

**Generierung humaner Antikörper-Spezifitäten zur Therapie
entzündlicher Erkrankungen**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Eva-Maria Krinner

aus
Freising

Würzburg 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Gutachter: PD. Dr. P. Kufer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Struktur eines Antikörpermoleküls.....	1
1.2 Therapeutische Antikörper	3
1.3 ScFv-Antikörper: kleine, rekombinante Antikörperfragmente	5
1.3.1 Immunogenität und Humanisierung von Antikörpern.....	6
1.3.2 Generierung von humanen Antikörperfragmenten mittels Phage-Display....	8
1.4 Funktion von GM-CSF.....	12
1.4.1 Struktur des GM-CSF-Moleküls.....	13
1.4.2 Die Rolle von GM-CSF bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des Menschen	13
1.4.3 Die Rolle von GM-CSF in Tiermodellen verschiedener entzündlicher Erkrankungen	14
1.5 Aufgabenstellung.....	16
2. MATERIAL	17
2.1 Bakterienstämme	17
2.2 Zelllinien.....	17
2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	17
2.4 Kultur-Medien für die Bakterienkultur	18
2.5 Antibiotika.....	19
2.6 Enzyme für die Molekularbiologie.....	19
2.7 KITS.....	19
2.8 Oligonukleotide	20
2.9 Antikörper.....	21
2.10 Reagenzien	21
2.11 Geräte	22
2.12 Computerprogramme und Datenbank zur Datenauswertung	22
2.13 Zentrifugen und Rotoren	23
3. METHODEN	24
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.1.1 Präparation von RNA.....	24

3.1.2	Synthese von cDNA.....	24
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	25
3.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	26
3.1.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	27
3.1.6	Bakterienkultur.....	28
3.1.7	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
3.1.8	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	29
3.1.9	Restriktions-Verdau	30
3.1.10	Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA	30
3.1.11	Ligation	30
3.1.12	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien	31
3.1.13	Transformation von Hitzeschock-kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterienzellen	31
3.1.14	Sequenzierung.....	31
3.2	Proteinbiochemische Methoden	32
3.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
3.2.2	Coomassie Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	32
3.2.3	Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	32
3.2.4	Western Blot	32
3.3	Phage-Display.....	33
3.3.1	Produktion von Helferphagen <i>VCSM13</i>	33
3.3.2	Erstellen von scFv- Bibliotheken.....	34
3.3.3	Isolierung von Phagen aus Kulturüberstand	40
3.3.4	Selektion von antigenbindenden Phagen mit der Methode des „in-solution- panning“	40
3.3.5	Infektion einer <i>E. coli</i> XI-1 blue Kultur mit eluierten scFv-Phagen und erneute Phagenamplifikation.....	41
3.3.6	Bestimmung von Input-und Output-Phagentitern.....	42
3.3.7	Produktion und Biotinylieren von hGM-CSF.....	43
3.3.8	Screening.....	44
3.4	Expression und Aufreinigung von scFv- und vollständigen Antikörpermolekülen	46

3.4.1	Expression kleiner Mengen scFv-Antikörpern in <i>E. coli</i> und Aufreinigung über Ni-NTA-Zentrifugiersäulen	46
3.4.2	Expression größerer Mengen scFv-Antikörper in <i>E. coli</i> und Aufreinigung über Affinitätschromatographie und Gelfiltration	47
3.4.3	Expression von ganzen Antikörpermolekülen in HEK 293-F Zellen	49
3.5	PEGylierung von scFv-Molekülen	49
3.6	Charakterisierung von scFv- und vollständigen Antikörpermolekülen.....	50
3.6.1	Untersuchung der Bindungskinetik.....	50
3.6.2	Charakterisierung der hGM-CSF-neutralisierenden Eigenschaften	51
3.6.3	Denaturierung durch Guanidinium-Hydrochlorid (GdnHCl)	54
3.6.4	Vergleich der Serum-Stabilität.....	54
3.6.5	Vergleich der Thermostabilität	54
4.	ERGEBNISSE	56
4.1	Vorarbeiten	56
4.2	Generierung eines prokaryotisch exprimierbaren scFv-Antikörpers durch Austausch der leichten Kette	57
4.2.1	Phage-Display-Selektion von hGM-CSF-spezifischen scFv-Antikörpern und Nachweis der Antigenbindung im ELISA	57
4.2.2	Charakterisierung der selektierten scFv-Antikörper	65
4.3	Isolierung einer humanen VH-Kette unter Beibehaltung der CDR3-Region des Ursprungs-Antikörpers	75
4.3.1	Klonierung der humanen VH-Bibliothek mit parentaler VH CDR-Region	76
4.3.2	Durchführung der Selektion und Test auf Antigenbindung im ELISA	77
4.3.3	Charakterisierung der selektierten humanen hGM-CSF-bindenden scFv-Antikörper	83
4.4	Vergleich von verschiedenen Antikörperformaten derselben Spezifität: scFv, scFv-PEG, IgG	93
4.4.1	Herstellung einer PEGylierten Variante von scFv 3077	93
4.4.2	Klonierung und Produktion von 3077 als vollständiger IgG1-Antikörper ..	97
4.4.3	Vergleich der Konstrukte scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077.....	99
5.	DISKUSSION	105
5.1	Der Austausch der leichten Kette führt zur erfolgreichen funktionellen Expression eines zunächst nicht löslich produzierbaren scFv-Antikörpers	105

5.2	Phage-Display-Selektion führt zur Isolierung eines hGM-CSF-neutralisierenden scFv-Fragments, dessen leichte V-Kette dieselbe kanonische Struktur ausbildet wie die parentale VL-Region.....	107
5.3	Phage-Display-Selektion einer schweren Kette unter Beibehaltung der CDR3 Sequenz.....	108
5.4	Die VH-Selektion führt zur Identifikation von zehn verschiedenen, teils hochaffinen hGM-CSF-Bindern.....	109
5.5	Auswahl des Testsystems für die Neutralisierung von humanem GM-CSF.....	110
5.6	Die humanen hGM-CSF bindenden scFv-Fragmente zeigen sehr unterschiedliches Neutralisationsverhalten	111
5.7	ScFv-Fragment 3077 zeigt hohe thermodynamische Stabilität.....	112
5.8	Umwandlung von scFv 3077 in ein humanes IgG-Molekül und in ein PEGyliertes scFv-Fragment.....	113
5.9	Das PEGylierte scFv-Fragment 3077 zeigt moderat reduzierte, IgG 3077 deutlich erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zum unkonjugierten scFv-Fragment....	115
5.10	Der Antikörper IgG 3077 neutralisiert hGM-CSF besser als das scFv-Fragment 3077, während die Neutralisierungseffizienz durch PEGylierung unverändert bleibt.....	116
5.11	Alle molekularen Formate des 3077-Moleküls zeigen eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber Serumproteasen	117
5.12	PEGylierung führt zu einer Erhöhung der thermischen Stabilität.....	118
5.13	Klinische Relevanz der drei Moleküle	119
6.	SUMMARY	121
7.	ZUSAMMENFASSUNG	123
8.	LITERATUR	125
9.	ABKÜRZUNGEN	136
	Lebenslauf	138
	Publikationsliste	139
	Danksagung	140
	Ehrenwörtliche Erklärung	141

1. EINLEITUNG

Antikörper werden von B-Lymphozyten gebildet und leisten als Bestandteil des humoralen Immunsystems einen entscheidenden Beitrag zur Abwehr von Pathogenen. Ihre wichtigste Eigenschaft ist die hohe Spezifität und Selektivität, mit der sie an bestimmte Antigene binden. Durch Bindung an Oberflächenproteine von Viren oder Bakterien sind Antikörper in der Lage, die Infektiosität dieser Erreger zu hemmen. Auch Toxine können direkt durch Bindung von spezifischen Antikörpermolekülen neutralisiert werden. Zum anderen erkennen und binden Antikörper aber auch Fremdproteine auf der Oberfläche von körpereigenen virusinfizierten oder malignen Zellen. So werden diese Zellen für die Erkennung durch andere Akteure des Immunsystems markiert und können nachfolgend durch Phagozytose und zell- oder komplementvermittelte Zellyse unschädlich gemacht werden.

1.1 Struktur eines Antikörpermoleküls

Antikörper vom IgG-Typ haben eine molekulare Masse von ca. 150 kDa und bestehen aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Polypeptidketten. Die beiden schweren Ketten sind an einer sog. Gelenkregion (*Hinge*) über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Eine weitere Disulfidbrücke verbindet jeweils eine leichte und eine schwere Kette.

Die leichten Ketten werden von einer variablen Domäne (VL) und einer konstanten Domäne (CL) gebildet. Bei den leichten Ketten unterscheidet man dabei die beiden Subtypen kappa (κ) und lambda (λ). Die schweren Ketten eines IgG-Antikörpers setzen sich aus einer variablen Region (VH) und drei konstanten Domänen (CH1, CH2, CH3) zusammen. Andere Antikörperklassen (IgA, IgE, IgD, IgM) unterscheiden sich von IgG-Molekülen durch Anzahl und Aminosäuresequenz dieser konstanten Domänen.

Durch die konstanten Regionen des Antikörpermoleküls werden funktionelle Eigenschaften wie die Bindung an NK-Zellen, Makrophagen und andere phagozytierende Zellen oder die Fähigkeit zur Komplementbindung vermittelt. Die variablen Regionen des Antikörpers determinieren dagegen die Spezifität der Antigenbindung.

Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette liegen in der dreidimensionalen Struktur des Antikörpers direkt nebeneinander und bilden gemeinsam die Antigen-

bindungsstelle. Innerhalb der Aminosäuresequenz der variablen Regionen der leichten, wie auch der schweren Kette gibt es Bereiche die stark konserviert sind (*framework region*, FR). Diese Gerüstregionen (FR1, FR2, FR3, FR4) bilden zwei parallele β -Faltblätter (Harris et al., 1992) und sind für die Aufrechterhaltung der Proteinstruktur verantwortlich. Zwischen diesen konservierten Bereichen liegen drei hypervariable Bereiche, die CDR-Regionen (*complementarity determining regions*), die sich durch hohe Sequenzvariabilität auszeichnen (Johnson und Wu, 2000). Diese CDR-Regionen bilden Schleifen am Rande der von den Gerüstregionen gebildeten β -Faltblattstrukturen und treten in direkten Kontakt mit dem Antigen.

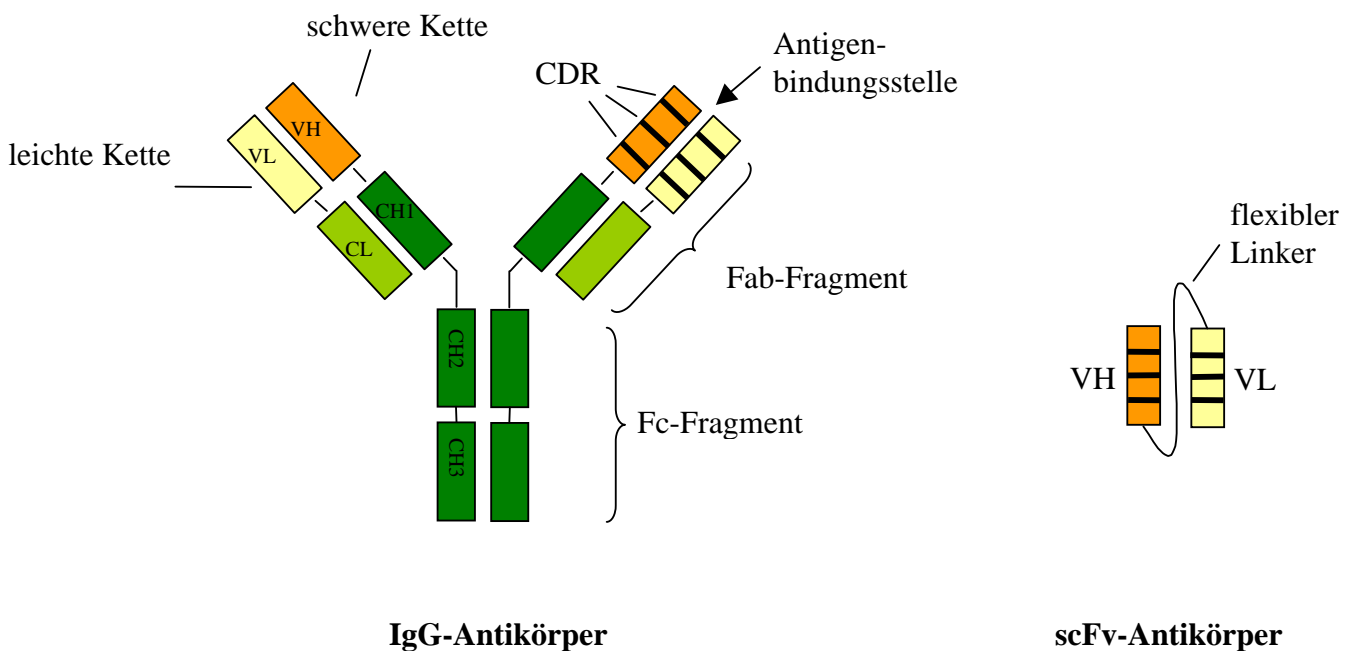


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur eines IgG-Antikörpermoleküls und eines scFv-Fragments

Die Sequenzvariabilität der variablen Regionen entsteht durch verschiedene Mechanismen. So werden die V-Regionen durch separate Gensegmente kodiert. Die Nukleotidsequenz der variablen Region einer leichten Kette entsteht durch die Kombination eines sog. V- und eines J-Segments, während die Nukleotidsequenz der variablen Region einer schweren Kette aus drei Segmenten (V-, D-, J-Segment) zusammengesetzt wird. Das Genom eines Individuums enthält jeweils eine ganze Reihe verschiedener kodierender V- und J-Segmente für die VL-Regionen bzw. V-, D- und J-Segmente für die VH-Regionen. Im Laufe der Entwicklung einer B-Zelle werden durch somatische Rekombination die im Genom enthaltenen Segmente (Keimbahnsegmente) zu einem vollständigen V-Region-Gen kombiniert. Die zufällige Kombination verschiedener Keimbahnsegmente stellt einen Mechanismus dar, auf dem die Antikörper-Diversität beruht. Zum anderen sorgen spezielle Rekombinationsmechanismen für zusätzliche Sequenzvariabilität an den Verknüpfungsstellen der Segmente. Im Rahmen der sog. Affinitätsreifung entsteht weitere Variabilität durch somatische Mutation innerhalb der Segmente (Tonegawa, 1983).

Durch die Sequenzdiversität der variablen Regionen sowie durch Kombination von unterschiedlichen schweren und leichten Ketten wird die Vielfalt der Bindungsspezifitäten im Antikörperrepertoire begründet. Eine einzelne B-Zelle bildet dabei stets nur einen Antikörper bestimmter Spezifität (Rajewsky, 1996).

1.2 Therapeutische Antikörper

Seit der Entwicklung der Hybridomtechnologie, die erstmals von Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) beschrieben wurde, ist es möglich, monoklonale Antikörper (mAK) definierter Spezifität zu generieren. Diese Antikörper sind nicht nur unverzichtbare Werkzeuge für Forschung und Diagnostik geworden. Sie erwiesen sich außerdem als wirksame Therapeutika im Rahmen von Krebstherapie, Transplantationsmedizin und bei der Behandlung von immunologischen Erkrankungen.

Dank der gentechnischen Möglichkeiten, Antikörper und von ihnen abgeleitete Formate für den klinischen Einsatz im Hinblick auf Spezifität, Affinität oder Stabilität zu modifizieren und zu optimieren, wurde die Entwicklung von Antikörpern zu einem der am stärksten expandierenden Bereiche in der Arzneimittelentwicklung. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe als Medikament zugelassener Moleküle und viele weitere befinden sich in klinischer

Erprobung. In Tab. 1 sind gegenwärtig für die Therapie zugelassene Antikörper aufgelistet (Brekke und Sandlie, 2003; Reichert et al., 2005; Smith et al., 2004).

Antikörper	Handelsname	Ziel-Antigen	Indikation
Rituximab	Rituxan®	CD20	B-Zellymphom
Trastuzumab	Herceptin®	HER-2	Brustkrebs
Alemtzumab	Campath®	CD52	Chronisch Lymphatische Leukämie
Adalimumab	Humira®	TNF- α	Rheumatoide Arthritis
Daclizumab	Zenapax®	IL-2 Rezeptor	Organ-Transplantation
Muromonab	Orthoclone OKT3®	CD3	Organ-Transplantation
Abciximab	ReoPro®	GPIIb/IIIa Fibrinogenrezeptor	Angina pectoris
Palivizumab	Synagis®	RSV	Prävention von RS-Virusinfektion
Infliximab	Remicade®	TNF- α	Rheumatoide Arthritis
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	CD33	Aktue Myeloische Leukämie
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	CD20	Non-Hodgkin Lymphom radiolabeled
Omalizumab	Xolair®	IgE	Allergien
Tositumomab-I131	Bexxar®	CD20	Non-Hodgkin Lymphom radiolabeled
Efalizumab	Raptiva®	CD11a	Psoriasis
Cetuximab	Erbitux®	EGFR	Darmkrebs
Bevacizumab	Avastin®	VEGF	Darmkrebs

Tab. 1: Gegenwärtig zugelassene therapeutische Antikörper (Reichert et al., 2005)

Einer Antikörpertherapie können verschiedene Wirkprinzipien zugrunde liegen. Zum einen werden Antikörper an Toxine, Chemotherapeutika oder Radioisotope (Waldmann, 2003) gekoppelt und so für den zielgerichteten Transport dieser Stoffe genutzt. Durch die selektive Bindung des Antikörpers an sein Zielantigen erfolgt eine Verteilung der Wirksubstanzen an bestimmte, ausgewählte Gewebe- oder Zelltypen.

Ungekoppelte therapeutische Antikörper kommen unter anderem zum Einsatz, wenn eine Rezeptor/Liganden-Interaktion durch Bindung an einen der beiden Partner blockiert und so die biologische Folgereaktion auf diese Interaktion neutralisiert werden soll. Nach diesem

Prinzip wirkt z.B. Humira® (Adalimumab), ein gegen TNF- α gerichteter Antikörper, der zur Therapie von rheumatoider Arthritis zugelassen ist (Weisman et al., 2003) oder Zenapax® (Daclizumab), das die IL-2 Rezeptoren aktivierter T-Zellen blockiert und so einer Organabstoßung nach Transplantation entgegen wirkt (Hershberger et al., 2005).

Die Wirksamkeit von ungekoppelten Antikörpern kann aber auch auf der Rekrutierung immunologischer Effektorfunktionen beruhen. So wirken eine Reihe zur Tumorthapie eingesetzter therapeutischer Antikörper über die Mechanismen der komplement-vermittelten Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) und der antikörperabhängigen zell-vermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Klinisch zugelassene Antikörper mit diesem Wirkprinzip sind z.B. das zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzte Herceptin® (Trastuzumab) oder Rituxan® (Rituximab), das in der Therapie von B-Zell-Lymphomen Anwendung findet (Smith, 2003).

1.3 ScFv-Antikörper: kleine, rekombinante Antikörperfragmente

Vollständige Antikörper vom IgG-Typ sind ein klinisch erprobtes und etabliertes Format. Für den therapeutischen Einsatz sind jedoch nicht nur Antikörper in ihrer natürlichen vollständigen Struktur geeignet. Eine ganze Reihe verschiedener rekombinanter Antikörperformate wurde mittlerweile entwickelt, die mögliche Alternativen darstellen. Die verschiedenen Konstrukte unterscheiden sich in Molekülgröße sowie Anzahl der Bindungsstellen und -spezifitäten (Holliger und Hudson, 2005). Eines dieser Formate - das scFv-Fragment (*single chain variable fragment*) - soll hier näher vorgestellt werden. ScFv-Fragmente sind rekombinante Antikörperkonstrukte, bei denen die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette über ein flexibles Linkerpeptid von 10-20 Aminosäuren verbunden, als ein zusammenhängendes Polypeptid exprimiert werden (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988). Damit beträgt ihre Größe nur ca. 1/6 der Größe eines IgG-Antikörpers. ScFv-Fragmente können zum einen durch Klonierung der variablen Regionen eines von Hybridomzellen exprimierten mAK generiert werden. Diese Konstrukte zeigen dann Bindungsspezifität für das identische Bindungsepitop wie der entsprechende vollständige Antikörper. Zum anderen ist es möglich, scFv-Fragmente gewünschter Spezifität mit Hilfe der Phage-Display-Technologie zu generieren.

Ein großer Pluspunkt ist die relativ kostengünstige Produzierbarkeit der scFv-Antikörper, denn anders als vollständige Antikörper können diese Konstrukte in Bakterien oder Hefen in

großer Menge schnell hergestellt werden. Die Expression in *E. coli* ist dabei die am häufigsten angewandte Methode.

Durch das Fehlen des Fc-Teils sind die scFv-Fragmente nicht in der Lage, immunologische Effektorfunktionen zu rekrutieren. Wie vollständige Antikörper können diese Moleküle aber an Radioisotope gekoppelt zur Radioimmuntherapie oder für diagnostische Zwecke eingesetzt werden (Shen et al., 2005). Ebenso sind spezifische scFv-Fragmente in der Lage, Zielantigene zu blockieren und so deren biologische Wirkung zu neutralisieren (Fleisig und Verrier, 2005).

Aufgrund ihrer geringen Größe bieten scFv-Fragmente in bestimmten Bereichen Vorteile gegenüber vollständigen Antikörpermolekülen. So ist vielfach gezeigt worden, dass scFv-Moleküle leichter ins Gewebe penetrieren als vollständige Antikörper, was für eine therapeutische Anwendung bei soliden Tumoren bedeutsam ist (Colcher et al., 1998; Yokota et al., 1992). ScFv-Fragmente sind, anders als IgG-Moleküle, sogar in der Lage, die Cornea des Auges zu penetrieren (Thiel et al., 2002).

IgG-Antikörper haben eine hohe Serum-Halbwertszeit, da sie durch Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), die im Bereich der CH₂-CH₃ Domäne stattfindet, zurückgehalten und auch vor Degradation geschützt werden (Ghetie und Ward, 2000). Aufgrund des Fehlens des Fc-Teils werden scFv-Antikörper daher sehr schnell aus der Blutzirkulation eliminiert. Wegen ihrer geringen Größe unterliegen sie einer hohen glomerulären Filtrationsrate in den Nieren. Für bestimmte Anwendungsgebiete wie z.B. den Einsatz radioaktiv markierter scFv-Fragmente im Bereich der Tumordiagnostik, ist die rasche Ausscheidung ein großer Vorteil gegenüber vollständigen Antikörpern (Kang et al., 2000). Für die therapeutische Anwendung ist jedoch in der Regel eine verlängerte Halbwertszeit erforderlich. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist die Modifikation der scFv-Antikörper durch kovalente Koppelung an Polyethylenglycol (PEG) und damit der Vergrößerung des Gesamtmoleküls.

1.3.1 Immunogenität und Humanisierung von Antikörpern

Der therapeutische Einsatz von nicht-humanen Hybridomantikörpern wird dadurch limitiert, dass diese in den meisten Fällen eine sog. HAMA-Reaktion (*human-anti mouse antibodies*) hervorrufen, bei der vom Patienten eigene, gegen den therapeutischen Antikörper gerichtete

Antikörper gebildet werden (de Bono et al., 2004; DeNardo et al., 2003). Diese Immunreaktion hat eine Neutralisierung und rasche Ausscheidung des therapeutischen Antikörpers zur Folge, wodurch seine Wirksamkeit maßgeblich beeinträchtigt wird (Hwang und Foote, 2005; Khazaeli et al., 1994).

Um den Anteil nicht-humaner, die Immunogenität vermittelnder Sequenzanteile zu verringern, wurden chimäre Antikörper, bestehend aus humanen konstanten und nicht-humanen variablen Regionen generiert. Die Halbwertszeit solcher chimärer Antikörper im Patienten ist deutlich länger als die muriner Antikörper (Meredith et al., 1993). Ferner ist die Inzidenz starker, gegen den chimären Antikörper gerichteter Immunreaktionen deutlich verringert, wird aber weiterhin beobachtet (Hwang und Foote, 2005).

Zur Humanisierung eines Antikörpers kann ein sog. „*CDR-grafting*“ durchgeführt werden, das von Jones et al. (1986) erstmals beschrieben wurde. Hierunter versteht man das Ersetzen der CDRs in einem humanen Antikörpergerüst durch CDRs eines murinen Antikörpers, wodurch dessen Bindungsspezifität auf den humanen Antikörper übertragen wird (Thomas et al., 1996). Oft reicht jedoch die Übertragung der CDRs alleine nicht aus, um einen Antikörper mit adäquater Affinität zu erhalten. Dann wird die Einführung weiterer Mutationen in die Frameworkbereiche notwendig (Carter et al., 1992). Bei Antikörpern, die auf diese Weise humanisiert wurden, ist die Immunogenität gegenüber chimären Antikörpern noch weiter reduziert.

Als Weiterentwicklung des „*CDR-grafting*“ ist das sog. „*SDR-grafting*“ entstanden, bei dem lediglich die für die Antigenbindung maßgeblichen Aminosäurepositionen innerhalb der CDRs von einem nicht-humanen auf ein humanes Antikörpergerüst übertragen werden. Diese Positionen müssen zunächst durch Mutationsanalyse oder durch Datenvergleich mit bereits bekannten dreidimensionalen Strukturen von Antigen-Antikörper-Komplexen ermittelt werden (Kashmiri et al., 2005).

