

Identifizierung neuer Antikörper durch die Kombination von Phagen-Display und *Next-Generation-Sequencing*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Steffen Krohn

Kiel, 2021

Erster Gutachter: Prof. Dr. Axel J. Scheidig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias Peipp

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis.....	9
1. Einleitung	10
1.1 Antikörper als Teil des Immunsystems	10
1.1.1 Aufbau und Wirkungsweise von Antikörpern	10
1.1.2 Zusammensetzung und Funktionsweise der Fc γ R	13
1.1.3 Aufbau und Funktion von CD64.....	13
1.1.4 Entstehung der Antikörpervielfalt und Immunantwort	14
1.2 Anwendung therapeutischer Antikörper in der Krebstherapie.....	17
1.2.1 Wirkmechanismen therapeutischer IgG1-Antikörper	17
1.2.2 Therapeutische IgG1-Antikörper zur Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen	18
1.2.3 Weitere Antikörperformate in der Krebstherapie.....	22
1.2.4 CD64 als Antigen für Immuntherapien.....	23
1.3 Strategien für die Identifizierung neuer Antikörper.....	24
1.3.1 Phagen-Display-Technologie.....	25
1.3.2 Kombination aus Phagen-Display und <i>Next-Generation-Sequencing</i>	28
1.4 Ziel der Arbeit	29
2. Material und Methoden.....	30
2.1 Verwendete Materialien	30
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Generierung muriner scFv-Immunbanken	38
2.2.1.1 Immunisierung von Mäusen	38
2.2.1.2 RNA-Präparation aus den Milzen immunisierter Mäuse	38
2.2.1.3 cDNA-Synthese	39
2.2.1.4 PCR der variablen Regionen	39
2.2.1.5 Klonierung von VH/VL-Banken	41
2.2.1.6 Klonierung von scFv-Immunbanken.....	42
2.2.2 Phagen-Display	43
2.2.2.1 Präparation von Phagen	43

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.2	Subtraktives, zelluläres <i>Panning</i>	44
2.2.2.3	Präparation von Phagen aus vereinzelten Bakterienkolonien	46
2.2.2.4	Bindungsanalyse der Phagen im Durchflusszytometer	46
2.2.2.5	Bindungsanalyse von Phagen im ELISA.....	47
2.2.3	Sequenzierungen	47
2.2.3.1	<i>Next-Generation-Sequencing</i> der VH	47
2.2.3.2	Sanger-Sequenzierung der scFv	49
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	49
2.2.4.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung.....	49
2.2.4.2	Passagieren von Zellen	49
2.2.4.3	Aufreinigung von Leukozyten aus Blut.....	50
2.2.4.4	Aufreinigung von mononukleären Zellen aus Blut.....	50
2.2.5	Produktion und Reinigung des chimären CD38-Antikörpers.....	51
2.2.6	Funktionelle Analyse des CD38-Antikörpers	53
2.2.6.1	Messung der ADCC und CDC im Zytotoxizitätsassay	53
2.2.6.2	Messung der ADCP im <i>Live Cell Imager</i>	54
3.	Ergebnisse	55
3.1	Generierung muriner scFv-Immunbanken	55
3.2	Identifizierung neuer Antikörper gegen CD64.....	57
3.2.1	Bindungsverhalten der rekombinanten CD64-Antikörper	65
3.3	Identifizierung neuer Antikörper gegen Myelomzellen	67
3.3.1	Funktionelle Charakterisierung des neuen CD38-Antikörpers	80
4.	Diskussion	83
5.	Zusammenfassung.....	95
6.	Summary	97
7.	Literaturverzeichnis.....	98
8.	Danksagung	109
9.	Erklärung.....	110

Abkürzungsverzeichnis

(c)ADPR	<i>(cyclic) ADP ribose</i>
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADC	<i>antibody-drug conjugates</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ARResT	<i>Antigen Receptors Research Tool</i>
Az	Aktenzeichen
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
bp	<i>base pairs</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
CFU	<i>colony-forming units</i>
CH	<i>constant region heavy chain</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CL	<i>constant region light chain</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMM	extramedulläres Multiples Myelom
ENS	<i>effective number of species</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	<i>Forward-Primer</i>
G418	Geneticindisulfat
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
hIL-6	humane Interleukin-6
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>

Ig	Immunglobulin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LRSC	<i>leukoreduction system chambers</i>
MAC	<i>membrane attack complex</i>
Mac-1	<i>macrophage antigen-1</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MGUS	<i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>
mIL-3	Maus Interleukin-3
MNC	<i>mononuclear cells</i>
NAADP	<i>nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate</i>
NAD+	<i>nicotinamide adenine dinukleotide</i>
NADP+	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NGS	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
NK	natürlichen Killerzellen
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin und Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBA	<i>protein blocking agent</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PE	R-Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PFU	<i>plaque-forming units</i>
rev	Reverse-Primer
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SB	<i>super broth</i>
scFv	<i>single-chain fragment variable</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>
SMM	<i>smouldering multiple myeloma</i>
SOC	<i>super optimal broth</i>
sPCL	<i>secondary plasma cell leukemia</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
TAE	TRIS-Acteta-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i>
V	<i>variable</i>
VH	<i>variable region heavy chain</i>
VL	<i>variable region light chain</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Aufbau eines Antikörpers am Beispiel des IgG-Isozyps.....	11
Abb.2	Aufbau von CD64 und Interaktion mit einem IgG1.....	14
Abb.3	Entstehung der Antikörpervielfalt durch die Kombination von Gensegmenten.	15
Abb.4	Entstehung und Entwicklung des Multiplen Myeloms.	19
Abb.5	Aufbau eines M13-Phagen mit scFv-pIII-Fusionsprotein und Ablauf eines <i>Pannings</i>	27
Abb.6	Prinzip des subtraktiven, zellulären <i>Pannings</i>	28
Abb.7	Ablauf der Generierung einer scFv-Immunbank aus einer immunisierten Maus.....	56
Abb.8	<i>Panning</i> -Strategie für die Isolation von CD64-Antikörpern.....	58
Abb.9	Die NGS-Analyse der CD64-Immunbank belegt die Anreicherung von VH-Klonen.....	59
Abb.10	Durchflusszytometrische Analyse der CD64-Bindung von selektionierten Phagen.....	60
Abb.11	Analyse der CD64-Bindung vereinzelter Phagen im zellulären ELISA.....	61
Abb.12	Die VH- und VL-Aminosäuresequenzen der CD64-bindenden Phagen können auf zwei gleiche bzw. ähnliche Klone zurückgeführt werden.....	62
Abb.13	Frequenzen der VH-Klonotypen nach den <i>Pannings</i>	64
Abb.14	Bindung der neuen Antikörper an CD64 nach Bindung von IgG1 und <i>vice versa</i>	66
Abb.15	<i>Panning</i> -Strategie und NGS-Analyse der Myelom-Immunbank.	68
Abb.16	Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von scFv-Phagen an L-363-Zellen.....	69
Abb.17	Bindung monoklonaler scFv-Phagen auf L-363-Zellen	70
Abb.18	Vergleich der VH-Aminosäuresequenzen und Klonotypen der scFv-Phagen.....	71
Abb.19	Vergleich der VL-Aminosäuresequenzen und Klonotypen der scFv-Phagen.....	72
Abb.20	Bindung monoklonaler scFv-Phagen auf Blut- bzw. Endothelzellen ..	73
Abb.21	Analyse der Bindung weiterer scFv-Phagen und Frequenzen aller VH-Klonotypen nach den <i>Pannings</i>	75
Abb.22	Bindung ausgewählter scFv-Phagen auf unterschiedlichen Lymphomzellen und an Antigene, gegen die sich Antikörper in der Klinik oder Entwicklung befinden.	77
Abb.23	Einfluss der Bindung von CD54- bzw. CD38-Antikörpern auf die Bindung des CD54- und des CD38-spezifischen scFv-Phagen.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abb.24 Reinheit und Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von #5-CD38-IgG1.....	80
Abb.25 Funktionelle Analyse des #5-CD38-IgG1 im Vergleich zu Daratumumab.	82

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Geräte	30
Tab.2	Verbrauchsmaterialien	30
Tab.3	Chemikalien und <i>Kits</i>	31
Tab.4	Puffer und Lösungen.....	33
Tab.5	Enzyme	34
Tab.6	Primer	34
Tab.7	Plasmide	35
Tab.8	Antikörper.....	35
Tab.9	Zellkulturmaterialien und Medien	36
Tab.10	Zelllinien.....	37
Tab.11	Zusammensetzung der Leukozyten der gesunden Spender.....	67

1. Einleitung

Therapeutische Antikörper sind in den vergangenen Jahrzehnten zu einem wichtigen Bestandteil der Medizin geworden und haben nachweislich zu einer Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten bei verschiedenen Erkrankungen geführt (Carter u. Lazar 2018). Auch in der Diagnostik und in der biowissenschaftlichen Forschung sind Antikörper Grundlage unterschiedlicher Methoden, wie Färbungen und Detektionen von Proteinen. Antikörper sind jedoch keine neue Erfindung des Menschen, sondern seit 500 Millionen Jahren ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems kiefertragender Vertebraten (*Gnathostomata*), wo sie in verschiedenen Ausführungen auftreten (Cooper u. Alder 2006).

1.1 Antikörper als Teil des Immunsystems

1.1.1 Aufbau und Wirkungsweise von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine, die fremdartige Strukturen, Antigene, auf Pathogenen, wie Viren, Bakterien oder Parasiten, erkennen und nach der spezifischen Bindung eine Reaktion des Immunsystems vermitteln. Als Antigene kommen sowohl Proteine als auch Zuckerstrukturen und andere Makromoleküle in Frage, die normalerweise nicht im Körper auftreten und deshalb als fremdartig erkannt werden. Antikörper besitzen Bindestellen für das Antigen, die von variablen Regionen gebildet werden, und konstante Regionen, über die Interaktionen mit Komponenten des Immunsystems vermittelt werden. Antikörper werden in die fünf Isotypen IgM, IgD, IgA, IgE und IgG unterteilt, die sich strukturell in ihren konstanten Regionen und funktionell in ihren Effektorfunktionen unterscheiden. Der häufigste Isotyp im Serum des Menschen ist IgG, der in vier weitere Subklassen (IgG1-4) unterteilt wird. Ein IgG-Antikörper setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die in je zwei identische leichten und schwere Ketten unterschieden werden (Abb. 1). Die variablen Regionen der schweren Kette (VH) und die der leichten Kette (VL) bilden zusammen je eine Antigenbindestelle. Dabei tritt jede variable Region, die aus neun β -Strängen aufgebaut ist, über drei Schleifen, die als komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity-determining region*, CDR) bezeichnet werden, in direkten Kontakt mit dem Antigen. Durch Wechselwirkungen, wie

Einleitung

Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Kräfte zwischen geladenen Aminosäureseitenketten oder Van-der-Waals-Kräfte, bildet der Antikörper eine hoch spezifische, nicht-kovalente Bindung zum Antigen aus (Murphy u. Weaver 2018). Ein Antigen kann von unterschiedlichen Antikörpern gebunden werden, die verschiedene Bindestellen, Epitope, erkennen können.

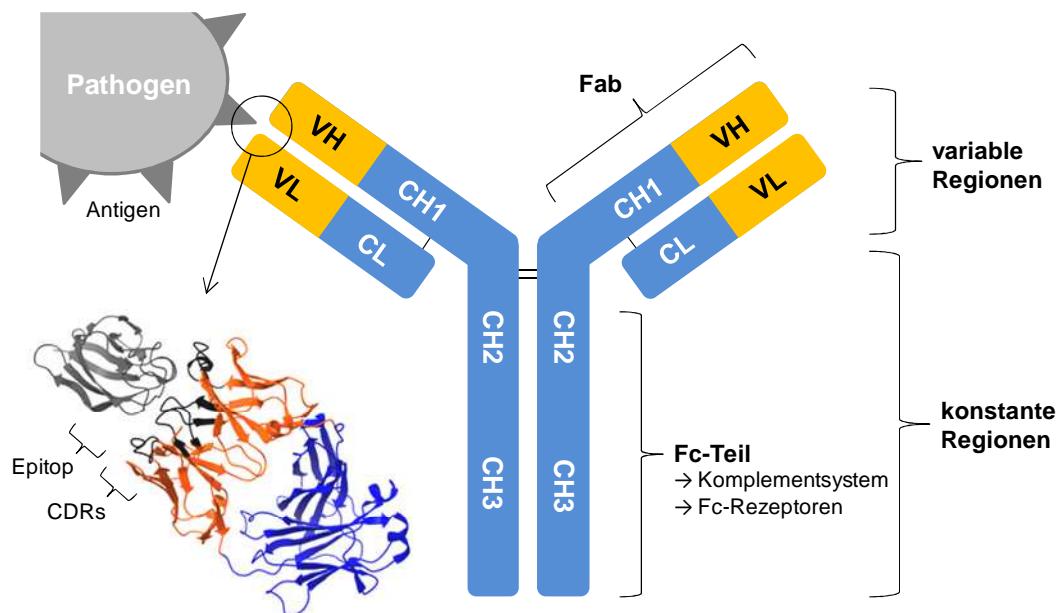


Abb.1 Aufbau eines Antikörpers am Beispiel des IgG-Isotyps.

Ein IgG-Antikörper hat zwei Antigenbindestellen, die je von den variablen Regionen (orange) einer schweren (VH) und leichten (VL) Kette gebildet werden. Über die *complementarity-determining regions* (CDRs, schwarz) der variablen Regionen tritt der Antikörper in Kontakt mit dem Epitop auf dem Antigen. Die leichten und die schweren Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind, besitzen konstante Teile (CL, CH, blau). Der Aufbau der konstanten Regionen der schweren Kette (CH) hängt vom Isotyp des Antikörpers ab. Die konstante Region der schweren Kette des IgG-Isotyps ist aus drei Domänen aufgebaut (CH1-3). Die CH2 und CH3 bilden zusammen den *fragment crystallisable* (Fc)-Teil, der an das C1q-Protein des Komplementsystems und an Fc-Rezeptoren binden kann. Das Fragment aus der leichten Kette und der VH der schweren Kette werden als *fragment antigen binding* (Fab) bezeichnet, das eine Antigenbindestelle hat. Der Ausschnitt mit der Epitop-CDR-Interaktion (links unten) zeigt ein Antikörperfragment in Wechselwirkung mit einem Hülleprotein des West-Nil-Virus nach PBD 1ZTX (Nybakken et al. 2005) erzeugt mit UCSF ChimeraX 1.1 (Goddard et al. 2018).

Durch die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen können verschiedene Wirkmechanismen aktiviert werden. Viren und Bakterien können von Antikörpern direkt neutralisiert werden. Durch die Bindung von Hülleproteinen auf Viren bzw. bakteriellen Adhäsinen verhindern Antikörper, dass die Erreger in die Wirtszelle eindringen oder sich auf der Oberfläche anlagern. Auch die Wirkung von Toxinen kann durch die spezifische Bindung eines Antikörpers neutralisiert werden. Andere Effektormechanismen werden über das *fragment crystallisable* (Fc) der konstanten Regionen vermittelt.

Einleitung

Erkennen Antikörper vom Isotyp IgG oder IgM ein Pathogen, kann durch die Bindung des C1q-Moleküls an deren Fc-Teil der klassische Weg der Komplementkaskade aktiviert werden. Die Anlagerung von Komplementfaktoren führt zur Freisetzung von Anaphylatoxinen, die Immunzellen rekrutieren. Gleichzeitig wird der Membranangriffskomplex (*membrane attack complex*, MAC) gebildet, durch den ein Pathogen lysiert wird (Murphy u. Weaver 2018). Des Weiteren binden Antikörper mit dem Fc-Teil an Fc-Rezeptoren (FcR) auf Immunzellen, wie Granulozyten, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die anders als B-Zellen und T-Zellen keine Antigenrezeptoren tragen, und vermitteln eine spezifische Reaktion, die von der Immunzelle und dem Isotyp des Antikörpers abhängig ist. IgG werden von Fc γ R, IgE von Fc ϵ R und IgA von Fc α R erkannt. Pathogene, die mit IgG- bzw. IgA-Antikörpern markiert wurden, können über Fc γ R und Fc α R von Phagozyten, wie Makrophagen, erkannt und aufgenommen werden. Sind die Pathogene, wie z.B. Parasiten, für eine Phagozytose zu groß, können eosinophile Granulozyten nach der Aktivierung durch Antikörper (IgG, IgA, IgE) toxische Granula freisetzen. NK-Zellen erkennen und zerstören Zellen, die sich in Folge einer Virusinfektion verändert haben oder maligne entartet sind. Durch eine Infektion können Zellen z.B. Hüllproteine des Virus auf ihrer Oberfläche tragen, die von IgG-Antikörpern erkannt werden. Über Fc γ R auf NK-Zellen vermitteln die Antikörper die Freisetzung zytotoxischer Granula, um eine infizierte oder entartete Zelle zu töten und eine Ausbreitung des Virus oder die Entstehung von Krebszellen zu verhindern (Vivier et al. 2008). Weitere Immunzellen, wie Mastzellen und basophile Granulozyten, setzen durch die Aktivierung von Fc γ R und Fc ϵ R über IgG- bzw. IgE-Antikörper Enzündungsmediatoren frei, die andere Effektorzellen mobilisieren. Die Ausbildung unterschiedlicher Isotypen ermöglicht eine vielseitige und dem Pathogen angepasste Wirkungsweise des Immunsystems. Zudem kommen FcR auch auf Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, vor und vermitteln die Aufnahme von Antikörper-Antigen-Komplexen aus der Umgebung der Zelle. Die Komplexe werden prozessiert, T-Zellen Peptide präsentiert und die T-Zellen, die ein Peptid des Antigens spezifisch binden, aktiviert, um eine adaptive Immunantwort zu stimulieren (Vyas et al. 2008).

1.1.2 Zusammensetzung und Funktionsweise der Fc γ R

Die Fc γ R, die IgG erkennen, gehören zur Ig-Superfamilie und sind mehrheitlich Typ I Transmembran-Glykoproteine (Nimmerjahn u. Ravetch 2008). Die Familie der Fc γ R wird in mehrere Mitglieder unterteilt, die auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden und nach Bindung eines IgG-Antikörpers verschiedene Effektormechanismen vermitteln können. Zudem werden die vier Subklassen des IgG-Istotyp mit unterschiedlicher Affinität gebunden. IgG1 und IgG3, die mit einer starken pro-inflammatorischen Wirkung assoziiert sind, zeigen im Vergleich zu IgG2 und IgG4 eine höhere Affinität zu allen Fc γ R (Nimmerjahn u. Ravetch 2008; Murphy u. Weaver 2018).

Die aktivierenden Rezeptoren CD64 (Fc γ RI), CD32a (Fc γ RIIa), CD16a (Fc γ RIIIa) kommen auf Immuneffektorzellen, wie Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen, vor und vermitteln über Antikörper die Zytotoxizität, Phagozytose und Aufnahme von Antikörper-Antigen-Komplexen. Der inhibierende Rezeptor CD32b (Fc γ RIIb), der bis auf T-Zellen und NK-Zellen, auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems zu finden ist, übernimmt eine regulierende Funktion (Nimmerjahn u. Ravetch 2008). Auf Makrophagen und Granulozyten wirkt CD32b inhibierend und ist ein Gegenspieler der aktivierenden Fc γ R. Bei der Entwicklung der B-Zellen und der Differenzierung zu Plasmazellen ist CD32b an der Unterdrückung von Autoantikörpern beteiligt. Das Gleichgewicht aus aktivierenden und inhibierenden Signalen ist eine Voraussetzung für die Regulation der Immunantwort und eine Störung dieses Zusammenspiels tritt bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen auf, wie systemischer *Lupus erythematoses* oder rheumatoider Arthritis (Nimmerjahn 2006).

1.1.3 Aufbau und Funktion von CD64

CD64 besitzt die höchste Affinität aller Fc γ R für IgG1 und IgG3 und kommt auf Makrophagen/Monozyten, Granulozyten (Eosinophile, Neutrophile) und dendritischen Zellen vor. Drei Domänen bilden den extrazellulären Teil, wobei die Interaktion mit dem Fc-Teil von IgG-Antikörpern fast ausschließlich über die Domäne 2 stattfindet (Lu et al. 2015) (Abb. 2).

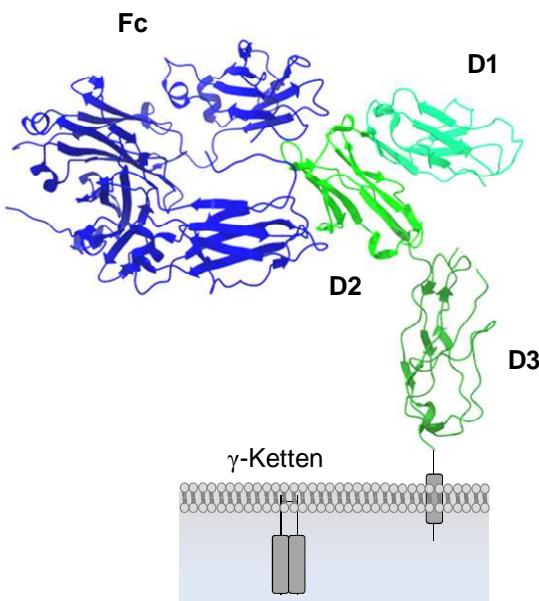


Abb.2 Aufbau von CD64 und Interaktion mit einem IgG1.

CD64 ist ein glykosyliertes Typ I Transmembranprotein, dessen extrazellulärer Teil aus drei Domänen besteht (D1-3; grün). Die Interaktion zwischen dem Fc-Teil eines IgG1 (blau) und CD64 findet fast ausschließlich über D2 statt. Die Vernetzung von Rezeptoren hat eine Phosphorylierung der assoziierten γ -Ketten zur Folge, die das Signal intrazellulär weitergeben. Fc-CD64 Komplex nach PBD 4X4M (Lu et al. 2015) erzeugt mit UCSF ChimeraX 1.1 (Goddard et al. 2018).

CD64 vermittelt aktivierende Signale nach der Bindung von Antikörper-Antigen-Komplexen und der dadurch bedingten Vernetzung der Rezeptoren auf der Oberfläche der Immunzelle. *In-vivo*-Versuche bestätigen, dass CD64 ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems ist. So konnte in einem Melanom-Mausmodel gezeigt werden, dass durch den *knock-out* von CD64 die Wirkung eines zur Therapie verabreichten monoklonalen Antikörpers gegen die Melanom-Zellen aufgehoben wurde (Bevaart et al. 2006). Jedoch befinden sich im Serum von Menschen große Mengen IgG, die von CD64 aufgrund der hohen Affinität (K_D : 38 nM) auch ohne Kontakt zu einem Antigen gebunden werden und dadurch Bindestellen für Antigen-Antikörper-Komplexe blockieren können (Nimmerjahn u. Ravetch 2008; Mancardi et al. 2013). Mit welchem Mechanismus Antigen-Antikörper-Komplexe trotzdem ein Signal über die Rezeptoren vermitteln können, bleibt Gegenstand aktueller Forschung (Brandsma et al. 2018).

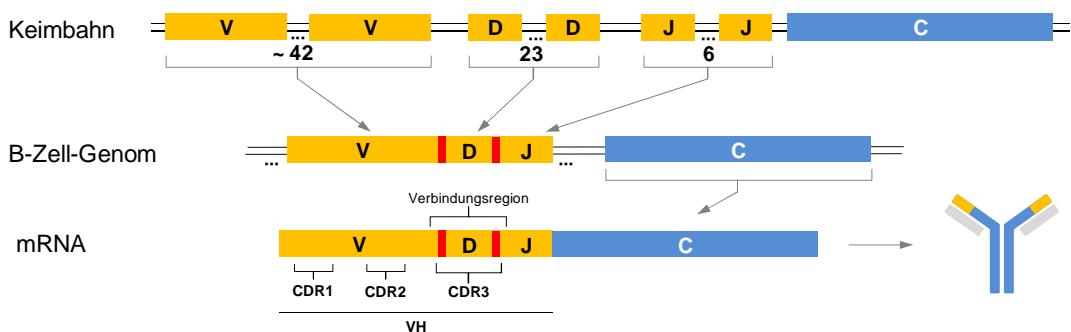
1.1.4 Entstehung der Antikörpervielfalt und Immunantwort

Die große Vielfalt der Antigenbindestellen, mit denen Antikörper Antigene als fremd erkennen können, wird während der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark ausgebildet. VH und VL entstehen durch die Kombination aus drei bzw. zwei unterschiedlichen Gensegmenten. In der Keimbahn besteht der Ig-Locus der schweren Kette aus mehreren V-, D- und J-Genen, die

Einleitung

getrennt hintereinander liegen und während der Entwicklung von B-Zellen durch Genumlagerung kombiniert werden (Lefranc u. Lefranc 2001). An den Kontaktstellen kann durch das zufällige Entfernen und Hinzufügen von Nukleotiden eine zusätzliche Variation entstehen. Die CDR1 und die CDR2 werden vom V-Gen kodiert, während die CDR3 nach der Umlagerung von der Verbindungsregion gebildet wird, die aus Teilen der V-, D- und J-Gene und den beiden Kontaktstellen besteht und den Ort größter genetischer Vielfalt darstellt (Abb. 3). Die gleichen Genumlagerungen finden auch an den Ig-Loci der leichten Kette statt (κ und λ), wobei die leichte Kette nur aus einem V-Gen und einem J-Gen aufgebaut ist (Abb. 3). Beim Menschen stammen etwa 65 % aller leichten Ketten vom κ -Locus und etwa 35 % vom λ -Locus (Murphy u. Weaver 2018).

Locus der schweren Kette



Locus der leichten Kette (κ)

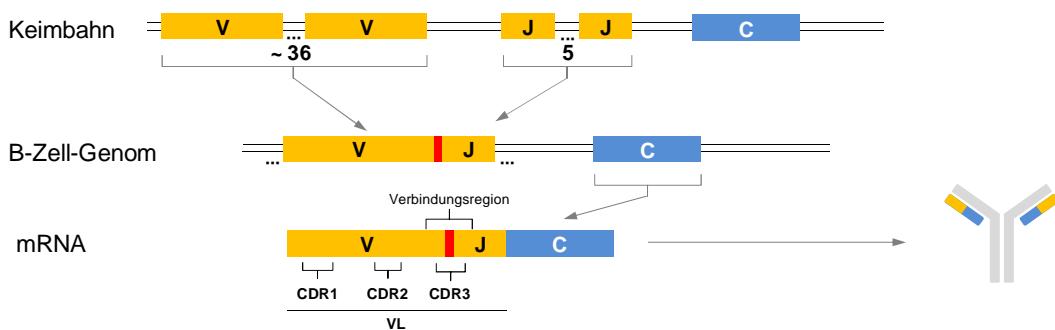


Abb.3 Entstehung der Antikörpervielfalt durch die Kombination von Gensegmenten.

Die große Vielfalt der Antikörper entsteht während der Entwicklung der B-Zellen. Für die drei Gensegmente, aus denen sich die variable Region der schweren Kette (VH, orange oben) bzw. die zwei Gensegmente aus denen sich die variable Region der leichten Kette (VL, orange unten) zusammensetzt, liegen am jeweiligen Locus in der Keimbahn mehrere Varianten mit unterschiedlichen Sequenzen vor. Angegeben ist die Anzahl funktioneller Gensegmente beim Menschen (Murphy u. Weaver 2018). Durch Gen-Umlagerungen werden einzelne Gensegmente zufällig kombiniert, wobei an den Kontaktstellen eine zusätzliche Variation der Nukleotidsequenz auftritt (rot). Die variablen Regionen werden bei der RNA-Prozessierung mit den konstanten Regionen (blau) verbunden. Für die leichte Kette ist als Beispiel der κ -Locus gezeigt. Der λ -Locus besitzt beim Menschen durchschnittlich 31 V-Gene und 4-5 J-Gene (Murphy u. Weaver 2018). CDR: complementarity-determining region, mRNA: messenger ribonucleic acid

Einleitung

Durch die zufällige Kombination der schweren Kette mit einer leichten Kette entsteht eine zusätzliche kombinatorische Vielfalt. Das Repertoire, das durch diese Mechanismen ausgebildet werden kann, wird beim Menschen auf mehr als 10^{11} verschiedene Antikörper geschätzt und wird nur durch die Anzahl der naiven B-Zellen begrenzt (Murphy u. Weaver 2018). B-Zellen, deren Antikörper körpereigene Strukturen erkennen, werden während der Entwicklung entfernt, um die Ausbildung von Autoantikörpern zu vermeiden (zentraler Toleranzmechanismus). Die unreifen B-Zellen, die keine Autoreaktion erzeugen, wandern aus dem Knochenmark in die Peripherie aus und reifen zu naiven B-Zellen. Im Blut des Menschen zirkulieren naive B-Zellen, die membranständige Antikörper als Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (IgM, IgD) und noch keinen Kontakt zu einem Antigen hatten. Trifft eine naive B-Zelle auf ein passendes Antigen wird sie aktiviert, wandert in die äußeren Follikel der lymphatischen Gewebe (Lymphknoten oder Milz) und wartet auf ein, für die weitere adaptive Immunantwort notwendiges, zweites Signal. Trifft die aktivierte B-Zelle, die Teile des Antigens präsentiert, auf eine aktivierte T-Zelle, die dieses Antigen erkennt, treten beide Zellen in direkte Wechselwirkung. Die B-Zelle proliferiert und differenziert zur reifen B-Zelle, die Antikörper vom Typ IgM produziert (Murphy u. Weaver 2018). Mikrobielle Strukturen, wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid, können zu einer T-Zell-unabhängigen Stimulation der aktivierten B-Zellen führen (Cyster u. Allen 2019). Ein Teil der B- und T-Zellen bilden im lymphatischen Gewebe ein Keimzentrum, um eine zusätzliche Affinitätsreifung zu durchlaufen. In dieser Phase werden Mutationen in die Sequenzen der VH und VL eingeführt, die eine veränderte Aminosäuresequenz der Antikörper zur Folge haben. B-Zellen, deren Antikörper nach den Mutationen eine höhere Affinität zum Antigen aufweisen, können den T-Zellen Teile des Antigens effektiver präsentieren und erhalten einen Wachstumsvorteil. B-Zellen mit niedrig affinen Antikörpern oder Mutationen, die der Expression des Antikörpers schaden, werden entfernt. Auf diesem Weg können aus einem B-Zell-Klon mehrere affinitätsgereifte Antikörper hervorgehen (Cyster u. Allen 2019). Nach diesem Reifungsprozess wird durch eine Genumlagerung die VH mit einer CH kombiniert, um einen für die Abwehr des Pathogens passenden Isotyp zu erhalten (IgG, IgA oder IgE). Einige B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, die Antikörper sekretieren, und in das Knochenmark, die

Lymphknoten oder die Milz wandern. Plasmazellen im Knochenmark sind sehr langlebig. Zusätzlich werden B-Gedächtniszellen gebildet, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen mobilisiert werden, um die schnelle Produktion affinitätsgereifter Antikörper einzuleiten (Good-Jacobson u. Tarlinton 2012).

1.2 Anwendung therapeutischer Antikörper in der Krebstherapie

Seit den 1990er-Jahren ist die Anzahl der zu Therapien zugelassenen Antikörper auf mehr als 60 gestiegen, wobei die Mehrheit für die Behandlung von Krebserkrankungen oder Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Multipler Sklerose, eingesetzt wird. Die meisten zugelassenen Immuntherapeutika sind Antikörper vom Isotyp IgG1, doch auch abgewandelte Formate werden entwickelt und eingesetzt (Carter u. Lazar 2018).

1.2.1 Wirkmechanismen therapeutischer IgG1-Antikörper

Die Antigene von IgG1-Antikörpern in der Krebstherapie sind meist Proteine auf der Oberfläche der Tumorzellen. Durch die spezifische Bindung können verschiedene Effektormechanismen vermittelt werden, die von der Struktur und Funktion des Antigens für die Tumorzelle abhängen. Zu den direkten Wirkmechanismen zählen u. a. die Induktion von Zelltod, die Blockierung der Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren auf der Tumorzelle, die Störung der Rezeptor-Liganden-Interaktionen zwischen der Tumorzelle und den Zellen des umgebenden Mikromilieus oder die Blockade inhibierender Interaktionen zwischen Tumorzelle und Immunzellen (Martinelli et al. 2009; Kim et al. 2012). Die indirekten Fc-vermittelten Effektorfunktionen nutzen die Wirkmechanismen des Immunsystems (Nimmerjahn 2013; Biburger et al. 2014). Nach der Bindung auf der Tumorzelle können die Antikörper über den Fc via Bindung an Fc γ R NK-Zellen und neutrophile Granulozyten aktivieren (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Während NK-Zellen zytotoxische Granula mit Perforin und Granzyme freisetzen, um eine Apoptose einzuleiten, lysieren neutrophile Granulozyten die Zelle durch das Erzeugen von Löchern in der Zellmembran (Tropoptosis), was einen nekrotischen Zelltod einleitet (Matlung et al. 2018). Zudem können Antikörper auch die Phagozytose durch Makrophagen (*antibody-dependent cellular*

phagocytosis, ADCP) und eine Lyse der Tumorzelle durch das Komplementsystem (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) einleiten. Um die Fc-vermittelten Effektorfunktionen zu verstärken, wurden Veränderungen der Zuckerstrukturen (*Glyko-Engineering*) und verschiedene Mutationen (*Protein-Engineering*) im Fc-Teil der IgG1 entwickelt, die zu einer stärkeren Bindung an aktivierende Fc γ R auf Immunzellen oder das C1q-Protein der Komplementkaskade führen (Kellner et al. 2017). Der erste klinisch zugelassene Glyko-optimierte IgG1-Antikörper ist Mogamulizumab für die Behandlung von T-Zell-Leukämien/Lymphomen (Beck u. Reichert 2012). Der Antikörper ist nicht-fukosyliert, was zu einer erhöhten Affinität zum CD16a (Fc γ RIIIa) und damit zu einer verstärkten ADCC führt (Yamane-Ohnuki et al. 2004). Mit Tafasitamab (MOR208) für die Behandlung von rezidivierten/refraktären diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen wurde im Jahr 2020 erstmals ein Protein-optimierter IgG1-Antikörper mit Mutationen (S239D und I332E) zur Krebstherapie zugelassen, die die Bindungsaffinität zu Fc γ R erhöhen und die ADCC verstärken (Lazar et al. 2006).

1.2.2 Therapeutische IgG1-Antikörper zur Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen

Unter hämatologischen Krebserkrankungen werden maligne Entartungen von Zellen des Blutes bzw. blutbildenden Systems zusammengefasst. Tumore im lymphatischen System (Knochenmark, Milz oder Lymphknoten) werden als Lymphome bezeichnet. Werden durch unkontrollierte Zellteilung im Knochenmark viele Tumorzellen an das periphere Blut abgegeben, liegt eine Leukämie vor. Des Weiteren kann eine Einteilung nach dem Ursprung der Tumorzellen vorgenommen werden, die aus der myeloischen Linie (Granulozyten oder Monozyten) oder der lymphatischen Linie (B-, T- oder NK-Zellen) stammen können (Greten et al. 2010).

Zur Behandlung verschiedener hämatologischer Krebserkrankungen werden therapeutische IgG1-Antikörper bereits erfolgreich eingesetzt. Rituximab, der im Jahr 1997 als erster IgG1-Antikörper zur Krebsbehandlung zugelassen wurde, bindet CD20 auf B-Zellen und wird bis heute zur Behandlung verschiedener B-Zell-Lymphome eingesetzt. Bei der Anwendung therapeutischer Antikörper, wie Rituximab, können zwar Nebenwirkungen wie *infusion-related reactions* auftreten, in der Regel sind die Behandlungen aber

Einleitung

gut verträglich und haben zur Verbesserung der Therapien verschiedener hämatologischer Krebserkrankungen beigetragen (Salles et al. 2017; Carter u. Lazar 2018).

Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen Einsatz therapeutischer IgG1-Antikörper ist das Multiple Myelom, das von malignen Plasmazellen verursacht wird und den Lymphomen zugeordnet wird (Greten et al. 2010). Die erste Mutation der Tumorzelle, meist eine Hyperdiploidie oder Translokation des Ig-Locus der schweren Kette, tritt bereits in der B-Zelle im Keimzentrum eines Lymphknotens auf (Barwick et al. 2019). Die veränderte B-Zelle differenziert zu einer prä-malignen Plasmazelle und wandert in das Knochenmark ein, wo sie sich, anders als gesunde Plasmazellen, teilen kann. Während der Entwicklung einer *monoclonal gammopathy of undetermined significance* (MGUS) und eines *smouldering multiple myeloma* (SMM), den Vorstufen des Multiplen Myeloms, entzieht sich die Plasmazelle zunehmend der Zellzykluskontrolle und die genetische Instabilität nimmt zu (Abb. 4). Treten, in Folge der verstärkten Proliferation der Plasmazelle, Symptome auf (Knochenläsionen, Anämie, Hyperkalzämie und Nierenschäden) liegt ein voll ausgebildetes Multiples Myelom vor.

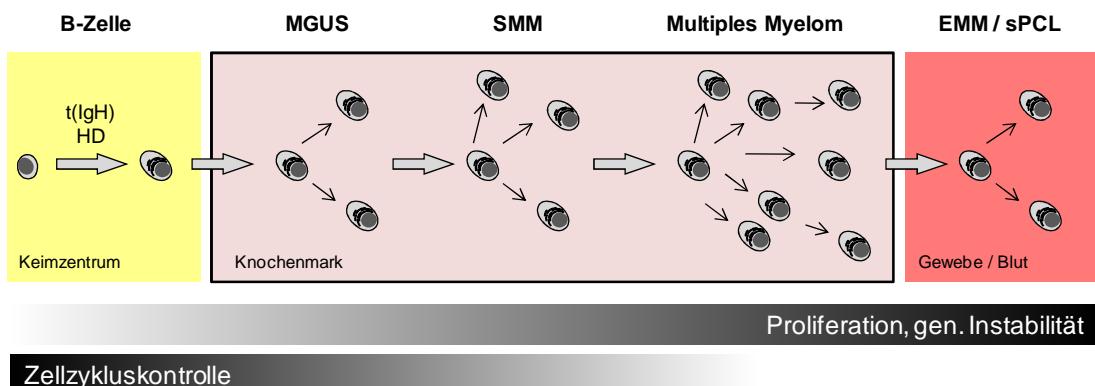


Abb.4 Entstehung und Entwicklung des Multiplen Myeloms.

Während der Entwicklung im Keimzentrum eines Lymphknotens kann eine aktivierte B-Zelle eine initiale Mutation erhalten, meist eine Translokation des Ig-Locus der schweren Kette (t(IgH)) oder Hyperdiploidie (HD). Die nach der Differenzierung ausgebildete prä-maligne Plasmazelle kann sich, anders als gesunde Plasmazellen, teilen und bildet im Knochenmark die Vorstufen des Multiplen Myeloms (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS; *smouldering multiple myeloma*, SMM). Die Zellen entziehen sich zunehmend der Zellzykluskontrolle und die genetische Instabilität nimmt zu. Sobald Symptome auftreten liegt ein voll ausgebildetes Multiples Myelom vor. Wandern die Myelomzellen aus dem Knochenmark in das Gewebe oder das periphere Blut aus, liegt ein extramedulläres Multiples Myelom (EMM) bzw. eine sekundäre Plasmazelleukämie vor (*secondary plasma cell leukemia*, sPCL).

