

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung, Aufreinigung und Nachweis eines CD33-spezifischen IgM-Antikörpers

4.1.1. Herstellung und Aufreinigung des Antikörpers

CD33-spezifische IgM-Antikörper wurden durch transiente Genexpression in HEK 293-EBNA-Zellen hergestellt. Zur weiteren Isolierung des Antikörpers wurde der Überstand der transienten Genexpression mit Hilfe der ÄKTA™ prime mit HiTrap™ Säulen aufgereinigt. Die gereinigte Proteinmenge wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden in Coomassie unspezifisch gefärbt.

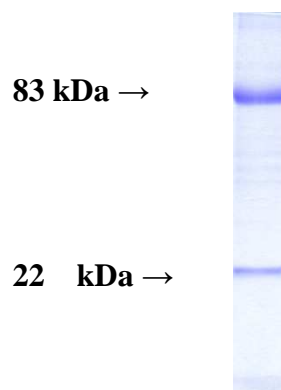
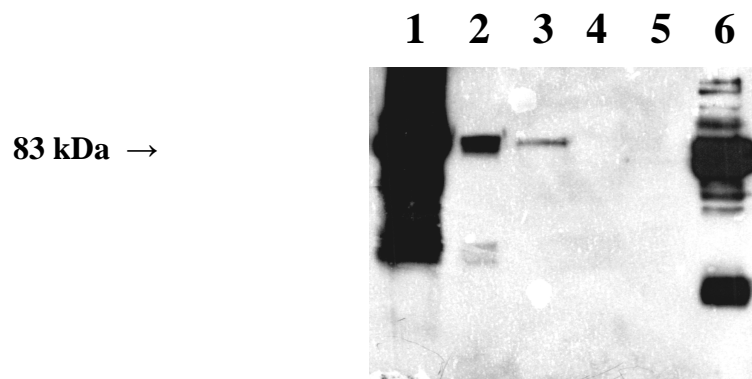


Abbildung 4: Coomassiefärbung des aufgereinigten anti-CD33-Antikörper nach einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese: nach der Aufreinigung des exprimierten Proteins aus dem HEK 293-Zellkulturüberstand wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel anschliessend unspezifisch mit Coomassie angefärbt. Die danach sichtbaren Banden bei 22 und 83 kDa entsprechen jeweils einer IgM light- und heavy-chain.

Es zeigten sich zwei saubere Banden, eine bei 83,3 kDa und eine bei ungefähr 22 kDa. Die obere Bande entspricht der schweren Kette eines Monomers des IgM-Antikörpers, die untere der leichten Kette. Zum spezifischen Nachweis wurde ein Western Blot durchgeführt.

4.1.2. Nachweis des Antikörpers im Western Blot

Die gereinigte Proteinmenge wurde mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und über einen anti- μ -spezifischen Antikörper entwickelt. Wie erwartet stellt sich im Western Blot eine Bande bei ca. 83 kDa dar, entsprechend der schweren Kette des IgM-Antikörpers. Parallel zur Aufreinigung erfolgte eine Konzentrierung des Antikörpers durch Elution in einem geringen Endvolumen. Die üblicherweise erreichte Endkonzentration lag bei ungefähr 300 $\mu\text{g/ml}$.