All diese Ansätze beschäftigen sich mit der Humanisierung bekannter muriner Antikörper. Es ist jedoch auch möglich, direkt Antikörper mit humaner Sequenz zu generieren. Zum einen können diese beispielsweise über die Hybridomtechnologie aus transgenen Mäusen, die ein humanes Antikörper-Repertoire exprimieren, gewonnen werden (Lonberg, 2005). Die weitaus flexiblere und schnellere Technik zur Generierung humaner Antikörper ist jedoch die Methodik des Phage-Display.

Die Phage-Display-Technologie erlaubt die gezielte *in vitro* Selektion humaner Antikörper-Spezifitäten für beliebige Antigene. Die Selektion aus Antikörperbibliotheken

erfolgt im Fab- oder scFv-Format. Selektierte, spezifische Fragmente können in diesen Formaten weiter charakterisiert oder in einen vollständigen Antikörper umgewandelt werden.

1.3.2 Generierung von humanen Antikörperfragmenten mittels Phage-Display

Die Expression von scFv-Antikörperfragmenten auf der Oberfläche filamentöser Phagen (Phage-Display) wurde 1990 erstmals beschrieben (McCafferty et al., 1990). In den darauffolgenden Jahren wurde diese Technik für die gerichtete Anreicherung antigenbindender Spezifitäten aus kombinatorischen Antikörperbibliotheken nutzbar gemacht, so dass es mit Hilfe der Phage-Display-Technologie heute möglich ist, aus einer großen Anzahl verschiedener Antikörperfragmente (scFv oder Fab) Spezifitäten mit definierten Bindungseigenschaften zu selektieren.

Für die Verankerung auf der Oberfläche der filamentösen Phagen werden Antikörperfragmente in Fusion mit einem Phagenhüllprotein kloniert (Abb. 2). Bei der Vermehrung der Phagen in *E. coli* wird das resultierende Fusionsprodukt in neue Phagenpartikel eingebaut. Die Expression des Fusionsproduktes und sein nachfolgender Einbau in die Hülle der reifen Phagenpartikel führt zu funktionellen Antikörperfragmenten, die auf der Oberfläche präsentiert werden, während ihre genetische Information im Inneren des Phagenpartikels verpackt ist. Diese Koppelung von Geno- und Phänotyp ist das entscheidende Prinzip der Phage-Display-Technologie. Sie erlaubt die Selektion der genetischen Information eines antigenbindenden Fragmentes über Antikörper-Antigen Interaktion. Der Erfolg dieser Selektion hängt von der Komplexität des Antikörper-Repertoires, der Methode der Antikörperexpression auf der Phagenoberfläche, dem Selektionsprozess selbst und den nachfolgenden Tests für die Auslese amplifizierter Fragmente ab.

In einem ersten Schritt wird die genetische Information für die Antikörpervariabilität - das Repertoire an variablen Regionen der leichten bzw. schweren Kette - isoliert. Dazu werden die variablen Regionen aus der mRNA von B-Zellen revers transkribiert und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Je nach Zielsetzung und Verfügbarkeit können Zellen immunisierter oder naiver Spender verwendet werden.

Beim Erstellen einer kombinatorischen Antikörperbibliothek werden die VH- und VL-Repertoires im Fab- oder scFv-Format kloniert, wobei es zu zufälligen neuen VH-VL-Paarungen kommt. Gerade die Selektion aus naiven Bibliotheken erfordert eine hohe Komplexität der Bibliothek. Der Literatur zufolge muss eine naive Antikörperbibliothek ca.

10^{10} unterschiedliche Klone enthalten, um Binder mit Affinitäten im Bereich von 10^{-9} M zu isolieren (Sheets et al., 1998; Vaughan et al., 1996).

Die in der Antikörperbibliothek enthaltene, genetische Information für die Antikörpervariabilität wird nun phänotypisch auf der Oberfläche filamentöser Phagen exprimiert, während seine genetische Information im Inneren der Phagenhülle verpackt ist. Diese Koppelung von Phäno- und Genotyp wird folgendermaßen erreicht:

Die Expression der Antikörperfragmente auf der Oberfläche des Phagen ist in Fusion mit verschiedenen Hüllproteinen möglich. Meist wird das pIII Protein verwendet, das in drei bis fünf Kopien auf der Phagenoberfläche vorhanden ist (Barbas et al., 1991). Es befindet sich an einem Ende des zylindrischen Phagenpartikels und vermittelt die Infektion von *E. coli* (Deng et al., 1999). Eine trunke Form des pIII Proteins (Δ pIII) dient der Verankerung des Antikörperfragments in der Phagenhülle. Dazu wird die kodierende Sequenz für Δ pIII in Translationsfusion mit der Sequenz für das Antikörperfragment kloniert. Die Klonierung erfolgt in einem Phagemidvektor, d.h. einem Plasmid, das neben dem plasmidalen Replikationsursprung auch einen Phagen-spezifischen Replikationsursprung hat und in Phagenpartikel verpackt werden kann. Wird ein solches Phagemid in *E. coli* transformiert und das Bakterium gleichzeitig mit einem Helferphagen infiziert, so entstehen Phagenpartikel, die das mit dem Antikörperfragment fusionierte Δ pIII Protein tragen. Der Helferphage stellt dabei alle Proteine und Enzyme für die Replikation des Phagen zur Verfügung. Das Phagemid wird dabei effizienter in neu entstehende Phagenpartikel verpackt als das Genom des Helferphagen. Die entstehenden Partikel (ca. 200-2000 pro Bakterienzelle) tragen das an Δ pIII fusionierte Antikörperfragment auf ihrer Oberfläche. Durch die Verpackung des Phagemid in diese Antikörperfragment-tragenden Phagen ist eine Koppelung des Genotyps mit dem Phänotyp des auf der Oberfläche exprimierten Antikörperfragments gegeben.

In einem nun folgenden Ausleseprozess werden aus der diversen Phagenbibliothek Antikörperfragmente mit bestimmten Bindungseigenschaften selektiert. Dazu werden Antikörperfragment-tragende Phagen mit dem Antigen inkubiert, gegen das die gesuchte Spezifität gerichtet sein soll. Das Antigen kann dabei entweder direkt auf einer Mikrotiterplatte oder indirekt über Biotin-Avidin (Hawkins et al., 1992) immobilisiert werden. Auch Zellen, die das Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren, können für die Selektion eingesetzt werden (Watters et al., 1997). Phagen, die ein antigenspezifisches Antikörperfragment tragen, binden an das Antigen, während Phagenpartikel mit

unspezifischen Antikörperfragmenten auf ihrer Oberfläche durch Waschschrte entfernt werden. Die so selektierten, spezifisch gebundenen Phagen werden nun vom Antigen eluiert.

Durch Infektion von *E. coli*-Zellen und Expression mit Hilfe von Helferphagen erreicht man eine Vermehrung der wenigen, selektierten Phagemidklone. An diesen Anreicherungsprozess kann sich nun ein weiterer Selektionszyklus mit Antigeninkubation, Waschschrten, Elution, Reinfektion und Vermehrung der selektierten Phagen anschließen. So wird Runde für Runde eine Anreicherung der antigenspezifischen Phagen erreicht.

Um letztlich die gewünschten Antikörperfragmente zu identifizieren, wird die Fusion mit dem Phagenhüllprotein auf DNA-Ebene gelöst und die Antikörperfragmente löslich im Periplasma von *E. coli* produziert. Von Einzelklonen produzierte Fragmente können nun z.B. in ELISA- oder FACS-Experimenten auf Antigenbindung überprüft und in weiteren Tests charakterisiert werden.

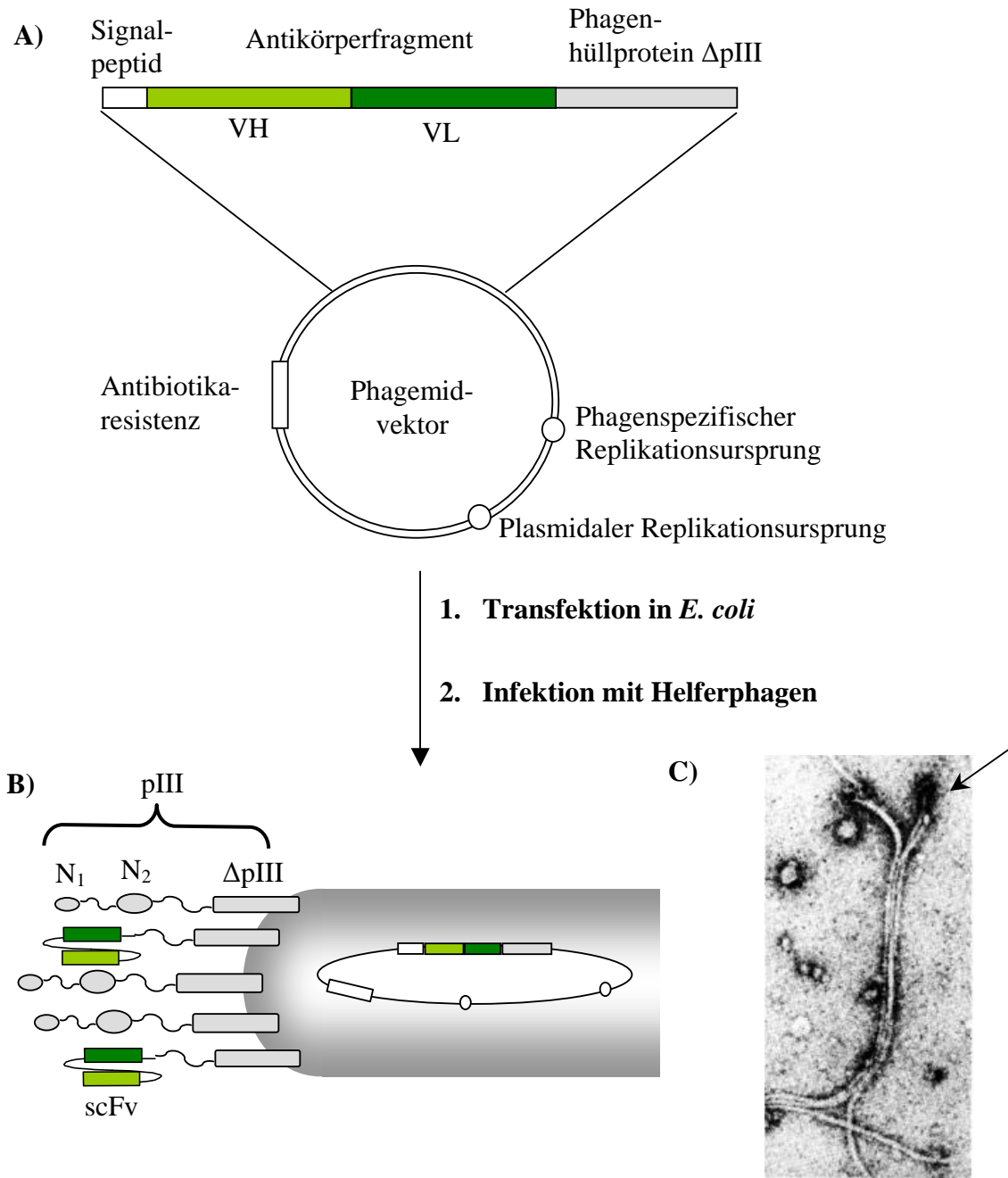


Abb. 2: Expression von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche filamentöser Phagen
 (A) Phagemidvektor für die Expression eines scFv-Antikörperfragments in Fusion mit Phagenhüllprotein $\Delta pIII$. Nach Transfektion des Vektors in *E. coli* und Infektion mit Helferphagen entstehen Phagenpartikel, die auf ihrer Oberfläche scFv-Antikörper in Fusion mit dem trunkierten Phagenprotein $\Delta pIII$ tragen. Die genetische Information für den scFv-Antikörper ist im Phagenpartikel in Form des Phagemidvektors verpackt. (B) zeigt eine schematische Darstellung des entstehenden Phagenpartikels. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von filamentösen Phagen, die Tetanus-Toxoid-spezifische Antikörperfragmente auf ihrer Oberfläche exprimieren. Markierung der Antikörper erfolgte über kolloidale Goldpartikel, die mit Tetanus Toxoid beschichtet wurden (x 140.000) (Barbas et al., 1991).

1.4 Funktion von GM-CSF

Das Zytokin GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) ist ein multipotenter, hematopoetischer Wachstumsfaktor. Es wurde zunächst als wichtiger Stimulus für die Proliferation und Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen aus Vorläuferzellen beschrieben. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Zytokin auch die Funktionen reifer, ausdifferenzierter Zellen der myeloiden Reihe fördert. Mittlerweile wurde eine Vielzahl biologischer Aktivitäten beschrieben, die durch GM-CSF vermittelt oder verstärkt werden (Gasson, 1991). So ist GM-CSF z.B. ein entscheidender Überlebensfaktor für die verschiedenen Granulozyten-Subpopulationen und inhibiert die Apoptose von eosinophilen (Her et al., 1991) und neutrophilen (Ward et al., 1997) Granulozyten. Auch deren Effektorfunktionen, wie Zytotoxizität, und die Ausschüttung von Zytokinen werden durch GM-CSF gefördert. Auf die Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen hat GM-CSF ebenfalls einen fördernden Einfluss (Inaba et al., 1992).

Untersuchungen an GM-CSF-defizienten Mäusen gaben weiteren Aufschluss über die physiologische Bedeutung von GM-CSF. Solche Mäuse zeigten keine offensichtliche Reduktion in der Anzahl myeloider Zellen, obwohl die Differenzierung aller myeloider Linien (Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) durch GM-CSF gefördert wird. Untersuchungen an Listerien infizierten, GM-CSF-defizienten Mäusen lassen vielmehr vermuten, dass die Rolle von GM-CSF weniger in der Kontrolle der Hematopoese als in der Aufrechterhaltung und Stimulierung der funktionalen Aktivität von Granulozyten und Makrophagen liegt (Zhan et al., 1998).

GM-CSF wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen produziert: aktivierte T-Zellen, aber auch Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten können dieses Zytokin sezernieren. In vitro-Versuche haben gezeigt, dass Fibroblasten und epitheliale Zellen aus Lungengewebe auf Stimulierung mit IL-1 oder TNF- α hin mit der Produktion von GM-CSF reagieren (Adkins et al., 1998; Munker et al., 1986). IL-1 liefert auch für Endothelzellen und Chondrozyten aus Gelenken den Stimulus für die Produktion von GM-CSF (Campbell et al., 1991). In Makrophagen hingegen wird GM-CSF unter anderem durch LPS induziert (Thorens et al., 1987).

1.4.1 Struktur des GM-CSF-Moleküls

Humanes GM-CSF (hGM-CSF) besteht aus 127 Aminosäuren. Das Molekül bildet eine globuläre, dreidimensionale Struktur mit vier α -Helices sowie zwei β -Faltblattstrukturen (Walter et al., 1992). Humanes GM-CSF weist je zwei potentielle N- und O-Glycosylierungsstellen auf und wird *in vivo* als Glycoprotein sezerniert. Variationen in der Glycosylierung resultieren in einem heterogenen Molekulargewicht von ca. 14-30 kDa (Ernst et al., 1992; Lee et al., 1985).

Rekombinante Expression von humanem GM-CSF in Säugerzellen wie auch in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu posttranslational modifiziertem, glycosyliertem Protein, während bei der Produktion in *E. coli* keine Glycosylierung stattfindet. Alle Formen sind, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, biologisch aktiv. Nicht- oder wenig glycosylierte Formen weisen dabei jedoch eine höhere Affinität zum Rezeptor auf und ihre spezifische Aktivität übersteigt die der vollständig glycosylierten Form (Cebon et al., 1990).

Der GM-CSF-Rezeptor ist ein Heterodimer, dessen Ketten beide zur Typ I Zytokin-Rezeptor Familie gehören. Die α -Untereinheit (CD116) bindet GM-CSF mit hoher Spezifität, jedoch geringer Affinität. Der hochaffine GM-CSF-Rezeptor wird von der α - und der β -Untereinheit gemeinsam gebildet. Die β -Kette alleine ist jedoch nicht in der Lage GM-CSF zu binden (Hayashida et al., 1990). Da diese β -Untereinheit auch Bestandteil der Rezeptoren für IL-3 und IL-5 ist, wird sie auch als „gemeinsame β -Kette“ bezeichnet. Der GM-CSF-Rezeptor wird auf Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie dendritischen Zellen, d.h. Zellen der myeloiden Reihe exprimiert (DiPersio et al., 1988; Yamada et al., 1997).

1.4.2 Die Rolle von GM-CSF bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des Menschen

Beim Menschen gehen eine Reihe verschiedener, chronisch entzündlicher Erkrankungen mit systemisch oder lokal erhöhtem GM-CSF-Spiegel einher.

Die im Rahmen einer Studie untersuchten GM-CSF-Konzentrationen im Blutplasma von Patienten mit rheumatoider Arthritis (366 ± 61 pg/ml), zeigten deutlich erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe (174 ± 18 pg/ml). In Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke konnten lokale GM-CSF-Konzentrationen bis zu 1300 pg/ml nachgewiesen werden (Fiehn et

al., 1992). Von Fibroblasten- und Makrophagen-artigen Zellen aus dem Synovium arthritischer Gelenke ist bekannt, dass sie auf Stimulierung mit IL-1 β oder TNF- α mit der Produktion von GM-CSF reagieren (Alvaro-Gracia et al., 1991). Auch bei chronischen Erkrankungen der Atemwege wie chronischer Bronchitis, Asthma oder COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) kommt es zu entzündlichen Veränderungen, deren Entstehung und Aufrechterhaltung durch erhöhte GM-CSF-Spiegel gefördert werden (Balbi et al., 1997; Culpitt et al., 2003).

In der Zerebrospinalflüssigkeit von Multiple-Sklerose-Patienten konnte ebenfalls eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Konzentration an GM-CSF nachgewiesen werden (Perrella et al., 1993) und in Hautbiopsien von Patienten mit allergischen Hauterkrankungen zeigte sich vermehrt GM-CSF mRNA (Kay et al., 1991).

1.4.3 Die Rolle von GM-CSF in Tiermodellen verschiedener entzündlicher Erkrankungen

Durch Erkenntnisse aus verschiedenen Tiermodellen erhärtet sich die These, dass GM-CSF bei der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt und dass seine Neutralisierung von großem therapeutischem Nutzen sein könnte.

Bei Mäusen mit Collagen-induzierter Arthritis (CIA), einer Modellerkrankung für das menschliche Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis (RA), zeigte sich durch zusätzliches Verabreichen von GM-CSF nach Induktion der Erkrankung eine Verschlimmerung der Symptome (Campbell et al., 1997), während GM-CSF-defiziente Mäuse vor der Entstehung der Krankheit geschützt waren (Campbell et al., 1998). In DBA/1 Wildtyp-Mäusen mit bestehender CIA-Erkrankung konnten Symptome, wie die auftretende Deformierung der Extremitäten und die Zerstörung der Knorpelstruktur in den Gelenken, durch Gabe eines GM-CSF-neutralisierenden Antikörpers deutlich gemildert werden (Cook et al., 2001).

Weitere Hinweise für den therapeutischen Nutzen der Neutralisierung von GM-CSF, liefert das Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) bei Mäusen. EAE ist eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte inflammatorische Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die als experimentelles Modell für die menschliche Erkrankung Multiple Sklerose (MS) dient. Sie kann durch verschiedene Myelin-Antigene induziert werden. Wie auch bei CIA, sind GM-CSF-defiziente Mäuse resistent gegen die Induktion der Erkrankung und zusätzliche Gabe von GM-CSF verschlimmert die Symptome bei Wildtyp-Mäusen. Die

Verabreichung eines anti-GM-CSF Antikörpers war auch in diesem Modell therapeutisch wirksam. Sie führte selbst noch nach Auftreten von klinischen Symptomen zu deren Ausheilung (McQualter et al., 2001) und zeigt die Wirksamkeit einer GM-CSF-Neutralisierung auch in fortgeschrittenem Krankheitsstadium.

Auch bei experimentell durch LPS induzierter Entzündung der Lunge in Mäusen zeigte sich ein durch GM-CSF-Neutralisierung vermittelter therapeutischer Nutzen. Die Gabe eines GM-CSF-blockierenden Antikörpers führte hier zur Reduktion der induzierten Proliferation von Makrophagen und zur Verringerung von infiltrierenden neutrophilen Granulozyten in die Lunge (Bozinovski et al., 2004).

Ein therapeutischer Effekt durch Blockierung von GM-CSF zeigte sich auch bei der Behandlung von „Flaky-Skin“ Mäusen (*fsn/fsn*), bei denen es durch eine spontane Mutation im *Tetratricopeptide repeat domain 7*-Gen am distalen Ende von Chromosom 17 (Helms et al., 2005) zu hyperproliferativen entzündlichen Hautveränderungen und Akkumulation von Neutrophilen in der Haut kommt. Die Gabe eines anti-GM-CSF Antikörpers führte bei dieser Modellerkrankung für Psoriasis zu einer deutlichen Reduktion von Akanthose und Entzündung der Haut (Schon et al., 2000).

1.5 Aufgabenstellung

Viele chronisch entzündliche Erkrankungen gehen offensichtlich mit einer erhöhten GM-CSF-Produktion einher, welche wiederum das weitere Fortschreiten der Krankheit fördert. Ergebnisse aus Tiermodellen haben gezeigt, dass die Neutralisierung von GM-CSF den Krankheitsverlauf stoppt oder zumindest mildert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass ein immuntherapeutischer Ansatz, der die Neutralisierung von GM-CSF zum Ziel hat, auch beim Menschen für die Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen geeignet ist.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Antikörpermolekül zu generieren, das in der Lage ist, die biologische Aktivität von GM-CSF zu neutralisieren. Für einen effizienten therapeutischen Einsatz wurde ein hochaffin bindendes, in niedrig-molaren Konzentrationen neutralisierendes Molekül gesucht. Um die potentielle Immunogenität so gering wie möglich zu halten, sollte der Antikörper humanen Ursprungs sein. Zur Selektion eines solchen Antikörpers wurde die Phage-Display-Technologie verwendet. Als initiales Format für die Entwicklung wurde das scFv-Fragment gewählt.

Nach erfolgreicher Selektion eines geeigneten GM-CSF-neutralisierenden Antikörpermoleküls sollte es für den klinischen Einsatz in verschiedene relevante Antikörperformate überführt werden. Dazu wurde das scFv-Fragment einerseits mit einem PEG-Polymer konjugiert und andererseits durch Fusion mit humanen konstanten Immunglobulin-Regionen in einen vollständigen humanen IgG1-Antikörper umgewandelt. Diese verschiedenen Antikörperformate sollten *in vitro* hinsichtlich Antigenbindungsaffinität, Neutralisierungseffizienz und Stabilität miteinander verglichen und so ein optimierter Arzneimittelkandidat für die klinische Entwicklung vorgeschlagen werden.

2. MATERIAL

2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	
XI-1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene
TG1	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r _K - m _K -) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]	Stratagene
BL-21 (DE3)	F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal λ(DE3)	Stratagene
BL-21 AI	F- ompT hsdS _B (r _B -m _B -) gal dcm araB::T7RNAP-tetA	Invitrogen

2.2 Zelllinien

TF-1 (DSMZ)

- human,
- etabliert aus Knochenmark eines Erythroleukämie-Patienten, GM-CSF-abhängiges Wachstum (Kitamura et al., 1989)
- Suspensionszellen
- kultiviert in RPMI 1640 (Gibco) mit 10 % FCS, 2,5 ng/ml hGM-CSF bei 37°C, 5% CO₂

HEK293-F (Invitrogen)

- Klon der Zelllinie HEK293, der an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert wurde
- Suspensionszellen
- kultiviert in Freestyle 293 Expression Medium (Invitrogen) bei 37°C, 8% CO₂, unter leichtem Schütteln (100 rpm)

2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

PBS

150 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄

pH auf 7,4 einstellen

Wasch-Puffer ELISA:

1x PBS, 0,05 % Tween-20

TBE

89 mM Tris-Base
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

TBS

50 mM Tris
137 mM NaCl
2,7 mM KCl

pH auf 8 einstellen

FACS-Puffer:

1x PBS, 1 % FCS, 0,05 % NaN₃

TAE

40 mM Tris-Base
40 mM Essigsäure
1 mM EDTA

TBS-T

TBS + 0,05 % Tween-20

DNA-Probenpuffer

50 mM EDTA
30 % Glycerin
0,001 % Orange G

Die Chemikalien zur Pufferherstellung wurden von Sigma, Merck, Roth oder Fluka in Analysequalität bezogen.

Puffer und Lösungen, die nur in einzelnen Methoden Anwendung fanden, werden mit der entsprechenden Methode beschrieben.

2.4 Kultur-Medien für die Bakterienkultur

LB

1 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt
340 mM NaCl

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

für LB-Platten: + 1,5% Bacto-Agar

SB

1 % MOPS
3 % Bacto-Trypton
2 % Bacto-Hefeextrakt

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

2.5 Antibiotika

Carbenicillin (Roth)

Stocklösung: 100 mg/ml in 50 % EtOH

Endkonzentration in Flüssigmedium 50 µg/ml; in Festmedium 100 µg/ml

Tetracyclin (Fluka)

Stocklösung: 5 mg/ml in EtOH

Endkonzentration in Flüssigmedium 10 µg/ml

Kanamycin (Roth)

Stocklösung: 10 mg/ml in H₂O

Endkonzentration in Flüssigmedium 70 µg/ml

2.6 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal</i> , CIP)	New England Biolabs
Expand-High-Fidelity Taq-Polymerase	Roche
Quick T4-DNA Ligase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme (<i>BstEII</i> , <i>SacI</i> , <i>SpeI</i> , <i>XhoI</i>)	Roche, New England Biolabs
Reverse Transkriptase (SuperscriptII)	Invitrogen
RNase H	Roche
RNase Inhibitor	Roche
T4-DNA Ligase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Roche

2.7 KITs

QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SilverXpress Silver Staining Kit	Invitrogen

2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried bezogen.

