

**'Fibroblast activation protein'**  
**spezifische rekombinante Antikörperderivate**  
**zur Tumordetektion und Therapie**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation

Vorgelegt von  
**Thomas Wüest**  
aus Zürich (CH)

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier  
Mittberichter: PD Dr. Harald Wajant  
Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2001

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart  
2001



Berichte aus der Biologie

**Thomas Wüest**

**"Fibroblast activation protein"  
spezifische rekombinante Antikörperderivate  
zur Tumordetektion und Therapie**

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag  
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Wüest, Thomas:*

"Fibroblast activation protein" spezifische rekombinante Antikörperderivate zur Tumordetektion und Therapie/Thomas Wüest.

Aachen : Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9580-7

Copyright Shaker Verlag 2001

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9580-7

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei...

... Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion, die Betreuung und die konstruktive Diskussion von Ergebnissen.

... Dr. Dieter Moosmayer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

... Elke Gerlach und Eva Behrle für die grosse Unterstützung in allen Bereichen, v.a. aber bei der Zellkultur.

... Angelika Hausser, Gisela Link, Linda Bamberg, Alexej Schmidt und allen Anderen für das hervorragende Arbeitsklima im Labor, welches wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

... Dr. W.J. Rettig, Dr. J. Park und Dr. P. Garin-Chesa von Boehringer Ingelheim Pharma KG für Ihre Unterstützung, insbesondere die Bereitstellung von rekombinantem Antigen, Zelllinien, verschiedener DNA-Konstrukte und die immunhistologischen Untersuchungen.

... Dr. Harald Wajant für seine Diskussionsbereitschaft und die Korrektur dieser Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Mechanismen der Tumorentstehung .....	3
2.2 Interaktionen zwischen Tumor und Immunantwort.....	3
2.3 Verschiedene Ansätze zur Behandlung von Tumoren .....	4
2.3.1 Antikörper-vermittelte Tumorthherapie.....	5
2.3.2 Antikörperderivate zur Aktivierung einer antitumoralen Immunantwort.....	6
2.4 Zytokine in der Tumorthherapie .....	7
2.4.1 Die Verwendung des Tumor Nekrose Faktors (TNF) in der Tumorthherapie...	8
2.5 'Prodrug'-Ansätze in der Tumorthherapie .....	10
2.6 Tumorantigene.....	11
2.7 Funktion und Eigenschaften des Tumorstromas .....	11
2.7.1 Das Tumorstroma als Zielstruktur zur Tumorthherapie .....	12
2.7.2 Das 'Fibroblast Activation Protein' (FAP) .....	13
2.8 Zielsetzung.....	14
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1 Verwendete Materialien .....	15
3.1.1 Geräte.....	15
3.1.2 Material.....	15
3.1.3 Verwendete Reagenzien .....	15
3.1.4 Enzyme .....	16
3.1.5 Antikörper.....	16
3.1.6 Bakterien und Zellkulturstämme .....	16
3.1.7 Rekombinantes FAP.....	17
3.1.8 Oligonukleotide .....	18
3.1.9 Plasmide.....	19
3.2 Molekulargenetische und biochemische Methoden.....	20
3.2.1 Transformation und Proteinexpression in <i>Proteus mirabilis</i> LVI .....	20
3.2.2 Expression von Antikörperfragmenten in Eukaryotenzellen .....	20
3.2.3 Proteinreinigung mittels Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) .....	21
3.2.4 Ankonzentrierung von Proteinen .....	21
3.2.5 Lagerung von Proteinen .....	21
3.2.6 Gelfiltrationschromatographie.....	21
3.2.7 FAP spezifischer 'Enzyme Linked Immunosorbent Assay' ELISA .....	21
3.2.8 Mengenabschätzung mittels Western Blot.....	22
3.2.9 Affinitätsbestimmung des MbOS4 nach Friguet et al. 1985 .....	22
3.2.10 Abschätzung der Dissoziationskonstante auf zellulärem FAP .....	22
3.2.11 Aktivierung der Selektokin-Prodrug mit Trypsin.....	23