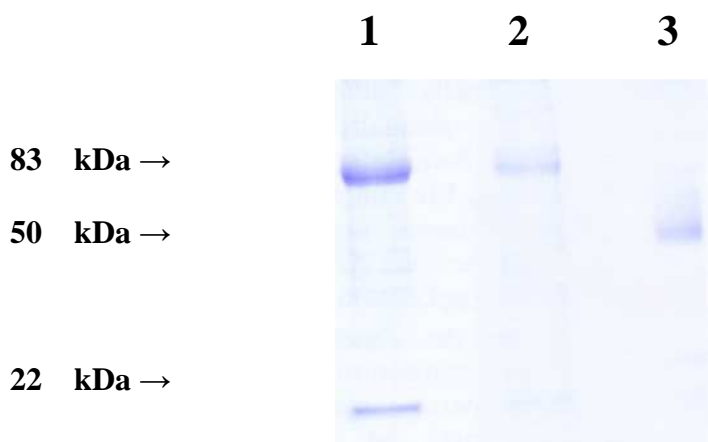


Spur 1: CD33 IgM Zellkulturüberstand
Spur 2: CD33 IgM aufgereinigt (Charge1)
Spur 3: CD33 IgM aufgereinigt (Charge2)
Spur 4: Negativkontrolle
Spur 5: Negativkontrolle
Spur 6: Positivkontrolle: humanes Serum mit IgM

Abbildung 5: Western-Blot des Zellkulturüberstandes und der daraus aufgereinigten IgM-Antikörper. Nach einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden der HEK-293-Zellkulturüberstand und die daraus aufgereinigten IgM-Antikörper im Westernblot dargestellt. Dieser wurde entwickelt mit einem anti-human IgM μ -chain spezifischen Sekundärantikörper aus der Maus und einem biotinylierten Maus-anti-Ziege-Tertiärantikörper. Die danach sichtbare Bande bei 83 kDa entspricht einer IgM heavy-chain.

4.2. Nachweis eines CD33-spezifischen IgG-Antikörpers

In dieser Arbeit werden IgM- und IgG-Antikörper mit identischer Spezifität (gleiches Antigen und Epitop) auf ihre funktionelle Aktivität *in vitro* getestet. Der bereits im onkologischen Labor vorhandene Anti-CD33-IgG-Antikörper wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zum Vergleich wurde er ebenfalls mittels einer Coomassiefärbung nach SDS-PAGE und im Western Blot spezifisch mittels eines Anti-Fc γ -Antikörpers dargestellt.



Spur 1: CD33 IgM Konzentration= 310µg/ml
Spur 2: CD33 IgM Konzentration= 280µg/ml
Spur 3: CD33 IgG Konzentration= 250 µg/ml

Abbildung 6: Coomassiefärbung des aufgereinigten anti-CD33-IgM-Antikörpers und des aufgereinigten anti-CD33-IgG-Antikörpers nach einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese: nach der Aufreinigung des exprimierten IgM-Antikörpers aus dem HEK 293-Zellkulturüberstand wurde mit diesem Protein und dem IgG-Antikörper eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel anschliessend unspezifisch mit Coomassie angefärbt. Die danach sichtbaren Banden bei 22 und 83 kDa entsprechen jeweils einer IgM light- und heavy-chain, die Bande bei 50 kD einer IgG heavy-chain, die IgG light-chain ist nicht mehr sichtbar.

Bei 50 kDa zeigt sich die Bande der schweren Kette des IgG-Antikörpers, die leichte wie die des IgM-Antikörpers bei ungefähr 20 kDa. Zum Vergleich wurden die beiden Banden des IgM-Antikörpers dargestellt, die schwere bei 83,3 kDa und die leichte bei ungefähr 22 kDa.