Oligonukleotide, die zur Amplifikation der variablen Regionen verwendet wurden, finden sich unter 3.3.2.3.

Umklonierung von scFv 3077 Fragment in pBad-pelB-Kan

primA

5'- ATT ATA GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG CAG GTG CAG CTG GTC CAG TCT GGG GCT GAG G -3'

primB

5'-GGT CAT CTG GAT ATC AGA ACC ACC ACC ACC GGA GC-3'

primC

5'-GAT ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TC-3'

primD

5'-TAT ATT GCG GCC GCT TAC GGG CAA TGG TGA TGG TGA TGG TGT TTG ATT TCC ACC TTG GTC C-3'

Klonierung des scFv 3077_HisCys

5'-NaeIw/oM_3077star

5'-GCTGCCCCAG CCG GCG ATG GCC CAG GTG CAG CTG-3'

3'-3077star_H6C_Not

5'-TGA CGT GCG GCC GCT TAG CAA TGG TGA TGG TGA TGG TGT TTG ATT TC -3'

Klonierung des vollständigen IgG 3077

5'- Bsu36I 5-306

5'-ACG TCA CCT TAG GTG TCC ACT CCG ATA TCC AGA TGA CCC AGT CTC CAT CTT CCG TGT CTG C -3'

3'- 5-306 XhoI

5'-CAT GCA CTC GAG CTT GGT CCC TCC GCC GAA AG-3'

5'- Bsu36I 3077

5'-ACG TCA CCT TAG GTG TCC ACT CCC AGG TGC AGC TGG TCC AGT CTG GGG CTG AGG TGA AGA AGC-3'

3'- 3077 Bsu36I

5'-ACG TCA CCT GAG GAG ACG GTG ACC ATT GTC CCT TG-3'

2.9 Antikörper

Maus-anti-Flag M2 (# F3165)	Sigma
Maus-anti-hGM-CSF (#M500-A)	Pierce Endogen
Maus-anti-Penta-His Antibody (# 34670)	Qiagen
Ziege-anti-human-IgG (H+L)-spezifisch-POD (#109-035-088)	Jackson
Ziege-anti-human-IgG Fc γ -spezifisch-POD (#109-035-098)	Jackson
Ziege-anti-Maus-IgG F(ab) ₂ -spezifisch-POD (#115-036-072)	Jackson
Ziege-anti-Maus-IgG-AP (#A3562)	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG Fc γ -spezifisch-POD (#115-035-071)	Jackson
Maus-anti-human-IgD (#555776)	Pharmingen

2.10 Reagenzien

Die Bezugsquelle weiterer Reagenzien wird bei der Beschreibung der jeweiligen Methodik angegeben.

ABTS-Substratlösung	Roche
Arabinose	Sigma
BCIP/NBT	Sigma
BSA	Sigma
Bacto- Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Agar	Difco
DTT	Invitrogen
Dynabeads ® M-280 Streptavidin	Dynal
Ficoll	Biochrom
Glucose	Eifelfango
IPTG	Roth
Leukine® (hGM-CSF, <i>S. cerevisiae</i>)	Berlex
Lysozym	Sigma
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roth
OPD-Substratlösung	Sigma

SOC-Medium	Fluka
Streptavidin-POD	Dako
WST-1	Roche

2.11 Geräte

Äkta FPLC	Amersham
Bakterienschüttler	Infors, New Brunswick
Biacore 2000	Biacore
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus
Elektrophoresekammern	Bio-Rad
Elektroporiergerät	Bio-Rad
ELISA Reader	BioTek Instruments
ELISA Washer	Molecular Devices
FACS Calibur	Becton Dickinson
Fluoreszenzspektrophotometer	Hitachi
PCR Haube	Erlab
PCR Robo Cycler	Stratagene
PCR Thermocycler	Peltier
Photometer	Eppendorf
Spannungsgeräte	Bio-Rad
Wasserbad	GFL

2.12 Computerprogramme und Datenbank zur Datenauswertung

BiaEvaluation	Biacore
CellQuest	Becton Dickinson
Prism 4	GraphPad Software
Vector NTI	Infor Max
V-Base-Datenbank (Tomlinson)	http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk

2.13 Zentrifugen und Rotoren

Biofuge Fresco Heraeus

Multifuge 3LR Heraeus

Sorvall RC 5C Plus Sorvall

Rotoren: SW-40, SS-34, JA-600

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, handelte es sich bei dem für die Reaktionsansätze verwendeten Wasser stets um „Wasser für die Molekularbiologie“ von Roth.

3.1.1 Präparation von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus PBMCs wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits durchgeführt. Zum Schutz vor RNasen wurde generell mit sterilen Plastikgefäßen und mit Aerosolfiltern versehenen Pipettenspitzen gearbeitet. Während der Arbeiten wurden stets Handschuhe getragen und auf eine zügige Durchführung des Protokolls geachtet.

Zunächst wurden humane PBMCs lysiert. Dazu wurden bis zu $1,5 \times 10^7$ Zellen in RLT-Puffer (Qiagen, substituiert mit 1% β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Um das Zelllysat zu homogenisieren wurde es auf eine QIAshredder-Säule, die in einem 2 ml Auffang-Gefäß platziert war, pipettiert und für 2 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Diese Zentrifugation wurde ebenso wie alle nachfolgenden bei RT durchgeführt. Der Durchfluss wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit einem Volumen 70% Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde nun auf eine „RNA-Mini Spin-Säule“ pipettiert und für 15 sec bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Die Säulenmatrix wurde mit 700 μ l RW1-Puffer (Qiagen) und anschließend mit 500 μ l RPE-Puffer (Qiagen) gewaschen, gefolgt von einem zusätzlichen Waschschrift mit RPE für 2 min. Um jegliche Ethanolreste, die die nachfolgende Elution stören könnten, zu entfernen, wurde die Säule nochmals für 1 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und die RNA durch Zugabe von 30 μ l RNase-freiem Wasser und Zentrifugation ($10000 \times g$, 1 min) eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde nochmals wiederholt. Die RNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht 40 μ g RNA. Die RNA wurde entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei -20°C gelagert.

3.1.2 Synthese von cDNA

Zur reversen Transkription von RNA in cDNA wurden 20 μ g RNA eingesetzt. War die Konzentration geringer als 0,8 μ g/ μ l so wurde die RNA durch Fällung aufkonzentriert. Dazu

wurden 20 µg RNA mit DEPC-H₂O auf 200 µl aufgefüllt, 1 µl Glycogen (Roche), 20 µl 3 M NaAcetat pH 5,2 zugegeben, und mit 500 µl Ethanol versetzt. Nach 15 min Inkubation bei -20°C wurde die RNA für 15 min bei 10000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 600 µl Ethanol gewaschen (10000 x g, 4°C, 15 min), anschließend luftgetrocknet und schließlich in 25 µl H₂O resuspendiert.

Zur RNA Lösung wurden 3 µl 10x Random Hexamer Primer (Roche) pipettiert und mit H₂O auf 28 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde bei 70°C für 10 min inkubiert und nachfolgend auf Eis abgekühlt. Es wurden 2 µl RNase-Inhibitor (Roche), 10 µl 5x RT-Puffer, 3 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 25 mM), 5 µl 0,1 M DTT und 2 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) zugegeben und der Ansatz zunächst 10 min bei RT, nachfolgend 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann bei 90°C und 5 min Inkubationszeit beendet und die RNA verbleibender RNA-cDNA-Hybride mittels 1 µl RNase H (Roche) für 20 min bei 37°C abgedaut.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde durchgeführt, um selektiv DNA-Fragmente für eine nachfolgende Klonierung zu amplifizieren oder um den Erfolg einer Klonierung mittels Kolonie-PCR zu überprüfen.

Für den ersten Fall diente aufgereinigte Plasmid-DNA als Matrize. Für den Fall einer Kolonie-PCR wurde nach Transformation eines Ligationsansatzes eine Einzelkolonie von der Agarplatte gepickt und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. 1 µl dieser Suspension wurde direkt in den PCR-Ansatz eingesetzt. Das Primerpaar wurde dabei stets so gewählt, dass ein Primer im Bereich des Vektors und ein Primer im Bereich des einligierten Fragments binden konnte.

Reaktionsansatz:

- 1 – 5 μ l Plasmid-DNA oder Bakteriensuspension
- 0,2 μ l 5'-Primer (20 μ M)
- 0,2 μ l 3'-Primer (20 μ M)
- 0,16 μ l dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 25 mM)
- 2 μ l 10 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9,0)
- ad 19,9 μ l mit H₂O

Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 0,1 μ l Taq-Polymerase (Roche) bei Kolonie-PCR oder Taq-Expand (Roche) bei Amplifikation für spätere Klonierung komplettiert.

Reaktionsbedingungen:

1. Denaturierung	94°C	180 sec	
2. Denaturierung	94°C	60 sec	} 30-40 x
3. Primer-Anlagerung	50-54°C	60 sec	
4. Verlängerung	72°C	60-120 sec	
5. Verlängerung	72°C	300 sec	

3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit einem Agarosegehalt von 0,8 - 2% (w/v) verwendet. Als Puffersystem wurde meist 1x TAE-Puffer eingesetzt. Für die Auftrennung von Fragmenten zur Klonierung von Phage-Display-Bibliotheken fand jedoch autoklavierter 1x Tris-Borat-Puffer (TBE) Verwendung. Laufpuffer und Gelpuffer waren stets identisch. Nach Aufkochen der Agarose in Puffer wurden die Gele mit ca. 5 μ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) auf 1 ml Gelvolumen versetzt und horizontal in Gelschlitten (Biorad) gegossen. Nach Verfestigen der Agarose wurden die Gele in mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammern überführt.

Die zu trennende DNA wurde mit DNA-Probenpuffer versetzt und geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 1-5 V/cm Elektrodenabstand. Als DNA-Größenstandards wurden verwendet: DNA-Ladder Mix 100 bp (Fermentas) oder 1 kb Plus DNA Standard (Invitrogen).

3.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.1.5.1 aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraktionskit (Qiagen) verwendet. Damit ließen sich Fragmente in der Größenordnung von 70 bp bis zu 10000 bp aufreinigen. Das DNA-Fragment wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Je nach Volumen des Gelstücks (100 mg ~ 100 µl) wurden 3 Volumen QG-Puffer (Qiagen) zugegeben. Dann wurde die Agarose unter Schütteln bei 50°C so lange inkubiert bis sie vollständig geschmolzen war. Bei der Aufreinigung von Fragmenten < 500 bp und > 4 kb wurde die Lösung mit der geschmolzenen Agarose zur Erhöhung der Ausbeute mit einem Gel-Volumen Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen, unter welche ein 2 ml Auffanggefäß gegeben wurde. Durch Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min bei RT wurde die DNA an die Säulenmembran gebunden. Um Agarosereste zu entfernen, wurde die Säule zunächst mit 500 µl Puffer QG und anschließend mit 750 µl Puffer PE (Qiagen) gewaschen (10000 x g, 1 min, RT). Durch nochmalige Zentrifugation wurde sichergestellt, dass Ethanolreste aus Puffer PE von der Säulenmatrix entfernt wurden. Zur Elution der DNA wurden 30-50 µl H₂O auf die Säule pipettiert und nach 1 min Inkubation bei 10000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert.

3.1.5.2 aus Reaktionsansätzen

Um DNA aus PCR-, Restriktions- oder Ligationsansätzen aufzureinigen, wurde das QIAquick PCR-Aufreinigungs kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem fünffachen Volumen an Bindungspuffer PB (Qiagen) vermischt und auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen. Durch Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min bei RT wurde die DNA an die Säulenmembran gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE (Qiagen) gewaschen (10000 x g, 1 min, RT). Durch nochmalige Zentrifugation wurde sichergestellt, dass sich keine Ethanolreste aus Puffer PE mehr auf der Säulenmatrix befanden. Zur Elution der DNA wurden 30-50 µl H₂O auf die Säule pipettiert und nach 1 min Inkubation bei 10000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert.

3.1.6 Bakterienkultur

Bakterienkulturen wurden entweder aus bereits bestehenden Flüssigkulturen oder durch Picken einzelner Bakterienkolonien von Agarplatten angelegt und über Nacht in Kulturmedium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen unter Schütteln bei 37°C kultiviert.

3.1.7 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.1.7.1 Präparation kleinerer Plasmidmengen

Zur Isolierung kleinerer Plasmidmengen aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Mini Kit (Qiagen) verwendet, dem das Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender säulenchromatographischer Bindung der DNA zugrunde liegt.

Dazu wurde eine 5 ml Bakterienkultur über Nacht in Selektionsmedium bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 250 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lysis-Puffer P2 (Qiagen) und vorsichtiges Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes wurden die Bakterien alkalisch lysiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch Zufügen von 350 µl Puffer P3 (Qiagen) und erneutes Mischen neutralisiert. Um Zellbruchstücke und Proteine zu sedimentieren, wurde der Ansatz für 10 min bei 10000 x g, RT, zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde auf die QIAprep Spin Säule pipettiert. Durch Zentrifugation (wie alle weiteren Zentrifugationen bei 10000 x g, 1 min, RT) wurde die Plasmid-DNA an die Säulenmembran gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten ein Waschschriff mit 500 µl Puffer PB (Qiagen) und ein Waschschriff mit 750 µl Puffer PE (Qiagen). Zur vollständigen Entfernung von störenden Ethanol-Resten aus Puffer PE wurde nochmals zentrifugiert. Durch Zugabe von 50 µl H₂O und Zentrifugation nach 1 min Inkubationszeit wurde die Plasmid-DNA eluiert.

3.1.7.2 Präparation mittlerer Plasmidmengen

Zur Isolierung mittlerer Plasmidmengen aus *E. coli* wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet, das wie das QIAprep Spin Mini Kit auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender säulenchromatographischer Bindung der DNA beruht.

Für die Präparation mittlerer Plasmidmengen wurde eine Bakterienkultur in 50 ml Selektionsmedium über Nacht bei 37°C geschüttelt und die Bakterien durch Abzentrifugieren geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden die Ansätze mit 4 ml Puffer P2 (Qiagen) versetzt. Es wurde durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 ml eisgekühlter Puffer P3 (Qiagen) zugegeben und wiederum durch Invertieren gemischt, wodurch Proteine, Zelltrümmer und genomische DNA gefällt wurden. Die Lysate wurden nun in Filterspritzen (Qiagen) überführt und 10 min bei RT inkubiert. Durch langsames Einführen des Stempels in die Filterspritze wurde das Lysat gleichzeitig filtriert und auf eine zuvor mit 4 ml Puffer QBT (Qiagen) äquilibrierte QIAGEN-tip 100 Säule überführt. Nach dem Durchlaufen des Ansatzes durch die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer QC (Qiagen) gewaschen und anschließend die gebundene DNA mit 5 ml Puffer QF (Qiagen) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (15000 x g, 4°C, 30 min). Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µl H₂O resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.1.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

3.1.8.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von größeren Nukleinsäuremengen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei 50 µg DNA bzw. 40 µg RNA. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation zu bestimmen, wurde auch bei der Wellenlänge 280 nm gemessen. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für DNA bei 1,8, für RNA bei 2,0 liegen.

3.1.8.2 Konzentrationsbestimmung im Agarosegel durch Vergleich mit einem Massenstandard

Durch den Vergleich mit einem Massenstandard auf dem Agarosegel ist die Bestimmung von sehr geringen DNA-Konzentrationen (bis zu 5 ng) möglich. Dazu wurde ein definiertes Volumen der DNA-Lösung und des Markers „Low DNA Mass Ladder“ (Invitrogen) auf einem Agarosegel aufgetrennt und miteinander verglichen. Bei einem Auftrag von 2 µl

entsprachen die DNA-Banden dieses Markers einer Masse von 5, 10, 20, 40, 60 und 100 ng. Diese Methode wurde vor allem für Konzentrationsbestimmungen im Rahmen der Klonierung von scFv-Bibliotheken eingesetzt.

3.1.9 Restriktions-Verdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem zur Einstellung optimaler pH- und Salzkonzentrationen. In der Regel wurden ca. 10 Enzymeinheiten (U) pro μg DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1-2 h beim angegebenen Temperaturoptimum inkubiert. Anschließend wurden die resultierenden DNA-Fragmente zu analytischen oder präparativen Zwecken auf einem Agarosegel aufgetrennt.

3.1.10 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA mussten beide Komponenten zunächst mit geeigneten, kompatiblen Restriktionsenzymen verdaut und aufgereinigt werden. Wurde bei einer Klonierung nur mit einem Restriktionsenzym gearbeitet, war es notwendig die Selbst-Ligation des Vektors durch die Abspaltung der Phosphatgruppen am 5'-Ende (Dephosphorylierung) mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (New England Biolabs) zu verhindern. Dazu wurde ca. 1 μg geschnittener Vektor mit 3 μl Enzym im vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem für 30 min bei 37°C inkubiert.

3.1.11 Ligation

DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. Dieses Enzym verestert ATP-abhängig 5'-Phosphatgruppen mit freien 3'-Hydroxylgruppen am Ende von DNA-Fragmenten. Bei der Durchführung wurden etwa 100 ng präparierter Vektor und ein zwei- bis dreifacher molarer Überschuss an präpariertem Fragment eingesetzt. Nach Zugabe von 1 μl 10x Ligationspuffer (Roche) wurde der Ansatz mit H_2O auf 9 μl aufgefüllt. Zuletzt wurde entweder 1 μl T4-DNA-Ligase (Roche) oder 1 μl T4-DNA Quick-Ligase (New England Biolabs) zupipettiert. Bei Verwendung der T4-DNA-Ligase (Roche) wurde der Ansatz 2 h bei

RT inkubiert, bei Verwendung der Quick-Ligase (New England Biolabs) nur 5-20 min. Der gesamte Ansatz wurde nachfolgend für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

3.1.12 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung hitzeschock-kompetenter Bakterien wurden die Roti-Transform Lösungen von Roth verwendet. Zunächst wurden 300 ml LB-Medium mit 3 ml einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* XI-1 blue oder *E. coli* TG1 inokuliert. Hatte die Kultur eine Dichte von $OD_{600} \approx 0,4 - 0,6$ erreicht, wurden die Bakterien aus 200 ml Kulturvolumen pelletiert (3000 x g, 5 min) und in 5 ml kaltem LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 5 ml Roti-Transform Lösung 1 wurde kurz gemischt, dann 500 μ l der Roti-Transform Lösung 2 zugegeben und nochmals durch sanftes Vortexen gemischt. Die Bakterien-suspension wurde auf Eis in 100 μ l Aliquots verteilt und bei -80°C gelagert.

3.1.13 Transformation von Hitzeschock-kompetenten *E. coli*-Bakterienzellen

Zur Transformation wurden die Zellen (100 μ l) auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz zugegeben. Nach 10 min auf Eis wurde der Ansatz für genau 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurden 900 μ l LB-Medium zupipettiert und durchmischt. Die Zellen wurden 45 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und dann jeweils 1/10 und 9/10 der Zellsuspension auf Agarplatten mit Selektionsmedium (100 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin) ausplattiert. Zellen, welche mit dem Plasmid die entsprechende Resistenz erworben hatten, bildeten nach einer 16-18-stündigen Inkubation deutlich sichtbare Kolonien.

3.1.14 Sequenzierung

Das Sequenzieren von DNA-Abschnitten wurde mittels der Strangabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) in Auftragsarbeit bei der Firma SequiServe, Vaterstetten durchgeführt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

20 µl aufzutrennende Proteinlösung wurden jeweils mit 7 µl Probenpuffer (NuPage LDS-Sample buffer, Invitrogen) sowie 3 µl DTT (1 M) versetzt und die Lösung für 10 min auf 70°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem Bis-Tris-Gel 4-12% (NuPage, Invitrogen) für 35 min bei 200 V. Als Laufpuffer diente NuPAGE MES SDS Laufpuffer (Invitrogen). Als Größenstandard wurde der Multimark Standard (Invitrogen) verwendet.

3.2.2 Coomassie Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Zur Coomassie Färbung von SDS-Gelen wurden diese zunächst für 3 x 5 min in H₂O gewaschen, nachfolgend in Simply Blue SafeStain Lösung (Invitrogen) für 1 h bei RT inkubiert und letztlich nochmals für ca. eine Stunde in H₂O gewaschen.

3.2.3 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Die Silberfärbung von SDS-Gelen wurde mit Hilfe des SilverXpress Silver Staining Kits von Invitrogen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde das Gel nacheinander mit den verschiedenen Lösungen zur Fixierung (10 min), Sensitivierung (30 min), Färbung (15 min) und Entwicklung (3-15 min) inkubiert und die Farbreaktion letztlich durch Zugabe der Stopplösung beendet. Nach Sensitivierung, Färbung und Abstoppen der Färbung wurde das Gel jeweils in H₂O gewaschen.

3.2.4 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (PALL) transferiert. Dies erfolgte mit einer „wet-blot“ Elektrophorese Apparatur (Bio-Rad) zwischen in Transferpuffer (NuPage Transferpuffer substituiert mit 10% Methanol, Invitrogen) getränktem Whatman-Filterpapier (60 min, 25 V). Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran wurde diese über Nacht mit PBS/3% BSA abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 4 x in PBS/0,01% Tween

gewaschen und mit dem ersten Antikörper (Penta-His, Qiagen, 1:1000 in PBS/0,3% BSA) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde die Nitrozellulosemembran mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG, AP-konjugiert, Sigma, 1:10 000 in PBS/0,3% BSA) für eine Stunde bei RT inkubiert, nochmals 4 x gewaschen und mit dem Substrat BCIP/NBT (Sigma) überschichtet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Membran fotografiert.

3.3 Phage-Display

3.3.1 Produktion von Helferphagen *VCSM13*

Zur Produktion von *VCSM13*-Helferphagen wurde eine Einzelkolonie *E. coli* XL-1 blue in 5 ml SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin überführt und über Nacht bei 37°C angezogen. Die Selektion mit Tetracyclin sollte einem Verlust des in *E. coli* XL-1 blue vorliegenden F'-Plasmids entgegenwirken. Das F'-Plasmid kodiert für die Proteine des Sex-Pilus, an welchen die M13-Phagen bei der Infektion andocken. Auf dem F'-Plasmid befindet sich außerdem das Transposon Tn10, durch welches die Tetracyclinresistenz kodiert wird. Durch die Selektion mit Tetracyclin wurde also sichergestellt, dass in der Kultur nur für eine Phageninfektion empfängliche Bakterien wuchsen. 1 ml dieser Übernachtskultur wurde in 20 ml SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) überführt und mit einem Phagenplaque angeimpft. Nach 2 h Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln wurde die Kultur in 1 l SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Kanamycin (70 µg/ml) überführt und über Nacht weiter bei 37°C geschüttelt. Da die verwendeten *VCSM13*-Phagen mit der Infektion die Resistenz gegen Kanamycin übertragen, konnten sich in dieser Doppelselektion nur phageninfizierte Bakterien mit F'-Plasmid vermehren. Diese entließen Phagen in den Kulturüberstand. Am folgenden Tag wurden Bakterien durch Zentrifugieren (2200 x g, 20 min, 4°C) aus der Kultur entfernt. Phagenhaltiger Überstand wurde zur Inaktivierung von Proteasen für 20 min bei 70°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Dieser Überstand wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 100 µl einer frisch angezogenen *E. coli* XL-1-blue Kultur ($OD_{600} \approx 1$) mit 3 ml Topagar (42°C, 0,6 g Agar in LB-Medium gelöst) vermischt, 10 µl einer Verdünnung des Phagenüberstandes zugegeben, gut gemischt und auf

eine LB-Platte gegossen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht bildete sich ein durchgehender Bakterienrasen, auf welchem sich kreisrunde Plaques mit vermindertem Bakterienwachstum zeigten. Jeder Plaque entsprach einem Phagenklon (pfu, plaque forming unit). Es wurde die pfu von Verdünnungen der Phagensuspension in Zehnerschritten von 10^{-8} bis 10^{-13} bestimmt und die Konzentration in der Ausgangssuspension errechnet.

3.3.2 Erstellen von scFv- Bibliotheken

3.3.2.1 Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)

Humane PBMCs wurden mittels eines Ficoll Dichtegradienten aus heparinisiertem Blut isoliert. Dazu wurden zunächst 15 ml Ficoll in Leukosept-Röhrchen (Falcon) pipettiert und durch Zentrifugation unter die Trennscheibe der Röhrchen gebracht. Auf die Trennscheibe wurden nun 25 ml Blut geschichtet. Während der nachfolgenden Zentrifugation (400 x g, 30 min, RT, ohne Bremse) trennten sich Erythrozyten und Granulozyten, die aufgrund ihrer größeren Dichte pelletiert wurden, von den PBMC, die sich in der Schicht zwischen der Ficoll-Phase und der obersten, aus Blutplasma bestehenden Schicht sammelten. Diese Zellen wurden vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und zweimal mit PBS gewaschen. Die so isolierten PBMC wurden entweder direkt in eine RNA-Präparation und nachfolgende cDNA-Synthese eingesetzt oder weiter für die Isolierung IgD-positiver Zellen verwendet.