3.3 Zytotoxizitätsmessungen der verschiedenen Konstrukte .....	23
3.3.1 Messung der lytischen Aktivität der aktivierten T-Zellen mittels Kristallviolett Färbung .....	23
3.3.2 Messung der Zelllyse mittels <sup>51</sup> Chrom-Freisetzung .....	24
3.3.3 TNF-vermittelte Zytotoxizität gemessen mit Kym-1 Zellen .....	24
3.3.4 Cokultur Zytotoxizitäts-Versuch mit FAP positiven HT1080 und Kym-1 .....	24
3.3.5 Cokultur Zytotoxizitäts-Versuch mit Aktivierung der Prodrug im Zell-gebundenen Zustand .....	25
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
4.1 Herstellung des FAP-spezifischen Minibody OS4 .....	26
4.1.1 Klonierung des MbOS4 .....	27
4.1.2 Expression in Eukaryotenzellen .....	28
4.1.3 Prokaryotische Expression in <i>Proteus mirabilis</i> LVI .....	29
4.1.4 Charakterisierung des MbOS4 mittels Gelfiltration .....	29
4.1.5 Bindung des MbOS4 an zellständiges FAP .....	31
4.1.6 Bestimmung der Dissoziationskonstante des MbOS4 nach der Methode von Friguet et al. (1985) .....	32
4.1.7 Stabilität des MbOS4 .....	32
4.1.8 Immunhistologische Färbung von humanen Tumorschnitten mit MbOS4 .....	33
4.2 Der bispezifische scFv zur FAP-abhängigen Aktivierung von T-Zellen im Tumor Stroma .....	34
4.2.1 Klonierung des bispezifischen scFvOS4/TR66 .....	34
4.2.2 Expression des bscFvOS4/TR66 .....	35
4.2.3 FAP-Bindung und Epitopspezifität des bscFv .....	36
4.2.4 Bindung des bscFv an zelluläres CD3 .....	38
4.2.5 Zytotoxische Aktivität und Stabilität des bscFv .....	38
4.2.6 <sup>51</sup> Chrom-Freisetzungsversuch zur quantitativen Bestimmung der lytischen Aktivität .....	39
4.3 Selektokin und Selektokin-Prodrug: Neue Tumor Nekrose Faktor Fusionsproteine zur Tumor Therapie .....	42
4.3.1 Klonierung der Selektokin Prodrug mit Modellprotease-Schnittstelle .....	43
4.3.2 Expression und Antigenbindung der Prodrug W20 und W22 .....	44
4.3.3 Proteolytische Aktivierung von W20 und W22 .....	44
4.3.4 TNF-Selektokin Prodrug (pW24) mit tumorspezifischem Proteaselinker .....	45
4.3.5 Expression und Reinigung von pW24 .....	45
4.3.6 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante auf nativem zellulärem FAP .....	46
4.3.7 Aktivierung von W24 mit Trypsin .....	47
4.3.8 Aktivierung von W24 mit 'tissue plasminogen activator' (tPA) .....	47
4.3.9 scFvMO36 enthaltende Selektokin Prodrug W32 .....	48
4.3.10 Klonierung und Expression von pW32 .....	49
4.3.11 Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante von W32 .....	50
4.3.12 Aktivierung der W32-Prodrug mit Trypsin .....	51
4.3.13 TNF spezifische Aktivität von Zell-gebundenem W32 .....	51
4.3.14 Aktivierbarkeit von W32 in FAP-gebundenem Zustand auf der Zellmembran .....	51