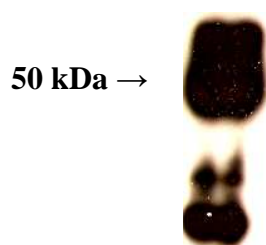


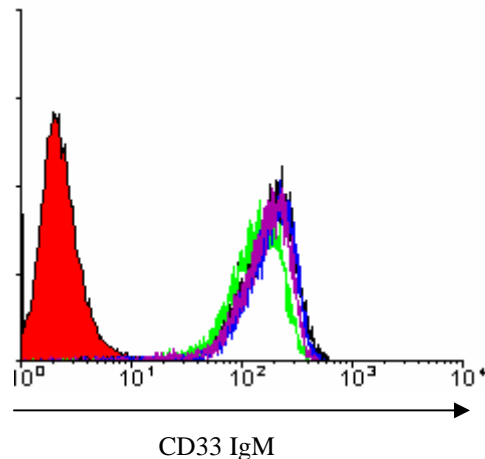
Abbildung 7: Western Blot CD33 IgG nach einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese, entwickelt über Maus-anti-human IgG Fcy-Fragment specific: mit dem IgG-Antikörper wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel anschliessend im Western-Blot über Maus-anti-human IgG Fcy-Fragment specific entwickelt. Die danach sichtbare Bande bei 50 kDa entspricht einer IgG heavy-chain.

4.3. Charakterisierung der Antikörper und ihrer Bindungseigenschaften

Durchflusszytometrisch wurde die Bindung des Antikörpers am Zielantigen untersucht.

4.3.1. Der CD33-spezifische IgM-Antikörper

Der anti-CD33-IgM Antikörper wurde zu der das CD33-Antigen stabil exprimierenden CHO-Zelllinie gegeben und dann über μ -spezifische und Fab-spezifische Sekundärantikörper entwickelt. Als Negativkontrolle diente der μ -spezifische Sekundärantikörper. Die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität in Abbildung 8 in Bezug auf die Negativkontrolle zeigt, dass CD33-IgM an die Oberflächen der CHO-Zellen bindet.



Rot: Negativkontrolle: anti-human IgM μ -chain specific auf CD33-positive CHO-Zellen

Schwarz: Positivkontrolle: CD33-PE auf CD33-positive CHO-Zellen

Grün: CD33 IgM entwickelt über anti-human IgM μ -chain specific, Maus-anti-Ziege, biotinyliert, Streptavidin-PE

Blau: CD33 IgM entwickelt über Kaninchen-anti-human IgM Fc5 μ -fragment specific, Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert, Streptavidin-PE

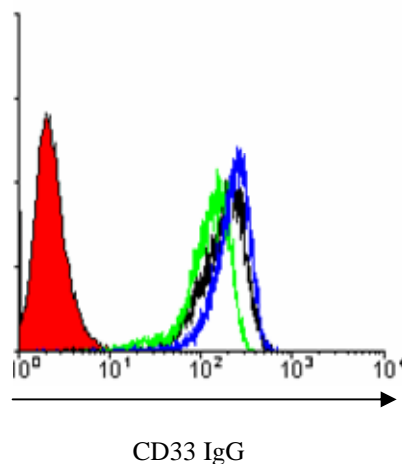
Violett: CD33 IgM entwickelt über Ziege-anti-human IgG Fab specific, biotinyliert

Abbildung 8: Durchflusszytometrische Darstellung des Anti-CD33-IgM-Antikörpers: Durch Entwicklung des Antikörpers über μ - und Fab-spezifische Sekundärantikörper wurde im Vergleich mit der Negativkontrolle (rot) durchflusszytometrisch nachgewiesen, dass das Konstrukt intakt ist.

Durch die Entwicklung über verschiedene Sekundärantikörper wurde gezeigt, dass sowohl der μ -spezifische Teil des IgM-Antikörpers, als auch der Fab-Teil vorhanden war. Da das Immunglobulin über einen anti-human-IgM- μ -chain-Antikörper und über einen anti-Fab-Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden nachgewiesen wurde, ist das Konstrukt intakt. Der Antikörper wurde also korrekt exprimiert und ist auch nach mehreren Aufreinigungsschritten intakt.

4.3.2. Der CD33-spezifische IgG-Antikörper

Auch der CD33-spezifische IgG-Antikörper wurde auf CHO-Zellen mit einem CD33-Antigen gegeben und dann über Fcy-spezifische und Fab-spezifische Sekundärantikörper entwickelt. Als Negativkontrolle diente der Fcy-Sekundärantikörper. Die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität in Abbildung 9 in Bezug auf die Negativkontrolle zeigt, dass CD33-IgG an die Oberflächen der CHO-Zellen bindet.

