wurde in Zelllysaten aus verschiedenen RMS-Zelllinien, darunter auch RD, nach Detektion mit einem spezifischen PI-9 Ak, schwache Banden nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Um diesen Resistenzmechanismus zu umgehen, wurden von Losasso *et al.* GrB-Mutanten entwickelt, welche eine reduzierte Bindung von PI-9 zeigten [97]. Die Mutante mit den besten Eigenschaften, R201K, wurde demnach für die Evaluierung eines hCFP mit scFv1711 eingesetzt.

Weiterhin ist die erfolgreiche Expression von GrB als Bestandteil von Fusionsproteinen in verschiedenen Systemen bereits evaluiert und die zytotoxische Wirkung belegt. Neben den in unserer Arbeitsgruppe publizierten CFPs Gb-H22(scFv) spezifisch für CD64 (verschiedene Leukämieformen), Gb-Ki4(scFv) spezifisch für CD30 (Hodgkin Lymphom) und Gb-2.44 als anti-Malaria Therapieansatz sind in Tabelle IV-I GrB-Fusionsproteine aufgeführt welche bisher in präklinischen Studien für die Behandlung solider Tumore evaluiert wurden [87, 90, 98, 188].

**Tabelle IV-I Publierte GrB-basierte CFPs als Therapie-Ansatz in soliden Tumoren**

Abkürzungen: Fn14 = Rezeptor des Zytokins TWEAK, VEGFR = Vaskular-endothelialer Wachstumsfaktor, hLHR = humaner luteinisierender Hormon Rezeptor, PEAI = zweite Domäne von *Pseudomonas* Exotoxin A, Fdt = Furin Domäne von Diphtheria Toxin, Fpe = Furin Domäne von *Pseudomonas* Exotoxin A, R9 = Poly-Arginin-Teil, Ag = Antigen, i.m. = intramuskulär, n.d. = nicht definiert.

CFP Name	Bindedomäne/Ziel-antigen	IC <sub>50</sub> auf Zelllinie/Tumorentität	Status und Quelle
<b>GrB-Fc-IT4</b>	scFv: anti-Fn14	<b>Fc-14:</b> 37,2-17,2 nM (Pankreaskrebs),	<i>In vivo</i> [189]
<b>GrB-TWEAK</b>	Ligand: Fn14	121-13,5 nM (Lungenkrebs), 284-3,1 nM (Melanom), 34,7-3,4 nM (Brustkrebs), 23 nM (Darmkrebs) <b>TWEAK:</b> 169,5-31,2 nM, 152, 4-13,8 nM, 519-21,6 nM, 61-5-6,9 nM und 51,9 nM	(Orthotop, MDA-MB-231) (Xenograft, HT-29,)
<b>GrB-TGF<math>\alpha</math></b>	Ligand: EGFR	0,25 nM + CQ (MDA-MB-468)	<i>In vitro</i> [91]
<b>GrB-scFv(FRP5)</b>	scFv: ErbB2 (HER-2)	0,29 nM + CQ (MDA-MB-468)	
<b>GrB/VEGF<sub>121</sub></b>	VEGFR-1, VEGFR-2	10 nM (PAE/hVEGFR-2), 660 nM (KS1767), 27 nM (SK-N-SH), 190 nM (TC-71), 500 nM (MDA-MB-231/luc)	<i>In vivo</i> [190, 191] (Xenograft, PC-3)
<b>GrB/4D5</b>	scFv:HER-2/neu	<b>4D5:</b> 93,1-29,3 nM (Brustkrebs), 40,5 nM (Lungenkrebs), 90,4 (Magenkrebs)	<i>In vivo</i> [192]
<b>GrB/4D5/26</b>	scFv+Peptid 26	<b>4D5/26:</b> 551,3-253,3 nM, 242,5 nM, 629,0 nM	(Xenograft, BT474 M1)
<b>GzmB-CD8</b>	Peptid: Lewis Y Ag	1595 nM (SKBR3), 198 nM (MCF-7)	<i>In vitro</i> [193]
<b>B3-GzmB</b>	dscFv: Lewis Y Ag	98 nM (SKBR3), 140 nM (MCF-7)	
<b>GrB-scFvMEL</b>	gp240	20 nM (A375-M), 50 nM (MEL-526), 150 nM (TXM-184)	<i>In vivo</i> [194, 195] (Xenograft,A375-M)
<b>GrB-YCG</b>	hLHR	0,16 $\mu$ M (MA-10 murin)	<i>In vitro</i> [196]
<b>ImmunoGrB-PEAI</b>	HER-2	n.d., nur Überstand eingesetzt	<i>In vivo</i> [197] (i.m., SK-BR-3)
<b>e23scFv/PEAI/ Fpe/Fdt/R<sub>9</sub>- GrB/Casp3</b>	HER-2	n.d., nur Überstand eingesetzt	<i>In vivo</i> [198] (Xenograft, SGC7901)

### IV.3.3 Charakterisierung von GbR201K-scFv1711

Da das zytotoxische Potential von GrB als Teil von Fusionsproteinen, wie in Tabelle IV-I aufgelistet, schon mehrfach bestätigt wurde, sollte es in dieser Arbeit als humane Effektdomäne für die Charakterisierung und Evaluierung eines gegen den EGFR gerichteten hCFPs genutzt werden. Bisher existieren keine bekannten Ansätze von GrB-Fusionsproteinen für die Behandlung des RMS. Neben RMS und dem Plattenepithelkarzinom sollte auch das Pankreaskarzinom im Fokus der Evaluierung des neuen hCFP stehen, da auch hierzu kaum Ergebnisse aus der Literatur bekannt sind [40].

GrB konnte bisher erfolgreich in verschiedenen Expressionssystemen produziert werden, darunter *E.coli* (z.B. AD494 DE3 pLysS), Hefen wie *Pichia pastoris*, den Insektenzellen *Sf9* oder auch in HEK 293T-Zellen [86, 187, 190]. Die Prozessierung von enzymatisch aktiven GrB ist jedoch nicht einfach, da die aktive Form einen freien N-Terminus benötigt. Es existieren verschiedene Ansätze, um die korrekte *in vitro* und *in vivo* Prozessierung von rekombinantem GrB zu erreichen [40, 86]. Ausreichende Mengen GrB und GrB-Fusionsprotein wurden nach der Expression in *E.coli* erzielt. Das Protein lag nach Reinigung als inaktives Vorprodukt vor, mit einer heterologen N-terminalen Proteindomäne Glutathione-S-Transferase, sodass eine Rückfaltung und die *in vitro* Spaltung mit proteolytischen Enzymen nötig waren [193, 195]. Eine Generierung von sich selbst aktivierenden GrB nach *E.coli*-Expression wurde nur mit Wildtyp-GrB jedoch nicht als Fusionsprotein erreicht. Dabei wurde die GrB-spezifische Schnittstelle IEPD zwischen GrB und einer heterologen N-terminalen Pre-Pro-Domäne eingefügt [199]. Das Pre-Pro-GrB trägt N-terminal ein Signalpeptid, welches über eine Signalpeptidase im ER gespalten wird, um inaktives Proenzym mit N-terminalen Pro-Peptid zu produzieren. Das Pro-Peptid muss zusätzlich entfernt werden um eine aktive Protease zu erhalten. In GrB wird das Pro-Peptid über DPPI, auch Cathepsin-C genannt, abgespalten [40, 86].

Einige GrB-basierte hCFP wurden erfolgreich in der eukaryotischen Expressionszelllinie HEK 293T produziert [40, 87, 90, 98, 187]. Gehrman *et al.* beschrieben, dass die Expression von aktiven humanen GrB in HEK 293-Zellen zu einer Apoptose-Auslösung führte bevor ausreichenden Mengen erreicht wurden. Deswegen wurde die Expression von inaktiven GrB in den Zellen angewendet [200]. HEK 293T-Zellen wurden ebenfalls für die Expression des in dieser Arbeit zu evaluierenden hCFP EGbR201K-scFv1711 gewählt. Da die proteolytische Aktivität von GrB wie beschrieben jedoch von einem freien N-terminus abhängt, wurde N-

terminal eine Enterokinase-Erkennungssequenz (ECS) rekombinant fusioniert. Die Sezernierung von EGbR201K-scFv1711 in das Zellkulturmedium nach erfolgreicher Transfektion in HEK 293T-Zellen wurde durch die N-terminale Igκ-Sequenz erreicht. Zellkulturüberstände können so, ohne den zusätzlichen Aufwand eines Zellaufschlusses, der potentiell zur Kontamination mit zellulären Proteinen führen könnte, für die Reinigung über den His-Tag genutzt werden [201]. Nach der Reinigung über IMAC, wie zuvor für die scFv-SNAP Fusionsproteinen dargestellt, wurde eine hohe Ausbeute von 17-30 mg/L mit einer bis zu 80%igen Reinheit erreicht. Diese war deutlich höher als für andere beschriebene GrB-Fusionsproteine. Dälken *et al.* zeigte mit dem in Hefen (*Pichia pastoris*) exprimierten GrB-scFv(FRP5) Ausbeuten von 1-2 mg/L [91]. Mohamedali *et al.* konnte für das Fusionsprotein GrB/VEGF121 nach Expression in HEK 293T-Zellen eine Ausbeute von 5 mg/L darstellen [191] (siehe auch Tabelle IV-I). Für die Expression und Produktion von nativen GrB konnte Gehrman *et al.* ebenfalls darstellen, dass in HEK 293-Zellen, mit 4 mg/L eine deutlich höhere Ausbeute erreicht wurde als in *E.coli* mit 0,5-1 mg/L, in Hefen mit 1-2 mg/L oder in Insektenzellen mit 1,5 mg/L [199, 200, 202, 203].

Die Prozessierung in aktives GbR201K-scFv1711 wurde über den EK-Verdau nach der Reinigung erreicht und die proteolytische Aktivität über einen kolorimetrischen Substratassay nachgewiesen. Nur das aktivierte/EK-verdaute GbR201K-scFv1711 zeigte eine vergleichbare Aktivität wie der eingesetzte GrB-Standard, wohingegen es bei dem nicht-aktivierten EGbR201K-scFv1711 zu keiner Umsetzung des synthetischen Substrates kam. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits erfolgreich nachgewiesen, dass die Mutation R201K nicht zu signifikanten Unterschieden in der Aktivität führte [97, 187]. Da bei vorherigen Experimenten in der Arbeitsgruppe oftmals beobachtet wurde, dass aktiviertes GrB-Fusionsprotein nach Lagerung rasch an Stabilität und Aktivität verlor, wurde ebenfalls ein Test auf Aktivität/Substratumsetzung nach drei-monatiger Lagerung bei -80°C durchgeführt, der kaum Verlust an Aktivität zeigte (Abbildung III-19).

Sowohl das nicht-aktivierte als auch das aktivierte GbR201K-scFv1711 zeigten spezifische Bindung auf den ausgewählten EGFR<sup>+</sup>-Zelllinien und keine unspezifische Reaktion mit der Negativzelllinie (Abbildung III-19, B). Der EK-Verdau hatte also keine Einwirkung auf die Bindeaktivität und -spezifität des hCFPs. GrB besitzt eine positive Oberflächenladung und einen hohen iso-elektrischen Punkt, was zu einer unspezifischen Bindung an negativ-geladene Oberflächen bzw. Zelllinien führen könnte [40, 92, 204]. Mit den hier verwendeten Zelllinien

wurde aber keine derartige Auswirkung auf die spezifische Bindung beobachtet. Ebenfalls wurde in anderen Arbeiten mit GrB-Fusionsproteinen keine unspezifischen Wechselwirkungen beobachtet [87, 91].

Neben den Bindungseigenschaften wurde ebenso die Internalisierungsgeschwindigkeit von GbR201K-scFv1711 bestimmt. Wiederum zeigte sich ein schnelles Internalisierungsverhalten in RD-Zellen (50 % Aufnahme nach 60 min und 60 % nach 120 min) und ein langsames in A431-Zellen (20% Aufnahme nach 60 min und 40% nach 120 min), dies war auch bei den scFv-SNAP und scFv-ETA' Konstrukten zu beobachten [121]. In L3.6pl- Zellen wurde erst nach 120 min eine 40%ige Aufnahme von GbR201K-scFv1711 bestimmt (Abbildung III-20). Cao *et al.* zeigte das Internalisierungsverhalten von GrB/4D5/26 (Tabelle IV-I) über Immunfluoreszenz und WB-Analyse, wobei GrB-Fusionsproteine primär im Zytosol beobachtet wurden und die beginnende Internalisierung nach 30 min detektiert wurde [192]. Ebenfalls wurde für die Fusionsproteine GrB-TGF $\alpha$  und GrB-scFv(FRP5) Internalisierung in auf Deckgläsern angewachsenen A431-Zellen nach Inkubation von 60 min und der Detektion mit spezifischen Ak über Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Hier konnte die Lokalisation der GrB-Fusionsproteine in den vesikulären Strukturen wie den Endosomen dargestellt werden [91]. Die Aufnahme von GbR201K-scFv1711 war aufgrund der Unterschiede der Assays nicht direkt mit diesen Werten vergleichbar, dennoch wurde hier ebenfalls Internalisierung nach 60 min beobachtet. Genaue Internalisierungszeitpunkte oder der Zeitpunkt des Internalisierungsbeginns, wie in dem für GbR201K-scFv1711 genutzten Assay, wurden hier aber nicht direkt bestimmt.

Ein weiterer wichtiger Parameter für therapeutisch wirksame Substanzen ist die Serumstabilität, welche mit dem GbR201K-scFv1711 in humanem Serum untersucht wurde. Hier zeigte sich eine sehr gute Serumstabilität von GbR201K-scFv1711, im Vergleich zu anderen GbR201K-Konstrukten, mit einer etwa 85%igen Bindeaktivität nach 24 h Inkubation im Serum, etwa 68% nach 48 h und noch einer über 50%igen Stabilität nach 72 h (Tabelle III-IV). Schiffer *et al.* zeigten mit GbR201K-H22(scFv) und Gb-H22(scFv) in humanem Patientenserum um die 60% Bindeaktivität nach 24 h Inkubation mit beiden Konstrukten [98]. In Mausserum wurde für Gb-Ki4(scFv) und GbR201K-Ki4(scFv) nach 24 h etwa 65% Bindeaktivität und nach 48 h noch etwa 50% Bindeaktivität gemessen [187]. GbR201K-scFv1711 zeigte im Vergleich zu den beiden anderen beschriebenen GbR201K-scFv hCFPs eine hohe Serumstabilität, mit einer für beide aufgeführten Zeitpunkte bis zu 20% höheren Bindeaktivität.