Einleitung

Im weiteren Verlauf der Erkrankung können die Myelomzellen auch unabhängig von der Knochenmarknische wachsen, aus dem Knochenmark auswandern und ein extramedulläres Multiples Myelom in Geweben, wie z.B. Lymphknoten, Haut oder dem zentralen Nervensystem, ausbilden. Ist das periphere Blut betroffen, so liegt eine sekundäre Plasmazellleukämie vor (van de Donk et al. 2014). Mit einer Inzidenz von 6 Fällen auf 100.000 Personen ist das Multiple Myelom die zweit häufigste Blutkrebskrankung in Europa und den USA, wobei das Alter der Patienten bei der Diagnose im Mittel bei 69 Jahren liegt (Röllig et al. 2015). Für die Behandlung des Multiplen Myeloms werden Medikamente mit verschiedenen Wirkmechanismen eingesetzt. Neben Chemotherapeutika, die die starke Proliferation verlangsamen sollen, und Glukokortikosteroiden, die entzündungshemmend wirken, werden seit einigen Jahren auch Proteasom-Inhibitoren, Immunmodulatoren und Histon-Deacetylase-Hemmer klinisch eingesetzt (Bird u. Boyd 2019). Für jüngere Patienten, die keine schweren Nebenerkrankungen vorweisen, besteht zudem die Möglichkeit einer autologen oder allogenen Stammzelltransplantation. Patienten, die für die Belastungen der Stammzelltransplantation nicht geeignet sind, können nur medikamentös behandelt werden. In den meisten Fällen ist das Multiple Myelom nicht heilbar. Nach einer Transplantation und einer folgenden Dauertherapie vergehen im Durchschnitt 4-5 Jahre und ohne Transplantation 1-2 Jahre bis ein Patient rezidiviert und eine neue Behandlung benötigt (Bird u. Boyd 2019). Einen wesentlichen Fortschritt brachten die seit Ende 2015 bzw. Anfang 2016 zugelassenen therapeutischen Antikörper Daratumumab und Elotuzumab. Daratumumab ist ein humarer IgG1-Antikörper, der das Typ II Transmembran-Glykoprotein CD38 bindet, das auf unterschiedlichen Immunzellen und auf einigen nicht-hämatopoetischen Zellen vorkommt. In der B-Zelllinie wird CD38 während der Entwicklung der naiven B-Zellen im Knochenmark und später wieder auf Plasmazellen exprimiert. CD38 ist sowohl ein Rezeptor als auch ein multifunktionelles Enzym auf der Zelloberfläche, das die Reaktionen von NAD⁺ und NADP⁺ zu cADPR/ADPR bzw. NAADP katalysiert, welche die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration regulieren (Malavasi et al. 2008). Auf Myelomzellen wird CD38 vergleichsweise hoch exprimiert (Lin et al. 2004). Daratumumab kann durch die Bindung an CD38 und Kreuzvernetzung programmierten Zelltod der

Einleitung

Myelomzellen auslösen und indirekte Effektormechanismen, wie ADCC, CDC und ADCP, vermitteln (Jansen et al. 2012; de Weers et al. 2011; Overdijk et al. 2012). Zudem konnte in Patienten ein immunmodulatorischer Effekt beobachtet werden, da Daratumumab CD38-positive regulatorische Immunzellen, die die Immunantwort supprimieren, entfernt und dadurch eine Antwort der T-Zellen verstärkt (Krejcik et al. 2016). In klinischen Studien konnte eine effektive Wirkung nachgewiesen werden, sodass Daratumumab für die Erstlinienbehandlung des Multiplen Myeloms in Kombination mit etablierten Präparaten (Proteasom-Inhibitor, Chemotherapeutikum und Glukokortikosteroid) zugelassen ist (Bonello et al. 2019). Insbesondere bei Patienten, die für eine Stammzelltransplantation nicht in Frage kamen, wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von Daratumumab der Anteil der Patienten, die nach zwei Jahren noch progressionsfrei waren, von 30 % auf 60 % stieg (Mateos et al. 2018). Bei refraktären/rezidivierten Myelompatienten kann Daratumumab auch als Monotherapie oder in Kombination sehr effektiv eingesetzt werden (Bonello et al. 2019).

Elotuzumab ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, der das Typ I Transmembran-Glykoprotein CD319 bindet. CD319 gehört zur Familie der *signaling lymphocytic activation molecules* (SLAM), die auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen vorkommen und als Rezeptoren an unterschiedlichen Entwicklungsschritten und Effektorfunktionen von Immunzellen beteiligt sind (Cannons et al. 2011). In der B-Zelllinie wird CD319 während der frühen Entwicklung der naiven B-Zellen im Knochenmark und später wieder auf Plasmazellen hoch exprimiert. Auf den Myelomzellen von mehr als 95 % aller Patienten wird CD319 stark exprimiert (Veillette u. Guo 2013). Elotuzumab vermittelt nach der Bindung an CD319 ADCC (Tai et al. 2008). Zudem wird beschrieben, dass Elotuzumab die Zell-Zell-Kontakte im umgebenden Mikromilieus stört und durch die Bindung von CD319 auf NK-Zellen die zytotoxische Wirkung gegen Myelomzellen fördert (Veillette u. Guo 2013). Für die Behandlung von refraktären/rezidivierten Myelompatienten ist Elotuzumab in Kombination mit etablierten Präparaten (Immunmodulator und Glukokortikosteroid) zugelassen, wobei das progressionsfreie Überleben im Mittel von 15 auf 19 Monate erhöht wurde (Bonello et al. 2019).

Einleitung

Sowohl Daratumumab als auch Elotuzumab sind, im Vergleich zu anderen Therapien beim Multiplen Myelom, gut verträglich. Weitere Antikörper gegen Myelomzellen befinden sich in der präklinischen und klinischen Entwicklung. Die Immuntherapie hat deutlich zu einer Verbesserung der Behandlung des Multiplen Myeloms beigetragen. Trotzdem profitieren weiterhin nicht alle Patienten und die Haupttodesursache bei Myelompatienten bleibt der Tumor, der unter Behandlung Resistenzen gegen etablierte Therapien ausbildet (Köhler et al. 2018; D'Agostino et al. 2019).

1.2.3 Weitere Antikörperformate in der Krebstherapie

Neben den IgG1-Antikörpern werden auch verschiedenste Antikörperformate und Antikörper-abgeleitete Moleküle entwickelt und z.T. bereits klinisch eingesetzt, die unterschiedlichste Eigenschaften haben. Zum Beispiel können Antikörper mit einem Chemotherapeutikum (*antibody-drug conjugate*, ADC) oder einem radioaktiven Isotop (*radioimmunoconjugate*) verknüpft werden. Das jüngste Beispiel für ein ADC ist Belantamab mafodotin, das seit August 2020 zugelassen ist und bei refraktären/rezidivierten Myelompatienten eingesetzt wird (Tzogani et al. 2020). Der humanisierte IgG1-Antikörper ist mit dem Spindelgift Monomethylauristatin F konjugiert und bindet das *B-cell maturation antigen* (BCMA), das spezifisch auf Plasmazellen vorkommt (Tai et al. 2014). Im Gegensatz zu einer klassischen Chemotherapie können die toxischen Substanzen so gezielt gegen Tumorzellen gerichtet werden. Voraussetzung ist jedoch ein möglichst Tumor-spezifisches Antigen, das nach der Bindung des Antikörper-Konjugats effektiv internalisiert wird. Auch weitere Eigenschaften, wie die Art der Verknüpfung oder die Wahl der zytotoxischen Komponente, sind kritische Parameter bei der Entwicklung von Konjugaten (Carter u. Lazar 2018). Andere Antikörperformate wurden entwickelt, um die Rekrutierung von Immunzellen, die nicht über den Fc eines therapeutischen IgG1 aktiviert werden können, zu ermöglichen. Der bispezifische Antikörper Blinatumomab, der zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämien (ALL) der B-Zelllinie eingesetzt wird, bindet sowohl das Antigen CD19 auf B-Zellen als auch das CD3-Molekül auf T-Zellen, die Untereinheit des T-Zell-Rezeptor-Komplexes ist, wodurch die T-Zelle aktiviert und die Tumorzelle durch die Freisetzung zytotoxischer Granula getötet wird (Nagorsen u. Baeuerle 2011; Franquiz u.

Short 2020). Eine weitere Strategie ist der Einsatz von chimären Antigen-Rezeptor-(*chimeric antigen receptor*, CAR)-T-Zellen. Hierbei werden dem Patienten T-Zellen entnommen und genetisch so verändert, dass sie einen künstlichen T-Zellrezeptor mit einem Antikörperfragment gegen ein Antigen auf der Tumorzelle tragen. Diese CAR-T-Zellen werden in den Patienten reinfundiert, um eine gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort zu induzieren (Feins et al. 2019). Die ersten CAR-T-Zellen, die 2017 in den USA zugelassen wurden, richten sich gegen das Antigen CD19 und konnten in klinischen Studien bei der B-Zell-ALL mit einer Remissionsrate von 60 % überzeugen. Jedoch kann diese Behandlungsstrategie auch schwere Nebenwirkungen hervorrufen, wie ein Zytokin-Freisetzungssyndrom oder neurologische Schäden (Sermer u. Brentjens 2019). Zur Behandlung des Multiplen Myeloms werden verschiedene CAR-T-Zellen gegen BCMA getestet. Refraktäre/rezidierte Myelompatienten, die im Mittel bereits 7-8 Therapien erhalten hatten, konnten nach der Behandlung mit BCMA-gerichteten CAR-T-Zellen durchschnittlich 11,8 Monate progressionsfrei leben (Raje et al. 2019). Das erste CAR-T-Zell-Produkt gegen BCMA (bb2121) wird voraussichtlich 2021 zugelassen werden. Jedoch können auch bei der Behandlung mit CAR-T-Zellen Resistenzmechanismen beobachtet werden, die u. a. mit einer Verringerung der BCMA-Expression erklärt werden (Sellner et al. 2020).

Derzeit befinden sich zahlreiche weitere therapeutische Antikörper in klinischen Phasen und die Entwicklung neuer Antikörperformate zum Einleiten einer Immunantwort gegen die Tumorzellen ist Gegenstand aktueller Forschung. Alle Strategien haben gemeinsam, dass sie auf Antikörper gegen möglichst Tumor-spezifische Antigene und die effektive Aktivierung des Immunsystems angewiesen sind, um eine zielgerichtete Therapie ohne schwere Nebenwirkungen zu ermöglichen.

1.2.4 CD64 als Antigen für Immuntherapien

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Blutkrebskrankung, die auf die maligne Transformation von myeloischen Vorläuferzellen zurückzuführen ist, aus denen während der Hämatopoiese u. a. Monozyten/Makrophagen und Granulozyten hervorgehen. CD64 ist häufig auf den Tumorzellen verschiedener AML-Typen zu finden und eignet sich, da es durch

Endozytose und Phagozytose internalisiert wird, als Antigen für die Therapie mit ADCs oder Antikörperfragmenten, an die genetisch Toxine fusioniert wurden (sog. Immunoxin). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die Aufnahme von CD64-gerichteten Immunoxin in Tumorzellen gezeigt werden (Zhong et al. 2001; Tur et al. 2003; Mladenov et al. 2016). Diese Strategie kann auch auf andere Erkrankungen übertragen werden. Chronische Entzündungen, wie z. B. die rheumatoide Arthritis, sind mit fehlerhaft regulierten Makrophagen assoziiert. CD64-gerichtete Immuntherapeutika, die Makrophagen eliminieren, wurden bereits erfolgreich in verschiedenen Tiermodellen eingesetzt (Hristodorov et al. 2012). Klinische Studien wurden noch nicht begonnen.

Antikörper gegen CD64 können jedoch nicht nur zur Erkennung von Tumorzellen sondern auch zur Rekrutierung von Effektorzellen eingesetzt werden, die CD64 exprimieren. So wurden bereits bispezifische Antikörper entwickelt, die ein Antigen auf einer Tumorzelle und CD64 auf neutrophilen Granulozyten binden, um eine Immunantwort gegen die Tumorzelle einzuleiten (Stockmeyer et al. 1997) Erste klinische Studien bispezifischer Antikörper gegen CD64 und den *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu) oder den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), die auf verschiedenen soliden Tumoren vorkommen, zeigten zwar eine gute Verträglichkeit aber bislang kein dauerhaftes Ansprechen der Patienten auf die Behandlung (James et al. 2001; Repp et al. 2003; Fury et al. 2007).

Fc γ R, wie CD64, sind sowohl für die Untersuchung der Wirkung therapeutischer IgG-Antikörper als auch für die Entwicklung von neuen Strategien und Immuntherapeutika von großem Interesse.

1.3 Strategien für die Identifizierung neuer Antikörper

1.3.1 Hybridom-Technologie

Um Antikörper gegen ein definiertes Antigen zu erzeugen und zu identifizieren wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Methoden entwickelt. Nach der Immunisierung eines Versuchstieres mit einem Antigen, enthält das Serum eine Mischung aus Antikörpern, die von verschiedenen B-Zell-Klonen stammen (polyklonal). Eine Methode monoklonale Antikörper aus immunisierten Tieren zu isolieren wurde

erstmals von Georges Köhler und César Milstein mit der Hybridom-Technologie beschrieben, wofür sie 1984 den Nobelpreis erhielten (Köhler u. Milstein 1975). Hierfür wird nach der Immunisierung einer Maus die Milz entnommen, der Zellverband gelöst und die Zellen, unter denen sich antikörperproduzierende B-Zellen befinden, mit murinen Myelomzellen fusioniert. Diese immortalisierten Hybridzellen, Hybridome, werden vereinzelt und die monoklonalen Antikörper, die an den Überstand abgegeben werden, auf Bindung zum Antigen überprüft. Die Hybridom-Technologie wird bis heute erfolgreich genutzt, doch sie hat auch Grenzen. Die gewonnenen Antikörper sind Maus-Antikörper und in dieser Form für den therapeutische Einsatz im Menschen ungeeignet, da eine Immunantwort gegen den fremden Antikörper ausgebildet wird (Legouffe et al. 1994). Auch technische Probleme können auftreten. Die Hybridome sind nicht genetisch rein, da die ungenutzten Ig-Loci beider Zellen im Hybridom verbleiben und während der Kultur Mutationen auftreten können (Bradbury et al. 2018). Zudem werden gegen Antigene, die nur eine sehr schwache Immunantwort erzeugen, nur wenige Plasmazellen ausgebildet, was die Suche nach Bindern erschwert. Gegen toxische Substanzen oder Antigenen, die hoch konserviert sind und auch im Versuchstier vorkommen, können u. U. keine Antikörper generiert werden (Hust et al. 2007).

1.3.1 Phagen-Display-Technologie

Phagen sind Viren, die Bakterien als Wirtse nutzen. Beim Phagen-Display werden Peptide genetisch mit einem Phagen-Hüllprotein fusioniert, wodurch die Phagen die Peptide auf der Oberfläche tragen und die genetische Information für das Fusionsprotein sich im Erbmaterial des Virus befindet. Viruspartikel, die unterschiedliche Peptide tragen, können entsprechend der Eigenschaften der Peptide selektiert und in Bakterien amplifiziert werden, wodurch der Selektionsprozess wiederholt werden kann. Durch den Wechsel aus Selektion und Amplifikation, der als *Panning* bezeichnet wird, werden Peptide mit den gewünschten Eigenschaften angereichert. Die Methode wurde 1985 erstmals vom amerikanischen Biologen George P. Smith beschrieben, der auch den Begriff *Panning* prägte und 2018 zusammen mit Gregory P. Winter den Nobelpreis erhielt (Smith 1985; Parmley u. Smith 1988). Das Phagen-Display wurde in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich

weiterentwickelt und findet eine breite Anwendung. So können z.B. mit Peptid-Banken Interaktionen zwischen Peptiden und Proteinen, wie Enzymen oder Rezeptoren, charakterisiert werden (Wells u. Lowman 1992). Des Weiteren können auch Antikörperfragmente, wie das *single-chain Fragment variable* (scFv), das aus VH, VL und einer Verknüpfung besteht und das kleinste Antikörperformat darstellt, auf Phagen präsentiert werden (McCafferty et al. 1990). Als Phagen werden M13-Bakteriophagen genutzt, an deren Hüllprotein pIII der scFv über eine genetische Verknüpfung fusioniert wird. Da sich der direkte Einbau des scFv in das Erbmaterial des Phagen negativ auf die Amplifikation auswirkt, wurden Plasmide entwickelt, die das scFv-pIII-Fusionprotein kodieren und als einzelsträngige DNA (*single-stranded* DNA, ssDNA) in Phagen verpackt werden. Diese sog. Phagemide, deren Expression reguliert werden kann, erlauben die effiziente und zuverlässige Produktion von scFv-Phagen (Breitling et al. 1991; Dübel et al. 1993) (Abb. 5A). Banken aus Phagemiden, die scFvs mit unterschiedlichen Sequenzen codieren, können in Phagen verpackt werden und beim *Panning* gegen das Antigen selektiert werden, um Phagen, die über den scFv binden, anzureichern (Abb. 5B). Ausgehend von dieser Strategie, wurden weitere Phage-Display-Methoden entwickelt, die sich in der Anzahl der scFvs pro Phage oder dem Antikörperfragment unterscheiden (Kontermann u. Dübel 2010).

Voraussetzung für ein erfolgreiches Antikörper-Phagen-Display sind möglichst diverse Antikörperbanken aus denen verschiedene spezifische Antigenbinder isoliert werden können. Bei synthetischen Banken werden die CDRs bekannter VH- und VL-Sequenzen mutiert, um künstlich eine hohe Diversität zu erzeugen (Shim 2015). Andere Strategien nutzen das natürliche Antikörperrepertoire eines Organismus, indem VH- und VL-Sequenzen aus B-Zellen amplifiziert und zu Antikörperfragmenten kloniert werden. Naive Banken werden aus Organismen generiert, die zuvor nicht immunisiert wurden, wie aus dem gespendeten Blut von Menschen (Frenzel et al. 2017). Immunbanken stammen hingegen in der Regel aus Tieren, die wie bei der Hybridom-Technologie immunisiert worden sind, um eine Immunantwort gegen das Antigen zu erzeugen (Hoogenboom 2005).

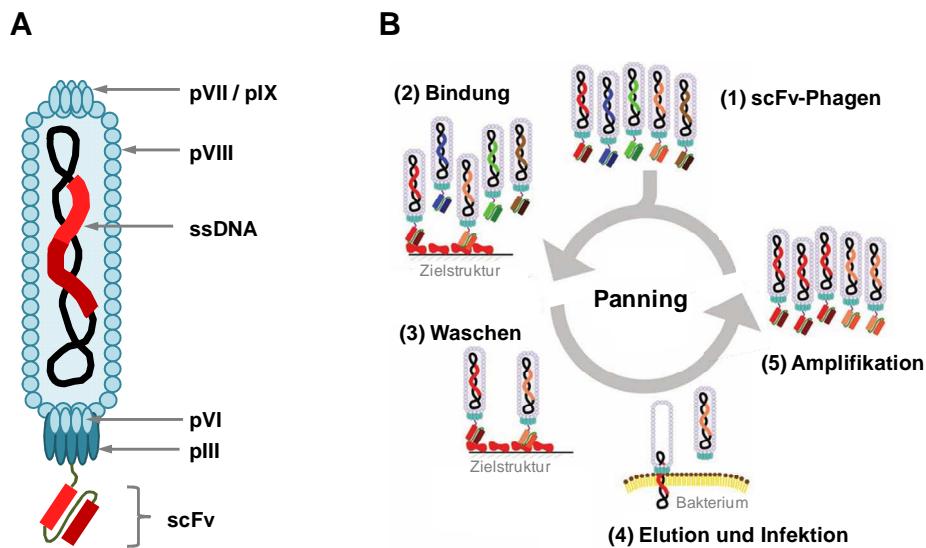


Abb.5 Aufbau eines M13-Phagen mit scFv-pIII-Fusionsprotein und Ablauf eines Pannings.

(A) Filamentöse M13-Bakteriophagen sind einzelsträngige DNA (ssDNA)-Viren, die aus fünf verschiedenen Hülpproteinen aufgebaut sind (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX). Diese Phagen können Bakterien infizieren und sich reproduzieren ohne den Wirt zu töten. Bei den meisten Phagen-Display-Techniken wird ein scFv an das pIII über eine Verknüpfung genetisch fusioniert und durchschnittlich ein scFv pro Phage präsentiert (monovalent). (B) Für ein Panning wird das Antigen z.B. immobilisiert und mit den scFv-Phagen inkubiert (1,2). scFv-Phagen, die nicht binden, werden durch Waschen entfernt (3), die gebundenen scFv-Phagen eluiert und die DNA durch Infektion wieder in Bakterien überführt (4). Mit den infizierten Bakterien können wieder scFv-Phagen hergestellt werden (5). Das Panning lässt sich wiederholen oder die Bakterien für weitere Bindungsanalysen und Sequenzierung vereinzeln. Abbildung verändert nach Schirrmann et al. 2011. scFv: single-chain fragment variable

Für das Antikörper-Phagen-Display können zum *Panning*, neben rekombinanten Antigenen, auch Zellen eingesetzt werden, die das Antigen auf der Oberfläche im natürlichen Kontext exprimieren. Beim subtraktiven, zellulären *Panning* werden durch Depletion mit Antigen-negativen Zellen die Binder entfernt, die nicht das Antigen binden, und mit den verbliebenen scFv-Phagen eine Selektion mit Antigen-positiven Zellen durchgeführt (Peipp et al. 2001) (Abb. 6). Das subtraktive, zelluläre *Panning* kann auch für die Suche nach Tumor-spezifischen Antikörpern genutzt werden. Für die Depletion werden Zellen von gesunden Spendern und für die Selektion Tumorzellen eingesetzt. Infolge der malignen Transformation können andere oder veränderte Antigene auf Tumorzellen auftreten, die sich in post-translationalen Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, und Faltungen von den Membranproteinen der gesunden Zellen unterscheiden. Ein Beispiel hierfür ist unreifer, hoch Mannose-haltiger EGFR, der durch die hohe Expression in der Tumorzelle an die Zelloberfläche gelangt (Johns et al. 2005). Solche spezifischen Unterschiede in Modifikation und Struktur können

Einleitung

mit *Genomics*-, *Transcriptomics*- oder *Proteomics*-Methoden, die Veränderungen auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene vergleichen, nicht direkt gefunden werden (Carter et al. 2004). Mit dem subtraktiven, zellulären *Panning* wurden bereits Antikörper gegen z. B. das *C-Type Lectin-Like Molecule-1* oder die *ATPase family AAA domain containing 3A* isoliert und die Antigene als neue potentielle Zielstrukturen bei der AML identifiziert (Bakker et al. 2004; Geuijen et al. 2005).

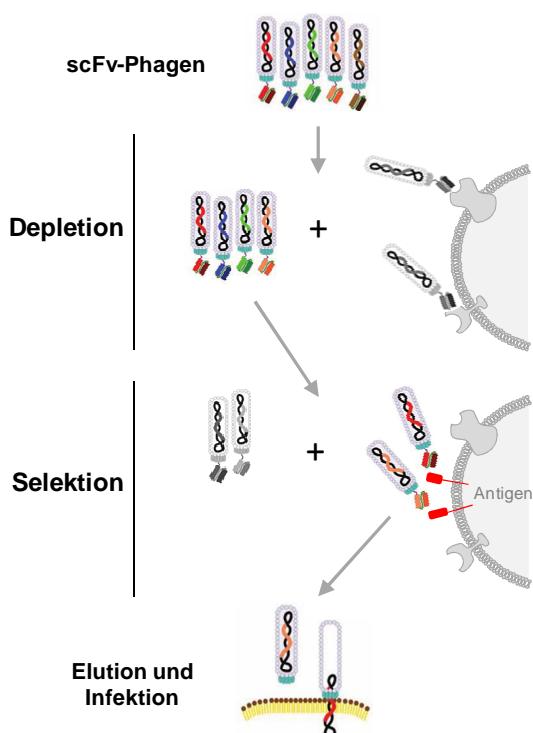


Abb.6 Prinzip des subtraktiven, zellulären Pannings.

Die scFv-Phagen werden zunächst mit Zellen inkubiert, die negativ für das Antigen sind, um die Phagen zu entfernen, die diese Zellen binden (Depletion). Die scFv-Phagen, die nicht gebunden haben, werden in einem zweiten Schritt mit Antigen-positiven Zellen inkubiert und gewaschen, um die scFv-Phagen zu entfernen, die nicht binden (Selektion). Die gebundenen scFv-Phagen werden eluiert und die DNA durch Infektion wieder in Bakterien überführt. Mit den infizierten Bakterien können wieder scFv-Phagen hergestellt werden. Das subtraktive, zelluläre *Panning* lässt sich wiederholen oder die Bakterien nach der Infektion für Bindungsanalysen und Sequenzierung vereinzeln. Abbildung verändert nach Schirrmann et al. 2011. scFv: single-chain fragment variable

1.3.2 Kombination aus Phagen-Display und *Next-Generation-Sequencing*

Seit Mitte der 2000er Jahre wurden verschiedene Methoden für die Hochdurchsatz-Sequenzierung entwickelt, die als *Next-Generation-Sequencing* (NGS) zusammengefasst werden. Durch die technische Weiterentwicklung und sinkende Kosten wurde der Zugang zu solchen Methoden erleichtert, was zu einer breiten Anwendung in verschiedenen Bereichen der Biowissenschaften und Medizin führte (Goodwin et al. 2016). Der Einsatz von NGS in Kombination mit dem Phagen-Display zur Identifizierung von Antikörpern wurde erstmals 2010 von Ravn et al. beschrieben, wobei die Anreicherung bestimmter CDR3-Sequenzen parallel zu Anreicherung bindender Antikörper beobachtet werden konnte (Ravn et al. 2010). In den vergangenen Jahren wurde die Strategie weiterentwickelt.

Antikörperbanken mit unterschiedlichem Ursprung wurden im Phagen-Display eingesetzt und mit verschiedenen NGS-Methoden (Illumina, Ion Torrent, PacBio, 454) analysiert (Rouet et al. 2018). Alle Strategien haben gemeinsam, dass die Antikörperbanken sequenziert (VH oder VH und VL) und charakterisiert werden, um die Veränderung der Zusammensetzung der antigenbindenden Sequenzen durch den *Panning*-Prozess zu untersuchen.

1.4 Ziel der Arbeit

Derzeit befinden sich zahlreiche therapeutische Antikörper und neue Antikörperperformate für die Krebstherapie in der Entwicklung. Alle Strategien haben gemeinsam, dass sie auf effektive Antikörper gegen möglichst Tumorspezifische Antigene angewiesen sind, um eine zielgerichtete Therapie ohne schwere Nebenwirkungen zu ermöglichen. Ein Ziel dieser Arbeit war es mit der Phagen-Display-Technologie und einer subtraktiven, zellulären *Panning*-Strategie aus einer Immunbank neue Antikörper gegen CD64 zu identifizieren, die für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien von Interesse sein könnten. Des Weiteren sollte diese Methodik genutzt werden, um neue Antikörper gegen die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms zu identifizieren, die neue potenzielle Zielstrukturen oder tumorzellspezifische Epitope auf den Tumorzellen erkennen. Die Behandlung des Multiplen Myeloms wurde durch die Immuntherapie bereits deutlich verbessert, doch weiterhin profitieren nicht alle Patienten von den neuen Behandlungsmöglichkeiten und neue Antikörper gegen Tumor-spezifische Antigene auf Myelomzellen werden weiterhin gebraucht.

Um neue Antikörper gegen CD64 und Myelomzellen zu selektieren, sollten Immunbanken aus immunisierten Mäusen generiert und ein subtraktives, zelluläres *Panning*-Protokoll entwickelt werden. Durch begleitendes NGS, das im Rahmen dieses Projekts ebenfalls etabliert werden sollte, sollte die Qualität der Immunbanken überprüft und der *Panning*-Prozess auf Sequenz-Ebene im Detail überwacht werden, um einen tiefen Einblick in die Diversität der Immunbanken und die Anreicherungen von Antikörpern durch das *Panning* zu erhalten. Die identifizierten, neuen Antikörper sollten hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert und ausgewählte Kandidaten funktionell analysiert werden, um das therapeutische Potentail der neuen Antikörper zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Tab.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Sitz
Autoklav	VX-150	Systec, Linden
Durchflusszytometer	Navios 10/3	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Elektrophoresekammer (Agarose)	Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektrophoresekammer (PAGE)	Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektroporationssystem	STX	MaxCyte, Gaithersburg, MD, USA
Elektroporator	Micro Pulser	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gasbrenner	gasprofi 2 SCS	WLD-TEC, Arenshausen
Gel-Dokumentation	E.A.S.Y 440K	HeroLab, Wiesloch
Heizblock	block heate	Bibby Scientific, Stone, UK
Inkubator für Zellkultur	Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge	MegaFuge 10 R	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
<i>Live-Cell Analysis System</i>	Incucyte	Sartorius, Göttingen
<i>LSC & Luminescence Counter</i>	MicorBeta TriLux 1450	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Magnetrührer	RCT basic	IKA, Staufen im Breisgau
MilliQ-Anlage	MilliQ A10	Merck, Darmstadt
Mini-Zentrifuge	Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
pH-Meter	HI2215 pH/ORP	HANNA instruments, Vöhringen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt
<i>Plate-Reader</i>	Rainbow	Tecan, Männedorf, CH
Roller	SRT1 stuart	Cole-Parmer, Stone, UK
Schüttelinkubator	HT infors	Infors HT, Einsbach
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus, Hanau
<i>SYBR-Green-Tisch</i>	Safe Imager	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Thermo-Cycler</i>	PTC-200	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	SYAV 3020	Syngene, Cambridge, UK
Vortexer	Bio Vortex V1	Schmidt, Wien, AU
Waage	XB 2200 C Precisa	PESA, Wetzikon, CH
Wasserbad	Julabo 13	Julabo, Seelbach

Tab.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Sitz
4 - 5 % Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gele	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Dounce-Homogenisator	Schott, Mainz
Drigalskispatel	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegskalpell	Feather, Osaka, J
Elektroporationsküvette für Bakterien	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektroporationsküvette für CHO	MaxCyte, Gaithersburg, MD, USA
Gel-Gies-Vorrichtung (PAGE)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Glasflaschen	Schott, Mainz
Glasplatten und Kämme (PAGE)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Kolben	Schott, Mainz
Kulturflaschen für Makrophagen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Material und Methoden

Kulturflaschen für Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturschalen für Agar-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Messzylinder	Kartell, Noviglio, I
Mikrotiterplatten für Counter	Perkin Elmer, Watham, MA, USA
Mikrotiterplatten für ELISA	Corning, Corning, NY, USA
Monovette (für Serum)	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette (mit Citrat)	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauerzählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Poly-Prep Säule	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen für Durchflusszytometer	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Ultrafiltrationssäulen Vivaspin 20	Sartorius, Göttingen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb (70 µm)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugationsgefäße (250 ml, PPCO)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tab.3 Chemikalien und Kits

Material	Hersteller, Sitz
100 bp DNA Ladder	Carl Roth, Karlsruhe
2xYT	Carl Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe
ABTS-Puffer (10x)	Roche, Basel, CH
ABTS-Tabletten	Roche, Basel, CH
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Lonza, Basel, CH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
BD Difco TC Yeasolate, UF	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
CD OptiCHO Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Cell-Dissociation-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CH1-Matrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CHO CD Efficient Feed A Stock Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Coomassie	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie, Steinbach (Taunus)
Dithiothreitol (DTT) 100 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNA-Ladepuffer (6x)	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix (je 10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP-Mix (je 25 mM)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Elektroporationspuffer	MaxCyte, Gaithersburg, MD, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Ladepuffer (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glykogen (20 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe
Halt Proteaseinhibitor-Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Intratect	Biotest Pharma, Dreieich
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Lymphoflot	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
M13KO7-Helferphage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Mach1 E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF)</i>	PeproTech, Cranbury, NJ, USA
Magnesiumsulfat (25 mM)	VWR, Radnor, PA, USA
Monocyte-Attachement-Medium	PromoCell, Heidelberg
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat (3 M, pH 5,2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchromat in PBS ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
n-Butanol	Carl Roth, Karlsruhe
<i>NucleoBond PC 2000 EF Mega Kit</i>	Machery Nagel, Düren
<i>NucleoBond Xtra Maxi Kit</i>	Machery Nagel, Düren
<i>NucleoSpin Mini Kit</i>	Machery Nagel, Düren
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
oligo(dT) ₁₅	Roche, Basel, CH
<i>Optiphase</i>	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphate-Buffered Saline (PBS, 10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphate-Buffered Saline (PBS, 1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
phrodo	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Pierce BCA Protein Assay</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pluronic F-68	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polyethyenglycol (PEG)-6000	Carl Roth, Karlsruhe
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
Reagent Kit v2 / v3	Illumina, San Diego, CA, USA
RNasin Ribonukleaseinhibitor	Promega, Fitchburg, WI, USA
Salzsäure (1 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Super Optimal Broth (SOC)-Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>SYBR Green I</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tetracyclin	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylenthylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
<i>XL1 Blue E. coli</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
X-VIVO 15	Lonza, Basel, CH
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tab.4 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
10xMOPS	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 0,01 M EDTA pH 7,0 mit NaOH
2xYT-Agar-Platten	3,1 % (m/v) 2xYT 1,8 % (m/v) Agar
2xYT-Medium	3,1 % (m/v) 2xYT
50xTAE-Puffer	0,2 M TRIS (pH 7,4 mit Essigsäure) 50 mM EDTA
5xLadepuffer für SDS-PAGE (nicht-reduzierend)	312,5 mM TRIS (pH 6,8 mit HCl) 10 % (m/v) SDS 25 % (v/v) Glycerin 0,5 % (m/v) Bromphenolblau
5xLadepuffer für SDS-PAGE (reduzierend)	312,5 mM TRIS (pH 6,8 mit HCl) 10 % (m/v) SDS 25 % (v/v) Glycerin 0,5 % (m/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
ABTS-Substrat-Lösung	5 ml 10xABTS-Puffer 45 ml destilliertes Wasser 1 ABTS-Tablette
Blocking-Puffer für Phagen-Display	4 % (m/v) BSA in PBS
Blocking-Puffer für Phagen-ELISA	0,1 M Natriumhydrogencarbonat (pH 8,5 mit NaOH) 1 % (m/v) BSA
Blocking-Puffer für zellulären ELISA	4 % (m/v) BSA in PBS
Blocking-Puffer für Zytometer	4 % (m/v) BSA in PBS
Elutionspuffer	0,1 M Glyzin pH 3,0 mit HCl
Feed Stock	140 ml CHO CD Efficient Feed A Stock Solution 28 ml Yeastolate Stock Solution 24,8 ml Glucose (450 g/l) 7 ml GlutaMAX
Neutralisationspuffer	1 M TRIS pH 8 mit HCl
PBA-Puffer	1 % (m/v) BSA in PBS 0,1 % (m/v) NaN3
PEG/NaCl-Lösung	20 % (m/v) PEG-6000 2,5 M NaCl
Produktionsmedium	CD OptiCHO Medium mit 1 % (v/v) Pluronic F-68 1 % (v/v) GlutaMAX 1 % (v/v) HT supplement
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS pH 6,8 mit HCl
SB-Medium	30 g/l Trypton 20 g/l Hefeextrakt 10 g/l MOPS pH 7,0 mit NaOH
SDS-PAGE-Laupuffer	25 mM TRIS 0,1 % (m/v) SDS 200 mM Glyzin
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS pH 8,0 mit HCl
TRIS/HCl-Puffer	1 M TRIS pH 7,5 mit HCl
Trypsin-Lösung	50 mM TRIS (pH 7,4 mit HCl) 1 mM CaCl ₂ 10 mg/ml Trypsin

Material und Methoden

Wasch-Puffer für Phagen-Display	2 % (m/v) BSA in PBS
Wasch-Puffer für Phagen-ELISA	0,1 % (m/v) BSA in PBS 0,1 % (v/v) Tween 20
Wasch-Puffer für zellulären ELISA	0,1 % (m/v) BSA in PBS
X-VIVO-Medium	X-VIVO 15 0,5 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung
Yeastolate Stock Solution	167 g/l BD Difco TC Yeasolate, UF

Tab.5 Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller, Sitz
<i>Ascl</i> -Restriktionsenzym	10x <i>CutSmart</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>BsrGI</i> -Restriktionsenzym	10x <i>NEBuffer 2.1</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>HindIII</i> -Restriktionsenzym	10x <i>NEBuffer 2.1</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>NheI</i> -Restriktionsenzym	10x <i>CutSmart</i> oder 10x <i>NEBuffer 2.1</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>NotI-HF</i> -Restriktionsenzym	10x <i>CutSmart</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>PmeI</i> -Restriktionsenzym	10x <i>NEBuffer 2.1</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>PpuMI</i> -Restriktionsenzym	10x <i>CutSmart</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>Pwo</i> -Polymerase	10x <i>Pwo</i> -Puffer	VWR, Radnor, PA, USA
RNase H	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>SfiI</i> -Restriktionsenzym	10x Puffer M	Roche, Basel, CH
<i>SuperScript II</i>	5x <i>First-Strand</i> Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
T4-Ligase	10x Ligase-Puffer	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>Taq</i> -Polymerase	10x <i>Pwo</i> -Puffer	VWR, Radnor, PA, USA

Tab.6 Primer

Zusätzliche Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen, Verknüpfungen, Adapter oder Index sind unterstrichen.

