

**Aus der Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und Onkologie
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. U. Wagner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg**

**Effektivitätsanalyse eines in vivo Depotsystems zur
Langzeitsekretion von anti-idiotypischen Antikörpern für das
Tumor assoziierte Antigen CA125**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps Universität Marburg**

**vorgelegt von
Dr. rer. nat. Evelin Hann
aus Bukarest**

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 09.06.11

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Dekan: Prof. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Uwe Wagner

Korreferent: Prof. (aP) Dr. rer.nat. Achim Aigner

Für Sue und Walter in tiefer Dankbarkeit

Abkürzungen

Ab1	idiotypischer Antikörper
Ab1'	Ab3 der an das Paratop von Ab2 bindet
Ab2	anti-idiotypischer Antikörper
Ab3	anti- anti-idiotypischer Antikörper
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethyl-benzthiozolinsulfonat]
ACA125	anti-idiotypischer Antikörper gegen OC125
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AG	Antigen
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Colle
Balb/c	Maus-Inzuchtstamm
CA125	Cancer Antigen 125
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
CD3	assoziiert mit dem AG Rezeptor von T Zellen
CD4	Corezeptor für MHCII Klasse Moleküle
CD8	Corezeptor für MHCI Klasse Moleküle
CD69	Aktivierungsantigen
CFA	komplettes Freundesches Adjuvants
CTL	zytotoxische T-Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessesigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent
Fc	Antikörper-Fragment (fragment crystallizing)
Fv	variables Antikörper-Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FBSi	Fetal Bovine Serum inaktiv
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstretics
GMA	2-Hydroxyethyl-Methacrylat
IFA	inkomplettes Freundesches Adjuvants
INF γ	Interferon gamma

IL2	Interleukin 2
IL6	Interleukin 6
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
HAMA	humane anti-Maus Antikörper
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N`-2-ethanesulfonic acid
H-Kette	schwere Antikörper-Kette
HF	hollow fiber
POD	Meerretich-Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
IgG	Immunglobulin G
KD	Kilodalton
L-Kette	leichte Antikörper-Kette
MHC I-II	major histocompatibility complex 1-2
min	Minute
MWCO	molecular weight cutoff
NK	natürliche Killerzellen
OC125	monoklonaler anti-CA125 Antikörper
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PES	Polyethersulfon
PHA	Phythämagglutinin
PVDF	Polyvinylidenflourid
PET	Polyeterterephthalat
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	sub cutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
T	Teile
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N´, N´Tetramethylendiamin

Th 1,2	T-Helferzelle ^{1,2}
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
VH	variable Antikörper-Region der schweren Kette
VL	variable Antikörper-Region der leichten Kette
WT	wildtyp

Inhaltsverzeichnis

<i>1. Einführung</i>	<i>10</i>
1.1 Hintergründe und Zielsetzung der Arbeit	10
1.2 Das Ovarialkarzinom	14
1.2.1. Inzidenz und Epidemiologie	14
1.2.2. Genetisches Risiko	15
1.2.3. Früherkennung und Screening	16
1.2.4. Klinik	17
1.2.5. Diagnostik und TNM/FIGO Klassifikation	17
1.2.6. Prognosefaktoren	18
1.2.7. Therapie	18
1.3. Anti-Idiotypen basierte Strategien zur Immuntherapie von Krebs	20
1.3.1. Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von Krebs	20
1.3.2. Anti-idiotypische Antikörpern in der Immuntherapie maligner Tumore	20
1.3.3. Abagovomab, ein anti-Idiotyp zur Immuntherapie des Ovarialkarzinoms	21
1.4. Biokapseln: Bioreaktoren zur in vivo Freisetzung von anti-Idiotypen?	24
1.4.1. Einführung	24
1.4.2. Die Biokapsel: Bioreaktoren zur in vivo Freisetzung therapeutischer Stoffe	25
1.4.3. Biokapsel: Immunenhancement für den anti-Idiotypen Abagovomab?	27
<i>2. Methoden</i>	<i>29</i>
2.1 Die Aufreinigung des anti-Idiotypen ACA125hFc aus serumfreien C2C12 Zellkulturüberstände über eine Protein G Säule	29
2.1.1. Das Prinzip der Proteinaufreinigung über eine Protein-G Säule	29
2.1.2. Das Protokoll zur Aufreinigung des ACA125hFc Antikörpers	29
2.1.3. Berechnung der Antikörperkonzentration von ACA12hFc	30
2.2. Die Überprüfung der Reinheit und Funktionalität des ACA125hFc Antikörpers nach der Aufreinigung über eine Protein G Säule	30
2.2.1 Die Überprüfung der Reinheit mittels SDS-PAGE	30
2.2.2. Das Protokoll für SDS-PAGE	30
2.2.3. Das Prinzip der Überprüfung der Funktionalität mittels ELISA	31
2.2.4. Das Protokoll für den ELISA Test	31
2.3. Herstellung von Makrokapseln welche kontinuierliche und konstante Mengen des ACA125hFc Antikörpers sezernieren	32
2.3.1. Die Herstellung von PES Makrokapseln	32
2.3.2. Sterilisation von PES Makrokapseln	32
2.3.3. Herstellung von PVDF Makrokapseln	32
2.3.4. Methode zur Befüllung der Makrokapseln mit C2C12 Zellen	33

2.4. Untersuchung der ACA125hFc Expression und der C2C12 Zellvitalität aus Makrokapseln	33
2.4.1 ELISA zur Quantifizierung der ACA15hFc Antikörper Expression	33
2.4.2. Prinzip der Polymereinbettung zur histochemischen Untersuchungen	33
2.4.3. Protokoll zur Polymereinbettung der Makrokapseln	34
2.5. Methoden zur Herstellung, Implantation und Explantation von Makrokapseln in Balb/c Mäuse	34
2.5.1. Das Prinzip der Implantation von Makrokapseln in Balb/c Mäuse	34
2.5.2. Die Herstellung verkapselter C2C12 Zellen für den Tierversuch	35
2.5.3. Die Implantation von PVDF bzw. PES Polymerkapseln in Balb/c Mäuse	35
2.5.4. Immunisierungsprotokoll für die ACA125hFc Aufreinigung	36
2.5.5. Die Zeitpläne für die Blutentnahmen	36
2.5.6. Die Explantation der Kapseln nach Versuchsende	37
2.5.7. Die Explantation der Milz nach Versuchsende	37
2.5.8. Das Protokoll zur Aufbereitung von Splenozyten	37
2.6. Die Untersuchung der Immunogenität von ACA125hFc-C2C12 Kapseln im Tierversuch	37
2.6.1. Das Prinzip des ELISA zum Nachweis von spezifischen anti-ACA125hFcAntikörpern im Serum von Balb/c Mäusen	37
2.6.2. ELISA-Protokoll zum Nachweis von spezifischen anti-ACA125hFc Antikörpern in Mauseren	38
2.6.3. Das Prinzip des intrazellulären Zytokin-Assays zum Nachweis von anti-CA125 spezifischen T-Lymphozyten aus Milzzellen	38
2.6.4. Das Protokoll des intrazellulären Zytokin-Assays	39
<u>3. Rezepturen</u>	<u>41</u>
3.1. Coomassie Entfärbelösung	41
3.2. Coomassie Färbelösung	41
3.3. ELISA Wandbeschichtungspuffer (pH 9,4-9,7)	41
3.4. ELISA ABTS Substratlösung	41
3.5. ELISA Waschpuffer	41
3.6. FBS inaktiv (FBSi)	41
3.7. Protein G Säule Binding Buffer, pH 5 (10X)	42
3.8. Protein G Säule Elution Buffer, pH 2,7 (10X)	42
3.9. Protein G Säule Neutralisation Buffer, pH 9	42
3.10. SDS Elektrophorese Puffer, 4X	42
3.11. SDS Probepuffer (nicht reduzierend)	42

3.12. SDS Probepuffer (reduzierend)	42
3.13. SDS Sammelgel, pH 6,8	43
3.14. SDS Trenngel (8% Acrylamid), 10 ml, pH 8,8	43
3.15. Zellkultur Einfriermedium	43
3.16. Zellkultur-Färbelösung zur Überprüfung der Zellvitalität	43
3.17. Zellkulturmedium	44

4. Materialien **45**

4.1. Chemikalien, Reagenzien, Kits	45
4.2. Antikörper und Antigene	46
4.3. Enzyme	47
4.4. Zelllinien	47
4.5. Tiere	47
4.6. Zubehör und Plastikartikel	47
4.7. Geräte	49

5. Ergebnisse **50**

5.1. Überprüfung der Reinheit des ACA125hFc Antikörpers mit SDS-PAGE	50
5.2. Überprüfung der Funktionalität des aufgereinigten ACA125hFc mit ELISA	50
5.3. Die Untersuchung der Immunantwort des endogenen ACA125hFc-Antikörper-Freisetzungssystems im Balb/c Mausmodell	51
5.3.1. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort von PVDF Implantaten	52
5.3.2. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort von PES Implantaten	55
5.3.3. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort infolge einer konventionellen Immunisierung mit ACA125hFc	57
5.3.4. Die Untersuchung der <i>in vitro</i> Expression an ACA125hFc Antikörpern aus explantierten PVDF Hohlfasern	60
5.3.5. Die Untersuchung der <i>in vitro</i> Expression an ACA125hFc aus explantierten PES Hohlfasern	61
5.3.6. Histochemische Untersuchungen zur Überprüfung der Vitalität und Morphologie von explantierten verkapselten C2C12 Myoblasten	61
5.3.7. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort von PVDF Implantaten anhand von CA125 spezifischen T-Lymphozyten	63
5.3.8. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort von PES Implantaten anhand von CA125 spezifischen T-Lymphozyten	67

5.3.9. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort infolge einer konventionellen Immunisierung	69
<u>6. Diskussion</u>	<u>72</u>
6.1. Herstellung eines kontinuierlichen endogenen Makrokapsel-Freisetzungssystems zur Verbesserung der Immunogenität des anti-Idiotypen ACA125hFc	72
6.2. Die <i>in vitro</i> Herstellung der verkapselten rekombinanten C2C12 Zellen für die Tierversuche	73
6.3. Die <i>in vitro</i> Herstellung einer ACA125hFc Antikörper Aufreinigung für die konventionelle Immunisierung mit anti-Idiotypen	74
6.4. Die Untersuchung der Immunogenität des ACA125hFc Antikörper-Freisetzungssystems, anhand der humoralen Immunantwort	75
6.5. Die Untersuchung der Immunogenität des ACA125hFc-Antikörper-Freisetzungssystems, anhand der CA125 Immunantwort	77
6.6. Die Untersuchung der <i>in vitro</i> Expression an ACA125hFc aus PVDF und PES Biokapseln nach deren Explantation	78
6.7. Histochemische Untersuchungen zur Überprüfung der Vitalität und Morphologie von explantierten verkapselten C2C12 Myoblasten	79
6.8. Schlussfolgerungen	80
<u>7. Zusammenfassung</u>	<u>82</u>
<u>8. Englische Zusammenfassung</u>	<u>86</u>
<u>9. Referenzen</u>	<u>87</u>

Lebenslauf

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

1. Einführung

1.1. Hintergründe und Zielsetzung der Arbeit

Das Ovarialkarzinom ist die fünft häufigste Malignomerkrankung der Frau und steht aufgrund der hohen Inzidenz der fortgeschrittenen Stadien an vierter Stelle krebserkrankter Todesursachen (Hilpert et al. 2007). Aufgrund der Symptomarmut zu Beginn der Erkrankung sowie das Fehlen suffizienter Früherkennungsmethoden werden über 50 % der Fälle im Stadium III und 20 % im Stadium IV nach FIGO diagnostiziert (Wagner et al. 1997). Frühe Stadien des Ovarialkarzinoms haben eine gute Prognose mit Überlebensraten von 65 bis zu 90%, während fortgeschrittenen Stadien mit einer infausten Prognose assoziiert sind: 25-50% (FIGO III) bzw. 5% (FIGO IV) (Harrison 2008). Therapieziel der Ovarialkarzinome ist die komplette bzw. maximal mögliche Tumorresektion sowie eine anschließende Chemotherapie (z.B. Carboplatin/Paclitaxel i.v.). Die Mehrzahl der Patientinnen mit einem primär fortgeschrittenen Ovarialkarzinom erleiden trotz optimaler Primärtherapie ein Rezidiv (Hilpert et al. 2007), so dass eine Ergänzung der konventionellen Therapiemaßnahmen als durchaus sinnvoll erscheint. So stellt die Immunisierung mit anti-idiotypischen Antikörpern eine interessante Zusatzstrategie in der Therapie von malignen Ovarialneoplasien dar und zielt insbesondere auf eine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen. Dabei können anti-idiotypische Antikörper in ihren variablen Domänen z.B. Tumor-assoziierte Antigene imitieren. Durch die Präsentation dieser Tumor Antigene in eine fremde molekulare Umgebung ist es möglich, eine spezifische Immunantwort gegen an sich nicht oder nur schwach immunogene Antigene und in Konsequenz gegen die Tumorzelle selbst zu erzeugen (Jerne 1994). Abagovomab (=ACA125) ist ein muriner monoklonaler anti-idiotypischer Antikörper, der ein spezifisches Epitop des tumor-assoziierten Antigen CA125 imitiert und aktuell in einer internationalen Phase II/III Studie (MIMOSA/AGO-Ovar10) in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms eingesetzt wird. CA125 ist ein Tumor-assoziiertes Antigen welches von der überwiegenden Anzahl der nicht-muzinösen Ovarialkarzinome exprimiert wird. Allerdings sind Patienten mit CA125 positiven Tumoren gegenüber diesem Antigen tolerant (Köhler et al. 1998). Diese Immuntoleranz kann mittels Abagovomab überwunden werden, welcher als stellvertretendes CA125 Antigen fungiert und somit in der Lage ist eine spezifische Immunantwort in Form von anti-anti-idiotypischen Antikörpern gegen das an sich nicht immunogene CA125 zu induzieren (Köhler et al. 1998, Reinartz et al. 2004). Bereits mehrere klinische Studien ergaben deutliche Hinweise auf die therapeutische

Wirksamkeit von Abagovomab mit verbesserten klinischen Ansprechraten sowie verlängerten Überlebenszeiten (Köhler et al. 1998, Wagner et al. 2001, Reinartz et al. 2004). Allerdings scheint die geringe Immunogenität des anti-idiotypischen Antikörper von Nachteil zu sein, so dass zur Erhaltung einer spezifischen Immunantwort Mehrfachapplikationen mit hohen Antikörperdosen erforderlich sind (Köhler et al. 1998), was Gefahren wie z.B. Effektivitätsverlust, Allergisierung nach sich ziehen könnte. Deshalb sind neue gentherapeutische Ansätze erforderlich um eine *dauerhafte* anti-tumorale Immunität mittels anti-Idiotypen zu erzeugen. In dieser Arbeit wird eine neuartige immuntherapeutische Strategie vorgestellt, welche über die Erzeugung eines *in vivo* Langzeit-Depotsystem mittels *kontinuierlicher* endogener Synthese von Antikörpern darauf zielt, die Immunogenität von anti-Idiotypen in der Weise zu verbessern, sodass *ein dauerhafter* anti-tumoraler Effekt eintritt. Die Generierung eines derartigen Antikörper Applikationssystems soll mittels Bioverkapselungstechnologien rekombinanter Zellen erfolgen, welche den anti-Idiotypen über eine semipermeable Membran kontinuierlich in die Umgebung sezernieren. In einer Vorarbeit der Autorin (Hann 2005) wurde ein Makrokapselsystem entwickelt, welches die kontinuierliche *in vitro* Expression und Freisetzung von anti-Idiotypen aus rekombinanten Zellen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun *in vivo* überprüft werden, inwiefern das neuartige Antikörperfreisetzungssystem die Immunogenität eines anti-idiotypischen Antikörpers verbessern kann bzw. welches die Vorteile gegenüber einer herkömmlichen Vakzinierung sind.

Zunächst wurde in der oben erwähnten Vorarbeit aus dem murinen anti-Idiotypen Abagovomab das chimäre ACA125hFc Antikörperfragment hergestellt, welches im Unterschied zum Ursprungsantikörper über eine humane konstante Immunoglobulin G Domäne (hFc) verfügt (siehe Abb.1).

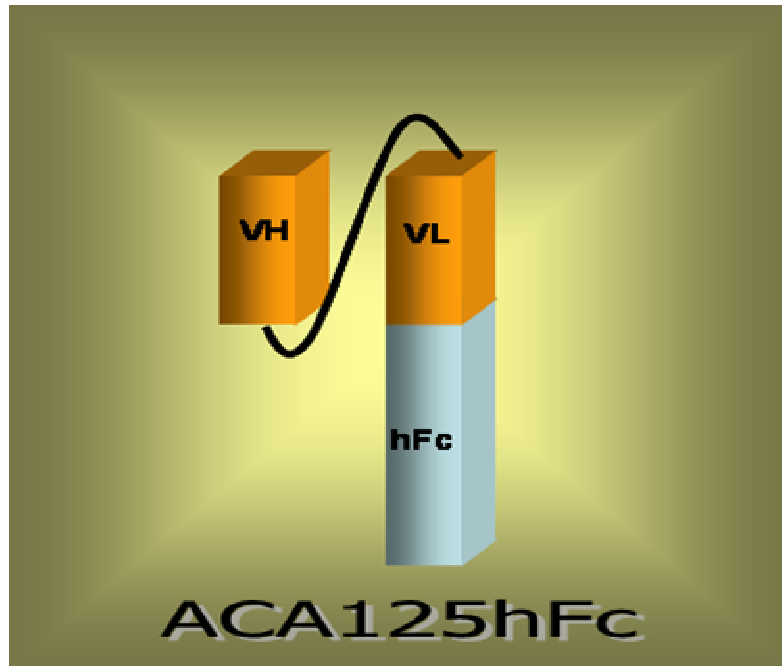


Abb.1: Dargestellt ist das chimäre anti-idiotypische ACA125hFc Antikörperfragment

Die variablen Regionen VH und VL stammen von dem murinen Antikörper Abagovomab und sind über einen Peptid Linker miteinander verknüpft. Beachte die Fc Region ist humanen Ursprungs.

In Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von ACA125hFc, soll durch den Wegfall der konstanten Regionen murinen Ursprungs die Induktion unspezifischer Antikörper verringert werden, welche infolge der Immunisierung mit Abagovomab beobachtet wurden und die spezifische anti-tumorale Immunantwort teilweise überlagerten.

Unter Verwendung von Makroverkapselungstechnologien wurde anschließend ein *in vitro* Depotsystem zur kontinuierlichen Expression und Freisetzung von ACA125hFc Antikörpern generiert. Hierbei wurden rekombinante murine C2C12 Myoblasten, die ACA125hFc stabil exprimierten in synthetischen Hohlfasern eingebettet. Über Membrandiffusion erfolgte die kontinuierliche Freisetzung des anti-Idiotyps in die Umgebung (Kulturmedium). Um ein möglichst optimales ACA125hFc Makrokapsel freisetzungssystem zu generieren wurden verschiedene Kapseltypen hergestellt (PVDF vs. PES). Dabei waren bestimmte Biokapseltypen bis zum Versuchsende (=1 Jahr) in der Lage konstante ACA125hFc Antikörperlevel freizusetzen (für weitere Details siehe Hann et al. 2005).

Die aktuelle Arbeit soll in einem murinen allogenen Tierversuch darüber Aufschluss geben inwiefern die neue anti-Idiotypen Applikationsform in der Lage ist die Immunogenität des ACA125hFc Antikörpers zu verbessern. Die Realisierung dieses Vorhabens erfolgt dabei über folgende Teilschritte (siehe auch Abb. 2):

- (1) Herstellung eines *in vitro* Zellkapselsystems zur kontinuierlichen Freisetzung von ACA125hFc Antikörpern. Zu diesem Zweck werden rekombinante ACA125hFc

C2C12 Myoblasten in eine semipermeable Hohlfaser eingebettet und zu einer dichten Kapsleinheit verarbeitet, die über Membrandiffusion den anti-Idiotypen kontinuierlich in ein entsprechendes Kulturmedium freisetzt. Da die Antikörperproduktion an die Langzeitvitalität des Depotsystems gebunden ist und somit eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo* Anwendbarkeit des Systems darstellt, werden verschiedene Makrokapseltypen [Polyethersulfon (PES) vs. Polyvinylidenfluorid (PVDF) Hohlfasern] hergestellt. Letztendlich soll *in vivo* untersucht werden inwiefern unterschiedliche physikalische (verschiedene Membranporendurchmesser) bzw. chemische (PVDF vs. PES Hohlfasern) Membraneigenschaften einen Einfluss auf die kontinuierliche ACA125hFc Freisetzung aus Makrokapseln ausüben.

- (2) Nachfolgend soll die Immunogenität des Makrokapselsystems zur kontinuierlichen Freisetzung von ACA125hFc überprüft werden. Anhand eines allogenen Tiermodells (s.c. Implantation von ACA125hFc C2C12 Kapseln in Balb/c Mäuse) soll die Immuntoleranz der verschiedenen Makrokapseltypen bzw. die Beziehung zwischen den unterschiedlichen Membraneigenschaften und einer eventuellen Implantatabstoßung untersucht werden. Letztendlich soll festgestellt werden, inwiefern die kontinuierliche *in vivo* Freisetzung des Antikörpers aus den Depotkapseln die Immunogenität des ACA125hFc Antikörpers verbessert bzw. welche Vorteile und Nachteile im Vergleich zur herkömmlichen Vakzinierung bestehen.

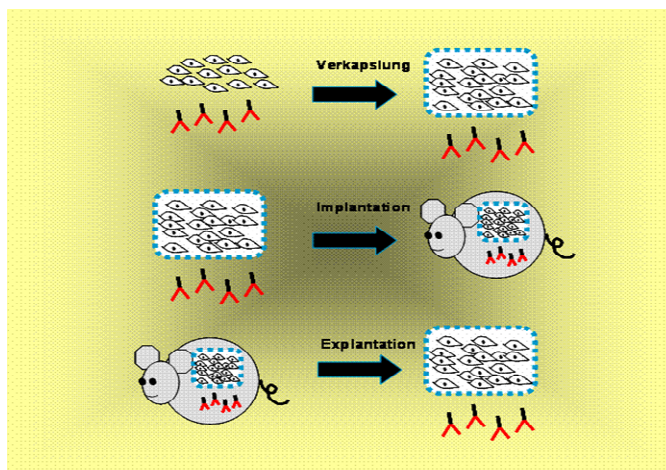


Abb. 2: Darstellung der Teilschritte zur Herstellung eines *in vivo* Depotsystems zur kontinuierlichen Expression des anti-Idiotypen ACA125hFc mittels semipermeabler Kapseln

A) Rekombinate murine C2C12 Myoblasten, die ACA125hFc exprimieren werden in semipermeable Kapseln eingebettet. **B)** Die Kapseln werden in Mäuse implantiert und auf die Induktion einer spezifischen Immunantwort überprüft. **C)** Zu Versuchsende erfolgt die Explantation sowie die Überprüfung der Implantat Vitalität.

1.2. Das Ovarialkarzinom

1.2.1. Inzidenz und Epidemiologie

Ovarialkarzinome sind mit einem Anteil von 85 % die häufigsten malignen Ovarialtumore sowie die häufigste Todesursache durch gynäkologische Malignome (ohne Mammakarzinome) in den USA. Allein 2007 wurden in den USA 22.430 Neuerkrankungen diagnostiziert und 15.280 Frauen starben daran. In Deutschland erkrankten im Jahr 2002 etwa 9.950 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Die Inzidenz ist in den letzten Jahren gleich geblieben bei kontinuierlicher Abnahme der Mortalität. Die altersbezogene Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter und gipfelt in der siebten bis achten Lebensdekade (Harrison 2008). Die höchste Inzidenz wird zurzeit in Nord- und Südeuropa sowie in Nordamerika beobachtet, die niedrigste Inzidenz in Afrika und Asien (Colombo et al. 2006). Ovarialkarzinome werden in folgende Hauptgruppen unterteilt: seröse (50%), muzinöse (25%), endometroide (15%), klarzellige (5%) und Brenner Tumoren (1%) (Kumar et al. 2007). Maligne epitheliale Tumoren werden in der Regel bei Frauen jenseits des 40. Lebensjahrs diagnostiziert.

Aufgrund der Symptomarmut zu Beginn der Erkrankung sowie durch das Fehlen suffizienter Früherkennungsmethoden werden über 50 % der Fälle der malignen epithelialen Ovarialneoplasien im Stadium III und 20 % im Stadium IV nach FIGO diagnostiziert (Wagner et al. 1997). Die Gesamt-5-Jahresüberlebensrate aller Stadien lag in Deutschland im Jahr 2002 bei 41 %. Frühe Stadien des Ovarialkarzinoms haben eine gute Prognose mit Überlebensraten von etwa 90% (FIGO I) bzw. 70-80% (FIGO II) während fortgeschrittene Stadien mit einer infausten Prognose assoziiert sind: 25-50% (FIGO III) bzw. 1- 5% (FIGO IV) (Harrison 2008).

Gesicherte Risikofaktoren für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms sind Alter und positive Familienanamnese, möglicherweise auch Kinderlosigkeit, Infertilität und Lifestylefaktoren (z.B. Alkohol, Zigaretten).

Protektive Faktoren stellen orale Kontrazeptiva (Risikoreduktion für die Entwicklung eines Ovarialkarzinom um etwa 50 %, nach ca. 5 Jahren Dauereinnahme), Multiparität (jede Schwangerschaft reduziert das Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms um 10%), möglicherweise auch Stillen, Tubenligaturen sowie Hysterektomie dar (Permuth et al. 2009, Kumar et al. 2007).

Onkogene wie HER2/NEU sowie K-RAS werden in ca. 20-30% der Ovarialkarzinome überexprimiert, wobei das Tumorsuppressorgen p53 in ca. 50 % der Ovarialneoplasien mutiert

ist (Kumar et al. 2007). HER2/NEU positive Tumoren zeigen ein Ansprechen auf Transtuzumab. Der Nachweis von Rezeptoren für den Epidermal Growth Factor auf Zellen des Ovarialkarzinoms, ist mit einem hohen Risiko für eine progrediente Erkrankung assoziiert (Harrison 2008).

1.2.2. Genetisches Risiko

Etwa 10 % der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt und werden in der Mehrzahl der Fälle autosomal dominant mit unterschiedlicher Penetranz vererbt. Meistens sind sie mit einem gehäuften Auftreten von Brustkrebs, seltener mit einem gehäuften Auftreten von Darm und Gebärmutterkrebs (Lynch Syndrom II) oder anderen Tumoren (z.B. Li-Fraugmeni Syndrom) assoziiert (Colombo et al. 2006, Harrison 2008). Das Lebenszeitrisiko für ein Ovarialkarzinom beträgt 1,8 % (Modugno et al. 2003). Wurde eine Keimbahnmutation in einem verantwortlichen Gen nachgewiesen z.B. BRCA1, 2 (bei hereditärem Ovarialkarzinom bzw. hereditärem Brust-Ovarialkarzinom Syndrom), MHL1, MSH2 (bei hereditärem nonpolypösen kolorektalem Karzinom= Lynch Syndrom II) beträgt das Lebenszeitrisiko für ein Ovarialkarzinom bis zu 60 % (Columbo et al. 2006)).