### **IV.3.4 Das toxische Potential und die Steigerung der Effizienz von GbR201K-scFv1711**

Das antiproliferative und pro-apoptotische Potential des neuen hCFP GbR201K-scFv1711 wurde mit ausgewählten EGFR<sup>+</sup>-Zellen bestimmt. Dabei wurden auf A431-Zellen ein IC<sub>50</sub>-Wert von 133,3 nM erreicht und eine bis zu 30% höhere Apoptose-Induktion als in den unbehandelten oder mit dem Kontroll-Konstrukt behandelten Zellen (Abbildung III-23; Tabelle III-V). Mit RD und L3.6pl Zellen wurden zwar spezifische aber nur schwache zytotoxische Effekte gemessen. In allen Zelllinien zeigte wie erwartet überwiegend nur die aktivierte Form Wirkung. Dälken *et al.* konnte mit den EGFR und HER-2 spezifischen hCFPs keine zytotoxische Effekte auf A431 oder verschiedenen Brustkrebszelllinien messen. Nur unter Einsatz von CQ wurde proteolytische Aktivität erreicht (siehe: Tabelle IV-I) [91]. Für beide EGFR oder HER-2 spezifischen GrB-Fusionsproteine wurde gezeigt, dass sie in den endosomalen Vesikeln nach der Rezeptor-vermittelten Aufnahme zurückgehalten werden [91]. Diese hCFPs benötigen also in jedem Fall ein Hilfsmittel zur endosomolytischen Freisetzung um aktiv in den Zielzellen zu wirken. Das im Rahmen dieser Arbeit entstandene hCFP GbR201K-scFv1711 wirkte zumindest auf A431-Zellen auch ohne ein zusätzliches Hilfsmittel zur zytosolischen Freisetzung, wie dies bereits für andere GrB-Fusionsproteine beschrieben wurde [187, 191, 192, 205].

GrB wurde als Effektormolekül ausgewählt, da seine Zytotoxizität nach Internalisierung über mehrere Mechanismen vermittelt wird. Einer ist die Aktivierung einer Caspase-Kaskade über die Spaltung von Effektor-Caspasen über Pro-Caspasen, wie beispielsweise Caspase-3, gefolgt von der Aktivierung von Caspase-7. Neben dem Caspase-Signalweg erfolgt auch über den BID-Signalweg die Spaltung von Caspasen. Die erfolgreiche Prozessierung von Pro-Caspase-3 führt zur Entstehung einiger Effektor-Substrate, z.B. DNA-PK, was die typischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose auslöst [40]. Ein anderer Apoptose-Mechanismus wirkt über die Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien und über Pro-Caspase 9 [92]. Zhou *et al.* zeigte auf bestimmten Zielzellen nach Behandlung mit GrB-TWEAK mitochondriale Membran-Depolymerisation. Ebenfalls zeigten sie über WB-Analyse, dass die Behandlung der Zellen mit GrB-TWEAK zur Ausschüttung von Cytochrom C ins Zytoplasma führte [189]. Mit den Konstrukten GbR201K-H22(scFv) und GbR201K-Ki4(scFv) wurde die Aktivierung von Caspase 3/7 nach Inkubation der Zielzellen mit dem jeweiligen hCFP nachgewiesen [98, 187].

Die Effizienz zielgerichteter hCFP ist abhängig von drei Hauptfaktoren: zum einen die spezifische Bindung an den Oberflächenrezeptor, die Internalisierung über Rezeptorvermittelte Endozytose und die direkte Ausschüttung ins Zytosol. Sowohl die spezifische Bindung als auch die Internalisierung in die Zielzellen wurde mit GbR201K-scFv1711 erfolgreich nachgewiesen. Jedoch zeigte sich nur mit A431-Zellen eine deutliche Einwirkung auf die Zellproliferation (Abbildung III-21). Eine allgemeine Limitierung von hCFP kann ein ineffizienter Transfer des hCFP vom Endosom ins Zytosol darstellen. [40, 86, 92]. Dies führt letztendlich zur Aggregation und zum Abbau der internalisierten hCFP. Um dieses Problem zu umgehen bzw. die endosomolytische Freisetzung von GbR201K-scFv1711 zu erreichen und höhere anti-proliferative Effekte zu erzielen, wurde auf die Hilfe einer endosomolytischen Substanz, dem CQ, zurückgegriffen. CQ unterstützt die vesikuläre Freisetzung von intrazellulärem GbR201K-scFv1711 nach der Rezeptorvermittelten Endozytose. Es reichert sich in den sauren Zellbestandteilen wie Endosomen und Lysosomen an, wirkt auf das pH-Gleichgewicht ein und führt zum Aufbrechen der Vesikeln [86]. CQ Diphosphat ist ein weltweit eingesetztes Anti-Malaria Medikament, das darüber hinaus Inhibition von Zellwachstum in Krebszellen zeigte. Ferner ist es auch niedrigdosiert für rheumatoide Arthritis und Lupus erythematodes zugelassen. Weiterhin wird es aber auch als endosomolytisches bzw. lysosomotropes Agens in der Kombination mit hCFP und IT eingesetzt um deren toxische Effizienz zu erhöhen [86, 93, 94]. Im Gegensatz zu anderen endosomolytischen Substanzen wie L-Leucyl-L-Leucin-Methylester oder Ammoniumchlorid, welche auch zu erhöhten IC<sub>50</sub> – Werten bei IT führten, hat CQ den entscheidenden Vorteil, dass es aufgrund seiner Zulassung als Medikament auch mit geringen Problemen *in vivo* eingesetzt werden kann [94]. CQ wurde bereits in hohen Dosen als endosomolytische Reagenz in therapeutischen Tiermodellen eingesetzt, dabei waren 75 mg/kg CQ die maximal tolerable Dosis bei einer einmaligen intraperitonealen Injektion [206]. Im Menschen werden bei der Langzeit-Malariatherapie bei einem 65 kg schweren Patienten 400 mg Hydroxy-CQ oder 250 mg CQ täglich empfohlen [207]. In einem immuntherapeutischen Ansatz bestimmten van Horssen *et al.* zuerst das *in vivo* Serum-Level von CQ und applizierten einen Tag vor Beginn der IT-Therapie entweder 0,25 mg CQ direkt in die Versuchstiere oder 1 µl/h für 7 Tage über implantierte Mini-osmotische Pumpen gefüllt mit 200 mg/ml CQ. Die osmotischen Pumpen wurden eingesetzt da bei der direkten einmaligen Gabe von CQ keine konstanten IT-vermittelten Effekte nachgewiesen wurden. Hier wurde im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten jedoch kein verbesserter zytotoxischer Effekt in Kombination mit einem CD22-recRicinA IT erreicht [208]. Da solide



Tumorzellen aufgrund der unterschiedlichen Aufnahme von CQ jedoch möglicherweise ein anderes Ansprechen und ein anderes *in vivo* Serum-Level von CQ aufweisen als hämatologische Tumorzellen, wie in diesem Fall Burkitt Lymphom-Zellen, ist der Einsatz von CQ *in vivo* trotzdem aussichtsreich. Momentan existiert aber keine aktuellere Literatur im Zusammenhang mit CQ und dem kombinatorischen Einsatz von hCFPs *in vivo*. In Gegenwart von CQ zeigte GbR201K-scFv1711 einen gesteigerten zytotoxischen Effekt auf RD-Zellen mit 21,13 nM, in denen ohne CQ-Behandlung kaum Zytotoxizität nachgewiesen wurde. Derselbe Effekt wurde im AV/PI-Assay bei der Apoptose-Induktion nachgewiesen. Hierbei wurde in RD-Zellen die mit CQ und R201K-scFv1711 im Vergleich zu RD-Zellen die nur mit CQ behandelt wurden 40% mehr Apoptose induziert (Abbildung III-22). Ebenso wurde mit A431-Zellen ein dreifach besserer IC<sub>50</sub>-Wert nach CQ-Behandlung erreicht. Mit L3.6pl Zellen zeigte die CQ-Behandlung jedoch keine Verbesserung des zytotoxischen Potentials. Verschiedene Zelllinien wurden beschrieben, die eine Resistenz gegenüber IT zeigten. Schon in den Anfängen der IT-Entwicklung wurde demonstriert, dass bestimmte Leukämie-Zelllinien resistent gegenüber Ricin sind und kürzlich wurde die Resistenz einer Pankreaskarzinomzelllinie gegen ein ETA-basiertes anti-Mesothelin IT beschrieben [209, 210]. Mit den ETA-basierten IT wurden jedoch Proliferations-hemmende Effekte auf L3.6pl nachgewiesen. Die Zelllinie wurde zuvor mit der nötigen CQ-Konzentration austitriert, diese Konzentration könnte noch einmal geändert werden und weiterführende Experimente durchgeführt werden um die Inaktivität von GbR201K-scFv1711 auf L3.6pl zu ergründen. Weiterhin wurden aber auch nach CQ-Behandlung keine unspezifischen Effekte mit der Negativzelllinie beobachtet (Abbildung III-21). Der Einsatz von CQ wurde im Zusammenhang mit diversen GrB-Fusionsproteinen untersucht [86, 91, 193, 204]. Mit den HER-2 und EGFR spezifischen GrB-Fusionsproteinen GrB-scFvFRP5 und GrB-TGF $\alpha$  konnten unter Einsatz von 50  $\mu$ M CQ (die Menge die auch in den Experimenten mit GbR201K-scFv1711 eingesetzt wurde), IC<sub>50</sub> -Werte von 5,8 nM für GrB-scFvFRP5 und 3,5 nM für GrB-TGF $\alpha$  mit A431 Zellen, welche für beide Zielantigene positiv ist, erreicht werden [91, 204]. Im Vergleich dazu lagen die korrespondierenden ETA-basierten IT scFvFRP5-ETA und TGF $\alpha$ -ETA mit 0,5 nM und 0,02 nM auf A431 Zellen im Vergleich zu scFv1711-ETA mit 0,018 nM in einem ähnlichen oder sogar schlechteren Bereich [86]. Im weiteren Vergleich waren die mit GbR201K-scFv1711 erreichten IC<sub>50</sub>-Werte in einem ähnlichen oder teilweise besseren Rahmen wie die bereits publizierter GrB-basierter Fusionsproteine (Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der Konstrukte und dazugehörigen Referenzen siehe Tabelle IV-I). RD-Zellen besitzen deutlich weniger

EGFR-Rezeptoren auf der Oberfläche als A431, nur ~12.450 Rezeptoren im Vergleich zu ~149.000 auf A431-Zellen (Tabelle III-II). Die Rezeptorexpression kann aber einen Einfluss auf das zytotoxische Potential von zielgerichteten IT und hCFPs haben, wie bereits in IV.2.2 diskutiert. Die Korrelation von EGFR-Expression und Zellproliferation wurde für die ETA-Konstrukte klar dargestellt (Tabelle III-III). Unter Einsatz von CQ wurde auf RD jedoch ein IC<sub>50</sub>-Wert von 21,3 nM mit GbR201K-scFv1711 erreicht, der im besseren Bereich als der für A431 lag. Signifikante Apoptose-Induktion wurde sowohl für A431 mit und ohne CQ-Behandlung und für RD in Korrelation zum XTT-Assay nur mit CQ erreicht (Abbildung III-23). Dälken *et al.* demonstrierte ebenfalls Apoptose-auslösende Effekte von GrB-scFvFRP5 (68% apoptotische Zellen) nach 14 h Inkubation von 10 µg/ml des hCFP auf A431-Zellen, allerdings nur nach Vorbehandlung der Zellen mit CQ [91]. Für GbR201K-scFv1711 mit einer Konzentration von 5 µg/ml wurde auf A431 auch ohne CQ-Vorbehandlung Apoptose induziert (~50% apoptotische Zellen). Unter CQ-Behandlung wurden 60% apoptotische Zellen gemessen, allerdings zeigte auch das nicht-aktivierte hCFP einen Effekt von etwa 40% (Abbildung III-23), was auf die CQ-Behandlung zurückzuführen ist, welche in weiteren Versuchen erneut austitriert werden sollte. Auch die Bindeaktivität von GbR201K-scFv1711 auf RMS-Tumormaterial wurde erfolgreich nachgewiesen, was ein weiteres positives Evaluierungsziel im Rahmen von GbR201K-scFv1711 als potentiell Therapeutikum des RMS darstellt. GbR201K-scFv1711 ist somit ein hoch-interessantes neues hCFP, welches mit hoher Ausbeute in einem humanen eukaryotischen Expressionssystem produziert wurde, welches eine hohe Stabilität nach Lagerung bei -80°C und eine sehr gute Serumstabilität zeigte, Zytotoxizität im nanomolaren Bereich vermittelte und signifikant Apoptose in verschiedenen EGFR-positiven Zelllinien induzierte.

#### **IV.4 Ausblick**

Die beiden neuen EGFR-spezifischen Ak-Fragmente scFv2112 und scFv1711 wurden unter anderem mit Hilfe der SNAP-Tag Technologie charakterisiert. Wichtige Faktoren wie spezifische Bindung der scFvs über Ak-Detektion oder mit direkt Farbstoff-markierten Konstrukten, Internalisierungsverhalten sowie Affinität wurden bestimmt und erste *in vivo* Tests erfolgreich durchgeführt. Ein interessanter Ansatz, der die Spezifität und Gesamtbindungsstärke der neuen scFv-Fusionsproteine erhöhen und verbessern könnte, ist das sogenannte „duale Targeting“ bzw. die Entwicklung bispezifischer oder bivalenter Konstrukte.