R = A, G; Y = C, T; M = A, C; K = G, T; S = C, G; W = A, T; H = A, C, T; B = C, G, T; V = A, C, G; D = A, G, T

Name	Sequenz (5' → 3')
VH for	TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGAKGTRMAGCTTCAGGAGTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGAGGTBCAGCTBCAGCAGTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGAAGSARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTYCAGCTBCAGCARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTYCARCTGCAGCAGTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTCCACGTGAAGCARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTCAASSTGGTGGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGAASSTGGTGGAGTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGCAGSTGGTGGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAKGTGCAMCTGGTGGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGAAGCTGATGGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGCARCTTGTGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGARGTRAAGCTCTCGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAAGTGAARSTTGAGGARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTTACTCTRAAASARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGGTCCAACTVCAGCARCC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGATGTGAACCTGGAAASARTC TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGAAGGTATCGARTC
VH rev	TTACTCGCGCCCCCGAGGCCGGCCGCCACCAACAGAACACCACCCACCGAGGAAACGGTGACCGTGGT TTACTCGCGCCCCCGAGGCCGGCCGCCACCAACAGAACACCACCCAGGAGACTGTGAGAGTGT TTACTCGCGCCCCCGAGGCCGGCCGCCACCAACAGAACACCACCCAGAGACAGTGACCAGAGT TTACTCGCGCCCCCGAGGCCGGCCGCCACCAACAGAACACCACCCAGGAGACGGTACTGAGGTT
VL for	TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATCCAGCTGACTCAGCC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTGTTCTCAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTGTMACTCAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTGTRACACAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTGTRATGACMCAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTMAGATRAMCCAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTAGATGAYDCAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTAGATGACACAGAC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTGTTCTCAWCCAGTC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTGWGCTSACCCAATC TTACTCGCGCCCCAGCCGGCCGGCGGCCGGCGGCCGGCGCTCCGAYATTSTRATGACCCARTC

Material und Methoden

	TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGCGGCCGCGGCCGCGCTCCGAYATTGTGATGACBCAGKC TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGCGGCCGCGGCCGCGCTCCGAYATTGTGATAACYCAGGA TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGCGGCCGCGCTCCGAYATTGTGATGACCCAGWT TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGCGGCCGCGCTCCGAYATTGTGATGACACAACC TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGCGGCCGCGCTCCGAYATTGTGACTCAGTC TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGCGGCCGCGCTCCGATGCTGTTGACTCAGGAATC
VL rev	TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGACGTTKATTTCAGCTTGG TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGACGTTTATTCCAACTTTG TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGACGCTTCAGCTCAGCTTGG TTACTCGCGGCCCAAGCCGGCCGGCGGCCGACCTAGGACAGTCAGTTGG
NGS for	Adapter-Index-Adapter-CGGCAGCCGCTGGATTGTTATTAC
NGS rev	Adapter-Index-Adapter-CGAGGAAACGGTGACCGTGGT Adapter-Index-Adapter-CGAGGAGACTGTGAGAGTGGT Adapter-Index-Adapter-CGCAGAGACAGTGACCGAGT Adapter-Index-Adapter-CGAGGAGACGGTGACTGAGGT
Sang VH	CGTATGTTGTGAAATTGTGAGCGG
Sang VL	CATAGCCCCCTTATTAGCCTTGGC
CMV	GGTAGGCCTGTACGGTGGGAGG
REV	TTCCCTCATTTATTAGGAAAGGACAGTGGG
Fc back1	GCTCTCCACTCCACGGCAGTCGC
Fc back2	CGTCCACGTACCAGTTGAACCTGACCTCAGG

Tab.7 Plasmide

Name	Eigenschaften	Herkunft
pUC19-MSC2017	pUC19 mit veränderter <i>Multiple Cloning Site</i> (MCS)	Etabliert in Arbeitsgruppe
pAK100	myc-Tag-Sequenz zwischen scFv und pIII	A. Plückthun, Biochemisches Institut, Universität Zürich, Schweiz
pJB12	Schnittstelle für Trypsin zwischen scFv und pIII	(Krebber et al. 1997; Konermann u. Dübel 2001)
pSEC-4D5-VH-CH-IgG1	konstanter Teil der schweren Kette von IgG1	Etabliert in Arbeitsgruppe
pSEC-RTX-VL-CL	konstanter Teil der leichten Kette (kappa)	Etabliert in Arbeitsgruppe

Tab.8 Antikörper

Antikörper	Antigen	Format	Spezies	Hersteller, Sitz
anti-BCMA-PE	BCMA	IgG2a	Maus	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-FGFR3-PE	FGFR3	IgG1	Maus	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti-Kaninchchen-IgG-FITC	Kan. IgG	F(ab') ₂	Esel	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
anti-IL-6R-PE	IL-6R	IgG1	Maus	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti-kappa-FITC	CL kappa	F(ab') ₂	Ziege	SouthernBiotec, Birmingham, AL, USA
anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase	M13-Phagen	IgG1	Maus	Creative BioMart, Shirley, NY, USA
anti-Maus-IgG-FITC	Maus IgG	F(ab') ₂	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
anti-Mensch-IgG-FITC	Mensch IgG	F(ab') ₂	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
anti-myc-Fab	myc-Tag	Fab (kappa)	Mensch	Abnova, Taipeh, Taiwan
anti-Phagen-Kaninchenserum	fd-Phagen	IgG-Fraktion	Kaninchchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BI-505	CD54	IgG1	Mensch	eigene Produktion
CD138-PE	CD138	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD19-PC5	CD19	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

Material und Methoden

CD319-PE	CD319	IgG1	Mensch	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD38-FITC	CD38	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD3-PC5	CD3	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD40-PE	CD40	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD45-ECD	CD45	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD47-IgG2 σ mit Fc knock-out	CD47	IgG2	humanisiert	eigene Produktion
CD4-FITC	CD4	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD54-FITC	CD54	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD54-PE (HA58)	CD54	IgG1	Maus	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD56-PE	CD56	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD64-FITC	CD64	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD70	CD70	IgG1	Maus	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
CD7-IgG2 σ mit Fc knock-out	CD7	IgG2	chimär	eigene Produktion
CD8-PE	CD8	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Cetuximab	EGFR	IgG1	chimär	Bristol-Meyer Squibb, New York City, NY, USA
Daratumumab	CD38	IgG1	Mensch	Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ
Elotuzumab	CD319	IgG1	humanisiert	Bristol-Meyer Squibb, New York City, NY, USA
Isotypkontrolle-ECD	-	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Isotypkontrolle-FITC	-	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Isotypkontrolle-PC5	-	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Isotypkontrolle-PE	-	IgG1	Maus	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Isotypkontrolle-PE	-	IgG1	Mensch	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Isotypkontrolle-PE	-	IgG2a	Maus	BioLegend, San Diego, CA, USA
Isotypkontrolle-PE	-	IgG1	Maus	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Rituximab	CD20	IgG1	chimär	Hoffmann-La Roche, Basel, CH
Trastuzumab	HER2	IgG1	humanisiert	Hoffmann-La Roche, Basel, CH

Tab.9 Zellkulturmaterialien und Medien

Material	Hersteller, Sitz
Accutase	PAN-Biotech, Aidenbach
CD CHO Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) inklusive Phenolrot, D-Glucose (4,5 g/l) und L-Glutamin (0,58 g/l)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (D-PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EBM-2 Basal Medium	Lonza, Basel, CH
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Geneticin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>HT supplement</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Humanes Interleukin-6 (hIL-6)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hygromycin B	Carl Roth, Karlsruhe
Maus Interleukin-3 IS (mIL-3)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Penicillin und Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Puromycin	InvivoGen, San Diego, CA, USA
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 inklusive Phenolrot, HEPES (25 mM) und L-Alanyl-L-Glutamin (0,446 g/l)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Material und Methoden

SingleQuots Supplements

Lonza, Basel, CH

Tab.10 Zelllinien

Medium entsprechend der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), der *American Type Culture Collection* (ATCC) oder des Herstellers

Name	Zelltyp	Medium	Herkunft
BA/F3	B-Zelle (Maus)	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S + 10 ng/ml mIL-3	ATCC
BA/F3 [CD64]	stabil transfizierte BA/F3	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S + 10 ng/ml mIL-3 + 5 µg/ml Puromycin	University Medical Center, Utrecht, NL
L-363	Plasma-Zell-Leukämie (Mensch)	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S	DSMZ
HUVEC	Endothelzellen der Nabelschnurvene (Menschen)	EBM-2 Basal Medium + <i>SingleQuots Supplements</i>	Lonza, Basel, CH (CC-2519)
INA-6	Plasma-Zell-Leukämie (Mensch)	RPMI + 20% FBS + 1 % P/S + 10 ng/ml hIL-6	(Burger et al. 1998)
U-266	Plasma-Zell-Leukämie (Mensch)	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S	DSMZ
RAJI	Burkitt-Lymphom (Mensch)	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S	DSMZ
DAUDI	Burkitt-Lymphom (Mensch)	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S	DSMZ
GRANTA-519	B-Zell-Lymphom (Mensch)	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	DSMZ
CEM	T-Zell ALL (Mensch)	RPMI + 10% FBS + 1 % P/S	ATCC
CHO-K1	Ovarien (Hamster)	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	DSMZ
CHO [BCMA]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 50 µg/ml Hygromycin B	eigene Produktion
CHO [CD138]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 50 µg/ml Hygromycin B	eigene Produktion
CHO [CD319]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 100 µg/ml Geneticin	eigene Produktion
CHO [CD38]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 100 µg/ml Geneticin	eigene Produktion
CHO [CD40]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 50 µg/ml Hygromycin B	eigene Produktion
CHO [CD54]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 50 µg/ml Hygromycin B	eigene Produktion
CHO [CD56]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 100 µg/ml Geneticin	eigene Produktion
CHO [CD70]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 50 µg/ml Hygromycin B	eigene Produktion
CHO [FGFR3]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 50 µg/ml Hygromycin B	eigene Produktion
CHO [IL-6R]	stabil transfizierte CHO	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 100 µg/ml Geneticin	eigene Produktion
FreeStyle CHO-S	Ovarien (Hamster), Suspensionszellen	CD CHO Medium + 1 % HT + 1 % GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (R800-07)

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung muriner scFv-Immunbanken

2.2.1.1 Immunisierung von Mäusen

Für die Generierung der Immunbanken wurden immunkompetente Mäuse mit Antigen-tragenden Zellen immunisiert. Für die Immunbank, aus der CD64-Antikörpern isoliert werden sollten, wurden von unseren Kooperationspartnern im Labor für Translationale Immunologie am *University Medical Center Utrecht* $1,5 \times 10^6$ CD64-transfizierte Zellen (*ImmunoTherapy Immunization* Zellen, ITi) intravenös in C57BL/6-Mäuse injiziert und die Injektion viermal wiederholt, um die Immunantwort zu verstärken. Für die Generierung der Myelom-Immunbank, aus der Antikörpern gegen Myelomzellen isoliert werden sollten, wurden in unserem Labor 1×10^6 Plasmazellen eines Patienten mit sPCL intraperitoneal in BALB/c-Mäuse injiziert und die Injektion dreimal wiederholt. Antikörper gegen die Zielzellen im Blut der Mäuse wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen. Vier Tage nach der letzten Injektion wurden die Milzen entnommen, in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80°C gelagert.

Der Tierversuch wurde nach den Richtlinien der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (Tierversuchsantrag Az: V312-72241.121-4(94-8/11)). Die schriftliche Zustimmung des Spenders wurde gemäß der Erklärung von Helsinki eingeholt und die Forschung von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (Ethikantrag Az: D408/08).

2.2.1.2 RNA-Präparation aus den Milzen immunisierter Mäuse

Die Milz einer Maus mit hohem Antikörper-Titer wurde zu 6 ml TRIzol in einen *Dounce-Homogenisator* gegeben, auf Eis bis zum vollständigen Aufschluss des Gewebes homogenisiert und 5 min bei 21°C inkubiert. Je 1 ml der erhaltenen Suspension wurde in Reaktionsgefäß gegeben, 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Emulsion nach kräftigem Mischen für 3 min bei 21°C inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 4°C und $12.000 \times g$ wurde die obere, klare Phase abgenommen und jeweils in neue

Material und Methoden

Reaktionsgefäß überführt. Je 500 µl Isopropanol wurden hinzugefügt und die Ansätze nach 10 min bei 21 °C wieder zentrifugiert (10 min, 12.000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden verworfen und die Präzipitate in den Reaktionsgefäßten mit je 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen (10 min, 12.000 x g, 4 °C). Nach dem Trocknen (15 min, 21 °C) wurden die Präzipitate in je 20 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und 10 min auf 55 °C erwärmt. Die Lösungen wurden vereint und die Konzentration der RNA spektroskopisch über die Absorption bei 260 nm ermittelt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Um die Qualität der RNA zu ermitteln, wurde eine RNA-Agarosegel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit Formaldehyd durchgeführt. Pro Gel (100 ml) wurden durch Erhitzen 1 g Agarose in 72 ml destilliertem Wasser gelöst und auf 60 °C gekühlt. Anschließend wurden 10 ml 10xMOPS-Laupuffer und 18 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung zugegeben, die Lösung gemischt und das Gel gegossen. Pro Probe wurden 2 µg RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 4 µl aufgefüllt, 8 µl 2xFormaldehyd-Ladepuffer und 4 µl 100 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und die Ansätze 10 min bei 65 °C erhitzt. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und eine Spannung von 80 V angelegt. Nach 1 h wurde eine Aufnahme des Gels unter UV-Licht angefertigt.

2.2.1.3 cDNA-Synthese

Pro Ansatz wurden 10 µg RNA und 1 µg oligo(dT)₁₅ mit Nuklease-freiem Wasser auf 28 µl aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl RNase-Inhibitor (RNasin, 40 U/µl), 10 µl 5xReaktionspuffer, 3 µl dNTP-Mix (je 25 mM), 5 µl DTT (100 mM) und 2 µl Reverse Transkriptase (*SuperScript II*, 200 U/µl) zugegeben und der Ansatz 10 min bei 21 °C, 50 min bei 42 °C und 5 min bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 4 °C wurde dem Ansatz 1 µl RNase (RNase H, 1 U/µl) zugefügt und die Mischung für 20 min auf 37 °C erwärmt. Zur Kontrolle wurde parallel ein Ansatz mit Nuklease-freiem Wasser statt der Reversen Transkriptase mitgeführt.

2.2.1.4 PCR der variablen Regionen

Für die Amplifikation der VH und der VL wurden Primer-Mixe (VH *for*, VH *rev*, VL *for* und VL *rev*) entwickelt (Tab. 6). Die *Forward*-Primer (*for*) binden die

verschiedenen V-Gensegmente der VH bzw. VL am 5'-Ende und die Reverse-Primer (*rev*) binden die J-Gensegmente der VH bzw. VL am 3'-Ende, wodurch die unterschiedlichen V-Regionen, die nach der Rekombination gebildet werden, amplifiziert werden können (Krebber et al. 1997). Zudem besitzen die Primer zusätzliche Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen und der Verknüpfungssequenz mit denen die PCR-Produkte in den folgenden Klonierungen zu scFv zusammengesetzt werden können.

Die PCR der VH und VL wurden parallel durchgeführt. Für eine V-Region wurden jeweils 3 Ansätze angefertigt. Pro Ansatz wurden zu 29 µl Nuklease-freiem Wasser 5 µl 10xReaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 4 µl MgSO₄ (25 mM), 2 µl DMSO, 1 µl *Forward*-Primer-Mix (je 100 µM) und 1 µl *Reverse*-Primer-Mix (je 100 µM) gegeben. Jedem Ansatz wurden 5 µl cDNA-Synthese-Produkt und 2 µl Polymerase-Mix (*Pwo*- und *Taq*-Polymerase im Verhältnis 5:1) hinzugefügt. Die Proben wurden in einen auf 92 °C vorgeheizten *Thermo-Cycler* überführt und das PCR-Programm gestartet. Um die *Annealing*-Temperaturen der unterschiedlichen Primer zum *Template* abzudecken, wurde die PCR mit einem Gradienten begonnen. Hierfür wurden die drei Ansätze während der *Annealing*-Phase die ersten fünf Zyklen für 1 min parallel bei 45 °C, 50 °C und 55 °C inkubiert:

5x [1 min, 92 °C | 1 min, 45 °C – 55 °C | 1 min, 72 °C]

Für die weiteren Zyklen wurde die *Annealing*-Temperatur auf 63 °C gestellt. Nach den ersten fünf Zyklen stand genug PCR-Produkt als *Template* für weitere Reaktionen zur Verfügung, an das alle Primer ähnlich binden.

20x [1 min, 92 °C | 1 min, 63 °C | 1 min, 72 °C]

Nach Abschluss der PCR wurden die VH- bzw. VL-Reaktionen jeweils vereint, die Proben auf Agarose-Gele aufgetragen und die Banden, welche der Größe der VHs bzw. VLs entsprachen (ca. 400 bp), ausgeschnitten. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle wurden parallel zwei Ansätze mitgeführt, denen statt cDNA Nuklease-freies Wasser oder Material aus der cDNA-Synthese ohne Transkriptase zugegeben worden war.

2.2.1.5 Klonierung von VH/VL-Banken

Die aufgereinigten PCR-Produkte (VHs und VLs) und 1 µg Vektor pUC19-MSC2017 (Derivat von pUC19, Tab. 7) wurden jeweils mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 44 µl aufgefüllt, 5 µl 10xReaktionspuffer und 1 µl *Sfil*-Enzym (10 U/µl) zugefügt und die Ansätze 16 h bei 50 °C inkubiert. Nach Abschluss der Reaktionen wurden die Proben auf Agarose-Gele aufgetragen und die Banden, welche der Größe der PCR-Produkte (ca. 400 bp) bzw. des linearisierten Vektors (2.888 bp) entsprachen, ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die VH- und VL-Fragmente, die *Inserts* der folgenden Ligationen, wurden mit Ethanol gefällt. Beide Ansätze wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 90 µl eingestellt bevor 10 µl Natrium-Acetat (3 M, pH 5,2), 1 µl Glykogen-Lösung (20 µg) und 250 µl eiskaltes Ethanol zugegeben wurden. Nach 16 h bei -20 °C wurden die Lösungen zentrifugiert (4 °C, 16.000 x g, 20 min) und die gefällte DNA mit 70%iger Ethanol-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen (15 min, 21 °C) wurden die Präzipitate in 5 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Der linearisierte Vektor wurde nicht gefällt. Die Konzentration der gereinigten PCR-Produkte und des linearisierten Vektors wurden spektroskopisch über die Absorption bei 260 nm ermittelt. Für die Ligation wurden *Insert* (jeweils VHs oder VLs) und Vektor in einem molaren Verhältnis von 5:1 gemischt, mit Nuklease-freiem Wasser auf 17 µl aufgefüllt, 2 µl 10xLigase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (2.000 Cohesive-End-Ligation-Unit/µl) zugegeben. Beide Ansätze wurden für 16 h bei 16 °C inkubiert und im Anschluss für 10 min auf 65 °C erhitzt. Um die im Puffer enthaltenen Salze vor der Elektroporation zu entfernen, wurde jeder Ansatz mit 200 µl n-Butanol gemischt, zentrifugiert (21 °C, 25.000 x g, 5 min) und die Präzipitate zweimal mit 70%iger Ethanol-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen (15 min, 21 °C) wurde die DNA in 12 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Pro Ligation wurden drei Elektroporationen parallel durchgeführt. Je 4 µl der Ligationen wurden zu 50 µl elektrokompetenten *XL1-blue E. coli* gegeben, 1 min auf Eis inkubiert und der Ansatz in eine gekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm Weite) überführt. Nach der Elektroporation (1,8 kV) wurden die Bakterien zügig in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Die Bakterien aus den drei

Elektroporationen wurden vereint, 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und auf 15 2xYT-Agar-Platten (15 cm Durchmesser) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Zudem wurde eine Verdünnungsreihe mit den Bakterien angefertigt, um die Anzahl der transformierten Bakterien (*colony-forming units*, CFU) zu ermitteln. Nach 16 h bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien mit 2xYT-Medium gründlich abgespült und die Plasmide mit dem *NucleoBond Xtra Maxi Kit* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers präpariert. Die Konzentrationen wurden, wie zuvor beschrieben, spektroskopisch ermittelt. Zur Kontrolle wurden 18 Bakterienkolonien in 3 ml Medium aufgenommen, 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und mit dem *NucleoSpin Mini Kit* von Macherey-Nagel Plasmidpräparationen durchgeführt. Die Plasmide wurden, wie oben beschrieben, mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I verdaut und auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um den Anteil von Plasmiden mit VH- bzw. VL-*Insert* als Kontrolle für die Klonierungseffizienz zu ermitteln.

2.2.1.6 Klonierung von scFv-Immunbanken

Je 1 µg Plasmid (pUC19-MSC2017-VH und pUC19-MSC2017-VL) wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 43,5 µl aufgefüllt, 5 µl 10xReaktionspuffer, 1 µl *Ascl*-Enzym (10 U/µl) und 0,5 µl *Not*I-HF-Enzym (20 U/µl) zugefügt und die Ansätze 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der Reaktionen wurden die Proben auf Agarose-Gele aufgetragen. Die Banden, welche der Größe des VL-PCR-Produktes (ca. 400 bp) und der des linearisierten pUC19-MSC2017-VH (ca. 3.200 bp) entsprachen, wurden ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Das VL-Fragment wurde als *Insert* und der linearisierte pUC19-MSC2017-VH als Vektor in der folgenden Ligation eingesetzt. Die Fällung des *Inserts*, die Ligation und die Elektroporation wurden, wie unter 2.2.1.5 beschrieben, durchgeführt mit dem Unterschied, dass eine Ligation auf sechs Elektroporationen aufgeteilt wurde. Nach 16 h bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien mit 2xYT-Medium gründlich abgespült und die erhaltenen pUC19-MSC2017-scFv Plasmide mit dem *NucleoBond Xtra Maxi Kit* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers präpariert. Die Konzentration wurde, wie zuvor beschrieben, spektroskopisch ermittelt. Zur Kontrolle der Ligationseffizienz wurden erneut

Plasmide aus 18 Bakterienkolonien präpariert und ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I durchgeführt.

Für die finale Klonierung wurden 1 µg pUC19-MSC2017-scFv und 1 µg *Phagemid* (pAK100 oder pJB12, Tab. 7) mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 44 µl aufgefüllt, 5 µl 10xReaktionspuffer und 1 µl *Sfi*-Enzym (10 U/µl) zugefügt und die Ansätze 16 h bei 50 °C inkubiert. Nach Abschluss der Reaktionen wurden die Proben auf Agarose-Gele aufgetragen. Die Banden, welche der Größe des scFv-Fragments (ca. 700 - 800 bp) und des linearisierten *Phagemids* (pAK100: 4.322 bp bzw. pJB12: 5.312 bp) entsprachen, wurden ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Fällung, Ligation und Elektroporation wurde nach dem oben aufgeführten Protokoll durchgeführt, wobei das scFv-Fragment dem *Insert* und das linearisierte *Phagemid* dem Vektor entsprach. Zudem wurden 2xYT-Agar-Platten mit 1 %-(m/v) Glucose, 10 µg/ml Tetracyclin und 30 µg/ml Chloramphenicol eingesetzt. Nach 16 h bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien mit 2xYT-Medium gründlich abgespült. Ein Viertel der Bakteriensuspension wurde genutzt, um die *Phagemide* mit dem *NucleoBond Xtra Maxi Kit* von Macherey-Nagel für spätere NGS-Analysen zu präparieren. Die verbliebene Suspension wurde zentrifugiert (4 °C, 1.900 x g, 20 min), das *Pellet* in Einfriermedium (2xYT-Medium mit 20 %-(v/v) Glycerol) aufgenommen und auf Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der Ligationseffizienz wurden erneut Plasmide aus 18 Bakterienkolonien präpariert und ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I durchgeführt.

2.2.2 Phagen-Display

2.2.2.1 Präparation von Phagen

Für das *Panning* wurden scFv-Phagen aus den Bakterien der Immunbanken präpariert. Dafür wurden 500 ml SB-Medium mit 1 %-(m/v) Glucose, 30 µl/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetracyclin mit einem Aliquot der Immunbank auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt und bis zu einer Dichte von mindestens 0,5 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. 50 ml der Kultur wurden in ein auf

37 °C vorgewärmtes Reaktionsgefäß überführt und 25 µl einer 1 M IPTG-Lösung hinzugefügt. Die Konzentration der Bakterien wurde berechnet (OD_{600nm} von 1 entspricht 1×10^9 Bakterien/ml) und ein 20-facher Überschuss an M13KO7-Helperphagen zugegeben. Ein Helperphage kodiert die Proteine, die für die Bildung von Phagen benötigt werden und nicht auf den *Phagemiden* pAK100 und pJB12 kodiert sind. Nach 30 min bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln wurde die Suspension vollständig zu 500 ml SB-Medium mit 1 %-(m/v) Glucose, 30 µl/ml Chloramphenicol und 0,5 mM IPTG gegeben. Nach 1,5 h unter Schütteln bei 37 °C wurde Kanamycin mit einer finalen Konzentration von 25 µg/ml hinzugefügt und der Ansatz 20 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Zentrifugationsgefäße verteilt und bei 3.830 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt, mit einem Viertel des Volumens PEG/NaCl-Lösung gründlich gemischt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 12.400 x g wurde der Überstand verworfen, das weiße Phagen-Präzipitat getrocknet und in 4 ml PBS gründlich resuspendiert. Die erhaltene Phagen-Lösung wurde bei 21 °C und 25.000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand mit den Phagen in neue Gefäße überführt. Der Lösung wurden 0,02 %-(m/v) Natriumazid und Halt-Proteaseinhibitor zugefügt und die Phagen bei 4 °C gelagert.

Der Titer der Phagen wurde ermittelt, indem die Anzahl der infektiösen Phagen bestimmt wurde. 2xYT-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin wurde mit *XL1-blue E. coli* auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt und bis zu einer Dichte von mindestens 0,5 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde mit den präparierten Phagen eine Verdünnungsreihe von 1:10² bis 1:10¹⁰ angefertigt. Jeweils 10 µl einer Verdünnungsstufe wurden zu 100 µl Bakteriensuspension gegeben, 30 min bei 37 °C inkubiert und auf einer 2xYT-Agar-Platte mit 1 %-(m/v) Glucose, 30 µl/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetracyclin verteilt. Nach 16 h bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl der CFU pro ml berechnet.

2.2.2.2 Subtraktives, zelluläres *Panning*

Die für die Depletion verwendeten Zellen (2×10^7 untransfizierte BA/F3-Zellen oder 1×10^8 Blutzellen eines gesunden Spenders) wurden in 2 ml *Blocking*-Puffer aufgenommen und 30 min bei 4 °C unter Rollen inkubiert. 10^{12} CFU

Phagen wurden zur Suspension gegeben und das Volumen mit *Blocking*-Puffer auf 4 ml aufgefüllt. Nach 2 h bei 4 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (1.900 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand entweder für eine weitere Depletion genutzt oder für die Selektion auf Antigen-positiven Zellen verwendet.

Für die Selektion wurden 2×10^6 Zielzellen (CD64-transfizierte BA/F3-Zellen oder Myelomzellen) in 500 µl *Blocking*-Puffer aufgenommen und 30 min bei 4 °C unter Rollen inkubiert. Die Zielzellen wurden mit den depletierten Phagen gemischt und 2 h bei 4 °C unter Rollen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit kaltem Wasch-Puffer und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (300 x g, 4 min, 4 °C). Für die saure Elution der Phagen mit pAK100-*Phagmiden* wurden die Zellen in 1,5 ml 50 mM-HCl-Lösung aufgenommen, 10 min bei 21 °C inkubiert und mit einem 1 M-TRIS/HCl-Puffer (pH 7,5) neutralisiert. Für die Elution der Phagen mit pJB12-*Phagmiden* wurden die Zellen in 1,5 ml 1 mg/ml-Trypsin-PBS-Lösung aufgenommen und 10 min bei 21 °C unter Rollen inkubiert. Die Hüllproteine der M13-Bakteriophagen sind unter beiden Bedingungen stabil.

Nach der Elution wurden die Zellen sedimentiert (18.000 x g, 10 min, 21 °C). Parallel wurde 2xYT-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin mit *XL1-blue E. coli* auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt und bis zu einer Dichte von mindestens 0,5 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Der Überstand mit den Phagen wurde zu 10 ml Bakteriensuspension gegeben und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 1.900 x g und 4 °C zentrifugiert und das *Pellet* in 2 ml 2xYT-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde auf 10 2xYT-Agar-Platten (15 cm Durchmesser) mit 1 %-(m/v) Glucose, 30 µl/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetracyclin ausplattiert. Zudem wurde eine Verdünnungsreihe der Bakterien angerichtet, um die Anzahl der CFU nach dem *Panning* zu ermitteln und Bakterienkolonien zu vereinzeln. Nach 20 h bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien mit 2xYT-Medium gründlich abgespült. Ein Viertel der Bakteriensuspension wurde genutzt, um die *Phagemide* mit dem *NucleoBond Xtra Maxi Kit* von Macherey-Nagel für NGS-Analysen zu präparieren. Die verbliebene Suspension wurde zentrifugiert (4°C, 1.900 x g, 20 min), das *Pellet* in Einfriermedium (2xYT-Medium mit 20 %- (v/v) Glycerol)

aufgenommen, in flüssigen Stickstoff gegeben und für ein weiteres *Panning* bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Präparation von Phagen aus vereinzelten Bakterienkolonien

Um monoklonale scFv-Phagen zu analysieren wurden Phagen aus vereinzelten Bakterienkolonien präpariert. Je 4 ml 2xYT-Medium mit 1 %-(m/v) Glucose, 30 µl/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetracyclin wurde mit den Bakterien einer Kolonie inkubiert und bis zu einer Dichte von 0,5 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. In jeden Ansatz wurden 2×10^{10} Plaque-bildende Einheiten (*plaque-forming units*, PFU) Helperphage gegeben und die Bakterien 30 min ohne Schütteln und 30 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension bei 4 °C und 1.900 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 5 ml 2xYT-Medium mit 1 %-(m/v) Glucose, 30 µl/ml Chloramphenicol, 0,5 mM IPTG und 25 µg/ml Kanamycin aufgenommen. Nach 20 h unter Schütteln bei 37 °C wurden die Bakteriensuspension bei 4 °C und 3.350 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand mit den Phagen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Überprüfung des Phagen-Titers erfolgte im *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Eine Mikrotiterplatte wurde für 16 h bei 4 °C mit anti-Phagen-Kanninchenserum (IgG-Fraktion, 1:100 in 0,1 M Natriumhydrogen-carbonat-Puffer mit pH 8,5) beschichtet und für 1 h bei 37 °C mit *Blocking*-Puffer inkubiert. Je 1 µl Bakterienüberstand wurden zu 100 µl PBS in eine Vertiefung gegeben und 1 h auf 4 °C gekühlt. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit Wasch-Puffer gespült die gebundenen Phagen mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase (1:5000) markiert. Die Detektion erfolgte mit ABTS-Substrat und die Absorption wurde bei 405 nm gemessen (Referenzwellenlänge: 492 nm). Zum Vergleich wurde eine Verdünnungsreihe einer Phagen-Lösung mit bekanntem Titer angefertigt und im ELISA mitgeführt.

2.2.2.4 Bindungsanalyse der Phagen im Durchflusszytometer

Die Bindung von scFv-Phagen auf Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen. Je 5×10^5 Zellen wurden bei 4 °C 30 min mit *Blocking*-Puffer und 1 h mit 10^{11} CFU Phagen inkubiert und dreimal mit *protein blocking agent* (PBA) gewaschen (4 °C, 9.300 x g, 30 sec). Im Fusionsprotein liegt zwischen

dem scFv und dem pIII ein myc-Tag. Die Zellen wurden mit anti-myc-Fab (kappa, 40 µg/ml) 1 h bei 4 °C inkubiert und nach drei Waschschritten erfolgte die Detektion mit anti-kappa-FITC (1:20). Alternativ wurden die Phagen mit anti-Phagen-Kanninchenserum (IgG-Fraktion, 1:100, 1 h bei 4 °C) und mit anti-Kaninchen-IgG-FITC (1:100, 1 h bei 4 °C) detektiert. Vor der Messung am Navios der Firma Beckman Coulter wurden die Zellen erneut gewaschen und mit einer 1 %igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

2.2.2.5 Bindungsanalyse von Phagen im ELISA

Die Analyse der Bindung der scFv-Phagen erfolgte in zellulären ELISA. Je 10^6 Zellen wurden bei 4 °C 30 min mit *Blocking*-Puffer und danach 1 h mit 10^9 CFU Phagen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen (4 °C, 530 x g, 20 min) und mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase (1:2000) 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit ABTS-Substrat für 30 min und die Absorption wurde bei 405 nm gemessen (Referenzwellenlänge: 492 nm).

2.2.3 Sequenzierungen

2.2.3.1 *Next-Generation-Sequencing* der VH

Die Sequenzierungen der Immunbanken erfolgte mit dem MiSeq-System der Firma Illumina in Kooperation mit der Sektion für Hämatologische Spezialdiagnostik am UKSH. Die maximal erreichbare Länge einer Sequenzierung mit dem MiSeq-System liegt bei 500-600 bp, weshalb die Sequenzierung auf die VH-Region beschränkt wurde. Als Ausgangsmaterial wurden aus Bakterien präparierte *Phagemide* eingesetzt, deren VH-Region mit einer PCR amplifiziert wurde, um die benötigten Adapter und einen Index hinzuzufügen. Der *Forward*-Primer (NGS for) liegt 5' von der VH auf dem *Phagemid* und die *Reverse*-Primer (NGS rev) sind ein Mix, der die unterschiedlichen J-Gene der VH bindet (Tab. 6). Für die folgende Sequenzierung der Fragmente wurden, je nach benötigter Anzahl der Sequenzierreaktionen, das *Reagent Kit v2* oder *v3* nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Die VH-Sequenzdaten wurden in das FASTQ-Format überführt und die unterschiedlichen Nukleotidsequenzen mit der ARResT/Interrogate-Plattform, die von der Sektion für Hämatologische

Spezialdiagnostik betrieben wird, ausgewertet. Für jede VH-Sequenz wurden die V-, D-, J-Gensegmente bestimmt und die Verbindungsregion charakterisiert, an der alle drei Gene aufeinander treffen und wo die CDR3 gebildet wird. Mit diesen Daten können VH-Sequenzen in Gruppen zusammengefasst werden: Ein Klonotyp ist eine V/D/J-Kombination mit einer einzigartigen Verbindungsregion, die auf eine charakteristische Umlagerung in einem B-Zell-Klon zurückgeführt werden kann. Mit der Anzahl der VH-Sequenzen, die einem Klonotyp zugeordnet werden, kann die Häufigkeit in der Immunbank, die Frequenz, berechnet und die Diversität der VH-Klonotypen ermittelt werden. Mathematisch wird die Diversität mit der effektiven Anzahl der Arten (*effective number of species*, ENS) erfasst, die mit der Shanon-Entropie (H) berechnet werden kann (Jost 2006). In diesem Zusammenhang beschreibt die Diversität die Anzahl unterschiedlicher VH-Klonotypen (S) unter Berücksichtigung der Frequenzen (p):

$$ENS = \exp(H) = \exp\left(-\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)\right)$$

Eine hohe Diversität bedeutet viele unterschiedliche Klonotypen, die gleichmäßig verteilt sind, also eine hohe Vielfalt. Die Verteilung der Frequenzen wird mit der Gleichmäßigkeit und Dominanz beschrieben. Die Gleichmäßigkeit, die ebenfalls mit der Shanon-Entropie berechnet wird, wird mit einem Score angegeben und wie folgt berechnet (Pielou 1966):

$$Score = \frac{H}{H_{max}} = \frac{-\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)}{\ln(S)}$$

Ein Wert von 1 entspricht einer völlig gleichmäßigen Verteilung, bei der jeder Klonotyp gleich oft auftritt. Mit einer sinkenden Gleichmäßigkeit der Verteilung sinkt auch der Score. Die Dominanz wird mit dem Anteil des häufigsten Klonotyps (p_{max}) an allen VH-Sequenzen beschrieben (Berger u. Parker 1970):

$$p_{max} = \max(p_i)$$

Um die Vergleichbarkeit der Werte trotz unterschiedlich tiefer Sequenzierungen sicherzustellen, wurden für die Berechnungen die gleiche Anzahl VH-Sequenz-Stichproben zufällig aus den Sequenzdatensätzen gezogen. Um die Datenmengen zu verwalten, wurden mit *SQLite 3.28.0*

lokale Datenbanken erstellt (Hipp et al. 2019). Die Auswertung erfolgte mit Programmen in der Sprache *Python*, die unter der Anwendung der Pakete *pandas* 0.25.3 (McKinney 2010), *Biopython* 1.75 (Cock et al. 2009) und *Matplotlib* 3.1.1 (Hunter 2007) geschrieben wurden.

2.2.3.2 Sanger-Sequenzierung der scFv

Die Sanger-Sequenzierung der scFv erfolgte im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Pro scFv wurden zwei Sequenzierreaktionen mit Primern, die 5' von der VH bzw. 3' von der VL liegen, angesetzt (Sang VH und Sang VL, Tab. 6). Die erhaltenen VH- und VL-Sequenzen wurden in das FASTQ-Format überführt und ebenfalls mit der *ARResT/Interrogate*-Plattform ausgewertet, um Sanger- und NGS-Daten direkt miteinander vergleichen zu können. Für jede Sequenz wurden die V-, (D)-, J-Gensegmente bestimmt, die CDR3 charakterisiert und der Klonotyp der VH und der VL eines scFv ermittelt. Die weitere Auswertung erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben mit Programmen in *Python*.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen mit PBA gewaschen ($4\text{ }^\circ\text{C}$, $9.300 \times g$, 30 sec) und in je $100\text{ }\mu\text{l}$ PBA aufgenommen. Für die Färbung von Zellen mit FcRs wurden die Zellen vor der Zugabe der Detektionsantikörper 10 min mit humanem Immunglobulin (Intratect, $500\text{ }\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Fluorochrom-markierte Antikörper gegen Oberflächenproteine wurden entsprechend der Angaben der Hersteller verdünnt und zugegeben (Tab. 8). Antikörper ohne Fluorochrom-Markierung wurden in einem zweiten Schritt mit einem sekundären Fluorochrom-markierten Antikörper gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers detektiert (Tab. 8). Nach 1 h bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen mit PBA gewaschen und in je $500\text{ }\mu\text{l}$ PBA aufgenommen. Die Messung erfolgte am Navios Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter.

2.2.4.2 Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in den von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfohlenen oder vom Hersteller

vorgegebenen Medien kultiviert und entsprechend passagiert (Tab. 10). Die Expression der Zielproteine auf der Oberfläche von stabil transfizierten Zelllinien wurden vor jedem Versuch im Durchflusszytometer mit den entsprechenden und in Tab. 8 aufgelisteten Antikörpern kontrolliert.

2.2.4.3 Aufreinigung von Leukozyten aus Blut

Die schriftliche Zustimmung wurde von allen Spendern gemäß der Erklärung von Helsinki eingeholt und die Forschung von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Ethikantrag Az: D 467/15) genehmigt. Je 30 ml peripheres Blut wurden in Citrat-Monovetten von gesunden Spendern genommen. Um Leukozyten aus peripherem Blut zu reinigen wurden zwei Erythrozyten-Lysen durchgeführt. Zu jeweils 5 ml Vollblut wurden 40 ml destilliertes Wasser (4 °C) und nach 30 sec 4,5 ml 10xPBS gegeben. Nach vorsichtigem Invertieren wurde die Suspension zentrifugiert (4 °C, 540 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Lyse der Erythrozyten wurde wiederholt, die Zellen vereint, mit 50 ml PBS gewaschen (4 °C, 540 x g, 5 min) und in 25 ml PBS aufgenommen. Thrombozyten und Bestandteile des Serums wurden durch das Waschen überwiegend entfernt. Eine Probe wurde entnommen, die Zellen mit Trypanblau-Lösung gefärbt und die Zellzahl und Vitalität mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Überprüfung der Zusammensetzung wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt: Leukozyten, die als CD45-positive Population detektiert wurden, wurden entsprechend dem Vor- und Seitwärtsstreulicht (*forward/side scatter*) in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterschieden. Die Population der Lymphozyten wurde mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmarker zusätzlich in CD4-T-Zellen (CD3+, CD4+), CD8-T-Zellen (CD3+, CD8+), B-Zellen (CD19+) und NK-Zellen (CD56+, CD3-) unterschieden.