BRCA 1/2 stellen Tumorsuppressorgene dar, deren Genprodukte eine Rolle in der Hemmung von Tumorstadium spielen und in hohen Mengen unter anderem in den Epithelzellen der Ovarien exprimiert werden. Bei Trägerinnen von Mutationen dieser Gene beträgt das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms 20-30 % (Modugno et al. 2003), wobei die serösen Zystadenokarzinome einen hohen Anteil ausmachen. Männer aus diesen Familien weisen ein erhöhtes Risiko für Prostatakarzinom auf (Harrison 2008). Etwa 30 % der Adenokarzinome des Ovars exprimieren im hohen Masse das HER2/neu Onkogen, das mit einer schlechten Prognose korreliert (Kumar et al. 2007).

Die prophylaktische bilaterale Salpingoovarektomie stellt nach bisheriger Studienlage die Methode der Wahl sowohl zur Senkung der Mortalität als auch des Erkrankungsrisikos beim hereditären Ovarialkarzinom (Kauff et al. 2002).

1.2.3. Früherkennung und Screening

Patientinnen in einem frühem Stadium des Ovarialkarzinoms (FIGO Stadium I-II) sind im Gegensatz zu den fortgeschrittenen Stadien (FIGO Stadium III-IV) zu einem Grossteil durch eine konventionelle Therapie heilbar. Daher würde eine effektive Screeninguntersuchung welche die Früherkennung des Ovarialkarzinoms ermöglicht, auch dessen Heilungsraten verbessern. Ein generelles Screening für die Früherkennung des Ovarialkarzinoms gibt es zum jetzigen Zeitpunkt leider nicht. Die derzeitigen Studien konnten nicht beweisen, dass eine routinemäßig durchgeführte Vaginalsonographie eventuell in Kombination mit z.B. einer Bestimmung des Tumormarkers CA 125 eine effektive Früherkennung gewährleisten kann (Modugno et al. 2003). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass etwa die Hälfte der Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium I und II normale CA 125 Konzentrationen aufweisen. Außerdem können auch andere maligne Erkrankungen wie Endometrium-, Zervix-, Tuben-, Mamma-, Pankreas-, Bronchial- und Kolonkarzinom sowie nicht maligne Veränderungen wie Schwangerschaften, Endometriose, Uterusfibrome, entzündliche Unterbaucherkrankungen und 1% der gesunden Frauen mit erhöhten CA 125 Konzentrationen assoziiert sein (Harrison 2008). Beachtlich ist auch die Tatsache, dass in ca. 20 % der Fälle die Tumorzellen kein CA 125 exprimieren und somit ebenfalls einer CA 125 Serumbestimmung entgehen (Bast et al. 2005). CA 125 negative Tumore exprimieren allerdings z.B. humanes Kallikrein 6, 10 sowie Osteopontin und Claudin 3 und stellen potentielle Zusatzmarker in der Diagnose des Ovarialkarzinoms dar (Bast et al. 2005). Nichtsdestotrotz liegen bei etwa 80-85 % der epithelialen Ovarialkarzinome die Konzentrationen des Tumormarkers CA 125 im Serum bei mehr als 35 U/ml. Die Sensitivität der CA 125 Bestimmung liegt bei postmenopausalen Frauen mit einem asymptomatischen Ovarialtumor und einer CA 125 Konzentration von mindestens 65 U/ml bei 97 % und die Spezifität bei 78 % (Harrison 2008).

Ein neuartiges Screeningverfahren könnte möglicherweise mittels Proteomanalyse bewerkstelligt werden. Erste Studienergebnisse klingen vielversprechend: Patientinnen im Stadium 1 des Ovarialkarzinoms konnten mit einer Sensitivität von 100 % bzw. einer Spezifität von 95 % identifiziert werden (Petricoin et al. 2002).

1.2.4. Klinik

Der Krankheitsverlauf ist in frühen Stadien (FIGO I und II) häufig symptomlos bzw. symptomarm und erklärt somit die hohe Inzidenz von etwa 70 % der fortgeschrittenen Stadien. Die am häufigsten angegebenen Beschwerden wie Abdominal- und Rückenschmerzen, eine Zunahme des Leibesumfanges, gastrointestinale Beschwerden, Störungen der Harnorgane, abnorme vaginale Blutungen sowie eine Gewichtszunahme bzw. – abnahme weisen allerdings in den meisten Fällen auf ein fortgeschrittenes Stadium hin (Hilpert et al. 2007).

1.2.5. Diagnostik und TNM/FIGO Klassifikation

Die Transvaginalsonographie nimmt unter den bildgebenden Verfahren den höchsten Stellenwert in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms ein. Das Tumor assoziierte Antigen CA 125 ist aufgrund der geringen Spezifität nicht zur Früherkennung geeignet, wird aber zur Verlaufsbeurteilung vor Therapiebeginn bestimmt. Zum jetzigen Zeitpunkt besteht keine apparative diagnostische Maßnahme, die ein operatives Staging des Ovarialkarzinoms ersetzen und die Operabilität verlässlich einschätzen könnte (S2K Leitlinien 2007, Colombo et al. 2006).

Die Stadieneinteilung nach FIGO wurde den S2K Leitlinien 2007 entnommen und setzt sich wie folgt zusammen:

FIGO I *Tumor begrenzt die Ovarien*

- IA Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt
- IB Tumor auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt
- IC Kapselruptur, Tumor an der Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Peritonealspülung bzw. in Aszites

FIGO II *Tumor breitet sich im Becken aus*

- IIA Ausbreitung auf Uterus und oder Tube(n)
- IIB Ausbreitung auf andere Beckengewebe
- IIC IIA oder IIB und maligne Zellen in Peritonealspülung bzw. in Aszites

FIGO III *Tumor mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen.*

- IIIA mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
- IIIB makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens $\leq 2\text{cm}$
- IIIC makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens $\geq 2\text{cm}$

FIGO IV *Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)*

1.2.6. Prognosefaktoren

Etablierte Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms die signifikant die Überlebenszeit der Patientinnen beeinflussen sind: 1) Tumorstadium, 2) postoperativer Tumorrest, 3) Alter, 4) Allgemeinzustand, 5) histologischer Typ sowie das 6) Tumorgrading (Colombo et al. 2006, Leitlinien S2K 2007).

1.2.7. Therapie

Therapie des frühen Ovarialkarzinoms (FIGO I-IIa)

Bei etwa 30 % der Patientinnen ist das Ovarialkarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf das kleine Becken begrenzt und die Aussichten auf eine dauerhafte Heilung sind gut, wobei die 5-Jahres-Überlebensraten stadienabhängig zwischen 65-90 % betragen.

Therapie der Wahl im Frühstadium ist zum einem die vollständige operative Entfernung des Tumors und zum anderen die platinhaltige adjuvante Chemotherapie, wobei folgende Operationsschritte bzw. Inspektions- notwendig sind: 1) Längsschnittlaparotomie, 2) beidseitige Adnektomie, 3) Hysterektomie, 4) Omentektomie, 5) beidseitige pelvine und paraaortale (entlang A/V. cava bis Höhe Vv. renales) Lymphadenektomie, 6) ev. Appendektomie (bei muzinösen und unklaren Tumortyp), 7) Biopsien aus allen auffälligen sowie aus multiplen unauffälligen peritonealen Stellen, 8) Peritonealzytologie, 9) Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle 10) Resektion des Tumors zum Peritoneum Patientinnen im Stadium I-II außer Stadium IA, benötigen im Anschluss einer Operation eine platinhaltige adjuvante Chemotherapie (Mittel der Wahl aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofil: Carboplatin/AUC5), die sowohl das Risiko eines Rezidiv als auch die Gesamtüberlebensrate um ca. 8% verbessert (S2k Leitlinien 2007, Colombo et al. 2006).

Nichtsdestotrotz erleiden auch in frühen Stadien 10-30 % der Frauen ein Rezidiv, was mit einer infausten Prognose korreliert (Colombo et al. 2006).

Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms (FIGO IIb-IV)

Aufgrund der Symptomarmut zu Beginn der Erkrankung sowie das Fehlen suffizienter Früherkennungsmethoden werden über 50 % der Fälle im Stadium III und 20 % im Stadium IV nach FIGO diagnostiziert (Wagner et al. 1997). Die Mehrzahl der Patientinnen mit primär fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erleiden trotz optimaler Primärtherapie ein Rezidiv (Hilpert et al. 2007), sodass fortgeschrittenen Stadien mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert sind: 25-50% (FIGO III) bzw. 5% (FIGO IV) (Harrison 2008).

Die Bedeutung der radikalen Tumoresektion ist bei fortgeschrittenen Stadien des Ovarialkarzinoms bekannt, wobei der postoperative Tumorrest nach dem Tumorstadium den stärksten unabhängigen Prognosefaktor darstellt (Leitlinien S2k 2007). Folgendes operatives Vorgehen wird hierbei durchgeführt: 1) beidseitige Adnektomie und Hysterektomie sowie hohes Absetzen der Ovarialbündel, 2) Netzresektion infragastrisch unter Mitnahme milznaher Anteile, 3) Resektion des befallenen Peritoneums, 4) Resektion infiltrierter Dün- sowie Dickdarmanteile, bei Befall auch Appendektomie, 5) nur bei kompletter Tumoresektion pelvine und paraaortale Lymphadenektomie (Leitlinien S2K 2007).

Standard ist nach der primären Operation mit maximaler Tumorreduktion eine taxanhaltige sowie platin- Kombinationstherapie über 6 Zyklen alle 3 Wochen (Paclitaxel 175mg/m² über 3 h i.v. und Carboplatin/AUC 5).

Therapie des Ovarialkarzinomrezidivs

Von einer Rezidivoperation profitieren wahrscheinlich nur Patientinnen mit einem platinsensiblen Ovarialkarzinom (therapiefreies Intervall > 6 Monate), bei denen eine Tumorfreiheit erreichbar scheint. Bei platinsensiblen Ovarialkarzinomen erfolgt im Anschluss eine platinhaltige Kombinationstherapie mit entweder Carboplatin/Paclitaxel oder Carboplatin/ Gemcitabin.

Bei platinrefraktären Rezidiven (Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach abgeschlossener Primärtherapie) ist eine erneuerte tumorreduktive Operation nur in Einzelfällen sinnvoll. Mittel der Wahl stellt hier eine nicht platinhaltige Monochemotherapie mit folgenden Zytostatika: Topotecan, pegyliertes liposomales Doxorubicin, Paclitaxel (bei nicht Taxan vorbehandelten Patientinnen) (Leitlinien S2K 2007).

1.3. Anti-Idiotypen basierte Strategien zur Immuntherapie von Krebs

1.3.1. Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von malignen Neoplasien

Das ideale Ziel der Immuntherapie maligner Tumore wäre die möglichst spezifische, komplette und nebenwirkungsarme Eliminierung aller entarteten Zellen. Dies könnte durch eine potente Immunreaktion erzielt werden, die zur totalen Tumorelimination führt und gleichzeitig über die Entwicklung eines Immunlangzeitgedächtnissystems eine anhaltende Tumorregression garantiert (Pejawar-Gaddy et al. 2008). Ansätze zur Immuntherapie von Krebs konzentrieren sich auf unterschiedliche Zielzellen, diese erstrecken sich von Tumorzellen, über Zellen des Immunsystems bis hin zu hämatopoetischen Stammzellen.

Zu den potentiellen Kandidaten für die Herstellung von Tumorvakzinen zählen unter anderem: Tumor-Antigene (Ward et al. 2002, Cheuk et al. 2008), Hitzeschockproteine (Roman et al. 2007), dendritische Zellen (Osada et al. 2006, Steinmann et al. 2007), virale Vektoren (Harrop et al. 2006), DNA/RNA (Yu et al 2006), anti-idiotypische Antikörper bzw. sonstige Antikörper (Wagner et al. 2001, de Ceiro et al. 2007).

1.3.2. Anti-idiotypische Antikörper in der Immuntherapie maligner Tumore

Anfang der siebziger Jahre postulierte Niels Jerne in seiner Hypothese über den Netzwerkaufbau des Immunsystems das Prinzip der Idiotypen/Anti-Idiotypen Vakzinierung (Jerne 1974). Eine der ersten klinischen Hinweise für die Wirksamkeit von anti-Idiotypen in der Immuntherapie von Tumoren lieferte 1982 die Arbeitsgruppe um Ron Levy, welche ein an B-Zell Lymphom erkranktes Patientenkollektiv mittels dieser Antikörper behandelte (Miller et al. 1982). Wie funktioniert nun das Ganze? Laut Jerne werden fremde Antigene über ein Netzwerk von miteinander interagierenden Antikörpern, der sogenannten Idiotypen/anti-Idiotypen Kaskade reguliert. Somit reagiert das Immunsystem auf externe Antigene mit idiotypischen Antikörpern (Ab1), welche in ihren variablen antigen-bindenden Domänen *immunogene* sogenannte Idiotope enthalten die gegen das Ursprungsantigen gerichtet sind. Idiotypische Antikörper (Ab1) sind somit selbst immunogen und können die Bildung von sogenannten anti-Idiotypen (Ab2) hervorrufen. Einige dieser Ab2 Antikörper, die sogenannten Ab2 β Antikörper, widerspiegeln die dreidimensionale Struktur (‘‘internal image’’) des ursprünglichen Antigens und passen exakt in die Antigenbindungsstelle des Ab1 Antikörpers. Eine selektive Immunisierung mit Ab2 β Antikörpern, die z.B. ein nicht

immunogenes Tumorantigen funktionell imitieren, kann somit eine spezifische anti-tumorale Immunantwort hervorrufen (Cherny und Hiernaux 1990, de Ceiro et al. 2007).

In den letzten drei Jahrzehnten wurden anti-Idiotypen in der Immuntherapie vielfältiger Tumore eingesetzt, wobei die Wirksamkeit einiger dieser Antikörper bereits in klinische Phase III Studien untersucht wird. Hierzu zählen: Kleinzelliges Lungenkarzinom (Bottomley et al. 2008, Phase III), Kolorektales Karzinom (Choog et al. 2006, Phase III), Ovarialkarzinom (Bauerschlag et al. 2008; Phase III), B-Zell Lymphom (de Ceiro et al. 2009, Phase III) und malignes Melanom (Lutzky et al. 2002, Phase II). Inwiefern der Einsatz dieser anti-idiotypischen Antikörper die zu erwartende klinische Relevanz liefert, werden die abschließenden Studienergebnisse zeigen.

1.3.3. Abagovomab, ein anti-Idiotyp zur Immuntherapie des Ovarialkarzinoms

Ovarialkarzinome werden aufgrund der Symptomarmut zu Beginn sowie durch das Fehlen ausreichender Früherkennungsmethoden in über 70% der Fälle in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Wagner et al. 1997). Die Gesamt-5-Jahresüberlebensrate aller Stadien lag in Deutschland im Jahre 2002 bei 41 % (Harrison 2008). Trotz einer insgesamt positiven Entwicklung der heutigen Therapieregime (siehe hierfür 1.2.7) bleibt festzustellen dass fortgeschrittenen Stadien mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert sind (Wagner et al. 2001), wobei die meisten Patientinnen trotz optimaler Behandlung ein Rezidiv innerhalb der ersten 18 Monate erleiden (Hilpert et al. 2007, Frederick et al. 2009). Aus diesem Grunde erscheint die Ergänzung der konventionellen Therapie (siehe hierfür 1.2.7) als durchaus sinnvoll. Hierbei wurden verschiedenste immunologische Strategien verfolgt, die unter anderem zur Generierung folgender Vakzine führten: NY-ESO1 Peptide (Odunsi et al. 2007), der CA125 spezifische monoklonale Antikörper Oregovomab (Berek et al. 2009), Radionuklide (Verheijen et al. 2006) anti-Folatrezeptor Antikörper (Figini et al. 2009), Multipeptide (Chianese-Bullock et al. 2008), der anti-idiotypische Antikörper Abagovomab (Wagner et al. 2001), der anti-VEGF Antikörper Bevacizumab, die anti-HER-2 Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab, der anti-EGFR1 Antikörper Cetuximab (Frederick et al. 2009). Die Immunisierung mit anti-idiotypischen Antikörpern stellt eine interessante Zusatzstrategie in der Behandlung des Ovarialkarzinoms dar und zielt insbesondere auf eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorzellen. Auf der Basis des Idiotypen/Anti-Idiotypen Konzeptes, wurde von unserer Laborgruppe der murine monoklonale anti-idiotypische Antikörper Abagovomab entwickelt, dessen klinischer Benefit aktuell in einer

internationalen Phase II/III Studie (MIMOSA/AGO-Ovar10) bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms (Bauerschlag et al. 2008) überprüft wird. Hierfür generierte unsere Laborgruppe den anti-Idiotyp Abagovomab (Ab2) nach Immunisierung von Mäusen mit dem idiotypischen Antikörper OC125 (Ab1) (Schlebusch et al. 1994). Der Idiotyp OC125 (Ab1) erkennt spezifische Epitope auf der Oberfläche des tumor-assoziierten Antigens CA125 (Bast et al. 1983) während der anti-Idiotyp Abagovomab (ACA125, anti-OC125, IgG1k) in seinen variablen Domänen CA125 funktionell imitiert und gleichzeitig eine hohe Affinität zu OC125 (Ab1) aufweist (Schlebusch et al. 1994), siehe auch Abbildung 3. Laut der Hypothese über den Netzwerkaufbau des Immunsystems von Niels Jerne (siehe hierfür 1.3.2) führt die Immunisierung mit dem anti-Idiotypen Abagovomab (Ab2) zur Bildung von anti-anti-idiotypischen Antikörpern (Ab3, anti-Abagovomab). Einige dieser Ab3 Antikörper besitzen sowohl Affinität zu dem Tumor Antigen CA125 als auch zu Abagovomab und werden als Ab1' Antikörper bezeichnet (Abb. 3) und sind somit in der Lage eine spezifische antitumorale Immunantwort zu induzieren (Schlebusch et al. 1994, Wagner et al. 1997, 2001, Reinartz et al. 2004, Bauerschlag et al. 2008).

Im Rahmen von mehreren klinischen Phase I/Ib Studien wurden insgesamt 197 Patienten mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mittels Abagovomab behandelt, mit dem Ziel sowohl die immunologische Kompetenz als auch die Sicherheit des Antikörpers unter Beweis zu stellen (Reinartz et al. 2004, Sabbatini et al. 2006, Pfisterer et al. 2006, Bauerschlag et al. 2008). Während der Applikation und auch in der Nachbeobachtungsphase konnten keine schwerwiegenden negativen Effekte beobachtet werden, die sich direkt auf die Antikörpergaben beziehen ließen. Insgesamt schienen die Nebenwirkungen außerordentlich gering zu sein, wobei lokale Schmerzen an der Injektionsstelle sowie eine moderate lokale Infiltration am häufigsten beobachtet wurden (Bauerschlag et al. 2008). Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen (de Ceiro et al. 2007).

Im Rahmen einer klinischen Phase I/Ib Studie wurden insgesamt 119 Patienten mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mittels Abagovomab behandelt (Wagner et al. 2001, Reinartz et al. 2004) wobei hier der Zusammenhang von verlängerten Überlebensraten und spezifischen Ab3 Immunantworten vordergründig untersucht wurde. 81 Patienten (68,1%) entwickelten anti-anti-idiotypische Antikörper (Ab3), welche in 50,4% der Fälle auch an gereinigtes CA125 banden. Bei 26,9% der immunisierten Patientinnen konnte eine durch anti-CA125 Antikörper (Ab1') vermittelte ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) gegen CA125 positive Tumorzellen nachgewiesen werden. Das mediane Überleben des gesamten Patientenkollektivs betrug dabei 19,4 Monate (Bereich: 0,5 bis 59,4 Monate). In der

Tat konnte bei Patientinnen, die spezifische Ab3 Antikörper entwickelten, im Vergleich zur Ab3-negativen Gruppe ein signifikant längeres Überleben (Median: 23,4 Monate vs. 4,9 Monate; $p < 0,0001$) bei außerordentlich geringerem Nebenwirkungsprofil beobachtet werden (Wagner et al. 2001, Reinartz et al. 2004). Diese Studienergebnisse belegen, dass Abagovomab als stellvertretendes Antigen für CA125, eine spezifische Immunantwort gegen ein an sich nicht-immunogene CA125 positive Tumore induzieren kann. Inwiefern diese viel versprechenden Resultate auch auf größere Patientenkollektive übertragbar sind, wird zurzeit in einer klinischen Phase II/III Studie (MIMOSA/AGO-Ovar10) bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom überprüft.

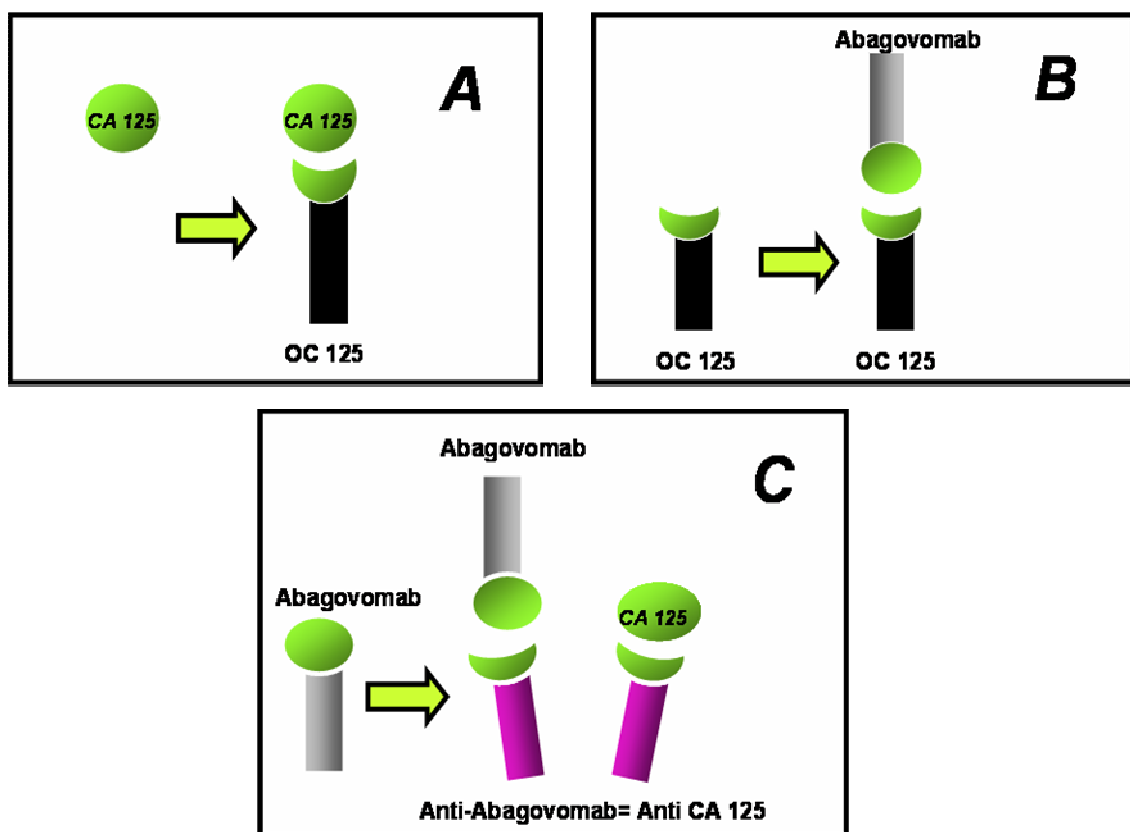


Abb. 3: Das Prinzip der anti-Idiotypen Vakzinierung mittels Abagovomab in der Immuntherapie des Ovarialkarzinoms

A) Der murine Antikörper OC125 (Ab1) ist spezifisch für das Tumorantigen CA125. **B)** Der murine anti-Idiotyp Abagovomab (Ab2) wurde nach Immunisierung von Mäusen mit OC125 generiert. Abagovomab imitiert CA125 und besitzt gleichzeitig Affinität zum Idiotyp OC125. **C)** Anti-Abagovomab (Ab3) Antikörper entstehen bei der Immunisierung von Patientinnen mit Abagovomab. Ab3 Antikörper die sowohl Affinität zu dem CA125 Antigen als auch zu dem ACA125 werden sie Ab1⁺ Antikörper genannt.

1.4. Biokapseln: Bioreaktoren zur in vivo Freisetzung von anti-Idiotypen?

1.4.1.Einführung

Das Prinzip der Immunisolation non-autologer Zellen mittels semipermeabler Kapseln wurde bereits in den fünfziger Jahren beschrieben (Uludag et al. 2000) und stellt eine interessante Alternative zu den herkömmlichen Transplantationsmethoden dar. Ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahren besteht darin, dass eine Abstoßreaktion ohne medikamentöse Immunsuppression verhindert werden kann (Murua et al. 2008) und sich somit deutlich nebenwirkungsärmer als konventionelle Transplantationen gestaltet. Hierbei werden die non-autologen Zellen des Spenders innerhalb einer synthetischen Kapsel physikalisch vom Immunsystem des Empfängers isoliert. Die semipermeable Membran umgibt die fremden Zellen wie einen Schutzmantel und verhindert somit den direkten Angriff von Immunzellen wie z.B. Lymphozyten, Makrophagen usw.. Auf diesem Weg wird eine wirksame Immunisolation erreicht, die auch ohne immunsuppressive Medikation funktioniert (Li et al. 1998). Die verkapselten Zellen gestalten sich wie kleine Bioreaktoren: über Membrandiffusion erfolgt ein bidirektionaler, kontinuierlicher Austausch kleiner Moleküle wie Nährstoffe, Sauerstoff, rekombinante Proteine etc. zwischen Spender und Empfänger (siehe Abb. 4). Somit wird sowohl die ausreichende Versorgung der Zellen im Kapselinneren als auch die Sekretion der therapeutischen Stoffe nach außen gewährleistet. Grosse Moleküle und Zellen können die Membran hingegen nicht passieren, sodass durch physikalische Zellisolation der immunologische Kontakt zwischen Donor und Akzeptor unterbunden wird, was in der Konsequenz die Abstoßungsreaktion verhindert.

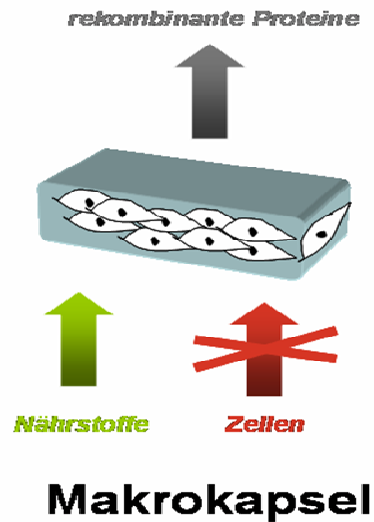


Abb. 4: Dargestellt ist das Prinzip der Immunisolierung non-autologer rekombinanter Zellen mittels Bioverkapselung

Die semipermeable Membran umhüllt die implantierten Zellen und erfüllt dabei folgende Aufgaben: 1) zum einen bietet sie den verkapselten Zellen den notwendigen immunologischen Schutz, so dass Fremdangriffe durch Immunzellen des Empfängers unterbunden werden; 2) zum anderen findet durch Diffusion ein kontinuierlicher Austausch von rekombinanten Proteinen, Nährstoffen, Metaboliten mit der Umgebung statt.