3.3.2.2 Isolierung von IgD-positiven Zellen aus PBMC

Die Selektion der IgD-positiven Zellen aus einer PBMC-Population erfolgte über magnetische Separation. Dazu musste ein muriner Antikörper mit Spezifität für humanes IgD an Magnetkügelchen, die mit einem anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtet waren (CELLection PanMouse IgG Kit, Dynal) gekoppelt werden. Zu diesem Zweck wurde 1 ml der Magnetkügelchen zunächst einmal in PBS / 0,1% BSA gewaschen und nachfolgend in 1 ml PBS / 0,1% BSA resuspendiert. Es wurden 40 µl eines murinen anti-human-IgD-Antikörpers (0,5 mg/ml, Pharmingen) zugegeben und für die Bindung des Antikörpers an die Magnetkügelchen über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Kügelchen viermal in PBS / 0,1% BSA gewaschen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß in einer

magnetischen Halterung platziert, wodurch die Kügelchen an der Gefäßwand zusammengezogen wurden. Der Überstand wurde abgezogen, das Reaktionsgefäß aus der Halterung genommen und die Magnetkügelchen erneut in PBS / 0,1% BSA resuspendiert. Nach dem vierten Waschschrift wurden die Kügelchen in 1 ml PBS / 0,1% BSA resuspendiert.

Etwa 5×10^7 PBMCs wurden in insgesamt 3 ml PBS / 0,1% BSA mit 195 μ l der vorbereiteten Magnetkügelchen für 15 min bei 4°C inkubiert. Durch Platzieren des Reaktionsgefäßes in der Magnethalterung wurden die Magnetkügelchen mit daran gebundenen IgD-positiven Zellen aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde verworfen. Die Magnetkügelchen wurden nach dem oben beschriebenen Prinzip viermal in RPMI 1640 / 1% FCS gewaschen und letztlich in 400 μ l RPMI 1640 / 1% FCS resuspendiert. Durch Zugabe von 8 μ l Releasepuffer (Dyna) wurde während einer 15-minütigen Inkubation bei RT auf einem Drehrad rotierend die Bindung zwischen Magnetkügelchen und Zellen gelöst. Die Magnetkügelchen wurden nachfolgend durch Platzieren in der Magnethalterung aus der Suspension entfernt. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und die Zellzahl der darin enthaltenen IgD-positiven Zellen bestimmt. Aus diesen Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und nachfolgend eine cDNA Synthese wie unter 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben durchgeführt.

3.3.2.3 Amplifikation von variablen Regionen aus cDNA-Präparationen

Die PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation von variablen Regionen wurden zur Vorbeugung von Kontaminationen mit Fremd-DNA unter einer PCR-Haube pipettiert. Die unter der Haube befindliche Arbeitsfläche wurde vor und nach jedem Ansetzen einer PCR-Reaktion für 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Die Amplifikationen wurden auf Eis angesetzt und dabei stets Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern verwendet.

Reaktionsansatz:

- 0,4 – 0,5 μ l cDNA
- 0,6 μ l 5'-Primer (20 μ M)
- 0,6 μ l 3'-Primer (20 μ M)
- 0,16 μ l dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 25 mM)
- 2 μ l 10 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9,0)
- ad 19,9 μ l mit H₂O

Zugabe von 0,1 μ l Taq-Polymerase (Roche)

Reaktionsbedingungen:

1. Denaturierung	94°C	180 sec	
2. Denaturierung	94°C	60 sec	} 40 x
3. Primer-Anlagerung	52°C	60 sec	
4. Verlängerung	72°C	60 sec	
5. Verlängerung	72°C	300 sec	

Oligonukleotide zur Amplifikation humaner V kappa Fragmente

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried bezogen.

5'-hu Vκ-1 SacI

5'- GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CC -3'

5'-hu Vκ-3 SacI

5'- GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GGT WTG ACR CAG TCT CC-3'

5'-hu Vκ-2/4 SacI

5'- GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GTG ATG ACY CAG TCT CC-3'

5'-hu Vκ-5 SacI

5'- GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'

5'-hu Vκ-6 SacI

5'- GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GTG CTG ACT CAG TCT CC-3'

3'-hu Vκ J1-SpeI-BsiWI

5'-GAC GAC ACT AGT TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CC-3'

3'-hu Vκ J2/4-SpeI-BsiWI

5'-GAC GAC ACT AGT TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT CTC CAS CTT GGT CC-3'

3'-hu Vκ J3-SpeI-BsiWI

5'-GAC GAC ACT AGT TGC AGC CAC CGT ACG TTT GAT TAC CAC TTT GGT CC-3'

3'-hu Vκ J5-SpeI-BsiWI

5'-GAC GAC ACT AGT TGC AGC CAC CGT ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CC-3'

zur Amplifikation humaner VH Fragmente

5'-hu VH-135-XhoI

5'- AGG TGC AGC TGC TCG AGT CTG G-3'

5'-hu VH-4-XhoI

5'- CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG -3'

5'-hu VH-4b-XhoI

5'- CAG GTG CAG CTA CTC GAG TGG GG -3'

3'-huVH J1-BstEII

5'- CTG AGG AGA CGG TGA CC -3'

3'-huVH J3-BstEII

5'- CTG AAG AGA CCG TGA CC -3'

zur Einführung des parentalen CDR3 in VH Fragmente

3'-LIB134-VH1A

5'- GTA ATC AAA GTA GAC TGC TAT CAG ACC CGA TCT YGC ACA GTA ATA CAC GGC -3'

3'-LIB134-VH1B

5'- GTA ATC AAA GTA GAC TGC TAT CAG ACC CGA TCT YGC ACA GTA ATA CAY RGC -3'

3'-LIB134-VH3A

5'- GTA ATC AAA GTA GAC TGC TAT CAG ACC CGA TCT NGY ACA GTA ATA CAC RGC -3'

3'-LIB134-VH3B

5'- GTA ATC AAA GTA GAC TGC TAT CAG ACC CGA TCT NGC ACA GTA ATA CAA RGC -3'

3'-LIB134-VH4

5'- GTA ATC AAA GTA GAC TGC TAT CAG ACC CGA TCT SGC ACA GTA ATA CAC RGC -3'

3'-LIB134-JH3-BstEII

5'-AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC CCA GTA ATC AAA GTA GAC TGC-3'

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte nach Spendern getrennt. Erst im Anschluss wurden die Fragmente der verschiedenen Spender für die Konstruktion der scFv-Bibliothek zu gleichen Teilen gepoolt. Die den verschiedenen V kappa- bzw. VH-Familien entsprechenden DNA-Fragmente wurden entsprechend ihrer Häufigkeit unter den funktionellen Keimbahngenen folgendermaßen gewichtet:

Vkappa-Pool:

Fragmente, die mit den verschiedenen 3'-Primern 3'-huVκJ1-*SpeI-BsiWI*, 3'-huVκJ2/4-*SpeI-BsiWI*, huVκJ3-*SpeI-BsiWI*, huVκJ5-*SpeI-BsiWI* amplifiziert worden waren, wurden entsprechend dem Verhältnis 3'-huVκJ1-*SpeI-BsiWI* : 3'-huVκJ2/4-*SpeI-BsiWI* : huVκJ3-*SpeI-BsiWI* : huVκJ5-*SpeI-BsiWI* wie 1:2:1:1 gemischt.

VH-Pool:

Mit gleichem 5'-Primer amplifizierte Fragmente VH Fragmente wurden im Verhältnis J1:J3 = 3:1 gepoolt.

Nach Einführung des parentalen CDR3 in die VH-Sequenz wurde ein Fragment-Pool mit folgender Gewichtung hergestellt: LIB134-VH1A : LIB134-VH1B : LIB134-VH3A : LIB134-VH3B : LIB134-VH4 : LIB134-VH4b = 3 : 1 : 3 : 1 : 1 : 1.

3.3.2.4 Subklonierung der VH- und VL-Fragmente in den Phagemid-Vektor pComb5BHis

Der Phagemidvektor pComb5BHis (Micromet AG) erlaubt die periplasmatische Expression von scFv-Fragmenten als Translationsfusion mit dem Phagenhüllprotein pIII in *E. coli*. Das bla-Gen vermittelt transformierten Bakterien Resistenz gegenüber Carbenicillin. Für die Klonierung von scFv-Bibliotheken wurden nacheinander die kodierenden Sequenzen für VH oder VL (Einzelgene oder Repertoires) inkloniert.

Die für die notwendigen Restriktionsansätze eingesetzte Menge an Restriktionsenzymen wurde wie folgt berechnet:

Definition: 1 U Restriktionsenzym entspricht der Enzymmenge, die 1 µg DNA des Lambda-Phagen in 1 h bei 37°C vollständig schneidet.

Daraus folgt:

Benötigte Enzymmenge [U/µg DNA] =

= (bp Lambda x Schnittstellen in DNA-Fragment) / (bp Fragment x Schnittstellen in Lambda)

Für Enzyme, die das Genom des Lambda-Phagen (50000 bp) nicht schneiden, wird die Bestimmung der Units z.B auf das Genom von Adeno-2 (35937 bp) normiert.

[U] / µg DNA	VH	VL	pComb5BHis	pBluescript
XhoI	143	---	9	17
BstEII	11	---	1	1,3
SacI	---	72	5	8
SpeI	---	35	2	2,1

Angaben in Unit Enzym / µg DNA

Tab. 2: Verwendete Enzymmenge pro µg Fragment bzw. Vektor

Für die Berechnung der zu verwendenden Enzymmengen wurde die Anzahl der Schnittstellen in der Lambda- bzw. Adeno-2 (*SpeI*) DNA dem Katalog der Firma New England Biolabs entnommen.

Die Restriktionsansätze wurden stets nur mit einem Enzym durchgeführt und das Gesamtreaktionsvolumen auf mindestens ein zehnfaches des eingesetzten Enzymvolumens eingestellt. Neben Enzym und dem zu schneidenden VH- oder VL-Fragment oder der Vektor-DNA enthielt ein Restriktionsansatz den vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Die

Reaktion wurde beim Temperaturoptimum für das jeweilige Enzym für mindestens 2 h inkubiert. Darauf folgte eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick PCR-Aufreinigungskit (siehe 3.1.5.2). Nur Ansätze bei denen erwartet wurde, dass zwei Fragmente entstehen, von denen beide größer als 100 bp waren, wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraktionskit (siehe 3.1.5.1) aufgereinigt.

Die DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. In Ligationsansätze zur Klonierung von Selektionsbibliotheken wurden stets 1200 µg geschnittener Vektor und 400 µg geschnittenes VH- oder VL-Fragment eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt zudem 20 µl 10x Ligationspuffer (Roche) und 15 U T4-DNA-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Nach einer Inkubationszeit von ca. 18 h bei 15°C wurde die DNA aus diesem Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR-Aufreinigungskit (siehe 3.1.5.2) aufgereinigt. Der gesamte Ansatz wurde in die nachfolgende Elektroporation eingesetzt.

3.3.2.5 Elektroporation

Pro Ansatz wurden 300 µl elektrokompente *E. coli* XI-1 blue (Stratagene) auf Eis aufgetaut und mit einer vorgekühlten Pipettenspitze zur aufgereinigten DNA aus dem Ligationsansatz gegeben. Nach Vermischen wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Küvette (0,2 cm gap, Bio-Rad) überführt, 1 min auf Eis inkubiert und die Elektroporation in einem Bio-Rad GenePulser (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω, Bio-Rad) durchgeführt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 5 ml vorgewärmtes SOC-Medium (Fluka) überführt und unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 10 ml SB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 20 µg/ml Carbenicillin) zugegeben und für die Bestimmung der Elektroporationseffizienz 1,1 µl des Gemisches abgenommen. Diese wurden in Verdünnungen auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurde die Koloniezahl bestimmt und die Gesamtzahl der Klone pro Ansatz errechnet (Transformations-Effizienz).

Der Elektroporationsansatz wurde sofort nach Abnahme des Anteils für die Effizienzbestimmung eine weitere Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Carbenicillinkonzentration auf 50 µg/ml erhöht und nochmals 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10^{12} pfu VCSM13-Helferphagen zugegeben, kurz vermischt, das Kulturvolumen mit SB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 50 µg/ml Carbenicillin) auf

100 ml erhöht und erneut 2 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde durch Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) auf *VCSM13*-infizierte Bakterien selektiert. Bakterien, welche sich in der folgenden Übernachtinkubation unter Schütteln bei 37°C vermehrten, enthielten also den pComb5B-Vektor (vermittelt Carbenicillin Resistenz) mit der genetischen Information für ein scFv-Fragment sowie Helferphagen-DNA (vermittelt Kanamycin-Resistenz). Diese Bakterien sezernierten scFv-tragende Phagen ins Medium.

3.3.3 Isolierung von Phagen aus Kulturüberstand

Zunächst wurden Bakterien durch Zentrifugation (2200 x g, 20 min, 4°C) aus dem phagenhaltigen Überstand entfernt. Das Bakterienpellet enthielt in Form des pComb5B-Vektors die genetische Information der aktuellen scFv-Bibliothek. Diese genetische Information wurde durch Präparation des Plasmidpools konserviert.

Im Kulturüberstand war die aktuelle scFv-Bibliothek phäno- und genotypisch in den Phagen, die scFv auf ihrer Oberfläche trugen, repräsentiert. Ein Teil des Kultur-Überstandes (2-50 ml) wurde stets für eventuelle spätere Versuche durch Lagerung bei 4°C gesichert. Im verbleibenden Phagenüberstand wurden 4 % PEG 8000 (Sigma) und 3 % NaCl (Sigma) gelöst und die Phagen 30 min auf Eis bei 1100 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS / 0,1%BSA gelöst. Um noch vorhandene Zellreste zu entfernen, wurde nochmals für 5 min bei 12000 x g (4°C) zentrifugiert und der Überstand – nach Abnahme von 5 µl für die Bestimmung des Phagentiters (*input*, siehe 3.3.6.1) - in die Selektion eingesetzt.

3.3.4 Selektion von antigenbindenden Phagen mit der Methode des „in-solution-panning“

Für den Selektionsansatz wurden 500 µl scFv-Phagenlösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß, das über Nacht bei 4°C mit PBS/1% BSA blockiert worden war, überführt und mit biotinyliertem hGM-CSF versetzt. Die Endkonzentration an biotinyliertem Antigen im Selektionsansatz betrug zwischen 1 nM und 100 nM. Das Gemisch wurde 1 h bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Um das biotinylierte Antigen zusammen mit daran gebundenen Phagen aus der Lösung isolieren zu können, wurden 100 µl (= $6,7 \times 10^7$) Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen (Dynabeads M-280, Dynal) zugesetzt und weitere 30 min unter denselben

Bedingungen inkubiert. Während dieser Zeit wurden an das Antigen gebundene Phagen über die Biotin-Streptavidin-Bindung letztlich an die Magnetkügelchen gekoppelt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in einer Halterung direkt vor einem Magneten platziert, so dass die Magnetkügelchen sich an der Wand des Reaktionsgefäßes sammeln konnten. So konnte nachfolgend der Überstand, der nicht-gebundene scFv-Phagen enthielt, abgezogen werden. Die Magnetkügelchen (mit biotinyliertem Antigen und daran gebundenen scFv-Phagen) wurden nun zum Entfernen unspezifisch gebundener Phagen mit 1 ml PBS / 0,1% BSA gewaschen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß für 5 min auf dem Drehrad bei RT inkubiert und dann wieder vor dem Magneten platziert, wo der Waschpuffer entfernt werden konnte. Dieser Vorgang wurde je nach Selektionsrunde noch ein- bis neunmal wiederholt.

Danach wurde die spezifische Bindung von scFv-Phagen an das Antigen durch pH-Erniedrigung gelöst. In einem ersten Elutionsschritt wurden die Magnetkügelchen mit Antigen und Phagen in 200 µl Elutionspuffer (0,1 M HCl-Glycin pH 2,2) resuspendiert, 10 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert und dann vor dem Magneten platziert. Im Überstand befanden sich nun die zuvor an Antigen gebundenen scFv-Phagen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort durch Zugabe von 2 M Tris-Base (pH 11) auf pH 7 gebracht.

Um auch besonders affine Antigen-bindende scFv-Phagen zu eluieren, wurde die Elution nochmals mit 0,1 M HCl-Glycin pH 1 als Elutionspuffer wiederholt. Alternativ dazu folgte eine Inkubation der Magnetkügelchen mit 200 µl einer frisch angezogenen *E. coli* XI-1 blue – Kultur (in SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin, $OD_{600} \approx 1$) für 10 min auf dem Drehrad. Während dieser Zeit konnten scFv-Phagen die Bakterien infizieren. Die Bakterien wurden, nachdem die Magnetkügelchen über den Magneten aus der Lösung entfernt worden waren, direkt in Kultur genommen.

3.3.5 Infektion einer *E. coli* XI-1 blue Kultur mit eluierten scFv-Phagen und erneute Phagenamplifikation

Das neutralisierte scFv-Phageneluat wurde zu 2 ml einer frisch angezogenen *E. coli* XI-1 blue – Kultur (in SB-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin, $OD_{600} \approx 1$) pipettiert und 15 min bei RT inkubiert, so dass eine Infektion der Bakterien durch die scFv-Phagen stattfinden konnte. Durch das in den scFv-Phagen verpackte pComb5BHis-Plasmid erhielten die Bakterien eine Resistenz gegen Carbenicillin. Der Ansatz wurde nachfolgend mit SB-Medium (10 µg/ml

Tetracyclin, 20 µg/ml Carbenicillin) auf 15 ml aufgefüllt. Zur Bestimmung des Output-Titers wurden der Kultur 11 µl entnommen (siehe 3.3.6.2). Nach 1 h unter Schütteln bei 37°C wurde die Carbenicillin-Konzentration im Kulturansatz auf 50 µg/ml erhöht und eine weitere Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Kultur wurden nun 10^{12} pfu *VCSM13*-Helferphagen zugegeben, kurz vermischt, das Kulturvolumen mit SB-Medium (10 µg/ml Tetracyclin, 50 µg/ml Carbenicillin) auf 100 ml erhöht und erneut 2 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde durch Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) auf *VCSM13*-infizierte Bakterien selektiert. Während der darauf folgenden Inkubation von ca. 16 h erfolgte die Amplifikation der selektierten scFv-Phagen.

Um eine weitere Selektionsrunde durchzuführen, wurden diese dann am nächsten Tag wiederum aus dem Medium isoliert und auf biotinyliertem Antigen selektiert. Infektion von *E. coli* XI-1 blue mit selektierten Phagen und die Amplifikation der Phagen in einer erneuten Übernachtskultur beendeten diese weitere Selektionsrunde. Theoretisch sollte sich in jeder Selektionsrunde der Anteil an antigenspezifischen scFv-Phagen erhöhen. Um hGM-CSF-spezifisch bindende scFv-Phagen anzureichern, wurden solche Selektionsrunden vier- bis fünfmal aneinandergereiht.

3.3.6 Bestimmung von Input-und Output-Phagentitern

Zur Überwachung des Selektionsvorgangs während einer Phage-Display-Selektion, wurde sowohl die Anzahl an Phagen bestimmt, die in eine Selektionsrunde eingesetzt wurden (*input*) als auch die nach Selektion verbliebene Anzahl an Phagen (*output*).

3.3.6.1 Input-Titer:

Zur Bestimmung des Input-Titers, wurden nach der Phagenfällung (siehe 3.3.3) 5 µl Phagensuspension für eine Titerbestimmung entnommen. Ausgehend von diesen 5 µl wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Von geeigneten Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 µl zur Infektion von 50 µl *E. coli* XI-1 blue ($OD_{600} \approx 1$) eingesetzt. Nach 10 min bei RT wurden diese Ansätze auf Carbenicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien wurde die Anzahl eingesetzter Phagen errechnet.

3.3.6.2 Output-Titer:

Zur Bestimmung des Output-Titers wurden einer *E. coli* XL-1blue Kultur nach Infektion dieser Kultur mit selektierten Phagen (siehe 3.3.5) 11 µl entnommen. Nach zweimaligem Verdünnen um den Faktor zehn, wurden alle drei Verdünnungsstufen auf Carbenicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien wurde die Anzahl eingesetzter Phagen errechnet.

3.3.7 Produktion und Biotinylieren von hGM-CSF

Zur periplasmatischen Produktion von hGM-CSF wurde das entsprechende Expressionsplasmid (Micromet AG) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in Selektionsmedium bei 37°C zu einer optischen Dichte von 0,5 - 0,8 angezogen. Proteinproduktion wurde durch 1 mM IPTG induziert und erfolgte über Nacht bei 25°C. Das Periplasma wurde mittels Resuspendieren der Bakterien in einer 20%igen Sucroselösung durch osmotischen Schock präpariert. Die Aufreinigung erfolgte über Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, Ni-NTA-Superflow) und nachfolgende Gelfiltration.

Für die Phage-Display-Selektion wurde das in *E. coli* produzierte hGM-CSF oder kommerziell erhältliches, in *S. cerevisiae* produziertes hGM-CSF (Leukine®, BERLEX) an Biotin gekoppelt. Die Biotinylierung wurde in PBS mit 5 % DMSO (Sigma) mit einem fünffachen Überschuss an EZ-Link Sulfo NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) für 1 h bei RT auf einem Drehrad durchgeführt. Zur Trennung von freiem Biotin und biotinyliertem hGM-CSF wurde eine Anionen-Austausch-Chromatographie (Resource Q, Amersham Biosciences) nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Chromatographie resultierte in zwei Elutionspeaks, die in nachfolgenden ELISA-Experimenten auf ihren Gehalt an hGM-CSF sowie die Biotinylierungsrate überprüft wurden.

Zur Bestimmung der hGM-CSF-haltigen Fraktion wurde eine 96-well ELISA-Platte mit seriellen Verdünnungen (Verdünnung 1:2, Ausgangskonzentration 6 µg/ml, nach Abschätzung aus der Höhe des Elutionspeaks) der erhaltenen Fraktionen beschichtet. Die Detektion des hGM-CSF erfolgte mit einem anti-hGM-CSF-Antikörper (M500-A, Pierce Endogen, 2,5 µg/ml in PBS/1% BSA) gefolgt von einem POD-gekoppelten, F(ab)₂-spezifischen Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, 1 µg/ml in PBS/1 % BSA). Das Signal wurde durch Zugabe von OPD-Substratlösung (Sigma) detektiert und bei einer

Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Die hGM-CSF-Konzentration wurde im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe an unbehandeltem hGM-CSF als Standard bestimmt. Zum Nachweis der Biotinylierung wurde dieses ELISA-Experiment unter Verwendung von POD-konjugiertem Streptavidin (Dako, 1 µg/ml in PBS/1% BSA) für die Detektion verwendet durchgeführt.

Der Anteil an Biotin-gekoppeltem hGM-CSF wurde ermittelt, indem oben erwähnte ELISA-Experimente sowohl mit Material durchgeführt wurden, das direkt aus der Säulenchromatographie stammte als auch mit Material, das zuvor mit $6,7 \times 10^7$ Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen (Dynabeads M-280, Dynal) auf einem Drehrad bei RT inkubiert worden war. Dadurch wurde biotinyliertes hGM-CSF aus der Lösung entfernt. Ein Vergleich der im ELISA ermittelten hGM-CSF-Konzentration vor und nach dieser Behandlung ließ auf den Grad der Biotinylierung schliessen.

Die ELISA-Resultate zeigten, dass der zweite Elutionspeak das biotinylierte hGM-CSF enthielt. Der Grad der Biotinylierung lag zwischen 50% und 95%.

Die Bioaktivität des biotinylierten hGM-CSF wurde anhand von TF-1-Proliferationstests sichergestellt. Die Durchführung erfolgte nach demselben Protokoll wie für die Charakterisierung von scFv-Antikörpern.

3.3.8 Screening

3.3.8.1 Expression von scFv-Antikörpern und Periplasmapräparation

Zur löslichen Expression von scFv-Fragmenten wurden die VH/VL-Sequenzen in den Vektor pCombFlag/His (Micromet) subkloniert. Dieser erlaubte die periplasmatische Expression der Fragmente ohne Fusion an Phagengene. Für Nachweis und Aufreinigung waren die Fragmente jedoch C-terminal mit einer FLAG-Sequenz gefolgt von einer Hexahistidinsequenz fusioniert. Die periplasmatische Expression von scFv-Antikörpern und die Durchführung der Periplasmapräparation erfolgte nach zwei unterschiedlichen Protokollen in *E. coli* XI-1 blue oder *E. coli* TG1.

a) **in *E. coli* XI-1 blue:** Expression im 5 ml-Maßstab und Periplasmapräparation nach der "Freeze & Thaw"-Methode

Nach Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien wurden Einzelkolonien gepickt und in 100 μ l LB-Medium resuspendiert. Mit 10 μ l dieser Suspension wurden 5 ml SB-Medium (5 μ g/ml Carbenicillin, 20 mM $MgCl_2$) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln für 6 h inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die über den lac-Promotor gesteuerte Proteinproduktion induziert. Nach Übernachtinkubation bei 30°C unter Schütteln wurden die Bakterien durch Zentrifugation (2000 x g, 15 min, 4°C) geerntet.