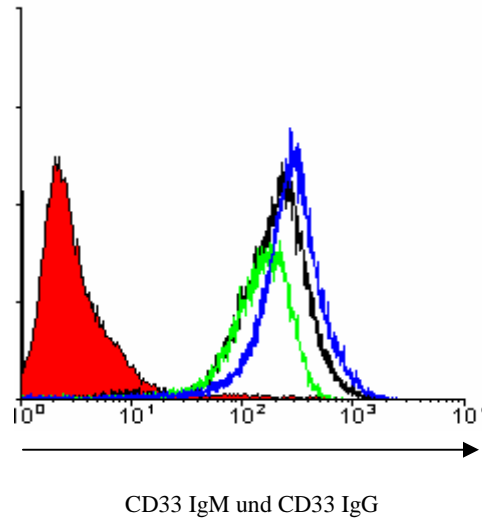


Rot: Negativkontrolle Maus-anti-human IgG Fc γ -Fragment specific auf CD33-positive CHO-Zellen
Schwarz: Positivkontrolle anti-CD33-PE-Antikörper direkt auf CD33-positive CHO-Zellen
Grün: CD33 IgG entwickelt über Ziege-anti-human IgG Fab specific, biotinyliert, Streptavidin-PE
Blau: CD33 IgG entwickelt über Maus-anti-human IgG Fc γ -Fragment specific

Abbildung 9: Durchflusszytometrische Darstellung des CD33 IgG-Antikörpers: Durch Entwicklung des Antikörpers über Fc γ - und Fab-spezifische Sekundärantikörper wurde im Vergleich mit der Negativkontrolle (rot) durchflusszytometrisch nachgewiesen, dass das Konstrukt intakt ist.

Durch die Entwicklung über verschiedene Sekundärantikörper wurde gezeigt, dass sowohl der Fc γ -spezifische Teil des IgG-Antikörpers, als auch der Fab-Teil vorhanden war. Da das Immunglobulin über einen anti-human-IgG-Fab-Antikörper und über einen anti-human-IgG-Fc γ -Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden nachgewiesen wurde, ist das Konstrukt korrekt exprimiert und trotz mehrerer Aufreinigungsschritte intakt.

4.3.3. Vergleich des IgM- und des IgG-Antikörpers



Rot: Negativkontrolle anti-human IgM μ -chain specific auf CD33-positive CHO-Zellen

Schwarz: Positivkontrolle CD 33-PE direkt auf CD 33 positive CHO-Zellen

Grün: CD 33 IgM entwickelt über anti-human IgM μ -chain specific + Maus-anti-Ziege, biotinyliert, Streptavidin-PE

Blau: CD33 IgG entwickelt über Maus-anti-human IgG Fc γ Fragment specific

Abbildung 10: Durchflusszytometrische Darstellung des CD33 IgM- und des CD33 IgG-Antikörpers im Vergleich: beide Antikörper sind korrekt exprimiert und besitzen gleichermassen die Fähigkeit, ihr Zielantigen zu binden. Die Konzentration des IgG-Antikörpers ist ungefähr doppelt so hoch wie die des IgM-Antikörpers.

Abbildung 10 zeigt eine ähnliche Fluoreszenz-Intensitätsänderung bei IgM und IgG, es binden etwas mehr IgG-Antikörper an die Zellen als IgM-Antikörper. Dies liegt daran, dass 50 μ l des IgG-Antikörpers mit einer Konzentration von ungefähr 600 μ g/ml und 50 μ l des IgM-Antikörpers mit einer Konzentration von ungefähr 300 μ g/ml eingesetzt wurden.

Zusammenfassend lässt sich bis hierhin sagen, dass beide Antikörper korrekt exprimiert wurden und die Fähigkeit besitzen, ihr Zielantigen zu binden.