1.4.2. Biokapsel: Bioreaktoren zur in vivo Freisetzung therapeutischer Stoffe

Die Therapie mit verkapselten, immunisolierten Zellen ermöglicht die kontinuierliche endogene Freisetzung therapeutischer Stoffe über einen langen Zeitraum und stellt somit ein effektives *in vivo* Langzeit-Depotsystem dar (Hann et al. 2005). Dabei kommen oft genetisch modifizierte non-autologe Zellen zum Einsatz, die *in vivo* rekombinante Proteine exprimieren (Murua et al. 2008): eine gentechnologische Methode, welche die Manipulation des Wirtsgenoms elegant umgeht. Aber auch primär nicht modifizierte Zellen haben ein großes therapeutisches Potential, weil sie defektes bzw. untergegangenes Gewebe wie beispielweise B-Inselzellen ersetzen können (Soon et al. 1994, Sun et al. 1996). Diese interessante Biotechnologie fand in dem letzten halben Jahrhundert eine breite Anwendung bei verschiedensten Krankheiten wie z.B.: Diabetes mellitus (Soon et al. 1994, Prochorov et al. 2008), Anämie (Ponce et al. 2006), Parkinson (Lindvall et al. 2008), Herzinfarkt (Zhang et al. 2008), Amyotrophe Lateralsklerose (Zurn et al. 2000), Alzheimer (Hammang et al. 1995), Chorea Huntington (Emerich et al. 1997, Bloch et al. 2004), Chronische Schmerzen (Jeon et al. 2006), Krebs (Samel et al. 2007). Die Bioverkapselungstechnologie wird zurzeit vor allem bei Diabetes mellitus (Calafiore et al. 2006, Soon et al. 1994), ALS (Zurn et al. 2000), Chorea

Huntington (Bloch et al. 2004), Pankreaskarzinom (Löhr et al. 2002) in klinischen Studien untersucht.

Diese Implantate können aufgrund ihrer Form und Größe in zwei Hauptklassen eingeteilt werden (Li et al. 1998, Uludag et al. 2000): Makrokapseln und Mikrokapseln. Makrokapseln sind synthetische zylinderförmige Hohlfasern, die aufgrund ihrer Größe (1-2cm) mehrere Millionen Zellen aufnehmen können, so dass in der Regel eins bis zwei Kapseln pro Implantation ausreichen um therapeutische Dosen des relevanten Proteins zu sezernieren (siehe Abbildung 5A). Mikrokapseln sind hingegen sphärisch geformt und können aufgrund ihrer Größe (0,2-1,5 mm) nur wenige Zellen pro Einheit aufnehmen, so dass pro Implantation oft hunderttausende davon benötigt werden. Die Mikrokapseln werden häufig auf Hydrogelbasis (z.B. Alginat, Agarose) hergestellt. Aufgrund ihrer sphärischen Form besitzen sie die größte mögliche Diffusionsoberfläche, welche ihnen im Gegensatz zu den zylinderförmigen Makrokapseln, eine optimale Zellversorgung mit Nährstoffen ermöglicht (Abb. 5B).

Zusammenfassend sollen die wichtigsten Vorteile der kontinuierlichen Sekretion von Wirkstoffen mittels Biokapseln festgehalten werden: 1) lang anhaltende endogene Verfügbarkeit auch von instabilen bzw. kurzwirksamen Stoffen, 2) Anwendung geringerer Dosen was implizit die Toxizität reduziert, 3) Kostenersparnisse, da z.B. Mehrfachapplikationen entfallen, 4) keine Anwendung von Immunsuppressiva.

Als Nachteile dieses Verfahrens sind folgende Aspekte anzusehen: 1) nur bestimmte Substanzen sind gentechnisch herstellbar (z. B. Proteine, Peptide), 2) Membranporengröße der Kapseln limitiert die Größe der Genprodukte, 3) das Verfahren konnte bislang den Anforderungen herkömmlicher qualitativer und quantitativer Herstellungsstandards nicht gerecht werden (Hann 2005).

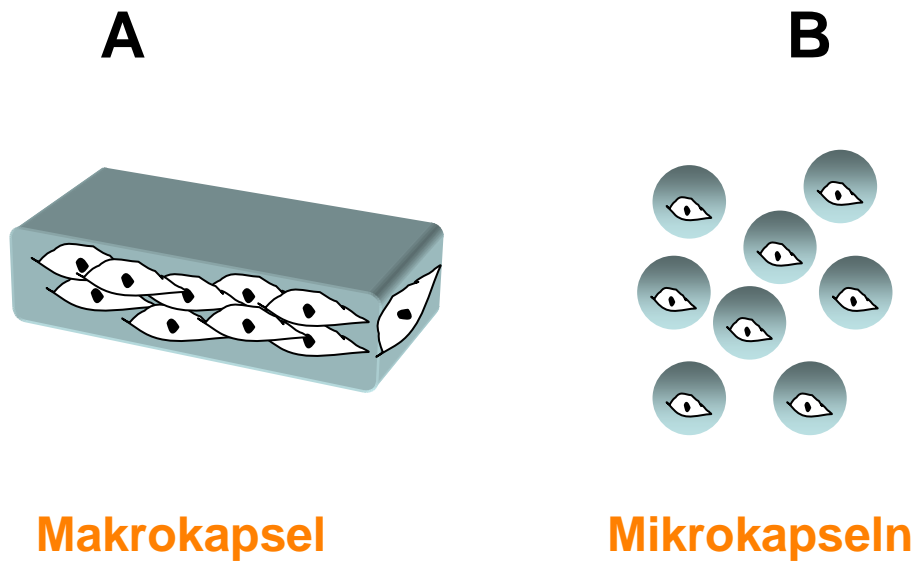


Abb. 5: Dargestellt sind die zwei häufigsten Biokapseln

A) Makrokapseln sind zylinderförmig und 1-2 cm groß. Eine einzige Kapsel kann viele Millionen Zellen beherbergen. **B)** Mikrokapseln sind sphärisch und 0,2-1,5 mm groß. Eine einzige Einheit kann nur wenige Zellen aufnehmen, sodass viele Sphären nötig sind um therapeutische Mengen eines bestimmten Wirkstoffes zu sezernieren.

1.4.3. Biokapsel: Immunenhancement für den anti-Idiotypen Abagovomab?

Die Behandlung maligner Tumoren mit rekombinanten verkapselten Zellen stellt eine interessante Zusatzstrategie dar und gehört zu den sogenannten *ex vivo* gentechnologischen Methoden. Im Unterschied zur *in vivo* Gentherapie mit z.B. viralen Vektoren, werden hier nicht Patientenzellen sondern non-autologe Zellen *ex vivo* gentechnisch manipuliert um anschließend als Biokapseln kontinuierliche Mengen an therapeutischen Stoffen endogen zu produzieren. Bei diesem Verfahren eröffnen sich einige Vorteile gegenüber *in vivo* Methoden mit z.B. viralen Vektoren: 1) keine Bildung von Antikörpern gegen virale Kapsidantigene, 2) keine unkontrollierte Disseminierung des Vektors, 4) keine Insertion viraler Bestandteile ins humane Genom, 5) keine Vektor-Mutagenese (Moisset et al. 2000, Cirone et al. 2001).

Die Bioverkapselungstechnologie findet auch in der Krebstherapie eine breite Anwendung vor allem bei: Pankreaskarzinom (Löhr et al. 2002), Glioblastom (Joki et al. 2001, Read et al. 2001, Huszthy et al. 2006), Kolon Karzinom (Zeng et al. 2003) u.a. Das Prinzip der kontinuierlichen endogenen Sekretion von Therapeutika wird vor allem dann attraktiv, wenn Substanzen aufgrund von z.B. hoher Toxizität, geringe Halbwertszeit oder geringer Bioverfügbarkeit eine effektive Tumorbehandlung limitieren (Cirone et al. 2001).

Im Hinblick auf die Gentherapie des Ovarialkarzinoms mittels anti-Idiotypen, wurde für den humanisierten Abagovomab Abkömmling ACA125hFc ein *in vitro* Biokapselsystem zur

kontinuierlichen Freisetzung generiert (Hann et al. 2005). Ein Nachteil von anti-Idiotypen ist ihre geringe Immunogenität, so dass zur Aufrechterhaltung einer Immunantwort Mehrfachimmunisierungen nötig sind (Wagner et al. 2001). Es ist durchaus denkbar, dass ein Depotsystem, welches die kontinuierliche anti-Idiotypen Expression sicherstellt, über endogene Antikörper Persistenz deren Immunogenität verbessert und so zu einer dauerhaften Tumorantwort führt. Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand eines Mausmodells überprüft werden, inwiefern das in einer Vorarbeit generierte Biokapselsystem für ACA125hFc (Hann et al. 2005), einen Vorteil gegenüber der herkömmlichen subcutanen Applikation des aufgereinigten Antikörpers bringt.

2. Methoden

2.1 Die Aufreinigung des anti-Idiotypen ACA125hFc aus serumfreien C2C12 Zellkulturüberständen über eine Protein G Säule

Die Herstellung und Expression des Abkömmlings von Abagovomab ACA125hFc mittels murinen C2C12 Myoblasten wurde bereits ausführlich beschrieben (Hann 2005, Hann et al. 2005).

2.1.1. Das Prinzip der Proteinaufreinigung über eine Protein-G Säule

Die Aufreinigung des ACA125hFc Antikörpers aus serumfreien Kulturüberständen erfolgte über eine Protein G Säule (Hip Trap Protein G), welche eine hohe Bindungsaffinität zu IgG Molekülen und somit auch zu dem anti-Idiotypen besitzt. Da herkömmliche C2C12-Kulturmedien (siehe Abschnitt 3.17) serumhaltig sind und somit IgG Antikörper enthalten, sind sie für die Aufreinigung über eine Protein G Säule ungeeignet. Aus diesem Grund wurden rekombinante C2C12 bzw. wildtyp C2C12 Myoblasten (Negativkontrolle) unmittelbar vor der Aufreinigung, 7 Tage in serumfreien Hybridomed-Medium kultiviert.

2.1.2. Das Protokoll zur Aufreinigung des ACA125hFc Antikörpers aus serumfreien Kulturüberständen mittels einer Protein G Säule

Circa 80 ml serumfreier ACA125hFc-C2C12 bzw. wildtyp C2C12 Kulturüberstand wurde abzentrifugiert (10 min, 4°C, 4000 rpm), 1:1 mit 1x Binding Buffer (siehe Abschnitt 3.7) verdünnt und steril filtriert. Die Protein G Säule wurde mit 5 ml Ampuwa gewaschen und mit 5 ml 1 x Binding Buffer äquilibriert. Die Kulturüberstände wurden 2 x über die Säule gegeben (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min). Die Säule wurde anschließend mit 10 ml Binding Buffer gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 6 ml Elution Buffer (siehe Abschnitt 3.8), wobei je 0,5 ml Fraktionen in Eppendorfhüttchen (40 µl Neutralisationspuffer vorgelegt) aufgefangen wurden. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm gemessen.

2.1.3. Berechnung der Antikörperkonzentration von ACA12hFc nach der Aufreinigung

$$C = A_{280} \times 0,71$$

C= Antikörperkonzentration (mg/ml Eluat)

A₂₈₀= Extinktion der Verdünnung bei 280 nm

$$m_{\text{tot}} = C \times V_y / 1000$$

m_{tot}= Gesamte Antikörpermenge (mg)

V_y= Gesamtvolumen an PBS

2.2. Die Überprüfung der Reinheit und Funktionalität des ACA125hFc Antikörpers nach der Aufreinigung über eine Protein G Säule

2.2.1 Die Überprüfung der Reinheit des ACA125hFc Antikörpers mittels SDS-PAGE

Die Reinheit des ACA125hFc Antikörpers nach Aufreinigung, wurde mittels SDS-PAGE überprüft und anschließend mit Coomassie-Färbung detektiert.

2.2.2. Das Protokoll für SDS-PAGE

Das 8 % Trenngel wurde durch Zusammenmischen der unter dem Abschnitt 3 beschriebenen Bestandteile hergestellt, in die Gelkassette gegossen, mit Ethanol absolut beschichtet (Luftblasen entweichen lassen!) und 30 min polymerisiert. Anschließend wurde das Sammelgel (Abschnitt 3.13) hergestellt, in die Gelkassette luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen und weitere 30 min polymerisiert. 15 µl Probe (5 µg aufgereinigtes ACA15hF) wurde mit je 5 µl non-reduced (Abschnitt 3.12) bzw. reduced Buffer (Abschnitt 3.11) gemischt, auf einen Heizblock für 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Proben auf dem SDS-PAGE Gel erfolgte in 1x Elektrophorese Puffer (siehe 3.10), bei 150 V, 300 mA, 15 W für ca. 1 h. Das Gel wurde anschließend entweder mit Coomassie Blau angefärbt oder zur Western-Blot Analyse weiterbenutzt.

2.2.3. Das Prinzip der Überprüfung der Funktionalität des ACA125hFc Antikörpers mittels ELISA

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung des anti-Idiotypen ACA125hFc an den Idiotypen OC125. ACA125hFc imitiert das CA125 Tumor Antigen und bildet somit Komplexe mit OC125, welches seinerseits gegen CA125 gerichtet ist. An die Wand von ELISA Mikrotiterplatten wurde im ersten Schritt der Idiotyp OC125 gebunden. Anschließend erfolgt die Zugabe von aufgereinigtem ACA125hFc oder der Kulturüberstand von rekombinanten C2C12 Myoblasten. Die Bildung der Immunkomplexe zwischen den Idiotypen OC125 und den anti-Idiotypen ACA125hFc wurde mit einem Antikörper detektiert, welcher Affinität zu den humanen Fc Teil von ACA125hFc aufweist.

2.2.4. Das Protokoll für ELISA zur Detektion und Quantifizierung des ACA125hFc Antikörpers

Mikrotiterplatten (Maxisorp) wurden mit dem murinen monoklonalen Antikörper OC125 in einer Konzentration von 3µg/ml Beschichtungspuffer (siehe Abschnitt 3.3) (50 µl/Kavität, 1h, schütteln) beschichtet. Anschließend wurde für 15 min mit 200 µl/Kavität Block-Puffer (siehe Abschnitt 4.1) geblockt und nachfolgend 3x mit Waschpuffer (siehe Abschnitt 3.5) gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von ACA125hFc (Zellkulturüberstände oder Aufreinigung) (50 µl/Kavität, 2h, schütteln). Nach dreimaligem Waschen wurde der POD konjugierte anti-human Fc spezifische Antikörper (50 µl/Kavität, 1:500 Block-Puffer, 1h, schütteln) hinzugefügt. Die Kavitäten wurden erneuert 3 x gewaschen und mit ABTS-Substrat (siehe Abschnitt 3.4) (50 µl/Kavität, 40 min.) im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde anhand der Extinktion bei 405 nm (A_{405}) gemessen. Als Negativkontrolle diente Kulturüberstand von wildtyp C2C12 Myoblasten bzw. Block-Puffer. Die Quantifizierung der ACA125hFc Mengen aus C2C12 Kulturüberständen erfolgte mittels Standard (purifiziertes ACA125hFc), welcher parallel in verschiedenen Verdünnungen (4-2-0,5-0,2-0,1 µg/ml Block-Puffer) aufgetragen wurde.

2.3. Herstellung von Makrokapseln welche kontinuierliche und konstante Mengen des ACA125hFc Antikörpers sezernieren

Die Generierung einer Makrokapsel, welche sowohl konstante als auch kontinuierliche Mengen des anti-Idiotypen ACA125hFc gewährleistet, wurde bereits 2005 von Hann detailliert beschrieben. Hier noch mal eine kurze Zusammenfassung: Die entwickelte Biokapsel umfasste eine Hohlfaser, in dessen Lumen rekombinante C2C12 Zellen injiziert wurden, die dann die konstante Abgabe der Antikörper nach Außen sicher stellten. Als optimales Expressionssystem für ACA125hFc Antikörper wurden Polyethersulfon (PES) bzw. Polyvinylidenfluorid (PVDF) Hohlfasern mit einer internen PET (Polyethylenterephthalat) Matrix gefunden.

2.3.1. Die Herstellung von PES Makrokapseln und die Einbringung einer internen PET Matrix

In das Lumen (Innendurchmesser=300 μm) von PES Kapseln wurde ein Polyethylenterephthalat (PET) Faserbündel, mittels einem dünnen Stahldraht eingeführt. Die PES Hohlfasern (MWCO: 2000 KD; ID=300 μm) wurden anschließend in 1cm lange Stränge geschnitten und an einem Ende mit einem medizinischen Klebstoff (Dymax 1188MT) abgedichtet. Der Klebstoff besitzt die Eigenschaft bei einer Wellenlänge von 470 nm zu polymerisieren, wenn er mit Blaulicht (Luxor 3, Wellenlängenbereich: 450-490 nm) behandelt wird. Ein ca. 600 mm langer Plastikschlauch (Pebax) wurde am offenen Ende der Kapsel angebracht und mittels Klebstoff befestigt.

2.3.2. Sterilisation von PES Makrokapseln

Die PES Kapseln wurden strahlensterilisiert (Rüsch Sterilisation Service). Die Strahlendosis betrug 25 KGy,

2.3.3. Herstellung von PVDF Makrokapseln mit einer internen PET Matrix

PVDF (MWCO: 500; ID=500 μm) Hohlfasern wurden in 1cm lange Stränge geschnitten und mit einer PET Membran (analog zu Abschnitt 2.3.1) versehen. Die Kapseln wurden dann für 24 h in Methanol eingeweicht, anschließend für zwei Tage in ein Wasserbad gehalten und

schließlich in PBS autoklaviert. Die weitere Herstellung erfolgte unter sterilen Bedingungen, wie unter Abschnitt 2.3.1. beschrieben

2.3.4. Methode zur Befüllung der Makrokapseln mit C2C12 Zellen

ACA125hFc-C2C12 Zellen wurden mit 3ml Trypsin für 3 min behandelt und nach Zugabe von 5 ml Kulturmedium (siehe Abschnitt 3.17) abzentrifugiert (10 min, 1100 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen (2000 Zellen/ μ l Medium) und auf Eis gestellt. Mittels Hamilton.Spritze und dem entsprechenden Adapter (siehe Hann 2005) wurde pro Polymerkapseln je 5 μ l Zellsuspension injiziert. Nach beendeter Beladung wurde die Adaptervorrichtung samt Plastikschlauch entfernt. Das offene Ende der Kapsel wurde im Anschluss mit einem Klebstoff (Dymax) abgedichtet. Die verkapselten Zellen wurden in 12 well Platten überführt und in je 1 ml Medium (siehe Abschnitt 3.17) kultiviert (37°C, 5% CO₂). Ein Mediumwechsel erfolgte durchschnittlich alle 7 Tage. Als Negativkontrolle dienten verkapselte wildtyp C2C12. Für die statistische Auswertbarkeit wurden 5 Kapseln pro Gruppe eingesetzt.

2.4. Untersuchung der ACA125hFc Expression und der C2C12 Zellvitalität aus Makrokapseln

2.4.1 ELISA zur Quantifizierung der ACA15hFc Antikörper Expression aus Makrokapseln

Die Funktionalität von verkapselten C2C12 Zellen wurde anhand der ACA125hFc Antikörpermengung bestimmt, welche aus den Polymerkapseln (pro 1ml Kulturmedium) innerhalb einer Woche freigesetzt wurde. Dabei wurde der unter Abschnitt 2.2.4. beschriebenen ELISA benutzt.

2.4.2. Prinzip der Polymereinbettung zur histochemischen Untersuchungen der verkapselten C2C12 Myoblasten

Da verkapselte Zellen eine relativ fragile Einheit darstellen, reichen herkömmliche Verfahren nicht aus um histologische Schnitte anzufertigen. Aus diesem Grund wurde ein Polymerisationssystem zum Einbetten von Makrokapseln auf Methacrylat-Basis (GMA, 2-Hydroxyethyl-Methacrylat) gewählt (Technovit 7100). Die GMA-Lösung passiert die Poren

der Hohlfaser und ein anschließender Polymerisationsschritt ermöglicht die Herstellung von Kunststoffblöcken, aus denen sich sehr dünne Schnitte (2-5 μm) anfertigen lassen können.

2.4.3. Protokoll zur Polymereinbettung der Makrokapseln

Die Makrokapseln wurden über Nacht mittels neutraler 4 % Formaldehydlösung fixiert. Anschließend folgten zahlreiche Entwässerungsschritte. Dabei wurden die Kapseln je 2 Stunden mit 50 %, 70 %, 90 % und 96 % Ethanol inkubiert. Nachfolgend wurden die Hohlfasern in eine Lösung aus gleichen Teilen Technovit 7100 und Ethanol 96 % für 2 h eingetaucht. Die Infiltration wurde im Infiltrationsmedium A (angefertigt laut Anweisung des Herstellers) über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Kapseln in eine Einbettform aus Teflon (Histoform Q) gelegt und mit je 2 ml Einbettflüssigkeit B (angefertigt laut Anweisung des Herstellers) beschichtet. Nach abgelaufener Polymerisation (ca. 2 h) wurden Klötzchenhalter in die Aussparungen der Einbettform gelegt und der Kleber (Technovit 3040) in die Kunststoffhalterung gegeben. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden schließlich 5 μm Schnitte angefertigt, die in einem Wasserbad gestreckt und mit einer Pinzette auf einen beschichteten Objektträger gezogen wurden. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Richardson Reagenz (1:10, 60°C, 1min).

2.5. Methoden zur Herstellung, Implantation und Explantation von Makrokapseln in Balb/c Mäuse

2.5.1. Das Prinzip der Implantation verkapselter Maus Myoblasten in Balb/c Mäuse

Für die Untersuchung der Immunogenität des ACA125hFc produzierenden Kapselsystems, wurden 12 Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse ausgewählt, die bekanntlich kein CA125 Antigen exprimieren. Verkapselte C2C12 Maus Myoblasten stellen, bezüglich Balb/c Mäusen, allogene Implantate dar, womit Voraussetzungen für die Erzeugung eines non-autologen endogenen Depot-Systems zur körpereigenen Antikörper-Synthese erfüllt waren. Gleichzeitig wurde untersucht, inwiefern die unterschiedlichen Wandporengrößen (MWCO) der zwei eingesetzten Kapseltypen [PVDF (MWCO=500 KD) bzw. PET (MWCO=2000 KD)], einen Einfluss auf eine eventuelle Implantatabstoßung nehmen könnten. Da bei vorangegangenen *in vitro* Experimenten verkapselte C2C12 Zellen, die eine PET-Matrix enthielten, die stärksten ACA125hFc Expressionsraten aufwiesen, wurde nur dieser Kapseltyp

im Tierversuch eingesetzt (Hann 2005). Die Applikation der Implantate erfolgte subkutan. In gleicher Weise wurden verkapselte untransfizierte Myoblasten als Kontrolle implantiert. Nach 4 Wochen wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen, um die Induktion spezifischer Antikörper zu bestimmen. Weitere Blutentnahmen folgten in 4 Wochen-Abstand um die Dauer und das Maximum der spezifischen Immunantwort feststellen zu können. Nach einer Versuchsdauer von 2 Monaten wurden die Tiere getötet, deren Milz entnommen und die Polymerkapseln explantiert. Parallel dazu wurden Tiere mit aufgereinigtem ACA125hFc (s.c.) bzw. wildtyp C2C12 Überständen immunisiert. Um die Immunantwort zu verstärken wurde CFA als Adjuvants eingesetzt. In diesen Gruppen wurde die Induktion von spezifischen Antikörpern ebenfalls im 4 Wochen Abstand über einen Zeitraum von 2 Monaten untersucht.

2.5.2. Die Herstellung verkapselter C2C12 Zellen für den Tierversuch

10⁵ ACA125-C2C12 bzw. wildtyp C2C12 Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.3. beschrieben in je eine PVDF Kapsel (MWCO=500 KD; ID= 500µm) bzw. PES Kapsel (MWCO=2000 KD; ID=300 µm) mit PET injiziert. Die Herstellung der PVDF Kapseln bzw. der PES Kapseln mit PET wurde bereits unter Abschnitt 2.3. beschrieben. Die Kapseln wurden eine Woche in je 1ml RPMI/10 % kultiviert und anschließend für 24 h in serumfreies Hybridomed überführt. Die ACA125hFc Expression verkapselter Myoblasten wurde mittels ELISA überprüft (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.5.3. Die Implantation von PVDF bzw. PES Polymerkapseln in Balb/c Mäuse

Die oben beschriebenen Polymerkapseln wurden kurz mit je 1 ml PBS gewaschen und sofort für die Implantation eingesetzt. Pro Tier wurden je zwei Kapseln mit Hilfe einer Vasofix Braunüle (14 G) dorsal (s.c.) implantiert. Der Eingriff erfolgte unter Narkose (Forene) und aseptischen Bedingungen. Zur statistischen Auswertbarkeit wurden pro Gruppe 5 Tiere eingesetzt (siehe Tabelle 1).

Gruppe 1	<i>PVDF HF (MWCO 500 KD), mit PET, C2C12-WT, s.c.</i>
Gruppe 2	<i>PVDF HF (MWCO 500 KD), mit PET, C2C12- ACA125hFc, s.c.</i>
Gruppe 3	<i>aufgereinigte C2C12 WT Überstände in 50 µl CFA, s.c.</i>
Gruppe 4	<i>aufgereinigte ACA125hFc Überstände in 50 µl CFA, s.c..</i>
Gruppe 5	<i>PES HF (MWCO 2000 KD), mit PET, C2C12 WT, s.c.</i>
Gruppe 6	<i>PES HF (MWCO 2000 KD), mit PET, C2C12-ACA125hFc, s.c.</i>

Tabelle 1 : Übersicht Immunisierungsschema.

Pro Gruppe wurden 5 Tiere eingesetzt. Gruppe 1 bzw. 3 stellen Negativkontrollen für Gruppe 2 bzw. 4 dar.

Gruppe 5 stellt die Negativkontrolle für Gruppe 6 dar. Abkürzungen: HF=Hohlfasern; PES=Polyethersulfon; PVDF=Polyvinylidendifluorid

2.5.4. Immunisierungsprotokoll für die Applikation des aufgereinigten ACA125hFc

Die Aufreinigung des ACA125hFc Antikörpers aus serumfreien C2C12 Kulturüberständen erfolgte wie unter Abschnitt 2.1. beschrieben. Das ACA125hFc Eluat wurde mit Hilfe von SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.6.) auf Verunreinigungen überprüft. In gleicher Weise erfolgte die Herstellung der Negativkontrolle (aufgereinigte wildtyp C2C12 Kulturüberstände). Die unter Abschnitt 2.1. beschriebenen Antikörper-Eluate wurden photometrisch quantifiziert (für die Formel siehe 2.1.3.), auf pH 7 eingestellt, mit Ampuwa auf die gewünschte Konzentration (13 µg ACA125hFc/100 µl Ampuwa) verdünnt und anschließend sterilfiltriert. Pro Tier wurden 13 µg ACA125hFc Antikörper und 100 µl CFA injiziert. Zur statistischen Auswertbarkeit wurden pro Gruppe 5 Tiere eingesetzt (siehe Tabelle 1).

2.5.5. Die Zeitpläne für die Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten unter Narkose (Forene©), in 4 Wochen Abstand über einen Zeitraum von 2 Monaten. Ort der Blutentnahme war der Retrobulbus und erfolgte mit Hilfe einer Glaskapillare.

2.5.6. Die Explantation der Kapseln nach Versuchsende

Nach 2 Monaten wurden die Mäuse unter Vollnarkose (Forene©) entblutet. Dabei wurden die Kapseln entnommen und entweder in je 1ml RPMI/10 % FCS weiterkultiviert oder wie unter 2.4.3. beschrieben eingebettet. Die *in vitro* ACA125hFc Expression wurde mit ELISA (siehe 2.2.4.) untersucht.