Das Bakterienpellet wurde in 0,5 ml PBS resuspendiert und in einem EtOH/Trockeneis-Bad 5 min gefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Dieses Einfrieren und Auftauen wurde dreimal wiederholt, wodurch die äußere Bakterienmembran zerstört und scFv in den Überstand entlassen wurde. Die Zelltrümmer wurden bei 12000 x g pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort im ELISA getestet, weiter aufgereinigt oder für weitere Versuche bei -20°C gelagert.

b) in *E. coli* TG1: Expression in 96-well Platten und Periplasmapräparation mit osmotischem Schock in Anwesenheit von Lysozym

Pro well wurde eine Einzelkolonie mit Hilfe von Zahnstochern in hohe 96-well-Platten (Volumen 1 ml) überführt. In den Platten waren 120 μ l/well LB-Medium mit Carbenicillin (50 μ g/ml) und 1% Glucose vorgelegt. Diese „Master“-Platten wurden mit luftdurchlässiger Folie (Greiner) verklebt und über Nacht bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 10 μ l/well aus der Master-Platte in eine neue Platte überführt (100 μ l/well LB-Carbenicillin/0,1% Glucose), die Platte mit luftdurchlässiger Folie verklebt und 4 h bei 37° kräftig geschüttelt. Dann wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und bei 30°C für weitere 18 h unter Schütteln inkubiert. Um das Periplasma aufzuschließen, wurden nun 40 μ l/well BBS-Puffer, der frisch mit Lysozym (2,5 mg/ml) supplementiert worden war, zugegeben. Die Platte wurde für 1 h bei RT geschüttelt und anschließend bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand konnte in eine neue Platte überführt und bei -20°C gelagert oder direkt im ELISA getestet werden.

BBS-Puffer 400 mM Borsäure

320 mM NaCl

4 mM EDTA pH 8,0

3.3.8.2 ELISA

Eine 96-well Flachbodenplatte (Nunc, Maxisorp) wurde mit 50 µl hGM-CSF (1 µg/ml in PBS) pro well über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl PBS-T gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mindestens 1 h mit PBS / 3% BSA bei RT blockiert. Darauf folgend wurden pro well 50 µl Periplasma-Extrakt oder entsprechende Kontrollen aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte eine einstündige Inkubation mit dem anti-Flag M2- oder anti-Penta-His-Antikörper (1µg/ml in PBS / 1 % BSA, 50 µl/well). Darauf folgend wurde wiederum gewaschen und 50 µl/well Peroxidase-gekoppelter Detektionsantikörper Ziege-anti-Maus-IgG (entweder (Fab)₂-spezifisch oder Fcγ-spezifisch) zugegeben. Nach 1 h bei RT wurde nochmals gewaschen und pro well 100 µl ABTS-Substratlösung (Roche) zupipettiert. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

3.4 Expression und Aufreinigung von scFv- und vollständigen Antikörpermolekülen

3.4.1 Expression kleiner Mengen scFv-Antikörpern in *E. coli* und Aufreinigung über Ni-NTA-Zentrifugiersäulen

Die Expression kleinerer Mengen scFv-Antikörper in *E. coli* erfolgte wie unter 3.3.8.1 beschrieben.

Aufreinigung kleinerer Mengen an 6xHis-markiertem Protein aus periplasmatischem Extrakt erfolgte über Ni-NTA-Zentrifugiersäulen von Qiagen. Um Degradation von Proteinen zu vermeiden, wurde stets mit eiskalten Puffern gearbeitet. Zur Equilibrierung wurden 600 µl Puffer A auf die Säule pipettiert und 2 min bei 700 x g und 4°C zentrifugiert. Alle nachfolgenden Zentrifugationen erfolgten unter den gleichen Bedingungen. 1000 µl periplasmatischer Extrakt wurde mit 20 µl Puffer A versetzt. Die Säule wurde zunächst mit 500 µl Extrakt beladen und zentrifugiert. Nachfolgend wurde dieser Schritt mit dem restlichen Extrakt wiederholt. Nach zweimaligem Waschen mit je 600 µl Waschpuffer wurde die Säule in ein frisches Auffanggefäß gegeben. Zur Elution des Proteins wurde 200 µl Puffer B auf die Säule pipettiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nachfolgend nochmals wiederholt.

Puffer A	20 mM Na ₂ HPO ₄ 400 mM NaCl 5 mM Imidazol, pH 7,0
Waschpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ 400 mM NaCl 20 mM Imidazol, pH 7,0
Puffer B	20 mM Na ₂ HPO ₄ 400 mM NaCl 250 mM Imidazol, pH 7,0

3.4.2 Expression größerer Mengen scFv-Antikörper in *E. coli* und Aufreinigung über Affinitätschromatographie und Gelfiltration

3.4.2.1 Expression

Erfolgte die Produktion größerer Mengen an scFv mit einem pCombFlag/His Expressionsvektor (Micromet AG), so wurde dieser in den *E. coli* Stamm BL-21 (DE3) transformiert. Eine Einzelkolonie wurde zum Animpfen einer 50 ml Übernachtskultur (LB Medium, 50 µg/ml Carbenicillin, 37°C) verwendet. Diese wiederum diente zum Animpfen einer 1 l-Kultur, die bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 30°C über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in einem zehntel des Kulturvolumens in PBS resuspendiert. Periplasmatische Extrakte wurden nach der „Freeze & Thaw“ Methode hergestellt, indem die Suspension sechsmal in einem Ethanol-Trockeneisbad eingefroren und nachfolgend bei 37°C aufgetaut wurde. Abschließend wurde Zell-Debris bei 10000 x g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand der Proteinaufreinigung zugeführt.

Sollte die Expression mit Hilfe eines pBAD-pelB-Kan-Vektors (Modifikation des pBAD Vektors, zur periplasmatischen Expression in *E. coli*, Micromet AG), erfolgen, wurde dieser in den *E. coli* Stamm BL-21 AI transformiert. Die Proteinproduktion erfolgte nach dem oben beschriebenen Prinzip. Die Anzucht der Bakterienkultur erfolgte jedoch bei 30°C unter

Selektion mit 50 µg/ml Kanamycin und die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 0,8% (w/v) L-Arabinose (Sigma) induziert.

3.4.2.2 Metall-Affinitäts-Chromatographie

Die Aufreinigung von grösseren Mengen an 6xHis markierten scFv-Molekülen erfolgte über die Methode der Immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) an einem Äkta FPLC System (Pharmacia). Eine Qiagen Ni-NTA-Superflow Säule wurde mit Puffer A2 äquilibriert und 100 ml periplasmatischer Extrakt mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule geladen. Um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen, wurde die Säule nachfolgend mit fünffachem Säulenvolumen an 5% Puffer B2 gewaschen. Danach wurde gebundenes Protein mit Hilfe von fünf Säulenvolumen an 100% Puffer B2 von der Säule eluiert und in Fraktionen gesammelt. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt.

Puffer A2 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2)
400 mM NaCl

Puffer B2 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2)
400 mM NaCl
500 mM Imidazol

3.4.2.3 Gelfiltration

An die Metall-Affinitätschromatographie schloss sich als zweiter Aufreinigungsschritt eine Gelfiltration an. Hierbei wird ein Proteingemisch entsprechend seiner Größe aufgetrennt. Die Gelfiltration wurde mit einer HiLoadTM 16/60 Superdex 75 Prep Grade Säule (Pharmacia) durchgeführt, die zuvor mit PBS äquilibriert worden war. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Vor der Aufreinigung war die Säule mit Hilfe eines Molekulargewicht Marker Kits (Sigma) kalibriert worden. Gelfiltration von scFv-Antikörpern resultierte in einer deutlichen Auftrennung von Monomeren und assoziativen Dimeren.

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm und Multiplikation mit dem entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten. Mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot Analyse wurde die Reinheit von aufgereinigten Proteinproben untersucht.

3.4.3 Expression von ganzen Antikörpermolekülen in HEK 293-F Zellen

Die Expression von ganzen Antikörpern erfolgte transient in HEK 293-F Zellen (Invitrogen). Für die transiente Transfektion wurden Zellen abzentrifugiert (100 x g, 5 min, RT) und mit frischem Medium auf eine Dichte von 1×10^6 / ml eingestellt. Pro Transfektionsansatz wurden 180 ml benötigt.

Für die Expression des IgG 3077 wurden die Expressionsplasmide für die leichte (pEF-ADA 5-306) und die schwere Kette (pEF-DHFR 3077) des Antikörpers in einem Verhältnis von 70:30 kotransfiziert. Insgesamt wurden für einen 180 ml - Ansatz 180 µg DNA eingesetzt.

Die Expressionsplasmide pEF-ADA 5-306 und pEF-DHFR 3077 wurden in 6 ml OptiMEM (Invitrogen) gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 6 ml OptiMEM mit 240 µl 293fectin (Invitrogen) versetzt. Dieses Gemisch wurde nach 5 min Inkubation bei RT zu der in OptiMEM verdünnten DNA gegeben. DNA und 293fectin (Invitrogen) wurden für weitere 30 min bei RT inkubiert und anschließend zu HEK 293-F Zellsuspension pipettiert.

Zur Expression des IgG wurden die Zellen drei Tage bei 37°C, 8 % CO₂ und unter leichtem Schütteln (100 rpm) kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen durch Zentrifugation (400 x g, 10 min, 4°C) aus der Kultur entfernt und IgG aus dem Überstand mittels Affinitätschromatographie über eine Protein A Säule aufgereinigt.

3.5 PEGylierung von scFv-Molekülen

Für die PEGylierung wurde eine eigens klonierte Variante des zuvor über Phage-Display selektierten, humanen scFv 3077 verwendet: 3077_HisCys. Dieses Molekül trug am C-Terminus einen zusätzlichen Cysteinrest. Expression und Aufreinigung dieses Konstruktes erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben. Allerdings war ein zusätzlicher Reduktionsschritt notwendig, um das C-terminale Cystein zugänglich zu machen und C-terminal kovalent verbundene scFv-Dimere zu trennen. Daher wurde nach dem ersten affinitätschromatographischen Aufreinigungsschritt DTT in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Um den scFv in reduziertem Zustand zu halten, wurde auch die nachfolgende Gelfiltration in Anwesenheit von 2 mM DTT durchgeführt. Erst direkt vor Durchführung der PEGylierung

wurde das DTT über eine PD10-Entsalzungssäule (Amersham) entfernt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gepoolt und mit einem zehnfachen molaren Überschuss an PEG-Polymer mPEG2-Mal (40 kDa, verzweigt, gekoppelt an eine Maleimidgruppe, Nektar Therapeutics) versetzt. Die Konjugationsreaktion mit dem scFv erfolgte während einer Inkubationszeit von zwei Stunden im Dunkeln.

Um PEGylierten scFv von freien PEG- und unkonjugierten scFv-Molekülen zu trennen, wurde eine Kationen-Austausch-Chromatographie mit einer Resource S Säule (Amersham) durchgeführt. Das Säulenvolumen betrug 1 ml. Als Laufpuffer diente 20 mM Citrat, pH 4. Zur Elution wurde ein linearer Salzgradient (Elutionspuffer 1 M NaCl, 20 mM Citrat, pH 4) verwendet, wobei der PEGylierte scFv bei einer Konzentration von etwa 140 mM NaCl von der Säule eluierte. Proteinhaltige Fraktionen wurden gepoolt, gegen PBS dialysiert und mittels SDS-PAGE auf Reinheit und Effizienz der PEGylierung überprüft.

3.6 Charakterisierung von scFv- und vollständigen Antikörpermolekülen

3.6.1 Untersuchung der Bindungskinetik

Zur Bestimmung der Affinität wurden Oberflächenplasmonresonanz-Messungen (*surface plasmon resonance*, SPR) an einem BIAcore™ 2000 (Biacore) durchgeführt. Diese Methodik wird verwendet, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Makromolekülen qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Dabei wird dem an einem Sensorchip immobilisierten Analyten der zu testende Reaktionspartner (Ligand) mittels eines Fließinjektionssystems zugeführt. Der verwendete CM5-Sensorchip ist ein Glasträger beschichtet mit einem Goldfilm. Dieser Goldfilm trägt eine Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche, an die nach Aktivierung der Analyt immobilisiert werden kann. Bei nachfolgender Anlagerung eines Liganden werden die daraus resultierenden Veränderungen der optischen Eigenschaften der Chipoberfläche durch die Veränderungen des refraktiven Index gemessen. Dazu wird von einer optischen Einheit die Ablenkung von auf die Chipoberfläche gerichteten polarisierten Lichts detektiert.

Zur Affinitätsbestimmung von verschiedenen Antikörperfragmenten und IgG-Molekülen wurde hGM-CSF auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Die Chip-Oberfläche wurde durch Injektion von 80 µl 0,1 M Natrium-Hydroxysuccimid/ 0,4 M N-ethyl-N'(3-dimethylaminpropyl)-carbodiimid (NHS/EDC) aktiviert. Zur Koppelung wurde

das hGM-CSF-Antigen auf eine Endkonzentration von 10 µg/ml in 0,01 M Natriumacetat, pH 4,7 verdünnt und in die Flusszelle injiziert. Die aktivierte Chip-Oberfläche wurde nachfolgend durch Injektion von 85 µl 1 M Ethanolamin blockiert. Zur Äquilibration wurde der Chip über Nacht bei einer konstanten Flussrate von 5 µl/min HBS-EP (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % surfactant P20, Biacore) im Gerät belassen.

Gleichgewichtsbindung von Antikörperfragmenten und vollständigen Antikörpern wurde gemessen, indem 10 µl der Proteinlösung (Konzentrationen zwischen 100 µg/ml und 1 ng/ml) in Laufpuffer HBS-EP injiziert und die Dissoziation für 100 Sekunden bei 25°C beobachtet wurde. Die Flussgeschwindigkeit betrug 5 µl/min unter Verwendung von HBS-EP als Laufpuffer. Die unspezifische Hintergrundabsorption von Protein auf einer unmodifizierten Flusszelle ohne hGM-CSF wurde vom Antwortsignal auf der Flusszelle mit immobilisierten hGM-CSF abgezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der BIAevaluation Software.

3.6.2 Charakterisierung der hGM-CSF-neutralisierenden Eigenschaften

3.6.2.1 TF-1-Zellen

Die Charakterisierung der hGM-CSF-neutralisierenden Eigenschaften von scFv-Molekülen oder vollständigem Antikörper erfolgte mit Hilfe der Zelllinie TF-1, die in ihrem Überleben von hGM-CSF-abhängig ist (Kitamura et al., 1989). Die Zelllinie TF-1 wurde aus Knochenmark eines Erythroleukämie-Patienten etabliert. Sie wurde über die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen und entsprechend den Angaben der DSMZ bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamin, ohne Phenol-Rot, Gibco) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS in Anwesenheit von 2,5 ng/ml hGM-CSF kultiviert.

3.6.2.2 Konkurrenz der hGM-CSF Bindung an TF-1-Zellen mit Fluoreszin-markiertem hGM-CSF

Um die Inhibition der Bindung von hGM-CSF an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von TF-1-Zellen zu untersuchen, wurde ein durchflußzytometrischer Bindungstest durchgeführt.

Für den durchflusszytometrischen Nachweis von Rezeptor-gebundenem hGM-CSF, wurde dieses zuvor mit Fluoreszin markiert. Die Inhibition der Bindung von hGM-CSF an seinen Rezeptor durch scFv-Antikörper konnte so über eine Verringerung der hGM-CSF-FITC-vermittelten Färbung der Zellen nachgewiesen werden.

a) FITC-Markierung von hGM-CSF

hGM-CSF (*E. coli*-produziert) wurde mit Fluoreszin-NHS (Fluka) konjugiert. Die Durchführung erfolgte in Borat-Puffer (0.05 M Borsäure, 0.1 M NaCl, pH 8.5) mit 17,5% DMSO. Fluoreszin-NHS wurde in fünffachem Überschuss eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1 h bei RT und wurde zur Durchmischung der Proben auf einem Drehrad durchgeführt. Um das Fluoreszin-gekoppelte hGM-CSF von ungekoppeltem zu trennen, wurde nachfolgend eine Gelfiltration (Sephadex G25, Amersham Biosciences) durchgeführt, die in zwei, bei einer Wellenlänge von 485 nm (Referenzwellenlänge 535 nm) gemessenen Elutionspeaks resultierte. Der erste Peak repräsentierte das FITC-markierte hGM-CSF.

b) Durchflusszytometrischer Bindungs-Kompetitions Test

Mit diesem Test konnte überprüft werden, ob die verschiedenen Antikörperkonstrukte in der Lage waren, die Bindung von hGM-CSF an den GM-CSF-Rezeptor auf der Oberfläche von TF-1 zu inhibieren.

Etwa 20 Stunden vor Durchführung des Bindungs-Kompetitionstests wurden TF-1-Zellen in Kulturmedium ohne hGM-CSF überführt und weiter bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Dieses Hungern der Zellen führte zu einer erhöhten Dichte an GM-CSF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen. Die Zellen wurden nachfolgend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 300 x g, 4°C), auf eine Konzentration von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und je 100 µl/well in einer 96-well V-Boden Platte ausgebracht.

In einer separaten Platte wurden Antikörper in einer Endkonzentration von 10 µg/ml oder unverdünnter, scFv-haltiger periplasmatischer Extrakt für 1 h bei RT mit FITC-markiertem hGM-CSF (Endkonzentration 0,36 µg/ml) inkubiert. 100 µl dieses Gemischs wurden zu 100 µl Zellsuspension gegeben und vorsichtig vermischt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen (3 min, 500 x g, 4°C), in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch an einem FACS Calibur Gerät (Becton Dickinson) untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest.

3.6.2.3 TF-1-Proliferations-Inhibitionstest

Dieser Test diente der Quantifizierung des hGM-CSF-neutralisierenden Potentials der verschiedenen Antikörperkonstrukte.

TF-1-Zellen sind in ihrem Wachstum abhängig von hGM-CSF. Um die hGM-CSF-neutralisierende Wirkung von scFv-Antikörpern zu testen, wurden TF-1-Zellen über 72 h in Anwesenheit von hGM-CSF mit einer Verdünnungsreihe an scFv-Fragment inkubiert und nachfolgend die lebenden Zellen quantifiziert. Die Durchführung erfolgte stets in Duplikaten. Zunächst wurden Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in RPMI-Medium mit 10% FCS auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt und je 90 μ l Zellsuspension/well in einer 96-well Flachbodenplatte ausgesät.

a) Proliferationstest

Um die Abhängigkeit der TF-1-Proliferation von der Konzentration an hGM-CSF zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe von hGM-CSF in einer separaten Platte angesetzt (in RPMI-Medium mit 10% FCS ; Verdünnung in 1 : 3er Schritten). Je 10 μ l der Verdünnung wurden zu den TF-1-Zellen pipettiert (1 :10 Verdünnung). Die Endkonzentration an hGM-CSF betrug 100 ng/ml– 0,5 pg/ml.

b) Proliferations-Inhibitionstest

Zur Untersuchung der Neutralisierung von hGM-CSF wurde in einer separaten Platte eine Verdünnungsreihe der zu testenden scFv-Antikörper angesetzt. (in RPMI-Medium mit 10% FCS ; Verdünnung in 1 : 3er Schritten). Je 10 μ l der Verdünnung wurden zu den TF-1-Zellen pipettiert (1 :10 Verdünnung). Zur Stimulation der TF-1-Zellen wurde hGM-CSF in einer konstanten Endkonzentration von 0,3 ng/ml zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37°C (5% CO₂) wurde zur Quantifizierung der lebenden Zellen 10 μ l/well WST-1 Reagenz (Roche) zugegeben und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Die Tetrazoliumsalze des WST-1 werden durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen umgesetzt, wodurch ein gelber Farbstoff entsteht. Die Anzahl lebender Zellen pro well korreliert mit der Menge an gebildetem Farbstoff. Durch Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde der Farbstoff quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism-Software: es wurde eine nicht-lineare Regressionskurve ermittelt

anhand derer die halbmaximale Konzentration sowohl für die hGM-CSF-induzierte Proliferation als auch für die Neutralisierung der hGM-CSF-Wirkung durch scFv-Antikörper bestimmt werden konnte.

3.6.3 Denaturierung durch Guanidinium-Hydrochlorid (GdnHCl)

Es wurden Verdünnungen des scFv-Fragments 3077 mit finalen GdnHCl-Konzentrationen zwischen 0 und 5 M hergestellt. Die Konzentration des scFv-Fragments betrug dabei konstant 5 µg/ml. Die Verdünnungen wurden über Nacht bei 10°C äquilibriert und am darauf folgenden Tag im Fluoreszenzspektrometer untersucht. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 280 nm, das Emissionsspektrum wurde von 320 bis 370 nm aufgenommen. Jedes Spektrum wurde zweimal gemessen. Das Emissionsmaximum jedes Spektrums wurde bestimmt und gegen die GdnHCl-Konzentration aufgetragen. Diese Daten wurden mit Hilfe der Prism Software bezüglich des Anteils an nicht entfaltetem Protein normalisiert.

3.6.4 Vergleich der Serum-Stabilität

Das PEGylierte und das nicht-PEGylierte scFv-Fragment sowie der vollständige IgG-Antikörper wurden in PBS auf eine Konzentration von 60 µg/ml eingestellt und nachfolgend mit dem gleichen Volumen an humanem AB-Serum (Biotest) verdünnt. Diese Lösung wurde auf verschiedene Reaktionsgefäße verteilt und entweder sofort schockgefroren und bei -80°C gelagert oder zunächst für 1, 2, 4 oder 7 Tage bei 37°C inkubiert. Alle Proben wurden gleichzeitig wieder aufgetaut, um parallel in einem TF-1-Proliferations-Inhibitionstest auf ihre biologische Aktivität hin untersucht zu werden. Dieser wurde wie unter 3.6.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.6.5 Vergleich der Thermostabilität

Das PEGylierte und das nicht-PEGylierte scFv-Fragment sowie der vollständige IgG-Antikörper wurden in PBS auf eine Konzentration von 25 µg/ml eingestellt und die Lösung jeweils à 30 µl auf Reaktionsgefäße verteilt. Diese Proben wurden nun in einem Wasserbad für 5 min bei verschiedenen Temperaturen (40-100°C, in 5°C-Schritten) inkubiert. Das

Erreichen der Temperatur wurde durch Messung in einem Referenzgefäß bestätigt. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt. Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte anhand eines TF-1-Proliferations-Inhibitionstests. Dieser wurde wie unter 3.6.2.3 beschrieben durchgeführt. Die erhitzten Proben wurden dabei in einer finalen Konzentration von 2,5 µg/ml für die Neutralisation eingesetzt. Der Test erfolgte in Duplikaten. Als Kontrolle für die Inhibition der GM-CSF-abhängigen Proliferation wurde für jedes Molekülformat eine Probe mitgeführt, die nicht temperaturbehandelt worden war. Nach 72-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der proliferative Status der TF-1-Zellen durch Zugabe von WST-1 bestimmt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Diese Daten wurden normalisiert und mit der GraphPadPrism4 Software gefittet, wobei der maximale neutralisierende Effekt mit dem jeweiligen unbehandelten scFv bzw. IgG als 0% TF-1-Zellproliferation definiert wurde und der minimale neutralisierende Effekt des scFv-Fragments bzw. IgG-Moleküls, der mit bei 100°C inkubiert worden war, als 100% TF-1-Zellproliferation.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vorarbeiten

In Vorexperimenten zu dieser Arbeit war versucht worden, einen hGM-CSF-neutralisierenden scFv-Antikörper zu generieren. Als Ausgangsmaterial diente eine Ratten-Hybridomzelllinie, die einen Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften produziert. Dieser monoklonale Antikörper (mAK) bindet spezifisch an das humane GM-CSF-Molekül. Dadurch wird die Bindung von hGM-CSF an seinen Rezeptor verhindert und so die biologische Wirkung des Zytokins neutralisiert.

Um einen von diesem parentalen mAK abgeleiteten scFv-Antikörper zu generieren, wurden die variablen Regionen der schweren (VH) und leichten (VL) Kette des mAK aus cDNA-Präparationen von Hybridomzellen über PCR-Reaktionen amplifiziert, kloniert und sequenziert. Für die prokaryotische Expression des scFv-Fragments in *E. coli* wurden die variablen Regionen über eine $(G_4S)_3$ - Linkersequenz miteinander verbunden in verschiedene Expressionsvektoren kloniert (VH- $(G_4S)_3$ -VL). Das Molekül ließ sich jedoch weder periplasmatisch noch cytoplasmatisch in funktioneller Form in *E. coli* produzieren. Kleine Mengen an biologisch aktivem Material konnten jedoch durch aufwändige Rückfaltung von unlöslichem Protein aus cytoplasmatischen Einschlusskörperchen („*inclusion bodies*“) isoliert werden. Auf diese Weise gewonnener scFv-Antikörper war in der Lage, hGM-CSF zu binden und zu neutralisieren. Dieses Ergebnis bestätigte die korrekte Sequenz der klonierten variablen Regionen.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Modifikation dieses parentalen Moleküls einen prokaryotisch exprimierbaren, hGM-CSF-neutralisierenden scFv-Antikörper zu generieren.

4.2 Generierung eines prokaryotisch exprimierbaren scFv-Antikörpers durch Austausch der leichten Kette

ScFv-Antikörper, die von einem monoklonalen Hybridomantikörper abgeleitet wurden, lassen sich oftmals nur sehr ineffizient oder gar nicht prokaryotisch exprimieren (Rojas et al., 2004). Es war daher wünschenswert, eine einfach durchführbare und breit anwendbare Methode zu entwickeln, um die Expressionsprobleme in Prokaryoten zu lösen.

