

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung des CH2/CH3-trunkierten dimerisierten anti-CD30-IgG1-TNF-Fusionsproteins

Im vorliegenden Immunzytokin wurden die Domänen CH2/CH3 des humanen Fc-Fragmentes durch das menschliche TNF-Molekül ersetzt. Die Multimerisierungstendenz des TNF-Moleküls und die natürliche, über die Disulfidbrücke stabilisierte IgG1-hinge Region erlauben eine Dimerisierung, d.h. es kommt zur Ausbildung der bekannten bivalenten Struktur mit zwei F(ab)₂ Fragmenten zur spezifischen und hochaffinen Antigenerkennung.

Die Herstellung des Immunzytokins wurde mittels der üblichen DNA-Rekombinationstechniken, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, durchgeführt:

Die variablen Regionen der HRS3 heavy chain (HC) und light chain (LC) wurden zunächst mittels PCR amplifiziert. Die dazu nötigen Primerpaare waren jeweils am 5'-Ende mit den nötigen Restriktionsenzymchnittstellen versehen, um ein Einklonieren in die entsprechenden Vektoren zu ermöglichen. Als Template dienten im Labor vorhandene Vektoren mit HRS3 HC und LC. Nach Restriktionsenzymverdau wurden PCR-Produkte und Vektoren im Agarosegel aufgetrennt, die benötigten Fragmente extrahiert und anschließend in die entsprechenden Vektoren (pREN) ligiert. Diese Vektoren enthielten jeweils den trunkierten, konstanten Anteil von HC und LC und waren ebenfalls im Labor bereits vorhanden. Orientierung und Identität der einklonierten Inserts wurden dabei über Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung kontrolliert. In gleicher Weise wurde die für das humane TNF-Molekül kodierende cDNA in das Vektorkonstrukt eingebracht.

Kleinere Mengen an Protein wurden durch transiente Expression mittels Fugene in CHO-Zellen produziert, für größere Proteinmengen wurde die transiente Expression nach der Calcium-Phosphat-Methode in HEK-293-Zellen durchgeführt, wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Für die letztere Methode wurden die Konstrukte in das pEAK-8-Vektorsystem umkloniert. Nach der transienten Expression wurde das Protein aus dem Überstand über eine Protein-L-Säule aufgereinigt. Die Reinheit des Eluates wurde unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3). Die Schwerekette (HC) ist dabei ein wenig kleiner als die normale IgG1-HC und läuft bei 47 kD. Da die

menschliche Leichtkette in diesem Konstrukt nicht verändert ist, läuft sie wie erwartet bei 28 kD. Um geeignete Kontrollen zur Verfügung zu haben, waren ein chimärer anti-CD 30-Antikörper (ch-HRS3) und ein intakter humaner anti-FAP Antikörper (Fibroblasten-aktivierendes Protein) bereits hergestellt worden.

kDa 1 2 3 4 5

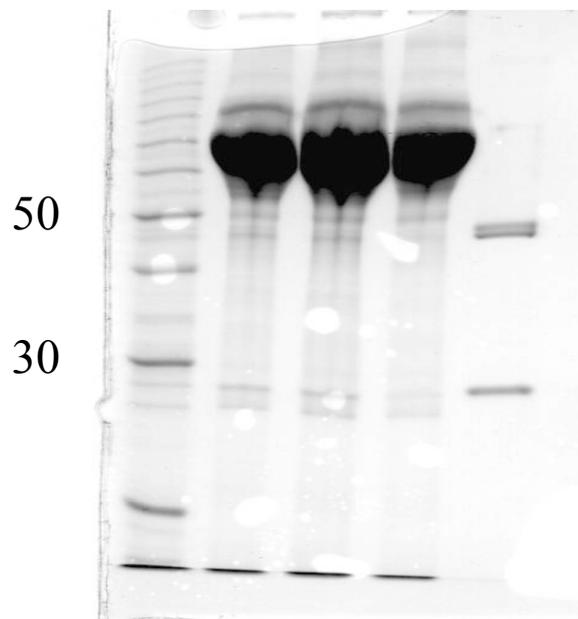


Abbildung 3: SDS-PAGE des anti-CD30-IgG1-TNF-Dimers. Das Immunzytokin war über Protein L Säulen aufgereinigt worden; mehrere Reinigungsschritte wurden in der Gelelektrophorese analysiert. Dargestellt sind: 10 μ l des Zellkulturüberstandes nach transienter Calcium-Phosphat Transfektion (Lane 1), das Produkt nach Dialyse gegen PBS (10 μ l, Lane 2), der Durchfluss (10 μ l, Lane 3) und das Eluat (10 μ l, Lane 4). Das Konstrukt zeigt unter reduzierenden Bedingungen die erwartete Größe von 45 kDa (HC-TNF) und 28 kDa (LC).