2.5.7. Die Explantation der Milz nach Versuchsende

Die Milz wurde sofort nach ihrer Entnahme weiterverarbeitet.

2.5.8. Das Protokoll zur Aufbereitung von Splenozyten

Die Splenozyten wurden über ein 100 µm Zellsieb aus der Milz gedrückt, in 30 ml RPMI aufgenommen und abzentrifugiert (1600 rpm, 10 min). Anschließend wurden die Erythrozyten aus der Präparation mit 3 ml Lysis-Buffer (BD Pharmingen) für 5 min lysiert, die Zellsuspension in 27 ml RPMI aufgenommen und abzentrifugiert (1600 rpm, 5 min). Das Pellet wurde schließlich in 30 ml RPMI aufgenommen, erneut abzentrifugiert (1600 rpm, 5 min) und entweder in je 1 ml Einfriermedium (siehe 3.18) cryoasserviert oder weiterverarbeitet (siehe 2.6.4.).

2.6. Die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit von ACA125hFc-C2C12 Kapseln im Tierversuch

2.6.1. Das Prinzip des ELISA zum Nachweis von spezifischen anti-ACA125hFc Antikörpern im Serum von Balb/c Mäusen

Die Induktion einer humoralen Immunantwort, infolge der kontinuierlichen *in vivo* Expression des anti-idiotypischen Antikörpers ACA125hFc aus verkapselten C2C12 Myoblasten, wurde anhand von spezifischen murinen anti-ACA125hFc Serum Antikörper via ELISA-Techniken untersucht. Zunächst gab der Nachweis einer spezifischen humoralen Immunität Aufschluss darüber, inwiefern eine kontinuierliche endogene Sekretion des ACA125hFc Antikörpers prinzipiell einen Vorteil gegenüber der konventionellen anti-Idiotypen Vakzinierung mit sich bringen kann. Gleichfalls wurden so Informationen über die

Dauer und Intensität der induzierten humoralen Immunantwort gewonnen. Eine spezifische anti-ACA125hFc Immunantwort in Form von murinen anti-humanen Antikörpern (anti-hFc), mit Affinität für den humanen Fc Teil des ACA125hFc Antikörpers wurde wie folgt nachgewiesen: An die Wand von Mikrotiterplatten wurde ein humaner polyklonaler IgG (hIgG) Antikörper gebunden der nachfolgend mit den entsprechenden Mausseren inkubiert wurde. Die Existenz von murinen Fc spezifischen anti-human Antikörpern (anti-hFc) in den untersuchten Mausseren führte zur Bildung von Komplexen mit dem human IgG auf den Mikrotiterplatten. Anti-hFc/hIgG Komplexe wurden mit Hilfe eines murinen anti-Maus Antikörpers detektiert, mit Spezifität für den Fc Teil von murinen IgG Antikörper.

2.6.2. ELISA-Protokoll zum Nachweis von spezifischen anti-ACA125hFc Antikörpern in Mausseren

Mikrotiterplatten (Maxisorp) wurden mit einem humanen polyklonalen IgG Antikörper in einer Konzentration von 2µg/ml Beschichtungspuffer (siehe Abschnitt 3.3) (50 µl/Kavität, 1h, schütteln) beschichtet. Anschließend wurde für 1 h mit 200 µl/Kavität Block-Puffer (siehe Abschnitt 4.1) geblockt und nachfolgend 3x mit Waschpuffer (siehe Abschnitt 3.5) gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von Mausseren in verschiedenen Verdünnungen (50 µl/Kavität, 2h, schütteln). Es wurde erneuert 3x gewaschen und anschließend den POD konjugierte anti-Maus Fc spezifischen Antikörper (50 µl/Kavität, 1:2000 Block-Puffer, 1h, schütteln) hinzugefügt. Nachfolgend wurde 3 x gewaschen und mit ABTS-Substrat (siehe Abschnitt 3.4) (50 µl/Kavität, 40 min.) im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde anhand der Extinktion bei 405 nm (A_{405}) gemessen. Als Negativkontrolle dienten Seren von Mäusen, die entweder verkapselte wildtyp C2C12 Myoblasten enthielten oder mit C2C12 wildtyp Aufreinigungen immunisiert worden waren. Der Antikörpertiter wurde als diejenige Serumverdünnung definiert, bei der die Extinktion (A_{405}) der untersuchten Probe den doppelten Wert der Extinktion der entsprechenden Negativkontrolle betrug.

2.6.3. Das Prinzip des intrazellulären Zytokin-Assays zum Nachweis von anti-CA125 spezifischen T-Lymphozyten aus Milzzellen

Das Ziel einer effektiven immuntherapeutischen Strategie besteht in der Induktion einer antigen-spezifischen T-Zellaktivierung mit nachfolgender Tumorzelllyse. Da der anti-Idiotyp ACA125hFc das Tumor Antigen CA125 funktionell imitiert, ist es durchaus vorstellbar, dass

es im Verlauf einer Immunantwort auch zur Induktion von CA125 spezifischen Lymphozyten kommen kann. Der Nachweis einer zellulären Immunantwort, infolge der kontinuierlichen endogenen Sekretion des anti-Idiotypen ACA125hFc, kann anhand der Induktion von CA125 spezifischen T-Lymphozyten, mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS) untersucht werden. Die Induktion einer effizienten zellulären Immunität ist insbesondere von dem Auftreten von Th1-Helferzellen sowie zytotoxischen CTL-Zellen abhängig. Da diese beiden Lymphozytenpopulationen teilweise unterschiedliche Oberflächenproteine besitzen [Th1-Zellen sind CD3/CD4 positiv; CTL-Zellen sind CD3/CD8 positiv] können sie via FACS-Analyse getrennt voneinander detektiert und untersucht werden. Eine Aussage über die Induktion einer spezifischen Immunantwort, als Folge einer Genimmuntherapie mit ACA125hFc, kann sowohl über die intrazelluläre Synthese von Zytokinen, (z.B. INF_γ) als auch über die Expression von Oberflächenaktivierungsmarkern (z.B. CD69) gemacht werden. Sowohl das Zytokin Interferon γ (INF_γ) als auch der Aktivierungsmarker CD69 kann von CA125 spezifischen CTL- bzw. Th1 Zellen, nach einer spezifischen in vitro Restimulation mit CA125, exprimiert werden. Zu diesem Zweck werden entsprechende murine Splenozyten in vitro mit dem CA125 Antigen und anti-CD28 Antikörper [reagiert mit CD28 (costimulatorisches Signal zur Lymphozytenproliferation)] stimuliert. Die nachfolgende Zugabe von Brefeldin A führt zur intrazellulären Akkumulation von Zytokinen, wie z.B. Interferon γ . Anschließend werden Th1 bzw. CTL Oberflächenproteine mit entsprechend markierten anti-CD3, anti-CD8 und anti-CD69-Antikörper angefärbt und nach Permeabilisierung der Lymphozyten das intrazelluläre INF_γ mit einem anti- INF_γ Antikörper detektiert. Eine Vier-Farben-FACS-Analyse ermöglicht dabei die simultane Detektion von CA125 spezifischen Th1-Zellen und CTL-Zellen in nur einem Ansatz. Als Positivkontrolle werden Lymphozyten unspezifisch mit PHA stimuliert, als Negativkontrolle dienen unstimulierte Zellen.

2.6.4. Das Protokoll des intrazellulären Zytokin-Assays zum Nachweis von anti-CA125 spezifischen T-Lymphozyten aus Milzzellen

Die murinen Splenozyten wurden wie unter Abschnitt 2.5.8. beschrieben, gewonnen und in einer Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Zellen/500 μl AIM-V-Medium/Kavität auf eine 24 well Kulturplatte gesetzt. Pro Ansatz wurde 2,5 μg anti-Maus-CD28 Antikörper gegeben, wobei nach 15 min die Zugabe von CA125 (2500 U/Ansatz, 37°C, 5% CO_2) erfolgte. Als Positivkontrolle wurde PHA (5 μg /Ansatz) eingesetzt, als Negativkontrolle dienten

unstimulierte Lymphozyten. Nach 2 h wurde zu jedem Ansatz Brefeldin A (2,5µg) zugesetzt und für 12 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nachfolgend wurden die Lymphozyten mit je 50 µl 20 mM EDTA/Ansatz abgelöst, in FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1600 rpm/5 min). Anschließend wurde pro Ansatz jeweils 2 µg anti-Maus CD69-PE, anti-Maus CD3-PerCP-CY5.5 und anti-Maus CD8-APC Antikörper zugegeben, 30 min inkubiert und mit je 2 ml Cellwash gewaschen (1600 rpm, 5 min). Nachfolgend wurden die Lymphozyten für 20 min in je 500 µl Cytotfix-Cytoperm Lösung aufgenommen, 2x mit 2ml 1x BD Perm/Wash gewaschen (1600 rpm, 5 min), für 30 min mit jeweils 3 µg anti-Maus INFγ -FITC Antikörper inkubiert und schließlich mit je 2 ml Cellwash gewaschen (1600 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in je 200 µl Cellwash aufgenommen und zur Messung eingesetzt (BD FACS Calibur).

3. Rezepturen

3.1. Coomassie Entfärbelösung

Methanol	45 %
Destilliertes Wasser	45 %
Eisessig	10 %

3.2. Coomassie Färbelösung

Coomassie R 250	0,125 %
in Coomassie Entfärbelösung	

3.3. ELISA Wandbeschichtungspuffer (pH 9,4-9,7)

Natriumcarbonat, 0,2 M	26 %
Natriumhydrogencarbonat, 0,2 M	74 %

3.4. ELISA ABTS Substratlösung

ABTS Puffer 1X	50 ml
ABTS	50 mg

3.5. ELISA Waschpuffer

Natriumchlorid	0,9 %
Tween 20	0,1 %

3.6. FBS inaktiv (FBSi)

FCS auf einem Wasserbad, bei 56 °C, 30 min inaktivieren.

3.7. Protein G Säule Binding Buffer, pH 5 (10X)

Natriumacetat	1M
Natriumazid	0,05 %

3.8. Protein G Säule Elution Buffer, pH 2,7 (10X)

Glycin-HCl	1M
------------	----

3.9. Protein G Säule Neutralisation Buffer, pH 9

Tris-HCl	1M
Natriumazid	0,05 %

3.10. SDS Elektrophorese Puffer, 4X

Tris Base	1,51 %
Glycin	7,2 %
SDS	0,5 %

3.11. SDS Probepuffer (nicht reduzierend)

Tris, 1M, pH 6,8	1,25 ml
SDS, 10 %	4 ml
Glycerin	2 ml
Bromphenolblau	1 mg
Destilliertes Wasser	2,75 ml

3.12. SDS Probepuffer (reduzierend)

Tris, 1M, pH 6,8	1,25 ml
SDS, 10 %	4 ml
Glycerin	2 ml
Bromphenolblau	1 mg

Destilliertes Wasser	1,75 ml
----------------------	---------

Vor Gebrauch 1% 2-Mercaptoethanol hinzufügen

3.13. SDS Sammelgel, pH 6,8

Destilliertes Wasser	2,7 ml
Acrylamid, 30 %	0,67 ml
Tris, 1M, pH 6,8	0,5 ml
SDS, 10 %	0,04 ml
APS, 10 %	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

3.14. SDS Trenngel (8% Acrylamid), 10 ml, pH 8,8

Destilliertes Wasser	4,6 ml
Acrylamid, 30 %	2,7 ml
Tris, 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml
SDS, 10 %	0,1 ml
APS, 10 %	0,1 ml
TEMED	0,008 ml

3.15. Zellkultur Einfriermedium

FBSi	80 %
DMSO	20 %

3.16. Zellkultur-Färbelösung zur Überprüfung der Zellvitalität

PBS	54 µl
Trypanblau 0,4%	36 µl
Zellsuspension	10 µl

3.17. Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin	
FBSi	10 %
Natriumpyruvat, 100 mM	1 %
Penicillin-Streptomycin, 10.000 E/10.000 µg	1 %

4. Materialien

4.1. Chemikalien, Reagenzien, Kits

	<i>Hersteller</i>
<i>ABTS buffer 16,7 g/l</i>	Roche
<i>ABTS</i>	Roche
<i>Acrylamid (Rotiphorese Gel, 30%)</i>	Roth
<i>Adjuvant complete (Freund)</i>	Difco
<i>Adjuvant incomplete (Freund)</i>	Difco
<i>AIM-V Medium</i>	Gibco
<i>Ampicillin</i>	Sigma
<i>APS</i>	Roth
<i>Ammoniumsulfat</i>	Merck
<i>Ampuwa</i>	Fresenius
<i>Blockierungsreag. für ELISA</i>	Roche
<i>Bromphenolblau</i>	Sigma
<i>Cellwash</i>	BD
<i>Coomassie brilliant blue R250</i>	Biorad
<i>Cytofix-Cytoperm Kit</i>	BD
<i>Dinatriumhydrogenphosphat</i>	Merck
<i>DMSO</i>	Sigma
<i>Dymax 1188MT</i>	Dymax
<i>ECL Western Blotting Detection Reagent</i>	Amershan
<i>EDTA</i>	Merck
<i>Eisessig 100</i>	Merck
<i>Ethanol absolut</i>	Merck
<i>Ethidiumbromid</i>	Sigma
<i>FACS Clean</i>	BD
<i>FACS Flow</i>	BD
<i>FBS</i>	Biochrom
<i>Forene</i>	Abboth
<i>Formalinlösung neutral</i>	Sigma
<i>Glycin</i>	Merck
<i>Glycerin wasserfrei</i>	Merck

<i>HCl</i>	Merck
<i>HybridomedDIF1000 f. 5% CO2</i>	Biochrom
<i>H₂SO₄</i>	Merck
<i>Kaleidoscope Prestained standards</i>	Biorad
<i>Kaliumchlorid</i>	Merck
<i>Lauryl Sulfate (SDS)</i>	Sigma
<i>2-Mercaptoethanol</i>	Sigma
<i>Molekulargewichtsmarker, Prestained IV, 10-160 KD</i>	Peqlab
<i>NaCl 0,9%</i>	Fresenius
<i>NaCl</i>	Merck
<i>NaOH 1 M</i>	Merck
<i>Na₂CO₃</i>	Merck
<i>NaHCO₃</i>	Merck
<i>Natriumazid</i>	Merck
<i>Penicillin- Streptomycin (10.000 E/10.000 µg)</i>	PAA
<i>PBS-Dulbecco</i>	PAA
<i>PHA</i>	BD
<i>2-Propanol</i>	Merck
<i>Richardson Reagenz</i>	Sigma
<i>RPMI 1640 mit stabilem Glutamin</i>	PAA
<i>Sodium Pyruvate (100 MEM 100mM)</i>	Invitrogen
<i>Technovit 7100</i>	Heraeus-Kulzer
<i>Technovit 3040/Kleber Kit</i>	Heraeus-Kulzer
<i>TEMED</i>	Roth
<i>Tris(hydroxymethylaminomethan)</i>	Merck
<i>Trypan blue stain 0,4 %</i>	Invitrogen
<i>Trizma Base</i>	Sigma
<i>Tween 20</i>	Sigma

4.2. Antikörper und Antigene

	<i>Hersteller</i>
<i>Anti-Human IgG-Fc spezifisch, Ziege</i>	Dianova
<i>Anti-Human-POD IgG-Fc spezifisch, Ziege</i>	Dianova
<i>Anti-Maus CD3-PerCP-CY5.5, HamsterIgG₁</i>	BD Pharm.

<i>Anti-Maus CD8-APC; Rat IgG_{2a}</i>	BD Pharm.
<i>Anti-Maus CD28, Hamster IgG₂</i>	BD Pharm.
<i>Anti-Maus CD69-PE, Hamster IgG₁</i>	BD Pharm.
<i>Anti-Maus-POD IgG-Fc spezifisch, Ziege</i>	Dianova
<i>Anti-Maus INF-FITC_γ, Rat IgG₁</i>	BD Pharm.
<i>CA125 cancer antigen (human fluid)</i>	NatuTec
<i>Human-IgG polyklonal</i>	Dianova
<i>OC 125 (anti-Human CA 125, Maus)</i>	Dako

4.3. Enzyme

	<i>Hersteller</i>
<i>Trypsin EDTA</i>	Invitrogen

4.4. Zelllinien

Für die Expression des anti-idiotypischen Fusionsproteins, sowie für die in vitro und vivo Verkapselungsversuche, wurde die Maus Myoblastenzelllinie C2C12 (ATCC No. CRL 1772) verwendet.

4.5. Tiere

Die biologische Wirksamkeit des aufgereinigten anti-idiotypischen Fusionsproteins ACA125hFc sowie der verkapselten, rekombinanten C2C12 Zellen, die den ACA125hFc Antikörper produzieren, wurde in 12 Wochen alten, weiblichen Balb/c Mäusen (Charles River, Sulzfeld) überprüft.

4.6. Zubehör und Plastikartikel

	<i>Größe</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Combitips</i>	<i>2,5-5-12,5 ml</i>	Eppendorf
<i>Falconröhrchen</i>	<i>15 ml, 50 ml</i>	Greiner
<i>FACS Röhrchen</i>		BD
<i>Gewebekulturflaschen(GKF)</i>	<i>75cm²/165cm²/225cm²</i>	Greiner
<i>Gewebekulturplatten</i>	<i>12 -24-96 well</i>	Nunc

Gewebekulturschalen	<i>100 mm</i>	Greiner
Hamilton Spritze	<i>1705 LT, 50 µl</i>	Hamilton
Histoblock Trägerteil		Heraeus
Histoform Q	<i>Teflon</i>	Heraeus
Hi Trap Protein G HPSäule		Amershan
Hohlfasern	<i>PES; MWCO=2000 KD (ID.: 300 µm/ OD: 500 µm) PVDF; MWCO=500 KD (ID.: 500 µm/OD: 700 µm)</i>	Membrana Spectrum Laboratories
Küvetten	<i>Hellma Präzisionsküvetten Kuvette Gene pulser, 0,4 gap</i>	Suprasil BioRad
Kanülen	<i>Brauniüle Vasofix (14 G/17 G)</i>	Braun
Mandrin	<i>Vasofix 14 G/17 G</i>	Braun
Mikrotiterplatten	<i>Maxisorp für ELISA</i>	Nunc
Nitrocellulosemembran, Hybond ECL		Amershan
Objektträger	<i>beschichtet</i>	Heraeus
Pebax plastic tubes	<i>ID.: 0.25 inches, OD. 0.27 inches</i>	MET
PET Fasern	<i>gebündelt</i>	Membrana
Pipettenspitzen	<i>0,5-10/10-100/100-1000 µl</i>	Gilson
Plastikadapter	<i>Material Ertacetal (Reiff)</i>	Uni-Tübingen
Plastikpipetten steril	<i>1-2-5-10-25-50 ml</i>	Greiner
Reaktionsgefäße	<i>0,5-1,5-2ml</i>	Eppendorf
Sterilfilter	<i>0,22 µm, FP 30/0,2</i>	S&Scholl
Zählkammer	<i>Neubauer improved</i>	Neubauer
Zellscraber		Sarstedt

4.7. Geräte

	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Autoklav</i>	<i>Autoklav Tuttnauer 2540 ELV</i>	Systec
<i>Blotting-Einheit</i>	<i>Novablot 2117-250</i>	LKB
<i>Brutschrank</i>	<i>Heracell (+CO₂)</i>	Heraeus
<i>Dokumentationssystem (für Western Blot)</i>		Roche
<i>FACS</i>	<i>FACS Calibur</i>	BD
<i>Gelkammer (SDS-PAGE)</i>		Biorad
<i>Mikroskop (invers)</i>	<i>Zeiss ID 03</i>	Zeiss
<i>Mikrotom</i>	<i>RM manuelles Rotationsmikrotom</i>	Leika
<i>Photometer</i>	<i>Gene Quant 2</i>	Pharmacia
<i>Pipetten</i>	<i>Mikropipetten (0,5-1000 µl)</i>	Gilson
	<i>Transferpette 8 (20-200µl)</i>	Brand
	<i>Pipettboy</i>	IBS
<i>Plattenreader</i>	<i>Microplate reader MPR A4</i>	Tosoh
<i>Polymerisationslampe</i>	<i>Luxor 3</i>	Ablestik
<i>Power Supply Gerät</i>	<i>LKB 2197 (Western Blot)</i>	LKB
	<i>Consort E 714 (SDS PAGE)</i>	Consort
<i>Pumpsystem</i>	<i>Pump-P-1</i>	Pharmacia
<i>Rührer</i>	<i>Heidolph Reax 2000</i>	Heidolph
<i>Schüttler</i>	<i>Heidolph Titramax 1000</i>	Heidolph
<i>Sterilbank</i>	<i>Microflow Safety Cabinet</i>	Heraeus
<i>Stickstofftank</i>	<i>Cryogenic Vessel Locator JR Plus</i>	Cryogenics

5. Ergebnisse

5.1. Die Überprüfung der Reinheit des ACA125hFc Antikörpers mittels SDS-PAGE, nach der Aufreinigung über eine Protein G Säule

Nach der Isolierung des anti-idiotypischen Antikörpers ACA125hF aus serumfreien C2C12 Kulturüberständen über eine Protein G Säule (siehe Abschnitt 2.1), wurde die Aufreinigung mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen auf proteinhaltige Verunreinigungen überprüft. Mittels Coomassie-Färbung konnten die Proteine sichtbar gemacht werden.

Unter reduzierenden Bedingungen wurde zum einen eine starke Bande bei 75 KD beobachtet, was der Größe der monomeren Form von ACA125hFc entsprach, zum anderen eine schwächere Bande bei 150 KD, was auf eine unvollständige Reduktion des ACA125Fc Dimers hindeutete. (Abb. 6A). Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde eine starke Bande bei 150 KD sichtbar, was der Größe der dimerisierten Form von ACA125hFc entsprach (Abb. 6B). Proteinkontaminationen konnten nicht nachgewiesen werden, was auf eine saubere ACA125hFc Präparation rückschließen ließ.

5.2. Die Überprüfung der Funktionalität des aufgereinigten ACA125hFc Antikörpers mittels ELISA

Die Bildung von spezifischen Immunkomplexen zwischen dem chimären anti-Idiotypen ACA125hFc (Ab2) und dem murinen Idiotypen OC125 (Ab1) konnten desweiteren mit Hilfe von den unter Abschnitt 2.2.4 beschriebenen ELISA Techniken qualitativ und quantitativ bestätigt werden. Daraus resultierte, dass der chimäre anti-idiotypische Antikörper ACA125hFc in der Lage war, den murinen Idiotypen OC125 zu binden, wobei eine optische Dichte (405 nm) von 1 einer Konzentration von etwa 2500 ng/ml entsprach (siehe Abb. 7).

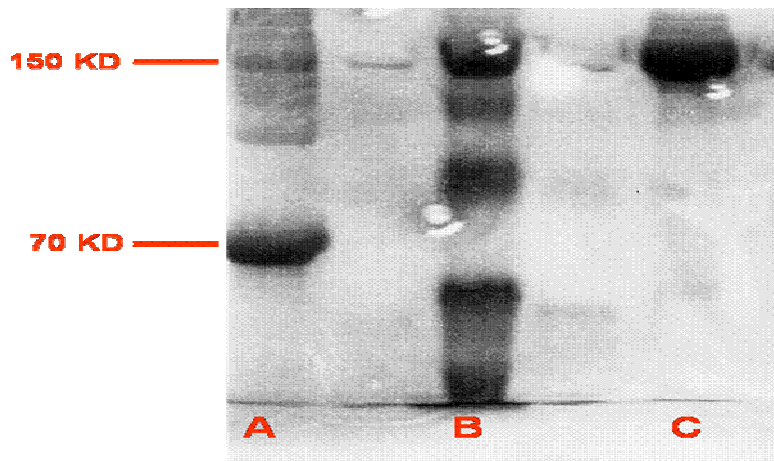


Abb. 6: Überprüfung der Aufreinigung ACA125hFc mit Hilfe von SDS-PAGE.

Der Antikörper wurde mittels Coomassie-Färbung dargestellt. **A)** SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen: Bande bei 75 KD (monomere Form von ACA125hFc); Bande bei 150 KD (unvollständige Reduktion des ACA 125hFc Dimers). **B)** Proreinmarker. **C)** SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen: Bande bei 150 KD (dimere Form von ACA125hFc).

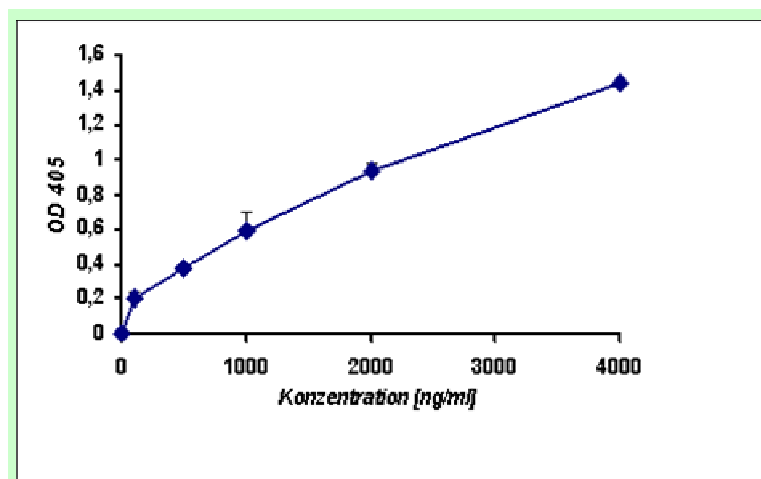


Abb. 7: Überprüfung der Bindung von ACA125hFc (Ab2) an OC125 (Ab1) mittels ELISA

OC125 (3 µg/ml) wurde an die Wand einer Mikrotiterplatte gebunden und mit unterschiedlichen Konzentrationen an ACA125hFc inkubiert. Die Detektion der Ab1-Ab2 Komplexe erfolgte mittels Fc spezifischen Ziege anti-human-POD Antikörper, nach Zugabe von ABTS, bei 405 nm.

5.3. Die Untersuchung der Immunantwort des endogenen ACA125hFc-Antikörper-Freisetzungssystems im Balb/c Mausmodell

Die Immunogenität des ACA125hFc-C2C12-Kapselsystems wurde in einem murinen Tiermodell anhand der humoralen bzw. zellulären Immunantwort untersucht. Dabei wurde der Balb/c Mausstamm eingesetzt, welcher bezüglich muriner C2C12-Myoblasten-Implantate einen allogenen Empfänger darstellte. Durch die Auswahl dieses Tiermodells war die Voraussetzung für die Generierung eines non-autologen endogen ACA125hFc Depotsystem gegeben. Die semipermeable Kapselmembran erfüllte dabei eine doppelte Rolle: zum einem

bot sie dem Implantat Schutz vor einer Abstoßreaktion, zum anderem ermöglichte sie den Austausch von ACA125hFc Antikörpern, Nährstoffe usw. zwischen Implantat und Blutbahn. Mittels zweier Kapseltypen wurde untersucht, inwiefern der immunologische Schutz für die verkapselten Zellen bestehen bleibt, wenn Materialeigenschaften wie Porengröße (500 KD vs. 2000 KD) oder chemische Zusammensetzung (PVDF vs. PES) der Implantate verändert werden. Zu diesem Zweck wurden PVDF (MWCO=500 KD) bzw. PES (MWCO=2000 KD) Kapseln eingesetzt, in deren Lumen ursprünglich 10^5 Zellen injiziert wurden. Die Kapseln wurden vor der Implantation für einen Monat in RPMI/10 % FCS kultiviert. Pro Tier wurden je zwei Kapseln des gleichen Typs, dorsal (s.c.) appliziert. In gleicher Weise wurden verkapselte wildtyp C2C12 Zellen hergestellt und implantiert. Die Kontrollimmunisierung mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörper bzw. wildtyp C2C12 Überstand als Negativkontrolle sollte darüber Aufschluss geben, inwiefern ein kontinuierliches endogenes ACA125hFc Freisetzungssystem die Immunogenität des anti-Idiotypen verbessern kann und wo die Vorteile gegenüber einer konventionellen Vakzinierung liegen. Zu diesem Zweck wurde diejenige Menge an ACA125hFc Antikörper appliziert (13 µg/Tier, s.c.), welche über 2 Monate durchschnittlich von 2 Kapseln *in vitro* exprimiert wurde. Diese Antikörpermengung entsprach der theoretischen *in vivo* ACA125hFc Expression von 2 Kapseln/ Tier/ 2 Monate. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass in alle Tiergruppen letztendlich die gleiche ACA125hFc Antikörpermengung gelangt. Um die Immunantwort zu verstärken wurde bei der ACA125hFc Vakzinierung zusätzlich 100 µl CFA/Tier (Kompletter Freudscher Adjuvants) als Adjuvants eingesetzt.