In der Literatur wird mehrfach berichtet, dass die variable Region der leichten Kette für die Spezifität eines Antikörpermoleküls nur eine untergeordnete Rolle spielt. So ist es z.B. möglich, durch Austausch der schweren Kette in Kombination mit ein und derselben leichten Kette Antikörper unterschiedlicher Antigenspezifität zu generieren (Sidhu et al., 2004). Ebenso konnten Antikörper der selben Spezifität generiert werden, bei denen eine schwere Kette mit verschiedenen leichten Ketten assoziiert war (Steinberger et al., 2000).

Der Einfluss der variablen Region der leichten Kette auf eine effektive Faltung und damit auch die Löslichkeit eines scFv-Fragments könnte dagegen erheblich sein. Dieser Hypothese folgend, sollte die ursprüngliche Ratten-VH-Kette mit einem Repertoire an verschiedenen VL-Ketten kombiniert und hGM-CSF-bindende VL-VH-Kombinationen mit Hilfe der Phage-Display-Technologie selektioniert werden. Die VH-Region des ursprünglichen Antikörpers wurde als sogenannte „Leitstruktur“ für die Antigenspezifität des Moleküls beibehalten („*guided selection*“, Jespers et al., 1994). Der Einsatz dieser Methodik mit der Zielsetzung, Expressionsprobleme von scFv-Antikörpern in Prokaryoten zu überwinden, war zu diesem Zeitpunkt ein neuartiger Ansatz.

4.2.1 Phage-Display-Selektion von hGM-CSF-spezifischen scFv-Antikörpern und Nachweis der Antigenbindung im ELISA

Für die Selektion eines prokaryotisch exprimierbaren, hGM-CSF-spezifischen Antikörperfragments wurde zunächst eine scFv-Bibliothek erstellt. In einem ersten Schritt wurde die variable Region der schweren Kette (VH) des parentalen mAK in den Phagemid-Vektor pComb5BHis subkloniert. Dies erfolgte nach PCR-Amplifikation eines entsprechenden cDNA-Fragmentes mit den Primern 5'-MVH8 und 3'-MuVHBstEII über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *BstEII*.

Um in einem Schritt mit der Verbesserung der Exprimierbarkeit gleichzeitig die potentielle Immunogenität des Moleküls zu reduzieren, wurde ein humanes IgD-leichte Ketten Repertoire für die Kombination mit der parentalen VH verwendet. Das humane IgD-Repertoire zeichnet sich dadurch aus, dass es keine oder nur wenige somatische Hypermutationen aufweist. Diese Nähe zu den Keimbahngenen lässt eine geringe Immunogenität beim späteren Einsatz im Patienten erwarten (Raum et al., 2001).

Für die Selektionsbibliothek wurde ein V-kappa-Pool gewählt, da die parentale VH-Region im ursprünglichen mAK mit einer VL-Kette vom kappa-Typ assoziiert vorlag. Es wurde daher angenommen, dass die Kombination mit einer V-kappa-Kette prinzipiell zu einem hGM-CSF bindenden Molekül führen kann.

Für die Herstellung der Selektionsbibliothek wurden die V-kappa-Fragmente aus humanen IgD-positiven B-Zellen präpariert. Dazu wurden PBMCs aus peripherem Blut von fünf gesunden Spendern über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und nachfolgend eine Positiv-Selektion von IgD-positiven Zellen mit Hilfe von Magnetbeads durchgeführt. Aus dieser Zellpopulation wurde die Gesamt-RNA präpariert und eine cDNA-Erststrangsynthese durchgeführt. Diese cDNA-Präparation diente als Matrize für die PCR-Amplifikation der humanen V-kappa-Fragmente. Dazu wurde ein Set aus fünf verschiedenen 5'-Primern mit vier 3'-Primern in Einzelreaktionen kombiniert. Mit Hilfe dieser Primer wurden auch die für die nachfolgende Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen eingeführt. Die Reaktionsbedingungen waren dabei wenig stringent gewählt, um eine möglichst umfassende Amplifikation aller vorhandenen Fragmente zu gewährleisten. Dafür wurde die Anreicherung unspezifischer Amplifikationsprodukte in Kauf genommen. Die PCR-Amplifikate wurden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3), die 350 bp großen Amplifikate der V-Regionen aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und wie unter 3.3.2.3 beschrieben „gepoolt“.

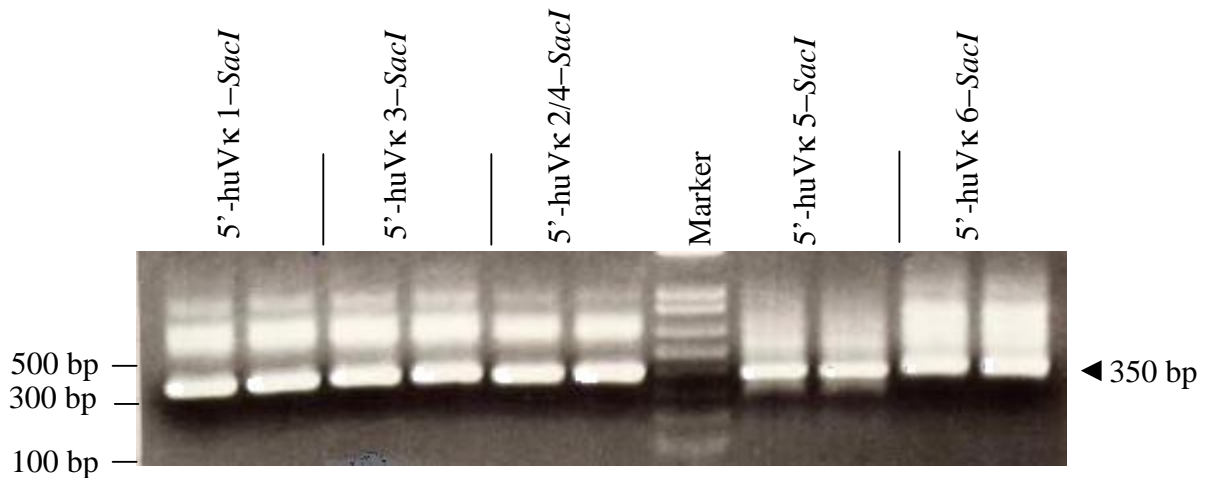


Abb. 3: Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Amplifikate der humanen V-kappa Subfamilien.

Es sind DNA-Fragmente gezeigt, die mit dem 3'-huVκJ1-*SpeI*-*BsiWI* Primer in Kombination mit den Subfamilien-spezifischen 5'-Primern (5'-huVκ1-*SacI*, 5'-huVκ3-*SacI*, 5'-huVκ2/4-*SacI*, 5'-huVκ5-*SacI*, 5'-huVκ6-*SacI*) ausgehend von cDNA aus der Fraktion IgD+ PBMCs eines gesunden Blutspenders amplifiziert wurden. Durch die PCR-Primer wurden dabei am 5'-Ende eine *SacI* und am 3'-Ende eine *SpeI*-Schnittstelle eingeführt. Um die gewünschten DNA-Banden einer Größe von ca. 350 bp zu isolieren und von unspezifischen, größeren PCR-Fragmenten zu trennen, wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Der Pool aus amplifizierten V-kappa Fragmenten wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *SpeI* geschnitten, in den Phagemid-Vektor pComb5BHis, der bereits die parentale VH-Region enthielt, ligiert und anschließend in *E. coli* XL1-blue elektroporiert. Die Effizienz dieser Elektroporation ist entscheidend für die Diversität der so generierten scFv-Bibliothek. Als Maß für die Diversität wurde die Zahl der unabhängigen Bakterienklone ermittelt, indem der Bakterienkultur nach der Elektroporation ein kleines Aliquot entnommen und auf Selektionsmedium ausplattiert wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Einzelkolonien ausgezählt und auf das Gesamt-Kulturvolumen umgerechnet. Die Zahl unabhängiger Klone dieser kombinatorischen Bibliothek aus parentaler VH-Kette und hu Vκ-Pool ließ sich so auf $2,8 \times 10^8$ bestimmen.

Nach Elektroporation in *E. coli* XI-1 blue wurde die Kultur mit dem Helferphagen VCSM13 infiziert, mit dessen Hilfe scFv-tragende Phagen von den *E. coli* Zellen produziert und ins Medium sezerniert wurden. Die scFv-Fragmente wurden dabei in Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII exprimiert. Nach einer Amplifikationsphase über Nacht wurden die

Phagen aus dem Kulturmedium gefällt, der Phagentiter (*input*) bestimmt und in die Selektion eingesetzt.

Für die Selektion wurde die Methode des „*in solution-panning*“ gewählt, bei der die scFv-tragenden Phagen mit löslichem Antigen inkubiert werden. Diese Methode bietet gegenüber Ansätzen, bei denen das Antigen an einer ELISA-Platte immobilisiert wird, den Vorteil, dass die Antigen-Konzentration genau eingestellt und gegebenenfalls von Selektionsrunde zu Selektionsrunde variiert werden kann.

Um das Antigen und daran gebundene Phagen später aus der Lösung isolieren zu können, wurde rekombinant in *E. coli* produziertes hGM-CSF vor der Selektion an Biotin gekoppelt. Während der Selektion wurden die scFv-tragenden Phagen mit diesem biotinylierten Antigen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Antigen, zusammen mit daran gebundenen Phagen, an Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen gebunden und im Komplex mit diesen über magnetische Separation wieder aus der Suspension isoliert. Um noch vorhandene, nicht gebundene Phagen zu entfernen, wurde mehrmals mit Puffer gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden anschließend durch pH-Erniedrigung (pH 2,2) eluiert und für die Infektion einer frischen, exponentiell wachsenden *E. coli*-Kultur verwendet. Um von einer quantitativen Infektion der Phagen ausgehen zu können, musste die Kultur einen deutlichen Überschuss an Bakterien enthalten. Durch Entnahme eines kleinen Aliquots nach der Reinfektion und dem Ausplattieren auf Selektionsmedium wurde die Anzahl infizierter Bakterienzellen als Maß des Phagentiters nach der Selektion (*output*) bestimmt – er entspricht damit der Gesamtzahl der in dieser Runde selektierten Phagen. Im Anschluss an die Reinfektion wurden die scFv-tragenden Phagen wiederum mit Hilfe von *VCSM13*-Helferphagen exprimiert und amplifiziert, dann geerntet, gefällt, mit Antigen inkubiert und wie oben beschrieben weiter verfahren. Durch diese Selektion wird in jeder Runde der Anteil an antigenbindenden Phagen erhöht und durch Aneinanderreihen mehrerer Selektionsrunden können stark bindende Klone schließlich signifikant angereichert werden. Abb. 4 zeigt die schematische Darstellung einer Selektionsrunde.

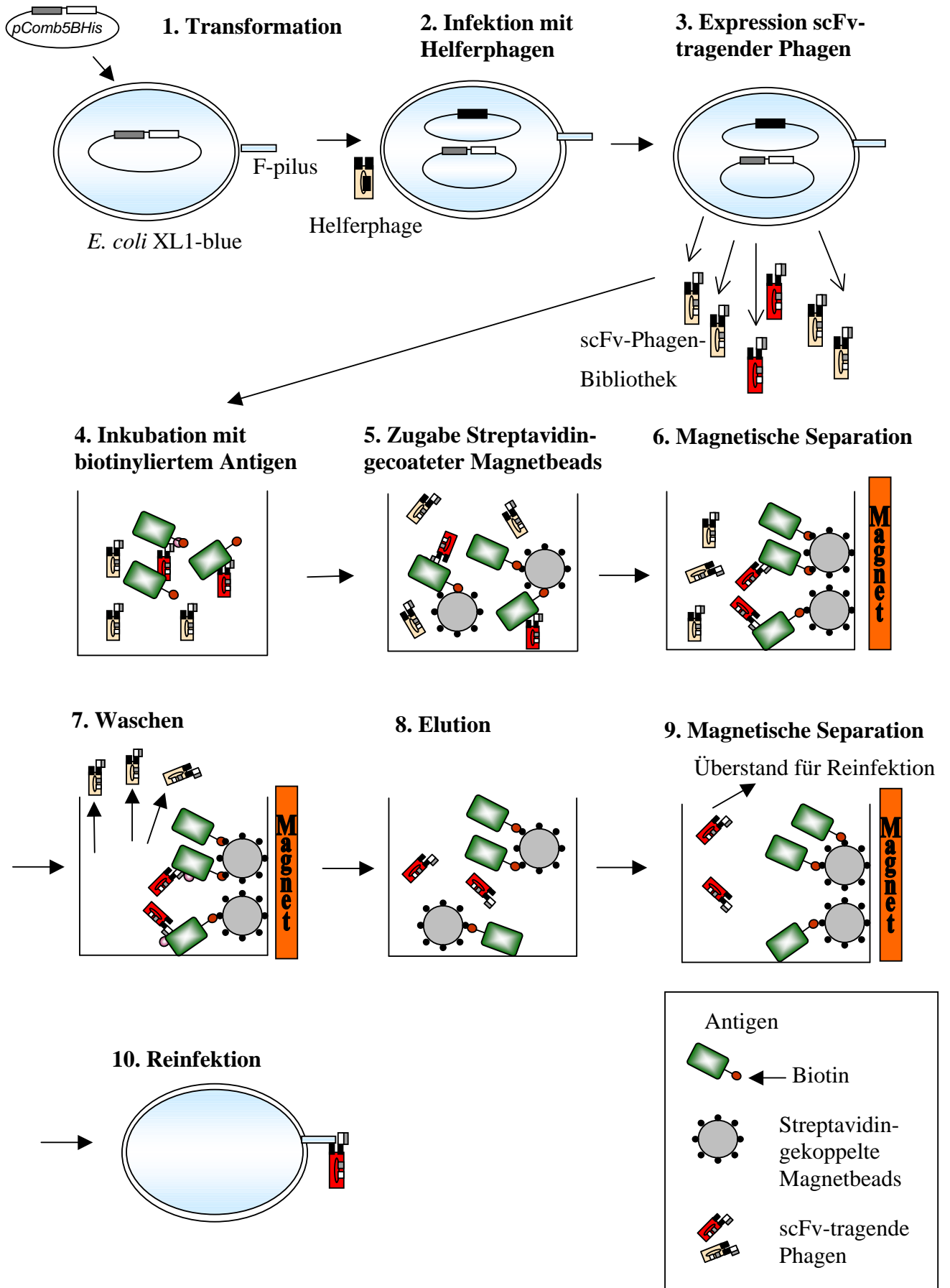


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Selektionsrunde

Zu Abb. 4 Schematische Darstellung einer Selektionsrunde

1. **Transformation** des Phage-Display Vektors pComb5BHis in *E. coli* XL1-blue
2. **Infektion** der Bakterienkultur mit dem Helferphagen *VCSM13*
3. **Expression** von Phagen, die scFv auf ihrer Oberfläche tragen. ScFv waren dabei an ein bis zwei von insgesamt fünf Molekülen des Phagen-Oberflächenproteins pIII gekoppelt. Die Phagen wurden in das Kulturmedium sezerniert.
4. **Inkubation mit biotinyliertem Antigen:** nach Fällung und Aufkonzentrierung wurden die Phagen mit biotinylierten Antigen inkubiert; antigenspezifische scFv-Phagen banden an das Antigen.
5. **Zugabe Streptavidin-beschichteter Magnetkügelchen:** nach Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeit wurden Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen zugegeben. Diese banden das an das Antigen-gekoppelte Biotin.
6. **Magnetische Separation:** durch Anlegen eines Magneten wurden die Magnetkügelchen im Komplex mit dem Antigen und daran gebundenen Phagen im Reaktionsgefäß festgehalten.
7. **Waschen:** Überstand mit nicht gebundenen Phagen wurde entfernt. Durch Zugabe von Waschpuffer und anschließende magnetische Separation wurden verbliebene, nicht gebundene Phagen entfernt. Dieser Waschschrift wurde mehrmals wiederholt.
8. **Elution:** Magnetkügelchen mit Antigen und spezifisch gebundenen scFv-Phagen wurden in Elutionspuffer (pH 2,2) resuspendiert. Diese pH-Erniedrigung löste die Bindungen zwischen Phagen und Antigen.
9. **Magnetische Separation:** durch Anlegen des Magneten wurden die Magnetkügelchen aus dem Eluat mit den Phagen entfernt.
10. **Reinfektion:** mit den im Eluat enthaltenen Phagen wurde - nach Neutralisierung des pH-Werts – eine frische *E. coli*-Kultur infiziert. Durch Zugabe von Helferphagen konnte eine neue Selektionsrunde gestartet werden.

Für die Isolierung einer humanen VL-Kette in Kombination mit der parentalen VH-Region wurde der Selektionszyklus insgesamt fünfmal wiederholt. Die Antigenkonzentration betrug in den ersten drei Runden je 100 nM. Sie wurde zur Erhöhung des Selektionsdruckes jedoch in der vierten Runde auf 10 nM, in der fünften auf 1 nM reduziert. Zusätzliche Stringenz wurde erreicht, indem die Anzahl der Waschschriffe von zwei in der ersten Selektionsrunde auf fünf in der zweiten und dritten Runde, sowie zehn in der vierten und fünften Runde erhöht wurde.

Als Indiz für die Anreicherung spezifisch bindender Phagenklone konnte ein Anstieg des Phagentiters nach Selektion (*output*) gewertet werden. Wie die Tab. 3 zeigt, stieg der Output-Titer in Relation zum Input-Titer trotz Reduktion der Antigenkonzentration und erhöhter Anzahl der Waschschriffe in der vierten Selektionsrunde deutlich an. Obwohl die Antigenkonzentration in der fünften Selektionsrunde weiter reduziert wurde, blieb das Verhältnis von Output- zu Input-Titer konstant.

Selektionsrunde	Antigenkonzentration	Waschschritte	Phagentiter [cfu]	
			eingesetzt <i>input</i>	selektiert <i>output</i>
1	100 nM	2	$3,0 \times 10^{11}$	$0,2 \times 10^8$
2	100 nM	5	$1,7 \times 10^{13}$	$0,5 \times 10^8$
3	100 nM	5	$1,0 \times 10^{13}$	$0,4 \times 10^8$
4	10 nM	10	$0,5 \times 10^{13}$	$1,6 \times 10^8$
5	1 nM	10	$0,8 \times 10^{13}$	$2,2 \times 10^8$

Tab. 3 : Selektionsbedingungen und Phagentiter für die Phage-Display-Selektion einer humanen leichten Kette

Es wurden insgesamt fünf Selektionsrunden mit abnehmender Antigenkonzentration und zunehmender Anzahl an Waschschritten durchgeführt.

Die Bestimmung des Input-Titers erfolgte durch Reinfektion einer frischen *E. coli*-Kultur mit einem verdünnten Aliquot der in die Selektion eingesetzten Phagen. Die infizierten Bakterien wurden auf Selektionsmedium ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden die Kolonien gezählt und die Ausgangsmenge an Phagen errechnet. Zur Bestimmung des Phagentiters nach der Selektion wurde der mit dem Eluat infizierten Bakterienkultur ein kleines Vergleichsvolumen entnommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Nach Übernachtkultur bei 37°C wurde aus der Zahl der gewachsenen Kolonien der Output-Titer errechnet.

Nach Abschluss der Selektion wurden die Plasmidpools der Phagen produzierenden *E. coli*-Kulturen aus der Amplifikationsphase der vierten und fünften Selektionsrunde isoliert. In diesem Pool aus pComb5BHis Plasmiden war die Gesamtheit der genetischen Information der bis zu diesem Zeitpunkt selektierten scFv-Antikörper enthalten.

Um einzelne, spezifisch bindende scFv-Antikörper zu identifizieren, wurden die kodierenden DNA-Fragmente für die scFv-Antikörper aus dem Plasmidpool über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *SpeI* ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pComb Flag/His einligiert. Dieser Vektor erlaubte die periplasmatische Expression der scFv-Antikörper ohne Koppelung an das Phagen-Gen III (siehe Abb. 5). Der scFv-Antikörper wurde dabei jedoch als Fusionsprotein mit den kurzen Peptidsequenzen „Flag“ und Hexa-Histidin exprimiert. Diese Markierungssequenzen sollten später den Nachweis und die Aufreinigung des Proteins ermöglichen. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* XL-1 blue wurden Einzelkolonien gepickt, die nun jeweils ein

bestimmtes scFv-Antikörper-kodierendes Plasmid trugen. Diese Einzelkolonien wurden in Flüssigkulturen angezogen. Nach Induktion der Proteinexpression und Übernachtskultur bei 30°C wurde eine Periplasmapräparation durchgeführt. Um Klone zu identifizieren, die einen löslichen, hGM-CSF-spezifischen scFv-Antikörper produzierten, wurden diese Periplasmapräparationen im ELISA auf Bindung an hGM-CSF getestet (siehe Abb. 6).

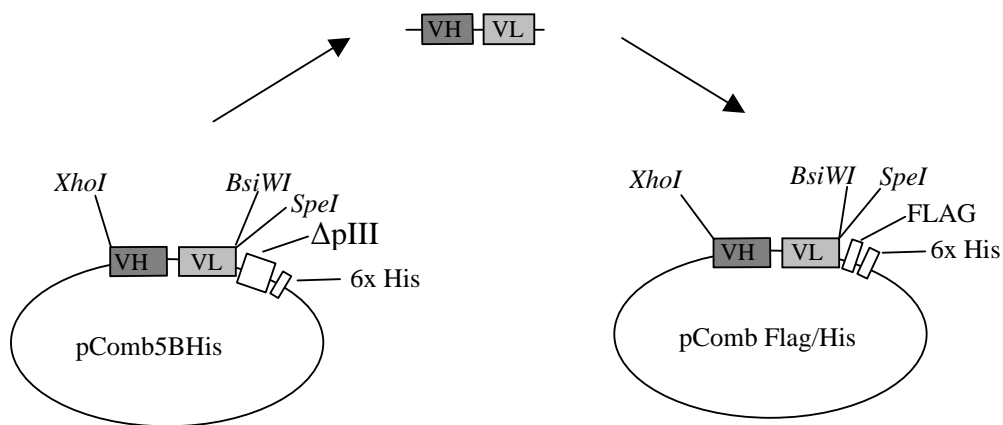


Abb. 5: Schematische Darstellung der Umklonierung von VH/VL-Fragmenten aus dem Phage-Display-Selektionsvektor in den Expressionsvektor pComb Flag/His

Es wurden jeweils zehn Einzelkolonien aus der vierten und fünften Selektionsrunde getestet. Insgesamt zeigten fünf Klone ein ELISA-Signal, das deutlich über der PBS-Negativkontrolle lag. Die gemessenen Absorptionswerte der drei aus der fünften Selektionsrunde stammenden Klone (5-301, 5-306, 5-310), sowie des Klons 4-306 aus der vierten Selektionsrunde lagen etwa zweifach über dem für Klon 4-301 gemessenen Wert.

Bei den ELISA-positiven Klonen wurde davon ausgegangen, dass durch die Kombination der selektierten humanen V-kappa leichten Kette des Einzelketten-Antikörpers mit der parentalen VH-Kette im Phage-Display ein löslich produzierbarer, hGM-CSF-spezifischer scFv-Antikörper generiert worden war.

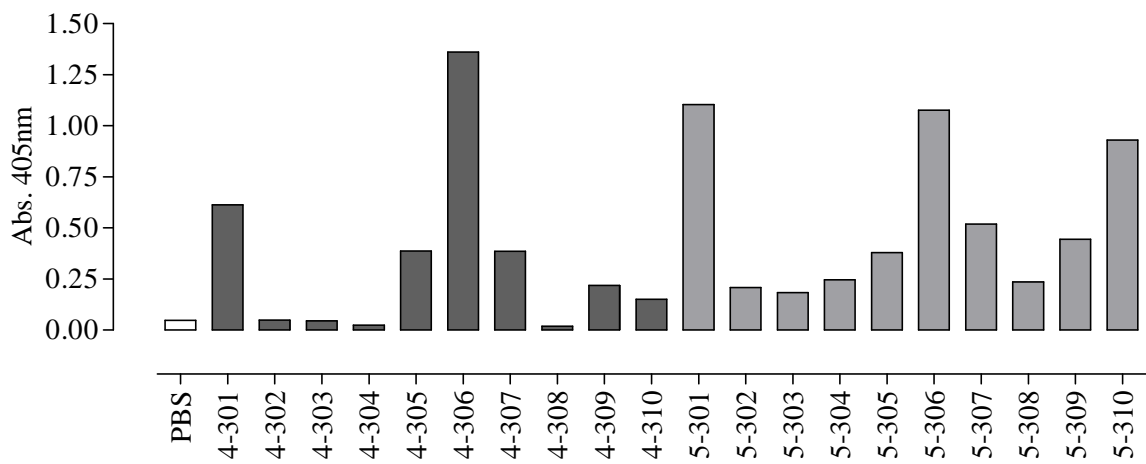


Abb. 6: Test von Periplasmapräparationen auf Antigenbindung mittels ELISA

Nach Phage-Display Selektion wurden ausgewählte scFv-Spezifitäten als lösliches Protein - zur Detektion C-terminal fusioniert mit einer Flag-His6-Sequenz - klonal im Periplasma von *E. coli* Xl-1blue exprimiert. Von je zehn Einzelkolonien nach der vierten (4-301 bis 4-310) und fünften (5-301 bis 5-310) Selektionsrunde wurden Periplasmapräparationen durchgeführt. Nicht-aufgereinigter, periplasmatischer Extrakt wurde im ELISA auf Bindung an hGM-CSF getestet. PBS diente als Negativkontrolle. Die Detektion gebundener scFv-Fragmente erfolgte über einen anti-Flag-Antikörper, gefolgt von einem POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper.