2.2.4.4 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus Blut

Zur Aufreinigung von mononukleären Zellen (*mononuclear cells*, MNCs) aus peripherem Blut wurden *Leukoreduction-System-Chambers* (LRSCs) aus dem Blutspendezentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein verwendet, deren Spender der Verwendung ihres Restmaterials für die

Forschung zugestimmt hatten. Der Inhalt einer LRSC wurde mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und je 10 ml der Suspension auf 20 ml Lymphoflot-Gradientenlösung gegeben. Nach 20 min Zentrifugation bei 850 x g, 21 °C und ohne Bremse wurden die Zellschichten mit den MNCs abgenommen und in einem Röhrchen vereint. Nach zwei Waschschriften mit je 50 ml PBS (4 °C, 540 x g, 5 min) wurden die Zellen in 25 ml PBS aufgenommen und durch ein 70 µm-Zellsieb gegeben. Zellzahl und Vitalität wurde mit Trypanblau-Lösung und mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.5 Produktion und Reinigung des chimären CD38-Antikörpers

Die Nukleotidsequenzen der VH und VL, die in das IgG1-Antikörperformat kloniert werden sollten, wurden um Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Nhel* und *PpuMI* (VH) bzw. *Nhel* und *HindIII* (VL) erweitert und die Sequenzen als *Standard Gene* von der Firma Eurofins Genomics, Hamburg, Deutschland, in pEX-Vektoren geliefert. Für die Klonierung der VH wurden 5 µg pEX-VH und 2 µg pSEC-4D5-VH-CH-IgG1 (schwere Kette) mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 43 µl aufgefüllt, 5 µl 10x*CutSmart*, 1 µl *Nhel*-Enzym (10 U/µl) und 1 µl *PpuMI*-Enzym (10 U/µl) zugefügt und die Ansätze 16 h bei 37 °C inkubiert. Für die Klonierung der VL wurden 5 µg pEX-VL und 2 µg pSEC-RTX-VL-CL (leichte Kette) mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 43 µl aufgefüllt, 5 µl 10x*NEBuffer 2.1*, 1 µl *Nhel*-Enzym (10 U/µl) und 1 µl *HindIII*-Enzym (20 U/µl) zugefügt und die Ansätze 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Proben auf Agarose-Gele aufgetragen und die Banden, welche der Größe der variablen Regionen (VH: 440 bp; VL: 390 bp) und der Vektoren mit den konstanten Bereichen eines humanen IgG1 (pSEC-CH-IgG1: 6.550 bp; pSEC-CL: 6.000 bp) enthielten, ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Für die Ligationen wurden je 10 µl Eluat der variablen Regionen und 7 µl Eluat der Vektoren mit den entsprechenden konstanten Regionen gemischt. Je 2 µl 10xLigase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (2.000 Cohesive-End-Ligation-Unit/µl) wurden zugegeben und die Ansätze 16 h bei 4 °C inkubiert. Pro Ligation wurden 4 µl des Ansatzes zu kompetenten *Mach1 E.coli* gegeben und die chemische Transformation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bakteriensuspensionen

Material und Methoden

wurden auf 2xYT-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicilin ausplattiert und 16 h bei 37 °C inkubiert. Pro Ligation wurden 10 einzelne Bakterienkolonien in 3 ml 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicilin aufgenommen, 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und mit dem *NucleoSpin Mini Kit* von Macherey-Nagel Plasmidpräparationen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Plasmide mit der schweren Kette mit dem Enzym *BsrGI* (10 U/µl) und die Plasmide mit der leichten Kette mit den Enzymen *BsrGI* (10 U/µl) und *Pmel* (10 U/µl) verdaut (je 10 U in 50 µl bei 37 °C für 16 h). Fragmente bei 700 bp für die leichte Kette bzw. 1100 bp für die schwere Kette bestätigten den Erfolg der Klonierung. Mit den Primern CMV und REV für die leichte Kette und den Primern CMV, REV, Fc *back1* und Fc *back2* für die schwere Kette (Tab. 6) wurden Sanger-Sequenzierungen, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, durchgeführt. Mit den Bakterienkulturen, die Expressionsplasmide mit korrekter Sequenz trugen, wurden 500 ml 2xYT-Medium mit 100 µl/ml Ampicilin inkokuliert und 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmide wurden mit dem *NucleoBond PC 2000 EF Mega Kit* der Firma Machery-Nagel Endotoxin-frei präpariert und die Konzentration, wie zuvor beschrieben, spektroskopisch ermittelt.

Der rekombinante Antikörper wurde in CHO-S-Zellen produziert. Die gleichzeitige Transfektion der CHO-S-Zellen mit den Expressionsplasmiden für die schwere und die leichte Kette erfolgte mit dem STX Elektroporationssystem der Firma MaxCyte. Pro Ansatz wurden 10 Elektroporationen durchgeführt. Für eine Elektroporation wurden 80×10^6 Zellen mit Elektroporationspuffer gewaschen und das Pellet gelöst. Zu der dichten Zellsuspension wurden 120 µg Plasmid in Wasser (1:1-(m/m) leichte und schwere Kette) gegeben, um ein Volumen von maximal 400 µl zu erhalten. Die Zellsuspension wurde in eine 400 µl-Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen aus den 10 Elektroporationen wurden in einem Kolben gesammelt und nach 40 min bei 37 °C mit 150 ml Produktionsmedium versetzt. Nach 24 h bei 37°C unter Schütteln wurden 5,25 ml *Feed Stock* und 150 µl 1 M-Natriumbutyrat-Lösung zugegeben und die Temperatur auf 32 °C verringert. Nach weiteren 48 h wurden alle 24 h 5,25 ml *Feed Stock* hinzugefügt bis die Vitalität der Zellen unter 50 % sank. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 21°C, 540 x g) und der

Überstand mit den produzierten Antikörpern abgenommen. Die Antikörper wurden affinitätschromatographisch mit CH1-Matrix aufgereinigt, wobei die Matrix zum Zellüberstand gegeben (2 ml Matrix / 1 l Überstand) und bei 4 °C für 16 h unter Rühren inkubiert wurde. Die Suspension wurde auf 50 ml Reaktionsgefäß verteilt, zentrifugiert (845 x g, 10 min, 4 °C) und in einer Poly-Prep-Säule vereint. Die Matrix wurde zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend für 2 min mit 1 ml Elutionspuffer inkubiert. Das Eluat wurde in einem Reaktionsgefäß, in dem 250 µl Neutralisationspuffer vorgelegt wurde, aufgefangen. Die Elution wurde ohne Inkubation viermal wiederholt. Um die Fraktionen, die den rekombinanten Antikörper enthielten, zu bestimmen, wurde je 12 µl Probe entnommen und eine Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurden Proben jeder Fraktion unter reduzierenden Bedingungen mit 5xLadepuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf ein Gel (10%) aufgetragen, das nach 1,5 h bei 120 V mit Coomassie-Lösung gefärbt wurde. Fraktionen mit dem rekombinanten Antikörper wurden vereint, dreimal für 16 h gegen PBS dialysiert und in einer Vivaspin 20 Ultrafiltrationssäule auf 1 ml eingeengt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem *Pierce BCA Protein Assay* nach den Angaben des Herstellers ermittelt und die Reinheit mit einer SDS-PAGE überprüft, die mit 6 µg wie oben beschrieben unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde. Die Bindung des neuen Antikörpers an Antigen-positive Zellen wurde im Durchflusszytometer, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, überprüft.

2.2.6 Funktionelle Analyse des CD38-Antikörpers

2.2.6.1 Messung der ADCC und CDC im Zytotoxizitätsassay

6×10^5 Tumorzellen wurden für 2 h bei 37 °C mit 100 µCi radioaktiver Natriumchromat-Lösung ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) inkubiert und anschließend dreimal mit Medium gewaschen. Je 5.000 Tumorzellen wurden zusammen mit MNCs im Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 80:1 bzw. mit 50 µl humanem Serum (25 %-(v/v)) in Triplikaten für 4 h bei 37 °C mit unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (850 g, 3 min) und je 25 µl Überstand mit 125 µl *Optiphase Szintillationsmix* für 15 min bei 21 °C unter Schütteln gemischt. Die

Szintillation und damit indirekt die radioaktive Strahlung in den Überständen wurde mit dem *MicorBeta TriLux 1450 LSC & Luminescence Counter* gemessen. Um die maximale und basale Freisetzung als *counts per minute* (cpm) zu ermitteln, wurden ein Ansatz mit 2 %-Triton-X-100-Lösung (*maximal release*, MR) und ein Ansatz in Abwesenheit von Antikörpern (*basal release*, BR) mitgeführt. Die Berechnung der prozentualen Lyse erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Lyse (\%)} = \frac{\text{cpm(Probe)} - \text{cpm(BR)}}{\text{cpm(MR)} - \text{cpm(BR)}} \cdot 100 \%$$

2.2.6.2 Messung der ADCP im *Live Cell Imager*

Für die Messung der ADCP wurden Makrophagen aus MNCs generiert. 50×10^6 MNCs wurden in 5 ml *Monocyte-Attachement*-Medium aufgenommen, in eine Kulturflasche gegeben, 30 min bei 37 °C inkubiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurde zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, 5 ml X-VIVO-Medium hinzugefügt und nach 24 h 1 µl *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF, 250 µg/ml) dazugegeben. Alle 3 Tage wurden die Zellen mit frischem X-VIVO-Medium mit M-CSF versorgt. Nach 11 Tagen wurden die Makrophagen mit PBS gewaschen, pro Flasche mit 5 ml *Cell-Dissociation*-Puffer für 60 min inkubiert und die Zellen mit vorsichtigem Schaben abgelöst. Nach der Zentrifugation (21 °C, 540 x g, 5 min) wurden die Makrophagen in 5 ml X-VIVO-Medium aufgenommen, gezählt und 100 µl mit je 40.000 Makrophagen in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Die Tumorzellen wurden mit pHrodo für 1 h nach Angaben des Herstellers gefärbt, dreimal mit Medium gewaschen, gezählt und im Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 1:1 mit 10 µg/ml Antikörpern zu den Makrophagen gegeben. Die Messung der Phagozytose der Tumorzellen erfolgte mittels *Live Cell Imaging* und Quantifizierung der *Red Cell Counts per Image* mit dem IncuCyte der Firma Sartorius nach den Vorgaben der Herstellers für 12 h alle 20 min.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung muriner scFv-Immunbanken

Für die Identifizierung neuer Antikörper gegen CD64 und Myelomzellen wurden scFv-Immunbanken aus Mäusen generiert, die mit Antigentragenden Zellen immunisiert worden waren. Für die Immunbank, aus der CD64-Antikörper isoliert werden sollten, wurden von unseren Kooperationspartnern im Labor für Translationale Immunologie am *University Medical Center Utrecht*, Niederlande, die Immunisierungen und die RNA-Präparation durchgeführt. Die RNA aus der Milz der Maus mit dem höchsten Antikörpertiter wurde für die Erstellung der Antikörperbank verwendet. Für die Immunbank, aus der Antikörper gegen Myelomzellen isoliert werden sollten, wurden in unserem Labor BALB/c-Mäuse mit Myelomzellen eines Patienten mit einer sPCL immunisiert. Der Titer im Serum der Mäuse wurde durchflusszytometrisch mit den Tumorzellen dieses Patienten ermittelt. Im Vergleich zum Serum einer Maus, die nicht immunisiert worden war, konnten im Blut der immunisierten Mäuse Antikörper gegen die Myelomzellen detektiert werden (Abb. 7B). Die RNA der Milz der Maus mit dem höchsten Titer wurde präpariert und die Qualität mit einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft. Zwei Banden sind zu erkennen, die der ribosomalen RNA (28S und 18S) zugeordnet werden können und eine Intaktheit der RNA bestätigen (Abb. 7C). Die RNA beider Banken wurde anschließend mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann der Amplifikation der variablen Regionen der Maus-Antikörper diente (Abb. 7A). Mit einer VH- bzw. VL-PCR wurden etwa 400 bp große Fragmente produziert, die den VHs oder VLs entsprachen (Abb. 7D,E). Die Fragmente wurden in den Vektor pUC19-MCS2017 kloniert, um zunächst separate Banken mit VHs bzw. VLs zu erhalten (pUC19-MSC2017-VH und pUC19-MCS2017-VL).

Ergebnisse

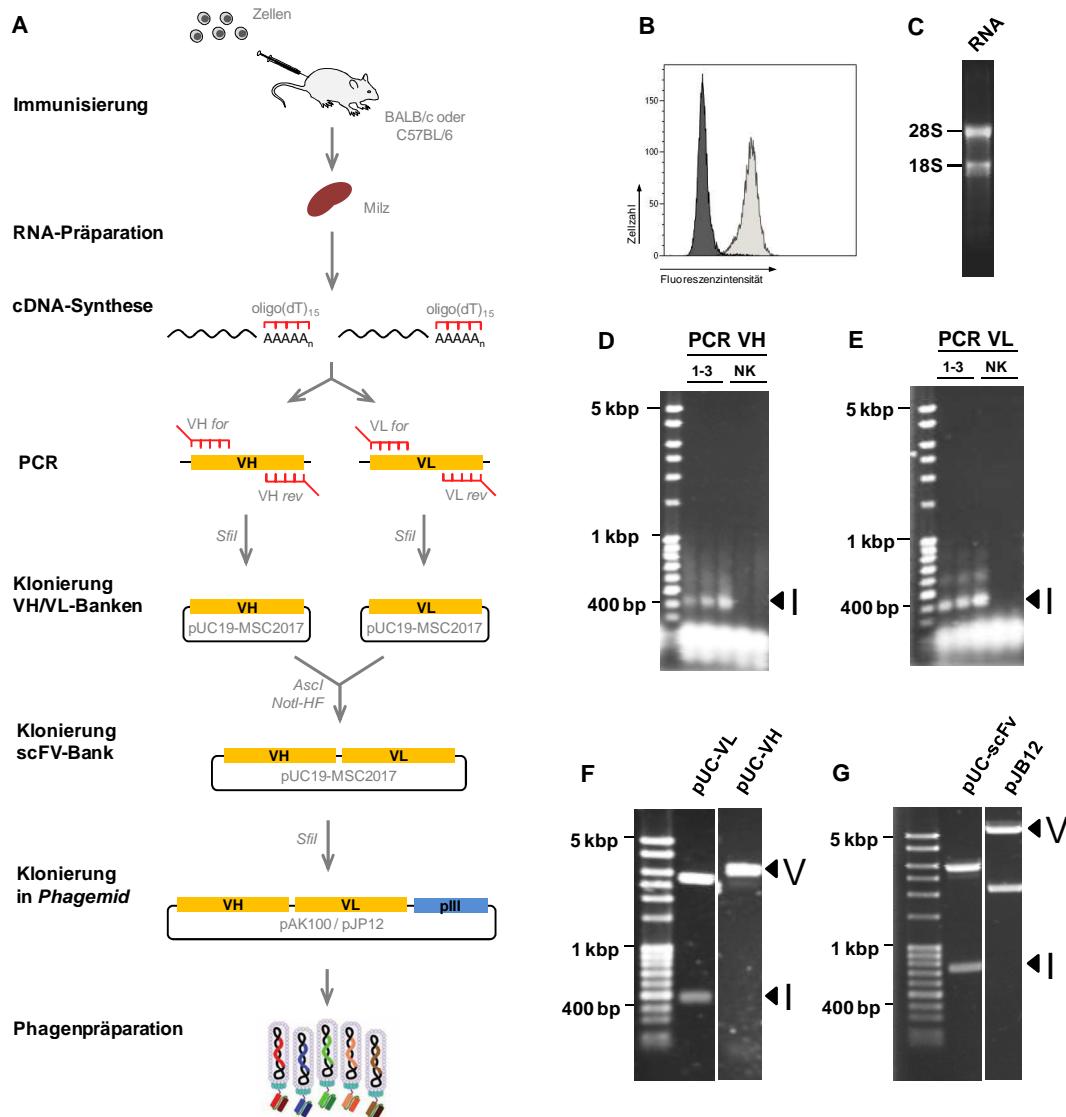


Abb.7 Ablauf der Generierung einer scFv-Immunbank aus einer immunisierten Maus.

(A) Schematische Darstellung der Generierung einer scFv-Immunbank aus einer immunisierten Maus. (B) BALB/c-Mäuse wurden mit malignen Plasmazellen eines Patienten immunisiert. Um die Ausbildung der Immunantwort zu überprüfen, wurde das Serum einer Maus verdünnt (1:1000) und die Bindung von Antikörpern an die Plasmazellen des Patienten im Durchflusszytometer gemessen (hell grau). Als Kontrolle wurde das Serum einer unbehandelten Maus verwendet (dunkel grau). (C) Die Milz wurde entnommen und Gesamt-RNA präpariert. 2 µg der RNA wurden zur Qualitätskontrolle auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Zwei deutliche Banden zeigen intakte ribosomale RNA (28S, 18S) zugeordnet werden können. (D,E) Die cDNA diente als Vorlage für PCRs mit Primer-Mixen für die Amplifikation der VHs und der VLs. Agarose-Gele mit den PCR-Produkten der drei initialen Annealing-Temperaturen (1-3: 45 °C, 50 °C, 55 °C) und den Negativkontrollen (NK: links ohne rev. Transkriptase, rechts ohne Template). Da in den Kontrollen keine PCR-Produkte zu erkennen sind, liegt keine Verunreinigung mit Fremd-DNA oder genomischen Material vor. Die Fragmente mit etwa 400 bp wurden aufgereinigt und dienten als Insert (I) für die Klonierung in den pUC19-MSC2017. (F) Agarose-Gelektrophorese der mit den Restriktionsenzymen Ascl und NotI-HF geschnittenen pUC19-MSC2017-VH (pUC-VH) und pUC19-MSC2017-VL (pUC-VL). Das Fragment, das den VLs entspricht, wurde als Insert (I) in den linearisierten Vektor (V) pUC19-MSC2017-VH eingefügt, um scFvs zu erhalten. (G) Die Plasmide mit den scFvs (pUC-scFv) und das Phagemid (pJB12) wurden mit SfiI verarbeitet und das Insert (I), das der Größe der scFvs entsprach (700 - 800 bp), in das linearisierte Phagemid (V) kloniert. Die transformierten Bakterien mit den Phagmidien und scFvs wurden zur Präparation von scFv-Phagen genutzt. bp: base pairs, kbp: kilo base pairs, for: Forward-Primer, rev: Reverse-Primer

In einem zweiten Klonierungsschritt wurden die VLs durch Restriktionsverdaue ausgeschnitten und die etwa 450 bp großen Fragmente zu den VHs in den zuvor linearisierten pUC19-MSC217-VH kloniert, um scFvs zu erhalten (Abb. 7F). Mit einer weiteren Klonierung wurden die scFv-Fragmente, die eine Größe von 700 - 800 bp hatten, in linearisierte *Phagemide* (pJB12 bzw. pAK100) eingefügt, die das pIII-Hüllprotein und eine Signal-Sequenz für den Einbau in M13-Phagen enthielten (Abb. 7G). Für die CD64-Immunbank wurde das pAK100-*Phagemid* verwendet, welches zwischen scFv und pIII einen myc-Tag kodiert. Für die Myelom-Immunbank wurde das pJB12-*Phagemid* verwendet, das statt des myc-Tags eine Schnittstelle für die Protease Trypsin kodiert (Tab. 7). Bakterien wurden mit den scFv-kodierenden *Phagemiden* transformiert und die Anzahl der CFU ermittelt. Die Größe der CD64-Immunbank lag bei 6 Millionen CFU und die der Myelom-Immunbank bei 15 Millionen CFU.

3.2 Identifizierung neuer Antikörper gegen CD64

Um CD64-spezifische scFv-Phagen aus der CD64-Immunbank zu isolieren wurde ein subtraktives, zelluläres *Panning* mit der murinen, malignen B-Zelllinie BA/F3 durchgeführt, die mit CD64 stabil transfiziert worden waren und uns von unseren Kooperationspartnern bereitgestellt wurde (Abb. 8A). Durch den Einsatz einer anderen Zelllinie als bei der Immunisierung, sollte das Risiko verringert werden, scFv-Phagen gegen die Zellen zu erhalten, mit denen die Immunisierung durchgeführt worden war. 10^{12} CFU Phagen, die aus der CD64-Immunbank präpariert worden waren, wurden gegen BA/F3-Zellen depletiert und anschließend mit CD64-transfizierten BA/F3-Zellen selektiert. Nach diesem ersten *Panning* wurden 19.200 CFU erhalten. Nach einem zweiten *Panning*, das nur aus einer Selektion mit CD64-transfizierten BA/F3-Zellen bestand, wurden mit 617.000 CFU 32-mal mehr CFU gezählt, was auf eine erfolgreiche Anreicherung hindeutet (Abb. 8B). Um dies genauer zu analysieren, wurden von der CD64-Immunbank vor dem ersten *Panning* und jeweils nach den *Pannings* *Phagemide* aus den Bakterien präpariert und NGS-Analysen durchgeführt (Abb. 9A).

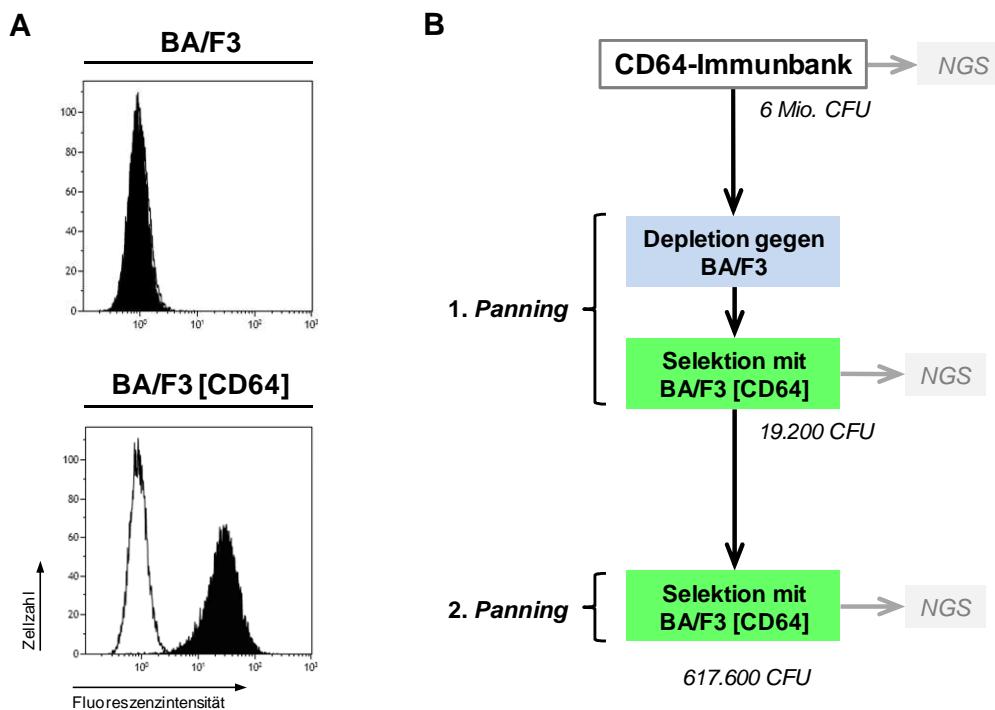


Abb.8 Panning-Strategie für die Isolation von CD64-Antikörpern.

(A) Um die Expression von CD64 auf der Oberfläche der transfizierten BA/F3-Zellen zu überprüfen, wurden vor den *Pannings* durchfluszytometrische Messungen durchgeführt. Je 5×10^5 BA/F3-Zellen, untransfiziert (oben) und transfiziert mit CD64 (unten), wurden mit humanem Immunglobulin (Intratect, 500 µg/ml) inkubiert, um den FcR abzusättigen. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD64 (schwarz) oder der entsprechenden Isotypkontrolle (weiß) gefärbt. Dargestellt sind Histogramme, die die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl zeigen. (B) Mit den Bakterien der CD64-Immunbank (6×10^6 CFU nach der Klonierung des *Phagemids*) wurden scFv-Phagen präpariert und 10^{12} CFU Phagen gegen 2×10^7 untransfizierte BA/F3-Zellen depletiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit den unbundenen scFv-Phagen auf 2×10^6 CD64-transfizierte BA/F3-Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und die Phagen sauer eluiert. Nach der Infektion von *E. coli* mit den selektierten Phagen wurden 19.200 CFU gezählt. Erneut wurden scFv-Phagen präpariert und mit 2×10^6 CD64-transfizierten BA/F3-Zellen bindende scFv-Phagen selektiert. Nach diesem zweiten *Panning* wurden 617.600 CFU erhalten und für Bindungsanalysen vereinzelt. Ein Teil der Bakterien der Bank vor und nach den *Pannings* wurden genutzt, um *Phagemide* für die *Next-Generation-Sequencing*-Analysen (NGS) zu präparieren.

Die Nukleotidsequenzen der VHs wurden einzeln annotiert, indem die enthaltenen Gen-Segmente (V, D und J) identifiziert und die Verbindungsregion der drei Gene, die die CDR3 bildet, analysiert wurde. Die Klonotypen wurden ermittelt und die Frequenz in den Sequenzdaten berechnet. Eine Eigenschaft, die zur Beurteilung der Vielfalt genutzt wurde, ist die Länge der Aminosäuresequenz der CDR3-Schleife in der VH. In der CD64-Immunbank waren vor dem ersten *Panning* CDR3s mit einer Länge von 13 oder 11 Aminosäuren am häufigsten bzw. zweithäufigsten vertreten, während längere oder kürzere CDR3s seltener vorkamen (Abb. 9B). Dies entsprach der zu erwartenden Verteilung in der Maus (Rettig et al. 2018). Eine ähnliche Verteilung war auch nach dem ersten *Panning* zu beobachten (Abb. 9B).

Ergebnisse

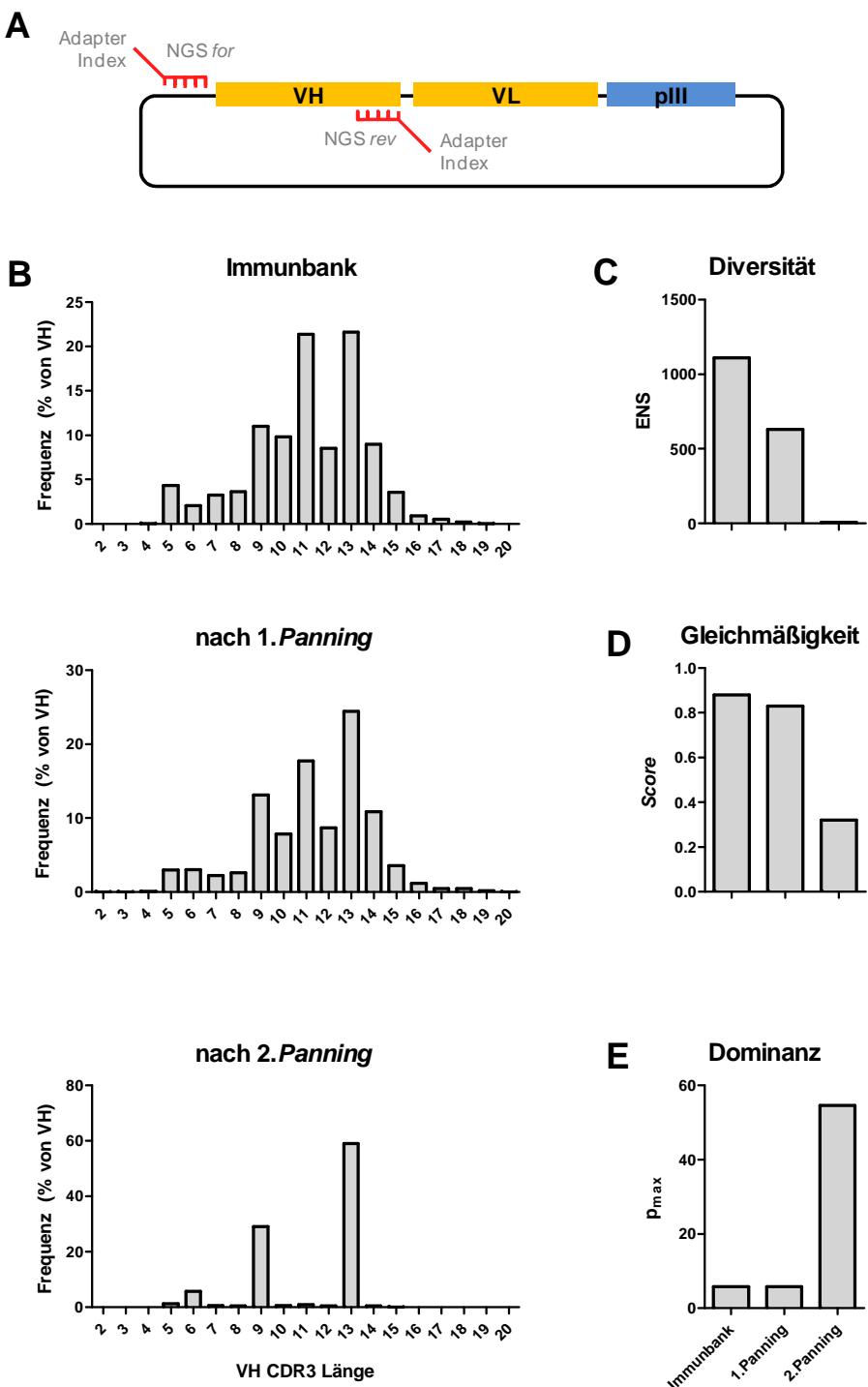


Abb.9 Die NGS-Analyse der CD64-Immunbank belegt die Anreicherung von VH-Klonen.

(A) Lage der Primer auf dem Phagemid für die PCR der VH, dessen Produkt anschließend mit Hilfe der Adaptersequenzen sequenziert wird. Durch den Einsatz unterschiedlicher Indices können verschiedene PCR-Produkte parallel sequenziert werden. Der forward-Primer bindet 5' vor der VH (NGS for). Als reverse-Primer wurde ein Mix eingesetzt, der die vier unterschiedlichen J-Gene der Maus am 3'-Ende der VH bindet (NGS rev). (B) Für die VH-Sequenzen der ursprünglichen Immunbank (oben) und der Bank nach dem ersten (Mitte) und zweiten Panning (unten) wurden die Längen der Aminosäuresequenzen der CDR3s ermittelt und deren Frequenz unter allen VH-Sequenzen in Prozent aufgetragen. Um die Vielfalt der ursprünglichen Immunbank und der Banken nach dem ersten und zweiten Panning miteinander zu vergleichen, wurden die VH-Klonotypen bestimmt und deren Frequenz unter allen VH-Sequenzen berechnet. Für jede Probe wurden (C) die Diversität der VH-Klonotypen als effektive Anzahl von Arten (*effective number of species*, ENS), (D) die Gleichmäßigkeit der VH-Klonotypen als ein Score und (E) die Dominanz als Anteil des häufigsten VH-Klonotypen an allen VH-Sequenzen (p_{max}) berechnet. Um die unterschiedlich umfangreichen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden gleichgroße VH-Sequenz-Stichproben ($n = 8.000$) gezogen.

Ergebnisse

Nach dem zweiten *Panning* wurde die Immunbank deutlich von VH-Sequenzen dominiert, die CDR3s mit 9 oder 13 Aminosäuren enthielten (Abb. 9B). Durch die *Pannings* verringerten sich Diversität und Gleichmäßigkeit der unterschiedlichen VH-Klonotypen, wohingegen die Dominanz des häufigsten VH-Klonotypen stieg. Nach dem ersten *Panning* halbierte sich die Diversität der VH-Klonotypen von ursprünglich 1.110 auf 630 ENS, während die Gleichmäßigkeit der Verteilung mit 0,8 hoch und die Dominanz des häufigsten VH-Klonotypen mit 6 % niedrig blieb (Abb. 9C-E). Nach dem zweiten *Panning* war ein deutlicher Rückgang der Diversität um den Faktor 79 auf nur noch 8 ENS zu beobachten. Auch die Gleichmäßigkeit der Verteilung sank von 0,8 auf 0,3 deutlich, während die Dominanz des häufigsten VH-Klonotypen von 6 % auf 55 % stieg, was auf die erfolgreiche Anreicherung von scFv-Phagen hindeutet (Abb. 9C-E). Um dies zu überprüfen, wurden die polyklonalen scFv-Phagen vor und nach den beiden *Pannings* im Durchflusszytometer mit CD64-transfizierten und untransfizierten BA/F3-Zellen untersucht. Vor den *Pannings* war weder auf den CD64-transfizierten noch auf den untransfizierten BA/F3-Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, ein Signal zu messen (Abb. 10).

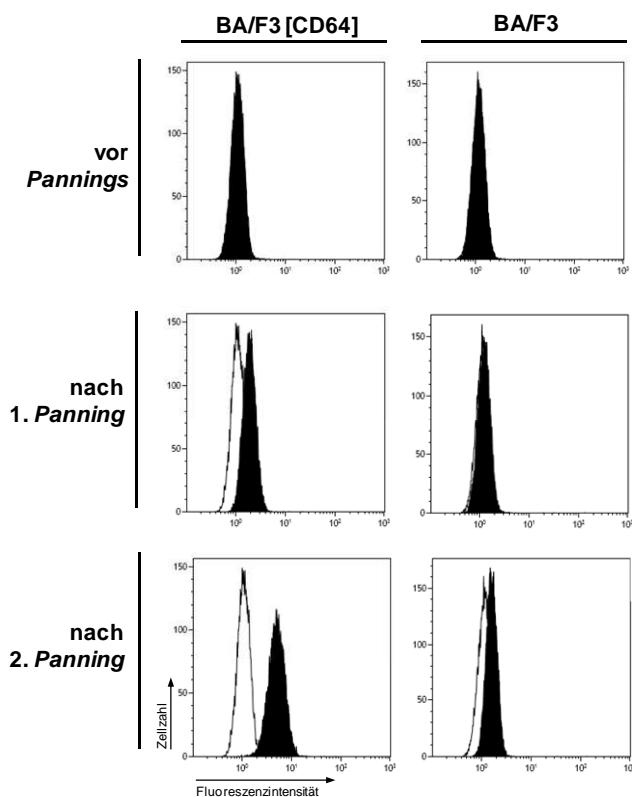


Abb.10 Durchflusszytometrische Analyse der CD64-Bindung von selektionierten Phagen.

Je 10^6 BA/F3-Zellen, transfiziert mit CD64 (links) und untransfiziert (rechts), wurden mit 10^{11} CFU Phagen aus der Präparation vor den *Pannings* (oben), nach dem ersten *Panning* (mittig) und nach dem zweiten *Panning* (unten) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen Phagen wurden mit anti-myc-Fab (40 µg/ml) und mit anti-kappa-FITC detektiert (schwarz). Als Kontrollen wurden CD7-spezifische Phagen (weiß) eingesetzt, die nicht auf BA/F3-Zellen binden. Dargestellt sind Histogramme, die die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl zeigen.

Ergebnisse

Bereits durch das erste *Panning* und besonders nach dem zweiten *Panning* war eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität auf den CD64-transfizierten Zellen zu erkennen. Da das Signal auf den untransfizierten Zellen deutlich schwächer war als auf den CD64-transfizierten Zellen, wurden erfolgreich CD64-bindende scFv-Phagen durch das *Panning* angereichert (Abb. 10). Anschließend wurden 25 monoklonale scFv-Phagen präpariert und die Bindung der Phagen auf untransfizierten und CD64-transfizierten BA/F3-Zellen im zellulären ELISA analysiert. 68 % (17) der scFv-Phagen zeigten eine CD64-abhängige Bindung, da sie ein stärkeres Signal auf den CD64-transfizierten Zellen als auf den untransfizierten Zellen lieferten (Abb. 11, mit * gekennzeichnet). Der scFv-Phage #24 zeigte sowohl auf den untransfizierten als auch auf den CD64-transfizierten Zellen ein starkes Signal, weshalb der scFv-Phage CD64-unabhängig binden muss. Als Kontrollen dienten die polyklonalen scFv-Phagen-Mischungen nach dem zweiten *Panning* und von der ursprünglichen Immunbank vor dem ersten *Panning*. Diese zeigen eine CD64-abhängige Bindung nach dem zweiten *Panning* und bestätigen das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 10).

Von den 25 monoklonalen Phagen wurden die *Phagemide* präpariert und die VHs und die VLs Sanger sequenziert. Wie bei den NGS-Analysen wurden die Nukleotidsequenzen annotiert und die Klonotypen bestimmt.

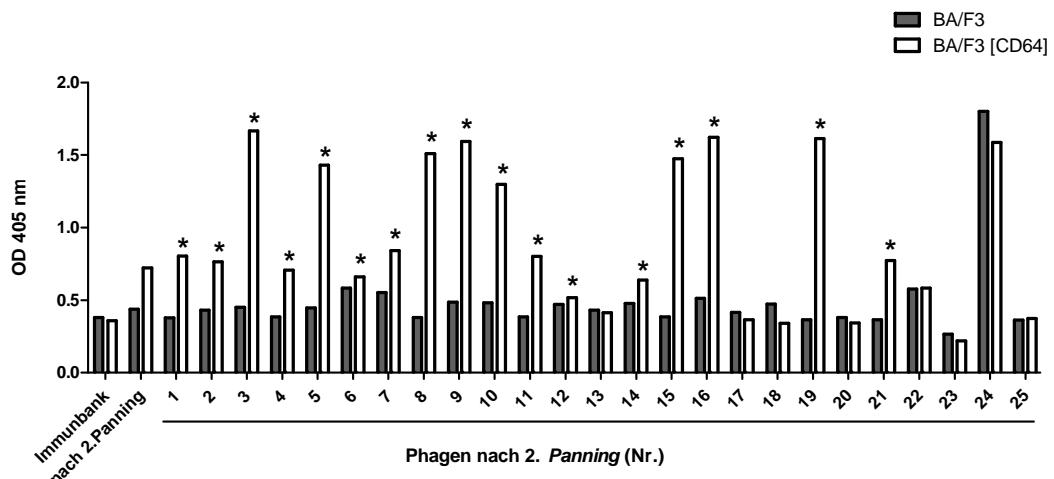


Abb.11 Analyse der CD64-Bindung vereinzelter Phagen im zellulären ELISA.

Je 10^6 BA/F3-Zellen, transfiziert mit CD64 (weiß) und untransfiziert (grau), wurden mit 100 µl Phagen für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase (Maus IgG1, 1:2000) 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit ABTS-Substrat und die Absorption wurde bei 405 nm gemessen. Zur Kontrolle wurden die polyclonalen Phagen vor den *Pannings* (Immunbank) und nach dem zweiten *Panning* mitgeführt. Mit Stern (*) markierte scFv-Phagen zeigen eine CD64-abhängige Bindung.

Ergebnisse

Um die Sequenzen untereinander zu vergleichen, wurden die Aminosäuresequenzen bestimmt und ein *Multi-Alignment* durchgeführt. Die VHs der CD64-Binder (grün dargestellt) können so in zwei Cluster gruppiert werden (Abb. 12A).