5.3.1. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort von PVDF Implantaten in einem murinen allogenen Tiermodell anhand von anti-ACA125hFc Antikörpern

Die Induktion einer humoralen Immunantwort infolge der kontinuierlichen endogenen Freisetzung des ACA125hFc Antikörpers aus PVDF Implantaten (MWCO=500 KD) wurde anhand von spezifischen murinen anti-ACA125hFc Antikörper analysiert. Dabei wurden die Mäuseren in 4 Wochen Abstand jeweils 2 mal auf murine anti-human Fc Antikörper mit Affinität für den humanen Fc Teil von ACA125hFc mittels ELISA Techniken (siehe 2.6.2) untersucht. Im Serum vorhandene murine anti-humane Antikörper führten zur Bildung von spezifischen Komplexen mit einem humanen polyklonalen IgG Antikörper (Dianova) auf den Mikrotiterplatten Diese human/anti-human Antikörperkomplexe konnten letztendlich mit einem anti-Maus Antikörper detektiert werden, welcher Spezifität für den murinen Fc Teil

von anti-ACA125hFc Antikörpern aufwies. Als Negativkontrolle diente Block-Puffer (siehe 4.1.) sowie Seren von Balb/c Mäusen, denen C2C12 wildtyp PVDF Implantate appliziert worden waren. Pro Tier wurden 2 Kapseln, s.c implantiert. Jede Kapsel enthielt ursprünglich 10^5 C2C12 Zellen und eine PET Matrix. Zur statistischen Auswertbarkeit wurden pro Gruppe 5 Tiere eingesetzt. Als Antikörpertiter wurde diejenige Serumverdünnung (Verdünnung in Block-Puffer) definiert, bei der die optische Dichte (OD_{405}) der Probe den doppelten Wert der OD_{405} der Negativkontrolle (Block-Puffer) beträgt. Beispiel (siehe Tabelle 2); Maus 1 (1 Monat): der anti-ACA125hFc Antikörpertiter entspricht hier einer Serumverdünnung von 1 zu 10000, weil die gemessene OD_{405} dieser Verdünnung doppelt so hoch war wie die OD_{405} der Negativkontrolle.

Bereits nach einem Monat konnten anti-human Fc spezifische Antikörper gegen ACA125hFc detektiert werden (siehe Tabelle 2), wobei der durchschnittliche Antikörpertiter bei 1/13000 lag. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, konnte nach 2 Monaten ein statistisch signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) des anti-human Fc spezifischen Antikörpertiter im Vergleich zum Vormonat beobachtet werden. Der durchschnittliche Seramtiter von anti-ACA125hFc Antikörpern betrug dabei einen Wert von 1/ 120000 (Abb. 8). Aus diesen ersten Daten wurde ersichtlich, dass infolge der endogenen Freisetzung von ACA125hFc Antikörpern aus verkapselten C2C12 Myoblasten eine ACA125hFc spezifische Immunantwort möglich war, wobei der signifikante Anstieg des Seramtiters um das ca. 9-fache (Blutentnahmepunkt 1. vs. 2. Monat) vermutlich auf die kontinuierliche *in vivo* Sekretion des Antikörpers aus den Implantaten zurückzuführen war.

Tabelle 2: Übersicht von anti-ACA125hFc Antikörpertiter, infolge der ACA125hFc Expression aus implantierten PVDF Kapseln.

<i>Tiergruppe mit ACA125hFc-C2C12 PVDF-Implantate</i>	<i>Maus anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach 1 Monat</i>	<i>anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach 2 Monaten</i>
Maus 1	10.000	100.000
Maus 2	10.000	50.000
Maus 3	20.000	200.000
Maus 4	20.000	200.000
Maus 5	5.000	50.000

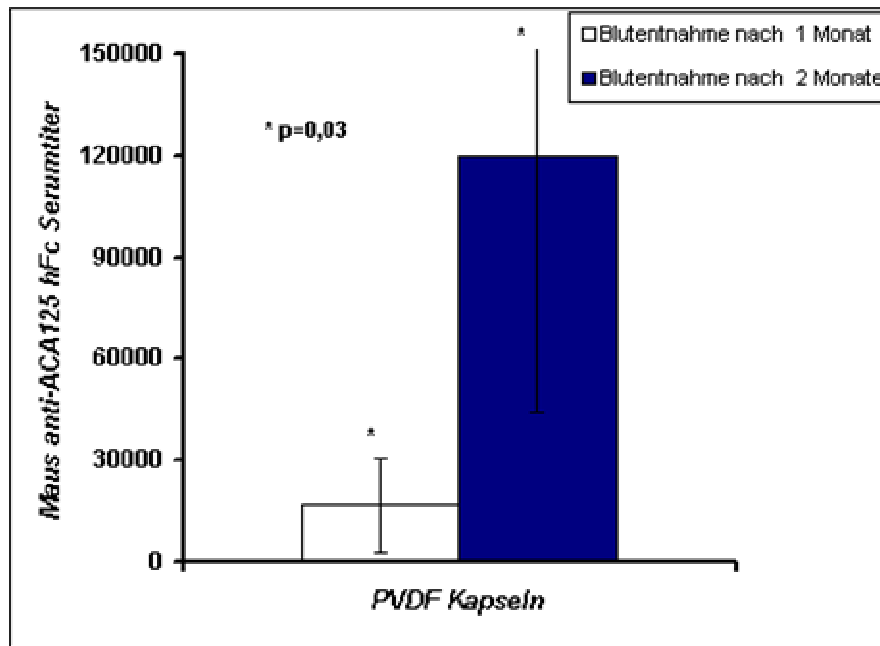


Abb. 8: Maus anti-ACA125hc Antikörpertiter (Mittelwerte) infolge der ACA125hFc Expression aus implantierten PVDF Kapseln (2 Implantate/Tier)

Dargestellt sind die Maus anti-human Fc spezifischen Antikörperlevel nach 1 bzw. 2 Monaten, die anhand ihrer Bindung an einem humanen polyklonalen IgG mittels ELISA ermittelt wurden.

5.3.2. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort von PES Implantaten in einem murinen allogenen Tiermodell anhand von anti-ACA125hFc Antikörpern

In diesem Versuch wurde anhand von PES Hohlfasern, der Einfluss von veränderten Materialeigenschaften wie Membranporendurchmesser (MWCO 2000 KD, anstatt 500 KD) bzw. chemische Zusammensetzung der Implantate (PES anstatt PVDF) auf die humorale Immunantwort gegen ACA125hFc untersucht. Die Induktion der humoralen Immunantwort infolge der *in vivo* Freisetzung des ACA125hFc Antikörpers aus PES Implantaten (MWCO=2000 KD) wurde ebenfalls anhand von spezifischen murinen anti-ACA125hFc Antikörper mittels ELISA analysiert (siehe oben), in 4 Wochen Abstand jeweils 2-mal. Als Negativkontrolle diente Block-Puffer bzw. Seren von Balb/c Mäusen, denen C2C12 wildtyp PES Implantate appliziert worden waren. Pro Tier wurden 2 Kapseln, s.c implantiert. Jede Kapsel enthielt ursprünglich 10^5 C2C12 Zellen und eine PET Matrix. Zur statistischen Auswertbarkeit wurden pro Gruppe 5 Tiere eingesetzt.

<i>Tiergruppe mit ACA125hFc-C2C12 PES-Implantate</i>	<i>Maus anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach 1 Monat</i>	<i>anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach 2 Monaten</i>
Maus 1	10000	240000
Maus 2	10000	480000
Maus 3	5000	200000
Maus 4	2000	130000
Maus 5	10000	2500000

Tabelle 3: Übersicht von anti-ACA125hFc Antikörpertiter, infolge der Applikation von ACA125hFc-PES Implantaten. Nach 1 bzw. 2 Monat(e) wurde das Serum der Mäuse mittels ELISA auf Fc spezifische Maus anti-human Antikörper untersucht.

Auch im Serum der PES-Implantat-Gruppe konnte bereits nach einem Monat spezifische anti-human Fc Antikörper gegen ACA125hFc detektiert werden (siehe Tabelle 3), wobei der durchschnittliche Antikörpertiter bei 1/7400 lag. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, konnte nach 2 Monaten ein statistisch signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) des anti-human Fc spezifischen Antikörpertiter im Vergleich zum Vormonat beobachtet werden. Der durchschnittliche Serumtiter von anti-ACA125hFc Antikörpern betrug dabei einen Wert von 1/260000 (Abb. 9). Aus diesen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass infolge der endogenen Freisetzung von ACA125hFc Antikörper aus verkapselten C2C12 Myoblasten eine ACA125hFc spezifische Immunantwort möglich war, wobei der signifikante Anstieg des Serumtiters um das ca. 35-fache (Blutentnahmepunkt 1. vs. 2. Monat) vermutlich auf die kontinuierliche in vivo Sekretion des Antikörpers aus den Implantaten zurückzuführen war.

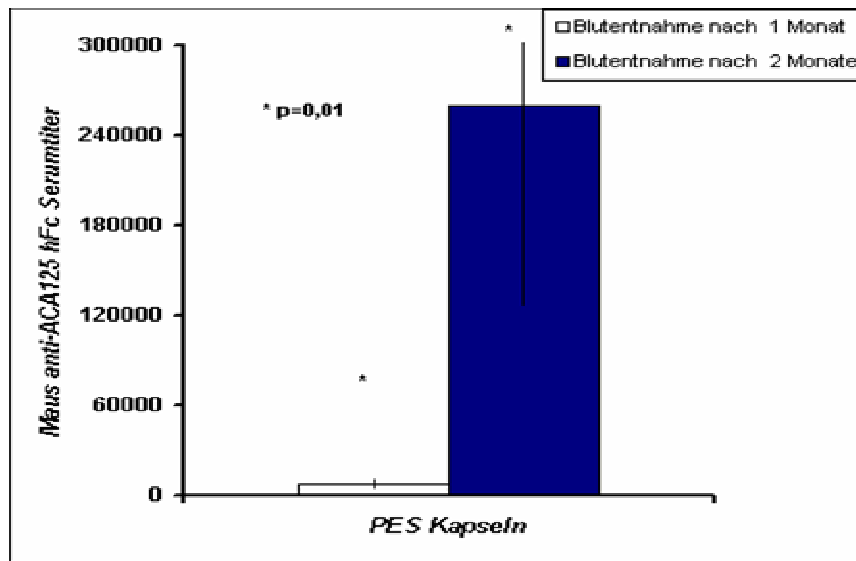


Abb. 9: Maus anti-ACA125hc Antikörpertiter (Mittelwerte) infolge der ACA125hFc Expression aus implantierten PES Kapseln

Dargestellt sind die Maus anti-human Fc spezifischen Antikörperlevel nach 1 bzw. 2 Monaten, die anhand ihrer Bindung an einem humanen polyklonalen IgG Antikörper ermittelt wurden

5.3.3. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort infolge einer konventionellen Immunisierung mit ACA125hFc anhand von anti-ACA125hFc Antikörpern

Die Immunisierung mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörper sollte darüber Aufschluss geben, inwiefern ein kontinuierliches endogenes ACA125hFc Freisetzungssystem in Form von verkapselten rekombinanten Zellen, die Immunogenität des anti-Idiotypen verbessern kann und wo die Vorteile gegenüber einer konventionellen Vakzinierung liegen. Der ACA125hFc Antikörper wurde im Vorfeld aus serumfreien C2C12 Kulturüberständen, wie unter Abschnitt 2.1 beschrieben, gewonnen. Nachfolgend wurde die Aufreinigung mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.2 und 5.1) auf Proteinkontaminationen überprüft, mit Wasser für Injektionszwecke auf die gewünschte Konzentration (13 µg/100 µl) verdünnt und sterilfiltriert. Pro Balb/c Maus wurde die Menge an ACA125hFc Antikörper injiziert (13 µg/Tier, s.c.), welche im Durchschnitt von 2 Kapseln *in vitro* über einen Zeitraum von 2 Monaten exprimiert wurde. Diese Antikörperkonzentration entsprach der Menge an ACA125hFc, die *theoretisch* von 2 Kapseln/ Tier über die Dauer des Tierversuches freigesetzt wurde. Um die Immunantwort des ACA125hFc Antikörpers zu verstärken wurde jedes Tier zusätzlich mit 100 µl CFA immunisiert. Als Negativkontrolle wurde(n) Block bzw. Seren eingesetzt, die von Mäusen stammen, welche mit aufgereinigten C2C12 wildtyp Überständen immunisiert worden waren. Zur statistischen Auswertbarkeit wurden pro Gruppe 5 Tiere eingesetzt.

Zwischen den anti-ACA125Fc Seruntiter nach 1 Monat bzw. nach 2 Monaten konnte im Falle der Immunisierung mit ACA125hFc kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,1$, Abb.10 bzw. Tabelle 4) beobachtet werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p<0,05$) im anti-ACA125hFc Seruntiter ergab sich allerdings beim direkten Vergleich der ACA125hFc-Vakzinierung (Titer: 1/51400) mit der PES- bzw. PVDF Implantation (Titer: 1/260000 bzw. 1/120000, nach 2 Monaten (Abb. 11)). Aus diesen *in vivo* Ergebnissen resultierte, dass durch die Immunisierung von Balb/c Mäuse mit je 13 μg aufgereinigten ACA125hFc Antikörper, kein signifikanter Anstieg des anti-ACA125hFc Antikörpertiters zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme festgestellt werden konnte. Allerdings war der anti-ACA125hFc Antikörpertiter infolge der Applikation von PES bzw. PVDF Implantaten nach 2 Monaten signifikant höher vergleichsweise zur konventionellen Vakzinierung mit ACA125hFc.

<i>Tiergruppe ACA125hFc Immunisierung</i>	<i>Maus anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach 1 Monat</i>	<i>anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach 2 Monaten</i>
Maus 1	2.000	100.000
Maus 2	1.000	100.000
Maus 3	5.000	5.000
Maus 4	2.000	2.000
Maus 5	20.000	50.000

Tabelle 4: Übersicht der anti-ACA125hFc Antikörpertiter nach Immunisierung mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörpern.

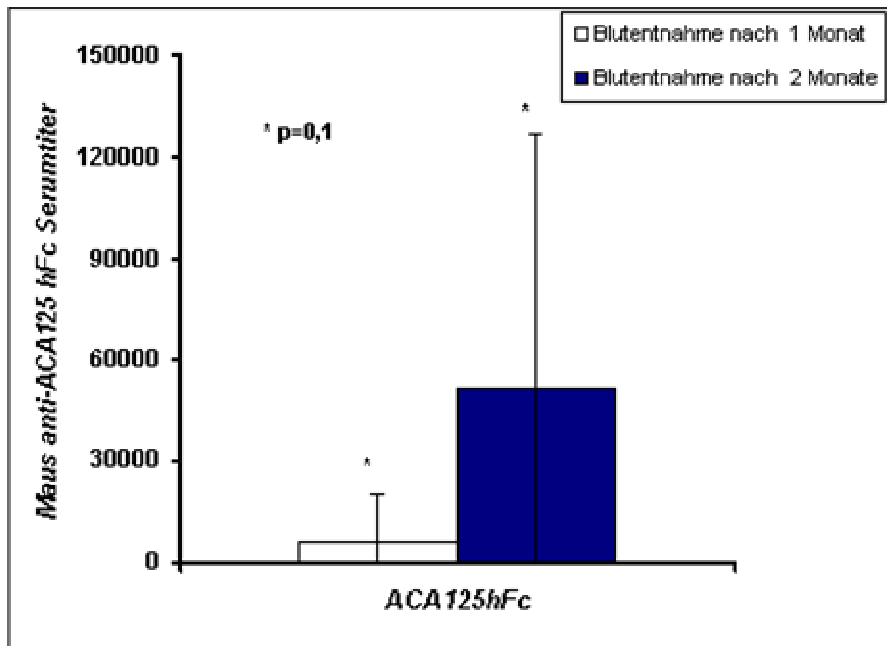


Abb. 10: Maus anti-ACA125hc Antikörpertiter (Mittelwerte) nach Immunisierung von Balb/c Mäusen mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörper (13 µg/Tier und 100 µl CFA/Tier).

Dargestellt sind die Maus anti-human Fc spezifischen Antikörperlevel nach 1 bzw. 2 Monaten, die anhand ihrer Bindung an einem humanen polyklonalen IgG Antikörper mittels ELISA ermittelt wurden.

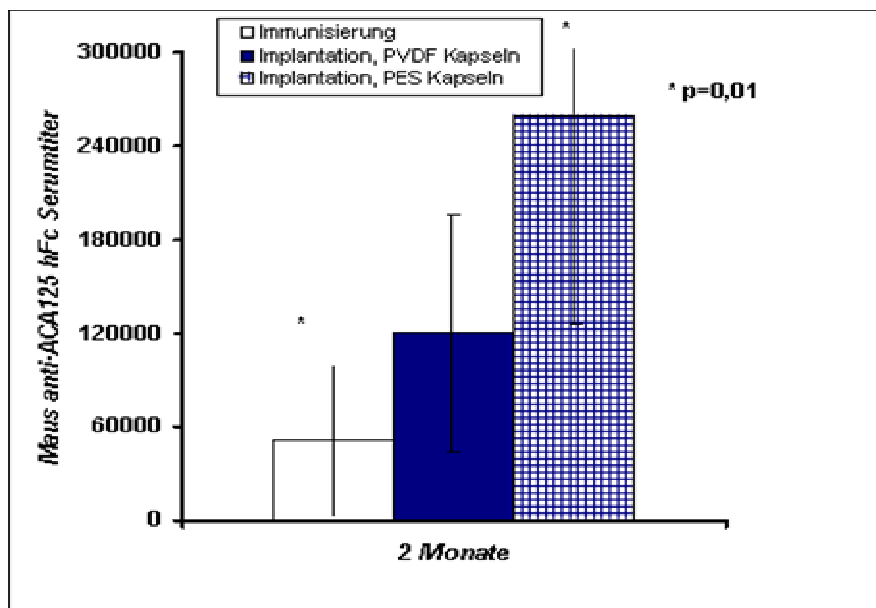


Abb. 11: Maus anti-ACA125hc Antikörpertiter (Mittelwerte) nach Immunisierung mit ACA125hFc Antikörper im direktem Vergleich mit den entsprechenden Serumtiter infolge der ACA125hFc Expression aus implantierten PVDF bzw. PES Kapseln.

Dargestellt sind die Maus anti-human Fc spezifischen Antikörperlevel nach 2 Monaten, die mittels ELISA (siehe 2.6.2) ermittelt wurden.

5.3.4. Die Untersuchung der *in vitro* Expression an ACA125hFc Antikörpern aus explantierten PVDF Hohlfasern

Die *in vitro* Sekretion des chimären ACA125hFc Antikörpers aus *explantierten* PVDF Kapseln wurde mittels ELISA Techniken auf die Bindung an dem murinen monoklonalen OC125 Antikörper untersucht. Die Explantation der Kapseln erfolgte nach 2 Monaten. Zu diesem Zweck wurden die Hohlfasern unmittelbar vor ihrer Implantation bzw. nach ihrer Explantation über 6 Tage in je 1ml RPMI%10 FCS kultiviert. Die Kulturüberstände wurden anschließend, wie unter Abschnitt 2.2.4 beschrieben, auf die Expression an ACA125hFc getestet. Um die Menge an Antikörpern zu quantifizieren, die eine Kapsel pro Tag freigesetzt hatte, wurde zusätzlich aufgereinigter ACA125hFc Antikörper als Standard eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten 6 Tage Zellkulturüberstände explantierter wildtyp PVDF Kapseln. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, ergab sich kein statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,3$) zwischen den ACA125hFc Expressionsraten aus PVDF Kapseln vor ihrer Implantation (361 ng/Tag) bzw. nach deren Explantation (388 ng/Tag). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Implantation von PVDF Hohlfasern (MWCO=500 KD, interne PET Membran) in Balb/c Mäuse keinen Einfluss auf die Sekretionsrate von ACA125hFc Antikörpern aus den verkapselten C2C12 Zellen genommen hatte. Die ACA125hFc Expression blieb Prä- bzw. Postimplantation unverändert.

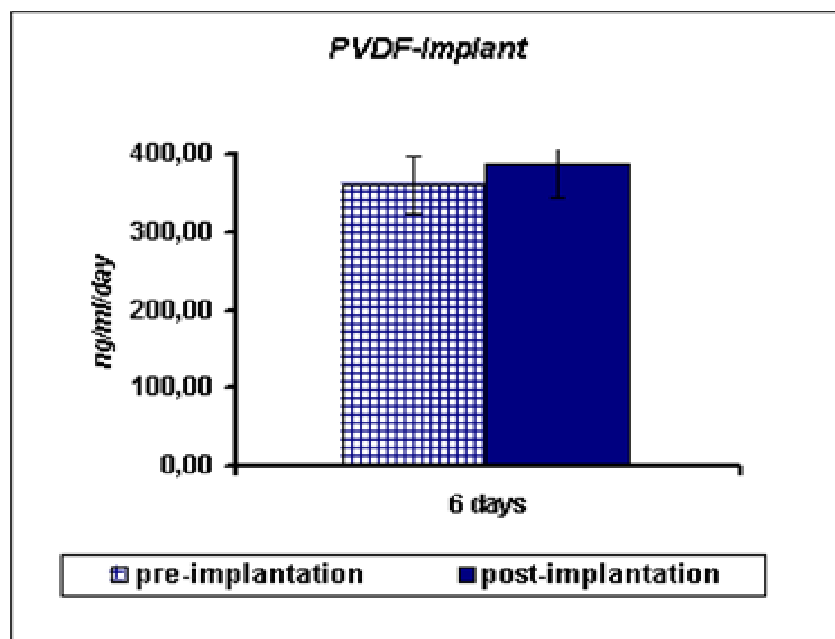


Abb. 12: ACA125hFc Expressionsraten (Mittelwerte) aus PVDF Kapseln mit PET (MWCO=500 KD), Prä- und Post-Implantation

5.3.5. Die Untersuchung der *in vitro* Expression an ACA125hFc aus explantierten PES Hohlfasern

Die *in vitro* Sekretion des chimären ACA125hFc Antikörpers aus *explantierten* PES Kapseln wurde wie oben beschrieben untersucht. Wie aus Abbildung 13 ersichtlich wird, führte die Implantation der PES Hohlfasern in Balb/c Mäuse innerhalb von 2 Monaten zu einer Abnahme der Sekretion an ACA125hFc um ca. 20 % ($p=0,01$). Die durchschnittliche *in vitro* Expressionsrate des ACA125hFc Antikörpers aus PES Kapseln betrug vor der Implantation einen Wert 347 ng/Tag bzw. nach der Explantation 291ng/Tag. Daraus resultierte, dass die Applikation von PES Implantate (MWCO=2000 KD) in Balb/c Mäuse zu einer verminderten ACA125hFc Sekretion geführt hatte.

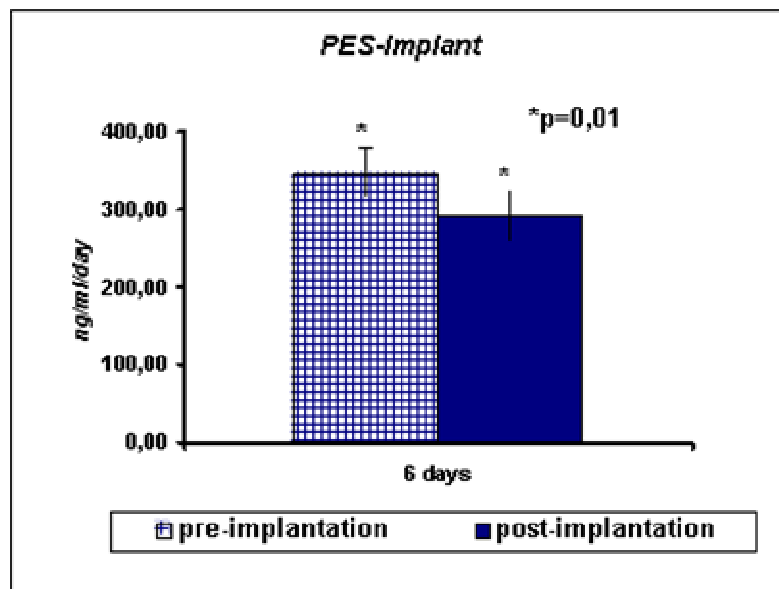


Abb. 13: Vergleich der ACA125hFc Expressionsraten (Mittelwerte) aus PES Kapseln mit PET (MWCO=2000 KD), Prä- und Post Implantation.

Die Kapseln wurden jeweils 6 Tage in je 1 ml RPMI/10% FCS *in vitro* kultiviert. Die Quantifizierung des ACA125hFc Antikörper aus Zellkulturüberständen erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

5.3.6. Histochemische Untersuchungen zur Überprüfung der Vitalität und Morphologie von explantierten verkapselten C2C12 Myoblasten

Die Explantation von Hohlfasern aus Balb/c Mäusen sollte darüber Aufschluss geben, inwiefern das verwendete allogene Tiermodell einen Einfluss auf die Vitalität und Morphologie von verkapselten C2C12 Zellen genommen hatte. Gleichzeitig sollte so die histopathologische Reaktion des umliegenden Gewebes auf das Implantat untersucht

werden. Wie in Abb. 14 dargestellt, konnten neugebildete Blutgefäße in unmittelbarer Nähe der s.c. Implantate lokalisiert werden. Durch die Neovaskularisation wurde wahrscheinlich die Versorgung der Kapseln mit Nährstoffen sowie der Abtransport von ACA125hFc Antikörpern, Methaboliten usw. gewährleistet. Eine Aussage über die Vitalität und Morphologie von verkapselten C2C12 Zellen konnte nach deren Einbettung in einem Methacrylat-Kunststoff getroffen werden. Von den Kapseln wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mittels Richardson Reagenz angefärbt, sodass Zytoplasma (hellblau) und Zellkerne (dunkelblau) sichtbar gemacht werden konnten. Nach Explantation der Kapseln zeigte sich intraluminal eine dichte vitale Myoblasten Zellpopulation, die sich entlang der gesamten Hohlfaser erstreckte. Dichte Zelldebris wurden nicht beobachtet.