Bivalente scFv-Fusionsproteine zeigen in der Regel eine höhere Bindungsaffinität als monovalente scFv-Fusionsproteine, nah an der von mAk [211]. Bisher wurden bereits scFv-SNAP Fusionsproteine als bivalente Konstrukte produziert (scFvC54-SNAP-scFvC54). Bezüglich Bindung und Internalisierung zeigte dieses Konstrukt im Vergleich zur monovalente Variante eine 2-3-fach bessere Internalisierungs- und Bindeaktivität [104]. Es ist bekannt, dass multivalente Ligandenbindung an Rezeptoren zu einer effizienteren Internalisierung der Fusionsproteine führt [104, 212]. Demnach ist nicht nur auf dem diagnostischen Ast die Entwicklung eines bivalenten/bispezifischen Konstruktes interessant, sondern viel mehr die Entwicklung eines solchen IT oder hCFP. Gerade der EGFR ist für diesen Ansatz, aufgrund der Überexpression in vielen Krebsarten ein sehr interessantes Zielantigen. Beim „dualen Targeting“ existieren ein direkter und ein indirekter Mechanismus. Beim direkten Mechanismus werden Oberflächenrezeptoren oder löslichen Faktoren gebunden, was die Neutralisierung von zwei Liganden oder Rezeptoren, der Aktivierung zweier verschiedener Rezeptoren oder auch die Aktivierung eines Rezeptors und die Hemmung eines anderen zur Folge haben kann. Beim indirekten Mechanismus wird das „duale Targeting“ genutzt, um eine therapeutisch aktive Substanz einzuschleusen [212]. Eine Weiterentwicklung könnte beispielsweise ein bispezifisches Konstrukt zur Diagnose und/oder Behandlung des Prostatakarzinoms mit EGFR- und PSMA (Prostata-membran spezifisches Antigen)-spezifischen scFvs sein. Ein PSMA-spezifisches scFv-SNAP Konstrukt (scFvD7-SNAP) wurde bereits evaluiert [104]. Ebenfalls sind für das RMS sowohl scFv-SNAP als auch ETA-Konstrukte beschrieben, welche zum einen spezifisch für den fetalen Acetylcholin-Rezeptor (scFv35-ETA/SNAP) oder für MCSP/CSPG-4 (Chondroitin-Sulfate-Proteoglycan-4, scFv $\alpha$ MCSP-ETA/SNAP) sind. Auch diese könnten mit den neuen EGFR-spezifischen scFvs als bispezifische Konstrukte fusioniert und für diagnostische oder therapeutische Ansätze eingesetzt werden [33, 104, 174]. Mit dem „dualen Targeting“ kann zusätzlich eine Resistenz gegen bestimmte Ak umgangen werden, wenn sich eine solche in Krebszellen ausgebildet hat, was besonders bei einem therapeutischen Ansatz interessant ist [213]. Weiterhin zeigen bivalente scFv-rekombinante IT eine längere Zirkulation im Blutkreislauf ( $t_{1/2} = \sim 40$  min) als monovalente scFv-rekombinante IT [71]. Ebenso können bispezifische scFv-basierte IT gegen zwei verschiedene Zielantigene den therapeutischen Effekt am Tumorgewebe erheblich erhöhen, denn doppel-positive Zellen werden präferentiell gebunden im Gegensatz zu einfach-positiven [214, 215]. Ansätze im „dualen Targeting“ existieren sowohl bei der diagnostischen Bildgebung als auch auf Ebene der Therapie unterschiedlicher Krebserkrankungen [212, 213,

215-217]. Beispielsweise befinden sich bispezifische IT für hämatologische und solide Tumore in der präklinischen Entwicklung [80, 214, 218, 219].

Das Ziel, ein hCFP zu generieren und funktionell zu charakterisieren, wurde mit GbR201K-scFv1711 in ersten *in vitro* und *ex vivo* Studien erfolgreich dargestellt. In weiterführenden Studien, sollten zum einen zusätzliche Tumorentitäten getestet werden und im Falle des RMS sollten zum anderem auch ARMS und PRMS-Zelllinien in die Experimente aufgenommen werden. Da humanen Enzymen im Vergleich zu bakteriellen Toxinen eine endogene Translokationsdomäne fehlt, ist dies ein Nachteil bei der Freisetzung aus dem Endosom ins Zytosol. Um dies zu optimieren wurden Protein Transduktions-Domänen z.B. die Translokationsdomäne von ETA (PEAII) zwischen die zellbindende- und die humane zytotoxische Domäne in IT der vierten Generation eingesetzt [40]. Zhang *et al.* verwendeten die PEAII-Domäne in einem GrB-basierten hCFP und erreichten dadurch ein verbessertes therapeutisches Potential gegen HER-2-positive Tumorzellen [197]. Bei der Verwendung einer solchen Translokationsdomäne entstehen jedoch wieder potentielle immunogene Regionen aufgrund des bakteriellen Ursprungs. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Einsatz von multifunktionalen spaltbaren Adaptern die zytosolische Freisetzung verbessert und dadurch eine Erhöhung der Toxizität bewirkt wird. Jedoch wurden nach dem Einfügen dieser Adapter auch Instabilitäten in den hCFP beobachtet [220, 221]. Beide Ansätze könnten erprobt werden, allerdings wurde bereits unter dem Einsatz von CQ eine Verbesserung der Zytotoxizität von GbR201K-scFv1711 dargestellt und CQ besitzt den Vorteil, dass es in einem *in vivo* Einsatz unkompliziert zusätzlich appliziert werden kann.

Die neuen IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' zeigten eine Inhibierung der Zellproliferation verschiedener Tumorentitäten im pikomolaren Bereich und ebenfalls eine signifikante Induktion der Apoptose. Weiterhin wurde neben der spezifischen *in vitro* auch eine spezifische *ex vivo* Bindung nachgewiesen [121]. Trotz der sehr guten Eigenschaften der beiden Konstrukte wurde keine *in vivo* Testung durchgeführt, da das Ziel die Entwicklung eines hCFP war. In diesem Zusammenhang wird immer wieder diskutiert ob der Faktor der Immunogenität in einem Tiermodell, welcher bei ETA-basierten rekombinanten IT durchaus im Vordergrund steht, auch auf den Menschen übertragen werden kann, da die Immunantwort oft Spezies-abhängig ist [71, 222]. Dennoch existieren verschiedene Tiermodell-Studien um eine Immunogenität von ETA-basierten IT vorherzusagen. Beispielsweise zeigte Pardo *et al.* eine Tumorreduzierung in Mäusen mit A431-subkutanen Tumoren unter Einsatz von 425(scFv)-

ETA', mit weniger beobachteten Nebenwirkungen als für das im Vergleich eingesetzte Doxorubicin [83]. Ebenfalls zeigte das bispezifische IT D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL signifikante Tumorreduktion in einem orthotopen Glioblastoma-Mausmodell [80]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aber darauf verzichtet, da ein Tiermodell mit dem hCFP zielführender wäre. Da das hier entwickelte hCFP GbR201K-scFv1711 sehr erfolgsversprechende Ergebnisse zeigte, sollte im nächsten experimentellen Schritt das Konstrukt *in vivo* eingesetzt werden. Hier steht sowohl die Serumverweildauer als auch eine MTD-Studie (maximum tolerated dose) im Tiermodell an erster Stelle. Darauf aufbauend sollte dann beispielsweise mit einem RMS-Tumormodell die Tumorzell-eliminierende Wirkung von GbR201K-scFv1711 getestet werden.

## V. Referenzen

- 1 Stewart BWaW, C.P. World Cancer Report 2014. IARC, distributed by WHO Press 2014.
- 2 Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.** *Eur J Cancer*, 2013; **49**: 1374-403.
- 3 Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. **European cancer mortality predictions for the year 2014.** *Ann Oncol*, 2014; **25**: 1650-6.
- 4 Ray A, Huh WW. **Current state-of-the-art systemic therapy for pediatric soft tissue sarcomas.** *Curr Oncol Rep*, 2012; **14**: 311-9.
- 5 Niesen J, Brehm H, Stein C, Berges N, Pardo A, Fischer R, Ten Haaf A, Gattenlohner S, Tur MK, Barth S. **In vitro effects and ex vivo binding of an EGFR-specific immunotoxin on rhabdomyosarcoma cells.** *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014; **141**: 1049-61.
- 6 Armistead PM, Salganick J, Roh JS, Steinert DM, Patel S, Munsell M, El-Naggar AK, Benjamin RS, Zhang W, Trent JC. **Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients.** *Cancer*, 2007; **110**: 2293-303.
- 7 Toporkiewicz M, Meissner J, Matuszewicz L, Czogalla A, Sikorski AF. **Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges.** *Int J Nanomedicine*, 2015; **10**: 1399-1414.
- 8 Herbst RS, Shin DM. **Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy.** *Cancer*, 2002; **94**: 1593-611.
- 9 Koefoed K, Steinaa L, Soderberg JN, Kjaer I, Jacobsen HJ, Meijer PJ, Haurum JS, Jensen A, Kragh M, Andersen PS, Pedersen MW. **Rational identification of an optimal antibody mixture for targeting the epidermal growth factor receptor.** *MAbs*, 2011; **3**: 584-95.
- 10 de Larco JE, Todaro GJ. **Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation.** *J Cell Physiol*, 1978; **94**: 335-42.
- 11 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. **EGFR and cancer prognosis.** *Eur J Cancer*, 2001; **37** Suppl 4: S9-15.
- 12 Herbst RS. **Review of epidermal growth factor receptor biology.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004; **59**: 21-6.
- 13 Jamdade VS, Sethi N, Mundhe NA, Kumar P, Lahkar M, Sinha N. **Therapeutic targets of triple negative breast cancer: A review.** *Br J Pharmacol*, 2015; **172**(17): 4228-37
- 14 Savage CR, Jr., Cohen S. **Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization.** *J Biol Chem*, 1972; **247**: 7609-11.
- 15 Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. **Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies.** *Biomaterials*, 2013; **34**: 8690-707.
- 16 Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. **Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab.** *Cancer Cell*, 2005; **7**: 301-11.

- 17 Schneider MR, Yarden Y. **Structure and function of epigen, the last EGFR ligand.** *Semin Cell Dev Biol*, 2014; **28**: 57-61.
- 18 Sasaki T, Hiroki K, Yamashita Y. **The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment.** *Biomed Res Int*, 2013; **2013**: 546318.
- 19 Pedersen MW, Jacobsen HJ, Koefoed K, Hey A, Pyke C, Haurum JS, Kragh M. **Sym004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy.** *Cancer Res*, 2010; **70**: 588-97.
- 20 Pines G, Kostler WJ, Yarden Y. **Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy.** *FEBS Lett*, 2010; **584**: 2699-706.
- 21 Asano R, Hagiwara Y, Koyama N, Masakari Y, Orimo R, Arai K, Ogata H, Furumoto S, Umetsu M, Kumagai I. **Multimerization of anti-(epidermal growth factor receptor) IgG fragments induces an antitumor effect: the case for humanized 528 scFv multimers.** *FEBS J*, 2013; **280**: 4816-26.
- 22 Mendelsohn J. **Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy.** *J Clin Oncol*, 2002; **20**: 1s-13s.
- 23 Bruell D, Stocker M, Huhn M, Redding N, Kupper M, Schumacher P, Paetz A, Bruns CJ, Haisma HJ, Fischer R, Finnern R, Barth S. **The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line.** *Int J Oncol*, 2003; **23**: 1179-86.
- 24 Carrion-Salip D, Panosa C, Menendez JA, Puig T, Oliveras G, Pandiella A, De Llorens R, Massaguer A. **Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands.** *Int J Oncol*, 2012; **41**: 1128-38.
- 25 Dhupkar P, Dowling M, Cengel K, Chen B. **Effects of anti-EGFR antibody cetuximab on androgen-independent prostate cancer cells.** *Anticancer Res*, 2010; **30**: 1905-10.
- 26 Ueno NT, Zhang D. **Targeting EGFR in triple negative breast cancer.** *J Cancer*, 2011; **2**: 324-8.
- 27 Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. **Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, 2012; **136**: 331-45.
- 28 Zhang Y, Satoh K, Li M. **Novel therapeutic modalities and drug delivery in pancreatic cancer - an ongoing search for improved efficacy.** *Drugs Context*, 2012; **2012**: 212244.
- 29 Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Ohtani Y, Oida Y, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H. **Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis.** *Int J Mol Med*, 2003; **11**: 305-9.
- 30 Faller BA, Burtness B. **Treatment of pancreatic cancer with epidermal growth factor receptor-targeted therapy.** *Biologics*, 2009; **3**: 419-28.
- 31 Parham DM, Barr FG. **Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis.** *Adv Anat Pathol*, 2013; **20**: 387-97.
- 32 Simon-Keller K, Barth S, Vincent A, Marx A. **Targeting the fetal acetylcholine receptor in rhabdomyosarcoma.** *Expert Opin Ther Targets*, 2013; **17**: 127-38.
- 33 Brehm H, Niesen J, Mladenov R, Stein C, Pardo A, Fey G, Helfrich W, Fischer R, Gattenlohner S, Barth S. **A CSPG4-specific immunotoxin kills rhabdomyosarcoma cells and binds to primary tumor tissues.** *Cancer Lett*, 2014; **352**: 228-35.
- 34 Ganti R, Skapek SX, Zhang J, Fuller CE, Wu J, Billups CA, Breitfeld PP, Dalton JD, Meyer WH, Khoury JD. **Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma.** *Mod Pathol*, 2006; **19**: 1213-20.