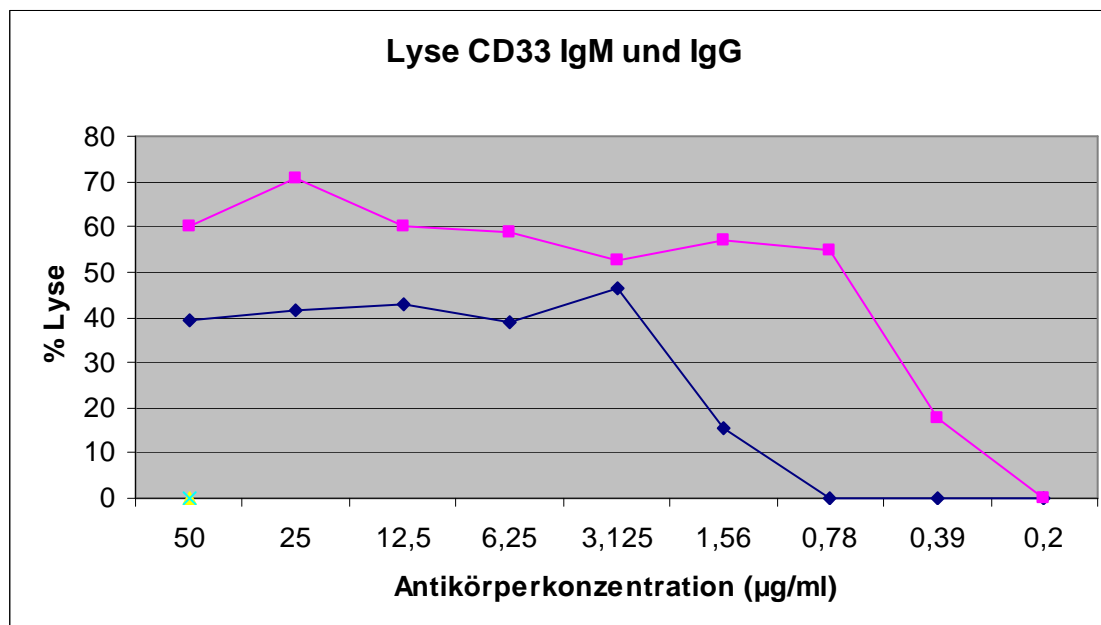
Desweiteren lässt sich nach der Durchflusszytometrie feststellen, dass trotz der beiden unterschiedlichen Fc-Fragmente der beiden Antikörper ein ähnlich starkes Fluoreszenzsignal zu detektieren ist, was für eine ähnlich starke Antikörperbindung beider Antikörper spricht. Somit kann durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Fc-Fragmente einen starken Einfluss auf die Affinität der beiden Konstrukte haben.

Nachdem die Intaktheit sowohl des IgM- als auch des IgG-Moleküls nachgewiesen wurde, und durchflusszytometrisch gezeigt wurde, dass beide Antikörper eine ähnliche Affinität für das CD33-Antigen besitzen, wurden die Antikörper bezüglich ihrer Funktion im Zytotoxizitätsassay getestet.

4.4. Funktionelle Testung der Antikörper im Zytotoxizitätsassay

Im Zytotoxizitätsassay wurde die Fähigkeit der beiden anti-CD33 Antikörperformate gemessen, das Komplementsystem zu aktivieren und dadurch CD33-Antigen exprimierende CHO-Zellen zu lysieren. Als Negativkontrolle dienten CHO-Zellen, die stabil das CD19-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sowohl mit dem CD33-IgM- als auch mit dem CD33-IgG-Antikörper erfolgte keine Lyse der Kontrollzellen. Ebenso erfolgte keine Lyse von parentalen CHO-DHFR-Zellen, die keines der Antigene exprimieren.