4.2. Charakterisierung des Fusionsproteins und seiner Bindungseigenschaften

4.2.1. Bindung des Konstruktes

Die Fähigkeit des Fusionsproteins, sein Zielantigen zu binden, wurde durchflusszytometrisch untersucht. Das anti-CD30-TNF-Konstrukt wurde dabei mit dem elterlichen chimären anti-CD30 Antikörper (chHRS3) verglichen. Wie in Abbildung 4 dargestellt, zeigte sich im ausgetesteten Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 0,1 ng/ml eine etwas niedrigere Affinität des anti-CD30-TNF-Konstruktes verglichen mit dem elterlichen chHRS3. Als Sekundärantikörper diente ein anti-human-Fab Antikörper. Als Negativkontrolle wurde das anti-FAP-TNF-Dimer benutzt. Eine spezifische Bindung auf CD30 negativen Zelllinien war nicht feststellbar (nicht dargestellt).

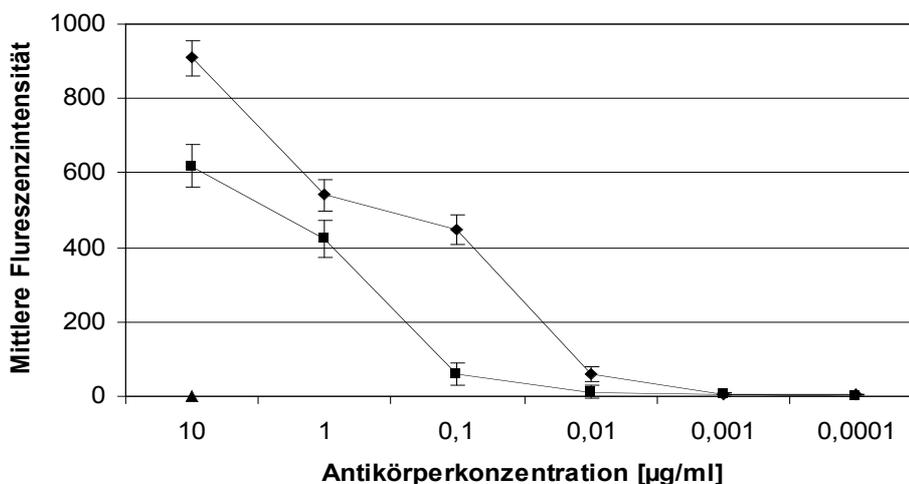


Abbildung 4: Bindungseigenschaften des Anti-CD30-TNF-Dimers (chHRS3-TNF) und des elterlichen chHRS3. Die Zelloberflächenbindung wurde durchflusszytometrisch quantifiziert mittels der CD30 exprimierenden Zelllinie L540cy. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Bindung in der jeweiligen Konzentration der Antikörper [anti-CD30-TNF (■), elterlicher anti-CD30-Antikörper (◆), anti-FAP-TNF (▲)] wurde analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung einer dreifachen Versuchsdurchführung.

4.2.2. Integrität des Konstruktes

Die Integrität des anti-CD30-TNF-Konstruktes wurde ebenfalls durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die Bindung wurde auf CD30-exprimierenden L540CY-Zellen gezeigt, in dem als Sekundärantikörper ein Anti-human-TNF- α -Antikörper benutzt wurde. Als Negativkontrollen dienten dabei sowohl der elterliche chHRS3 als auch der anti-FAP-TNF Antikörper. Da das Immunzytokin über den Anti-human-TNF- α -Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden nachgewiesen wurde, ist das Konstrukt intakt.