4.2.2 Charakterisierung der selektierten scFv-Antikörper

4.2.2.1 Sequenzanalyse

Zunächst wurde die DNA-Sequenz der fünf ELISA-positiven Klone bestimmt. Dabei konnten zwei verschiedene Sequenzen identifiziert werden. Die Sequenz der Klone 5-306, 4-306, 5-301 und 5-310 war identisch. Stellvertretend für diese Gruppe sequenz-identischer Klone wurde der Klon 5-306 weitergeführt. Lediglich der Klon 4-301 hatte eine davon abweichende Sequenz. Diese selektive Anreicherung des dominanten Klons 5-306 konnte als Zeichen für die überlegenen Eigenschaften dieses Klons gewertet werden, die sich gegenüber Klon 4-301 auch im deutlich stärkeren ELISA-Signal widerspiegeln. Dabei ist zu beachten, dass die Signalstärke im ELISA sowohl von der Affinität des Antiköpers als auch von seiner Konzentration im Periplasma abhängt. Klon 5-306 konnte also entweder bei gleicher

Produktivität aufgrund seiner überlegenen Affinität zum Antigen hGM-CSF oder bei gleicher Affinität wegen seiner verbesserten Produktivität oder aufgrund einer Kombination beider Eigenschaften selektiert worden sein.

Beide DNA-Sequenzen der VL-Domänen von 4-301 und 5-306 wurden in ihre entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Anschließend wurden sie einem Vergleich mit den in der V-Base-Datenbank erfassten humanen Keimbahn-Sequenzen unterzogen, um ihre V κ -Familie und das am nächsten verwandte Keimbahnsegment zu bestimmen (siehe Abb. 7). Interessanterweise konnten beide selektierten VL-Ketten der Kappa-Subfamilie 1, genauer, dem Gensegment V κ 1-O12 zugeordnet werden. Das den Frameworkbereich 4 bestimmende J-kappa Fragment war in Klon 4-301 vom Keimbahnsegment J κ 1, in Klon 5-306 von J κ 4, abgeleitet.

Die Aminosäuresequenz von VL 5-306 weicht in den Framework-Regionen an acht Positionen von der Keimbahnsequenz ab, im Bereich der CDR-Regionen an sieben Positionen (86% Identität). Die Aminosäuresequenz von 4-301 weist an fünf Positionen des Frameworks und fünf Positionen in den CDR-Regionen Abweichungen von der Keimbahnsequenz auf (91% Identität). Das Aminosäure-Motiv EL am Beginn der Framework-Region 1 wurde durch die Primer bei der Amplifikation der VL-Regionen für die Konstruktion der Selektions-Bibliothek eingeführt.

Es wurde auch ein Vergleich mit der Aminosäuresequenz der parentalen VL-Region angestellt. Die mit dieser Sequenz am nächsten verwandte humane Keimbahnsequenz ist das huV κ 6-A10 Fragment. Die Identität der parentalen VL-Kette zu den neu selektierten humanen VL-Regionen 5-306 und 4-301 betrug nur 60%.

Dennoch dürften die selektierten Sequenzen in ihrer dreidimensionalen Anordnung derselben sogenannten kanonischen Struktur entsprechen wie die parentale VL-Domäne. Für die humanen V-kappa Fragmente wird eine große Variabilität in der Länge der CDR1 Regionen zwischen den verschiedenen Familien und Subfamilien beschrieben. In beiden selektierten Sequenzen ist der CDR1 wie auch in der parentalen VL-Sequenz elf Aminosäuren lang und bildet damit nach Al-Lazikani et al. (1997) die kanonische Struktur 2 aus. Diese Struktur kann, je nach Besetzung der Aminosäureposition 71 (Nummerierung nach Kabat et al., 1991) in zwei Subtypen auftreten. Aufgrund eines Phenylalanins in Position 71 handelt es sich bei 5-306, 4-301 und der parentalen VL-Domäne um den Typ A.

Abb. 7: Sequenzvergleich (siehe folgende Seite)

Vergleich der Aminosäuresequenz der selektierten Klone 5-306 und 4-301 mit der am nächsten verwandten humanen Keimbahn-Sequenz V κ 1-O12/J κ 4 bzw. V κ 1-O12/J κ 1 und mit der VL-Sequenz des parentalen Antikörpers. Übereinstimmende Aminosäurepositionen sind durch einen Bindestrich gekennzeichnet. Die Einteilung von Framework- und CDR-Regionen erfolgte nach Kabat et al., 1991.

	Framework 1		CDR1	Framework 2		CDR2	Framework 3			CDR3	Framework 4
	<hr/>			<hr/>			<hr/>				<hr/>
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	<hr/>			<hr/>			<hr/>				<hr/>
	12345678901234567890123		45678901234	567890123456789	0123456	789012345678901234567890123456789012345678			901234567	8901234567	
5-306	ELVMTQSPSSVSASVGRVTIAC		RASQNIRNILN	WYQRPKAPQLLIY	AASNLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYC	QQSYMPRT			FGGKTKVEIK	
Keimbahn											
Vk1-O12/Jk4	DIQ-----L-----T-		---S-SSY--	---K----K----	---S---	-----S-----			-----T-L-	-----	
parentale VL	DI-L---ATL-VTPGES-S-S-		---GISTSIH	---KSNE-S-R---K	F--QSI-	-I-----S--RVES---SV---			-----L--	V-A---L---	

	Framework 1		CDR1	Framework 2		CDR2	Framework 3			CDR3	Framework 4
	<hr/>			<hr/>			<hr/>				<hr/>
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	<hr/>			<hr/>			<hr/>				<hr/>
	12345678901234567890123		45678901234	567890123456789	0123456	789012345678901234567890123456789012345678			901234567	8901234567	
4-301	ELVMTQSPSSLSASEGDRVTITC		RASQSISRSLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQR	GVPSRFSASGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYGTPVT			FGQKTKVEIK	
Keimbahn											
Vk1-O12/Jk1	DIQ-----V-----		-----SY--	-----	-----S	-----G-----			-----S--W-	-----	
parentale VL	DI-L---AT--VTPGES-S-S-		---GI-T-IH	---SNES-R---K	F--QSI-	-I-----G-----S-NRVES---SV---			-----SL--	V-A---L---	

Abb. 7 Sequenzvergleich (Beschreibung siehe vorherige Seite)

4.2.2.2 Bestimmung des Neutralisierungspotentials

Neben dem Nachweis der Bindungsspezifität im ELISA sollten die selektierten halb-humanen scFv-Antikörper 4-301 und 5-306 auf ihre hGM-CSF-neutralisierenden Eigenschaften hin überprüft werden.

4.2.2.2.1 Inhibition der Rezeptor-Bindung von hGM-CSF

Als Test für die Neutralisierungsfähigkeit wurde die Kompetition der selektierten scFv-Antikörper mit dem hGM-CSF-Rezeptor um Bindung des Zytokins anhand eines durchflusszytometrischen Tests untersucht.

Mittels FITC-konjugiertem hGM-CSF (hGM-CSF-FITC) ließ sich die Bindung des Zytokins an den auf der Zelloberfläche exprimierten humanen GM-CSF-Rezeptor im FACS anhand der Fluoreszenz-Färbung der Zellen verfolgen (Abb. 8). Für den Test wurde die hGM-CSF-abhängige, aus humanen Knochenmarkszellen etablierte Zelllinie TF-1 verwendet.

Bei Vorinkubation von 0,36 µg/ml hGM-CSF-FITC mit 10 µg/ml parentalem mAK war die Fluoreszenzfärbung der TF-1-Zellen vollständig zu inhibieren.

Zur Untersuchung der kompetitiven Bindung der scFv-Antikörper an hGM-CSF-FITC wurden diese nach periplasmatischem Aufschluss über die Freeze & Thaw-Methode in einem Ein-Schritt-Verfahren über Ni-NTA-Zentrifugiersäulchen aufgereinigt und ebenfalls mit hGM-CSF-FITC vorinkubiert; dieses Gemisch wurde nachfolgend zur Färbung der TF-1-Zellen eingesetzt. Es zeigte sich, dass der scFv-Antikörper 5-306 die Bindung des hGM-CSF-FITC an seinen Rezeptor blockiert, während der kompetitive Effekt des scFv-Antikörper 4-301 minimal ist.

Bereits die vorangegangenen Untersuchungen hatten nahegelegt, dass es sich bei dem Klon 5-306 um den für eine Weiterentwicklung interessanteren Kandidaten handelte: dieser Klon hatte sich in der fünften Phage-Display-Selektionsrunde dominant durchgesetzt und zeigte im ELISA ein deutlich stärkeres Bindungssignal. Da nun auch seine Fähigkeit zur Neutralisierung von hGM-CSF gezeigt werden konnte, während 4-301 die Bindung von hGM-CSF an seinen Rezeptor nur minimal inhibiert, wurde von nun an nur der Klon 5-306 weiter untersucht.

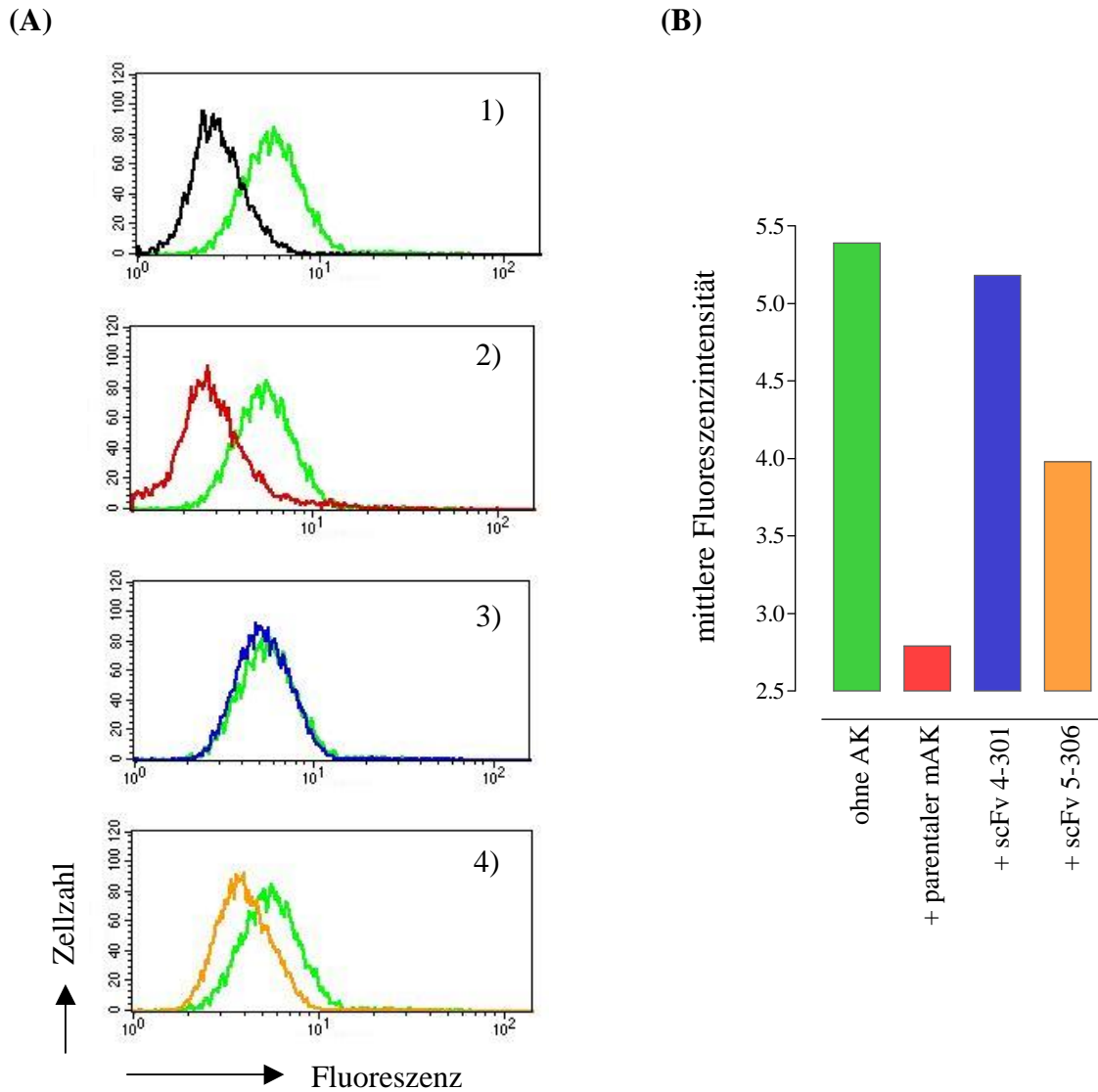


Abb. 8: Inhibition der Bindung von hGM-CSF-FITC an TF-1-Zellen durch den scFv-Antikörper 5-306

(A) Die Bindung von hGM-CSF an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von TF-1-Zellen kann durch Markierung des Zytokins mit FITC-Farbstoff im FACS nachgewiesen werden. In den Abbildungen A.1)-A.4) ist das Fluoreszenz-Signal von TF-1-Zellen, die in Abwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers mit 0,36 µg/ml hGMCSF-FITC inkubiert wurden, grün dargestellt. A.1) zeigt im Vergleich dazu ungefärbte TF-1-Zellen (schwarz). Durch Vorinkubation des hGM-CSF-FITC mit dem parentalen mAK (rot) wird dessen Bindung an TF-1-Zellen inhibiert, was sich anhand der verringerten Fluoreszenzintensität der TF-1-Zellen gegenüber der Kontrollfärbung mit hGM-CSF-FITC alleine verfolgen lässt (A.2). hGM-CSF-FITC wurde auch mit den scFv-Fragmenten, die zuvor aus periplasmatischem Extrakt über Ni-NTA-Zentrifugiersäulchen aufgereinigt worden waren, vorinkubiert. In A.3) ist das Fluoreszenzsignal nach Vorinkubation mit 4-301 (blau), in A.4) nach Vorinkubation mit 5-306 (orange) dargestellt.

(B) Die mittlere Fluoreszenzintensität der FACS-Messungen aus A1) – 4) wurde in einem Balken-Diagramm dargestellt. Neutralisation der hGM-CSF Bindung ist an einer Reduktion der Signalstärke ersichtlic.

4.2.2.2.2 Quantitative Analyse der Neutralisierung von hGM-CSF

Die Fähigkeit des scFv-Antikörpers 5-306, die biologische Funktion von hGM-CSF zu unterbinden, sollte in einem weiteren Test bestätigt und nun auch quantifiziert werden.

Der scFv 5-306 wurde zu diesem Zweck in einem Proliferations-Inhibitionstest mit TF-1-Zellen untersucht. Die Zelllinie TF-1 ist in ihrem Überleben abhängig von hGM-CSF. Um zu testen, ob scFv 5-306 die GM-CSF-induzierte Proliferation inhibiert, wurden größere Mengen an aufgereinigtem Protein benötigt. Daher wurde der scFv 5-306 in 500 ml Kulturvolumen in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Nach periplasmatischem Aufschluss über die Freeze & Thaw-Methode wurde das Protein in zwei Schritten über eine Metall-Affinitäts-Chromatographie (Ni-NTA-Superflow) und anschließende Gelfiltration aufgereinigt. Durch die Gelfiltration konnten die beiden auftretenden Konformationen Monomer und Dimer klar voneinander getrennt werden. Die Reinheit der Proteinpräparationen wurde mit SDS-PAGE und Western-Blot überprüft. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der OD₂₈₀ und Multiplikation mit dem spezifischen molekularen Extinktionskoeffizienten errechnet.

Für den Proliferations-Inhibitionstest wurden TF-1-Zellen mit 0,3 ng/ml hGM-CSF stimuliert. Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass TF-1-Zellen bei dieser hGM-CSF Konzentration zu etwa 75% der maximalen Proliferation angeregt werden. ScFv 5-306 wurde in monomerer wie dimerer Konformation jeweils in einer Verdünnungsreihe ausgehend von ca. 40 nM bis zu 0,4 nM zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde der Anteil stoffwechselaktiver Zellen durch Zugabe von WST-1 Reagenz und Messung der Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader quantifiziert.

In Abb. 9 ist die gemessene Absorption gegen die eingesetzte Konzentration an scFv 5-306 aufgetragen. Es zeigte sich ganz eindeutig eine reziproke Abhängigkeit der Anzahl lebender Zellen von der eingesetzten Konzentration an scFv-Antikörper. Bei geringer scFv-Konzentration konnten die Zellen GM-CSF-abhängig proliferieren. Die erhöhte Zellzahl resultierte nach Zugabe von WST-1 in einer erhöhten Umsetzung des Farbstoffs, was sich in einem hohen Absorptionswert bei 450 nm widerspiegelte. Je höher die Konzentration an eingesetztem scFv-Antikörper, umso geringere Absorptionswerte wurden gemessen. Bei Zugabe hoher scFv-Konzentrationen wurde die Proliferation sogar vollständig verhindert.

Zur Quantifizierung der Neutralisationseffizienz wurde anhand der nicht-linearen Regressionskurve auch die halbmaximale-Inhibition der Proliferation (IC₅₀) bestimmt. Der für scFv 5-306 ermittelte IC₅₀-Wert lag bei einer Konzentration von 7,3 nM für die monomere Konformation und bei einer Konzentration von 3,5 nM für die dimere

Konformation. Daraus konnte auf eine etwa gleiche Wirksamkeit von Monomer- und Dimer-Konformation geschlossen werden.

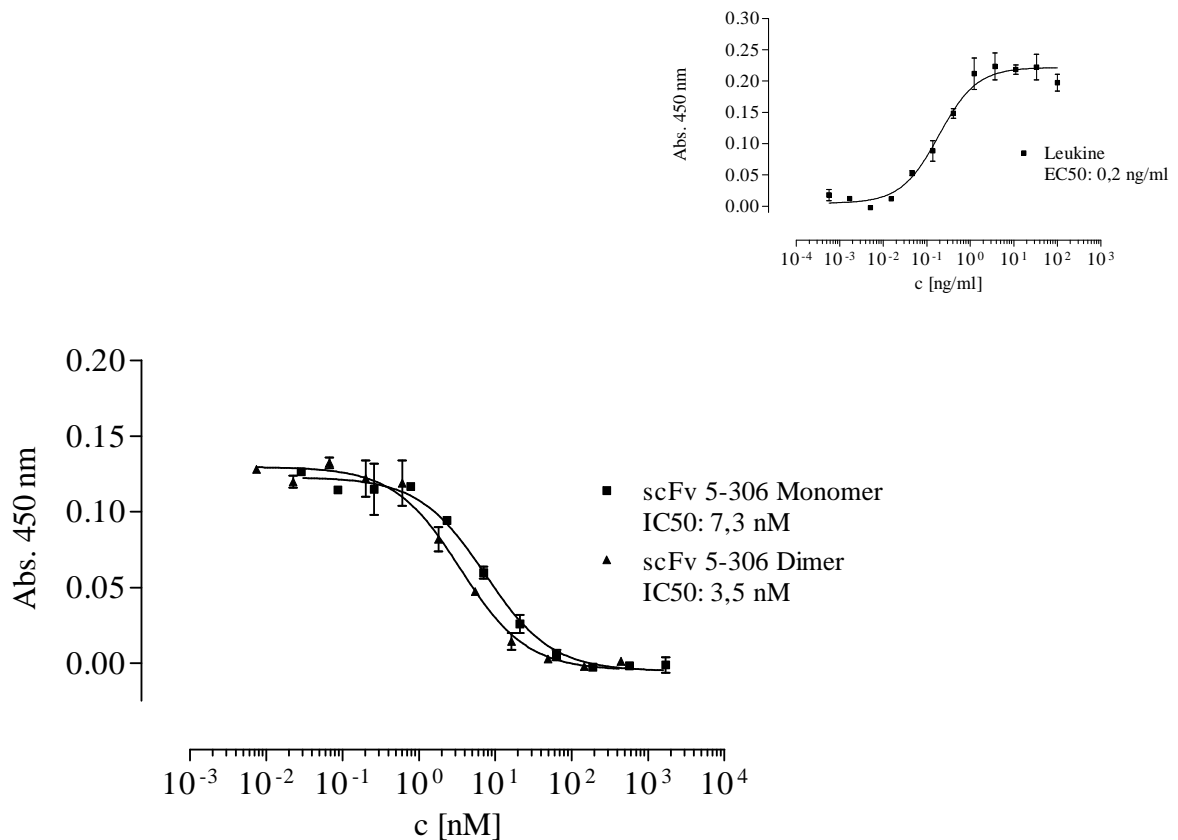


Abb. 9: Konzentrationsabhängige Inhibition der hGM-CSF-abhängigen Proliferation von TF-1-Zellen

hGM-CSF-abhängig wachsende TF-1-Zellen wurden für 72 h in Anwesenheit von 0,3 ng/ml hGM-CSF mit verschiedenen Konzentrationen des neutralisierenden scFv-Antikörpers 5-306 inkubiert.

Parallel dazu wurden TF-1-Zellen als Kontrolle für die Proliferation und zur Bestimmung der halbmaximalen Effektorkonzentration von hGM-CSF mit einer Verdünnungsreihe hGM-CSF (100 ng/ml – 0,5 pg/ml) inkubiert.

Die Proliferation der Zellen wurde im Anschluss indirekt durch Zugabe von WST-1 gemessen. Die Tetrazoliumsalze des WST-1 Reagenz werden durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen umgesetzt, wodurch ein gelber Farbstoff entsteht. Der gemessene Absorptionswert bei 450 nm korreliert so mit der Anzahl lebender Zellen.

Die bei 450 nm gemessene Absorption wurde gegen die Konzentration an scFv-Antikörper (bzw. hGM-CSF) aufgetragen. Mit Hilfe der Prism-Software wurde eine nicht-lineare Regressionskurve angepasst und anhand dieser die halbmaximale Inhibition der Proliferation (IC50) bestimmt.

4.2.2.3 Vergleich der periplasmatischen Expression des parentalen scFv-Antikörpers und seiner halb-humanen Variante 5-306

Durch Kombination der schweren Kette aus dem parentalen, nicht löslich produzierbaren scFv-Fragment mit einer humanen leichten Kette wurde ein scFv-Antikörper selektiert, der in *E. coli* löslich produzierbar ist und der gleichzeitig die Spezifität und hGM-CSF-neutralisierende Eigenschaft des parentalen mAK aufrecht erhält.

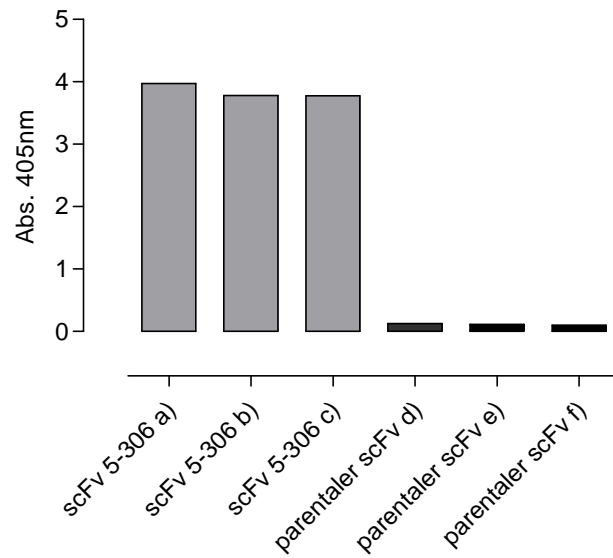
Hier soll noch einmal der parentale scFv-Antikörper und seine Phage-Display selektierte halb-humane Variante 5-306 in ihrer Exprimierbarkeit in Prokaryoten einander gegenübergestellt werden. Beide Varianten wurden im pComb5BHis-Vektor zunächst in *E. coli* TG1 transformiert. Es wurden jeweils drei Einzelkolonien gepickt und in Kulturmedium angezogen. Nach Induktion der Proteinproduktion über Nacht wurde das Periplasma aufgeschlossen. Der Extrakt wurde ohne weitere Aufreinigung im ELISA auf hGM-CSF-Bindung getestet. Für die drei Transformanten der scFv 5-306 Variante konnte ein starkes Bindungssignal nachgewiesen werden, während periplasmatischer Extrakt der drei Transformanten des parentalen scFv-Antikörpers keinerlei Signal zeigte (Abb. 10 A).

Um die These zu überprüfen, dass das negative Bindungssignal für den parentalen scFv tatsächlich auf das Fehlen der periplasmatischen Expression zurückzuführen war, wurde der periplasmatische Extrakt auch mittels Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte über einen anti-His Antikörper.

In diesem Experiment war tatsächlich nur die Variante 5-306 anhand einer deutlichen Bande bei der erwarteten Laufhöhe entsprechend einer Größe von ca. 30 kDa nachweisbar (Abb. 10 B). Durch parallel durchgeführte Silberfärbung konnte jedoch gezeigt werden, dass vergleichbare Proteinnengen aufgetragen worden waren. Das negative Ergebnis des parentalen scFv-Antikörpers im Antigenbindungs-ELISA war damit auf fehlendes Protein im periplasmatischen Extrakt zurück zu führen.

Dieses Ergebnis verdeutlicht noch einmal, dass der Austausch der VL-Kette unter Beibehaltung der VH-Kette dazu geeignet ist, aus scFv-Molekülen, die zunächst nicht funktionell in Prokaryoten exprimierbar sind, funktionell vergleichbare und aktiv produzierbare Antikörperfragmente der gleichen Spezifität zu generieren.