- 35 Ricci C, Landuzzi L, Rossi I, De Giovanni C, Nicoletti G, Astolfi A, Pupa S, Menard S, Scotlandi K, Nanni P, Lollini PL. **Expression of HER/erbB family of receptor tyrosine kinases and induction of differentiation by glial growth factor 2 in human rhabdomyosarcoma cells.** *Int J Cancer*, 2000; **87**: 29-36.
- 36 Ricci C, Polito L, Nanni P, Landuzzi L, Astolfi A, Nicoletti G, Rossi I, De Giovanni C, Bolognesi A, Lollini PL. **HER/erbB receptors as therapeutic targets of immunotoxins in human rhabdomyosarcoma cells.** *J Immunother*, 2002; **25**: 314-23.
- 37 Ehrlich P. **Collected studies on immunity.** J.Wiley & Sons: New York 1906.
- 38 Weiner LM, Surana R, Wang S. **Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.** *Nat Rev Immunol*, 2010; **10**: 317-27.
- 39 Kohler G, Milstein C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature*, 1975; **256**: 495-7.
- 40 Hehmann-Titt G, Schiffer S, Berges N, Melmer G, Barth S. **Improving the therapeutic potential of human granzyme B for targeted cancer therapy.** *Antibodies*, 2013; **2**: 19-49.
- 41 Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. **Development trends for human monoclonal antibody therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov*, 2010; **9**: 767-74.
- 42 Allen TM. **Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy.** *Nat Rev Cancer*, 2002; **2**: 750-63.
- 43 AlDeghaither D, Smaglo BG, Weiner LM. **Beyond peptides and mAbs-current status and future perspectives for biotherapeutics with novel constructs.** *J Clin Pharmacol*, 2015; **55 Suppl 3**: S4-20.
- 44 Vacchelli E, Pol J, Bloy N, Eggermont A, Cremer I, Fridman WH, Galon J, Marabelle A, Kohrt H, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. **Trial watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies for oncological indications.** *Oncoimmunology*, 2015; **4**: e985940.
- 45 Schlessinger J GD, Bellot F, Kris R, Ricca G, Cheadle C, South V. **Monoclonal antibodies specific to human epidermal growth factor receptor an therapeutic methods employing same:** In. Rhone-Poulenc Rorer International (Holdings), Inc. Greenville, De (US): US, 2001: 424/143.1,
- 46 Barnea I, Ben-Yosef R, Karaush V, Benhar I, Vexler A. **Targeting EGFR-positive cancer cells with cetuximab-ZZ-PE38: Results of in vitro and in vivo studies.** *Head Neck*, 2013; **35**: 1171-7.
- 47 Jakobovits A YXD, Gallo M, Jia X. **Human monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptor:** In. Abgenix, Inc. Fremont; CA; (US): US, 2001: US6235883 B1,
- 48 Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. **Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy.** *Nat Rev Cancer*, 2013; **13**: 663-73.
- 49 Oldham RK, Dillman RO. **Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress.** *J Clin Oncol*, 2008; **26**: 1774-7.
- 50 Weiner GJ. **Building better monoclonal antibody-based therapeutics.** *Nat Rev Cancer*, 2015; **15**: 361-70.
- 51 Shim H. **One target, different effects: a comparison of distinct therapeutic antibodies against the same targets.** *Exp Mol Med*, 2011; **43**: 539-49.
- 52 Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. **Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor.** *Cancer Sci*, 2007; **98**: 1275-80.
- 53 Levy EM, Sycz G, Arriaga JM, Barrio MM, von Euw EM, Morales SB, Gonzalez M, Mordoh J, Bianchini M. **Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells.** *Innate Immun*, 2009; **15**: 91-100.



- 54 Sliwkowski MX, Mellman I. **Antibody therapeutics in cancer.** *Science*, 2013; **341**: 1192-8.
- 55 Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. **Antibody therapy of cancer.** *Nat Rev Cancer*, 2012; **12**: 278-87.
- 56 Cathomas R, Rothermundt C, Klingbiel D, Bubendorf L, Jaggi R, Betticher DC, Brauchli P, Cotting D, Droege C, Winterhalder R, Siciliano D, Berthold DR, Pless M, Schiess R, von Moos R, Gillessen S. **Efficacy of cetuximab in metastatic castration-resistant prostate cancer might depend on EGFR and PTEN expression: results from a phase II trial (SAKK 08/07).** *Clin Cancer Res*, 2012; **18**: 6049-57.
- 57 Ferraro DA, Gaborit N, Maron R, Cohen-Dvashi H, Porat Z, Pareja F, Lavi S, Lindzen M, Ben-Chetrit N, Sela M, Yarden Y. **Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013; **110**: 1815-20.
- 58 Luedke E, Jaime-Ramirez AC, Bhave N, Carson WE, 3rd. **Monoclonal antibody therapy of pancreatic cancer with cetuximab: potential for immune modulation.** *J Immunother*, 2012; **35**: 367-73.
- 59 van Zweeken AA, van der Vliet HJ, Wilmink JW, Meijerink MR, Meijer OW, Bruynzeel AM, van Tienhoven G, Giovannetti E, Kazemier G, Jacobs MA, Verheul HM. **Phase I clinical trial to determine the feasibility and maximum tolerated dose of panitumumab to standard gemcitabine-based chemoradiation in locally advanced pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res*, 2015; **21**:4569-75.
- 60 Yamamoto Y, Fukuda K, Fuchimoto Y, Matsuzaki Y, Saikawa Y, Kitagawa Y, Morikawa Y, Kuroda T. **Cetuximab promotes anticancer drug toxicity in rhabdomyosarcomas with EGFR amplification in vitro.** *Oncol Rep*, 2013; **30**: 1081-6.
- 61 Panowksi S, Bhakta S, Raab H, Polakis P, Junutula JR. **Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy.** *MAbs*, 2014; **6**: 34-45.
- 62 Lukianova-Hleb EY, Belyanin A, Kashinath S, Wu X, Lapotko DO. **Plasmonic nanobubble-enhanced endosomal escape processes for selective and guided intracellular delivery of chemotherapy to drug-resistant cancer cells.** *Biomaterials*, 2012; **33**: 1821-6.
- 63 Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC. **Antibody targeted drugs as cancer therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov*, 2006; **5**: 147-59.
- 64 Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB, Hamid M. **scFv antibody: principles and clinical application.** *Clin Dev Immunol*, 2012; **2012**: 980250.
- 65 Thorpe SJ, Turner C, Heath A, Feavers I, Vatn I, Natvig JB, Thompson KM. **Clonal analysis of a human antimouse antibody (HAMA) response.** *Scand J Immunol*, 2003; **57**: 85-92.
- 66 Monnier PP, Vigouroux RJ, Tassew NG. **In vivo applications of single chain Fv (variable domain) (scFv) fragments.** *Antibodies*, 2013; **2**: 193-208.
- 67 Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. **Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.** *Nat Nanotechnol*, 2007; **2**: 751-60.
- 68 Kampmeier F, Niesen J, Koers A, Ribbert M, Brecht A, Fischer R, Kiessling F, Barth S, Thepen T. **Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010; **37**: 1926-34.
- 69 Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. **Immunotoxin treatment of cancer.** *Annu Rev Med*, 2007; **58**: 221-37.
- 70 Weidle UH, Tiefenthaler G, Schiller C, Weiss EH, Georges G, Brinkmann U. **Prospects of bacterial and plant protein-based immunotoxins for treatment of cancer.** *Cancer Genomics Proteomics*, 2014; **11**: 25-38.

- 71 Shan L, Liu Y, Wang P. **Recombinant immunotoxin therapy of solid tumors: challenges and strategies.** *J Basic Clin Med*, 2013; **2**: 1-6.
- 72 Alewine C, Hassan R, Pastan I. **Advances in anticancer immunotoxin therapy.** *Oncologist*, 2015; **20**: 176-85.
- 73 Matthey B, Engert A, Klimka A, Diehl V, Barth S. **A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of Pseudomonas exotoxin-based fusion proteins.** *Gene*, 1999; **229**: 145-53.
- 74 Weldon JE, Skarzynski M, Therres JA, Ostovitz JR, Zhou H, Kreitman RJ, Pastan I. **Designing the furin-cleavable linker in recombinant immunotoxins based on Pseudomonas exotoxin A.** *Bioconjug Chem*, 2015; **26**: 1120-8.
- 75 Nicholson DW, Thornberry NA. **Caspases: killer proteases.** *Trends Biochem Sci*, 1997; **22**: 299-306.
- 76 Houchins JP. **Immunotoxin-induced apoptosis.** *Stem Cells*, 2000; **18**: 384-5.
- 77 Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. **Immunotoxin therapy of cancer.** *Nat Rev Cancer*, 2006; **6**: 559-65.
- 78 Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Adhya S, Pastan I. **Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor type alpha and Pseudomonas toxin.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987; **84**: 4538-42.
- 79 Kreitman RJ. **Immunotoxins for targeted cancer therapy.** *AAPS J*, 2006; **8**: E532-51.
- 80 Chandramohan V, Bigner DD. **A novel recombinant immunotoxin-based therapy targeting wild-type and mutant EGFR improves survival in murine models of glioblastoma.** *Oncoimmunology*, 2013; **2**: e26852.
- 81 Chandramohan V, Bao X, Keir ST, Pegram CN, Szafranski SE, Piao H, Wikstrand CJ, McLendon RE, Kuan CT, Pastan IH, Bigner DD. **Construction of an immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, targeting EGFRwt and EGFRvIII for brain tumor therapy.** *Clin Cancer Res*, 2013; **19**: 4717-27.
- 82 Bruell D, Bruns CJ, Yezhelyev M, Huhn M, Muller J, Ischenko I, Fischer R, Finnern R, Jauch KW, Barth S. **Recombinant anti-EGFR immunotoxin 425(scFv)-ETA' demonstrates anti-tumor activity against disseminated human pancreatic cancer in nude mice.** *Int J Mol Med*, 2005; **15**: 305-13.
- 83 Pardo A, Stocker M, Kampmeier F, Melmer G, Fischer R, Thepen T, Barth S. **In vivo imaging of immunotoxin treatment using Katushka-transfected A-431 cells in a murine xenograft tumour model.** *Cancer Immunol Immunother*, 2012; **61**: 1617-26.
- 84 Mathew M, Verma RS. **Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy.** *Cancer Sci*, 2009; **100**: 1359-65.
- 85 Antignani A, Fitzgerald D. **Immunotoxins: the role of the toxin.** *Toxins (Basel)*, 2013; **5**: 1486-502.
- 86 Oberoi P, Jabulowsky RA, Wels W. **Selective induction of cancer cell death by targeted granzyme B.** *Antibodies*, 2013; **2**: 130-151.
- 87 Schiffer S, Hristodorov D, Mladenov R, Aslanian E, Huhn M, Fischer R, Barth S, Thepen T. **Species-dependent functionality of the human cytolytic fusion proteins granzyme B-H22(scFv) and H22(scFv)-angiogenin in macrophages.** *Antibodies*, 2013; **2**: 9-18.
- 88 Hristodorov D, Amoury M, Mladenov R, Niesen J, Arens K, Berges N, Hein L, Di Fiore S, Pham AT, Huhn M, Helfrich W, Fischer R, Thepen T, Barth S. **EpCAM-selective elimination of carcinoma cells by a novel MAP-based cytolytic fusion protein.** *Mol Cancer Ther*, 2014; **13**: 2194-202.
- 89 Tur MK, Neef I, Jost E, Galm O, Jager G, Stocker M, Ribbert M, Osieka R, Klinge U, Barth S. **Targeted restoration of down-regulated DAPK2 tumor suppressor activity induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells.** *J Immunother*, 2009; **32**: 431-41.

- 90 Stahnke B, Thepen T, Stocker M, Rosinke R, Jost E, Fischer R, Tur MK, Barth S. **Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes.** *Mol Cancer Ther*, 2008; **7**: 2924-32.
- 91 Dalken B, Giesubel U, Knauer SK, Wels WS. **Targeted induction of apoptosis by chimeric granzyme B fusion proteins carrying antibody and growth factor domains for cell recognition.** *Cell Death Differ*, 2006; **13**: 576-85.
- 92 Weidle UH, Georges G, Brinkmann U. **Fully human targeted cytotoxic fusion proteins: new anticancer agents on the horizon.** *Cancer Genomics Proteomics*, 2012; **9**: 119-33.
- 93 Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y, Nishikawa T, Shuno Y, Hongo K, Hiyoshi M, Kaneko M, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H. **Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells.** *BMC Cancer*, 2010; **10**: 370.
- 94 Wu M. **Enhancement of immunotoxin activity using chemical and biological reagents.** *Br J Cancer*, 1997; **75**: 1347-55.
- 95 Lizzi AR, D'Alessandro AM, Zeolla N, Brisdelli F, D'Andrea G, Pitari G, Oratore A, Bozzi A, Ippoliti R. **The effect of AZT and chloroquine on the activities of ricin and a saporin-transferrin chimeric toxin.** *Biochem Pharmacol*, 2005; **70**: 560-9.
- 96 Fuchs H, Bachran C, Flavell D. **Diving through membranes: molecular cunning to enforce the endosomal escape of antibody-targeted anti-tumor toxins.** *Antibodies*, 2013; **2**: 209-235.
- 97 Losasso V, Schiffer S, Barth S, Carloni P. **Design of human granzyme B variants resistant to serpin B9.** *Proteins*, 2012; **80**: 2514-22.
- 98 Schiffer S, Rosinke R, Jost E, Hehmann-Titt G, Huhn M, Melmer G, Barth S, Thepen T. **Targeted ex vivo reduction of CD64-positive monocytes in chronic myelomonocytic leukemia and acute myelomonocytic leukemia using human granzyme B-based cytolytic fusion proteins.** *Int J Cancer*, 2014; **135**: 1497-508.
- 99 Becker A, Hessenius C, Licha K, Ebert B, Sukowski U, Semmler W, Wiedenmann B, Grotzinger C. **Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands.** *Nat Biotechnol*, 2001; **19**: 327-31.
- 100 Henriquez NV, van Overveld PG, Que I, Buijs JT, Bachelier R, Kaijzel EL, Lowik CW, Clezardin P, van der Pluijm G. **Advances in optical imaging and novel model systems for cancer metastasis research.** *Clin Exp Metastasis*, 2007; **24**: 699-705.
- 101 Seddon BM, Workman P. **The role of functional and molecular imaging in cancer drug discovery and development.** *Br J Radiol*, 2003; **76 Spec No 2**: S128-38.
- 102 Ntziachristos V. **Fluorescence molecular imaging.** *Annu Rev Biomed Eng*, 2006; **8**: 1-33.
- 103 Kampmeier F, Ribbert M, Nachreiner T, Dembski S, Beaufils F, Brecht A, Barth S. **Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-alkylguanine DNA alkyltransferase.** *Bioconjug Chem*, 2009; **20**: 1010-5.
- 104 Amoury M, Blume T, Brehm H, Niesen J, Tenhaef N, Barth S, Gattenlohner S, Helfrich W, Fitting J, Nachreiner T, Pardo A. **SNAP-tag based agents for preclinical in vitro imaging in malignant diseases.** *Curr Pharm Des*, 2013; **19**: 5429-36.
- 105 Gronemeyer T, Chidley C, Juillerat A, Heinis C, Johnsson K. **Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling.** *Protein Eng Des Sel*, 2006; **19**: 309-16.
- 106 Cole NB. **Site-specific protein labeling with SNAP-tags.** *Curr Protoc Protein Sci*, 2013; **73**: Unit 30 1.