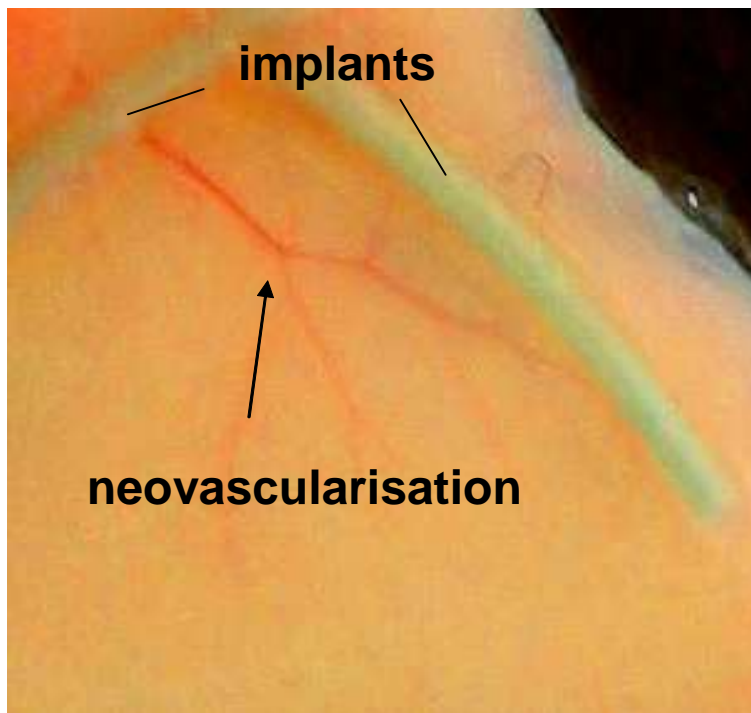


Abb. 14: Dargestellt ist die Neovaskularisation von 2 Kapseln, infolge der s.c. Implantation in Balb/c Mäuse. Die neu gebildeten Blutgefäße ermöglichten wahrscheinlich den Austausch von Nährstoffen, O₂, ACA125hFc Antikörper usw. zwischen Implantate und Umgebung.

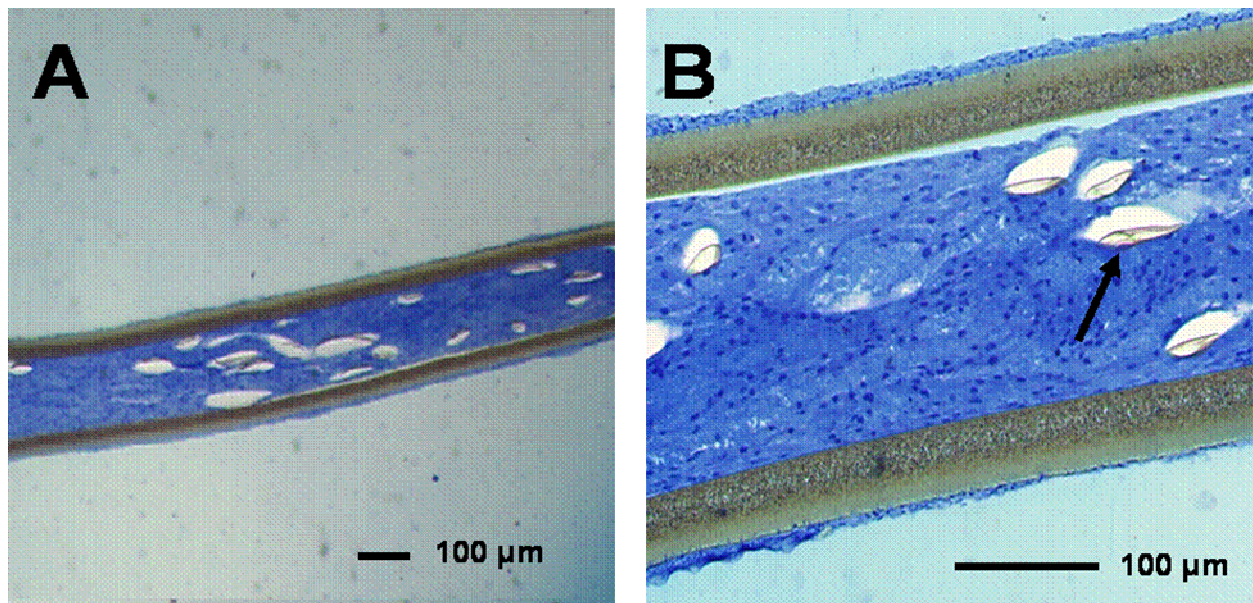


Abb. 15: Longitudinal-Schnitte durch eine PES Kapsel befüllt mit C2C12 Zellen unmittelbar nach ihrer Explantation aus Balbc Mäusen

A) 1: 10 Vergrößerung, **B)** 1:40 Vergrößerung

Pfeil: innere Membran aus PET

5.3.7. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort von PVDF Implantaten anhand von CA125 spezifischen T-Lymphozyten

Die Induktion von CA125-spezifischen T-Zellen mit nachfolgender Tumorzelllyse ist das Ziel einer effektiven Immuntherapie des Ovarialkarzinoms. Da der anti-Idiotyp ACA125hFc das Tumor Antigen CA125 funktionell imitiert, kann es im Verlauf einer Immunantwort auch zur Induktion von CA125 spezifischen Lymphozyten kommen. Die Induktion einer zellulären Immunantwort infolge der kontinuierlichen endogenen Freisetzung des ACA125hFc Antikörpers aus PVDF Implantaten wurde anhand von CA125 spezifischen Lymphozyten (Th1 Helferzellen und zytotoxische CTLs) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Lymphozytenquelle dienten Balb/c-Milzen, die wie unter 2.5.8 und 2.6.4 beschrieben, präpariert wurden. Anschließend wurden CA125 spezifische Lymphozyten *ex vivo* mit CA125 Tumor Antigen (siehe 4.2) restimuliert und nachfolgend anhand ihrer CD69 Expression bzw. intrazellulären $\text{INF}\gamma$ Sekretion quantitativ erfasst. Da aktivierte CA125 spezifische CD4^+ Th1-Helferzellen bzw. zytotoxische CD8^+ CTL-Zellen teilweise unterschiedliche Oberflächenproteine besitzen [Th1-Zellen sind $\text{CD69}/\text{CD4}/\text{INF}\gamma$ positiv; CTL-Zellen sind $\text{CD69}/\text{CD8}/\text{INF}\gamma$ positiv], konnten sie via FACS-Analyse getrennt voneinander detektiert werden. Eine Aussage über die Induktion einer CA125 spezifischen Immunantwort, konnte sowohl über die intrazelluläre Synthese von Zytokinen (z.B. $\text{INF}\gamma$), als auch über die Expression von Oberflächenaktivierungsmarkern (z.B. CD69) gemacht werden.

Als Negativkontrolle wurden Milzzellen eingesetzt, welche von Tieren stammen, denen im Vorfeld C2C12 wildtyp PVDF Implantate appliziert worden waren.

Nach einer spezifischen in vitro Stimulation der Splenozyten mit CA125 konnten sowohl CA125 spezifische CTL- als auch Th1 Zellen detektiert werden (siehe Tabelle 5). Nur doppelpositive Lymphozyten (CD69+INF γ +) wurden (abzüglich der Isotypenkontrolle) als CA125-spezifisch bewertet (siehe Abb. 18 a-d, Quadrant oben rechts). Einfach positive CD69+ Lymphozyten (abzüglich der Isotypenkontrolle) galten als CA125-aktiviert. Wie in Abb. 16 dargestellt, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Anzahl von CA125 spezifischen CTL-Zellen bezüglich Th1-Zellen festgestellt werden. Dabei lag der Anteil von CA125 spezifischen doppelpositiven (CD69+INF γ +) Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation im Falle von Th1-Zellen (CD4+) durchschnittlich bei 0,24% bzw. bei CTL-Zellen (CD8+) bei 0,71%. Zwischen den CA125-aktivierten Th1-Zellen (CD69+CD4+) und CTL-Zellen (CD69+CD8+) gab es anzahlmäßig allerdings keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,4$) (Tabelle 5 und Abb 17).

<i>Tiergruppe mit ACA125hFc-C2C12 PVDF-Implantate</i>	<i>CTL (CD8+) CD69+/INFγ+ [%]</i>	<i>Th1 (CD4+) CD69+/INFγ+ [%]</i>	<i>CTL (CD8+) CD69+ [%]</i>	<i>Th1 (CD4+) CD69+ [%]</i>
Maus 1	0,24	0,05	34,49	13,02
Maus 2	0,71	0,24	14,23	7,18
Maus 3	1,07	0,31	9,15	6,17
Maus 4	0,58	0,28	5,37	8,24
Maus 5	0,95	0,33	3,37	7,69

Tabelle 5: Übersicht des prozentuellen Anteils von CA125 spezifischen Th1 (CD4+) bzw. CTL (CD8+) Zellen an der gesamten Splenozytenpopulation, infolge der ACA125hFc Expression aus implantierten PVDF Kapseln

Nur doppelpositive CD69+INF γ + Lymphozyten wurden als CA125 spezifisch bewertet. Einfach CD69 positive Lymphozyten galten als CA125-aktiviert.

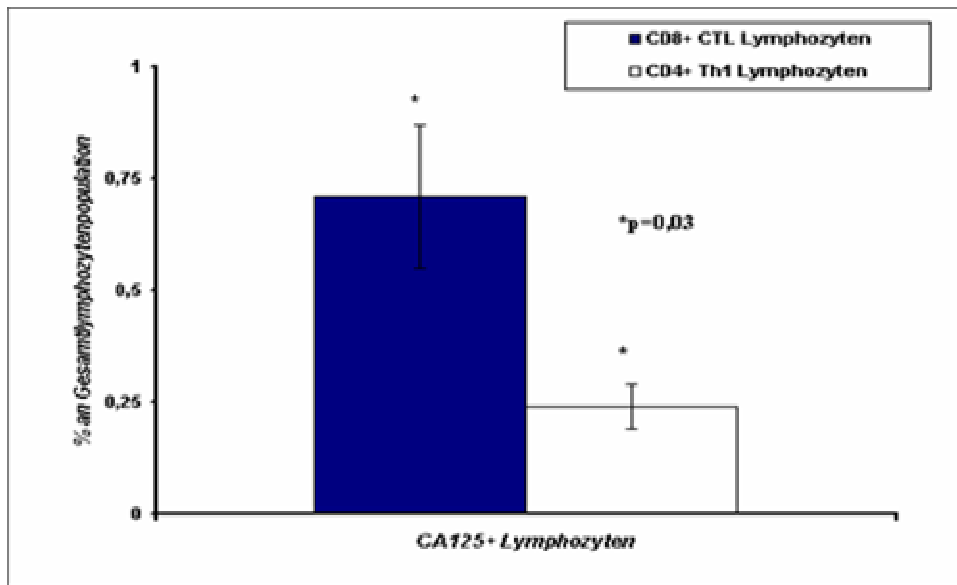


Abb. 16: Anteil der CA125 spezifischen (CA125+) T-Zellen (Mittelwert) an der Gesamlymphozytenpopulation, infolge der Expression von ACA125hFc aus implantierten PVDF-C2C12 Kapseln.

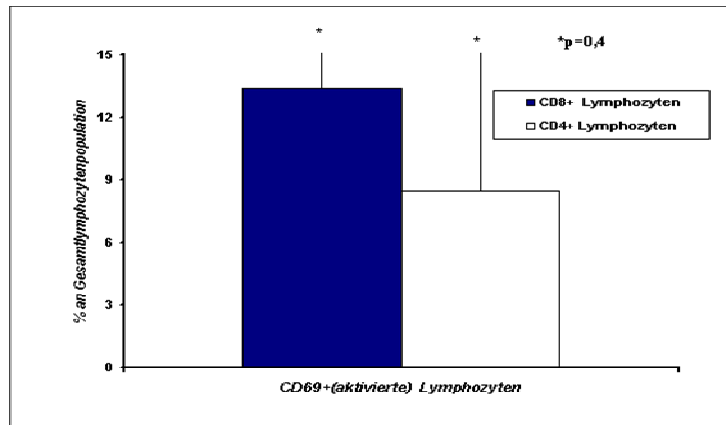


Abb. 17: Anteil der aktivierten CD4+CD69+ Helferzellen (Th1) bzw. CD8+CD69+ Zytotoxischen T-Zellen (CTL) (Mittelwert) an der Gesamtlymphozytenpopulation, infolge der *in vitro* Stimulierung von Splenozyten mit CA125

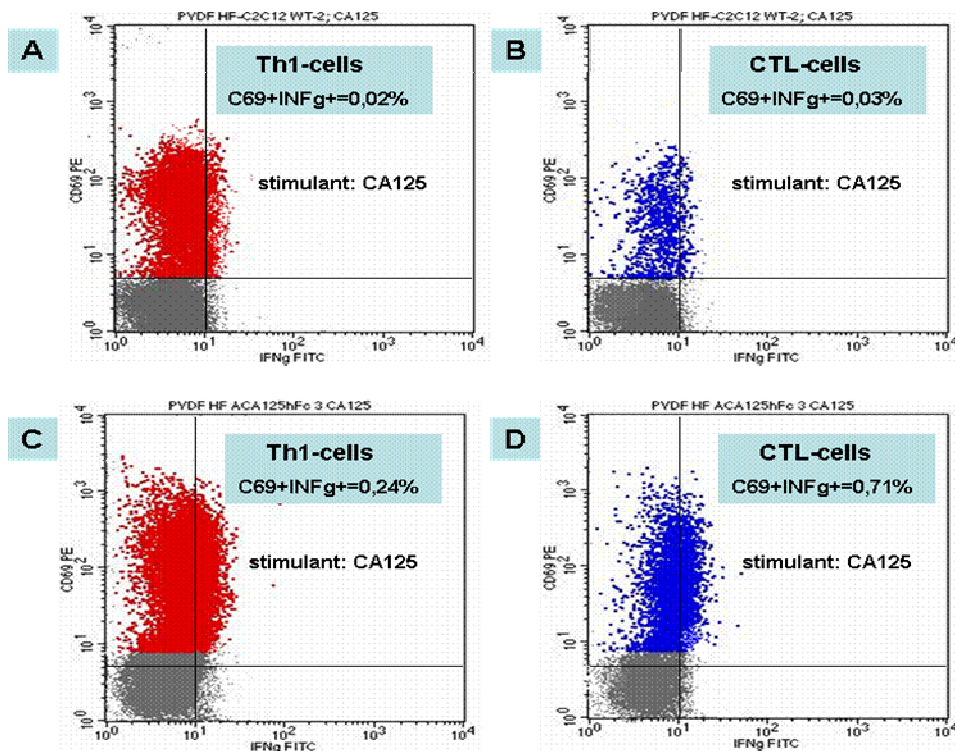


Abb. 18: Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung von CA125 spezifischen Th1 bzw. CTL T-Zellen, nach *in vitro* Stimulation von Splenozyten mit CA125.

Auf der X Achse sind die IFN γ +/- bzw. auf der y-Achse die CD69+ Lymphozyten aufgetragen. Dargestellt ist anhand eines repräsentativen Beispiels der Anteil [%] an doppelpositiven (CD69+IFN γ +) CA125 spezifischen Th1 (A und C) bzw. CTL Zellen (B und D) an der Gesamtsplenozytenzytenpopulation (siehe Quadrant oben rechts). Als Lymphozytenquelle dienten Mäuse denen über einen Zeitraum von 2 Monaten: A, B: C2C12 wildtyp-PVDF Implantate; C, D: C2C12-ACA125-PVDF appliziert worden waren.

5.3.8. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort von PES Implantaten anhand von CA125 spezifischen T-Lymphozyten

Die Untersuchung der zellulären Immunantwort von PES Kapseln wurde wie unter 5.3.7 beschrieben durchgeführt. Nach der spezifischen in vitro Stimulation der Splenozyten mit CA125 konnten sowohl CA125 spezifische CTL- als auch Th1 Zellen detektiert werden, (siehe Tabelle 6). Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich dabei in der Anzahl der CA125 spezifischen CTL bezüglich Th1-Zellen (Tabelle 6). Der Anteil von CA125 spezifischen doppelpositiven (CD69+INF γ +) Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation lag durchschnittlich bei 0,66 im Falle von CTL-Zellen (CD8+) und bei 0,34 im Falle von Th1-Zellen (CD4+) (Abb.19). Zwischen den CA125-aktivierten Th1-Zellen (CD69+CD4+) und CTL-Zellen (CD69+CD8+) gab es anzahlmäßig allerdings keinen signifikanten Unterschied (p=0,35) (Tabelle 6 und Abb. 20).

<i>Tiergruppe mit ACA125hFc-C2C12 PES-Implantate</i>	<i>CTL (CD8+) CD69+/INFγ+ [%]</i>	<i>Th1 (CD4+) CD69+/INFγ+ [%]</i>	<i>CTL (CD8+) CD69+ [%]</i>	<i>Th1 (CD4+) CD69+ [%]</i>
Maus 1	1,01	0,36	3,51	7,74
Maus 2	0,15	0,06	34,12	14,01
Maus 3	0,31	0,69	6,02	9,21
Maus 4	1,03	0,31	9,15	5,17
Maus 5	0,79	0,27	14,56	7,19

Tabelle 6: Übersicht des prozentuellen Anteils von CA125 spezifischen T Zellen an der gesamten Splenozytenpopulation, infolge der ACA125hFc Expression aus implantierten PES-Kapseln.

Nur Doppelpositive CD69+INF γ + CTL-Zellen (CD8+) bzw. Th1-Helferzellen (CD4+) wurden als CA125 spezifisch bewertet. Einfach CD69 positive Lymphozyten galten als CA125-aktiviert.

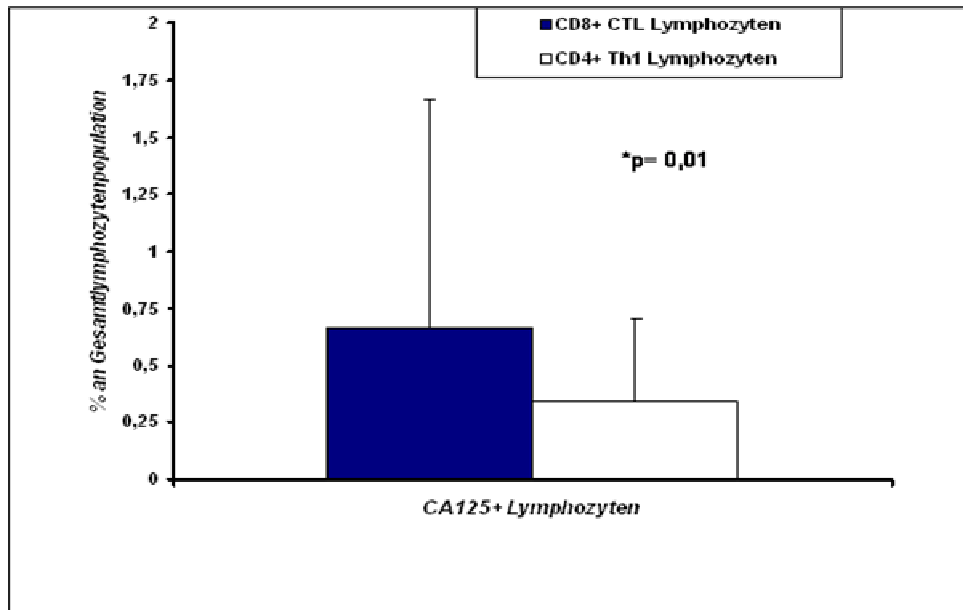


Abb. 19: Anteil der CA125 spezifischen (CA125+) T-Zellen (Mittelwert) an der Gesamtlymphozytenpopulation, infolge der Expression von ACA125hFc aus implantierten PES- Kapseln.

Die CA125+-Th1 (CD4+) Helferzellen bzw. -CTL (CD8+) zytotoxischen Zellen wurden mit CA125 Tumor Antigen *in vitro* restimuliert, mit anti-Maus Fluoreszenzantikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie detektiert.

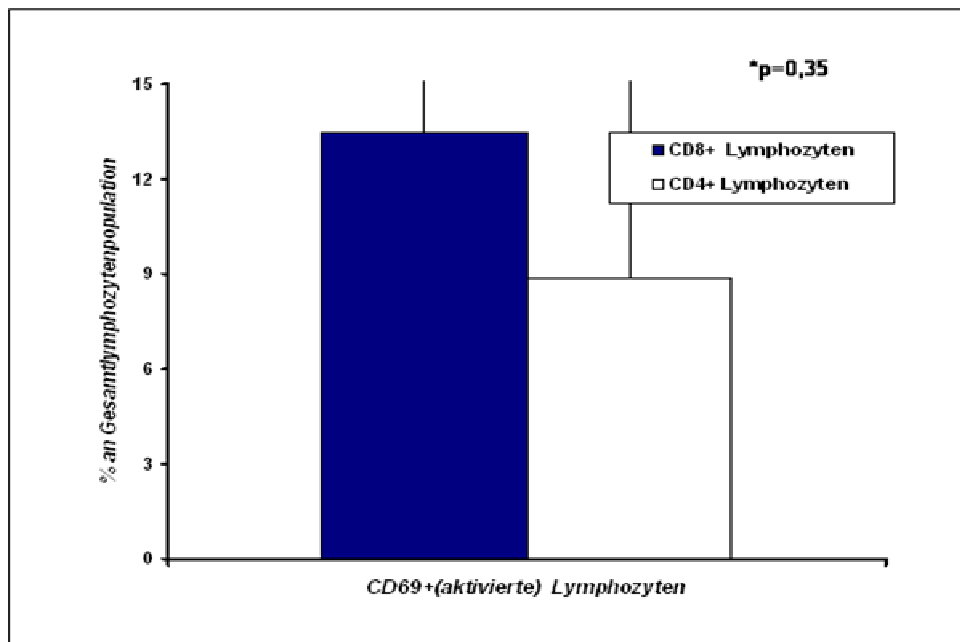


Abb. 20 : Anteil der aktivierten CD4+CD69+ Helferzellen (Th1) bzw. CD8+CD69+ Zytotoxischen T-Zellen(CTL) (Mittelwert) an der Gesamtlymphozytenpopulation, infolge der *in vitro* Stimulation mit CA125.

Als Lymphozytenquelle dienten Balb/cMäuse, denen über einen Zeitraum von 2 Monaten ACA125hFc-PES Implantate appliziert worden waren.

5.3.9. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort infolge einer konventionellen Immunisierung mit aufgereinigtem ACA125hFc anhand von CA125 spezifischen T-Lymphozyten

Die Vakzinierung von Balb/c Mäusen mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörper sollte unter anderem darüber Aufschluss geben, inwiefern eine kontinuierliche endogene Freisetzung von ACA125hFc aus Implantaten, die Immunogenität des anti-Idiotypen auch auf zellulärer Ebene verbessern kann und wo überhaupt die Vorteile gegenüber einer konventionellen Immunisierung liegen. Die Induktion der zellulären Immunantwort infolge der Immunisierung mit 13 µg aufgereinigten ACA125hFc Antikörpers wurde ebenfalls anhand von CA125 spezifischen Th1 bzw. CTL Lymphozyten, mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe oben). Als Negativkontrolle wurden Milzzellen eingesetzt, welche von Mäusen stammen, die mit aufgereinigten C2C12 wildtyp Überständen immunisiert worden waren. Zur statistischen Auswertbarkeit wurden pro Gruppe 5 Tiere eingesetzt.

<i>Tiergruppe immunisiert mit aufgereinigtem:</i>	<i>CTL (CD8+) CD69+/INFγ+ [%]</i>	<i>Th1 (CD4+) CD69+/INFγ+ [%]</i>	<i>CTL (CD8+) CD69+ [%]</i>	<i>Th1 (CD4+) CD69+ [%]</i>
ACA125hFc-C2C12	0,03	0,04	3	5
Wildtyp-C2C12	0,02	0,03	3	6

Tabelle 7: Prozentueller Anteil von CA125 spezifischen T Zellen (Mittelwert) an der gesamten Splenozystenpopulation, infolge der Vakzinierung von Balb/c Mäusen mit aufgereinigtem C2C12-ACA125hFc bzw. C2C12-Wildtyp Überstand.

Doppeltpositive Lymphozyten (CD69+INFγ+) wurden (abzüglich der Isotypenkontrolle) als CA125-spezifisch, einfach positive CD69+ Lymphozyten (abzüglich der Isotypenkontrolle) als CA125-aktiviert definiert. Die unspezifische Stimulation von Lymphozyten mit einem Mitogen (PHA) wurde als Positivkontrolle für die T-Zell Aktivierung eingesetzt (siehe Abb. 21 E und F).

Nach der spezifischen in vitro Stimulation von Splenozysten mit CA125 konnten keine CA125 spezifische CTL- bzw. Th1 Zellen detektiert werden (siehe Tabelle 7 bzw. Abb. 21). Wie aus Abb. 21 ersichtlich, ergab sich kein Unterschied zwischen Lymphozyten die mit CA125 (Abb

21 C und D) bzw. ohne Stimulus (Abb. 21 A und B) *in vitro* kultiviert wurden. Aus diesen Ergebnissen resultierte, dass im Gegensatz zur kontinuierlichen endogenen Freisetzung von ACA125 aus Implantaten, durch die Vakzinierung von Balb/c Mäusen mit je 13 µg aufgereinigtem ACA125hFc und 100 µl Adjuvants (CFA) keine CA125 spezifische Immunantwort auf zellulärer Ebene erzeugt werden konnte.