---

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1 Entwicklung eines FAP-spezifischen Minibodys zur Tumordetektion .....	53
5.1.1 Produktion und FAP-Bindungsverhalten des Minibody OS4 .....	53
5.1.2 <i>In vivo</i> Untersuchungen .....	54
5.2 Entwicklung eines bscFv zur Antigen-abhängigen T-Zell Aktivierung .....	55
5.2.1 Produktion und Bindungscharakteristika des bispezifischen scFv .....	55
5.2.2 FAP-abhängige T-Zell Aktivierung mittels bscFvOS4/TR66 .....	56
5.2.3 Ausblick .....	57
5.3 Entwicklung eines TNF-Prodrug Immuntherapeutikums .....	58
5.3.1 TNF-Selektokin Prodrug mit Modellproteasen .....	59
5.3.2 Prodrug W24 mit <i>in vivo</i> relevanten Proteaseschnittstellen .....	59
5.3.3 Prodrug W32 mit human- und murin-FAP-spezifischem scFvMO36 .....	60
5.3.4 Ausblick .....	62
<b>6 Summary .....</b>	<b>63</b>
6.1 The fibroblast activation protein as target for tumour therapy .....	63
6.2 The Minibody: a scFv fusion protein for tumour detection .....	64
6.3 Construction of a bispecific single chain antibody for recruitment of cytotoxic T cells to the tumour stroma associated antigen FAP .....	66
6.4 Selectokine prodrug: a new TNF fusion format for tumour therapy .....	70
<b>7 Anhang .....</b>	<b>73</b>
7.1 Minibody OS4; DNA- und Proteinsequenz .....	73
7.2 Bispezifischer scFv (pW13); DNA- und Proteinsequenz .....	75
7.3 Protease-sensitive Linker der TNF-Prodrug .....	78
7.4 TNF-Prodrug pW24; DNA- und Proteinsequenz .....	79
7.5 TNF-Prodrug pW32; DNA- und Proteinsequenz .....	82
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung	LB	Luria-Broth-Medium
Ak	Antikörper	M	molar (mol/l)
Amp.	Ampicillin	mAk	monoklonaler Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase	m.f.i.	mittlere Fluoreszenz Intensität
APS	Ammoniumperoxodisulfat	min	Minute
AS	Aminosäure	MTT	((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
BSA	Bovines Serum Albumin	MTX	Methotrexat
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat Toluidin	MW	Molekulargewicht
bp	Basenpaar	ODxy	Optische Dichte bei xy nm
bsAk	bispezifischer Antikörper	PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
bscFv	bispezifischer scFv	PBL	periphere Blut Lymphozyten
CDR	Complementarity Determining Region	PBS	Phosphate Buffered Saline
CEA	Carcinoembryonic Antigen	PCR	Polymerase Chain Reaction
DHFR	Dehydrofolatreductase	<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
EC50	Halbmaximale Effektkonzentration	POD	Peroxidase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra Essigsäure	scFv	Single Chain Fragment variable
Fab	Fragment antigen binding	SDS	Natriumdodecylsulfat
F(ab) <sub>2</sub>	Fab-Dimer	TCR	T-Zell Rezeptor
FAP	Fibroblast Activation Protein	TNF	Tumor Necrosis Factor
Fc	Fragment constant	TTBS	Tween / Tris Buffered Saline
FCS	Fötales Kälber Serum	Tet.	Tetracyclin
FR	<i>Framework</i> (Gerüstregion)	TNFR1/2	TNF-Rezeptor 1 bzw. 2
Fv	Fragment variable	tPA	tissue plasminogen activator
<i>g</i>	Gravitationskonstante	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
dd H <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser	U	Units
HAMA	Human Anti Mouse Antibody	ÜN	Über Nacht
h	Stunde	uPA	urokinase type plasminogen activator
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid	Upm	Umdrehungen pro Minute
Ig	Immunglobulin	V <sub>L</sub>	variable Domäne der leichten Kette
IgG	Immunglobulin Gamma	V <sub>H</sub>	variable Domäne der schweren Kette
kDa	Kilodalton	v/v	Volumen pro 100 ml Volumen
Kd	Dissoziationskonstante	wt	Wildtyp
		w/v	Gewicht pro 100 ml Volumen