- 107 Colombo M, Mazzucchelli S, Montenegro JM, Galbiati E, Corsi F, Parak WJ, Prosperi D. **Protein oriented ligation on nanoparticles exploiting O6-alkylguanine-DNA transferase (SNAP) genetically encoded fusion.** *Small*, 2012; **8**: 1492-7.
- 108 Hussain AF, Kampmeier F, von Felbert V, Merk HF, Tur MK, Barth S. **SNAP-tag technology mediates site specific conjugation of antibody fragments with a photosensitizer and improves target specific phototoxicity in tumor cells.** *Bioconjug Chem*, 2011; **22**: 2487-95.
- 109 Hussain AF, Amoury M, Barth S. **SNAP-tag technology: a powerful tool for site specific conjugation of therapeutic and imaging agents.** *Curr Pharm Des*, 2013; **19**: 5437-42.
- 110 Sambrook JaR, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York 2001.
- 111 Puettmann C, Kolberg K, Hagen S, Schmies S, Fischer R, Naehring J, Barth S. **A monoclonal antibody for the detection of SNAP/CLIP-tagged proteins.** *Immunol Lett*, 2013; **150**: 69-74.
- 112 Tur MK, Huhn M, Thepen T, Stocker M, Krohn R, Vogel S, Jost E, Osieka R, van de Winkel JG, Fischer R, Finnern R, Barth S. **Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells.** *Cancer Res*, 2003; **63**: 8414-9.
- 113 Barth S. **Technology evaluation: BL22, NCI.** *Curr Opin Mol Ther*, 2002; **4**: 72-5.
- 114 Stocker M, Tur MK, Sasse S, Krussmann A, Barth S, Engert A. **Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells.** *Protein Expr Purif*, 2003; **28**: 211-9.
- 115 von Kalle C, Wolf J, Becker A, Scaer A, Munck M, Engert A, Kapp U, Fonatsch C, Komitowski D, Feaux de Lacroix W, et al. **Growth of Hodgkin cell lines in severely combined immunodeficient mice.** *Int J Cancer*, 1992; **52**: 887-91.
- 116 Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ. **In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice.** *Neoplasia*, 1999; **1**: 50-62.
- 117 Hanahan D. **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *J Mol Biol*, 1983; **166**: 557-80.
- 118 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977; **74**: 5463-7.
- 119 Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A. **Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions.** *Appl Environ Microbiol*, 2000; **66**: 1572-9.
- 120 Cizeau J, Grenkow DM, Brown JG, Entwistle J, MacDonald GC. **Engineering and biological characterization of VB6-845, an anti-EpCAM immunotoxin containing a T-cell epitope-depleted variant of the plant toxin bouganin.** *J Immunother*, 2009; **32**: 574-84.
- 121 Niesen J, Stein C, Brehm H, Hehmann-Titt G, Fendel R, Melmer G, Fischer R, Barth S. **Novel EGFR-specific immunotoxins based on panitumumab and cetuximab show in vitro and ex vivo activity against different tumor entities.** *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015; **141**: 2079-95
- 122 Voigt M, Braig F, Gothel M, Schulte A, Lamszus K, Bokemeyer C, Binder M. **Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab.** *Neoplasia*, 2012; **14**: 1023-31.
- 123 Hristodorov D, Nordlohne J, Mladenov R, Huhn M, Fischer R, Thepen T, Barth S. **Human microtubule-associated protein tau mediates targeted killing of CD30(+)**

- lymphoma cells in vitro and inhibits tumour growth in vivo. *Br J Haematol*, 2014; **164**: 251-7.**
- 124 Hristodorov D, Mladenov R, Huhn M, Barth S, Thepen T. **Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases.** *Toxins (Basel)*, 2012; **4**: 676-94.
- 125 Waldron NN, Vallera DA. **An old idea tackling a new problem: Targeted toxins specific for cancer stem cells.** *Antibodies*, 2013; **2**: 82-92.
- 126 Lv M, Qiu F, Li T, Sun Y, Zhang C, Zhu P, Qi X, Wan J, Yang K, Zhang K. **Construction, expression, and characterization of a recombinant immunotoxin targeting EpCAM.** *Mediators Inflamm*, 2015; **2015**: 460264.
- 127 Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K. **A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo.** *Nat Biotechnol*, 2003; **21**: 86-9.
- 128 Alvarenga ML, Kikhney J, Hannewald J, Metzger AU, Steffens KJ, Bomke J, Krah A, Wegener A. **In-depth biophysical analysis of interactions between therapeutic antibodies and the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor.** *Anal Biochem*, 2012; **421**: 138-51.
- 129 Kim GP, Grothey A. **Targeting colorectal cancer with human anti-EGFR monoclonal antibodies: focus on panitumumab.** *Biologics*, 2008; **2**: 223-8.
- 130 Freeman DJ. **Safety and efficacy of panitumumab in the treatment of metastatic colorectal cancer.** *Clin Med: Ther*, 2009; **2009**:1: 633-645.
- 131 Lippow SM, Wittrup KD, Tidor B. **Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation.** *Nat Biotechnol*, 2007; **25**: 1171-6.
- 132 Saxena B, Sundaram ST, Walton W, Patel I, Kuo P, Khan S, Matathia A, Purohit A, Crowley R, Zhou Q. **Differentiation between the EGFR antibodies necitumumab, cetuximab, and panitumumab: In vitro biological and binding activities.** *In: ASCO Annual Meeting. J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr e13030), 2011.
- 133 Thatcher N, Hirsch FR, Luft AV, Szczesna A, Ciuleanu TE, Dediu M, Ramlau R, Galiulin RK, Balint B, Losonczy G, Kazarnowicz A, Park K, Schumann C, Reck M, Depenbrock H, Nanda S, Kruljac-Letunic A, Kurek R, Paz-Ares L, Socinski MA. **Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial.** *Lancet Oncol*, 2015; **16**: 763-74.
- 134 Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. **Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy.** *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001; **38**: 17-23.
- 135 Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A. **Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy.** *Cancer Res*, 1999; **59**: 1236-43.
- 136 Bessman NJ, Bagchi A, Ferguson KM, Lemmon MA. **Complex relationship between ligand binding and dimerization in the epidermal growth factor receptor.** *Cell Rep*, 2014; **9**: 1306-17.
- 137 Terpe K. **Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003; **60**: 523-33.
- 138 Srinivasarao M, Galliford CV, Low PS. **Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents.** *Nat Rev Drug Discov*, 2015; **14**: 203-19.
- 139 Nielsen UB, Adams GP, Weiner LM, Marks JD. **Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity.** *Cancer Res*, 2000; **60**: 6434-40.

- 140 Townsend S, Finlay WJ, Hearty S, O'Kennedy R. **Optimizing recombinant antibody function in SPR immunosensing. The influence of antibody structural format and chip surface chemistry on assay sensitivity.** *Biosens Bioelectron*, 2006; **22**: 268-74.
- 141 Zhou Y, Goenaga AL, Harms BD, Zou H, Lou J, Conrad F, Adams GP, Schoeberl B, Nielsen UB, Marks JD. **Impact of intrinsic affinity on functional binding and biological activity of EGFR antibodies.** *Mol Cancer Ther*, 2012; **11**: 1467-76.
- 142 Gong H, Kovar JL, Cheung L, Rosenthal EL, Olive DM. **A comparative study of affibody, panitumumab, and EGF for near-infrared fluorescence imaging of EGFR- and EGFRvIII-expressing tumors.** *Cancer Biol Ther*, 2014; **15**: 185-93.
- 143 Kovar JL, Johnson MA, Volcheck WM, Chen J, Simpson MA. **Hyaluronidase expression induces prostate tumor metastasis in an orthotopic mouse model.** *Am J Pathol*, 2006; **169**: 1415-26.
- 144 Gong H, Sampath L, Kovar JL, Olive DM. **Targeting EGFR and HER2 for molecular imaging of cancer.** In: Prof. Bernhard Schaller (Ed.) *Molecular Imaging*. InTech, 2012.
- 145 Xu W, Liu L, Brown NJ, Christian S, Hornby D. **Quantum dot-conjugated anti-GRP78 scFv inhibits cancer growth in mice.** *Molecules*, 2012; **17**: 796-808.
- 146 Edwards A, Daniels BS, Deen WM. **Ultrastructural model for size selectivity in glomerular filtration.** *Am J Physiol*, 1999; **276**: F892-902.
- 147 Kolberg K, Puettmann C, Pardo A, Fitting J, Barth S. **SNAP-tag technology: a general introduction.** *Curr Pharm Des*, 2013; **19**: 5406-13.
- 148 Wolf P, Alt K, Wetterauer D, Buhler P, Gierschner D, Katzenwadel A, Wetterauer U, Elsasser-Beile U. **Preclinical evaluation of a recombinant anti-prostate specific membrane antigen single-chain immunotoxin against prostate cancer.** *J Immunother*, 2010; **33**: 262-71.
- 149 Fridman R, Benton G, Aranoutova I, Kleinman HK, Bonfil RD. **Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection.** *Nat Protoc*, 2012; **7**: 1138-44.
- 150 Chung, L.W.K., Isaacs, W.B., Simons, J.W. **Prostate Cancer - Biology, Genetics and the New Therapeutics.** Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, USA 2007.
- 151 Liu L, Sun B, Pedersen JN, Aw Yong KM, Getzenberg RH, Stone HA, Austin RH. **Probing the invasiveness of prostate cancer cells in a 3D microfabricated landscape.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011; **108**: 6853-6.
- 152 Weissleder R, Mahmood U. **Molecular imaging.** *Radiology*, 2001; **219**: 316-33.
- 153 Diagaradjane P, Orenstein-Cardona JM, Colon-Casasnovas NE, Deorukhkar A, Shentu S, Kuno N, Schwartz DL, Gelovani JG, Krishnan S. **Imaging epidermal growth factor receptor expression in vivo: pharmacokinetic and biodistribution characterization of a bioconjugated quantum dot nanoprobe.** *Clin Cancer Res*, 2008; **14**: 731-41.
- 154 Sun X, Zhang A, Baker B, Sun L, Howard A, Buswell J, Maurel D, Masharina A, Johnsson K, Noren CJ, Xu MQ, Correa IR, Jr. **Development of SNAP-tag fluorogenic probes for wash-free fluorescence imaging.** *Chembiochem*, 2011; **12**: 2217-26.
- 155 Gong H, Kovar JL, Baker B, Zhang A, Cheung L, Draney DR, Correa IR, Jr., Xu MQ, Olive DM. **Near-infrared fluorescence imaging of mammalian cells and xenograft tumors with SNAP-tag.** *PLoS One*, 2012; **7**: e34003.
- 156 Leonidova A, Foerster C, Zarschler K, Schubert M, Pietzsch H-J, Steinbach J, Bergmann R, Metzler-Nolte N, Stephan H, Gasser G. **In vivo demonstration of an active tumor pretargeting approach with peptide nucleic acid bioconjugates as complementary system.** *Chem Sci*, 2015, **6**: 5601-5616

- 157 Gholami Z, Hanley Q. **Controlled assembly of SNAP-PNA-fluorophore systems on DNA templates to produce fluorescence resonance energy transfer.** *Bioconjug Chem*, 2014; **25**: 1820-8.
- 158 Becker N, Benhar I. **Antibody-based immunotoxins for the treatment of cancer.** *Antibodies*, 2012; **1**: 39-69.
- 159 Mason-Osann E, Hollevoet K, Niederfellner G, Pastan I. **Quantification of recombinant immunotoxin delivery to solid tumors allows for direct comparison of in vivo and in vitro results.** *Sci Rep*, 2015; **5**: 10832.
- 160 Schmidt M, Vakalopoulou E, Schneider DW, Wels W. **Construction and functional characterization of scFv(14E1)-ETA - a novel, highly potent antibody-toxin specific for the EGF receptor.** *Br J Cancer*, 1997; **75**: 1575-84.
- 161 Schwenkert M, Birkholz K, Schwemmlein M, Kellner C, Kugler M, Peipp M, Nettelbeck DM, Schuler-Thurner B, Schaft N, Dorrie J, Ferrone S, Kampgen E, Fey GH. **A single chain immunotoxin, targeting the melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan, is a potent inducer of apoptosis in cultured human melanoma cells.** *Melanoma Res*, 2008; **18**: 73-84.
- 162 Stein C, Kellner C, Kugler M, Reiff N, Mentz K, Schwenkert M, Stockmeyer B, Mackensen A, Fey GH. **Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells.** *Br J Haematol*, 2010; **148**: 879-89.
- 163 Wargalla UC, Reisfeld RA. **Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989; **86**: 5146-50.
- 164 Cao Y, Marks JD, Huang Q, Rudnick SI, Xiong C, Hittelman WN, Wen X, Marks JW, Cheung LH, Boland K, Li C, Adams GP, Rosenblum MG. **Single-chain antibody-based immunotoxins targeting HER2/neu: design optimization and impact of affinity on antitumor efficacy and off-target toxicity.** *Mol Cancer Ther*, 2012; **11**: 143-53.
- 165 Stahl P, Schwartz AL. **Receptor-mediated endocytosis.** *J Clin Invest*, 1986; **77**: 657-62.
- 166 Chi S, Cao H, Wang Y, McNiven MA. **Recycling of the epidermal growth factor receptor is mediated by a novel form of the clathrin adaptor protein Eps15.** *J Biol Chem*, 2011; **286**: 35196-208.
- 167 Jutten B, Rouschop KM. **EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival, and therapy resistance.** *Cell Cycle*, 2014; **13**: 42-51.
- 168 Bachran D, Schneider S, Bachran C, Urban R, Weng A, Melzig MF, Hoffmann C, Kaufmann AM, Fuchs H. **Epidermal growth factor receptor expression affects the efficacy of the combined application of saponin and a targeted toxin on human cervical carcinoma cells.** *Int J Cancer*, 2010; **127**: 1453-61.
- 169 Hristodorov D, Mladenov R, Pardo A, Pham AT, Huhn M, Fischer R, Thepen T, Barth S. **Microtubule-associated protein tau facilitates the targeted killing of proliferating cancer cells in vitro and in a xenograft mouse tumour model in vivo.** *Br J Cancer*, 2013; **109**: 1570-8.
- 170 Wolf P, Gierschner D, Buhler P, Wetterauer U, Elsasser-Beile U. **A recombinant PSMA-specific single-chain immunotoxin has potent and selective toxicity against prostate cancer cells.** *Cancer Immunol Immunother*, 2006; **55**: 1367-73.
- 171 Nachreiner T, Kampmeier F, Thepen T, Fischer R, Barth S, Stocker M. **Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin.** *J Neuroimmunol*, 2008; **195**: 28-35.