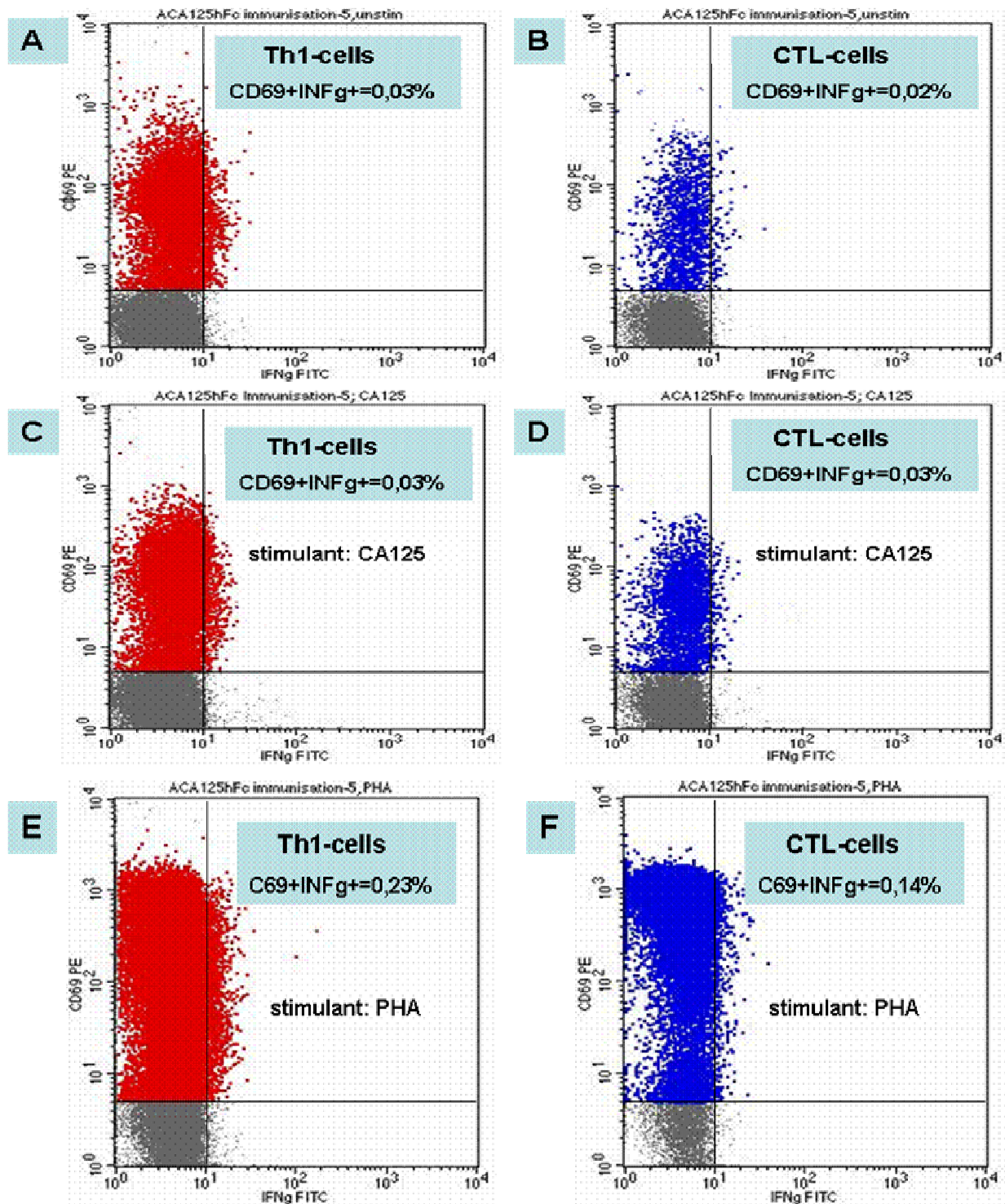


Abb. 21: Bestimmung von CA125 spezifischen Th1 bzw. CTL T-Zellen

(A, B): keine Stimulation; (C, D): spezifische Stimulation mit CA125; (E, F): unspezifische Stimulation mit PHA. Auf der X Achse sind die IFN- γ + bzw. auf der y-Achse die CD69+ Lymphozyten aufgetragen. Dargestellt ist anhand eines repräsentativen Beispiels der Anteil [%] an doppelpositiven (CD69+IFN- γ +) CA125 spezifischen Th1 (A, C, E) bzw. CTL Zellen (B, D, F) an der Gesamtsplenozytenpopulation (siehe Quadrant oben rechts). Als Lymphozytenquelle dienen Mäuse die mit 13 μ g aufgereinigter ACA125hFc vakziniert wurden.

6. Diskussion

6.1. Herstellung eines kontinuierlichen endogenen Makrokapsel-Freisetzungssystems zur Verbesserung der Immunogenität des anti-Idiotypen ACA125hFc

Das gemeinsame Ziel unterschiedlichster immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht in der Induktion einer möglichst dauerhaften tumor-spezifischen Immunantwort. Im Falle des anti-Idiotypen Vakzins Abagovomab sind aufgrund der eingeschränkten Immunogenität zur Erhaltung einer spezifischen Immunantwort Mehrfachapplikationen erforderlich (Wagner et al. 2001). Abagovomab ist ein muriner monoklonaler anti-idiotypischer Antikörper der das Tumor Antigen CA125 funktionell imitiert und aktuell in einer internationalen Phase II/III Studie (MIMOSA/AGO-Ovar10) in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms eingesetzt wird. Bereits mehrere klinische Studien ergaben in der Vergangenheit deutliche Hinweise auf die therapeutische Wirksamkeit von Abagovomab mit verbesserten klinischen Ansprechraten sowie verlängerten Überlebenszeiten (Köhler et al. 1998, Wagner et al. 2001, Reinartz et al. 2004).

Mit dem Ziel die Immunogenität des murinen anti-Idiotypen Abagovomab zu verbessern wurde in Rahmen von Vorarbeiten der humanisierte Abagovomab Abkömmling ACA125hFc hergestellt (Schlebusch et al. 1994, Reinartz et al. 2000, Hann et al. 2005). Durch den Wegfall der murinen konstanten Fc Regionen, soll so die Induktion unspezifischer anti-allo- und anti-isotypischer Antikörper verhindert werden, welche infolge der Immunisierung mit dem murinen Antikörper Abagovomab auftreten und die spezifische anti-tumorale Immunantwort teilweise überlagern (Wagner et al. 2001).

Die Ausbildung einer *langanhaltenden* immunologischen Gedächtnisreaktion könnte möglicherweise über eine kontinuierliche endogene Antigen Exposition erreicht werden (Ochsenbein et al. 2000). Deshalb wurde im Rahmen der obigen Vorarbeit (Hann 2005) ein *in vitro* Freisetzungssystem für den anti-Idiotypen ACA12hFc mittels Bioverkapselungstechnologien hergestellt, mit dem Ziel über eine kontinuierliche Antikörper Freisetzung eine *dauerhafte* spezifische Immunantwort gegen das Tumor Antigen CA125 zu induzieren (Hann et al. 2005). Das Prinzip der Bioverkapselung beruht auf der Immunisation non-autologer Zellen mittels einer semipermeablen Membran, welche als immunologische Schutzbarriere fungiert und so im Gegensatz zu herkömmlichen Transplantationsmethoden

auch ohne Immunsuppression funktioniert (siehe Abschnitt 1.4). Zu diesem Zweck wurden murine rekombinante C2C12 Zellen in dafür eigens hergestellte Makrokapseln eingefügt, *in vitro* kultiviert und auf die ACA125hFc Antikörper Sekretion überprüft. Dabei erwiesen sich beide getesteten Kapseltypen (PES vs. PVDF) bis zu Versuchsende (=1 Jahr) als geeignete Langzeitfreisetzungssysteme für ACA12hFc Antikörpern. Es ist durchaus denkbar, dass ein solches Depotimplantat über eine kontinuierliche endogene Antikörper Persistenz dessen Immunogenität verbessert und so zu einer dauerhaften Tumorantwort gegen CA125 positive Ovarialkarzinome führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand eines non-autologen Mausmodells überprüft, inwiefern das *in vitro* generierte Biokapselsystem für ACA125hFc (Hann et al. 2005), einen Vorteil gegenüber der herkömmlichen Applikation des aufgereinigten Antikörpers zeigt und somit in der Lage ist die Immunogenität von anti-Idiotypen zu steigern. Zu diesem Zweck wurden rekombinante C2C12 Myoblasten in zwei chemisch unterschiedlichen Kapseltypen eingebettet (PES bzw. PVDF) mit dem Hintergrund auch mögliche Unverträglichkeiten durch den Einsatz von z.B. verschiedenen Materialien im Tierversuch erfassen zu können. Anschließend erfolgte die Implantation der Biokapseln in ein allogenes Mausmodell (Balb/c), wobei die humorale Immunität mittels ELISA Techniken bzw. die zelluläre Immunantwort mittels Durchflußzytometrie untersucht wurde. Als Vergleichskontrolle diente ein Mauskollektiv, das nach herkömmlichen Vakzinierungsprotokollen mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörper immunisiert wurde.

6.2. Die *in vitro* Herstellung der verkapselten rekombinanten C2C12 Zellen für die Tierversuche

Aus den Ergebnissen der *in vitro* Vorarbeit (Hann 2005) resultierte, dass die zwei chemisch (PES bzw. PVDF) bzw. physikalisch (Porendurchmesser: 2000 KD bzw. 500 KD) unterschiedlichen Kapseltypen, nur dann beide die Voraussetzungen für ein kontinuierliches *in vitro* ACA125hFc-Freisetzungssystem erfüllten, wenn sie mit einer internen PET-Matrix versehen waren. Das in die Kapsel inserierte Substrat aus PET imitierte dabei die extrazelluläre Matrix von C2C12 Myoblasten und sorgte für eine verbesserte Zellvitalität und führte somit zu den höchstmöglichen ACA125hFc Expressionsraten. Inwiefern die chemische Zusammensetzung (PES vs. PVDF) bzw. die physikalischen Eigenschaften (Porengröße: 2000 KD vs. 500 KD)) der implantierten Kapseln eine tragende Rolle in einer möglichen

Abstoßungsreaktion spielen könnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von zwei unterschiedlichen Kapseltypen untersucht:

- 1) PES (Porengröße: 2000 KD) mit einer internen PET Matrix
- 2) PVDF Kapseln (Porengröße: 500 KD) mit einer internen PET Matrix

Zu diesem Zweck wurden rekombinante ACA125hFc-C2C12 Zellen, wie von Hann 2005 beschrieben, in das Lumen der zwei unterschiedlich zusammengesetzten Hohlfasern injiziert, zu einer dichten Einheit verpackt und in ein Zellkultur Medium ca. einen Monat kultiviert, bis beide Kapseltypen gleiche ACA125hFc Antikörper Mengen sezernierten. Um unspezifische Immunreaktionen durch das FCS haltige Kulturmedium zu vermeiden, wurden die Kapseln zu diesem Zweck vor der Implantation für einen Tag in ein serumfreies Medium überführt.

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass beide Kapseltypen sowohl konstante, kontinuierliche als auch gleiche Antikörpermengen ins Kulturmedium sezernierten. Aus diesem Grund wurden sie für biologisch gleichwertig befunden und deshalb auch beide als ACA125hFc Freisetzungssysteme für die nachfolgenden Tierversuche eingesetzt.

6.3. Die in vitro Herstellung einer ACA125hFc Antikörper Aufreinigung für die konventionelle Immunisierung mit anti-Idiotypen

Um die immunologische Effektivität der ACA125hFc sezernierenden Biokapseln im Mausmodell zu analysieren wurde hierbei eine herkömmliche ACA125hFc anti-Idiotypen Vakzinierung als Standardvergleich herangezogen. Aus diesem Grund wurde eine dafür geeignete ACA12hFc Aufbereitung hergestellt.

Die Aufreinigung des ACA125hFc Fragmentes erfolgte mit Hilfe einer Protein G Affinitätschromatographie über die selektive Anbindung des humanen IgG Fragmentes aus dem chimären Antikörper an die Säule. Anhand von SDS-PAGE Analysen konnte gezeigt werden, dass der chimäre ACA125hFc anti-Idiotyp als 150 KB großer Dimer exprimiert wurde (Hann et al. 2005). Dabei konnten keine Proteinkontaminationen nachgewiesen werden, sodass dadurch hervorgerufene unspezifische Immunreaktionen in den nachfolgenden Tierversuchen nicht zu befürchten waren. Somit erfüllte die ACA125hFc Aufreinigung die geeigneten Kriterien um als Impfstoff in den nachfolgenden Tierversuchen eingesetzt zu werden.

6.4. Die Untersuchung der Immunogenität des ACA125hFc Antikörper-Freisetzungssystems im Balb/c Mausmodell, anhand der humoralen Immunantwort

In einem allogenen Tiermodell (Balb/c Mäuse) wurde zum einen die Verträglichkeit, die Langzeitexpression und -vitalität der verkapselten ACA125hFc-produzierenden C2C12 Zellen nach Implantation untersucht, zum anderen wurde die immunologische Wirksamkeit der Biokapseln anhand der induzierten humoralen und zellulären Immunantworten evaluiert. Dabei wurde der Balb/c Mausstamm eingesetzt, welcher bezüglich Maus-C2C12-Zellkapsel-Implantate (C2C12-Zellen aus Mausstamm C3H) einen allogenen Empfänger darstellte. Die semipermeable Kapselmembran erfüllte dabei eine doppelte Rolle: zum einen bot sie dem Implantat physikalischen Schutz vor einer Abstoßreaktion, zum anderen ermöglichte sie den Austausch von ACA125hFc Antikörpern, Nährstoffe usw. zwischen Implantat und Blutbahn.

Mit Hilfe zweier Kapseltypen, bei denen *in vitro* vergleichbar hohe Sekretionsraten des ACA125hFc nachgewiesen werden konnten, wurde untersucht, inwiefern der immunologische Schutz für die verkapselten Zellen nach Implantation bestehen bleibt, wenn Materialeigenschaften wie Porengröße (500 KD vs. 2000 KD) oder chemische Zusammensetzung (PVDF vs. PES) der Implantate verändert werden. Da bei vorangegangenen *in vitro* Vorversuchen (siehe Hann 2005, Hann et al. 2005) Kapseln die eine PET Matrix beinhalteten, die höchsten ACA125hFc Expressionsraten aufwiesen, wurde dementsprechend jedes Implantat mit einer solchen Polymere membran versehen. Zu diesem Zweck wurden PVDF bzw. PES Kapseln mit einer internen PET-Matrix verwendet.

Beide Zell-Kapseltypen wurden zunächst solange *in vitro* kultiviert, bis eine maximale Sekretionsrate des ACA125hFc erreicht worden war. Pro Tier wurden je zwei Kapseln gleichen Typs dorsal subkutan implantiert. Als Negativkontrollen wurden PES- und PVDF-Kapseln mit untransfizierten C2C12 Zellen implantiert.

Die Kontrollimmunisierung mit aufgereinigtem ACA125hFc Antikörper gab darüber Aufschluss, inwiefern ein kontinuierliches endogenes ACA125hFc Freisetzungssystem die Immunogenität des anti-Idiotyps verbessern kann und wo die Vorteile gegenüber einer konventionellen Vakzinierung liegen. Zu diesem Zweck erfolgte die subcutane Applikation der gleichen Menge an ACA125hFc Antikörper, welche über den Versuchszeitraum (2

Monate) durchschnittlich von 2 Kapseln *in vitro* exprimiert wurde. Dadurch wurde ein Vergleich zwischen konventioneller Vakzinierung und kontinuierlicher endogenen Sekretion möglich, wobei letztendlich die gleiche ACA125hFc Antikörpermenge in jedes Tier gelangte.

Die Induktion von spezifischen Antikörpern gegen ACA125hFc infolge ihrer kontinuierlichen endogenen Freisetzung aus PVDF- und PES-Implantaten bzw. der Grundimmunisierung mit der Aufreinigung wurde im Serum der behandelten Mäuse untersucht. Dabei wurde die Induktion von Antikörpern gegen den xenogenen humanen Fc-Teil des ACA125hFc Antikörpers mittels ELISA Techniken überprüft. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit humanen IgG beschichtet, mit Serum der behandelten Mäuse inkubiert und die Bildung von Immunkomplexen mit einem POD-markierten anti-Maus IgG (human Fc-spezifisch) Antikörper detektiert.

Bereits einen Monat nach Implantation von ACA125hFc produzierenden PES- bzw. PVDF-Kapseln wurden ACA125hFc spezifische Antikörpern nachgewiesen, welche gegen den xenogenen humanen Fc-Teil gerichtet sind. Dabei war zu diesem Zeitpunkt noch kein signifikanter Unterschied im Antikörpertiter zwischen Kapselimplantation und konventioneller Immunisierung festzustellen.

Nach zwei Monaten war hingegen ein deutlicher Anstieg der anti-human Fc-spezifischen Antikörpern nur in den transplantierten Tieren zu beobachten. Dabei induzierten PES Implantate, wahrscheinlich aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung bzw. der weiteren Membranporen eine effektivere humorale Immunität als die PVDF-Kapseln.

Erwartungsgemäß konnten ACA125hFc-spezifische Antikörpern nicht durch verkapselte wild-type C2C12-Zellen induziert werden (Negativkontrollgruppen).

Basierend auf diesen Ergebnissen bleibt festzustellen, dass infolge der endogenen Freisetzung von ACA125hFc Antikörpern aus verkapselten C2C12 Myoblasten eine ACA125hFc spezifische Immunantwort möglich war, wobei der signifikante Anstieg des Seruntiters über zwei Monate wahrscheinlich auf die kontinuierliche *in vivo* Sekretion des Antikörpers aus den Implantaten zurückzuführen war.

Obwohl durch konventionelle Immunisierung mit ACA125hFc ebenfalls spezifische Antikörperantworten im Tier induziert werden können, so zeigte sich doch, dass die erhoffte Depotwirkung der PES-Kapseln in Form einer endogenen Langzeitproduktion der Vakzine

eine signifikante Verbesserung der humoralen Immunantwort gegenüber einer herkömmlichen anti-Idiotypen Vakzinierung darstellt.

6.5. Die Untersuchung der Immunogenität des ACA125hFc-Antikörper-Freisetzungssystems im Balb/c Mausmodell, anhand der CA125 spezifischen zellulären Immunantwort

Die Induktion von CA125-spezifischen T-Zellen mit nachfolgender Tumorzelllyse ist das Ziel einer effektiven Immuntherapie beim Ovarialkarzinom. Da der anti-Idiotyp ACA125hFc das Tumor Antigen CA125 funktionell imitiert, kann es im Verlauf einer Immunantwort auch zur Induktion von CA125 spezifischen Lymphozyten kommen. Der Nachweis einer T-Zellstimulation nach Vakzinapplikation stellt ein wichtiges Kriterium für die Effektivität eines anti-tumoralen Vakzins dar.

Die Induktion einer zellulären Immunantwort infolge der kontinuierlichen endogenen Freisetzung des ACA125hFc Antikörpers aus PVDF bzw. PES Implantaten wurde anhand von CA125 spezifischen Lymphozyten (Th1 Helferzellen und zytotoxische T Zellen) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mit Hilfe der Cytokin-Flowcytometry (CFC) konnten antigen-spezifische T-Zellen über ihren Aktivierungsstatus (CD69) und gleichzeitig über ihre Funktionalität anhand der intrazellulären Expression von IFN γ charakterisiert werden. Außerdem konnten so aktivierte T-Zellsubsets über entsprechende Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD8) charakterisiert werden.

Für die Untersuchung einer zellulären Aktivierung nach Implantation ACA125hFc-produzierender PES- bzw. PVDF-Kapseln sowie nach Immunisierung mit ACA125hFc wurde die Milz der behandelten Tiere 2 Monate nach Versuchsbeginn entnommen. Nach Isolierung und Erythrozyten-Lyse wurden die Splenozyten mit dem co-stimulatorischen Reagenz CD28 inkubiert, wodurch die Aktivierung antigen-spezifischer T-Zellen auch in Abwesenheit professioneller APC zusätzlich erhöht werden konnten. Danach erfolgte eine Kurzzeit-Stimulation für insgesamt 24 Stunden mit dem Tumorantigen CA125. Als Kontrolle für eine generelle Aktivierbarkeit wurden Splenozyten mit dem Mitogen PHA stimuliert und zusätzlich ein unstimulierter Ansatz als Backgroundkontrolle mitgeführt. Durch die Zugabe des Golgi-Stop Brefeldin A während der letzten 12 Stunden der Stimulation wurde die Sekretion der Cytokine verhindert, sodass die intrazelluläre Akkumulation von IFN γ

anschließend durchflusszytometrisch detektiert werden konnte. Nach Beendigung der Stimulation wurden die T-Zellpopulationen mittels anti-Maus Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8 bzw. den Aktivierungsmarker CD69 detektiert. Nach Permeabilisierung erfolgte die intrazelluläre Cytokin-Anfärbung durch anti-Maus IFN γ Antikörper.

Bezüglich des *Aktivierungsstatus* konnten als Folge der Implantation von ACA125hFc-produzierenden PES- und PVDF-Kapseln deutlich erhöhte prozentuale Anteile *CA125-aktivierter* CD69⁺ sowohl auf zytotoxische T Zellen als auch Helfer Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Verwendung beider Kapselsysteme zur Induktion *CA125 antigen-spezifischer* IFN γ ⁺/CD69⁺: CD4⁺ und -CD8⁺ T-Zellen führten.

Im Gegensatz zur humoralen Immunantwort konnte hinsichtlich der Frequenz antigenspezifischer T-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kapseltypen beobachtet werden. Dagegen war erwartungsgemäß kein Nachweis einer T-Zellaktivierung durch Implantation von verkapselten nichttransfizierten C2C12 Zellen möglich.

Im Bezug auf die Induktion einer zellulären Immunität wurde das überlegene immunologische Potential eines kontinuierlichen *in vivo* Freisetzungssystems gegenüber einer herkömmlichen Immunisierung mit ACA125hFc deutlich, da eine Vakzinierung mit aufgereinigtem Antikörpern in keinem der analysierten Tiere eine CA125-positive T-Zellantwort hervorrufen konnte.

6.6. Die Untersuchung der *in vitro* Expression an ACA125hFc aus PVDF und PES Biokapseln nach deren Explantation

Zur Untersuchung der ACA125hFc-Sekretionsrate nach 2 monatiger Versuchsphase, wurden die explantierten Zellkapseln *in vitro* kultiviert. Als Negativkontrolle dienten explantierte Kapseln mit wild-type C2C12 Zellen. Die ACA125hFc-Sekretionsrate wurde im Kulturüberstand mittels ELISA über die Bindung an den idiotypischen Antikörper OC125 quantifiziert. Als Vergleichskontrolle wurden die *in vitro* Kulturüberstände vor Implantation der Kapseln eingesetzt.

Für die PVDF-Kapseln konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der ACA125hFc-Sekretionsrate Prä- und Postimplantation nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die PES-Kapseln 2 Monate nach Implantation eine leichte Abnahme der Sekretionsrate. Dabei könnte die abnehmende Tendenz der Sekretionsrate nach Explantation von PES-Kapseln zwar theoretisch durch die größere Porengröße (2000 KD vs. 500 KD bei PVDF) zu erklären sein, welche einen leichteren Eintritt von immunreaktiven molekularen Komponenten des Host-Immunsystems (Komplement/Antikörper) ermöglichen und die Zellvitalität somit beeinträchtigen könnte. Da jedoch die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass PES-Kapseln trotz abnehmender Sekretionsrate im Vergleich zu PVDF-Kapseln vor allem stärkere Antikörperantworten in den behandelten Tieren induzieren konnten, scheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich zu sein. Vielmehr könnten leichte Beschädigungen der deutlich fragileren PES-Kapseln bei der Explantation verantwortlich für die geringfügig verminderten Expressionraten sein.

Aus den vorliegenden Ergebnissen resultierte, dass beide getesteten Kapselimplantate in der Lage waren bis zu Versuchsende (2 Monate) den anti-Idiotypen ACA125hFc kontinuierlich in den Organismus freizusetzen. Demnach bieten beide Polymermembrantypen einen ausreichenden immunologischen Schutz.

6.7. Histochemische Untersuchungen zur Überprüfung der Vitalität und Morphologie von explantierten verkapselten C2C12 Myoblasten

Die makroskopische bzw. mikroskopische Untersuchung der explantierten Biokapseln sollte darüber Aufschluss geben, inwiefern das verwendete allogene Tiermodell einen Einfluss auf die Vitalität der verkapselten C2C12 Zellen genommen hatte. Gleichzeitig sollte so die histopathologische Reaktion des umliegenden Gewebes auf das Implantat untersucht werden. Die Explantation der Kapseln nach 2 Monaten ergab makroskopisch keine Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe. Vielmehr konnten neugebildete Blutgefäße in unmittelbarer Nähe der Implantate lokalisiert werden. Durch die Neovaskularisation wurde wahrscheinlich die Versorgung der Kapseln mit Nährstoffen sowie den Abtransport von ACA125hFc Antikörpern, Metaboliten usw. gewährleistet. Da PES Kapseln in Vergleich zu PVDF Kapseln deutlich fragiler waren (Hann 2005), wurden sie beim Explantationsvorgang teilweise beschädigt.

Eine Aussage über die Vitalität der verkapselten C2C12 Zellen, konnte nach deren Einbettung in einem Methacrylat-Kunststoff getroffen werden. Nach Explantation beider Kapseltypen zeigte sich in deren Lumen eine dichte Myoblasten Zellpopulation ohne Anzeichen von Zellnekrose bzw. Ausbildung von Zellaggregaten. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass beide Kapseltypen (PES vs. PVDF) unabhängig von ihrer unterschiedlichen Beschaffung offensichtlich keine Abstossungsreaktion hervorgerufen hatten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in einem Zeitraum von zwei Monaten die unterschiedlichen Membraneigenschaften (Porengröße bzw. Material) der hier verwendeten Kapseltypen keinen Einfluss auf die Zellvitalität der allogenen Implantate genommen hatten. Weder eine Entzündungsreaktion noch eine Abstoßreaktion konnte im umliegenden Gewebe beobachtet werden, sodass prinzipiell beide Kapseltypen als geeignete Implantate in Betracht gezogen werden können. Allerdings sind PVDF Kapseln in Vergleich zu PES Hohlfasern mechanisch stabiler, eine Eigenschaft die ihnen einige Vorteile wie z.B. leichtere Handhabung, geringere Gefahr der Kapselwandläsion nach Implantation und grössere Sicherheit bei Explantation bieten könnten.

6.8. Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Immunogenität des anti-idiotypischen Antikörpers ACA125hFc (=humanisierter Abkömmling von Abagovomab) welcher das CA125 Tumor Antigen imitiert, mittels Bioverkapselungstechnologien deutlich verbessert werden kann.

Die unverkennbare Überlegenheit der kontinuierlichen endogenen Freisetzung kleiner ACA125hFc Mengen aus verkapselten Myoblasten gegenüber der herkömmlichen anti-Idiotypen Vakzinierung mit hohen Antikörpern Dosen konnte hierbei anhand der Analyse von CA125 spezifischen humoralen bzw. zellulären Immunantworten klar unter Beweis gestellt werden: mittels herkömmlicher anti-Idiotypen Vakzinierung war es im Gegensatz zu dem Biokapselsystem nicht möglich eine zelluläre Immunantwort in Form von CA125 spezifischen T-Zellen zu induzieren. Auch die hierbei induzierte spezifische humorale Immunantwort (= anti-anti ACA125hFc Antikörper) war deutlich schwächer ausgeprägt, verglichen mit den Kapselimplantaten. Demnach konnten beide untersuchten Biokapseln

(PVDF vs. PES) erfolgreich als allogene Implantate zur kontinuierlichen endogenen Sekretion von ACA125hFc Antikörpern bestehen.

Die unterschiedlichen Membraneigenschaften (Porengröße bzw. Membranzusammensetzung) der zwei eingesetzten Biokapseltypen spielten bei der möglichen Induktion einer so genannten „host vs. graft disease reaction“ keine Rolle. Beide Kapseln waren ähnlich gut verträglich, zeigten nach Explantation eine exzellente Zellvitalität ohne Anzeichen von Entzündung, Zellnekrose oder Lymphozyteninfiltration.

Durch den Einsatz der PES Biokapseln konnte die spezifische humorale Immunantwort des ACA125hFc Antikörpers noch einmal in Vergleich zu PVDF Kapseln gesteigert werden, was wahrscheinlich auf die größeren PES Membranporen zurückzuführen war. Allerdings schien dieser Effekt bei der Induktion einer zellulären Immunität keine Rolle mehr zu spielen, da beide Kapseltypen vergleichbar hohe CA125 spezifische T Zellantworten lieferten. PVDF Kapseln waren in Vergleich zu PES Hohlfasern mechanisch stabiler, eine Eigenschaft die ihnen einige Vorteile wie z. B. leichtere Handhabung und geringere Gefahr einer Kapselwandruptur nach Implantation bringen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Bioverkapselungstechnologien ein effizientes Antikörper Applikationssystem entwickelt, welches die Immunogenität des anti-Idiotypen ACA125hFc deutlich verbesserte. Nachfolgende Untersuchungen sollen darüber Aufschluss geben inwiefern diese viel versprechenden Ergebnisse auch auf andere anti-idiotypische Antikörper übertragen werden können: sind semipermeable allogene Biokapselimplantate, welche kontinuierlich endogene Mengen von anti-Idiotypen sezernieren generell in der Lage die Immunogenität solcher Antikörper zu steigern?