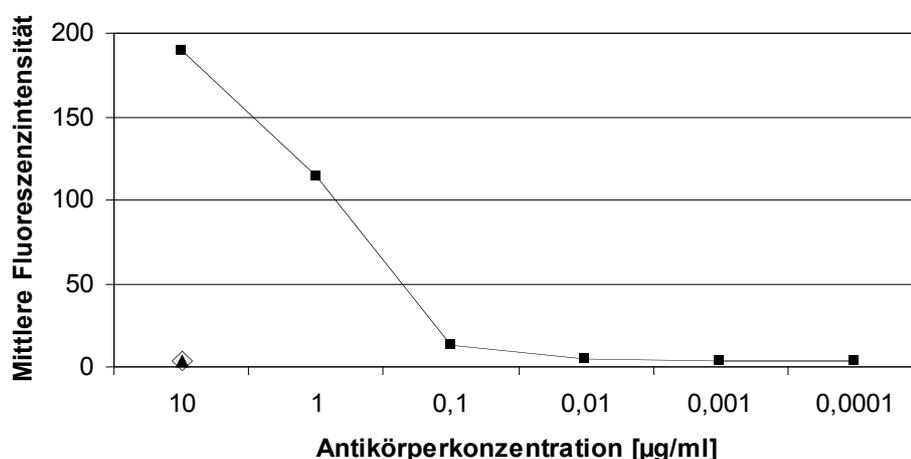


Abbildung 5: Integrität des Anti-CD30-TNF-Dimers (chHRS3-TNF). Die Zelloberflächenbindung wurde durchflusszytometrisch quantifiziert mittels der CD30 exprimierenden Zelllinie L540CY. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Bindung in der jeweiligen Konzentration der Antikörper [anti-CD30-TNF (■), elterlicher anti-CD30-Antikörper (◇), anti-FAP-TNF (▲)] wurde analysiert.

4.3. Funktionalität des Konstruktes

Das Anti-CD30-TNF-Dimer ist derart gestaltet, dass nach Bindung des CD30 Antigens auf Hodgkintumorzellen eine zielgerichtete, membrangebundene TNF-Bioreaktivität über beide TNF-Rezeptortypen erfolgen soll. Zur In vitro-Überprüfung der Funktionalität wurde das Konstrukt auf CD30 positiven L540CY Zellen absorbiert. Ungebundener Antikörper bzw. TNF wurden gewaschen. Dann wurden WEHI-164-Zellen hinzugegeben. Bei gebundenen Antikörpern ließ sich wie erwartet eine starke, konzentrationsabhängige Lyse der WEHI-

Targetzellen beobachten. Dies bedeutet, dass die Bindung des Konstruktes an CD30 und die Vermittlung des TNF- α abhängigen Zelltodes zur gleichen Zeit erfolgt. Eine derartige Aktivität konnte bei dem unbeteiligten Anti-FAP-TNF-Antikörper bzw. bei dem elterlichen chHRS3 Antikörper nicht nachgewiesen werden. Bei Zugabe von humanem TNF (Genzyme) ließ sich eine leichte lytische Aktivität nachweisen. Diese beruht a.e. auf einer geringfügigen TNF-Rezeptorexpression der Zelllinie L540CY (nicht dargestellt), wodurch geringe Mengen TNF auf der Zelloberfläche fixiert werden, die dann den WEHI-Zellen „präsentiert“ werden. Eine WEHI-164 Variante, die unter TNF- α -Zugabe selektioniert wurde, ist teilweise TNF- α resistent (WEHI-R). Bei Zugabe dieser Zelllinie zeigten sich eine deutlich schwächere Reaktion auf das Immunzytokin.

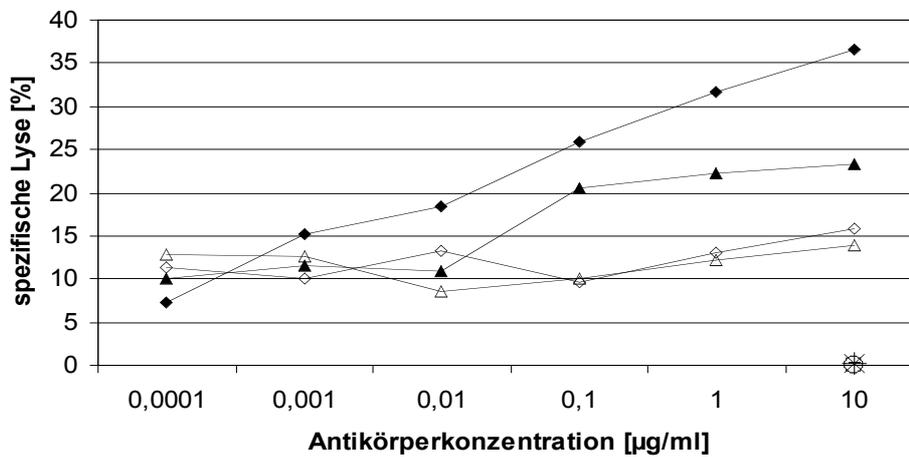


Abbildung 6: Funktionalität des membrangebundenen Anti-CD30-TNF-Dimers (chHRS3-TNF). Auf L540cy-Zellen (CD30 positiv) gebundener chHRS3 (◆,◇) sowie humanes TNF- α (Genzyme, ▲,△) wurden mit TNF-sensitiven (WEHI-S, geschlossene Symbole) und TNF-resistenten (WEHI-R, offene Symbole) Zellen inkubiert und die spezifische Lyse durch AnnexinV-Expression quantifiziert. Keine Lyse war nachweisbar mit dem elterlichen chHRS3-Antikörper (*), dem unbeteiligten Anti-FAP-TNF-Antikörper (○) sowie Medium alleine (—).