- 172 Mladenov R, Hristodorov D, Cremer C, Hein L, Kreutzer F, Stroisch T, Niesen J, Brehm H, Blume T, Brummendorf T, Jost E, Thepen T, Fischer R, Stockmeyer B, Barth S, Stein C. **The Fc-alpha receptor is a new target antigen for immunotherapy of myeloid leukemia.** *Int J Cancer*, 2015; 1;**137**:2729-38
- 173 Della Cristina P, Castagna M, Lombardi A, Barison E, Tagliabue G, Ceriotti A, Koutris I, Di Leandro L, Giansanti F, Vago R, Ippoliti R, Flavell SU, Flavell DJ, Colombatti M, Fabbrini MS. **Systematic comparison of single-chain Fv antibody-fusion toxin constructs containing Pseudomonas Exotoxin A or saporin produced in different microbial expression systems.** *Microb Cell Fact*, 2015; **14**: 19.
- 174 Gattenlohner S, Jorissen H, Huhn M, Vincent A, Beeson D, Tzartos S, Mamalaki A, Etschmann B, Muller-Hermelink HK, Koscielniak E, Barth S, Marx A. **A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model.** *J Biomed Biotechnol*, 2010; **2010**: 187621.
- 175 Azemar M, Schmidt M, Arlt F, Kennel P, Brandt B, Papadimitriou A, Groner B, Wels W. **Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo.** *Int J Cancer*, 2000; **86**: 269-75.
- 176 von Minckwitz G, Harder S, Hovelmann S, Jager E, Al-Batran SE, Loibl S, Atmaca A, Cimpoiasu C, Neumann A, Abera A, Knuth A, Kaufmann M, Jager D, Maurer AB, Wels WS. **Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas.** *Breast Cancer Res*, 2005; **7**: R617-26.
- 177 Pastan I, Hassan R. **Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy.** *Cancer Res*, 2014; **74**: 2907-12.
- 178 Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, Meyerson M, Eck MJ. **The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; **105**: 2070-5.
- 179 Abraham J, Nelon LD, Kubicek CB, Kilcoyne A, Hampton ST, Zarzabal LA, Giles FJ, Michalek JE, Rubin BP, Keller C. **Preclinical testing of erlotinib in a transgenic alveolar rhabdomyosarcoma mouse model.** *Sarcoma*, 2011; **2011**: 130484.
- 180 Ratti M, Tomasello G. **Emerging combination therapies to overcome resistance in EGFR-driven tumors.** *Anti-Cancer Drugs*, 2014; **25**: 127-39.
- 181 Liu XF, Xiang L, FitzGerald DJ, Pastan I. **Antitumor effects of immunotoxins are enhanced by lowering HCK or treatment with SRC kinase inhibitors.** *Mol Cancer Ther*, 2014; **13**: 82-9.
- 182 Sandvig K, van Deurs B. **Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins.** *Gene Ther*, 2005; **12**: 865-72.
- 183 Kreitman RJ. **Chimeric fusion proteins--Pseudomonas exotoxin-based.** *Curr Opin Investig Drugs*, 2001; **2**: 1282-93.
- 184 Hassan R, Miller AC, Sharon E, Thomas A, Reynolds JC, Ling A, Kreitman RJ, Miettinen MM, Steinberg SM, Fowler DH, Pastan I. **Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression.** *Sci Transl Med*, 2013; **5**: 208ra147.
- 185 Brehm H, Hristodorov D, Pardo A, Mladenov R, Niesen J, Fischer R, Tur MK, Barth S. **Targeted killing of rhabdomyosarcoma cells by a MAP-based human cytolytic fusion protein.** *Cancer Lett*, 2015; **365**: 149-55.
- 186 Weidle UH, Tiefenthaler G, Georges G. **Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy.** *Cancer Genomics Proteomics*, 2014; **11**: 67-79.



- 187 Schiffer S, Hansen HP, Hehmann-Titt G, Huhn M, Fischer R, Barth S, Thepen T. **Efficacy of an adapted granzyme B-based anti-CD30 cytolytic fusion protein against PI-9-positive classical Hodgkin lymphoma cells in a murine model.** *Blood Cancer J*, 2013; **3**: e106.
- 188 Kapelski S, de Almeida M, Fischer R, Barth S, Fendel R. **Antimalarial activity of granzyme B and its targeted delivery by a granzyme B-single-chain Fv fusion protein.** *Antimicrob Agents Chemother*, 2015; **59**: 669-72.
- 189 Zhou H, Mohamedali KA, Gonzalez-Angulo AM, Cao Y, Migliorini M, Cheung LH, LoBello J, Lei X, Qi Y, Hittelman WN, Winkles JA, Tran NL, Rosenblum MG. **Development of human serine protease-based therapeutics targeting Fn14 and identification of Fn14 as a new target overexpressed in TNBC.** *Mol Cancer Ther*, 2014; **13**: 2688-705.
- 190 Liu Y, Cheung LH, Thorpe P, Rosenblum MG. **Mechanistic studies of a novel human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)121 and the serine protease granzyme B: directed apoptotic events in vascular endothelial cells.** *Mol Cancer Ther*, 2003; **2**: 949-59.
- 191 Mohamedali KA, Cao Y, Cheung LH, Hittelman WN, Rosenblum MG. **The functionalized human serine protease granzyme B/VEGF(1)(2)(1) targets tumor vasculature and ablates tumor growth.** *Mol Cancer Ther*, 2013; **12**: 2055-66.
- 192 Cao Y, Mohamedali KA, Marks JW, Cheung LH, Hittelman WN, Rosenblum MG. **Construction and characterization of novel, completely human serine protease therapeutics targeting HER2/neu.** *Mol Cancer Ther*, 2013; **12**: 979-91.
- 193 Kurschus FC, Kleinschmidt M, Fellows E, Dornmair K, Rudolph R, Lilie H, Jenne DE. **Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin.** *FEBS Lett*, 2004; **562**: 87-92.
- 194 Liu Y, Cheung LH, Hittelman WN, Rosenblum MG. **Targeted delivery of human pro-apoptotic enzymes to tumor cells: In vitro studies describing a novel class of recombinant highly cytotoxic agents.** *Mol Cancer Ther*, 2003; **2**: 1341-50.
- 195 Liu Y, Zhang W, Niu T, Cheung LH, Munshi A, Meyn RE, Jr., Rosenblum MG. **Targeted apoptosis activation with GrB/scFvMEL modulates melanoma growth, metastatic spread, chemosensitivity, and radiosensitivity.** *Neoplasia*, 2006; **8**: 125-35.
- 196 Kanatani I, Lin X, Yuan X, Manorek G, Shang X, Cheung LH, Rosenblum MG, Howell SB. **Targeting granzyme B to tumor cells using a yoked human chorionic gonadotropin.** *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011; **68**: 979-90.
- 197 Zhang L, Zhao J, Wang T, Yu CJ, Jia LT, Duan YY, Yao LB, Chen SY, Yang AG. **HER2-targeting recombinant protein with truncated pseudomonas exotoxin A translocation domain efficiently kills breast cancer cells.** *Cancer Biol Ther*, 2008; **7**: 1226-31.
- 198 Wang T, Zhao J, Ren JL, Zhang L, Wen WH, Zhang R, Qin WW, Jia LT, Yao LB, Zhang YQ, Chen SY, Yang AG. **Recombinant immunoproapoptotic proteins with furin site can translocate and kill HER2-positive cancer cells.** *Cancer Res*, 2007; **67**: 11830-9.
- 199 Lorentsen RH, Fynbo CH, Thogersen HC, Etzerodt M, Holtet TL. **Expression, refolding, and purification of recombinant human granzyme B.** *Protein Expr Purif*, 2005; **39**: 18-26.
- 200 Gehrman M, Doss BT, Wagner M, Zettlitz KA, Kontermann RE, Foulds G, Pockley AG, Multhoff G. **A novel expression and purification system for the production of enzymatic and biologically active human granzyme B.** *J Immunol Methods*, 2011; **371**: 8-17.

- 201 Coloma MJ, Hastings A, Wims LA, Morrison SL. **Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction.** *J Immunol Methods*, 1992; **152**: 89-104.
- 202 Giesubel U, Dalken B, Mahmud H, Wels WS. **Cell binding, internalization and cytotoxic activity of human granzyme B expressed in the yeast *Pichia pastoris*.** *Biochem J*, 2006; **394**: 563-73.
- 203 Xia Z, Kam CM, Huang C, Powers JC, Mandle RJ, Stevens RL, Lieberman J. **Expression and purification of enzymatically active recombinant granzyme B in a baculovirus system.** *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; **243**: 384-9.
- 204 Jabulowsky RA, Oberoi P, Bahr-Mahmud H, Dalken B, Wels WS. **Surface charge-modification prevents sequestration and enhances tumor-cell specificity of a recombinant granzyme B-TGFalpha fusion protein.** *Bioconjug Chem*, 2012; **23**: 1567-76.
- 205 Rosenblum MG, Barth S. **Development of novel, highly cytotoxic fusion constructs containing granzyme B: unique mechanisms and functions.** *Curr Pharm Des*, 2009; **15**: 2676-92.
- 206 Zhang X, Sawyer GJ, Dong X, Qiu Y, Collins L, Fabre JW. **The in vivo use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct.** *J Gene Med*, 2003; **5**: 209-18.
- 207 Mutschler E, Geisslinger G, Kromer HK, Schäfer-Korting M. **Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.** Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2013.
- 208 Van Horssen PJ, Preijers FW, Van Oosterhout YV, Eling WM, De Witte T. **Relationship of the CD22 immunotoxin dose and the tumour establishment in a SCID mice model.** *Leuk Lymphoma*, 2000; **39**: 591-9.
- 209 Hollevoet K, Mason-Osann E, Muller F, Pastan I. **Methylation-associated partial down-regulation of mesothelin causes resistance to anti-mesothelin immunotoxins in a pancreatic cancer cell line.** *PLoS One*, 2015; **10**: e0122462.
- 210 Engert A, Brown A, Thorpe P. **Resistance of myeloid leukaemia cell lines to ricin A-chain immunotoxins.** *Leuk Res*, 1991; **15**: 1079-86.
- 211 Kellner C, Bruenke J, Stieglmaier J, Schwemmlein M, Schwenkert M, Singer H, Mentz K, Peipp M, Lang P, Oduncu F, Stockmeyer B, Fey GH. **A novel CD19-directed recombinant bispecific antibody derivative with enhanced immune effector functions for human leukemic cells.** *J Immunother*, 2008; **31**: 871-84.
- 212 Kontermann RE. **Dual targeting strategies with bispecific antibodies.** *MAbs*, 2012; **4**: 182-97.
- 213 Luo H, Hong H, Yang SP, Cai W. **Design and applications of bispecific heterodimers: molecular imaging and beyond.** *Mol Pharm*, 2014; **11**: 1750-61.
- 214 Zhang Y, Sun X, Huang M, Ke Y, Wang J, Liu X. **A novel bispecific immunotoxin delivered by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to target blood vessels and vasculogenic mimicry of malignant gliomas.** *Drug Des Devel Ther*, 2015; **9**: 2947-59.
- 215 Schubert I, Kellner C, Stein C, Kugler M, Schwenkert M, Saul D, Stockmeyer B, Berens C, Oduncu FS, Mackensen A, Fey GH. **A recombinant triplebody with specificity for CD19 and HLA-DR mediates preferential binding to antigen double-positive cells by dual-targeting.** *MAbs*, 2012; **4**: 45-56.
- 216 Buhler P, Wolf P, Gierschner D, Schaber I, Katzenwadel A, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, Tacke M, Swamy M, Schamel WW, Elsasser-Beile U. **A bispecific diabody directed against prostate-specific membrane antigen and CD3 induces T-**

- cell mediated lysis of prostate cancer cells.** *Cancer Immunol Immunother*, 2008; **57**: 43-52.
- 217 Kugler M, Stein C, Kellner C, Mentz K, Saul D, Schwenkert M, Schubert I, Singer H, Oduncu F, Stockmeyer B, Mackensen A, Fey GH. **A recombinant trispecific single-chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting.** *Br J Haematol*, 2010; **150**: 574-86.
- 218 Waldron NN, Barsky SH, Dougherty PR, Vallera DA. **A bispecific EpCAM/CD133-targeted toxin is effective against carcinoma.** *Target Oncol*, 2014; **9**: 239-49.
- 219 Bachanova V, Frankel AE, Cao Q, Lewis D, Grzywacz B, Verneris MR, Ustun C, Lazaryan A, McClune B, Warlick ED, Kantarjian H, Weisdorf DJ, Miller JS, Vallera DA. **Phase I study of a bispecific ligand-directed toxin targeting CD22 and CD19 (DT2219) for refractory B-cell malignancies.** *Clin Cancer Res*, 2015; **21**: 1267-72.
- 220 Keller J, Heisler I, Tauber R, Fuchs H. **Development of a novel molecular adapter for the optimization of immunotoxins.** *J Control Release*, 2001; **74**: 259-61.
- 221 Hetzel C, Bachran C, Fischer R, Fuchs H, Barth S, Stocker M. **Small cleavable adapters enhance the specific cytotoxicity of a humanized immunotoxin directed against CD64-positive cells.** *J Immunother*, 2008; **31**: 370-6.
- 222 Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H. **Immunogenicity of therapeutic proteins: the use of animal models.** *Pharm Res*, 2011; **28**: 2379-85.