4.4.1. Komplementvermittelte Zytolyse des IgG- und IgM-Antikörperformates bei gleicher Konzentration



Rosa: CD33 IgM auf CHO-CD33-Antigen-Zellen
 Blau: CD33 IgG auf CHO-CD33-Antigen-Zellen
 Grün: Negativkontrolle CD33 IgM und CD33 IgG auf CHO-CD19-Antigen-Zellen
 Gelb: Negativkontrolle CD33 IgM und CD33 IgG auf parentalen CHO-DHFR-Zellen

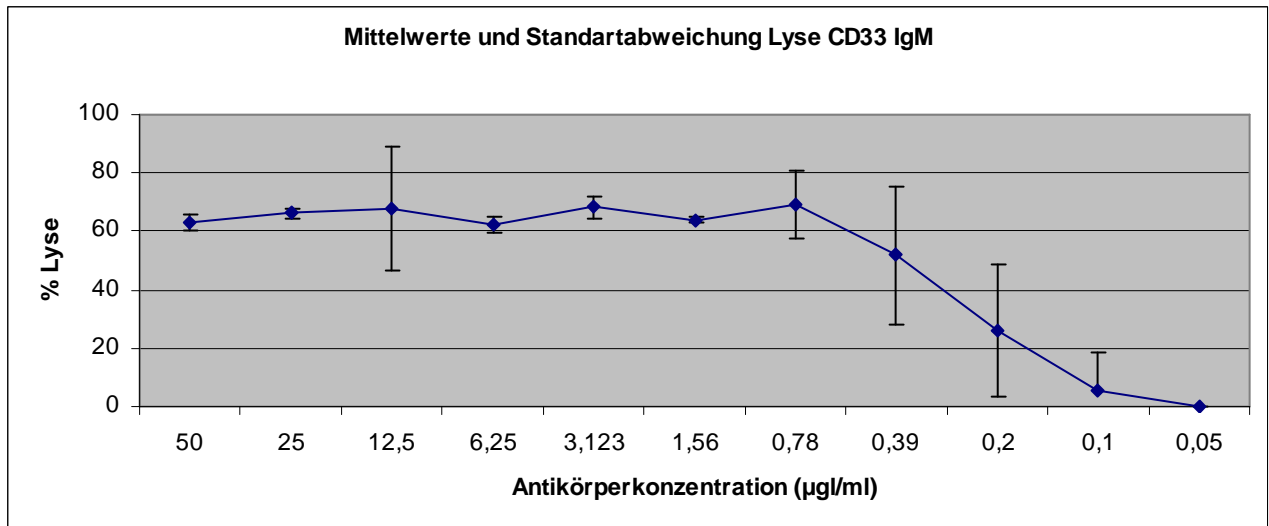
Abbildung 11: Zytotoxizitäts-Assay. Dargestellt ist die spezifische Lyse des anti-CD33 IgG- und IgM-Antikörpers zur jeweiligen Antikörperkonzentration. Sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Konzentrationen ist für den IgM-Antikörper eine stärkere Lyse nachweisbar. Die dargestellte Kurve ist eine Repräsentation von drei Versuchen, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden und einen ähnlichen Kurvenverlauf ergaben.

Der Versuch wurde dreimal unter den gleichen Ausgangsbedingungen durchgeführt. Die Ausgangskonzentration sowohl des IgM- als auch des IgG-Antikörpers betrug 50µg/ml.

Die Abbildung 11 zeigt, dass der CD33-IgM-Antikörper bis zu 70% aller CD33-Antigen exprimierenden CHO-Zellen lysiert, hingegen der CD33-IgG-Antikörper nur ca. 55%. Wie erwartet kann das IgM-Antikörperformat im durchgeführten Zytotoxizitätstest mehr Komplement aktivieren und zu einer höheren Lyse der Zielzellen führen. Dargestellt ist die Repräsentation von drei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen mit ähnlichem Kurvenverlauf. Aufgrund des unterschiedlich raschen Abfalls der Lyserate in den verschiedenen Versuchen lässt sich keine sinnvolle Mittelwertkurve mit Standardabweichungen darstellen.