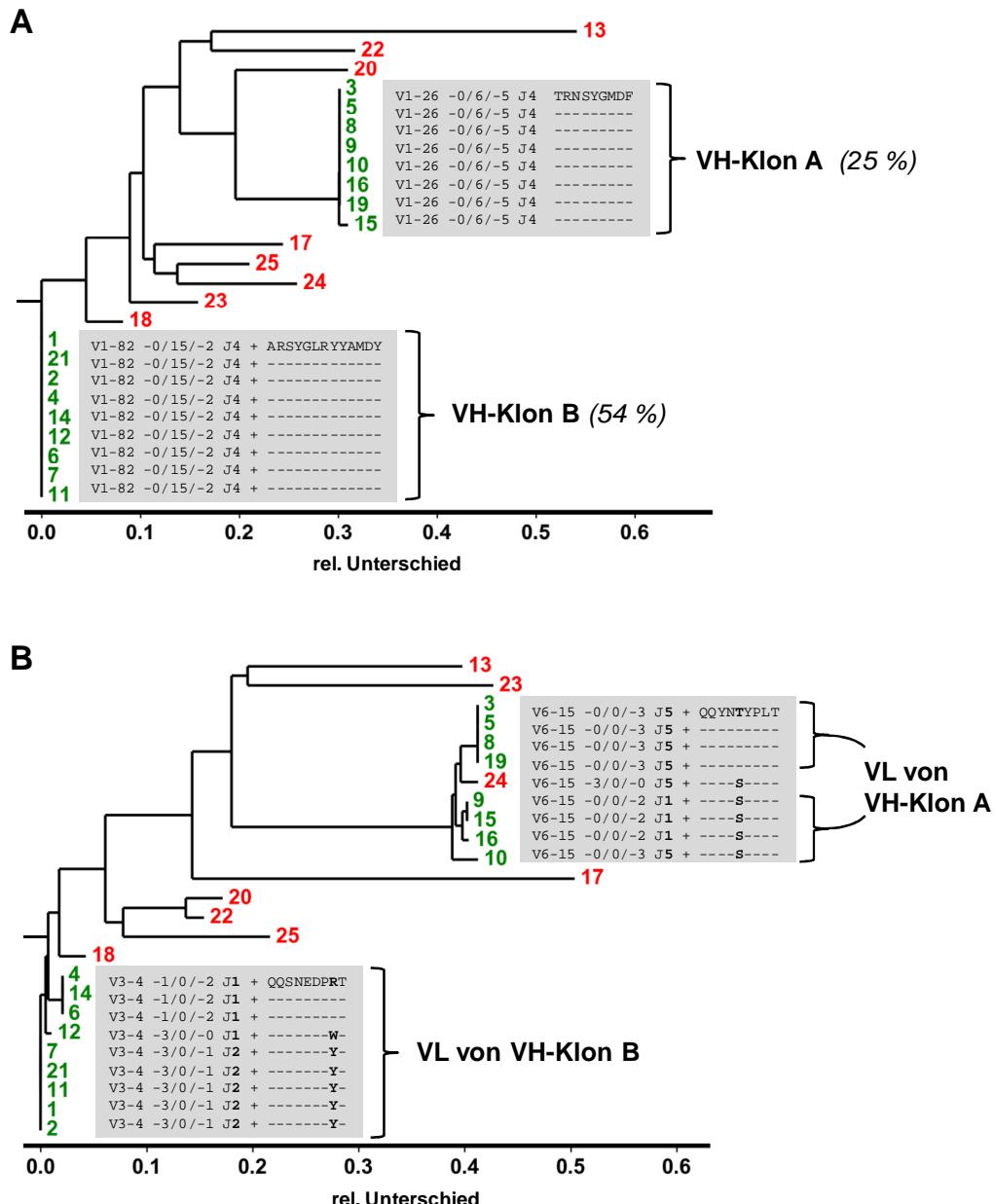


Abb.12 Die VH- und VL-Aminosäuresequenzen der CD64-bindenden Phagen können auf zwei gleiche bzw. ähnliche Klone zurückgeführt werden.

Die Aminosäuresequenzen der VHs (**A**) und VLs (**B**) der 25 untersuchten scFv-Phagen wurden mit *ClustalW* unter Anwendung der *Neighbor-Joining* Methode verglichen und die *Alignments* als Dendrogramme dargestellt. Je ähnlicher sich Sequenzen sind, desto näher liegen sie im Baum zusammen. Die Nummern der CD64-Binder sind grün und die der scFv-Phagen, die CD64 nicht binden, rot dargestellt. Die VH- und VL-Klonotypen wurden mit der ARResT/Interrogate-Plattform für die CD64-Binder ermittelt (graue Kästen). ARResT/Interrogate beschreibt einen Klonotypen mit der Nummer des V-Gens, der Anzahl der entfernten V-Gen-Nukleotide, die Anzahl der neu hinzugefügten Nukleotide (bei VH vom D-Gen), die Anzahl der entfernten J-Gen-Nukleotide, der Nummer des J-Gens und der Aminosäuresequenz der CDR3. Bei den VH- und VL-Sequenzen bilden sich je zwei auffällige Cluster, die auf gleiche bzw. ähnliche Klone zurückgeführt werden können. 25 % bzw. 54 % aller VH-Sequenzen, die nach dem zweiten Panning mit NGS gefunden worden sind, konnten diesen zwei Klonen zugeordnet werden.

Ergebnisse

Die Aminosäuresequenzen eines Clusters unterscheiden sich maximal in einer Aminosäure und können je einem VH-Klonotyp zugeordnet werden. Die VHs der CD64-Binder stammen wahrscheinlich von zwei B-Zell-Klonen ab. Diese CD64-bindenden VH-Klone sind die bei den NGS-Analysen beobachteten dominanten Klonotypen nach dem zweiten *Panning* (Abb. 9). Der VH-Klon A, dem nach dem zweiten *Panning* 25 % aller VH-Sequenzen zugeordnet werden konnten, setzt sich aus dem V-Gen V1-26, dem J-Gen J4 und einer 9 Aminosäuren langen CDR3 zusammen. Der VH-Klon B, auf den 54 % aller VH-Sequenzen nach dem zweiten *Panning* zurückgeführt werden konnten, besteht aus dem V-Gen V1-82, dem J-Gen J4 und einer 13 Aminosäuren langen CDR3 (Abb. 12A).

Auch die Aminosäuresequenzen der VLs wurden verglichen und auch hier sind zwei Cluster zu beobachten, denen die VLs der CD64-Binder (grün dargestellt) zugeordnet wurden (Abb. 12B). Die Aminosäuresequenzen eines Clusters unterscheiden sich zum Teil in mehreren Aminosäuren und im VL-Klonotyp. Die Unterschiede sind aber auf verschiedene J-Gene und eine ausgetauschte Aminosäure in den CDR3s beschränkt. Obwohl bei der Generierung der Immunbank VH- und VL-Fragmente zufällig zugeordnet wurden, wurden nur scFv-Phagen mit einer ähnlichen VH-VL-Kombination angereichert. Die Sequenzen, der scFv-Phagen, die keine CD64-abhängige Bindung zeigen (rot dargestellt), unterscheiden sich deutlich von denen der CD64-Binder und auch untereinander (Abb. 12A,B). scFv-Phage #24, der CD64 nicht gebunden hatte, enthält zwar eine VL, die bei CD64-Bindern zu finden war, doch die VH ist keinem der beiden VH-Klone zuzuordnen, die CD64 spezifisch binden.

Um weiterer Klone zu identifizieren, die durch das *Panning* angereichert wurden, wurden die Frequenzen der VH-Klonotypen nach dem ersten und zweiten *Panning* aus den NGS-Analysen gegeneinander aufgetragen und mit den VH-Klonotypen und ELISA-Ergebnissen der Sanger-sequenzierten scFv-Phagen kombiniert (Abb. 13). Die beiden häufigsten VH-Klonotypen nach dem zweiten *Panning* können den bereits identifizierten CD64-Bindern (grün dargestellt) zugeordnet werden. Die VH-Klonotypen der anderen scFvs, die im ELISA analysiert wurden und keine CD64-abhängige Bindung zeigten (rot dargestellt), haben eine Frequenz von weniger als 10 % (13, 20, 22, 24) oder liegen unter 0,01 % (17, 18, 23, 25). Der dritthäufigste VH-Klonotyp, der nach

Ergebnisse

dem zweiten *Panning* vergleichsweise stark angereichert wurde, kann dem scFv-Phagen #24 zugeordnet werden, der BA/F3-Zellen CD64-unabhängig gebunden hatte (Abb. 11).

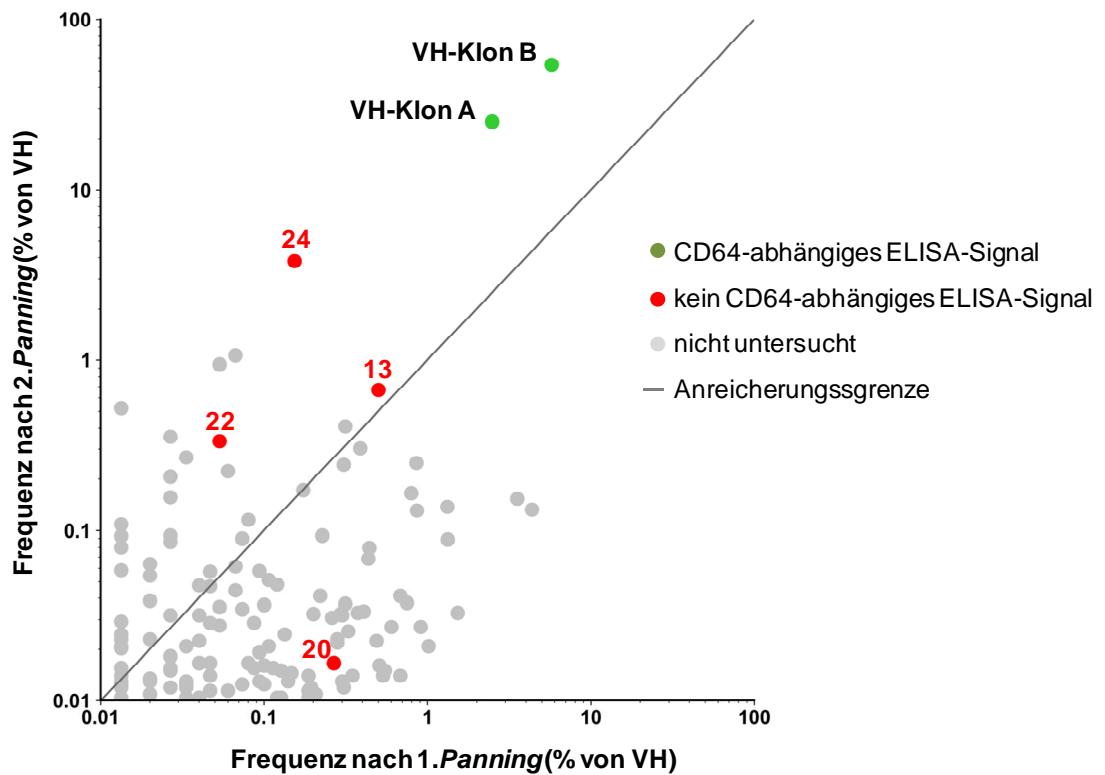


Abb.13 Frequenzen der VH-Klonotypen nach den *Pannings*.

Für alle VH-Klonotypen die nach dem ersten *Panning* und zweiten *Panning* mit einer Frequenz von mehr als 0,01 % in den VH-Sequenzen vertreten waren, wurden die Frequenzen nach dem ersten und zweiten *Panning* gegeneinander aufgetragen. VH-Klonotypen, die oberhalb der Anreicherungsgrenze liegen, sind nach dem zweiten *Panning* häufiger vertreten als nach dem ersten *Panning*. Die beiden häufigsten VH-Klonotypen (grün) können den scFv-Phagen zugeordnet werden, die ein CD64-abhängiges Signal im ELISA erzeugen (A, B). Für weitere VH-Klonotypen (rot), für die scFv-Phagen identifiziert wurden, konnte im ELISA kein CD64-abhängiges Signal gemessen werden (13, 20, 22, 24) oder die Frequenzen lagen nach dem ersten und zweiten Panning unter 0,01 % (17, 18, 23, 25).

Die Frequenzen der VH-Klonotypen von VH-Klone A und B erhöhten sich durch das *Panning* deutlich und unterscheiden sich stark von den anderen VH-Klonotypen, bei denen keine CD64-Bindung gemessen werden konnte. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass vermutlich alle CD64-bindenden VH-Klone bereits durch die zufällige Auswahl einzelner Kolonien/Klone gefunden wurden. In der ursprünglichen Immunbank waren die beiden VH-Klone mit jeweils weniger als 0,02 % vertreten und wurden durch zwei *Pannings* um den Faktor 1.250 (VH-Klon A) bzw. 2.700 (VH-Klon B) angereichert.

3.2.1 Bindungsverhalten der rekombinanten CD64-Antikörper

Für weitere Bindungsanalysen der Antikörper wurden von unserem Kooperationspartner IgG1 mit den VHs und VLs der CD64-Binder rekombinant hergestellt und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Um auszuschließen, dass die hergestellten Antikörper über ihren Fc an den hochaffinen Fc γ R CD64 binden, wurden IgG1 mit den Mutationen P329G, L234A und L235A verwendet, durch die der Fc nicht mehr an Fc γ R binden kann (Schlothauer et al. 2016). Je zwei Kandidaten vom VH-Klon A und B wurden ausgewählt (#3 und #10 bzw. #1 und #4), die jeweils unterschiedliche VL-Klonotypen tragen. Im Durchflusszytometer wurde die spezifische Bindung der neuen Antikörper an CD64 und der Einfluss der CD64-Fc-Interaktion auf die Bindung der CD64-Antikörper untersucht.

Im ersten Versuch wurden CD64-transfizierte BA/F3-Zellen mit humanen IgG1-Antikörpern vorinkubiert, deren Fc an die Domäne 2 von CD64 bindet. Anschließend wurde die Bindung der neuen CD64-Antikörper im Durchflusszytometer gemessen (Abb. 14A). Durch die Prä-Inkubation der Zellen mit IgG1-Antikörpern reduzierte sich die Signalintensität der VH-Klon-B-Antikörper #1 und #4 um 69 % bzw. 79 %, während die Fluoreszenzintensität der VH-Klon-A-Antikörper #3 und #10 nur um 20 % bzw. 19 % abnahm (Abb. 14A). Die Bindung der CD64-Antikörper vom VH-Klon B an CD64 wurden damit durch die Bindung von IgG1-Antikörpern stärker blockiert als die Bindung der CD64-Antikörper, die vom VH-Klon A stammen. Um den Einfluss der CD64-Antikörper auf die Fc-Bindung zu untersuchen, wurde der Versuch *vice versa* durchgeführt: CD64-transfizierte BA/F3-Zellen wurden zunächst mit den CD64-Antikörpern (#3 und #10 bzw. #1 und #4) inkubiert und im Anschluss die Bindung von humanem IgG1 über den Fc im Durchflusszytometer gemessen (Abb. 14B). Im Vergleich zur Kontrolle ohne CD64-Antikörper war zu beobachten, dass durch die Inkubation mit CD64-Antikörpern des VH-Klon B die Bindung des IgG1 um 79 % (#1) bzw. 78 % (#4) geblockt wurde. Die Antikörper des VH-Klons A verringerten hingegen die Bindung der IgG1-Antikörper nur um 14 % (#3) bzw. 6 % (#10; Abb. 14B).

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die Bindung der CD64-Antikörper vom VH-Klon B (#1 und #4) blockierend auf die CD64-Fc-

Ergebnisse

Interaktionen wirken und auch *vice versa*. Die CD64-Antikörper vom VH-Klon A (#3 und #10) haben hingegen wenig Einfluss auf die CD64-Fc-Interaktion und können CD64 trotz der Anwesenheit von IgG1 deutlich binden. Die neuen CD64-Antikörper haben damit interessante Eigenschaften, die sowohl für die Erforschung der CD64-Signalübermittlung und Funktion, als auch für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien von großem Interesse sind.

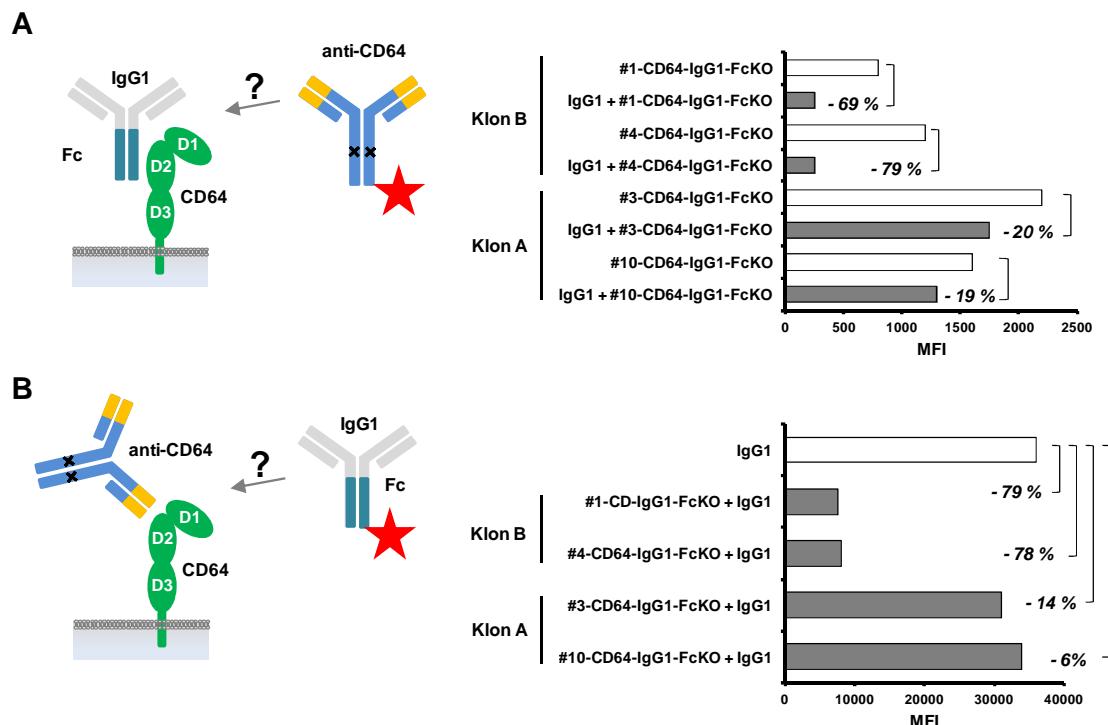


Abb.14 Bindung der neuen Antikörper an CD64 nach Bindung von IgG1 und *vice versa*.

(A) Für die Messung der Bindung der CD64-Antikörper nach Inkubation mit humanen IgG1 wurden 50.000 BA/F3[CD64]-Zellen 5 µg/ml IgG1 (anti-TNP; graue Balken) oder mit Puffer (weißer Balken) inkubiert und anschließend die neuen CD64-Antikörper (FITC markiert) mit einer finalen Konzentration von 2 µg/ml zugegeben. (B) Für die Messung der Bindung von humanen IgG1 nach Inkubation mit den neuen CD64-Antikörpern wurden 50.000 BA/F3[CD64]-Zellen mit 2 µg/ml der neuen CD64-Antikörper (graue Balken) oder mit Puffer (weißer Balken) inkubiert und anschließend IgG1 (anti-TNP, Alexa 647 markiert) mit einer finalen Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei Experimenten der im Durchflusszytometer gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI). Die Produktion der Antikörper und erste durchflusszytometrische Messungen erfolgten im Labor für Translationale Immunologie am *University Medical Center Utrecht*. Die Daten für diese Abbildung wurden freundlicherweise bereitgestellt.

3.3 Identifizierung neuer Antikörper gegen Myelomzellen

Um scFv-Phagen, die spezifisch Myelomzellen binden, aus der Myelom-Immunbank zu isolieren, wurde ein subtraktives, zelluläres *Panning* durchgeführt. Zur Depletion wurden Leukozyten verwendet, die von unterschiedlichen gesunden Spendern frisch präpariert wurden. Leukozyten setzten sich aus Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, zu denen B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen gehören, zusammen. Die Verhältnisse zwischen den Zellpopulationen variieren zwischen den Spendern und wurden vor den Depletionen durchflusszytometrisch ermittelt. Die gemessene Zusammensetzung der Leukozyten entsprachen überwiegend den zu erwartenden Referenzwerten (Tab. 11), weshalb die Spender als repräsentativ für gesunde Menschen angesehen wurden (Dörner u. Deufel 2009; Hallbach 2006).

Tab.11 Zusammensetzung der Leukozyten der gesunden Spender

Spender	A	B	C	D	Ref.
Granulozyten	52 %	68 %	46 %	62 %	41-82 %
Monozyten	11 %	7 %	9 %	8 %	2-8 %
Lymphozyten	31 %	17 %	39 %	23 %	20-45 %
davon:					
T4 (CD3+,CD4+)	54 %	22 %	44 %	37 %	29-60%
T8 (CD3+,CD8+)	25 %	31 %	30 %	31 %	11-38%
B (CD19+)	5 %	10 %	5 %	10 %	6-23%
NK (CD56+, CD3-)	6 %	16 %	13 %	11 %	6-31%

T4: CD4-T-Zellen, T8: CD8-T-Zellen, B: B-Zellen, NK: natürliche Killerzellen, Ref.: Referenzwerte (Dörner u. Deufel 2009; Hallbach 2006)

10^{12} CFU Phagen, die aus der Myelom-Immunbank präpariert wurden, wurden zweimal gegen 1×10^8 Leukozyten der Spender A und B depletiert und anschließend mit 2×10^6 Zellen der Myelomzelllinie L-363 selektiert. Nach diesem ersten *Panning* wurden 84.000 CFU erhalten. Nach einem zweiten *Panning*, für das Leukozyten von den gesunden Spendern C und D verwendet wurden, wurden 1.002.000 CFU gezählt. Nach dem zweiten *Panning* haben 12-mal so viel scFv-Phagen gebunden wie nach dem ersten *Panning* (Abb. 15A). Wie bereits für die CD64-Immunbank beschrieben, wurden begleitende NGS-Analysen durchgeführt, um den *Panning*-Prozess auf Sequenz-Ebene zu verfolgen. Bis zu 13 Millionen VHs wurden parallel sequenziert, um ein möglichst umfangreiches Bild von der Immunbank und

Ergebnisse

der Veränderung ihrer Zusammensetzung durch das *Panning* zu erhalten. Die häufigsten CDR3-Aminosäurelängen in der Immunbank vor dem *Panning* und nach dem ersten *Panning*, lagen bei 12 bzw. 11 Aminosäuren und entsprachen dem erwarteten Antikörperrepertoire einer Maus (Rettig et al. 2018). Nach dem zweiten *Panning* war die ursprüngliche, glockenförmige Verteilung jedoch nicht mehr zu erkennen und VH-Klonotypen mit 10, 8, 15 oder 16 Aminosäuren langen CDR3s dominierten die Verteilung (Abb. 15B).

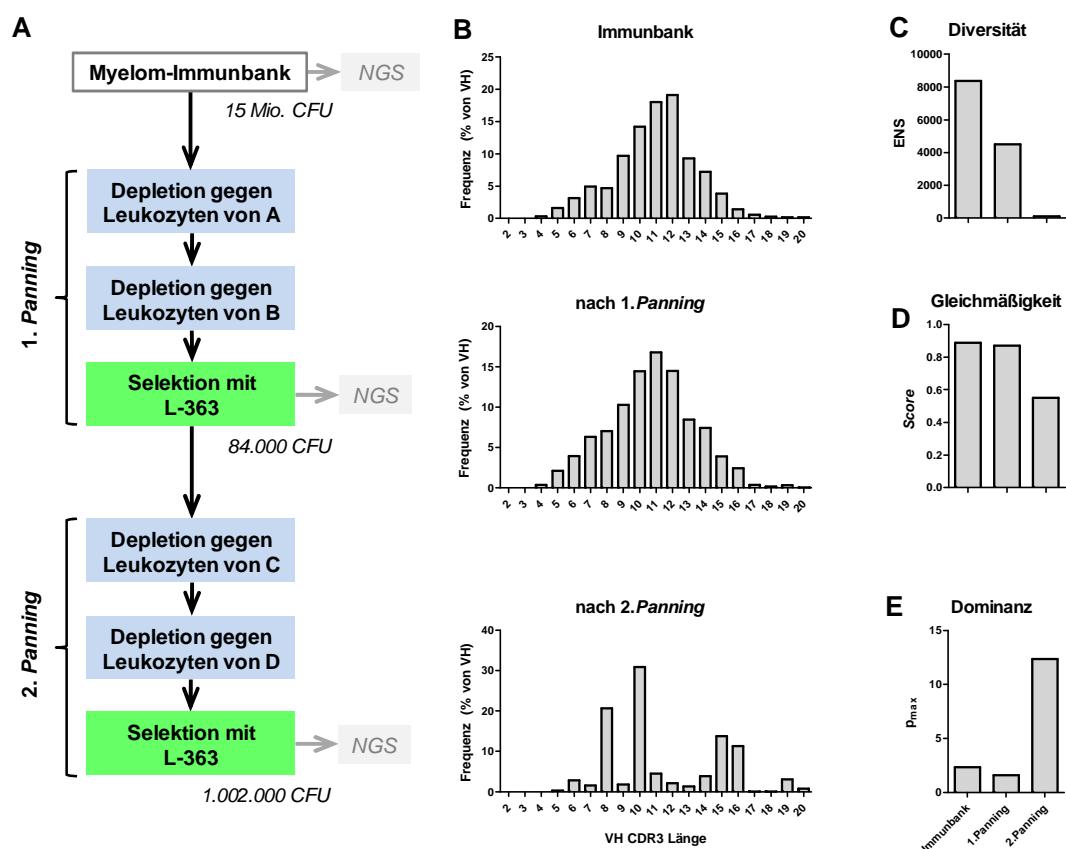


Abb.15 Panning-Strategie und NGS-Analyse der Myelom-Immunbank.

(A) Die Phagen der Myelom-Immunbank wurden zweimal gegen Leukozyten von unterschiedlichen gesunden Spendern deploriert und die verbliebenen scFv-Phagen auf L-363 Zellen gegeben. Nach der Elution der Phagen wurden nach dem ersten *Panning* 84.000 CFU und nach dem zweiten *Panning* 1.002.000 CFU erhalten. Ein Teil der Bakterien der Bank wurde genutzt, um *Phagemide* für das *Next-Generation-Sequencing* (NGS) zu präparieren. (B) Für die VH-Sequenzen der ursprünglichen Immunbank (oben) und der Banken nach dem ersten (Mitte) und zweiten *Panning* (unten) wurden die Längen der Aminosäuresequenzen der CDR3s ermittelt und deren Frequenz unter allen VH-Sequenzen in Prozent aufgetragen. Um die Vielfalt der ursprünglichen Immunbank und der Banken nach dem ersten und zweiten *Panning* miteinander zu vergleichen, wurden die VH-Klonotypen bestimmt und deren Frequenz unter allen VH-Sequenzen berechnet. Für jede Probe wurden (C) die Diversität der VH-Klonotypen als effektive Anzahl von Arten (*effective number of species*, ENS), (D) die Gleichmäßigkeit der VH-Klonotypen als ein Score und (E) die Dominanz als Anteil des häufigsten VH-Klonotypen an allen VH-Sequenzen (p_{max}) berechnet. Um die unterschiedlich umfangreichen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden gleichgroße VH-Sequenz-Stichproben ($n = 50.000$) gezogen.

Ergebnisse

Nach dem ersten *Panning* halbierte sich die Diversität der VH-Klonotypen, von ursprünglich 8.370 auf 4.490 ENS, während die Gleichmäßigkeit der Verteilung mit 0,9 hoch und die Dominanz des häufigsten VH- Klonotypen mit ca. 2 % niedrig blieb (Abb. 15C-E). Nach dem zweiten *Panning* war ein deutlicher Rückgang der Diversität um den Faktor 47 auf 95 ENS zu beobachten, wobei die Gleichmäßigkeit von 0,9 auf 0,6 fiel und die Dominanz des häufigsten VH- Klonotypen von 2 % auf 12 % stieg, was auf die Anreicherung einzelner scFv-Phagen zurückzuführen sein muss (Abb. 15C-E). Um die erfolgreiche Selektion von Myelom-bindenden scFv-Phagen zu testen, wurden die präparierten scFv-Phagen vor den *Pannings*, nach dem ersten und dem zweiten *Panning* im Durchflusszytometer auf ihre Bindung an L-363 Zellen hin untersucht. Als Kontrolle wurde ein scFv-Phage gegen CD7 verwendet, ein Antigen, das nicht auf L-363 vorkommt. Vor den *Pannings* und nach dem ersten *Panning* war keine Bindung der polyklonalen Phagen im Vergleich zum CD7-Phagen zu erkennen (Abb. 16, links und mittig). Nach dem zweiten *Panning* war eine Zunahme des Fluoreszenzsignals im Vergleich zum CD7-Phagen zu beobachten (Abb. 16, rechts), womit L-363-bindende Phagen nachgewiesen wurden.

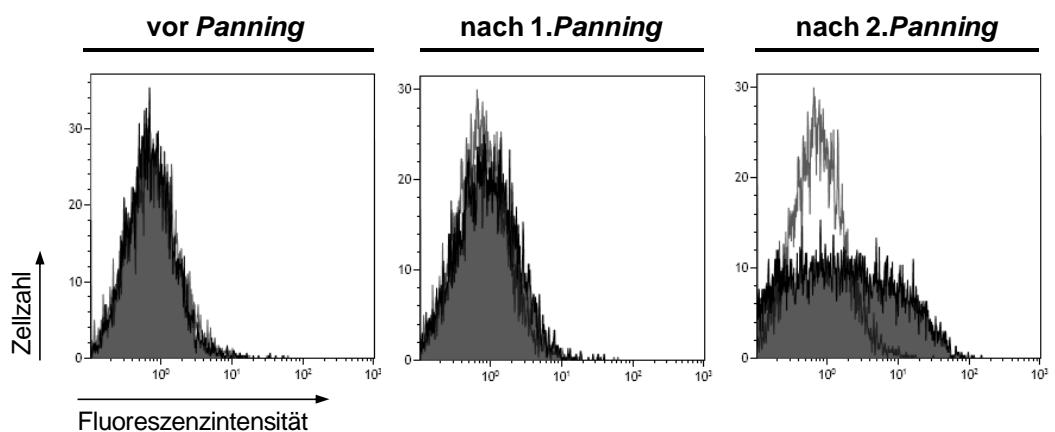


Abb.16 Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von scFv-Phagen an L-363-Zellen.

5x10⁵ L-363-Zellen wurden mit 10¹¹ CFU Phagen aus der Präparation vor den *Pannings*, nach dem ersten und nach dem zweiten *Panning* inkubiert und hinsichtlich ihrer Bindung an L-363 überprüft (schwarz). Dargestellt sind exemplarische Histogramme, die die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl zeigen. Als Negativkontrolle wurde ein CD7-spezifischer scFv-Phage verwendet (weiß).

Nach dem zweiten *Panning* wurden aus 33 Bakterienkolonien monoklonale scFv-Phagen präpariert. Die Bindung der scFv-Phagen (je 10⁹ CFU) auf L-363 Zellen wurde im zellulären ELISA analysiert. Hierbei zeigte sich, dass, im Vergleich zum CD7-Phagen, der als Negativkontrolle eingesetzt wurde,

Ergebnisse

bei 17 scFv-Phagen (grün dargestellt) eine Bindung an die L-363 Zellen gemessen werden konnte (Abb. 17). Die Absorption bei den 16 weiteren scFv-Phagen (weiß dargestellt) ist kleiner oder gleich der Negativkontrolle (Abb. 17). Nach dem zweiten *Panning* bindet also mehr als die Hälfte der getesteten scFv-Phagen L-363-Zellen. Zusätzlich wurden die polyklonalen Phagen vor den *Pannings*, nach dem ersten und nach dem zweiten *Panning* mitgeführt (grau dargestellt), wobei eine deutliche Zunahme der Absorption nach dem zweiten *Panning* zu beobachten ist, was die durchflusszytometrischen Messungen bestätigt (Abb. 17).

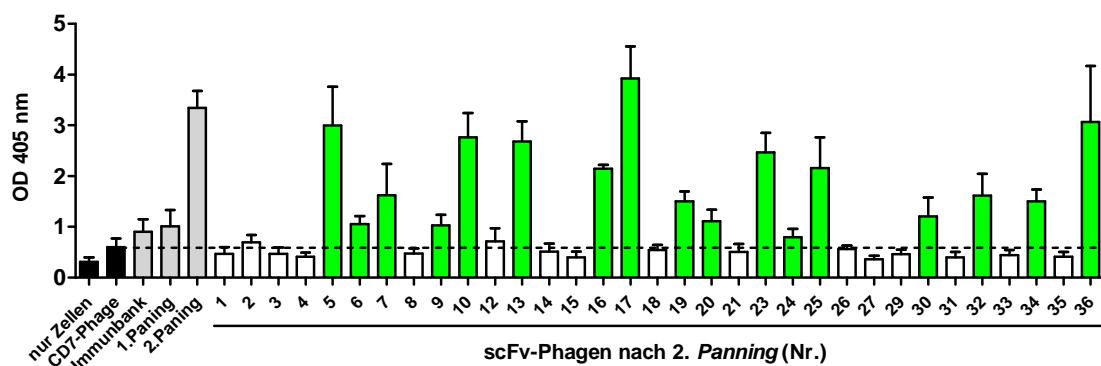


Abb.17 Bindung monoklonaler scFv-Phagen auf L-363-Zellen

Je 10^6 L-363-Zellen wurden mit 10^9 CFU monoklonalen scFv-Phagen inkubiert. Die Bindung wurde mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase-Antikörper und ABTS-Substrat detektiert. Die Absorption bei 405 nm ist gezeigt. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Phagen und mit CD7-spezifischem scFv-Phagen mitgeführt (schwarz). Im L-363-ELISA wurden zusätzlich die präparierten Phagen-Mischungen vor den *Pannings* (Immunbank), nach dem ersten *Panning*, nach dem zweiten *Panning* getestet (grau) und die Säulen von L-363-Bindern grün markiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei Experimenten.

Die VH-Aminosäuresequenzen der 33 monoklonalen scFv-Phagen wurden durch Sanger-Sequenzierung bestimmt und ein *Alignment* durchgeführt. Zudem wurden die VH-Klonotypen bestimmt und mit dem Ergebnis des *Alignments* verglichen (Abb. 18). Die scFv-Phagen #5, #10, #20, #24 und #34 bilden ein Cluster sehr ähnlicher VH-Aminosäuresequenzen, die alle den gleichen Klonotyp haben und als VH-Klon E zusammengefasst wurden, auf den nach dem zweiten *Panning* und NGS 9,6 % aller VH-Sequenzen zurückgeführt werden können. Ein Vergleich mit den ELISA-Ergebnissen aus Abbildung 17A zeigte jedoch Unterschiede bei den Signalintensitäten der scFv-Phagen, wobei der scFv-Phage #5 die höchste und scFv-Phage #24 die niedrigste Intensität hatte. Dieser Unterschied muss auf einzelne Mutationen, die während der Affinitätsreifung aufgetreten waren, oder verschiedenen VLs zurückzuführen sein.

Ergebnisse

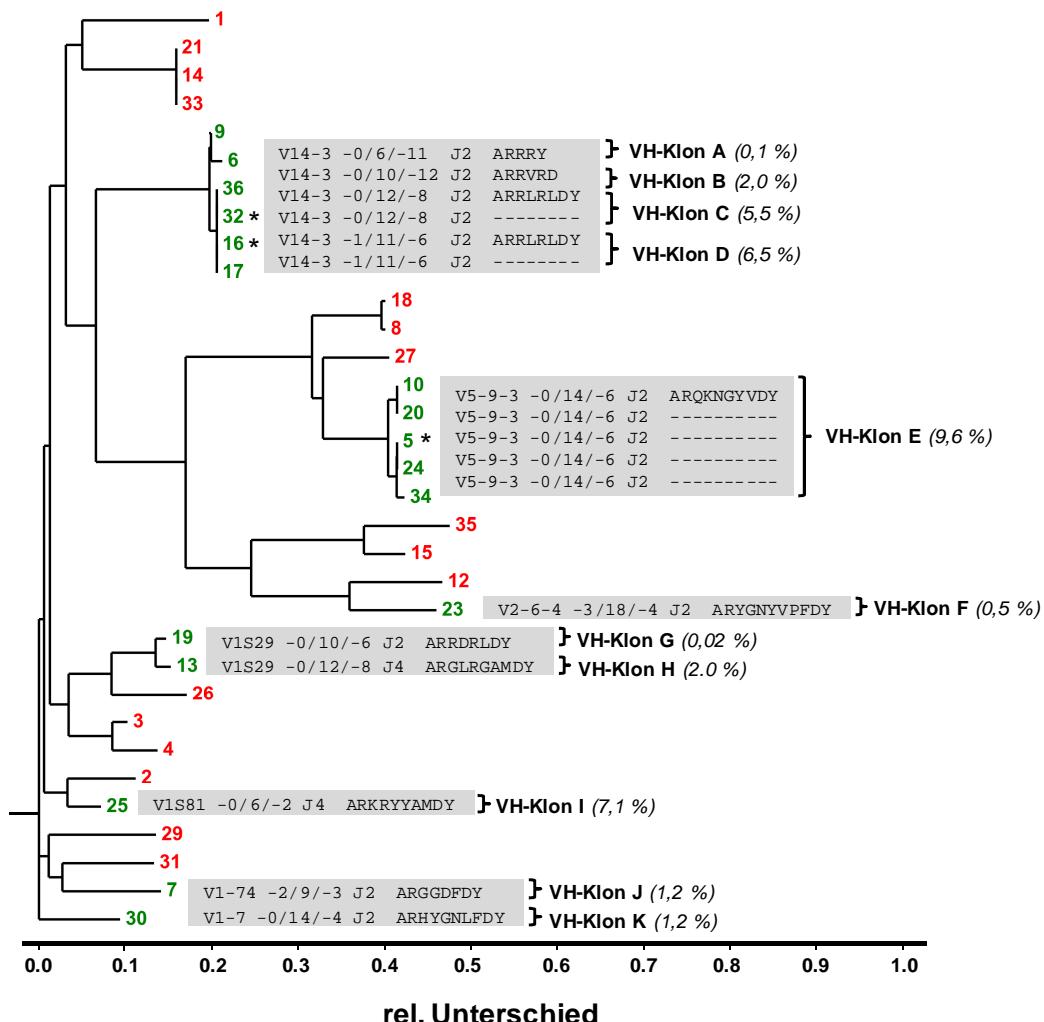


Abb.18 Vergleich der VH-Aminosäuresequenzen und Klonotypen der scFv-Phagen.