## VI. Anhang

### VI.1 Vektorkarten und Sequenzen

#### VI.1.1 Vektorkarten

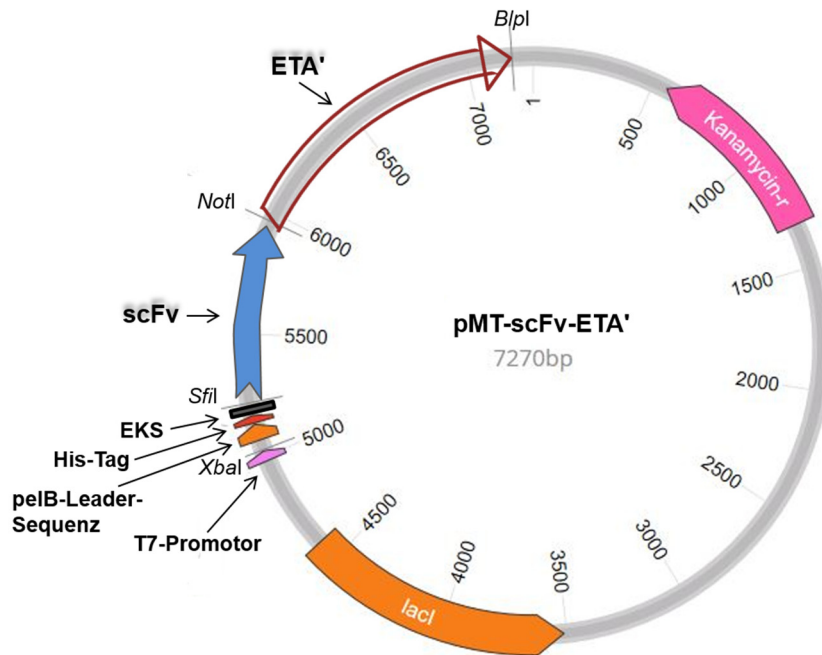
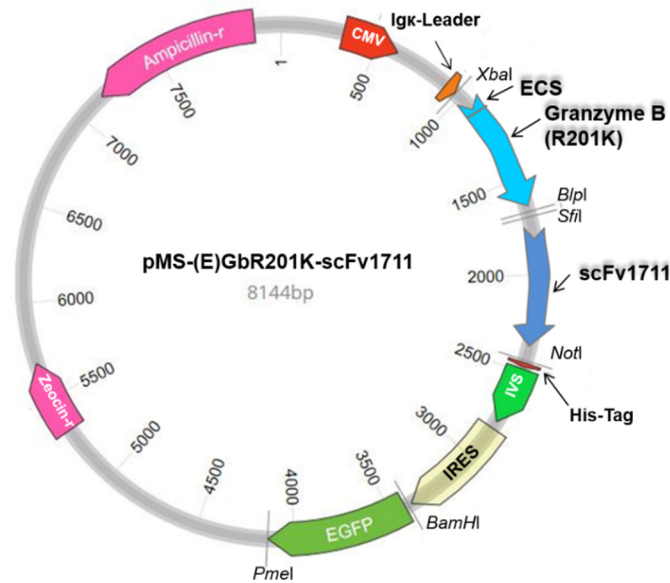


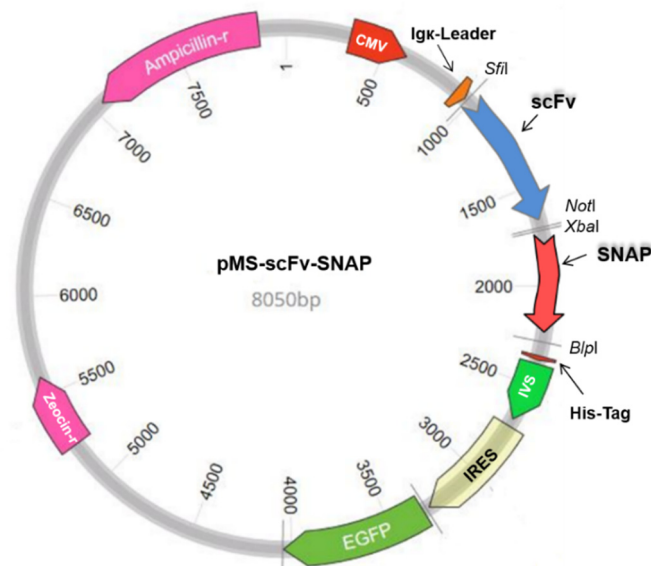
Abbildung VI-1: Vektorkarte von pMT-scFv-ETA'

In diesem Vektor liegt N-terminal der scFv vor und C-terminal die toxische Domäne ETA'. Vor dem scFv liegen der T7-Promotor, die *pelB*-Leader-Sequenz, der His-Tag (10x) und eine Enterokinase-Erkennungssequenz. Das Kanamycinresistenzgen und *lacI*, die Gensequenz für den Lac-Inhibitor, sind ebenfalls dargestellt. Hier kann scFv2112 oder scFv1711 über *SfiI/NotI*-Verdau eingesetzt werden.



**Abbildung VI-2: Vektorkarte pMS-(E)GbR201K-scFv1711**

Der scFv1711 liegt im Vektor C-terminal vor und die Effektor-domäne (E)GbR201K N-terminal. Vor dem GbR201K befinden sich die Enterokinase-Schnittstelle (ECS), der Igk-Leader und der CMV-Promotor. Im offenen Leseraster sind die Transkriptionsrichtungen über Pfeile dargestellt. C-terminal befindet sich der His-Tag (6x), die IVS/IRES das synthetische Intron und die interne ribosomale Eintrittsstelle zur Überprüfung der Transkription sowie EGFP. Das Zeocinresistenzgen wird für die Kultivierung in eukaryotischen Zellen genutzt und das Ampicillinresistenzgen für die Klonierung.



**Abbildung VI-3: Vektorkarte pMS-scFv-SNAP**

Beispielhafte Darstellung der Vektorkarte für ein pMS-scFv-SNAP-Konstrukt, hier kann scFv212 als auch scFv1711 über *SfiI/NotI*-Verdau eingesetzt werden. Der Vektor besteht aus denselben Bestandteilen wie in Abbildung VI-2 beschrieben, bis auf die Enterokinaseschnittstelle. Der scFv liegt in diesem Vektor N-terminal vor und der SNAP-Tag C-terminal.

## VI.1.2 Sequenzen der scFv-Ak-Fragmente

Im Folgenden werden die Sequenzen der in dieser Arbeit genutzten neuen scFvs scFv2112 und scFv1711 aufgeführt, inklusive der angefügten Schnittstellen.

```

g gccacgcccgg cccaggtcca gctgcagcag
a a q p a q v q l q q
-----Sfi-----
>>....scFv2112.....>
p g p a a a

1001 tctggcggcc agctgatgaa gccaggcgcc agcgtgaaga tcagctgcaa gccaccggc tacaccttca gcagctactg gatcgagtgg gtaacgacgc
s g a e l m k p g a s v k i s c k a t g y t f s s y w i e w v k q
>.....scFv2112.....>
v w r r a d e a r r q r e d q l q g h r l h l q q l l d r v g q a

1101 ggcctggcca cggcctggaa tggatcggcg agatcctgcc cggcagcaaa aagaccaact acaacgagaa gtccaagggg aagccacct tcaccgccga
r p g h g l e w i g e i l p g s k k t n y n e k f k g k a t f t a
>.....scFv2112.....>
a a w p r p g m d r r d p a r q q k d q l q r e v q g e g h l h r r

1201 caccagcagc aacaccgctc acatgcagtt cagcagcctg accagcggag acagcgcctg gtactactgc gcccggtact actaccggaa cgacgactac
d t s s n t a y m q f s s l t s e d s a v y y c a r y y r n d d y
>.....scFv2112.....>
h q q q h r l h a v q q p d q r g q r r v l l r p v l l p e r r l
(Gly4Ser)3- Linker-----
1301 ggcattgact actggggcca gggcacctcc gtgaccgtgt ctgacggagg cggaggatct ggcggagggg gatcaggggg aggcggcagc gagatccaca
g m d y w g q g t s v t v s s g g g g s g g g g s e i h
>.....scFv2112.....>
r h g l l g p g h l r d r v - r r r r r i w r r g i r g r r q r d p

1401 tgaccagacg caccagctcc ctgagcgcca gcctggggcga cagagtacc atcagctgct ccgccagcca ggacatccgg aactacctga actggatca
m t q t t s s l s a s l g d r v t i s c s a s q d i r n y l n w y
>.....scFv2112.....>
h d p d h q l p e r q p g r q s d h q l l r q p g h p e l p e l v s

1501 gcagaaaccc gacggcaccg tgaagctgct gatctactac accagcaccg tgcacagcgg cgtgccacgc agattcagcg gctctggcag cggcaccgac
q q k p d g t v k l l i y y t s t l h s g v p s r f s g s g s g t d
>.....scFv2112.....>
a e t r r h r e a a d l l h q h p a q r r a q q i q r l w q r h r

1601 tactccctga ccattctcaa cctggaaccc gaggatateg ccacctacta ctgccagcag tacagcaaga tcccctaac ctttaccggc ggcaccaagc
y s l t i s n l e p e d i a t y y c q q y s k i p y t f t g g t k
>.....scFv2112.....>
l l p d h l q p g t r g y r h l l l p a v q q d p l h l y r r h q

1701 tggaaatcaa gcggtctgcg gccgca
l e i k r a a a a a
>.....scFv2112.....
a g n q a g c g r
-----NotI-----

```

**Abbildung VI-4: Sequenz des scFv2112**

Dargestellt ist die Sequenz des scFv2112 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-Orientierung) inklusive der Schnittstellen *Sfi*I und *Not*I und dem (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-Linker.

```

g gccagccgg cccaggttca gctgcaagaa
a a q p a q v q l q e

-----SfiI----->>.....'scFv1711'.....>
g p g s a a r

1001 agcggctccg gtctggttaa acggagccag accctgagcc tgacctgtac cgttagcggg ggtagcatta gcagcgggta ttactactgg acctggattc
s g p g l v k p s q t l s l t c t v s g g s i s s g d y y w t w i
>.....'scFv1711'.....>
k r s g s g - t e p d p e p d l y r - r w - h - q r - l l l d l d

1101 gtcagcctcc gggtaaaggt ctggaatgga ttggtcatat ctattatagc ggcaacacca attataaccc gagcctgaaa agccgtgtta ccattagcgt
r q p p g k g l e w i g h i y y s g n t n y n p s l k s r v t i s
>.....'scFv1711'.....>
s s a s g - r s g m d w s y l l - r q h q l - p e p e k p c y h - r

1201 tgataccagc aaaaccaggt tttagcctgaa actgagcagc gttaccgcag cagataccgc agttttattac tgtgcacggt atcgtgttac cgggtgcatt
v d t s k t q f s l k l s s v t a a d t a v y y c a r d r v t g a f
>.....'scFv1711'.....>
- y q q n p v - p e t e q r y r s r y r s l l l c t - s c y r c i
------(Gly,Ser)3-Linker-----

1301 gatatttggg gtcagggtac aatggttacc gtttcaagcg gtggtggtgg tagtggtggc ggtggttcag gcggtggcgg tagcgatatt cagatgacc
d i w g q g t m v t v s s g g g g s g g g g s g g g s d i q m t
>.....'scFv1711'.....>
- y l g s g y n g y r f k r w w w - w w r w f r r w r - r y s d d

1401 agagcccagc cagcctgagc gcaagcgttg gtgatcgcgt gaccattacc tgtcaggcaa gccaggatat tagcaattat ctgaattggt atcagcagaa
q s p s s l s a s v g d r v t i t c q a s q d i s n y l n w y q q
>.....'scFv1711'.....>
p e p e q p e r k r w - s r d h y l s g k p g y - q l s e l v s a e

1501 acctggcaaa gcaccgaaac tgctgattta tgatgcaagc aatctgaaaa cgggtgttcc gagccgtttt agcggtagcg gtagtggcac cgattttacc
k p g k a p k l l i y d a s n l e t g v p s r f s g s g s g t d f t
>.....'scFv1711'.....>
t w q s t e t a d l - c k q s g n r c s e p f - r - r - w h r f y

1601 tttaccattt ctagcctgca gccggaagat attgcaacct attattgtca gcactttgat catctgcccg tggcatttgg tgggtggcacc aaagttgaaa
f t i s s l q p e d i a t y y c q h f d h l p l a f g g g t k v e
>.....'scFv1711'.....>
l y h f - p a a g r y c n l l l s a l - s s a a g i w w w h q s -

1701 ttaaactgtc ggccgca
i k r a a a
>.....>> 'scFv1711'
n - t c -----NotI-----

```

### Abbildung VI-5: Sequenz des scFv1711

Die Sequenz des scFv1711 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-Orientierung) inklusive der Schnittstellen *Sfi*I und *Not*I und dem (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-Linker ist dargestellt.