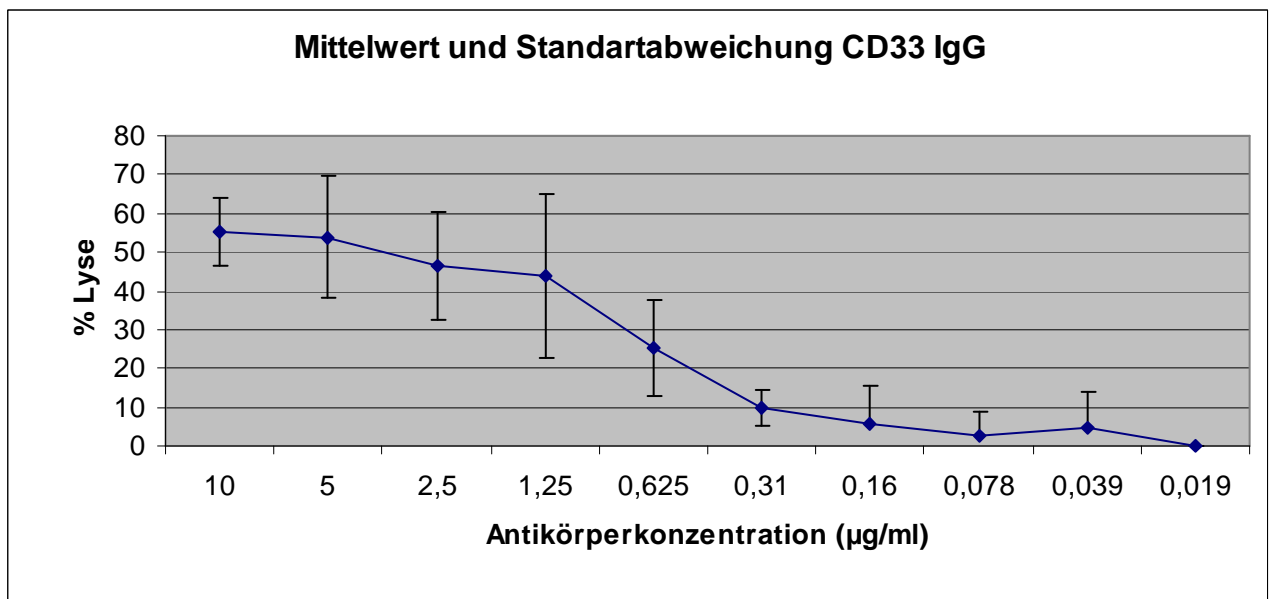
4.4.2. Komplementvermittelte Zytolyse des IgG- und IgM-Antikörperformates bei gleicher Molarität

Entscheidend für die komplementvermittelte Lyse ist die Anzahl von Komplementbindungsstellen, die an der Zellmembran verankert werden. Da das IgM-Molekül *in vivo* vor allem als Pentamer vorkommt, wurden die gleichen Zytotoxizitätsversuche auch unter näherungsweise isomolaren Bedingungen durchgeführt. Aus diesem Grund wurde das pentamere IgM-Konstrukt in einer weiteren Versuchsreihe in fünf-facher Konzentration eingesetzt. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen, dass der CD33-IgM-Antikörper in 5-fach höherer Konzentration als der CD33-IgG-Antikörper bis zu 75% der CHO-Zellen mit einem CD33-Antigen auf ihrer Oberfläche lysiert, und dass die Anzahl der lysierten Zellen mit abfallender Antikörperkonzentration abnimmt. Desweiteren zeigt sich, dass der CD33-IgG-Antikörper nur bis zu 55% der CHO-Zellen lysiert, und dass der prozentuale Anteil der lysierten Zellen mit sinkender Antikörperkonzentration schneller abnimmt als bei dem CD33-IgM-Antikörper.