Die Aminosäuresequenzen der VHs der 33 monoklonalen scFv-Phagen wurden mit *ClustalW* unter Anwendung der *Neighbor-Joining* Methode verglichen und das *Alignment* als Dendrogramm dargestellt. Je ähnlicher sich Sequenzen sind, desto näher liegen sie im Baum zusammen. Die Nummern der Phagen sind aufgeführt, wobei L-363-Binder grün und Nicht-Binder rot markiert sind. Die VH-Klonotypen wurden mit der *ARResT/Interrogate*-Plattform für die L-363-Binder ermittelt (graue Kästen). *ARResT/Interrogate* beschreibt einen Klonotypen mit der Nummer des V-Gens, der Anzahl der entfernten V-Gen-Nukleotide, die Anzahl der neu hinzugefügten Nukleotide (vom D-Gen), die Anzahl der entfernten J-Gen-Nukleotide, der Nummer des J-Gens und der Aminosäuresequenz der CDR3. Die untersuchten L-363-Binder können 11 unterschiedlichen Klonen zugeordnet werden, die von A bis K bezeichnet wurden. Von Klonen, denen mehrere scFv-Phagen zugeordnet werden konnten, wurde ein Kandidat (mit Stern * markiert) für weitere Bindungsanalysen ausgewählt.

Auch die scFv-Phagen #16, #17, #32 und #36 bilden ein Cluster, das zwei Klonotypen zugeordnet werden kann, die sich nur in der V/D/J-Rekombination unterscheiden, und als VH-Klone C (5,5 % VH-Sequenzen) und D (6,5 % VH-Sequenzen) bezeichnet werden. Alle weiteren L-363-bindenden scFv-Phagen haben VH-Sequenzen, die sich z.T. in ihren verwendeten V-Gene ähneln (#6 und #9, #13 und #19). Da jedoch Unterschiede in den V/D/J-Rekombinationen und CDR3-Aminosäuresequenzen auftreten, liegen unterschiedliche Klonotypen vor, die

Ergebnisse

auf verschiedene Klone zurückzuführen sind (A, B, F, G, H, I, J, K). Auch die VL-Aminosäuresequenzen wurden bestimmt, die VL-Klonotypen ermittelt und den VH-Klonen zugeordnet, mit denen sie im scFv gepaart vorkommen (Abb. 19). Die VLs unterscheiden sich deutlich in ihren Aminosäuresequenzen, wobei die VLs der L363-Binder, die zusammen mit dem häufigsten VH-Klon E auftreten, ein größeres Cluster bilden.

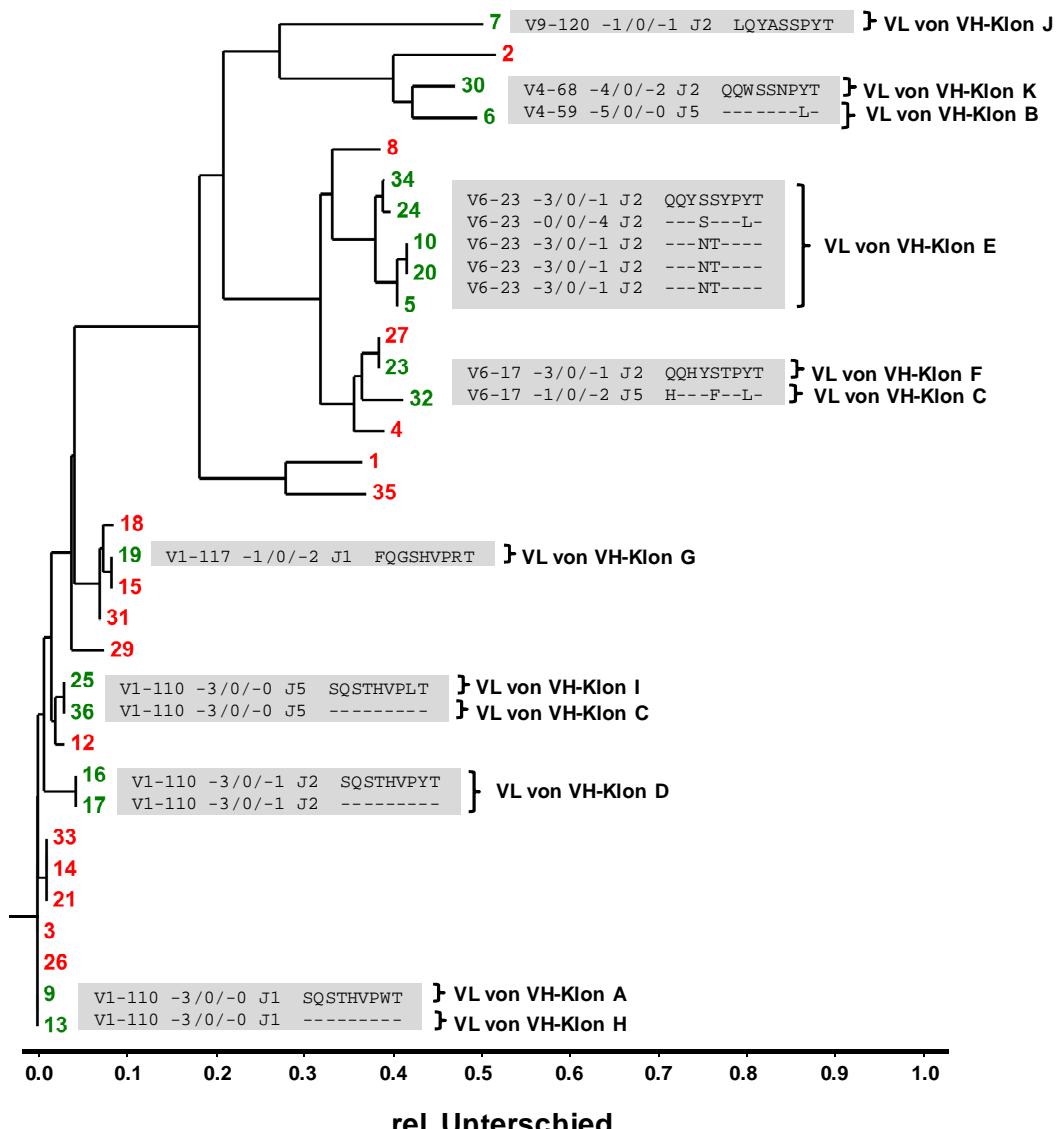


Abb.19 Vergleich der VL-Aminosäuresequenzen und Klonotypen der scFv-Phagen.

Die Aminosäuresequenzen der VLs der 33 monoklonalen scFv-Phagen wurden mit *ClustalW* unter Anwendung der *Neighbor-Joining* Methode verglichen und das *Alignment* als Dendrogramm dargestellt. Je ähnlicher sich Sequenzen sind, desto näher liegen sie im Baum zusammen. Die Nummern der Phagen sind aufgeführt, wobei L-363-Binder grün und Nicht-Binder rot markiert sind. Die VL-Klonotypen wurden mit der *ARResT/Interrogate*-Plattform für die L-363-Binder ermittelt (graue Kästen). *ARResT/Interrogate* beschreibt einen Klonotypen mit der Nummer des V-Gens, der Anzahl der entfernten V-Gen-Nukleotide, die Anzahl der neu hinzugefügten Nukleotide, die Anzahl der entfernten J-Gen-Nukleotide, der Nummer des J-Gens und der Aminosäuresequenz der CDR3. Die VL-Klonotypen wurden den entsprechenden VH-Klonen zugeordnet.

Ergebnisse

Zwar liegen hier verschiedene VL-Klonotypen vor, doch die Unterschiede sind auf J-Gene und zwei Aminosäuren in der CDR3 beschränkt. Die variierenden Signalintensitäten der scFv-Phagen vom VH-Klon E im ELISA könnten auf diese Unterschiede zurückzuführen sein. Auch für den VH-Klon D wurden VL-Sequenzen mit gleichen Klonotypen gefunden. Wie bereits beim *Panning* der CD64-Immunbank, wurden scFv-Phagen mit einer ähnlichen VH-VL-Kombination angereichert. Bei dem VH-Klon C hingegen treten zwei scFvs mit deutlich unterschiedlichen VL-Sequenzen auf, wohingegen die unterschiedlichen VH-Klone A und I mit VLs verbunden sind, die eine identische Aminosäuresequenz besitzen. Diese Beobachtungen deuten auf eine Flexibilität der VH-VL-Kombination hin, da die Bindung einer VH auch mit unterschiedlichen VLs erhalten bleiben kann. Für jeden der 11 VH-Klone, die als L-363-Binder identifiziert wurden, wurde ein scFv-Phage für weitere zelluläre ELISA mit gesunden Zellen verwendet. Für die VH-Klone C, D und E, denen mehrere scFv-Phagen zugeordnet wurden, wurden die scFv-Phagen #5, #16 bzw. #32 als Kandidaten ausgewählt. Um die Bindung auf gesunden Zellen des Blutes zu überprüfen, wurden mononukleäre Zellen (*mononuclear cells, MNC*) von unterschiedlichen gesunden Spendern präpariert, die T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und B-Zellen enthielten. Für die Mehrheit der scFv-Phagen war keine oder nur eine sehr schwache Signalzunahme im ELISA mit den MNCs zu erkennen, wohingegen für die scFv-Phagen #6 und #7 eine Zunahme der Absorption gemessen wurde (Abb. 20)

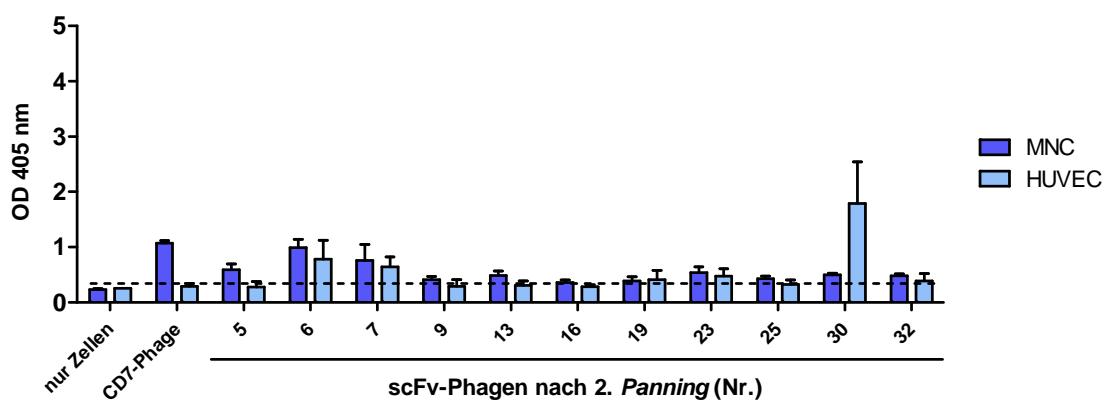


Abb.20 Bindung monoklonaler scFv-Phagen auf Blut- bzw. Endothelzellen

Je 10^6 mononukleäre Zellen (*mononuclear cells, MNC*) bzw. Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*) wurden mit 10^9 CFU monoklonalen scFv-Phagen inkubiert. Die Bindung wurde mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase-Antikörper und ABTS-Substrat detektiert. Die Absorption bei 405 nm ist gezeigt. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Phagen und mit CD7-spezifischem scFv-Phagen mitgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von bis zu drei Experimenten.

Ergebnisse

Als Kontrolle diente der CD7-Phage. CD7 kommt auf T-Zellen vor, wodurch eine Bindung auf den MNCs zu beobachten war, was die Funktionsfähigkeit des Kontrollphagen bestätigte (Abb. 20). Um die Bindung auf Endothel zu überprüfen, wurden Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cell*, HUVEC) im zellulären ELISA eingesetzt. Nur für die scFv-Phage #30, #6 und #7 war eine erhöhte Absorption im Vergleich zum CD7-Kontrollphagen zu messen (Abb. 20). Neun der 11 scFv-Phagen zeigten nur ein sehr schwaches bzw. kein Signal auf den untersuchten Zellen gesunder Spender.

Der Vergleich mit den NGS-Daten zeigte, dass den VH-Klonotypen der 11 L-363-bindenden VH-Klone nach dem zweiten *Panning* zusammen 31 % aller VH-Sequenzen zugeordnet werden konnten. Diese VH-Klone bildeten nach dem ersten *Panning* nur 1,7 % und in der ursprünglichen Myelom-Immunbank nur 0,12 % aller Sequenzen, was die erfolgreiche Anreicherung der L-363-bindenden scFv-Phagen bzw. der entsprechenden VH-Sequenzen bestätigt. Die NGS-Daten zeigten jedoch auch, dass nach dem zweiten *Panning* noch 59 % der VH-Sequenzen übrig waren, denen weder der VH-Klonotyp eines L-363-Binders noch eines Nicht-Binders zugeordnet werden konnten. Um zu überprüfen, ob sich nach dem zweiten *Panning* weitere L-363-bindende scFv-Phagen in der Bank befanden, wurden erneut *Phagemide* von 34 Bakterienkolonien präpariert und die VHs Sanger-sequenziert. Die VH-Sequenzen, die keinem der bereits untersuchten VH-Klonotypen zugeordnet werden konnten, wurden identifiziert, untereinander verglichen und 16 neue VH-Klone identifiziert, für die noch kein scFv-Phage untersucht wurde. Um das Bindungsverhalten zu beurteilen, wurden für jeden VH-Klon monoklonale scFv-Phagen präpariert und die Bindung der scFv-Phagen (je 10^9 CFU) auf L-363 Zellen und MNCs im zellulären ELISA überprüft (Abb. 21A). Acht der 16 scFv-Phagen zeigten keine Zunahme der Absorption im Vergleich zum CD7-Kontrollphagen und sieben der 16 scFv-Phagen zeigten ein deutliches Signal auf MNCs. Nur der scFv-Phagen #55 zeigte ein L-363-spezifisches Signal, das jedoch vergleichsweise schwach war. Den 16 zusätzlich untersuchten VH-Klonotypen konnten nach dem zweiten *Panning* insgesamt 27 % aller VH-Sequenzen zugeordnet werden.

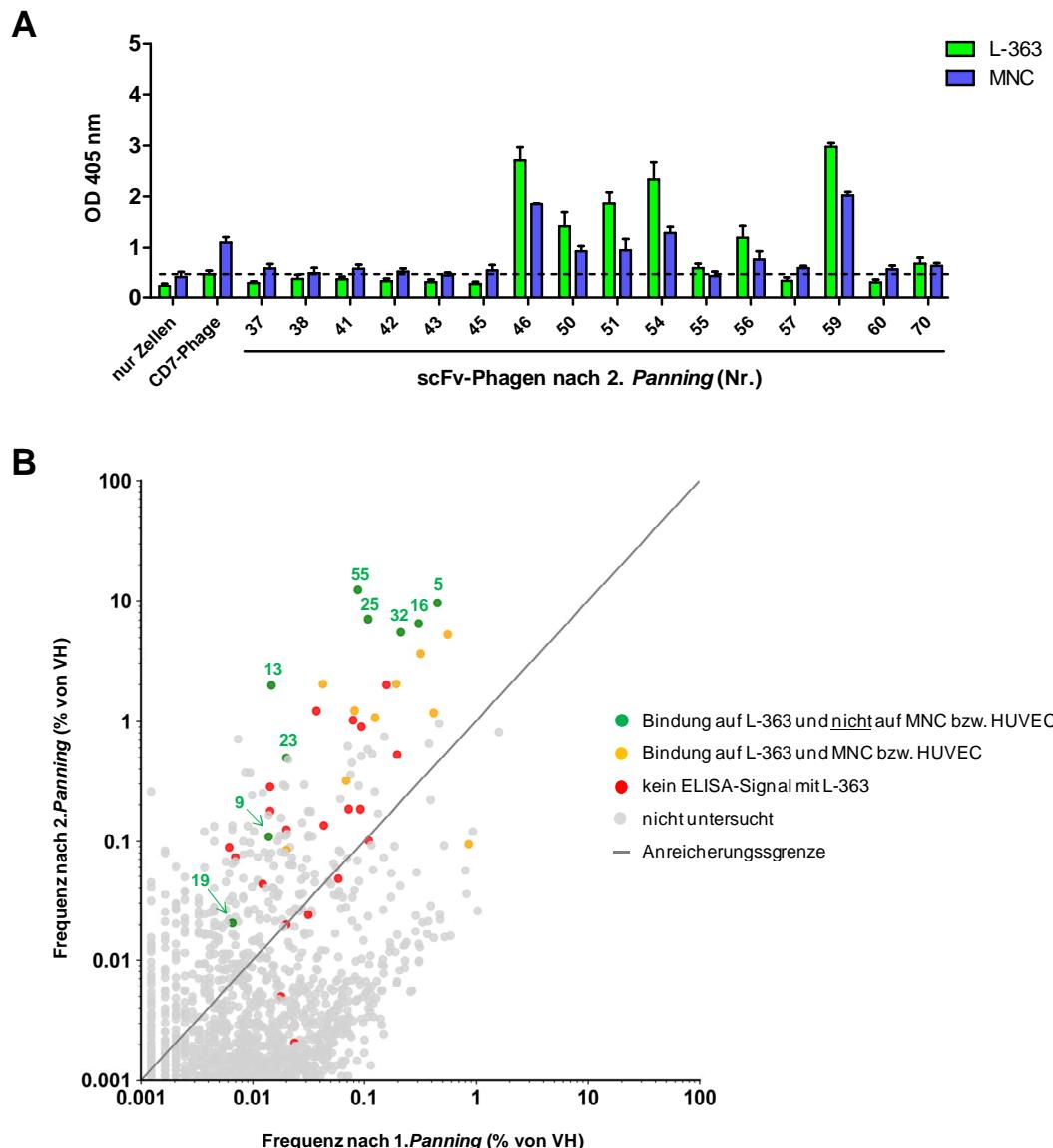


Abb.21 Analyse der Bindung weiterer scFv-Phagen und Frequenzen aller VH-Klonotypen nach den Pannings.

(A) Je 10^6 L-363-Zellen (grün) bzw. mononukleäre Zellen (MNC; blau) wurden mit 10^9 CFU monoklonalen scFv-Phagen inkubiert und die Phagen mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase und ABTS-Substrat detektiert. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Phagen und mit CD7-spezifischem scFv-Phagen mitgeführt. Für die Mehrheit der Kandidaten wurde entweder keine Bindung auf L-363-Zellen oder eine Bindung auch auf MNCs nachgewiesen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. (B) Für alle VH-Klonotypen, die nach dem ersten und zweiten Panning mit einer Frequenz von mehr als 0,001 % in den VH-Sequenzen vorhanden waren, wurden die Frequenzen nach dem ersten und zweiten Panning gegeneinander aufgetragen. VH-Klonotypen, die oberhalb der Anreicherungsgrenze liegen, sind nach dem zweiten Panning häufiger vertreten als nach dem ersten Panning. Die VH-Klonotypen, denen ein scFv-Phage zugeordnet wurde, der ausschließlich auf L-363-Zellen bindet, wurden mit der Nummer des untersuchten scFv-Phagen und grün markiert. VH-Klonotypen, denen scFv-Phagen zugeordnet wurden, die MNCs bzw. HUVECs oder keine L-363-Zellen binden, wurden gelb bzw. rot markiert.

Ergebnisse

Um ein vollständiges Bild von der Verteilung aller VH-Klonotypen nach den *Pannings* zu erhalten, wurden die Frequenzen der VH-Klonotypen nach dem ersten und zweiten *Panning* gegeneinander aufgetragen und die VH-Klonotypen, für die bereits ein scFv-Phage identifiziert und im ELISA untersucht wurde, markiert (Abb. 21B). Hierbei wurde in L-363-Binder, die wenig oder nicht auf den untersuchten gesunden Zellen binden, MNC- bzw. HUVEC-Binder und Nicht-Binder unterschieden. Dabei bilden die VH-Klonotypen der L-363-Binder (#5, #16, #25, #32, #55) ein Cluster, das die Sequenzen nach dem zweiten *Panning* dominierte und damit die erfolgreiche *Panning*-Strategie widerspiegelt (Abb. 21B). Zusätzlich treten aber auch einige VH-Klonotypen, denen L-363-bindende scFv-Phagen zugeordnet wurden, nach dem zweiten *Panning* vergleichsweise schwach auf, wie z.B. der VH-Klonotyp des scFv-Phagen #19 (Abb. 21B). Diese VH-Klonotypen wurden durch das *Panning* aber ebenfalls angereichert. Auch VH-Klonotypen von scFv-Phagen, die zusätzlich auf gesunden Zellen oder auf gar keinen Zellen banden, wurden angereichert, doch tendenziell sind sie schwächer vertreten als das Cluster aus dominanten L-363-Bindern (Abb. 21B). Insgesamt belegen die Sequenzanalysen, dass alle VH-Klonotypen bzw. Phagen erfasst wurden, die nach dem zweiten *Panning* mit mehr als 1 % in den VH-Sequenzen vorkamen (Abb. 21B). Die untersuchten scFv-Phagen repräsentieren zusammen 68 % aller VH-Sequenzen nach dem *Panning*.

Für die weitere Charakterisierung der Bindung wurden die acht scFv-Phagen ausgewählt, für die keine oder nur wenig Bindung auf gesunden Zellen nachgewiesen werden konnte und die ein deutliches Signal auf L-363-Zellen erzeugt hatten. Im ersten Schritt wurde überprüft, ob die scFv-Phagen auch auf anderen Myelomzellen binden, indem ein ELISA mit den Myelomzelllinien INA-6 und U-266 durchgeführt wurde. Alle scFv-Phagen banden auf mindestens einer weiteren Myelomzelllinie, wobei sich die Signalintensitäten zum Teil deutlich unterschieden (Abb. 22A). Bei den scFv-Phagen #5 und #23 konnte neben den Myelomzellen auch ein deutliches Signal auch auf der Burkitt-Lymphom-Zelllinie RAJI, die aus malignen B-Zellen hervorgeht, gemessen werden (Abb. 22A). Eine Bindung an die T-ALL-Zelllinie CEM konnte für den scFv-Phagen #5 und den CD7-Phagen beobachtet werden (Abb. 22A).

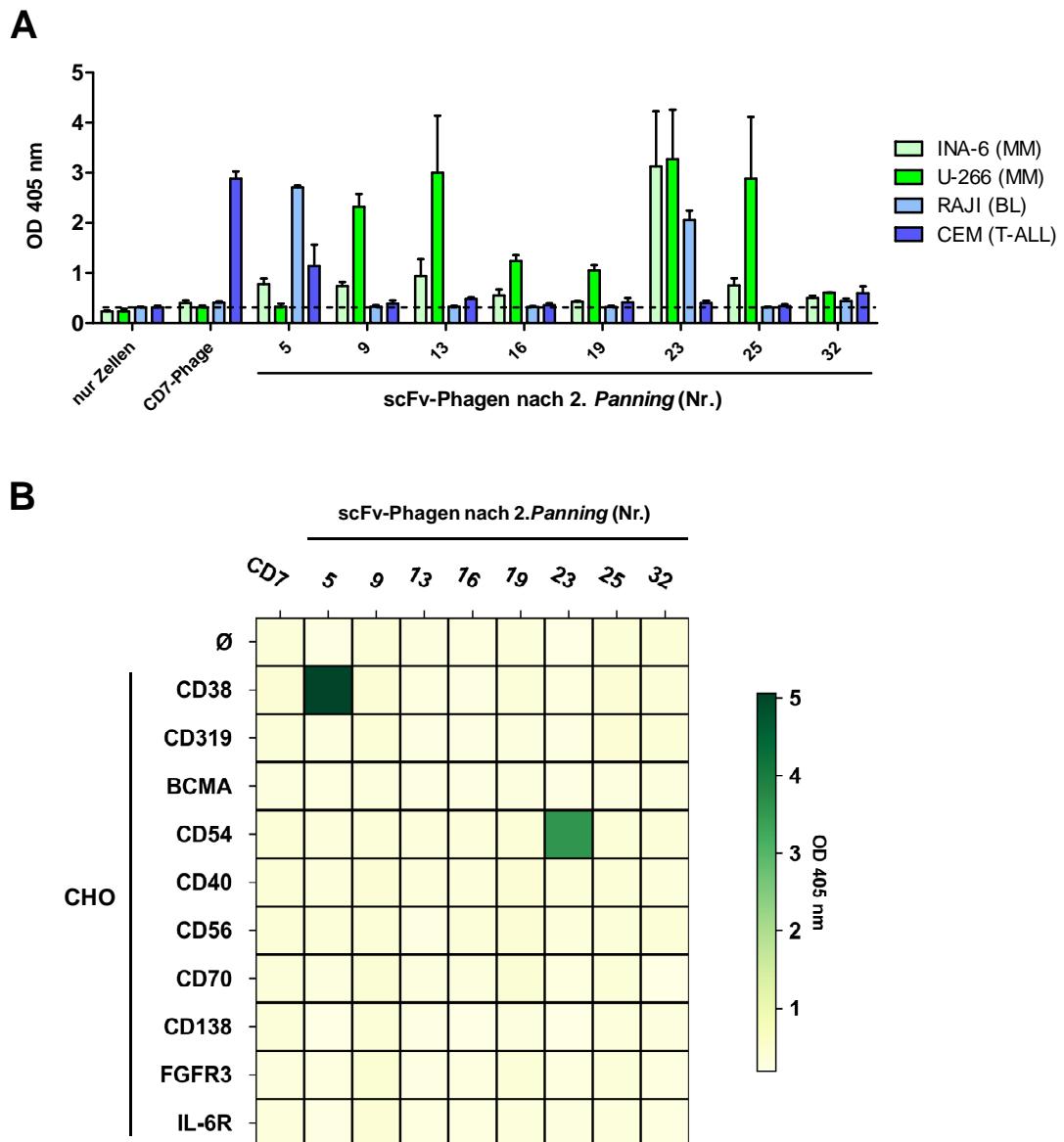


Abb.22 Bindung ausgewählter scFv-Phagen auf unterschiedlichen Lymphomzellen und an Antigene, gegen die sich Antikörper in der Klinik oder Entwicklung befinden.

(A) Je 1×10^6 Zellen der Myelomzelllinien (MM) INA-6 und U-266, der Burkitt-Lymphom-Zelllinie (BL) RAJI und der akuten lymphatischen Leukämie der T-Zelllinie (T-ALL) CEM wurden mit 10^9 CFU monoklonalen scFv-Phagen inkubiert. Die Bindung wurde mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase-Antikörper und ABTS-Substrat detektiert. Die Absorption bei 405 nm ist gezeigt. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Phagen und mit CD7-spezifischem scFv-Phagen mitgeföhrt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. (B) Je 1×10^6 CHO-Zellen wurden mit 10^9 CFU Phagen inkubiert und gebundene Phagen mit anti-M13-Phagen-Meerrettichperoxidase-Antikörper und ABTS-Substrat detektiert. Die CHO-Zellen waren untransfiziert (\emptyset) oder exprimierten auf ihrer Oberfläche humanes CD38 (das Antigen von Daratumumab), CD319 (das Antigen von Elotuzumab), *B-cell maturation antigen* (BCMA), CD54, CD40, CD56, CD70, CD138, *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) oder den Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R). Zur Kontrolle wurde der CD7-Phage mitgeföhrt. Je stärker die Absorption bei 405 nm war, desto dunkler ist die grüne Färbung eines Feldes.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob die scFv-Phagen bekannte Antigene auf Myelomzellen binden, gegen die therapeutische Antikörper entwickelt oder eingesetzt werden, wurden zelluläre ELISA mit Hamster-Zellen durchgeführt, die verschiedene dieser humanen Antigene stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren. Für die scFv-Phagen #5 und #23 konnte ein deutliches Signal für CD38, das Antigen des therapeutisch erfolgreichen Antikörpers Daratumumab, bzw. für das Adhäsionsmolekül CD54 gemessen werden (Abb. 22B). Die Expression von CD38 stimmt mit dem beobachteten Bindungsverhalten des scFv-Phagen #5 auf den Tumorzelllinien und gesunden Zellen überein: CD38 kommt auf L-363, INA-6, Burkitt-Lymphomen, CEM und auch auf gesunden Immunzellen vor, wird aber nicht auf U-266 und Endothelzellen exprimiert (Abb. 22A) (de Weers et al. 2011; Malavasi et al. 2008). Auch die Expression von CD54 passt zum Bindungsverhalten des scFv-Phagen #23, da CD54 auf allen hier untersuchten Tumorzelllinien, außer den CEM vorkommt (Abb. 22A) (Klausz et al. 2017). Auf gesunden Immunzellen und Endothelzellen tritt CD54 erst nach der Aktivierung der Zellen mit Zytokinen, z.B. Tumornekrosefaktor- α , auf und wird sonst nur sehr schwach exprimiert (Murphy u. Weaver 2018). Mit den scFv-Phagen #9, #13, #16, #19, #25 und #32 wurden somit neue Antikörper gegen Myelomzellen identifiziert, die keines der bislang untersuchten Antigene erkennen und potentiell neue Zielstrukturen binden. Weitere Untersuchungen werden folgen, um die Antigene zu identifizieren.

Um die Epitope der scFv-Phagen #23 und #5 näher einzugrenzen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit den CD54- bzw. CD38-transfizierten Hamster-Zellen durchgeführt, die zuvor mit CD54- bzw. CD38-Antikörpern inkubiert wurden. Um die Bindung des scFv-Phagen #23 näher zu untersuchen, wurden die CD54-transfizierten Zellen mit dem CD54-Antikörper BI-505 bzw. HA58 inkubiert und die Bindung des scFv-Phagen #23 im Durchflusszytometer ermittelt. BI-505 ist ein humaner CD54-Antikörper, der klinisch für die Behandlung des Myeloms getestet wurde und im Gegensatz zum HA58 nicht die Interaktion zwischen CD54 und Integrinen blockiert. Im Vergleich zur Isotypkontrolle verringerte sich die spezifische Bindung des Phagen #23 nicht durch die Zugabe von BI-505, weshalb sich die Epitope beider Antikörper unterscheiden müssen (Abb. 23A).

Ergebnisse

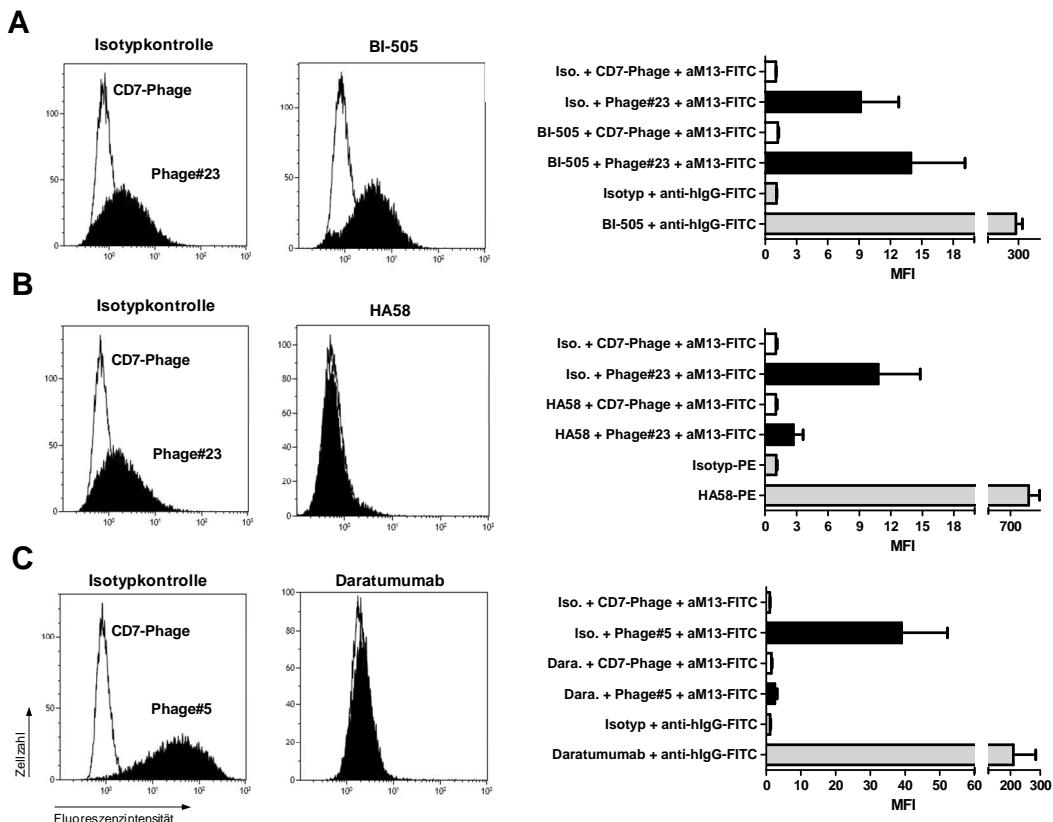


Abb.23 Einfluss der Bindung von CD54- bzw. CD38-Antikörpern auf die Bindung des CD54- und des CD38-spezifischen scFv-Phagen.

5x10⁵ CD54-transfizierte CHO-Zellen wurden mit (A) humanen CD54-Antikörper BI-505 oder (B) dem murinen CD54-Antikörper HA58 oder den entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert. Im Anschluss wurden 1x10⁹ CFU scFv-Phagen #23 (schwarz) bzw. CD7-Phagen (weiß) zugegeben und die Bindung im Durchflusszytometer gemessen. (C) 5x10⁵ CD38-transfizierte CHO-Zellen wurden mit 500 µg/ml IgG1-Isotypkontrolle oder Daratumumab inkubiert. Im Anschluss wurden 1x10⁹ CFU Phagen #5 (schwarz) bzw. CD7-Phagen (weiß) zugegeben und die Bindung im Durchflusszytometer gemessen. Gezeigt sind exemplarische Histogramme, die die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl zeigen (links), und die Mittelwerte ± SEM der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von drei unabhängigen Experimenten (rechts). Die Detektion der Phagen erfolgte mit anti-Phagen-Kanninchenserum und sekundärem Antikörper (aM13-FITC). Als Kontrolle wurde die Bindung der CD54- bzw. CD38-Antikörper auf den transfizierten CHO-Zellen durch die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gegen humane IgG (anti-hlgG-FITC) überprüft (rechts, grau).

Nach der Inkubation der Zellen mit HA58 verringerte sich die Bindung des scFv-Phagen #23 deutlich im Vergleich zu Isotypkontrolle, weshalb beide Antikörper CD54 in der gleichen Region binden müssen (Abb. 23B). Ob der scFv-Phagen #23 als Antikörper auch die Bindung von CD54 an Integrine blockieren kann wie HA58 und so die Adhäsion zwischen Zellen beeinflusst, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Um die Bindung des scFv-Phagen #5 zu untersuchen, wurden die CD38-transfizierten Zellen mit dem klinisch genutzten CD38-Antikörper Daratumumab bzw. einer Isotypkontrolle inkubiert und die Bindung des scFv-Phagen im Durchflusszytometer ermittelt. Die eingesetzte Isotypkontrolle verhinderte nicht die Bindung des scFv-Phagen #5 an CD38, wohingegen

Ergebnisse

durch die Inkubation mit Daratumumab die Bindung des scFv-Phagen #5 vollständig verhinderte, was darauf hindeutet, dass der scFv-Phage #5 und Daratumumab CD38 in der gleichen Region binden (Abb. 23C).

3.3.1 Funktionelle Charakterisierung des neuen CD38-Antikörpers

Um die Effektorfunktionen des neuen CD38-Antikörpers zu analysieren und mit Daratumumab zu vergleichen, wurde mit der VH und VL des scFv-Phagen #5 ein IgG1-Antikörper generiert. Hierfür wurden die VH und VL synthetisiert und in Plasmide mit dem konstanten Teilen der schwerer bzw. leichten Kette eines humanen IgG1 kloniert. Der erhaltene Antikörper, #5-CD38-IgG1, ist somit ein chimärer IgG1, da die variablen Regionen von der Maus und die konstanten Teile vom Menschen stammen. Der Antikörper wurde in Hamster-Zellen rekombinant hergestellt und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Konzentration wurde bestimmt und die Reinheit mit der SDS-PAGE überprüft. Unter reduzierenden Bedingungen waren Banden bei 25 kDa und 50 kDa und unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Bande bei 150 kDa zu erkennen, die den zu erwartenden Größen der leichten bzw. schweren Kette und eines intakten IgG1-Antikörpers entsprechen (Abb. 24A). Die Gel-Elektrophorese bestätigt eine hohe Reinheit des produzierten Antikörpers, da keine weiteren Banden zu sehen sind.

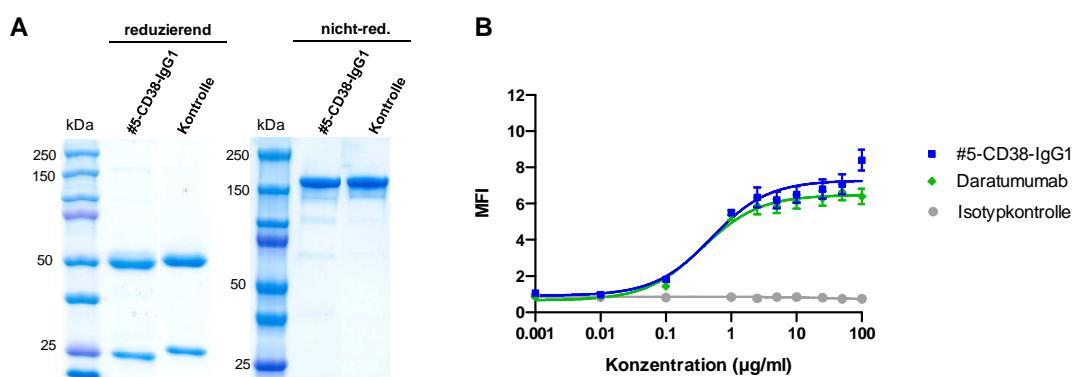


Abb.24 Reinheit und Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von #5-CD38-IgG1.

(A) Zur Bestimmung der Reinheit wurden mit je 6 μg des aufgereinigten #5-CD38-IgG1 und einer IgG1-Kontrolle SDS-PAGEs unter reduzierenden (links) und nicht-reduzierenden (rechts) Bedingungen mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt. (B) Steigende Konzentrationen des #5-CD38-IgG1 (blau), Daratumumab (grün) und einer IgG1-Isotypkontrolle (grau) wurden mit der CD38-positiven Zelllinie GRANTA-519 inkubiert und die gebundenen Antikörper durchflusszytometrisch mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper gegen humane IgG gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Um die konzentrationsabhängige Bindung von #5-CD38-IgG1 an CD38 zu überprüfen, wurden durchfusszytometrische Analysen mit der CD38-positiven B-Zell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 durchgeführt. Im Vergleich zur Isotypkontrolle war mit zunehmender Konzentration des #5-CD38-IgG1 eine erhöhte Fluoreszenzintensität zu messen, wobei der EC₅₀-Wert bei 3,3 nM lag. Da für Daratumumab ein EC₅₀-Wert von 2,4 nM gemessen wurde, binden beide Antikörper CD38 mit ähnlicher Affinität (Abb. 24B).