## VI.2 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
ADC	„Antibody-Drug conjugates“
ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität
AGT	<i>O</i> (6)-Alkylguanin DNA Alkyltransferase
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ARMS	alveolares Rhabdomyosarkom
AV	Annexin V
BG	<i>O</i> 6-Benzylguanin
CDC	„complement-dependent cytolysis/cytotoxicity“
C <sub>H</sub>	Konstante schwere Kette
CI	Konfidenzintervall
CQ	Chloroquin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECS	Enterokinase-Schnittstelle
EK	Enterokinase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„epidermal growth factor“
EGFR	EGF-Rezeptor
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
ETA	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A
ETA'	ETA (mit Deletion der Zellbindedomäne)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	„fluorescent activated cell sorting“
Fc	„Fragment crystallizable“
FDA	„food and drug association“
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gb	Granzym B in Fusionsproteinen
GrB	Granzym B



hCFP	humanes zytolytisches Fusionsprotein
HER-2	“human epidermal growth factor receptor-2”
His	Histidin
IT	Immuntoxin
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NBT/BCIP	Nitro-Blau Tetrazolium Chlorid/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat
n.d.	nicht definiert
NIR	nah-infrarot
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NTA	Nitrilotriessigsäure
PARP	poly(ADP-Ribose) Polymerase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
RMS	Rhabdomyosarkom
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
scFv	„single-chain Fragment variable“
SDS	Natriumdodecylsulfat/“sodium dodecyl sulfat”
SDS-PAGE	SDS-–Polyacrylamid Gelelektrophorese
SPR	“Surface Plasmon Resonance”
TEMED	Acrylamid-N, N'-Methylen-bis-acrylamid-tetramethyldiamin
TKI	Tyrosin-Kinase Inhibitoren
TNBC	“triple negative breast cancer”
ün	Über Nacht
V <sub>H</sub>	variable schwere Kette
V <sub>L</sub>	variable leichte Kette
v/v	Volumenprozent /“volume to volume“
WB	Western Blot
w/v	Gewichtsprozent/“weight to volume“
XTT	Tetrazoliumsalz (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

## VI.3 Index der Abbildungen und Tabellen

### VI.3.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1: Schematische Darstellung von Ak und Ak-Fragmenten .....	5
Abbildung I-2: Intrazelluläre Wirkweise von scFv-basierten IT .....	9
Abbildung I-3: Die verschiedenen Generationen von IT- von alt zu neu .....	11
Abbildung I-4: Zelluläre Aufnahme von GrB und GrB Fusionsproteinen (hCFP).....	13
Abbildung I-5: Die SNAP-Tag Technologie und ihre Verwendung.....	16
Abbildung I-6: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes als Flussdiagramm.....	18
Abbildung III-1: Expressionsvektor von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP.....	50
Abbildung III-2: Reinigung von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP und Markierung mit BG-Fluorophoren.....	51
Abbildung III-3: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsaktivität der scFv2112- SNAP, scFv1711-SNAP und 425(scFv)-SNAP Fusionsproteine .....	52
Abbildung III-4: Internalisierungsverhalten von scFv2112-SNAP, scFv1711-SNAP und 425(scFv)-SNAP .....	54
Abbildung III-5: Bestimmung des Kompetitionsverhaltens der Vollängen-Ak und der abgeleiteten scFvs.....	55
Abbildung III-6: Schematische Darstellung der Affinitätsbestimmung der abgeleiteten scFv-SNAP Fusionsproteine über das „BiotinCAPture Kit“ .....	56
Abbildung III-7: SPR-Sensogramm von scFv2112-SNAP und scFv1711-SNAP – Biotin CAPture Kit .....	57
Abbildung III-8: Sensogramm von Cetuximab und Panitumumab – Protein A Chip .....	58
Abbildung III-9: <i>In vitro</i> Binde- und Internalisierungseigenschaften von scFv2112-SNAP mit PC-3 Zellen.....	61
Abbildung III-10: <i>In vivo</i> Fluoreszenz-Bildgebung von PC-3 und L540cy subkutanen Tumoren .....	62
Abbildung III-11: Schema des scFv-ETA Expressionsvektors, SDS-PAGE und WB-Analyse der gereinigten IT .....	64
Abbildung III-12: Spezifische Bindungseigenschaften der rekombinanten IT und der parentalen mAk.....	66

---

Abbildung III-13: Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA' in verschiedene EGFR <sup>+</sup> -Zelllinien .....	67
Abbildung III-14: XTT-Zytotoxizitätsstudien von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und der Referenz 425(scFv)-ETA' auf verschiedenen Zelllinien .....	69
Abbildung III-15: Bestimmung der pro-apoptotischen Aktivität von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA' über AV-EGFP/PI-Färbung .....	71
Abbildung III-16: Bindung der neuen IT scFv2112-ETA' und scFv1711-ETA' und der parentalen mAk auf Primärmaterial .....	73
Abbildung III-17: Spezifische Bindung von 425(scFv)-ETA' auf RMS-Tumorbiopsien.....	74
Abbildung III-18: Expressionsvektor von GbR201K-scFv1711, Analyse über SDS-PAGE .... und WB.....	75
Abbildung III-19: Enzymatische Aktivität von GbR201K-scFv1711 und seine spezifische Bindungseigenschaft.....	77
Abbildung III-20: Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von GbR201K-scFv1711 .....	78
Abbildung III-21: XTT-basierter Zellviabilitätsassay von GbR201K-scFv1711 in Kombination mit CQ .....	81
Abbildung III-22: Apoptoseinduktion von GbR201K-scFv1711 auf den EGFR <sup>+</sup> -Zelllinien mit und ohne CQ-Behandlung.....	83
Abbildung III-23: Darstellung der früh- und spät-apoptotischen Effekte von GbR201K-scFv1711.....	84
Abbildung III-24: Bindung von EGbR201K-scFv1711 und GbR201K-scFv1711 auf Primärmaterial .....	85
Abbildung VI-1: Vektorkarte von pMT-scFv-ETA' .....	128
Abbildung VI-2: Vektorkarte pMS-(E)GbR201K-scFv1711 .....	129
Abbildung VI-3: Vektorkarte pMS-scFv-SNAP .....	129
Abbildung VI-4: Sequenz des scFv2112.....	130
Abbildung VI-5: Sequenz des scFv1711.....	131

### **VI.3.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle I-I Zahlen der prognostizierten Todesfälle in der EU in 2014 im Vergleich zu 2009 .	1
Tabelle II-I Verwendete Enzyme, Standards und Reaktionskits.....	20
Tabelle II-II Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle II-III Übersicht der verwendeten Ak.....	27
Tabelle II-IV Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.....	28
Tabelle II-V Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren .....	29
Tabelle II-VI Verwendete Bakterienstämme .....	29
Tabelle II-VII Verwendete Zelllinien .....	30
Tabelle II-VIII Verwendete BG-Farbstoffe und BG-Biotin .....	32
Tabelle II-IX PCR Reaktions-und Pipettierschema .....	33
Tabelle II-X PCR-Cycler Einstellungen .....	33
Tabelle III-I Auflistung der Werte nach Affinitätsbestimmung über SPR-Analyse.....	60
Tabelle III-II EGFR Expressions-Level.....	66
Tabelle III-III IC50-Werte von scFv2112-ETA', scFv1711-ETA' und 425(scFv)-ETA'.....	71
Tabelle III-IV Serumstabilität von GbR201K-scFv1711 in humanem Serum .....	80
Tabelle III-V IC50-Werte von GbR201K-scFv1711 auf den EGFR+-Zelllinien.....	83
Tabelle IV-I Publierte GrB-basierte CFPs als Therapie-Ansatz in soliden Tumoren.....	104

## **VI.4 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken die mich sowohl in fachlicher als auch persönlicher Hinsicht während meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Fischer für die Möglichkeit, diese Dissertation am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie in Aachen durchführen zu können und für seine freundliche Unterstützung und Betreuung.

Außerdem danke ich herzlich Herrn Prof Dr. Dr. Stefan Barth für die wissenschaftliche Betreuung und fachliche Unterstützung während seiner Zeit in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Produktentwicklung am Fraunhofer IME.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Jannen-Dechent danke ich ganz herzlich für die kurzfristige Bereitschaft als Ko-Referent zur Verfügung zu stehen und Herrn Prof. Dr. Johannes Bohrmann danke ich für die freundliche Übernahme der Rolle des Drittprüfers.

Ein ganz besonderer und außerordentlich großer Dank gilt Dr. Christoph Stein, für eine mehr als vorbildliche Betreuung, uneingeschränkte Unterstützung in jeglichen Fragestellungen und zu jeder Zeit und für den geteilten Ehrgeiz und Spaß an der Wissenschaft.

Während meiner Zeit und Finanzierung bei der Pharmedartis GmbH danke ich Herrn Dr. Georg Melmer und ganz besonders Frau Dr. Grit Hehmann-Titt für ihre wissenschaftliche Betreuung, ihre stetige Hilfe und ihren immerwährenden Frohsinn.

Herzlich danke ich auch Dr. Rolf Fendel für seine Unterstützung während meiner Promotion, in wissenschaftlicher und finanzieller Hinsicht sowie für die Möglichkeit eigenständig Verantwortung in Projekten zu übernehmen und mein wissenschaftliches Fenster zu erweitern.

Für die Hilfe an Geräten, bei Experimenten und die Bereitstellung von Material danke ich: Markus Sack, Nina Berges, Radoslav Mladenov, Hannes Brehm, Stephanie Kapelski, Dr. Rolf Fendel, Dr. Stefano di Fiore, Dr. Theo Thepen, Dr. Mehmet Thur und Dr. Florian Kampmeier.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitern, Büro- und Laborpartnern die mich auf dem Weg meiner Promotion begleitet, unterstützt und für eine schöne Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Ganz herzlich danke ich Mareike Staudt, für eine tolle Zusammenarbeit und Freundschaft, Mira Voitok und Dr. Dmitrij Hristodorov für den gemeinsamen Spaß im Labor und an der Forschung sowie den produktiven Diskussionen.

Danke an all meine Büronachbarn, ganz besonders Melanie Seidel fürs Zusammenhalten, Lea Schenke auch für ihre Hilfe bei den Tierversuchen, Diana Klose, Susanne Bethke und Christian Cremer. Allen Technikern danke ich für ihren Einsatz, insbesondere Anh-Tuan Pham, Severin Schmies, Kai Fuhrman, Jens Bührmann und Reinhard Rosinke. Herzlichen Dank an Dr. Birgit Orthen für ihre Unterstützung in allen Promotions-relevanten Fragestellungen.

Vielen Dank an Christoph und Severin für das Abschalten bei genialen Lauf- und Konzertveranstaltungen.

Ganz herzlich danke ich meiner gesamten Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihr Vertrauen in mich, nicht nur während meiner Promotion.

Meinen wunderbaren Freunden danke ich für alles, ihr seid meine zweite Familie!

Einem ganz besonderen Menschen danke ich von ganzem Herzen für sein Vertrauen und seinen grenzenlosen und liebevollen Rückhalt... it was us against the world!

## **VI.5 Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Judith Iris Niesen  
Geburtsdatum: 17. November 1984  
Geburtsort: Zell-Mosel (Deutschland)



### **Akademische Laufbahn und Berufspraxis**

01/2014-10/2015 Fraunhofer IME, Aachen/RWTH Aachen University  
Position: Doktorandin  
Thema: Antikörper-abgeleitete zytolytische Fusionsproteine zur Behandlung unterschiedlicher Krebserkrankungen

08/2011 – 12/2013 Pharmedartis GmbH, Aachen/RWTH Aachen University  
Position: Doktorandin  
Thema: Antikörper-abgeleitete zytolytische Fusionsproteine zur Behandlung von Krebserkrankungen, Fokus: Prostatakarzinom

01/2011-07/2011 Institute of Neurology, London/University College London, UK  
Abteilung: MRC Prion Unit  
Position: Senior placement student  
Thema: Gateway Klonierung von Marker-Genen für Prionen- und verwandte neurodegenerative Erkrankungen

12/2009-12/2010 Pharmedartis GmbH, Aachen  
Position: Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Themengebiet: Forschung & Entwicklung

09/2009-11/2009 Institut für Nano- und Biotechnologien (INB), FH Aachen in Kooperation mit dem Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI), Hamburg  
Deutsches Forschungsschiff „FFS Walther Herwig III“  
Forschungsreise nach Grönland, Arktische See  
Position: Wissenschaftliche Mitarbeiterin

04/2009-09/2009	Thema: Phytoplankton-Analyse/Fluoreszenzmessungen von Chlorophyll-A – Klimaerwärmungs-Auswirkungen Pharmedartis GmbH, Aachen Position: Wissenschaftliche Mitarbeiterin Themengebiet: Forschung & Entwicklung
09/2008-04/2009	Fraunhofer IME, Aachen Abteilung: Pharmazeutische Produktentwicklung Position: Diplomandin Thema: EGF-Rezeptor-Targeting am Beispiel des Pankreaskarzinoms - <i>in vitro</i> Charakterisierung von humanen Immuntoxinen und <i>in vivo</i> optische Bildgebung
04/2008-08/2008	Fraunhofer IME, Aachen Position: Praktikantin Themengebiet: Grundlagen der Molekularbiologie
07/2004-09/2004	Chemisches-und Lebensmitteluntersuchungsamt der Stadt Aachen Position: Praktikantin, Studium-vorbereitend

### **Schule und Studium**

09/2004-04/2009	Fachhochschule Aachen, Campus Jülich Studiengang: Bioingenieurwesen Schwerpunkt: Biotechnologische Verfahren Abschlussnote: 1,7 Abschluss: Diplom Ingenieurin (FH)
08/1997-03/2004	Martin-von-Cochem-Gymnasium, Cochem Schulabschluss: Abitur
08/1995-06/1997	Gemeinsame Orientierungsstufe der Realschule und des Martin-von-Cochem-Gymnasiums
08/1991-06/1995	Grundschule der Gemeinde Bullay

### **Qualifikationen**

FELASA B Zertifikat, 2015  
eBioscience Flow Cytometry Seminar Zertifikat, 2012