Blau: CD33 IgM auf CHO-CD33-Antigen-Zellen

Abbildung 12: Mittelwerte von zwei Zytotoxizitätsassays mit IgM mit Standardabweichung



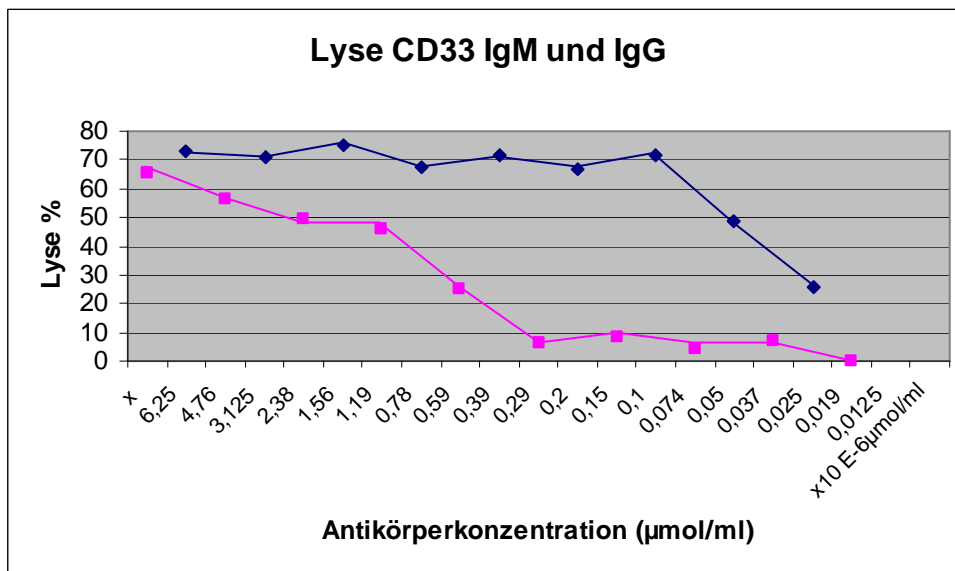
Blau: CD33 IgG auf CHO-CD33-Antigen-Zellen

Abbildung 13: Mittelwerte von zwei Zytotoxizitätsassays mit IgG mit Standardabweichung

Aus graphischen Gründen wurde bei einigen Werten nur der obere Wert der Standardabweichung dargestellt.

Auf diese Weise war es möglich, die beiden Antikörperformate mit der gleichen Molarität bzgl. ihrer Zytolyserate zu vergleichen. Wie oben beschrieben wurde vereinfachend zunächst

die fünf-fache IgM-Konzentration eingesetzt und anschliessend über die Molmasse auf die Molarität zurückgerechnet. Aus diesem Grund ergaben sich für das IgG- und das IgM-Konstrukt nicht exakt dieselben Messpunkte.



Blau: CD33 IgM auf CHO-CD33-Antigen-Zellen
 Rosa: CD33 IgG auf CHO-CD33-Antigen-Zellen

Abbildung 14: Zytotoxizitäts-Assay in Abhängigkeit von der Molarität. Dargestellt ist die spezifische Lyse des anti-CD33 IgG- und IgM-Antikörpers zur jeweiligen molaren Antikörperkonzentration. Da näherungsweise die fünf-fache IgM-Konzentration eingesetzt wurde und anschliessend über die Molmasse auf die Molarität zurückgerechnet wurde, ergeben sich für die beiden Antikörperformate jeweils unterschiedliche Messpunkte. Im Vergleich der molaren Antikörperkonzentrationen wird die stärkere Zytolyse des IgM-Formates noch deutlicher.

Im molaren Vergleich der beiden Formate wird die stärkere komplementvermittelte Lyse des IgM-Konstrukts noch deutlicher.