Die Vermittlung Fc-vermittelter Effektorfunktionen gegen CD38-positive Tumorzellen wurde für #5-CD38-IgG1 analysiert und mit Daratumumab verglichen. Um die Vermittlung der zellulären Zytotoxizität (ADCC) zu messen, wurde die Lyse von Tumorzellen mit den MNCs gesunder Spender in Chromfreisetzungsversuchen ermittelt. Sowohl #5-CD38-IgG1 als auch Daratumumab zeigten eine konzentrationsabhängige Lyse, wobei der EC₅₀-Wert für #5-CD38-IgG1 mit 7,9 pM etwas niedriger lag als der von Daratumumab mit 17,5 pM (Abb. 25A). Zur Messung der Phagozytose von Tumorzellen (ADCP) wurden ein *Live Cell Imaging* mit Makrophagen durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass durch die Zugabe der Antikörper #5-CD38-IgG1 und Daratumumab mehr phagozytierte Tumorzellen mit der Zeit gemessen wurden als bei der Isotypkontrolle (Abb. 25B). Zudem wurde das Oberflächenprotein CD47 auf den Tumorzellen mit einem Antikörper blockiert. CD47 wird auf gesunden Zellen und Tumorzellen exprimiert und wirkt durch die Bindung an den Rezeptor SIRP α auf Makrophagen inhibierend auf die Phagozytose (*don't eat me* Signal). Das Blockieren von CD47 hatte eine Verstärkung der Phagozytose zur Folge, die von #5-CD38-IgG1 und Daratumumab vermittelt wurde, wobei das Blockieren von CD47 alleine keine Phagozytose initiierte (Abb. 25B). Im Gegensatz zu anderen CD38-Antikörpern, kann Daratumumab in *in-vitro*-Versuchen auch das Komplementsystem aktivieren (CDC). Diese Aktivierung wurde auch für #5-CD38-IgG1 nachgewiesen, denn im Vergleich zur Isotypkontrolle stieg die Lyse der Tumorzellen durch die Zugabe von #5-CD38-IgG1. Im Durchschnitt lag die Lyse der Tumorzellen für Daratumumab bei 40 % und für #5-CD38-IgG1 bei 20 % (Abb. 25C).

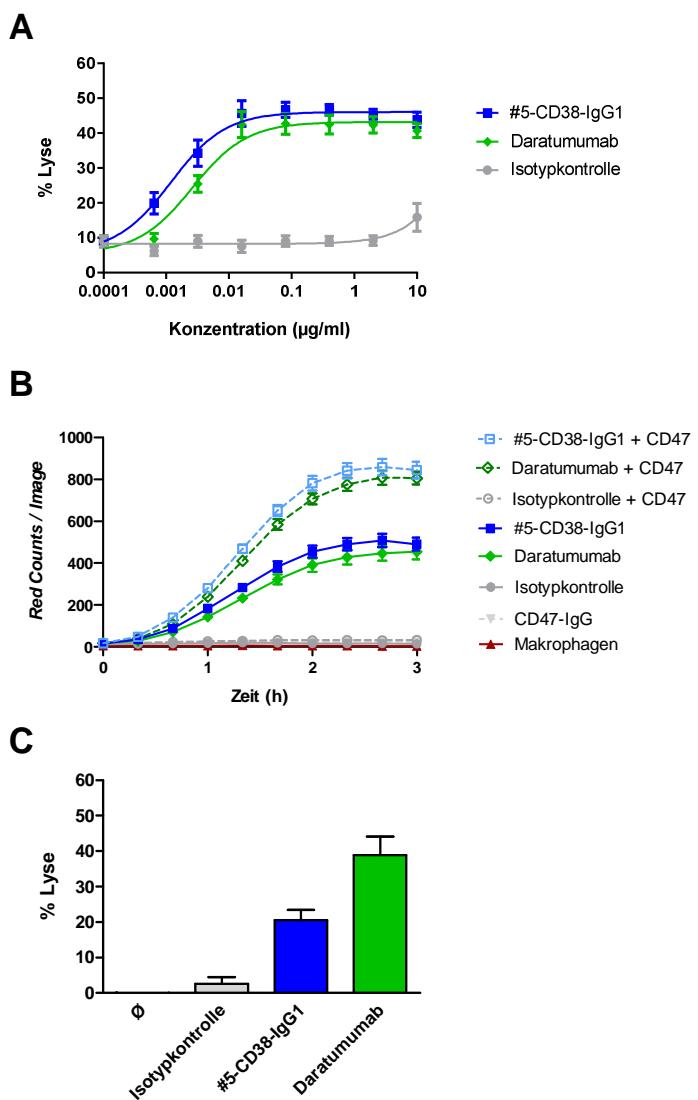


Abb.25 Funktionelle Analyse des #5-CD38-IgG1 im Vergleich zu Daratumumab.

(A) Die Messung der ADCC erfolgte im ^{51}Cr -Freisetzungssassay. Hierfür wurden mit radioaktivem Chromat-markierte CD38-positive Tumorzellen (DAUDI) mit Verdünnungen der Antikörper und mit den MNCs gesunder Spender (Verhältnis 1:40) inkubiert. Nach 4 h bei 37°C wurde die Szintillation des freigesetzten radioaktiven Chromats aus dem Überstand gemessen. (B) Die Messung der ADCP erfolgte im *Live Cell Imaging*. Hierfür wurden pHrodo-markierte CD38-positive Tumorzellen (DAUDI) mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper und Makrophagen (Verhältnis 1:1) inkubiert. Gezeigt ist das Fluoreszenzsignal der phagozytierten Zellen in RedCounts / Image über die ersten 3 h. Zum Blockieren des *don't eat me* Signals auf den Tumorzellen wurde CD47-IgG2 α mit 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. (C) Die Messung der CDC erfolgte im ^{51}Cr -Freisetzungssassay. Mit radioaktivem Chromat-markierte CD38-positive Tumorzellen (RAJI) wurden mit 25 % (v/v) Serum gesunder Spender 4 h bei 37°C zinkubiert und die Szintillation des freigesetzten Chromats gemessen. Die Konzentrationen der Antikörper lagen bei 50 $\mu\text{g/ml}$.

Der neue Antikörper #5-CD38-IgG1 bindet CD38 mit etwa gleicher Affinität wie Daratumumab und vermittelt die gleichen indirekten Effektorfunktionen. Ob der neue CD54-Antikörper und die anderen identifizierten Antikörper, die potenziell neue Antigene binden, ähnlich wirksam gegen Tumorzellen sind, werden weitere Untersuchungen zeigen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mit dem Phagen-Display neue Antikörper gegen den Fc γ R CD64 und gegen die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms zu identifizieren. Immunbanken im scFv-Format wurden aus immunisierten Mäusen generiert und Phagen-Displays mit einem subtraktiven, zellulären *Panning*-Protokoll durchgeführt, um CD64- bzw. Myelom-spezifische Phagen-Antikörper zu isolieren. Mit dieser Strategie konnten einerseits neue CD64-Antikörper identifiziert werden, die die Bindung von IgG-Antikörpern an CD64 blockieren oder diese unbeeinflusst lassen und andererseits neue Antikörper gegen CD38, CD54 und bislang unbekannte Zielstrukturen auf Myelomzellen identifiziert werden. Für den im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierten, neuen chimären CD38-Antikörper #5-CD38-IgG1 konnten potente Effektorfunktionen ermittelt werden, die auch der klinisch erfolgreiche CD38-Antikörper Daratumumab besitzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass vielversprechende neue Antikörper gegen CD64 und Myelomzellen mit dem verfolgten Ansatz isoliert werden konnten.

Membranproteine, die als Zielstrukturen für therapeutische Antikörper dienen, können post-transkriptionale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, und Faltungen haben, die nach dem Einbau in die Membran entstehen (Heinrich et al. 2014). Um Antikörper zu identifizieren, die Membranproteine im naiven Zustand binden, wurde für das *Panning* der Immunbanken ein zellulärer Ansatz ausgewählt, bei dem eine Depletion mit Antigen-negativen und eine Selektion mit Antigen-positiven Zellen durchgeführt wurde. So wurden neue Antikörper gegen das Membranprotein CD64 durch ein *Panning* mit untransfizierten und CD64-transfizierten Zellen identifiziert. Solche Strategien wurden bereits erfolgreich für die Suche nach neuen Antikörpern gegen Zielstrukturen, wie z. B. CD36 und CD13, als auch zur Suche nach konformationsspezifischen Antikörpern gegen das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ angewendet (Hoogenboom et al. 1999; Peipp et al. 2001; Schwarz et al. 2004). Für die Identifikation neuer Antikörper gegen die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms wurde die Depletion mit den Blutzellen gesunder Spender und die Selektion mit Tumorzellen durchgeführt, um Myelom-spezifische Antikörper anzureichern. Mit dieser Methode können

Diskussion

Antikörper identifiziert werden, deren Antigene als therapeutische Zielstruktur noch unbekannt sind oder die Antigene binden, die Tumor-spezifische strukturelle Veränderungen aufweisen, da bei der malignen Transformation Modifikationen wie z.B. abberante Glykosylierungen oder 3-dimensionale, strukturelle Veränderungen auftreten (Munkley u. Elliott 2016; Zaenker et al. 2016). So wurden mit dem subtraktiven, zellulären *Panning* Antikörper gegen z. B. das *C-Type Lectin-Like Molecule-1* oder die *ATPase family AAA domain containing 3A* identifiziert, die neue potentielle Zielstrukturen bei der AML darstellen (Bakker et al. 2004; Geuijen et al. 2005).

Für die Identifikation der Antikörper gegen diese AML-Antigene wurden semi-synthetische Antikörperbanken angewendet, deren VH-CDR3-Sequenz künstlich erzeugt und in humane V-/J-Gene eingefügt wurden (de Kruif et al. 1995). Jedoch durchlaufen Antikörper, die aus solchen synthetischen oder naiven Banken isoliert wurden, keinen Reifungsprozesses im Immunsystem, weshalb anschließende Affinitätsreifungen notwendig sein können (Low et al. 1996). Naiven und synthetische Antikörperbanken können zudem von Antikörpern gegen Antigene dominiert werden, die in der ursprünglichen Bank stark vertreten sind (Noronha et al. 1998; Hoogenboom et al. 1999). Solche Phagen-Antikörper könnten auch den *Panning*-Prozess dominieren und damit die Isolation Tumor-spezifischer Phagen-Antikörper stören. Für diese Arbeit wurden Immunbanken aus Tieren generiert, die mit Patientenmaterial immunisiert wurden und deren Immunisierung durch den Antikörpertiter im Serum nachgewiesen wurde. Eine Immunisierung erzeugt durch den Reifungsprozess der B-Zellen Antikörper mit hoher Affinität gegen ihr Antigen (Murphy u. Weaver 2018). Eine hohe Affinität für das Antigen auf der Tumorzelle ist eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz als therapeutischer Antikörper. Ein Nachteil bei Immunisierungen ist jedoch der Toleranzmechanismus des Immunsystems, der die Ausbildung von Antikörpern gegen Antigene, die zwischen Mensch und Maus hoch konserviert sind, verhindert und damit das Spektrum an Antigenen, die erkannt werden können, einschränkt (Hust et al. 2007). Außerdem können die murinen VH- und VL-Sequenzen u. U. eine Immunantwort gegen den therapeutischen Antikörper erzeugen, weshalb eine Humanisierung der variablen Regionen notwendig ist (Khazaeli et al. 1991).

Diskussion

Die Diversität unserer generierten Immunbanken und die Veränderungen der Immunbanken durch das komplexe subtraktive, zelluläre *Panning*-Protokoll wurden durch begleitende NGS-Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden, auf Sequenz-Ebene überwacht. So zeigte sich eine schrittweise Verringerung der Vielfalt und die Selektion dominanter Klone nach jeweils zwei *Panning*-Runden. Beim *Panning* beider Immunbanken hat das erste *Panning* die Diversität nur halbiert, während sowohl Gleichmäßigkeit als auch Dominanz im Vergleich zur ursprünglichen Immunbank unverändert blieben. Erst durch das zweite *Panning* waren ein deutlicher Rückgang der Diversität und Gleichmäßigkeit zu beobachten. Beim ersten *Panning* wurden scFv-Phagen ausgewählt, doch ein hoher Hintergrund an irrelevanten scFv-Phagen scheint mitgeführt worden zu sein, wodurch die Gleichmäßigkeit unverändert blieb. Erst nach der Amplifikation der Phagen und dem anschließenden zweiten *Panning* war bei beiden Immunbanken eine deutliche Veränderung der Zusammensetzung zu beobachten, die mit der Anreicherung von scFv-Phagen zu erklären war.

Mit Hilfe der NGS-Analysen wurde entschieden nach dem zweiten *Panning* mit der Untersuchung vereinzelter scFv-Phagen zu beginnen, da ein Rückgang der Diversität und eine Anreicherung dominanter VH-Klone zu beobachten war. Bei ähnlichen Ansätzen mit zellulären *Panning*-Protokollen wurden zwischen drei und fünf Runden durchgeführt (Klausz et al. 2017; Roovers et al. 2001). Die richtige Anzahl an *Pannings* ist beim Phagen-Display von großer Bedeutung: Durch zu wenige *Pannings* werden Antigen-spezifische scFv-Phagen nicht ausreichend angereichert, um identifiziert zu werden. Werden jedoch zu viele *Pannings* durchgeführt, können scFv-Phagen, die das Antigen binden aber weniger effizient amplifiziert werden, verdrängt werden (Bradbury u. Marks 2004; Derda et al. 2010). Bei zellulären *Pannings* gegen unbekannte Antigene, wie bei dem hier durchgeföhrten *Panning* der Myelom-Immunbank, besteht zudem die Schwierigkeit, dass die Häufigkeit und Expression dieser Antigene nicht bekannt sind. So hätten bei weiteren *Pannings* der Myelom-Immunbank vergleichsweise niedrig-frequente aber vielversprechende scFv-Phagen wie #9 (0,1 %) oder #19 (0,02 %) verloren gehen können. Des Weiteren erlaubte die Kombination aus den Sequenzdaten der VHs und den Bindungsanalysen der scFv-Phagen Vorhersagen über die Anzahl der zu erwartenden Binder und deren

Anreicherung. So zeigten die begleitenden Sequenzdaten beim *Panning* der CD64-Immunbank, dass alle CD64-Binder identifiziert worden sein müssen. Beim *Panning* der Myelom-Immunbank war hingegen zu beobachten, dass zwar die Mehrheit aller Myelom-bindenden Antikörper gefunden worden ist, aber die Anwesenheit weiterer Kandidaten nicht ausgeschlossen werden kann. Mit Hilfe von NGS-Daten, einer PCR und VH-spezifischer Primer können gezielt VH-Klonotypen isoliert und für die Herstellung von Antikörperfragmenten genutzt werden, um so mögliche Binder gezielt zu isolieren, was eine Strategie für die weitere Isolierung seltener VH-Klonotypen aus der Myelom-Immunbank sein könnte (Ravn et al. 2010).

Für das NGS wurde in dieser Abreit das Illumina MiSeq-System genutzt, dass mehrere Millionen Sequenzierungen parallel erlaubt. Die maximal erreichbare Länge einer Sequenzierung mit dem verwendeten MiSeq-System liegt bei 500 - 600 bp, weshalb die Sequenzierung auf die VH-Region beschränkt wurde. Die VH ist häufig wesentlich an der Bindung eines Antikörpers an das Antigen/Epitop beteiligt und ist aufgrund der hohen Diversität charakteristisch für eine B-Zelle (John L Xu u. Mark M Davis 2000). Beim *Panning*-Prozess werden VHs mit passenden VLs gemeinsam selektiert und können später durch Sanger-Sequenzierung identifiziert werden. Die Analyse der VL-Sequenzen der CD64- und Myelom-bindenden scFv-Phagen eines VH-Klons konnten meist auf gleiche oder ähnliche VL-Klone zurückgeführt werden. Die Unterschiede in den VL-Sequenzen hatte zwar einen Einfluss auf die Signalintensitäten im ELISA, doch die Spezifität blieb erhalten.

Neben der Illumina-Plattform werden für die Kombination mit dem Phagen-Display auch andere NGS-Methoden genutzt wie PacBio oder 454 (Rouet et al. 2018). Mit diesen Methoden können mehr als 800 bp und damit der ganze scFv sequenziert werden. So können für funktionelle Analysen scFvs mit den häufigsten VL ausgesucht werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an das Antigen binden (Hemadou et al. 2017). Allerdings ist im Vergleich zum NGS mit dem Illumina die Tiefe der anderen Sequenzierungsmethoden niedriger. So liegt die Tiefe mit PacBio nur bei maximal 400.000 Sequenzierungen (Rouet et al. 2018). Da die CD64- und Myelom-Immunbanken eine Größe von 6 Millionen CFU bzw. 15 Millionen CFU hatten, konnte mit der von uns

gewählten Methode eine tiefe Sequenzierung der ganzen Banken durchgeführt werden.

Um die Sequenz-Daten des NGS auszuwerten, wurden mit der ARResT/Interrogate-Plattform die Klonotypen der VH-Sequenzen ermittelt, die eine einzigartige V/D/J-Rekombination und CDR3-Aminosäuresequenz beschreiben (Bystry et al. 2017). Eine weit verbreitete Strategie ist die Verwendung der CDR3-Aminosäuresequenz zum beschreiben eines VH-Klon ohne weitere Informationen zu Genen und Rekombinationen, was den Vorteil hat, dass die Sequenzierung auf ein kleines Fragment beschränkt wird (Ravn et al. 2010). Hierbei besteht jedoch das Risiko, dass Antikörper, die zwar die gleiche VH-CDR3 haben, unterschiedliche Spezifitäten haben können. So konnte für naive Banken, die aus Menschen generiert worden waren, gezeigt werden, dass vor dem *Panning* nur 0,15 % aller Antikörper, die die gleiche VH-CDR3-Aminosäuresequenz hatten, letztlich auch das gleiche Antigen banden (D'Angelo et al. 2018). Zwar werden, durch ein Display-Verfahren V/D/J-Rekombination und CDR3-Aminosäuresequenz angereichert, die zu einem Antigen-Binder führen, doch die Einschränkung auf die VH-CDR3 liefert ein unvollständiges Bild von der Diversität und verfälscht den Vergleich zwischen der Immunbank vor und nach dem *Panning*. Die hier gewählte Strategie, einen Klonotyp über seine einzigartige V/D/J-Rekombination und CDR3-Aminosäuresequenz zu definieren, minimiert dieses Problem.

Weitere Strategien für die Identifizierung von Antikörpern verzichten auf das Phagen-Display und führen ausschließlich die NGS-Analysen der variablen Regionen antikörperproduzierender B- oder Plasmazellen immunisierter Tiere durch. Häufig auftretende VHs und VLs wurden synthetisiert, zusammengesetzt und die Bindung an das Antigen überprüft (Reddy et al. 2010). Neue Methoden erlauben es zudem Antikörperbanken mit natürlicher VH-VL-Paarung zu generieren, indem die VH und VL aus einer B- oder Plasmazellen zusammen sequenziert werden (DeKosky et al. 2013; DeKosky et al. 2015). Mit diesen NGS-Strategien können auch Antikörper identifiziert werden, die mit dem Phagen-Display nicht isoliert werden können, weil sie nicht oder nur schlecht in Bakterien hergestellt oder auf Phagen präsentiert werden können (Saggy et al. 2012). Voraussetzung ist jedoch, dass B-Zellen und Plasmazellen, die Antikörper gegen das zu untersuchende Antigen

bilden, die Sequenzdaten auch ohne Anwendung einer Display-Methode dominieren. Ein solcher Ansatz wäre für dieses Projekt nicht sinnvoll gewesen, da bei der Immunisierung mit Zellen eine polyklonale Immunantwort gegen verschiedenste Antigene entsteht. Antikörper, die nicht das zu untersuchende Antigen binden, müssen durch die Depletion entfernt werden. Zudem kann nicht sichergestellt werden, dass Antikörper gegen das zu untersuchende Antigen auf der Zelle die Sequenzdaten der Antikörperbank dominieren. Die beiden CD64-bindenden VH-Klone oder der CD38-Antikörper #5-CD38-IgG1 waren in den ursprünglichen Immunbanken nur mit einer Frequenz von 0,02 % und 0,045 % sehr schwach vertreten und wären ohne Anreicherung mit dem Phagen-Display durch reine Sequenzanalysen nur mit sehr großem Aufwand gefunden worden.

Mit dem subtraktiven, zellulären *Panning*-Protokoll wurden CD64-spezifische Antikörper aus der CD64-Immunbank isoliert. Vorausgegangene Versuche CD64-Antikörper aus immunisierten Mäusen mit der Hybridomtechnik zu generieren wurden durch die sehr hohe Affinität der murinen IgG2-Antikörper für humanes CD64 (K_D : 40 nM für mIgG2a) erschwert, da IgG2-Hybridomantikörper so falsch-positive Signale in den Analysen lieferten (Mancardi et al. 2013; Arianne M. Brandsma 2018). Daher wurde das Phagen-Display mit scFv-Antikörperfragmenten, die keinen Fc haben, für die Isolierung neuer CD64-Antikörper gewählt. Die beiden B-Zell-Klone, auf die die hier identifizierten CD64-Antikörper zurückzuführen sind, waren nur mit Frequenzen von 0,02 % in den VH-Sequenzen der ursprünglichen CD64-Immunbank vertreten. Interessanterweise erkennen die CD64-Antikörper verschiedene Epitope und haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Bindung von humanen IgG1-Antikörpern an CD64. Die Antikörper des VH-Klons B blockieren zu ca. 80 % die Bindung von IgG1 an CD64. Andere murine CD64-Antikörper inhibieren diese Interaktion unspezifisch oder nur sehr schwach. So bindet der Antikörper 197 (mIgG2a) zwar CD64, aber die blockierende Wirkung war ausschließlich auf den Fc des Antikörpers zurückzuführen und nicht auf die spezifische Bindung an CD64 (Arianne M. Brandsma 2018). Die beiden CD64-Antikörper m22 und 10.1 sind murine IgG1 und binden humanes CD64 nicht über ihren Fc, doch für beide Antikörper konnte nur eine vergleichsweise schwache Fc-Blockierung (ca.

Diskussion

40 % bzw. 10 %) bei einer identischen Konzentration von 2 µg/ml gemessen werden (Arianne M. Brandsma 2018). CD64-Antikörper sind sowohl für die Erforschung der Funktionsweise von CD64 als auch für die Analyse von Effektorfunktionen neuer Immuntherapeutika von großem Interesse. So könnte z.B. durch das spezifische Blockieren unterschiedlicher FcRs auf Effektorzellen wie Makrophagen die Wirkungsweise eines therapeutischen Antikörpers und die Signalvermittlung über die FcRs genauer charakterisiert werden. Ob die neuen CD64-Antikörper die Interaktion zwischen Fc und CD64 durch das Binden an der Bindungstelle für Fc blockieren, den Zugang zur Bindstelle stören oder möglicherweise CD64 in einer Konformation fixieren, die die Bindung an Fc erschwert, muss eine Identifikation des Epitops klären.

Für die klinische Anwendung von CD64-Antikörpern ist ein Antikörper von Interesse, auf dessen Bindung die IgGs keinen Einfluss haben, da sich im menschlichen Serum ein hoher Spiegel freier IgGs befinden, die an den hoch-affinen Rezeptor CD64 gebunden sind (Nimmerjahn u. Ravetch 2008). Die neuen CD64-Antikörper mit dem VH-Klon A besitzen diese Eigenschaft, da IgG wenig Einfluss auf ihre CD64-Bindung hat. Für das Erkennen und Eliminieren von CD64-postiven Tumorzellen bei der AML wurden bereits Antikörperfragmente, an die Toxine genetisch fusioniert wurden (sog. Immunoxin), entwickelt, da CD64 gut internalisiert wird (Zhong et al. 2001; Tur et al. 2003; Mladenov et al. 2016). So konnte z.B. für MDX-44, ein Immunoxin aus dem CD64-Antikörper H22 (humanisierte Variante von m22) und der A-Kette des Toxins Ricin, eine zytotoxische Wirkung durch Internalisierung beobachtet werden (Zhong et al. 2001). Um zu überprüfen, ob unsere neuen CD64-Antikörper auch für den Einsatz als ADCs oder Immunoxin verwendet werden können, soll die Internalisierung der Antikörper nach Bindung an CD64 mit Hilfe von *Pseudomonas Exotoxin A* (ETA')-basierten Screeningkonjugaten untersucht werden (Kellner et al. 2011; Klausz et al. 2015). Neben der Behandlung der AML wären solche Strategien auch für die Behandlung chronischer Entzündungen verwendbar, bei denen fehlerhaft regulierte Makrophagen auftreten, die ebenfalls CD64 exprimieren (Hristodorov et al. 2012).

Diskussion

CD64-bindende Antikörper können auch zur Rekrutierung von Effektorzellen an Tumorzellen eingesetzt werden. Ein Beispiel ist der bispezifische Antikörper MDX-H210, der CD64 auf Effektorzellen und *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu) auf Tumorzellen erkennt. In vorklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser bispezifische Antikörper HER2-positive Tumorzellen bindet und die Tumorzelllyse durch Neutrophile vermitteln kann (Stockmeyer et al. 1997). In klinischen Studien bei Patienten mit HER2-positiven Brust- bzw. Prostatakarzinomen konnte zwar eine gute Verträglichkeit aber keine dauerhafte Antitumor-Wirkung beobachtet werden (Repp et al. 2003; James et al. 2001). Die fehlenden Effekte wurden u. a. auf die zu geringen Dosen des bispezifischen Antikörpers und die Immunogenität der verwendeten murinen Fab-Fragmente zurückgeführt (Chames u. Baty 2009). Der ersten Generation aus chemisch verknüpften Fab-Fragmenten folgte eine neue Generation aus rekombinanten bispezifischen Antikörpern, denen auch der klinisch erfolgreiche Blinatumomab angehört (Chames u. Baty 2009). Blinatumomab besteht aus murinen scFvs gegen CD19 auf Tumorzellen und gegen CD3 auf T-Zellen, die genetisch verknüpft wurden, um die zytotoxische Wirkung der T-Zellen gegen die Lymphomzellen zu vermitteln (Franquiz u. Short 2020). Ob ein solches Fusionsprotein aus einem Tumor-spezifischen Antikörper und unseren neuen CD64-Antikörpern eine Immunantwort von CD64-positiven Effektorzellen, wie Makrophagen und Granulozyten, gegen Tumorzellen einleiten kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die CD64-vermittelten Phagozytose von Tumorzellen durch therapeutische Moleküle könnte klinisches Potential haben, da bekannt ist, dass die aufgenommenen Antigene von dendritischen Zellen und Makrophagen prozessiert und effektiv präsentiert werden, um T-Zellen zu aktivieren und einen adaptive Immunantwort zu induzieren (van Vugt et al. 1999). Eine Aktivierung des Immunsystems findet bereits therapeutische Anwendung bei *Ckeckpoint-Inhibitor*. So blockiert der Antikörper Ipilimumab das *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA4) auf T-Zellen und fördert damit die Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen, was zu einer Immunantwort gegen den Tumor führen kann (Pardoll 2012; Sharma u. Allison 2015).

Diskussion

Um eine zielgerichtete Immuntherapie zu ermöglichen, sind Antikörper gegen Tumor-spezifische Antigene notwendig, weshalb im Rahmen dieser Arbeit neue Antikörper mit hoher Selektivität gegen die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms identifiziert werden sollten. Gegen das Multiple Myelom werden Immuntherapeutika bereits erfolgreich eingesetzt. Die IgG1-Antikörper Daratumumab und Elotuzumab haben zu einer Verbesserung der Behandlung beigetragen und neue Antikörperperformate wie das BCMA-ADC Belantamab mafodotin oder BCMA-CAR-T-Zellen werden die therapeutischen Optionen zukünftig noch erweitern. Trotz der großen Fortschritte bei der Behandlung des Multiplen Myeloms bleibt die Erkrankung unheilbar und die Entwicklung neuer therapeutischer Antikörper sowie die Identifizierung neuer Zielstrukturen ist weiter von großem Interesse. Mit dem subtraktiven, zellulären *Panning*-Protokoll unserer Immunbank wurden zwei neue Antikörper gegen die Oberflächenproteine CD38 und CD54 identifiziert. Für den scFv-Phage #5 bzw. den neuen Antikörper #5-CD38-IgG1 wurde eine spezifische Bindung an CD38, das Antigen das auch von dem klinisch sehr erfolgreich eingesetzten IgG1-Antikörper Daratumumab gebunden wird, nachgewiesen (Bonello et al. 2019). Daratumumab und #5-CD38-IgG1 binden CD38 mit ähnlicher Affinität und vermitteln beide effektiv ADCC, ADCP und CDC gegen Tumorzellen (de Weers et al. 2011; Overdijk et al. 2012). Zwar hat #5-CD38-IgG1 im Vergleich zu Daratumumab eine schwächere CDC-Aktivität, aber dafür eine etwas höhere ADCC- und ADCP-Aktivität gegen CD38-positive Tumorzellen. Daratumumab wurde mit der Hybridomtechnik aus transgenen Mäusen generiert, die humane Ig-Loci tragen, um humane Antikörper zu erzeugen. Bei der Untersuchung und Selektion der Hybridome wurde neben der Bindung an CD38 auch die Fähigkeit untersucht, CDC gegen Tumorzellen zu vermitteln. Hierbei wurde beobachtet, dass nur Daratumumab (1 von 42 untersuchten CD38-Antikörpern) CDC vermitteln konnte. Eine Charakterisierung des Epitops hat ergeben, dass Daratumumab ein einzigartiges Epitop auf CD38 bindet, das von den anderen CD38-Antikörper nicht gebunden wurde (de Weers et al. 2011). Da unser neuer CD38-Antikörper von Daratumumab blockiert wird und ähnliche therapeutisch relevante Eigenschaften besitzt, müssen beide Antikörper CD38 in der gleichen Region binden. Die VH von Daratumumab setzt sich aus den humanen Genen V3-23(D), J4 und der 15 Aminosäuren

Diskussion

langen CDR3 AKDKILWFGEPVFDY zusammen. Die VH des #5-CD38-IgG1 besteht aus den murinen Genen V5-9-3, J2 und der 10 Aminosäure langen CDR3 ARQKNGYVDY. Die unterschiedlichen Umlagerungen der VH, die zudem von zwei Spezies stammen, schließen jedoch nicht aus, dass beide Antikörper das Antigen in der gleichen Region binden. Um dies zu überprüfen, könnte ein Epitop-mapping analog zu dem für Daratumumab beschriebenen durchgeführt werden (de Weers et al. 2011). Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften von Daratumumab und #5-CD38-IgG1 besitzt unser neuer CD38-Antikörper das Potential für eine klinische Anwendung. Für Daratumumab wurden auch direkte Effektorfunktionen gegen Myelomzellen und immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen. So löst Daratumumab durch die Kreuzvernetzung von CD38 programmierten Zelltod aus und entfernt CD38-positive regulatorische Immunzellen, die eine Immunantwort gegen den Tumor unterdrücken (Jansen et al. 2012; Krejcik et al. 2016). Ob #5-CD38-IgG1 diese Effekte auch vermittelt, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

Neben Daratumumab befinden sich weitere CD38-Antikörper in der vorklinischen und klinischen Entwicklung, wobei auch andere Formate, wie z. B. bispezifische Antikörper, ADCs oder CAR-T-Zellen getestet werden (Bonello et al. 2018). Die bispezifischen Antikörper AMG424 und GBR1342, die bereits klinisch erprobt werden, binden CD3 auf T-Zellen, um eine Immunantwort gegen CD38-positive Tumorzellen einzuleiten (Zuch de Zafra et al. 2019; Caraccio et al. 2020). Auch unser neuer CD38-Antikörper #5-CD38-IgG1 könnte in andere Formate überführt werden, an denen in unserem Labor gearbeitet wird. So könnte mit den oben beschriebenen CD64-Antikörpern bispezifische Antikörper erzeugt werden, um die Aktivierung CD64-positiver Effektorzellen, wie Makrophagen, gegen Myelomzellen zu vermitteln. Da Myelomzellen im ihrem Mikromilieu von Makrophagen umgeben sind, wäre eine gezielte Aktivierung der Phagozyten ein sinnvoller Ansatz (Zheng et al. 2009).

Für den scFv-Phage #23 wurde eine spezifische Bindung an das Adhäsionsmolekül CD54 nachgewiesen. Myelomzellen treten im Knochenmark mit den Zellen des umgebenden Mikromilieus in direkten Kontakt. Diese Knochenmarknische ist eine Voraussetzung für die Entwicklung des Multiplen Myeloms und unterstützt die Ausbildung von

Diskussion

Resistenzen gegen Behandlungen (Kawano et al. 2015; Schmidmaier et al. 2006). CD54 ist ein Adhäsionsmolekül und der Ligand der Integrine *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1; CD11a:CD18) und *macrophage antigen-1* (Mac-1; C11b:CD18) (Hyun et al. 2009). CD54 wird in Folge einer Entzündungsreaktion auf Endothelzellen von Gefäßen induziert, um Immunzellen zu einem Infektionsort zu führen. Auf Myelomzellen wird CD54 verstärkt exprimiert und trägt durch die Interaktion mit Integrinen auf Makrophagen zu Resistenzen gegen Behandlungen bei (Zheng et al. 2013). In präklinischen Studien konnten therapeutische IgG1-Antikörper gegen CD54 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Effektorfunktionen gegen Myelomzellen vermitteln (Klausz et al. 2020; Veitonmäki et al. 2013). In einer ersten klinischen Studie mit dem CD54-Antikörper BI-505 von der Firma *BioInvent* konnte eine gute Verträglichkeit nachgewiesen werden (Hansson et al. 2015). Jedoch konnte bei der Behandlung des SMM, einer Vorstufe des Multiplen Myeloms, keine Wirkung beobachtet werden (Wichert et al. 2017). Wurden CD54-positive Zellen mit dem therapeutischen CD54-Antikörper BI-505 vorinkubiert, so war keine Blockierung der Bindung des scFv-Phagen #23 zu beobachten, weshalb beide Antikörper unterschiedliche Epitope binden müssen. In vorklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass BI-505 ADCP und ADCC gegen Myelomzellen vermittelt und programmierten Zelltod induziert, wenn der Antikörper auf der Zelloberfläche kreuzvernetzt wird (Veitonmäki et al. 2013). Um zu testen, ob unser neuer CD54-Antikörper ähnliche Effektorfunktionen über den Fc vermittelt kann, soll er vom scFv- in das IgG-Format überführt und weiter charakterisiert werden. Wenn CD54-positve Zellen mit dem Antikörper HA58 vorinkubiert wurden, verringerte sich die Bindung des scFv-Phagen #23, weshalb beide Antikörper Epitope in der gleichen Region binden. Der murine IgG1-Antikörper HA58 blockiert die Interaktion zwischen Integrinen und CD54 (Tsujisaki et al. 1991). Ob diese Wirkung auch für unseren neuen CD54-Antikörper gilt, muss noch untersucht werden. Ein Blockieren, der Adhäsion über CD54 könnte eine zusätzliche direkte Effektorfunktion darstellen, die für den therapeutischen CD54-Antikörper BI-505 nicht beschrieben wurde.

Neben den Antikörpern gegen CD38 und CD54 wurden sechs weitere scFv-Phagen isoliert, die eine relativ selektive Myelom-Bindung zeigen. Für diese sechs scFv-Phagen wurde zudem keine Bindung an acht Antigene auf

Diskussion

Myelomzellen detektiert, gegen die sich Antikörper in der Klinik oder Entwicklung befinden. Dazu zählen CD319 und BCMA, die Antigene von Elotuzumab und dem kürzlich für das Myelom zugelassenen ADC Belantamab mafodotin (Tai et al. 2008; Tai et al. 2014). Die sechs scFv-Phagen bzw. neuen Antikörper binden Antigene, die potentielle neue Zielstrukturen darstellen. In folgenden Arbeiten sollen diese Antigene identifiziert und die neuen Antikörper hinsichtlich ihrer therapeutischen Effektivität gegen Myelomzellen umfassend charakterisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Phagen-Display mit einem subtraktiven, zellulären *Panning*-Protokoll und in Kombination mit dem NGS erfolgreich eingesetzt, um CD64- bzw. Myelom-spezifische Antikörper aus Immunbanken zu identifizieren. Sowohl die Antikörper gegen CD64, CD38 und CD54 als auch die Antikörper gegen unbekannte Antigene auf den Myelomzellen sind von großem Interesse und stellen die Grundlage für weitere Projekte zur Entwicklung neuer Immuntherapeutika in der Krebstherapie dar.

5. Zusammenfassung

Therapeutische Antikörper sind heute ein wichtiger Bestandteil der Behandlung von Krebserkrankungen. Voraussetzung für die Wirkung therapeutischer Antikörper ist die spezifische Bindung an Antigene auf Tumorzellen, die eine zielgerichtete und effektive Therapie erlaubt. Da nicht alle Patienten von einer Antikörpertherapie profitieren, besteht weiterhin hoher Bedarf an neuen Antikörpern und neuen Zielstrukturen. Eine Methode zur Identifikation neuer Antikörper stellt das Phagen-Display dar, mit dem auch Antikörper gegen noch unbekannte oder strukturell veränderte Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen aus Antikörperbanken isoliert werden können, was mit heutigen *Genomics*-, *Transcriptomics*- oder *Proteomics*-Methoden nicht unbedingt möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine subtraktive, zelluläre *Panning*-Strategie etabliert, mit der Antikörper gegen Membranproteine auf Zellen angereichert und vereinzelt werden können. Zudem wurde eine *Next-Generation-Sequencing* (NGS)-basierte Strategie etabliert, die es erlaubt, die Qualität der generierten Antikörperbanken zu überprüfen und die Anreicherung von Antikörpern auf Sequenzebene zu verfolgen.

Mit Hilfe dieser Methoden konnten verschiedene Antikörper gegen den Fc-Rezeptor CD64 identifiziert werden. CD64 stellt sowohl eine Zielstruktur auf Tumorzellen als auch einen aktivierenden Rezeptor auf einigen Immunzellen dar, der zur Rekrutierung von Effektorzellen z.B. mit bispezifischen Antikörpern genutzt werden kann. Die neuen CD64-Antikörper, die verschiedene Epitope erkennen und entweder die Fc-CD64-Interaktion blockieren oder unbeeinflusst lassen, zeigen Eigenschaften, die sowohl für die Entwicklung als auch für die Erforschung neuer Immuntherapeutika von großem Interesse sind.

Des Weiteren ist es durch die subtraktive, zelluläre *Panning*-Strategie in Kombination mit NGS-Analysen gelungen, neue Antikörper gegen die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms zu isolieren. Dazu zählen zwei Antikörper gegen die bereits bekannten Myelom-Antigene CD38 und CD54 sowie sechs weitere Antikörper, die bislang unbekannte Antigene binden, die relativ selektiv auf den Tumorzellen des Multiplen Myeloms exprimiert zu werden scheinen. Der neue CD38-Antikörper, der im Rahmen

Zusammenfassung

dieser Arbeit als chimärer IgG1 rekombinant hergestellt und charakterisiert wurde, besitzt potente Effektorfunktionen, die dem klinisch sehr erfolgreichen CD38-Antikörper Daratumumab ähneln. Dies zeigt, dass durch die im Rahmen dieser Doktorarbeit etablierte Methode Antikörper identifiziert werden konnten, die eine interessante Basis für neue, potente Immuntherapeutika darstellen.