7. Zusammenfassung

Ovarialkarzinome sind die häufigste Todesursache durch gynäkologische Malignome in den USA und Deutschland. Aufgrund der Symptomarmut zu Beginn der Erkrankung sowie das Fehlen suffizienter Frühscreeningmethoden werden über 70% der Ovarialkarzinome in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Trotz einer insgesamt positiven Entwicklung der heutigen Therapieregime bleibt festzustellen dass fortgeschrittene Stadien mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert sind, wobei die meisten Patientinnen trotz optimaler Behandlung (OP mit anschließender Polychemotherapie) bald danach ein Rezidiv erleiden. Aus diesem Grunde erscheint die Ergänzung der konventionellen Therapie als durchaus sinnvoll.

Die Immunisierung mit anti-idiotypischen Antikörpern stellt eine interessante Zusatzstrategie in der Behandlung des Ovarialkarzinoms dar. Dabei können anti-idiotypische Antikörpern in ihren variablen Domänen Tumor-assoziierte Antigene imitieren. Durch die Präsentation von Tumor Antigenen in eine fremde molekulare Umgebung ist es möglich, eine spezifische Immunantwort gegen an sich nicht oder nur schwach immunogene Tumor-assoziierten Antigenen und im Endeffekt gegen die Tumorzelle selbst zu erzeugen. Anti-Idiotypen wurden in der Immuntherapie vielfältiger Tumore eingesetzt, wobei die Wirksamkeit einiger dieser Antikörpern bereits in klinische Phase III Studien untersucht wird. Hierzu zählen: Kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolorektales Karzinom, Ovarialkarzinom, B-Zell Lymphom und malignes Melanom.

Abagovomab (=ACA125) ist ein muriner anti-idiotypischer Antikörper der das tumorassoziierte Antigen CA125 funktionell imitiert und aktuell in einer internationalen Phase II/III Studie (MIMOSA/AGO-Ovar10) in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms eingesetzt wird. CA125 ist ein Tumor Antigen welches von der Mehrzahl der Ovarialkarzinome überexprimiert wird, wobei die meisten Patientinnen gegenüber diesem Antigen tolerant sind. Allerdings kann diese Immuntoleranz durch ein stellvertretendes CA125 Antigen wie Abagovomab überwunden werden. Bereits mehrere klinische Studien ergaben deutliche Hinweise auf die therapeutische Wirksamkeit von Abagovomab mit verbesserten klinischen Ansprechraten sowie verlängerten Überlebenszeiten.

Ein Nachteil vieler anti-Idiotypen Vakzine scheint ihre geringe Immunogenität zu sein, so dass zur Erhaltung einer spezifischen anti-tumoralen Immunantwort Mehrfachapplikationen mit hohen Antikörperdosen notwendig sind, was Gefahren wie Effektivitätsverlust, Toleranzinduktion und Allergisierung nach sich ziehen könnte.

Im Hinblick auf die Gentherapie des Ovarialkarzinoms mittels anti-Idiotypen, wurde im Rahmen einer Vorarbeit der humanisierten Abagovomab Abkömmling ACA125hFc hergestellt, welcher im Unterschied zum murinen Ursprungsantikörper mit einer humanen konstanten Fc Region ausgestattet war. Die Intention dabei war, die Induktion unspezifischer anti-Maus Antikörper im humanen System zu reduzieren, welche infolge der Immunisierung mit dem murinen Abagovomab beobachtet wurden und die spezifische anti-tumorale Immunantwort teilweise überlagerten.

Im Rahmen derselbigen Vorarbeit wurde ein kontinuierliches *in vitro* Freisetzungssystem für den anti-Idiotypen ACA12hFc mittels Bioverkapselungstechnologien hergestellt, mit dem Ziel eine *dauerhafte* spezifische Immunantwort gegen das Tumor Antigen CA125 zu erzeugen. Das Prinzip der Bioverkapselung beruht auf die physikalische Immunisolation non-autologer Zellen mittels einer semipermeablen Membran, welche als immunologische Schutzbarriere fungiert und so im Gegensatz zu herkömmlichen Transplantationsmethoden auch ohne Immunsuppression funktioniert. Die verkapselten Zellen gestalten sich wie kleine Bioreaktoren: über Membrandiffusion erfolgt ein bidirektionaler, kontinuierlicher Austausch kleiner Moleküle wie Nährstoffe, Sauerstoff, rekombinante Proteine etc. zwischen Spender und Empfänger, wobei große Moleküle und Zellen die Membran nicht passieren können.

Es ist durchaus vorstellbar, dass ein Depotsystem welches die kontinuierliche anti-Idiotypen Expression sicherstellt, in der Lage ist dessen Immunogenität zu verbessern um schließlich eine dauerhafte Tumorregression zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden murine rekombinante C2C12 Myoblasten welche den ACA12hFc Antikörper stabil exprimierten, in dafür eigens hergestellte Makrokapseln eingebracht und *in vitro* untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Vorversuche resultierte, dass beide getesteten Kapseltypen (PES vs. PVDF) bis Versuchsende (=1 Jahr) die Voraussetzungen für ein kontinuierliches *in vitro* ACA125hFc-Freisetzungssystem erfüllten.

Im Rahmen der aktuellen Arbeit wurde anhand eines non-autologen Mausmodells überprüft, inwiefern das *in vitro* entwickelte ACA125hFc Biokapselsystem, einen Vorteil gegenüber der

herkömmlichen Vakzinierung nach sich zieht und somit *in vivo* in der Lage ist die Immunogenität von anti-Idiotypen zu verbessern. Zu diesem Zweck wurden rekombinante C2C12 Myoblasten in zwei chemisch unterschiedlichen Kapseltypen eingebettet (PES bzw. PVDF) mit dem Hintergrund auch mögliche Unverträglichkeiten durch den Einsatz von z.B. unterschiedlichen Materialien zu erfassen. Anschließend erfolgte die Implantation der Biokapseln in ein allogenes Mausmodell (Balb/c), wobei die humorale Immunität mittels ELISA Techniken bzw. die zelluläre Immunantwort mittels Durchflußzytometrie untersucht wurde.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Immunogenität des anti-idiotypischen Antikörpers ACA125hFc welcher das CA125 Tumor Antigen funktionell imitiert, mittels Bioverkapselungstechnologien deutlich gesteigert werden kann.

Die Überlegenheit der kontinuierlichen *in vivo* Freisetzung kleiner ACA125hFc Mengen aus verkapselten Myoblasten gegenüber der herkömmlichen Vakzinierung mit hohen anti-Idiotypen Dosen konnte hierbei anhand der Analyse von CA125 spezifischen Immunantwort eindrucksvoll demonstriert werden: über die herkömmliche anti-Idiotypen Vakzinierung konnte keine spezifische zelluläre Immunantwort induziert werden. Hingegen erfolgte über die konstante endogene Freisetzung von ACA125hFc Antikörpern aus Kapselimplantaten eine eindeutige CA125 spezifische T Zellantwort sowohl in Form von T Helferzellen als auch als zytotoxischen T Zellen. Auch die hierbei induzierte spezifische humorale Immunantwort (= anti-anti ACA125hFc Antikörper) war bei der herkömmlichen Immunisierung deutlich schwächer ausgeprägt als bei den Kapselimplantaten.

Aus den obigen Ergebnissen resultierte, dass beide untersuchten Biokapseln (PVDF vs. PES) erfolgreich als allogene Implantate zur kontinuierlichen endogenen Sekretion von ACA125hFc Antikörpern bestehen konnten. Da beide Kapseltypen trotz einiger Unterschiede in den Membraneigenschaften (Porengröße bzw. Material) ähnlich gut verträglich waren und nach Explantation eine exzellente Zellvitalität ohne Anzeichen von Implantatabstoßung zeigten, können letztendlich auch beide als gleichwertige Immunisolatoren für allogene Zellen befunden werden.

Lediglich in der Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort gab es Unterschiede: PES Biokapseln wiesen höhere spezifische anti-ACA125hFc Antikörpertiter vergleichbar mit den PVDF Kapseln, was wahrscheinlich auf die größeren PES Membranporen

zurückzuführen war. Allerdings schien dieser Effekt bei der Induktion einer zellulären Immunität keine Rolle mehr zu spielen, da beide Kapseltypen vergleichbar hohe CA125 spezifische T Zellantworten lieferten. PVDF Kapseln waren hingegen mechanisch stabiler, was für die Implantatsicherheit bzw. Handhabung von großem Vorteil sein könnte.

Nachfolgende Untersuchungen (z.B. Tumortiermodell) sollen darüber Aufschluss geben inwiefern die verbesserten immunologischen Eigenschaften von bioverkapselten anti-Idiotypen letztendlich auch zu einer dauerhaften Tumorregression führen können, was bislang durch herkömmliche Vakzinierungsstrategien leider nicht erzielt werden konnte. Ausserdem sollte untersucht werden inwiefern dieses neue ACA125hFc Freisetzungsmodell auch auf andere anti-Idiotypen übertragbar ist bzw. inwieweit hierbei eine verbesserte spezifische anti-tumorale Immunantwort möglich ist.

8. Englische Zusammenfassung (Summary)

Ovarian cancer represents the third most common malignancy of the genital tract. Because more than 50% of ovarian cancer patients are stage III and 20 % are stage IV at the time of diagnosis, this tumour is associated with an extremely unfavourable prognosis. Because the success of chemotherapy regimens after failure of first-line therapy is limited, the development of other therapeutically methods e.g. immunotherapy became necessary.

One promising application in ovarian cancer immunotherapy is the administration of the murine anti-idiotypic antibody abagovomab that imitates the tumour-associated antigen CA 125, which is overexpressed by about 80 % of ovarian carcinomas. Abagovomab is currently being tested in a Phase II/III trial in ovarian cancer patients with a complete response after standard first-line chemotherapy. Activating the cancer host's immune system via an anti-idiotypic network system is a new strategy that is worth being pursued in the fight against ovarian cancer.

A drawback of abagovomab is its low immunogenicity. The goal of the present work was to determine if a continuous delivery system for abagovomab will show an advantage over conventional immunization in inducing a durable antitumor response. Based on bioencapsulation technologies, we generated in a previous work a cell culture system that acts as a continuous delivery system for the abagovomab derivative ACA125hFc and concluded that recombinant C2C12 myoblasts encapsulated in semi permeable hollow fibers can be employed as secretion devices for this antibody.

In the present work we developed an allogene mouse model, acting as a long term delivery system for ACA125hFc expressing allografts. Compared with conventional anti-idiotypic immunization the new antibody application systems showed a significant improvement in humoral as well as in cellular immune responses.

Further studies using e.g. ovarian cancer animal models will show if this new delivery system is able to improve the anti-tumoral response against CA125.

9. Referenzen

Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Remy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugieres P, Baudic S, cesaro P, Peschanski M, Aebischer P 2000: Clinical Protocol. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Human Gene Therapy 11: 1723-1729*

Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K 2005: New tumor markers: CA125 and beyond. : *Int J Gynecol Cancer. Nov-Dec; 15 Suppl 3:274-81.*

Bauerschlag DO, Schem C, Baumann K, Harter P, Hilpert F, Wagner U, du Bois A, Pfisterer J 2008: Anti-idiotypic antibody abagovomab in advanced cancer. *Future Onol.: 4, (6)*

Berek J, Taylor P, McGuire W, Smith LM, Schultes B, Nicodemus CF. 2009: Oregovomab maintenance monoimmunotherapy does not improve outcomes in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol. :Jan 20;27(3):418-425*

Bjerkvig R, Read TA, Vajkoczy P, Aebischer P, Pralong W, Platt S, Melvik JE, Hagen A, Dornish M. 2003: Cell therapy using encapsulated cells producing endostatin.. *Acta Neurochir Suppl: 88:137-41.*

Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski. 2004: Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther.: Oct; 15(10):968-75.*

Bottomley A, Debruyne C, Felip E, Millward M et al. 2008: Symptom and quality of life results of an international phase III study of adjuvant vaccination with Bec2/BCG in responding patients with limited disease small cancer. *Eur J Cancer: Oct 44(15), 2178-2184*

Buchser E, Goddard M, Heyd B et al 1996: Immunoisolated xenogeneic chromaffin cell therapy for chronic pain. Initial clinical experience. *Anesthesiology 85, 1005*

Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Racanicchi L, Mancuso F, Montanucci MP, Brunetti P 2006: Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes mellitus. *TransplantProc*: 38(4):1156-7

Cerny J, Hiernaux J, 1990: Concept of Idiotypic Network: Description and Functions. In: *Idiotypic Network and Diseases. Eds.: Cerny J, Hiernaux J. - Washington: American Society for Microbiology, 13-30*

Cheuk AT, Chan L, Czepulkowski B et al. 2008: Development of a whole cell vaccine for acute myeloid leukaemia. *Front Biosci* 2008: 13, 2022-2029

Chianese-Bullock KA, Irvin WP Jr, Petroni GR, Murphy C, Smolkin M, Olson WC, Coleman E, Boerner SA, Nail CJ, Neese PY, Yuan A, Hogan KT, Slingluff CL Jr. 2008: A multi-peptide vaccine is safe and elicits T-cell responses in participants with advanced stage ovarian cancer. *Immunother*. 2008 May; 31(4):420-30.

Cirone P, Saller RM, Chang PL 2001: Immuno-isolation in oncology-a mini-review. *Curr Pharm Biotechnol.*: Sep;2(3):269-77

Choog G, Bhatnagar A, Cunningham D, Cosgriff TM, Harper PG et al. 2006: Phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin plus either 5H1 anti-idiotypic monoclonal antibody or placebo in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*: Mar, 17(3), 437-442

Colombo N, Van Gorp T, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C, Vergote I 2006: Ovarian Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*: 60; 159-179

Cserr HF, Knopf PM 1992: Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain. A new view. *Immol. Today* 85; 1005

Deglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P 1996: Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther* 7: 2135-2146

De Ceiro AL, Zabalegiu N, Rodriguez-Cavill, Inoges S, Bendandi M 2007: Anti-idiotypic antibodies in cancer treatment. *Oncogene*: 26, 3594-3602

De Ceiro AL, Inogés S. 2009: Future of idiotypic vaccination for B-cell lymphoma. *Expert Rev Vaccines.*: Jan,8(1), 43-50

Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE, Kordower JH. 1997: Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature*: Mar 27;386(6623):395-9.

Figini M, Martin F, Ferri R, Luison E, Ripamonti E, Zacchetti A, Mortarino M, Di Cioccio V, Maurizi G, Allegretti M, Canevari S 2009: : Conversion of murine antibodies to human antibodies and their optimization for ovarian cancer therapy targeted to the folate receptor. *Cancer Immunol Immunother*: Apr, 58(4):531-46

Frederick PJ, Straughn JM Jr, Alvarez RD, Buchsbaum DJ 2009: Preclinical studies and clinical utilization of monoclonal antibodies in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009 Feb 19

Hammang JP, Emerich DF, Winn SR, Lee A, Lindner MD, Gentile FT, Doherty EJ, Kordower JH, Baetge EE. 1995: Delivery of neurotrophic factors to the CNS using encapsulated cells: developing treatments for neurodegenerative diseases. *Cell Transplant*.:4 Suppl 1:S27-8.

Hann E 2005: Generierung eines endogenen Freisetzungssystems zur kontinuierlichen Sekretion von anti-idiotypischen Antikörpern für die Immuntherapie des Ovarialkarzinoms, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, dem Fachbereich Pharmazie der Philipps Universität Marburg*

Hann E, Reinartz S, Clare SE, Passow S, Kissel T, Wagner U 2005: Development of a delivery system for the continuous endogenous release of an anti-idiotypic antibody against ovarian carcinoma, *Hybridoma* 24 (3), 133-140

Hilpert F, Krause G, Venhoff L, Kühnle E, Schem C, Maas N 2007: Das epitheliale Ovarialkarzinom. *Therapeutische Umschau, Band 64, 7:375-380*

Harrop R, John J, Carroll MW 2006: Recombinant viral vector: cancer vaccines. *Adv Drug deliv Rev*: 58: 931-947

Huszthy PC, Brekken C, Pedersen TB, Thorsen F, Sakariassen PO, Skaftnesmo KO, Haraldseth O, Lønning PE, Bjerkvig R, Enger PO 2006: Antitumor efficacy improved by local delivery of species-specific endostatin. *J Neurosurg.: Jan;104(1):118-28.*

Interdisziplinäre S2k Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren 2007. Herausgegeben von der Kommission Ovar der AGO in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. sowie in der deutschen Krebsgesellschaft e.V.

Jeon Y, Kwak K, Kim S, Kim Y, Lim J, Baek W. 2006: Intrathecal implants of microencapsulated xenogenic chromaffin cells provide a long-term source of analgesic substances. *Transplant Proc.: Nov; 38(9):3061-5*

Jerne NK 1974: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol: 125, 373-389*

Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, Abe T, Carroll RS, Black PMcL 2001: Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nature Biotechnology, Vol. 19: 35-39*

Kauff ND, Satogopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, Ellis NA, Boyd j, Borgen PI, Barakat RR 2002: Risk reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med; 346: 1609-1615.*

Köhler S, Prietl G, Schmolling J, Grün U, Fischer HP, Schlebusch H, Wagner U 1998: Immuntherapie des Ovarialkarzinoms mit dem monoklonalen anti-idiotypischen Antikörper ACA125 - Ergebnisse der Phase Ib Studie. *GebFra 58, 180-186*

Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R 2007: Robbins Basics Pathology. *Elsevier, 728-734.*

Lacy PE, Hegre OD, Gerasimidi-Vazeou A, Gentile FT, Dionne KE 1991: Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science 254, 1782-1784*

Li RH 1998: Materials for immunoisolated cell transplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews, 33: 87-109*

Li RH, Williams S, Burkstrand M, Roos E 2000: Encapsulation matrices for neutrophic factor-secreting myoblast cells. *Tissue engineering Vol. 6, No. 2:151-163*

Lindvall O, Wahlberg LU 2008: Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol. 2008 Jan; 209(1):82-8*

Löhr M, Hummel F, Faulmann G, Ringel J, Saller R, Hain J, Günzburg WH, Salmons B 2002: Microencapsulated, CYP2B1-transfected cells activating ifosfamide at the site of the tumor: the magic bullets of the 21st century. *Cancer Chemother Pharmacol: May; 49 Suppl 1:S21-4. Epub 2002 Apr 12.*

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R 1982: Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med: 4, 517-522*

Modugno F, Ovarian Cancer and High Risk Women Symposium Presenters 2003: Ovarian Cancer and high-risk women: Implication for prevention, screening and early detection. *Gynecol. Oncol 91: 15-31*

Moisset PA, Bonham L, Skuk D, Koeberl D, Brussee V, Goulet M, Roy B, Asselin I, Miller AD, Tremblay JP 2000: Systemic production of human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates by transplantation of genetically modified myoblasts. *Hum Gene Ther: Jun 10; 11(9):1277-88.*

Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, Hoffman EW, Pan L, Ritter G, Vilella J, Thomas B, Rodabaugh K, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Gnajatic S 2007: Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 31;104 (31):12837-42*

Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Siervo S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM 2000: Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help depend differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *PNAS, Vol. 97(24), 13263-13268*

Osada T, Clay TM, Wood CY, Morse MA, Lyery HK 2006: Dendritic cell-based immunotherapy. *Int Rev Immunol*: 25, 377-413

Peduto G, Rinsch C, Schneider BL, Rolland E, Aebischer P 2000: Long-term host unresponsiveness to encapsulated xenogeneic myoblasts after transient immunosuppression. *Transplantation* 70:78-85

Peirone MA, Ross CJD, Hortelano G, Brash JL, Chang PL 1998: Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res*. 42(4):587-96.

Pejawar- Gaddy S, Finn OJ 2008: Cancer vaccines: Accomplishment and challenges. Critical Reviews in *Oncology Hematology*: 67, 93-102

Permeth-Wey J, Sellers TA 2009: Epidemiology of ovarian cancer. *Methods molec biol*, 472:413-37.

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fussaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA 2002: Use of proteomics patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 359: 572-577

Pfister J, du Bois A, Sehouli J, Loibl S, et al 2006: The anti-idiotypic antibody abagovomab in patients with recurrent ovarian cancer. A phase I trial of AGO-OVAR. *Annals of Oncology*: 17, 1568-1577

Ponce S, Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Canals JM, Muñoz MT, Pedraz JL.2006: In vivo evaluation of EPO-secreting cells immobilized in different alginate-PLL microcapsules. *J Control Release*.: Nov;116(1):28-34.

Prochorov AV, Tretjak SI, Goranov VA, Glinnik AA, Goltsev MV. 2008: Treatment of insulin dependent diabetes mellitus with intravascular transplantation of pancreatic islet cells without immunosuppressive therapy. *Adv Med Sci*.: 53(2):240-4.

Reinartz S 2000: Strategien zur Weiterentwicklung anti-idiotypischer Vakzine in der Immuntherapie des Ovarialkarzinoms. *Dissertation, Bonn*.

Reinartz S, Wagner U, Giffels P, Grün U, Schlebusch H, Wallwiener D 2000: Immunological properties of a single chain fragment of the anti-idiotypic antibody ACA125. *Cancer Immunol Immunother* 49, 186-192

Reinartz S, Köhler S, Schlebusch H, Krista K, Giffels P, Renke K, Huober J, Möbus V, Kreienberg R, Sabbatini P, Wagner U 2004: Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotypic antibody ACA125: Immunological response and survival (Phase Ib/II study). *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, 1580-1587

Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger P, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MHB, Haraldseth O, Bjerkvig R 2001: Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nature Biotechnology*, Vol. 19: 29-34

Roman LD, Wilczynski S, Munderspach LI, et al 2007: A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in woman with high grade cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*: 106, 453-460.

Sabbatini P, Dupont J, Aghajanian C et al. 2006: Phase I Study of Abagovomab in Patients with Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, or Primary Peritoneal Cancer. *Clin Cancer Res*: 12 (18), 5503-5510

Sabbatini P, Odunsi K 2008: Immunological Approaches to Ovarian Cancer Treatment. *J of Clinical Oncology*: 25(20), 2884-2893

Samel S, Löhr M. 2007: Targeted intraabdominal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*: 134:469-82.

Schlebusch H, Wagner U, Grün U, Schultes B 1995: A Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody ACA125 Mimicking the Tumor-Associated Antigen CA125 for Immunotherapy of Ovarian Cancer. *Hybridoma* 14, 167-174

Shu L, Qi CF, Horan Hand P, Schlom J, Kashmiri SVS 1995: Generation and characterization of a single-gene encoded single-chain immunoglobulin-interleukin2-fusion protein. *Immunotech* 1, 231-241

Soon-Shiong P et al. 1994: Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343, 950-951

Steinmann RM, Bancheureau J 2007: Taking dendritic cells into medicine. *Nature*: 419-426

Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I and Sun AM 1996: Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *Journal of Clinical Investigation* Vol. 98, No 6: 1417-1422

Uludag H, De Vos P, Tresco PA 2000: Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 42: 29-64

Verheijen RH, Massuger LF, Benigno BB, Epenetos AA, Lopes A, Soper JT, Markowska J, Vyzula R, Jobling T, Stamp G, Spiegel G, Thurston D, Falke T, Lambert J, Seiden MV 2006: Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission. *J Clin Oncol. Feb 1, 24(4), 571-8.*

Wagner U, Schlebusch H, Köhler S, Schmolling J, Grün U, Krebs D 1997: Immunological Responses to the Tumor-Associated Antigen CA125 in Patients with Advanced Ovarian Cancer induced by the Murine Monoclonal Anti-Idiotypic Vaccine ACA125. *Hybridoma* 16, 33-40

Wagner U, Köhler S, Reinartz S, Giffels P, Huober J, Renke K, Schlebusch H, Biersack HJ, Möbus V, Kreienberg R, Bauknecht T, Krebs D, Wallwiener D 2001: Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125: Immune responses and survival in palliative treatment. *Clin Cancer Res* 7, 1154-1162

Ward S., Casey D, Labarthe MC, et al. 2002: Immunological potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunoth*: 51, 351-357.

Yu M, Finn OJ 2006: DNA vaccines for cancer too. *Cancer Immunol Immunother*: 55, 119-130

Zhang H, Zhu SJ, Wang W, Wei YJ, Hu SS 2008: Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function.. *Gene Ther.*: Jan; 15(1):40-8

Zielinski BA, Aebischer P 1994: Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials* 15; 1049-1056

Zheng S, Xiao ZX, Pan YL, Han MY, Dong Q 2003: Continuous release of interleukin 12 from microencapsulated engineered cells for colon cancer therapy. *World J Gastroenterol*: May; 9(5):951-5.

Zurn AD, Henry H, Schlupe M, Aubert V, Winkel L, Eilers B, Bachmann C, Aebischer P. 2000: Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells. *Cell Transplan.*: Jul-Aug; 9(4):471-84.

Lebenslauf Evelin Hann

Geburtsdatum und Ort:	27. September 1972 in Bukarest, Rumänien
Familienstand:	Ledig
Schulbildung:	
1979-1991:	Deutsches Gymnasium Bukarest Abschluss: Abitur (Bakkalaureat)
1993-1994	Übersiedlung nach Deutschland und Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Hochschulausbildung:	
1994-1999	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls Universität Tübingen.
2000	Approbation als Apothekerin.
2004	Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg.
2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2010	Approbation als Ärztin
Praktika:	
2006	Famulatur Innere Medizin, Klinikum Stuttgart
2006	Famulatur Innere Medizin, Klinikum Stuttgart
2007	Famulatur Neurologie, Stuttgart
2009	PJ Neurologie, KK Siegen
2010	PJ Innere, Indianapolis USA
2010	PJ Chirurgie, Uni Marburg

Beruflicher Werdegang:

2000-2001

Apothekerin, Leverkusen.

2001-2004

Promotion an der Philipps-Universität Marburg

2005

Erlangung des Doktorgrades der

Naturwissenschaften im Fachbereich Pharmazie

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/ Herren:

in Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Bartsch, Baum, Baumann, Bien, Daut, Doll, Gress, Grzeschik, Hassilik, Hertl, Hofmann, Hoye, Klenk, Klose, Kolb-Niemann, Koolman, Lang, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholt, Schäfer, Schlosser, Seitz, Sekundo, Steininger, Sturm, Vogelmeyer, Voigt, Walter, Wagner, Weihe, Werner, Wulf

in Siegen:

Gehrke, Grond, Grübener, Richter

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Uwe Wagner danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für die jederzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft und praktische Unterstützung.

Frau PD Dr. Katja Schlosser danke ich für die Übernahme des Koreferats und für die konstruktiv kritische Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dr. Susan Clare für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen sowie für ihre Freundschaft, die mich seit Beginn meiner Dissertationszeit begleitet.

Ein besonderer Dank gilt Frau Ute Hilcher für ihre gründliche Einweisung in die molekularbiologischen Labormethoden, sowie für ihre liebevolle Art mit der sie stets für gute Arbeitsatmosphäre gesorgt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Zellkulturlabors der Universitätsfrauenklinik Marburg, für ihre Hilfsbereitschaft und praktische Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Effektivitätsanalyse eines in vivo Depotsystems zur Langzeitsekretion von anti-idiotypischen Antikörpern für das Tumor assoziierte Antigen CA125 in der Klinik für Gynäkologie, endokrinologische Gynäkologie und Onkologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Uwe Wagner mit Unterstützung durch das Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 26.10.2010

Evelin Hann