6. Summary

Today therapeutic antibodies are an important part of cancer therapy. Specific binding to an antigen on the surface of the tumor cell is an important precondition to allow a precise and effective treatment. Since not all patients benefit from antibody therapies, new antibodies and target structures are needed. Phage display is one method for the identification of new antibodies. Furthermore, it can be used to isolate new antibodies from antibody libraries that bind unknown or structurally altered antigens on the surface of tumor cells that cannot necessarily be found by current genomics, transcriptomics or proteomics approaches. As part of this project, a subtractive, cellular panning strategy was established to enrich and select antibodies targeting membrane proteins. In addition, a next-generation sequencing strategy was established to estimate the quality of our generated antibody libraries and to monitor the enrichment of antibodies by panning on sequence level.

By using these methods, antibodies against the Fc receptor CD64 were identified. CD64 can be used both as tumor cell target and activating receptor on several immune cells for the recruitment of effector cells by e.g. bispecific antibodies. Our new CD64 antibodies detect different epitopes and either block the Fc-CD64 interaction or keep it untouched. They show interesting properties that can be used to develop and study new immune therapeutics. Furthermore, the combination of subtractive, cellular panning and NGS analysis was used to isolate new antibodies against the malignant plasma cells of multiple myeloma. Two antibodies were identified targeting the antigens CD38 and CD54 as well as six antibodies binding so far unknown antigens that seem to be preferentially expressed on the tumor cells of multiple myeloma. The new CD38 antibody was produced recombinantly as chimeric IgG1 and subsequently characterized. It has potent effector functions similar to the CD38 antibody Daratumumab that is successfully used in clinic. These results indicate that by the method established in this project new antibodies were identified that have potential for new and potent immune therapeutics.

7. Literaturverzeichnis

- Arianne M. Brandsma (2018): Fc receptors: regulatory mechanisms and function in antibody therapy. Dissertation. Utrecht.
- Bakker, A. B. H.; van den Oudenrijn, S.; Bakker, A. Q.; Feller, N.; van Meijer, M.; Bia, J. A.; Jongeneelen, M. A. C.; Visser, T. J.; Bijl, N.; Geuijen, C. A. W.; Marissen, W. E.; Radosevic, K.; Throsby, M.; Schuurhuis, G. J.; Ossenkoppele, G. J.; Kruif, J. de; Goudsmit, J. u. Kruisbeek, A. M. (2004): C-type lectin-like molecule-1. A novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer research* 64 (22): 8443–8450.
- Barwick, B. G.; Gupta, V. A.; Vertino, P. M. u. Boise, L. H. (2019): Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Frontiers in immunology* 10: 435.
- Beck, A. u. Reichert, J. M. (2012): Marketing approval of mogamulizumab. A triumph for glyco-engineering. *mAbs* 4 (4): 419–425.
- Berger, W. H. u. Parker, F. L. (1970): Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. *Science (New York, N.Y.)* 168 (3937): 1345–1347.
- Bevaart, L.; Jansen, M. J. H.; van Vugt, M. J.; Verbeek, J. S.; van de Winkel, J. G. J. u. Leusen, J. H. W. (2006): The high-affinity IgG receptor, FcgammaRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma. *Cancer research* 66 (3): 1261–1264.
- Biburger, M.; Lux, A. u. Nimmerjahn, F. (2014): How immunoglobulin G antibodies kill target cells. Revisiting an old paradigm. *Advances in immunology* 124: 67–94.
- Bird, S. A. u. Boyd, K. (2019): Multiple myeloma. An overview of management. *Palliative Care and Social Practice* 13: 1-13.
- Bonello, F.; D'Agostino, M.; Moscvin, M.; Cerrato, C.; Boccadoro, M. u. Gay, F. (2018): CD38 as an immunotherapeutic target in multiple myeloma. *Expert opinion on biological therapy* 18 (12): 1209–1221.
- Bonello, F.; Mina, R.; Boccadoro, M. u. Gay, F. (2019): Therapeutic Monoclonal Antibodies and Antibody Products. *Current Practices and Development in Multiple Myeloma. Cancers* 12 (1): 15.
- Bradbury, A. R. u. Marks, J. D. (2004): Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methods* 290 (1-2): 29–49.
- Bradbury, A. R. M.; Trinklein, N. D.; Thie, H.; Wilkinson, I. C.; Tandon, A. K.; Anderson, S.; Bladen, C. L.; Jones, B.; Aldred, S. F.; Bestagno, M.; Burrone, O.; Maynard, J.; Ferrara, F.; Trimmer, J. S.; Görnemann, J.; Glanville, J.; Wolf, P.; Frenzel, A.; Wong, J.; Koh, X. Y.; Eng, H.-Y.; Lane, D.; Lefranc, M.-P.; Clark, M. u. Dübel, S. (2018): When monoclonal antibodies are not monospecific. Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *mAbs* 10 (4): 539–546.
- Brandsma, A. M.; Schwartz, S. L.; Wester, M. J.; Valley, C. C.; Blezer, G. L. A.; Vidarsson, G.; Lidke, K. A.; Broeke, T. ten; Lidke, D. S. u. Leusen, J. H. W. (2018): Mechanisms of inside-out signaling of the high-affinity IgG receptor FcyRI. *Science signaling* 11 (540).
- Breitling, F.; Dübel, S.; Seehaus, T.; Klewinghaus, I. u. Little, M. (1991): A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104 (2): 147–153.

Literaturverzeichnis

- Burger, R.; Neipel, F.; Fleckenstein, B.; Savino, R.; Ciliberto, G.; Kalden, J. R. u. Gramatzki, M. (1998): Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 91 (6): 1858–1863.
- Bystry, V.; Reigl, T.; Krejci, A.; Demko, M.; Hanakova, B.; Grioni, A.; Knecht, H.; Schlitt, M.; Dreger, P.; Sellner, L.; Herrmann, D.; Pingeon, M.; Boudjoghra, M.; Rijntjes, J.; Pott, C.; Langerak, A. W.; Groenen, P. J. T. A.; Davi, F.; Brüggemann, M. u. Darzentas, N. (2017): ARResT/Interrogate. An interactive immunoprofiler for Ig/TR NGS data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 33 (3): 435–437.
- Cannons, J. L.; Tangye, S. G. u. Schwartzberg, P. L. (2011): SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology* 29: 665–705.
- Caraccio, C.; Krishna, S.; Phillips, D. J. u. Schürch, C. M. (2020): Bispecific Antibodies for Multiple Myeloma. A Review of Targets, Drugs, Clinical Trials, and Future Directions. *Frontiers in immunology* 11: 501.
- Carter, P.; Smith, L. u. Ryan, M. (2004): Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocrine-related cancer* 11 (4): 659–687.
- Carter, P. J. u. Lazar, G. A. (2018): Next generation antibody drugs. Pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nature reviews. Drug discovery* 17 (3): 197–223.
- Chames, P. u. Baty, D. (2009): Bispecific antibodies for cancer therapy. The light at the end of the tunnel? *mAbs* 1 (6): 539–547.
- Cock, P. J. A.; Antao, T.; Chang, J. T.; Chapman, B. A.; Cox, C. J.; Dalke, A.; Friedberg, I.; Hamelryck, T.; Kauff, F.; Wilczynski, B. u. Hoon, M. J. L. de (2009): Biopython. Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25 (11): 1422–1423.
- Cooper, M. D. u. Alder, M. N. (2006): The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124 (4): 815–822.
- Cyster, J. G. u. Allen, C. D. C. (2019): B Cell Responses. *Cell Interaction Dynamics and Decisions*. *Cell* 177 (3): 524–540.
- D'Agostino, M.; Bertamini, L.; Oliva, S.; Boccadoro, M. u. Gay, F. (2019): Pursuing a Curative Approach in Multiple Myeloma. A Review of New Therapeutic Strategies. *Cancers* 11 (12).
- D'Angelo, S.; Ferrara, F.; Naranjo, L.; Erasmus, M. F.; Hraber, P. u. Bradbury, A. R. M. (2018): Many Routes to an Antibody Heavy-Chain CDR3. Necessary, Yet Insufficient, for Specific Binding. *Frontiers in immunology* 9: 395.
- de Kruif, J.; Terstappen, L.; Boel, E. u. Logtenberg, T. (1995): Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (9): 3938–3942.
- de Weers, M.; Tai, Y.-T.; van der Veer, M. S.; Bakker, J. M.; Vink, T.; Jacobs, D. C. H.; Oomen, L. A.; Peipp, M.; Valerius, T.; Slootstra, J. W.; Mutis, T.; Bleeker, W. K.; Anderson, K. C.; Lokhorst, H. M.; van de Winkel, J. G. J. u. Parren, P. W. H. I. (2011): Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology* 186 (3): 1840–1848.
- DeKosky, B. J.; Ippolito, G. C.; Deschner, R. P.; Lavinder, J. J.; Wine, Y.; Rawlings, B. M.; Varadarajan, N.; Giesecke, C.; Dörner, T.; Andrews, S. F.; Wilson, P. C.; Hunicke-Smith, S. P.; Willson,

Literaturverzeichnis

- C. G.; Ellington, A. D. u. Georgiou, G. (2013): High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nature Biotechnology* 31 (2): 166–169.
- DeKosky, B. J.; Kojima, T.; Rodin, A.; Charab, W.; Ippolito, G. C.; Ellington, A. D. u. Georgiou, G. (2015): In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire. *Nature medicine* 21 (1): 86–91.
- Derda, R.; Tang, S. K. u. Whitesides, G. M. (2010): Uniform amplification of phage with different growth characteristics in individual compartments consisting of monodisperse droplets. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49 (31): 5301–5304.
- Dörner, K. u. Deufel, T. (2009): *Klinische Chemie und Hämatologie*. 69 Tabellen. Thieme. Stuttgart. 632 S.
- Dübel, S.; Breitling, F.; Fuchs, P.; Braunagel, M.; Klewinghaus, I. u. Little, M. (1993): A family of vectors for surface display and production of antibodies. *Gene* 128 (1): 97–101.
- Feins, S.; Kong, W.; Williams, E. F.; Milone, M. C. u. Fraietta, J. A. (2019): An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American journal of hematology* 94 (S1): S3-S9.
- Franquiz, M. J. u. Short, N. J. (2020): Blinatumomab for the Treatment of Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Toward a New Era of Targeted Immunotherapy. *Biologics: Targets and Therapy Volume* 14: 23–34.
- Frenzel, A.; Kügler, J.; Helmsing, S.; Meier, D.; Schirrmann, T.; Hust, M. u. Dübel, S. (2017): Designing Human Antibodies by Phage Display. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 44 (5): 312–318.
- Fury, M. G.; Lipton, A.; Smith, K. M.; Winston, C. B. u. Pfister, D. G. (2007): A phase-I trial of the epidermal growth factor receptor directed bispecific antibody MDX-447 without and with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in patients with advanced solid tumors. *Cancer immunology immunotherapy* 57 (2): 155–163.
- Geuijen, C. A. W.; Bijl, N.; Smit, R. C. M.; Cox, F.; Throsby, M.; Visser, T. J.; Jongeneelen, M. A. C.; Bakker, A. B. H.; Kruisbeek, A. M.; Goudsmit, J. u. Kruif, J. de (2005): A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41 (1): 178–187.
- Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Meng, E. C.; Pettersen, E. F.; Couch, G. S.; Morris, J. H. u. Ferrin, T. E. (2018): UCSF ChimeraX. Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein science : a publication of the Protein Society* 27 (1): 14–25.
- Good-Jacobson, K. L. u. Tarlinton, D. M. (2012): Multiple routes to B-cell memory. *International immunology* 24 (7): 403–408.
- Goodwin, S.; McPherson, J. D. u. McCombie, W. R. (2016): Coming of age. Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics* 17 (6): 333–351.
- Greten, H.; Rinninger, F.; Greten, T. F. u. Amling, M. /Hrsg. (2010): *Innere Medizin*. 395 Tabellen. Thieme. Stuttgart. 1241 S.
- Hallbach, J. (2006): *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*. 175 Tabellen ; [mit Hämatologie und Hämostaseologie]. Thieme. Stuttgart. 495 S.

Literaturverzeichnis

- Hansson, M.; Gimsing, P.; Badros, A.; Niskanen, T. M.; Nahi, H.; Offner, F.; Salomo, M.; Sonesson, E.; Mau-Sorensen, M.; Stenberg, Y.; Sundberg, A.; Teige, I.; van Droogenbroeck, J.; Wichert, S.; Zangari, M.; Frendeus, B.; Korsgren, M.; Poelman, M. u. Tricot, G. (2015): A Phase I Dose-Escalation Study of Antibody BI-505 in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (12): 2730–2736.
- Heinrich, P. C.; Müller, M. u. Graeve, L. (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Hemadou, A.; Giudicelli, V.; Smith, M. L.; Lefranc, M.-P.; Duroux, P.; Kossida, S.; Heiner, C.; Hepler, N. L.; Kuijpers, J.; Groppi, A.; Korlach, J.; Mondon, P.; Ottone, F.; Jacobin-Valat, M.-J.; Laroche-Traineau, J. u. Clofent-Sanchez, G. (2017): Pacific Biosciences Sequencing and IMGT/HighV-QUEST Analysis of Full-Length Single Chain Fragment Variable from an In Vivo Selected Phage-Display Combinatorial Library. *Frontiers in immunology* 8: 1796.
- Hipp, D. R.; Kennedy, D. u. Mistachkin, J. (2019): SQLite.
- Hoogenboom, H. R. (2005): Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* 23 (9): 1105–1116.
- Hoogenboom, H. R.; Lutgerink, J. T.; Pelsers, M. M. A. L.; Rousch, M. J. M. M.; Coote, J.; van Neer, N.; de Bruïne, A.; van Nieuwenhoven, F. A.; Glatz, J. F. C. u. Arends, J. - W. (1999): Selection - dominant and nonaccessible epitopes on cell - surface receptors revealed by cell - panning with a large phage antibody library. *European Journal of Biochemistry* 260 (3): 774 – 784.
- Hristodorov, D.; Mladenov, R.; Huhn, M.; Barth, S. u. Thepen, T. (2012): Macrophage-targeted therapy. CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases. *Toxins* 4 (9): 676–694.
- Hunter, J. D. (2007): Matplotlib. A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering* 9 (3): 90–95.
- Hust, M.; Dübel, S. u. Schirrmann, T. (2007): Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 408.
- Hyun, Y.-M.; Lefort, C. T. u. Kim, M. (2009): Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunologic research* 45 (2-3): 195–208.
- James, N. D.; Atherton, P. J.; Jones, J.; Howie, A. J.; Tchekmedyan, S. u. Curnow, R. T. (2001): A phase II study of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-HER2 × CD64) with GM-CSF in HER2+ advanced prostate cancer. *British Journal of Cancer* 85 (2): 152–156.
- Jansen, J. H. M.; Boross, P.; Overdijk, M. B.; van Bueren, J. J. L.; Parren, P. W.H.I. u. Leusen, J. H. W. (2012): Daratumumab, a Human CD38 Antibody Induces Apoptosis of Myeloma Tumor Cells Via Fc Receptor-Mediated Crosslinking. *Blood* 120 (21): 2974.
- John L Xu u. Mark M Davis (2000): Diversity in the CDR3 Region of VH Is Sufficient for Most Antibody Specificities. *Immunity* 13 (1): 37–45.
- Johns, T. G.; Mellman, I.; Cartwright, G. A.; Ritter, G.; Old, L. J.; Burgess, A. W. u. Scott, A. M. (2005): The antitumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells over-express the receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (7): 780–782.
- Jost, L. (2006): Entropy and diversity. *Oikos* 113 (2): 363–375.

Literaturverzeichnis

- Kawano, Y.; Moschetta, M.; Manier, S.; Glavey, S.; Görgün, G. T.; Roccaro, A. M.; Anderson, K. C. u. Ghobrial, I. M. (2015): Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological reviews* 263 (1): 160–172.
- Kellner, C.; Bleeker, W. K.; van Lammerts Bueren, J. J.; Staudinger, M.; Klausz, K.; Derer, S.; Glorius, P.; Muskulus, A.; Goeij, B. E. C. G. de; van de Winkel, J. G. J.; Parren, P. W. H. I.; Valerius, T.; Gramatzki, M. u. Peipp, M. (2011): Human kappa light chain targeted *Pseudomonas exotoxin A*—identifying human antibodies and Fab fragments with favorable characteristics for antibody-drug conjugate development. *Journal of Immunological Methods* 371 (1-2): 122–133.
- Kellner, C.; Otte, A.; Cappuzzello, E.; Klausz, K. u. Peipp, M. (2017): Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 44 (5): 327–336.
- Khazaeli, M. B.; Saleh, M. N.; Liu, T. P.; Meredith, R. F.; Wheeler, R. H.; Baker, T. S.; King, D.; Secher, D.; Allen, L. u. Rogers, K. (1991): Pharmacokinetics and immune response of 131I-chimeric mouse/human B72.3 (human gamma 4) monoclonal antibody in humans. *Cancer research* 51 (20): 5461–5466.
- Kim, D.; Wang, J.; Willingham, S. B.; Martin, R.; Wernig, G. u. Weissman, I. L. (2012): Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* 26 (12): 2538–2545.
- Klausz, K.; Cieker, M.; Kellner, C.; Oberg, H.-H.; Kabelitz, D.; Valerius, T.; Burger, R.; Gramatzki, M. u. Peipp, M. (2017): A novel Fc-engineered human ICAM-1/CD54 antibody with potent anti-myeloma activity developed by cellular panning of phage display libraries. *Oncotarget* 8 (44): 77552–77566.
- Klausz, K.; Cieker, M.; Kellner, C.; Rösner, T.; Otte, A.; Krohn, S.; Lux, A.; Nimmerjahn, F.; Valerius, T.; Gramatzki, M. u. Peipp, M. (2020): Fc-engineering significantly improves the recruitment of immune effector cells by anti-ICAM-1 antibody MSH-TP15 for myeloma therapy. *Haematologica: haematol*.2020.251371.
- Klausz, K.; Kellner, C.; Derer, S.; Valerius, T.; Staudinger, M.; Burger, R.; Gramatzki, M. u. Peipp, M. (2015): The novel multispecies Fc-specific *Pseudomonas exotoxin A* fusion protein α-Fc-ETA' enables screening of antibodies for immunotoxin development. *Journal of Immunological Methods* 418: 75–83.
- Köhler, G. u. Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495–497.
- Köhler, M.; Greil, C.; Hudecek, M.; Lonial, S.; Raje, N.; Wäsch, R. u. Engelhardt, M. (2018): Current developments in immunotherapy in the treatment of multiple myeloma. *Cancer* 124 (10): 2075–2085.
- Kontermann, R. u. Dübel, S. (2001): *Antibody engineering*. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Kontermann, R. u. Dübel, S. (2010): *Antibody Engineering*. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Krebber, A.; Bornhauser, S.; Burmester, J.; Honegger, A.; Willuda, J.; Bosshard, H. R. u. Plückthun, A. (1997): Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods* 201 (1): 35–55.
- Krejcik, J.; Casneuf, T.; Nijhof, I. S.; Verbist, B.; Bald, J.; Plesner, T.; Syed, K.; Liu, K.; van de Donk, N. W. C. J.; Weiss, B. M.; Ahmadi, T.; Lokhorst, H. M.; Mutis, T. u. Sasser, A. K. (2016): Daratumumab

Literaturverzeichnis

- depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* 128 (3): 384–394.
- Lazar, G. A.; Dang, W.; Karki, S.; Vafa, O.; Peng, J. S.; Hyun, L.; Chan, C.; Chung, H. S.; Eivazi, A.; Yoder, S. C.; Vielmetter, J.; Carmichael, D. F.; Hayes, R. J. u. Dahiyat, B. I. (2006): Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11): 4005–4010.
- Lefranc, M.-P. u. Lefranc, G. (2001): *The Immunoglobulin FactsBook*. Elsevier Science. Burlington. 676 S.
- Legouffe, E.; Liautard, J.; Gaillard, J. P.; Rossi, J. F.; Wijdenes, J.; Bataille, R.; Klein, B. u. Brochier, J. (1994): Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clinical and experimental immunology* 98 (2): 323–329.
- Lin, P.; Owens, R.; Tricot, G. u. Wilson, C. S. (2004): Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *American Journal of Clinical Pathology* 121 (4): 482–488.
- Low, N. M.; Holliger, P. H. u. Winter, G. (1996): Mimicking somatic hypermutation. Affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of molecular biology* 260 (3): 359–368.
- Lu, J.; Chu, J.; Zou, Z.; Hamacher, N. B.; Rixon, M. W. u. Sun, P. D. (2015): Structure of Fc γ RI in Complex With Fc Reveals the Importance of Glycan Recognition for High-Affinity IgG Binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (3): 833–838.
- Malavasi, F.; Deaglio, S.; Funaro, A.; Ferrero, E.; Horenstein, A. L.; Ortolan, E.; Vaisitti, T. u. Aydin, S. (2008): Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological reviews* 88 (3): 841–886.
- Mancardi, D. A.; Albanesi, M.; Jönsson, F.; Iannascoli, B.; van Rooijen, N.; Kang, X.; England, P.; Daëron, M. u. Bruhns, P. (2013): The high-affinity human IgG receptor Fc γ RI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood* 121 (9): 1563–1573.
- Martinelli, E.; Palma, R. de; Orditura, M.; Vita, F. de u. Ciardiello, F. (2009): Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical and experimental immunology* 158 (1): 1–9.
- Mateos, M.-V.; Dimopoulos, M. A.; Cavo, M.; Suzuki, K.; Jakubowiak, A.; Knop, S.; Doyen, C.; Lucio, P.; Nagy, Z.; Kaplan, P.; Pour, L.; Cook, M.; Grosicki, S.; Crepaldi, A.; Liberati, A. M.; Campbell, P.; Shelekhova, T.; Yoon, S.-S.; Iosava, G.; Fujisaki, T.; Garg, M.; Chiu, C.; Wang, J.; Carson, R.; Crist, W.; Deraedt, W.; Nguyen, H.; Qi, M. u. San-Miguel, J. (2018): Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *New England Journal of Medicine* 378 (6): 518–528.
- Matlung, H. L.; Babes, L.; Zhao, X. W.; van Houdt, M.; Treffers, L. W.; van Rees, D. J.; Franke, K.; Schornagel, K.; Verkuijlen, P.; Janssen, H.; Halonen, P.; Liefink, C.; Beijersbergen, R. L.; Leusen, J. H. W.; Boelens, J. J.; Kuhnle, I.; van der Werff Ten Bosch, J.; Seeger, K.; Rutella, S.; Pagliara, D.; Matozaki, T.; Suzuki, E.; van Menke-van der Houven Oordt, C. W.; van Bruggen, R.; Roos, D.; van Lier, R. A. W.; Kuijpers, T. W.; Kubès, P. u. van den Berg, T. K. (2018): Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis. *Cell reports* 23 (13): 3946–3959.
- McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G. u. Chiswell, D. J. (1990): Phage antibodies. Filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348 (6301): 552–554.

Literaturverzeichnis

- McKinney, W. (2010): Data Structures for Statistical Computing in Python. In: SciPy: 56–61.
- Mladenov, R.; Hristodorov, D.; Cremer, C.; Gresch, G.; Grieger, E.; Schenke, L.; Klose, D.; Amoury, M.; Woitok, M.; Jost, E.; Brümmendorf, T. H.; Fendel, R.; Fischer, R.; Stein, C.; Thepen, T. u. Barth, S. (2016): CD64-directed microtubule associated protein tau kills leukemic blasts *ex vivo*. *Oncotarget* 7 (41): 67166–67174.
- Munkley, J. u. Elliott, D. J. (2016): Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* 7 (23): 35478–35489.
- Murphy, K. u. Weaver, C. (2018): Janeway Immunologie. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Nagorsen, D. u. Baeuerle, P. A. (2011): Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Experimental Cell Research* 317 (9): 1255–1260.
- Nimmerjahn, F. (2006): Activating and inhibitory Fc_γRs in autoimmune disorders. *Springer seminars in immunopathology* 28 (4): 305–319.
- Nimmerjahn, F. (2013): Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity. Springer New York.
- Nimmerjahn, F. u. Ravetch, J. V. (2008): Fc_γ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology* 8 (1): 34–47.
- Noronha, E. J.; Wang, X.; Desai, S. A.; Kageshita, T. u. Ferrone, S. (1998): Limited Diversity of Human scFv Fragments Isolated by Panning a Synthetic Phage-Display scFv Library with Cultured Human Melanoma Cells. *The Journal of Immunology* 161 (6): 2968–2976.
- Nybakken, G. E.; Oliphant, T.; Johnson, S.; Burke, S.; Diamond, M. S. u. Fremont, D. H. (2005): Structural Basis of West Nile Virus Neutralization by a Therapeutic Antibody. *Nature* 437 (7059): 764–768.
- Overdijk, M. B.; Verploegen, S.; Marijn, B.; van Egmond, M.; Groen, R. W.J.; Martens, A. C.M.; van Bueren, J. L.; Bleeker, W. u. Parren, P. W.H.I. (2012): Phagocytosis Is A Mechanism of Action for Daratumumab. *Blood* 120 (21): 4054.
- Pardoll, D. M. (2012): The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 252–264.
- Parmley, S. F. u. Smith, G. P. (1988): Antibody-selectable filamentous fd phage vectors. Affinity purification of target genes. *Gene* 73 (2): 305–318.
- Peipp, M.; Simon, N.; Loichinger, A.; Baum, W.; Mahr, K.; Zunino, S. J. u. Fey, G. H. (2001): An improved procedure for the generation of recombinant single-chain Fv antibody fragments reacting with human CD13 on intact cells. *Journal of Immunological Methods* 251 (1-2): 161–176.
- Pielou, E. C. (1966): The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 13: 131–144.
- Raje, N.; Berdeja, J.; Lin, Y.; Siegel, D.; Jagannath, S.; Madduri, D.; Liedtke, M.; Rosenblatt, J.; Maus, M. V.; Turka, A.; Lam, L.-P.; Morgan, R. A.; Friedman, K.; Massaro, M.; Wang, J.; Russotti, G.; Yang, Z.; Campbell, T.; Hege, K.; Petrocca, F.; Quigley, M. T.; Munshi, N. u. Kochenderfer, J. N. (2019): Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 380 (18): 1726–1737.

Literaturverzeichnis

- Ravn, U.; Gueneau, F.; Baerlocher, L.; Osteras, M.; Desmurs, M.; Malinge, P.; Magistrelli, G.; Farinelli, L.; Kosco-Vilbois, M. H. u. Fischer, N. (2010): By-passing *in vitro* screening—next generation sequencing technologies applied to antibody display and *in silico* candidate selection. *Nucleic Acids Research* 38 (21): e193-e193.
- Reddy, S. T.; Ge, X.; Miklos, A. E.; Hughes, R. A.; Kang, S. H.; Hoi, K. H.; Chrysostomou, C.; Hunnicke-Smith, S. P.; Iverson, B. L.; Tucker, P. W.; Ellington, A. D. u. Georgiou, G. (2010): Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nature Biotechnology* 28 (9): 965–969.
- Repp, R.; van Ojik, H. H.; Valerius, T.; Groenewegen, G.; Wieland, G.; Oetzel, C.; Stockmeyer, B.; Becker, W.; Eisenhut, M.; Steininger, H.; Deo, Y. M.; Blijham, G. H.; Kalden, J. R.; van de Winkel, J. G. J. u. Gramatzki, M. (2003): Phase I clinical trial of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-Fc γ RI × anti-HER-2/neu) in combination with Filgrastim (G-CSF) for treatment of advanced breast cancer. *British Journal of Cancer* 89 (12): 2234–2243.
- Rettig, T. A.; Ward, C.; Bye, B. A.; Pecaut, M. J.; Chapes, S. K. u. Melcher, U. (2018): Characterization of the naive murine antibody repertoire using unamplified high-throughput sequencing. *PLOS ONE* 13 (1): e0190982.
- Röllig, C.; Knop, S. u. Bornhäuser, M. (2015): Multiple myeloma. *The Lancet* 385 (9983): 2197–2208.
- Roovers, R. C.; van der Linden, E.; Bruïne, A. P. de; Arends, J. W. u. Hoogenboom, H. R. (2001): Identification of colon tumour-associated antigens by phage antibody selections on primary colorectal carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 37 (4): 542–549.
- Rouet, R.; Jackson, K. J. L.; Langley, D. B. u. Christ, D. (2018): Next-Generation Sequencing of Antibody Display Repertoires. *Frontiers in Immunology* 9: 118.
- Saggy, I.; Wine, Y.; Shefet-Carasso, L.; Nahary, L.; Georgiou, G. u. Benhar, I. (2012): Antibody isolation from immunized animals. Comparison of phage display and antibody discovery via V gene repertoire mining. *Protein engineering, design & selection* 25 (10): 539–549.
- Salles, G.; Barrett, M.; Foà, R.; Maurer, J.; O'Brien, S.; Valente, N.; Wenger, M. u. Maloney, D. G. (2017): Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies. A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Advances in Therapy* 34 (10): 2232–2273.
- Schirrmann, T.; Meyer, T.; Schütte, M.; Frenzel, A. u. Hust, M. (2011): Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostics and Therapy. *Molecules* 16 (1): 412–426.
- Schlothauer, T.; Herter, S.; Koller, C. F.; Grau-Richards, S.; Steinhart, V.; Spick, C.; Kubbies, M.; Klein, C.; Umaña, P. u. Mössner, E. (2016): Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein Engineering Design and Selection* 29 (10): 457–466.
- Schmidmaier, R.; Mörsdorf, K.; Baumann, P.; Emmerich, B. u. Meinhardt, G. (2006): Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells *in vivo*. *The International journal of biological markers* 21 (4): 218–222.
- Schwarz, M.; Röttgen, P.; Takada, Y.; Le Gall, F.; Knackmuss, S.; Bassler, N.; Büttner, C.; Little, M.; Bode, C. u. Peter, K. (2004): Single - chain antibodies for the conformation - specific blockade of

Literaturverzeichnis

- activated platelet integrin α IIb β 3 designed by subtractive selection from naïve human phage libraries. *The FASEB Journal* 18 (14): 1704–1706.
- Sellner, L.; Fan, F.; Giesen, N.; Schubert, M.-L.; Goldschmidt, H.; Müller-Tidow, C.; Dreger, P.; Raab, M. S. u. Schmitt, M. (2020): BCMA-specific chimeric antigen receptor T cells for multiple myeloma. Clinical experience and future perspectives. *International Journal of Cancer* 147 (8): 2029–2041.
- Sermer, D. u. Brentjens, R. (2019): CAR T - cell therapy. Full speed ahead. *Hematological Oncology* 37 (S1): 95 – 100.
- Sharma, P. u. Allison, J. P. (2015): Immune checkpoint targeting in cancer therapy. Toward combination strategies with curative potential. *Cell* 161 (2): 205–214.
- Shim, H. (2015): Synthetic approach to the generation of antibody diversity. *BMB reports* 48 (9): 489–494.
- Smith, G. P. (1985): Filamentous fusion phage. Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)* 228 (4705): 1315–1317.
- Stockmeyer, B.; Valerius, T.; Repp, R.; Heijnen, I. A.; Bühring, H. J.; Deo, Y. M.; Kalden, J. R.; Gramatzki, M. u. van de Winkel, J. G. (1997): Preclinical studies with Fc(gamma)R bispecific antibodies and granulocyte colony-stimulating factor-primed neutrophils as effector cells against HER-2/neu overexpressing breast cancer. *Cancer research* 57 (4): 696–701.
- Tai, Y.-T.; Dillon, M.; Song, W.; Leiba, M.; Li, X.-F.; Burger, P.; Lee, A. I.; Podar, K.; Hideshima, T.; Rice, A. G.; van Abbema, A.; Jesaitis, L.; Caras, I.; Law, D.; Weller, E.; Xie, W.; Richardson, P.; Munshi, N. C.; Mathiot, C.; Avet-Loiseau, H.; Afar, D. E. H. u. Anderson, K. C. (2008): Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood* 112 (4): 1329–1337.
- Tai, Y.-T.; Mayes, P. A.; Acharya, C.; Zhong, M. Y.; Cea, M.; Cagnetta, A.; Craigen, J.; Yates, J.; Gliddon, L.; Fieles, W.; Hoang, B.; Tunstead, J.; Christie, A. L.; Kung, A. L.; Richardson, P.; Munshi, N. C. u. Anderson, K. C. (2014): Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. *Blood* 123 (20): 3128–3138.
- Tsujisaki, M.; Imai, K.; Hirata, H.; Hanzawa, Y.; Masuya, J.; Nakano, T.; Sugiyama, T.; Matsui, M.; Hinoda, Y. u. Yachi, A. (1991): Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant diseases. *Clinical & Experimental Immunology* 85 (1): 3–8.
- Tur, M. K.; Huhn, M.; Thepen, T.; Stöcker, M.; Krohn, R.; Vogel, S.; Jost, E.; Osieka, R.; van de Winkel, J. G.; Fischer, R.; Finnern, R. u. Barth, S. (2003): Recombinant CD64-Specific Single Chain Immunotoxin Exhibits Specific Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cancer research* 63 (23): 8414–8419.
- Tzogani, K.; Penttilä, K.; Lähteenluoma, J.; Lapveteläinen, T.; Lopez Anglada, L.; Prieto, C.; Garcia-Ochoa, B.; Enzmann, H.; Gisselbrecht, C.; Delgado, J. u. Pignatti, F. (2020): The EMA Review of Belantamab Mafodotin (Blenrep) for the Treatment of Adult Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *The oncologist*.
- van de Donk, N. W. C. J.; Palumbo, A.; Johnsen, H. E.; Engelhardt, M.; Gay, F.; Gregersen, H.; Hajek, R.; Kleber, M.; Ludwig, H.; Morgan, G.; Musto, P.; Plesner, T.; Sezer, O.; Terpos, E.; Waage, A.; Zweegman, S.; Einsele, H.; Sonneveld, P. u. Lokhorst, H. M. (2014): The clinical relevance and

Literaturverzeichnis

- management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders. Recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica* 99 (6): 984–996.
- van Vugt, M. J.; Kleijmeer, M. J.; Keler, T.; Zeelenberg, I.; van Dijk, M. A.; Leusen, J. H.; Geuze, H. J. u. van de Winkel, J. G. (1999): The FcgammaRIa (CD64) ligand binding chain triggers major histocompatibility complex class II antigen presentation independently of its associated FcR gamma-chain. *Blood* 94 (2): 808–817.
- Veillette, A. u. Guo, H. (2013): CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. *Critical reviews in oncology/hematology* 88 (1): 168–177.
- Veitonmäki, N.; Hansson, M.; Zhan, F.; Sundberg, A.; Löfstedt, T.; Ljungars, A.; Li, Z.-C.; Martinsson-Niskanen, T.; Zeng, M.; Yang, Y.; Danielsson, L.; Kovacek, M.; Lundqvist, A.; Mårtensson, L.; Teige, I.; Tricot, G. u. Frendéus, B. (2013): A Human ICAM-1 Antibody Isolated by a Function-First Approach Has Potent Macrophage-Dependent Antimyeloma Activity In Vivo. *Cancer Cell* 23 (4): 502–515.
- Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T. u. Ugolini, S. (2008): Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9 (5): 503–510.
- Vyas, J. M.; van der Veen, A. G. u. Ploegh, H. L. (2008): The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology* 8 (8): 607–618.
- Wells, J. A. u. Lowman, H. B. (1992): Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Current Opinion in Biotechnology* 3 (4): 355–362.
- Wichert, S.; Juliusson, G.; Johansson, Å.; Sonesson, E.; Teige, I.; Wickenberg, A. T.; Frendeus, B.; Korsgren, M. u. Hansson, M. (2017): A single-arm, open-label, phase 2 clinical trial evaluating disease response following treatment with BI-505, a human anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody, in patients with smoldering multiple myeloma. *PLoS one* 12 (2): e0171205.
- Yamane-Ohnuki, N.; Kinoshita, S.; Inoue-Urakubo, M.; Kusunoki, M.; Iida, S.; Nakano, R.; Wakitani, M.; Niwa, R.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Shitara, K. u. Satoh, M. (2004): Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells. An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnology and bioengineering* 87 (5): 614–622.
- Zaenker, P.; Gray, E. S. u. Ziman, M. R. (2016): Autoantibody Production in Cancer--The Humoral Immune Response toward Autologous Antigens in Cancer Patients. *Autoimmunity reviews* 15 (5): 477–483.
- Zheng, Y.; Cai, Z.; Wang, S.; Zhang, X.; Qian, J.; Hong, S.; Li, H.; Wang, M.; Yang, J. u. Yi, Q. (2009): Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* 114 (17): 3625–3628.
- Zheng, Y.; Yang, J.; Qian, J.; Qiu, P.; Hanabuchi, S.; Lu, Y.; Wang, Z.; Liu, Z.; Li, H.; He, J.; Lin, P.; Weber, D.; Davis, R. E.; Kwak, L.; Cai, Z. u. Yi, Q. (2013): PSGL-1/selectin and ICAM-1/CD18 interactions are involved in macrophage-induced drug resistance in myeloma. *Leukemia* 27 (3): 702–710.
- Zhong, R. K.; van de Winkel, J.G.J.; Thepen, T.; Schultz, L. D. u. Ball, E. D. (2001): Cytotoxicity of Anti-CD64-Ricin A Chain Immunotoxin Against Human Acute Myeloid Leukemia Cells In Vitro and in SCID Mice. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 10 (1): 95–105.

Literaturverzeichnis

Zuch de Zafra, C. L.; Fajardo, F.; Zhong, W.; Bennett, M. J.; Muchhal, U. S.; Moore, G. L.; Stevens, J.; Case, R.; Pearson, J. T.; Liu, S.; McElroy, P. L.; Canon, J.; Desjarlais, J. R.; Coxon, A.; Balazs, M. u. Nolan-Stevaux, O. (2019): Targeting Multiple Myeloma with AMG 424, a Novel Anti-CD38/CD3 Bispecific T-cell-recruiting Antibody Optimized for Cytotoxicity and Cytokine Release. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 25 (13): 3921–3933.

8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Matthias Peipp und Dr. Katja Klausz für die Unterstützung während der vergangenen Jahre und dafür, dass sie dieses spannende Projekt ermöglicht haben.

Prof. Dr. Axel J. Scheidig danke ich für die Betreuung der Promotion und die Organisation meiner sechs Jahren Biochemie-Studium in Kiel, die der Promotion vorausgingen.

Ebenfalls danke ich den technischen Assistentinnen Anja Muskulus und Britta von Below und allen Kollegen aus dem Dr. Mildred-Scheel-Haus für die schöne Zusammenarbeit.

Auch bei meiner Familie möchte ich mich für die jahrelange Unterstützung bedanken.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Steffen Krohn, dass diese Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch die Betreuerin oder den Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigenen Arbeit ist und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst wurde.

Die Arbeit hat weder vollständig noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und die Ergebnisse dieser Arbeit wurden noch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Ein akademischer Grad wurde mir nicht entzogen.

Kiel, den 05.09.2021

Steffen Krohn