(A)



(B)

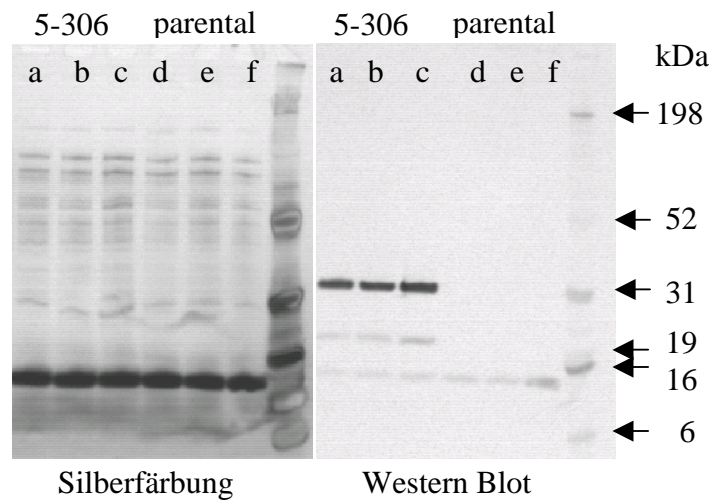


Abb. 10: Vergleich der Expression des parentalen scFv-Antikörper und der Variante 5-306

Plasmid-DNA von beiden Konstrukten wurde in *E. coli* transformiert. Es wurden jeweils drei Einzelkolonien gepickt, in LB-Medium angezogen und über Nacht mit 1 mM IPTG bei 30°C induziert. Am folgenden Tag wurden Periplasmapräparationen durchgeführt und auf Antigenbindung im ELISA getestet (A). Die Detektion erfolgte mit einem anti-His-Antikörper gefolgt von einem POD-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper. Die Periplasmapräparationen wurden auch parallel auf zwei SDS-Gelen aufgetrennt (B). Mittels Silberfärbung des ersten Gels wurde sichergestellt, dass vergleichbare Proteinmengen pro Gelspur geladen wurden. Zum Nachweis von scFv erfolgte die Übertragung der Proteine des zweiten Gels auf eine Nitrozellulosemembran und eine Analyse im Western-Blot. Die Detektion erfolgte mit einem anti-His-Antikörper gefolgt von einem AP-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper.

Bei der prominenten Bande bei ca. 15 kDa handelte es sich vermutlich um Lysozym, das zum periplasmatischen Aufschluss verwendet wurde.

4.3 Isolierung einer humanen VH-Kette unter Beibehaltung der CDR3-Region des Ursprungs-Antikörpers

Um einen vollständig humanen scFv-Antikörper zu erhalten, sollte nun die humane VL-Kette 5-306 mit einem Repertoire humaner VH-Ketten kombiniert und mittels Phage-Display auf GM-CSF-Bindung selektiert werden. Während bei der Selektion der VL-Kette die Schwierigkeit v.a. darin bestand, eine löslich exprimierbare VH-VL-Kombination zu selektieren, lag die Schwierigkeit hier nun in der dominanten Rolle, die der variablen Region der schweren Kette bei der Antigenerkennung zukommt.

Die variable Region der schweren Kette ist gegenüber der variablen Region der leichten Kette deutlich stärker an der Bindung des Antigens beteiligt (Kabat und Wu, 1991). Es war daher anzunehmen, dass die Frequenz möglicher Antigen-bindender, hGM-CSF-neutralisierender Kombinationen aus der VL-Kette 5-306 und einer vollständig humanen VH-Region sehr niedrig sein würde.

Innerhalb der VH-Kette kommt dem hochvariablen CDR3-Bereich (VH CDR3) besondere Bedeutung für die exakte Bindung an ein bestimmtes Epitop zu. So wurde beschrieben, dass Variationen im CDR3-Bereich der VH-Kette alleine ausreichen, um die Spezifität eines Antikörpers zu verändern, auch wenn das Framework und alle übrigen CDR-Bereiche konstant bleiben (Xu und Davis, 2000). Umgekehrt ist mehrfach beschrieben, dass in Phage-Display-Selektionen trotz Veränderung der Framework-Bereiche Binder mit exakt erhaltener Epitop-Spezifität selektiert werden konnten, wenn in der Selektionsbibliothek ein oder mehrere CDR-Bereiche aufrechterhalten wurden (Klimka et al., 2000; Rader et al., 1998).

Aus diesem Grund sollte der CDR3-Bereich der parentalen VH-Region in eine humane VH-Bibliothek integriert werden, um bei der Selektion einer humanen VH-Kette in Kombination mit der vorselektierten humanen VL 5-306 die Epitop-Spezifität aufrechtzuerhalten. Dazu wurde der strom-aufwärts vom CDR3-Bereich gelegene Anteil des scFv-Antikörpers (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3) mit einem Repertoire humaner VH-Gensegmente besetzt.

Da sich die CDR3-Region der VH-Kette durch extreme Diversität auszeichnet und nicht Keimbahn-kodiert ist, sondern durch verschiedene rekombinatorische Ereignisse beim Rearrangement der verschiedenen V-, D- und J-Fragmente während der B-Zellreifung entsteht (Sanz, 1991), gibt es keine Sequenzen, die eindeutig einer Spezies zuzuordnen sind. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die Immunogenität eines humanen scFv-

Antikörpers mit dem parentalen, aus der Ratten VH-Region stammenden CDR3-Bereich nicht höher einzustufen ist als die eines Moleküls aus einer vollständig humanen VH-Bibliothek.

4.3.1 Klonierung der humanen VH-Bibliothek mit parentaler VH CDR-Region

Die Klonierung der scFv-Bibliothek erfolgte in zwei Schritten: zunächst wurde die humane VL 5-306 in den Phagemid-Vektor pComb5BHis subkloniert. Im Anschluss wurden die mit der parentalen VH CDR3-Region fusionierten humanen VH-Fragmente dazu kloniert. Diese VH-Fragmente waren zuvor folgendermaßen hergestellt worden:

Als Matrize für die Einführung des parentalen VH CDR3-Bereichs sollten VH-Fragmente dienen, die aus humanen PBMCs mittels PCR amplifiziert worden waren. Bei der Amplifikation der VH-Fragmente wurde der unterschiedlichen Verteilung der Gensegmente unter den humanen VH-Subfamilien Rechnung getragen. Von 51 funktionellen humanen VH-Keimbahnsegmenten gehören je 11 Gene zur VH1- bzw. VH4-Familie. Mit 22 Segmenten stellt die VH3-Familie 43% der humanen Keimbahn-VH-Sequenzen. Dagegen sind die weiteren Familien VH2 (3 Gene), VH5 (2 Gene), VH6 und VH7 (je 1 Gen) deutlich weniger stark repräsentiert (V-Base-Datenbank). Für die Erstellung der scFv-Bibliothek wurden lediglich VH-Fragmente der Familien 1, 3 und 4 verwendet und die kleineren VH-Familien vernachlässigt.

Aus PBMCs von fünf gesunden Blutspendern wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Amplifikationen wurden für jeden Blutspender separat durchgeführt (Abb. 11) und anschließend „gepoolt“.

In den so amplifizierten Fragmenten wurde ihr jeweils eigener CDR3-Bereich durch den CDR3-Bereich der parentalen VH-Region ersetzt. Abb. 12 B zeigt schematisch die zweistufige Klonierungsstrategie. Mit Hilfe entsprechend konstruierter Primer (Abb. 12 A) wurde ein Zwischenprodukt bestehend aus humanen FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-Fragmenten und dem parentalen VH CDR3-Bereich amplifiziert. Um ein komplettes VH-Fragment zu erhalten, wurde das Zwischenprodukt in einer nachfolgenden PCR-Reaktion mit Hilfe eines weiteren Primers um das noch fehlende FR4-Fragment ergänzt. Mit diesem Primer wurde zugleich die für die Klonierung in den Phagemid-Vektor notwendige *BstEII*-Schnittstelle eingeführt. Für das FR4-Fragment wurde die humane, keimbahnkodierte JH3 Sequenz gewählt, weil diese mit nur einem Aminosäureaustausch dem FR4-Fragment der parentalen VH-Region am ähnlichsten ist. Das so modifizierte VH-Repertoire wurde über die eingeführten Schnittstellen (*XhoI*, *BstEII*) in den Vektor pComb5BHis_VL5-306 kloniert.

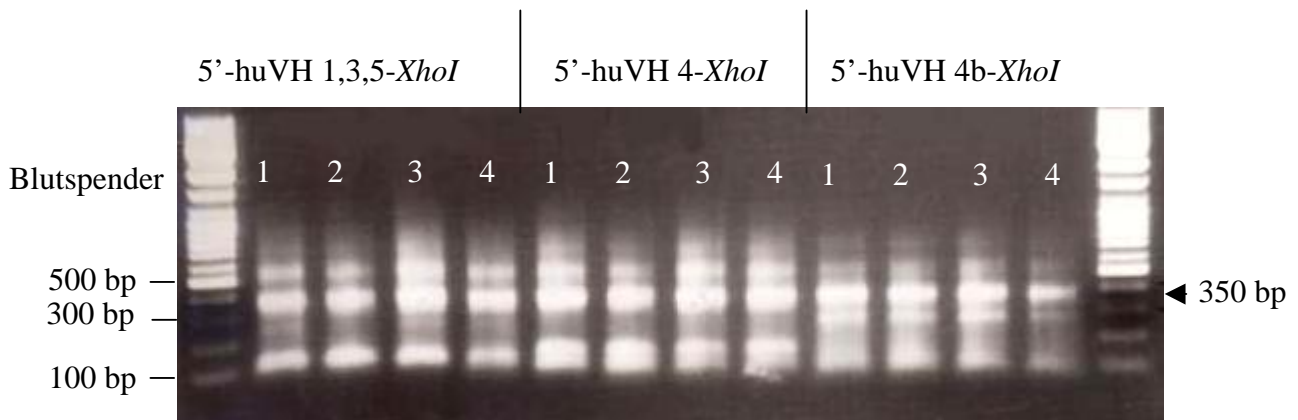


Abb. 11: Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Amplifikate der humanen VH-Subfamilien VH 1, 3, 4 und 5.

Es sind Fragmente gezeigt, die mit dem 3'-huVHJ1-*BstEII* Primer in Kombination mit den Subfamilien-spezifischen 5'-Primern (5'-huVH 1,3,5-*XhoI*, 5'-huVH 4-*XhoI* und 5'-huVH 4b-*XhoI*) amplifiziert wurden. Als Matrize diente cDNA aus PBMCs von vier gesunden Blutspendern 1 - 4. Um die gewünschten DNA-Banden einer Größe von ca. 350 bp zu isolieren und von unspezifischen, größeren PCR-Fragmenten zu trennen, wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

4.3.2 Durchführung der Selektion und Test auf Antigenbindung im ELISA

Nach der Ligation wurde der Ansatz direkt durch Elektroporation in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Die Anzahl der unabhängigen Klone betrug $1,6 \times 10^8$.

Wie bereits für die Selektion der humanen leichten Kette dargelegt, wurden scFv-tragende Phagen mit Hilfe von Helferphagen *VCSM13* in *E. coli* exprimiert. Die Phagen wurden ins Medium sezerniert und nach der Amplifikationsphase über Nacht aus dem Kulturmedium gefällt. Die Selektion erfolgte wiederum auf löslichem, biotinyliertem Antigen. Anders als bei der Selektion der VL-Kette stand nun aber neben dem bereits verwendeten rekombinant in *E. coli* hergestellten hGM-CSF auch kommerziell erhältliches in *S. cerevisiae* produziertes hGM-CSF (Leukine®, *Sargramostim*, BERLEX) zur Verfügung. Während hGM-CSF bei der Produktion in *E. coli* unglycosyliert bleibt, findet bei dem rekombinant in *S. cerevisiae* produzierten hGM-CSF eine post-translationale Glycosylierung statt. Es war zwar gezeigt worden, dass das in *E. coli* produzierte hGM-CSF ebenso biologisch aktiv war wie das in *S. cerevisiae* produzierte. Da jedoch eine potentielle

Glycosylierungsstelle in unmittelbarer Nähe der beschriebenen Rezeptor-Interaktionsstelle von hGM-CSF lag, bestand die Möglichkeit, dass die Neutralisierung durch Glykosylierung von hGM-CSF beeinträchtigt werden könnte. Daher wurde die Phagenbibliothek nach Amplifikation und Fällung der Phagen auf zwei Ansätze verteilt und die Selektion parallel auf beiden Antigen-Varianten durchgeführt.

Die Durchführung der Selektion erfolgte prinzipiell wie bereits für die leichte Kette beschrieben: die gefällten Phagen (*input*) wurden mit dem biotinylierten Antigen inkubiert. Im Anschluss wurden Antigen und die gebundenen Phagen über Streptavidin-beschichtete Magnetkügelchen aus der Lösung isoliert. Nach mehreren Waschsritten (in der ersten Runde zwei, in allen nachfolgenden Runden fünf) zum Entfernen nicht-gebundener Phagen wurden Antigen-bindende Phagen bei pH 2,2 eluiert. Nach Neutralisierung dieses Eluats wurde damit eine exponentiell wachsende *E. coli*-Kultur infiziert. In einem zusätzlichen Elutionsschritt wurde nach der sauren Elution eine *E. coli*-Suspension mit den Magnetkügelchen inkubiert und anschließend mit der ersten Kultur vereinigt (*output*). Nach Zugabe von VCSM13-Helferphagen wurden über Nacht in einer Amplifikationsphase scFv-tragende Phagen produziert und nach deren Fällung eine weitere Selektionsrunde gestartet. Für die Selektion der humanen schweren Kette wurden vier Selektionsrunden durchgeführt. In der ersten Runde betrug die Antigenkonzentration 100 nM, in allen weiteren wurde sie auf 10 nM reduziert.

In Tab. 4 sind die Selektionsbedingungen und die in den einzelnen Selektionsrunden ermittelten Phagentiter zusammengefasst: das Absinken des Output-Titers nach der zweiten Runde lässt sich durch die geringere Antigen-Konzentration und gleichzeitig erhöhte Stringenz der Waschsritte erklären. In der vierten Selektionsrunde stieg das Verhältnis von Input- zu Output-Titer in der Selektion auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF um das 30fache an, in der Selektion auf *S. cerevisiae*-produziertem hGM-CSF um das Zehnfache. Diese Beobachtung ließ bereits auf eine deutliche Anreicherung Antigen-bindender scFv-Phagen schließen.

(A)

Primer	Sequenz
3'- LIB134-VH1A	5'-gtaatcaaagtagactgctatcagacccgatctygcacag taatacacggc-3'
3'- LIB134-VH1B	5'-gtaatcaaagtagactgctatcagacccgatctygcacag taatacayrgc-3'
3'- LIB134-VH3A	5'-gtaatcaaagtagactgctatcagacccgatctngyacag taatacargc-3'
3'- LIB134-VH3B	5'-gtaatcaaagtagactgctatcagacccgatctngcacag taatacaargc-3'
3'- LIB134-VH4	5'-gtaatcaaagtagactgctatcagacccgatctsgcacag taatacargc-3'
	VH CDR3
3'-LIB134-JH3- <i>BstEII</i>	5'-agagacggtgaccattgtcccttggcccccagtaatcaaa gtagactgc-3'

(B)

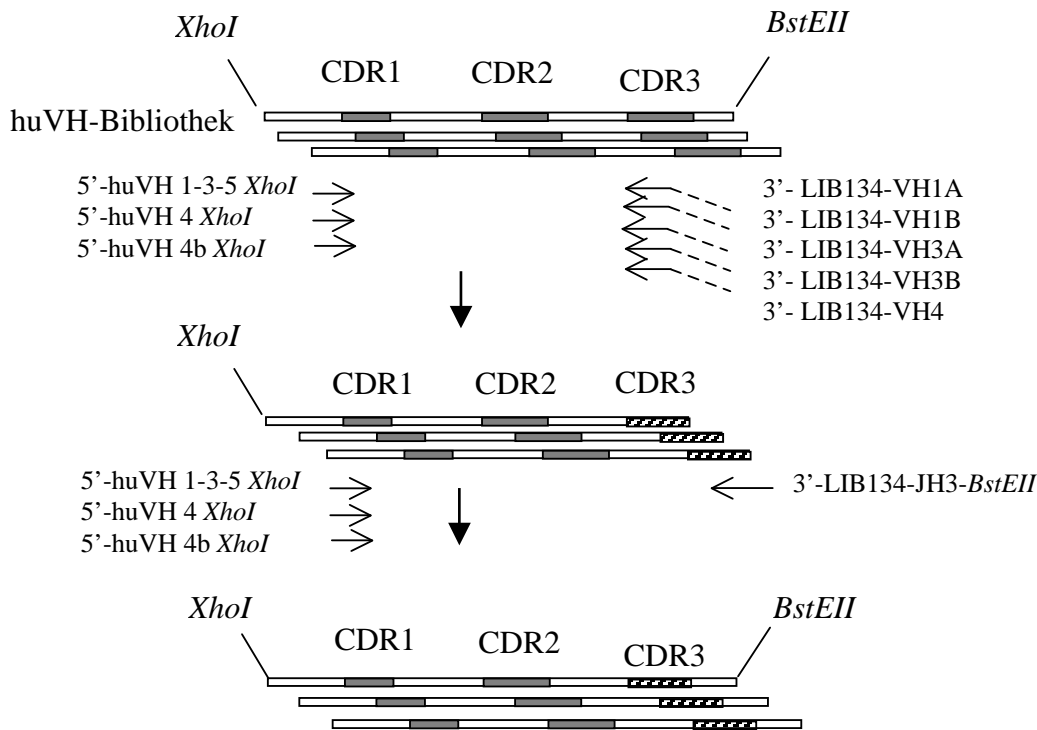


Abb. 12: Generierung von humanen VH-Fragmenten mit der VH CDR3-Sequenz des Ursprungs-Antikörpers

(A) Die Abbildung zeigt die für die Generierung der Fragmente konstruierten 3'-Primer. Die 3'-Primer wurden jeweils mit den 5'-Primern 5'-huVH 1-3-5 *XhoI*, 5'-huVH 4 *XhoI* und 5'-huVH 4b *XhoI* kombiniert.

(B) Schematische Darstellung der durchgeführten PCR-Amplifikationen

Zur Klonierung einer Bibliothek von humanen VH-Sequenzen mit der CDR3-Sequenz der schweren Kette des parentalen mAK wurden nur Sequenzen der VH-Familien VH1, 3 und 4 amplifiziert. Als Matrize diente eine Bibliothek von humanen VH-Fragmenten, die aus PBMCs von fünf gesunden Spendern isoliert wurden. Der Primer 3'-LIB134-JH3-*BstEII* diente der Verlängerung der VH-Fragmente über den CDR3-Bereich hinaus und der Einführung der *BstEII*-Schnittstelle für die Klonierung in den Vektor pComb5BHis.

Selektions- runde	Antigen- konzentration	Wasch- schritte	hGM-CSF (<i>E.coli</i>) Phagentiter [cfu]		hGM-CSF - Leukine® (<i>S. cerevisiae</i>) Phagentiter [cfu]	
			<i>input</i>	<i>output</i>	<i>input</i>	<i>output</i>
1	100 nM	2	0,4 x 10 ¹¹	1,4 x 10 ⁶	0,4 x 10 ¹¹	3,3 x 10 ⁵
2	10 nM	5	0,5 x 10 ¹¹	0,2 x 10 ⁶	0,8 x 10 ¹¹	0,4 x 10 ⁵
3	10 nM	5	0,5 x 10 ¹²	0,5 x 10 ⁶	1,3 x 10 ¹¹	3,9 x 10 ⁵
4	10 nM	5	1,7 x 10 ¹²	5,0 x 10 ⁷	5,0 x 10 ¹¹	1,2 x 10 ⁷

Tab. 4: Selektionsbedingungen und Phagentiter für die Phage-Display-Selektion einer humanen VH-Kette in Kombination mit der humanen VL-Kette 5-306

Es wurden vier Selektionsrunden auf *E. coli*- und *S. cerevisiae* -produziertem Antigen mittels „*in solution panning*“ durchgeführt. In der zweiten Selektionsrunde wurde die Antigenkonzentration verringert und die Waschstringenz erhöht, wodurch der Output-Titer in beiden Selektionen näherungsweise um den Faktor zehn sank. Nachfolgend ist jedoch in der vierten Runde der Selektion auf beiden Antigenen ein deutlicher Anstieg des Output-Titers zu erkennen.

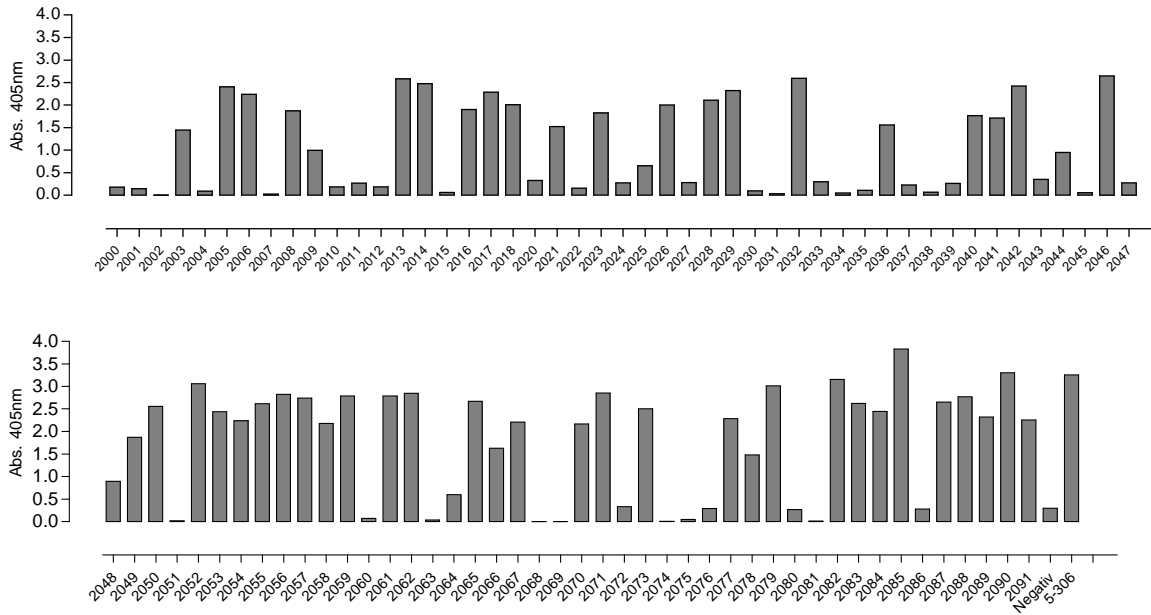
Zur effizienteren Identifikation von Bindern wurde eine neue Methode etabliert, die einen deutlich höheren Durchsatz an Klonen ermöglichte, als die zur Identifikation der huVL 5-306 verwendete Methode. Während bei der ersten Methode Bakterienklone in 5 ml-Kulturen angezogen und zur Proteinproduktion induziert wurden, erfolgte die Bakterienanzucht hier in 96-well Platten in einem Kulturvolumen von nur 100 µl. Dazu wurde der schnell wachsende *E. coli*-Stamm TG1 verwendet. Die Präparation des Periplasmas wurde dann ebenfalls in 96-well Platten durch osmotischen Schock und in Anwesenheit von Lysozym durchgeführt.

Zunächst wurden die Plasmidpools nach der dritten und vierten Selektionsrunde präpariert. Um die scFv-Antikörper löslich exprimieren zu können, wurden, wie unter 4.2.1 beschrieben, die kodierenden VH/VL-Sequenzen über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *SpeI* ausgeschnitten, in den Expressionsvektor pCombFlag/His umklont und in *E. coli* TG1 transformiert. Nachfolgend wurden Einzelkolonien gepickt, in 96-well Platten in LB-Medium angezogen und die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG induziert. Nach Übernachtskultur wurde ein periplasmatischer Aufschluss durchgeführt und diese Periplasma-präparationen im ELISA auf Bindung an immobilisiertes Leukine® getestet.

Für beide Selektionen wurden nach der dritten Selektionsrunde jeweils 91 Klone getestet. Aus der Selektion auf dem *S. cerevisiae*-produzierten Antigen Leukine® zeigten insgesamt 10 Klone (11%) ein deutliches ELISA-Signal, aus der Selektion auf dem *E. coli*-produzierten hGM-CSF waren es 12 Klone (13%). Nach der vierten Selektionsrunde wurden für beide Selektionen jeweils 160 Klone getestet. Abb. 13 zeigt beispielhaft das Ergebnis von jeweils 91 Klonen. Aus der Selektion auf dem *S. cerevisiae*-produzierten Antigen Leukine® waren insgesamt 87 Klone (54%) im ELISA stark positiv, aus der Selektion auf dem *E. coli*-produzierten hGM-CSF waren es 140 Klone (87,5%).

Dieses Ergebnis bestätigte die deutliche Anreicherung von bindenden Klonen in der vierten Selektionsrunde, die bereits aufgrund des Output-Titers vermutet worden war. Die Benennung der Klone wurde so gewählt, dass die Ordnungsnummer 2000 aufwärts stets einen auf Leukine® selektierten Klon bezeichnet, während die Ordnungsnummer 3000 aufwärts stets einen auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF selektierten Klon benennt.

(A) Selektion auf *S. cerevisiae*-produziertem hGM-CSF (Leukine®)



(B) Selektion auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF

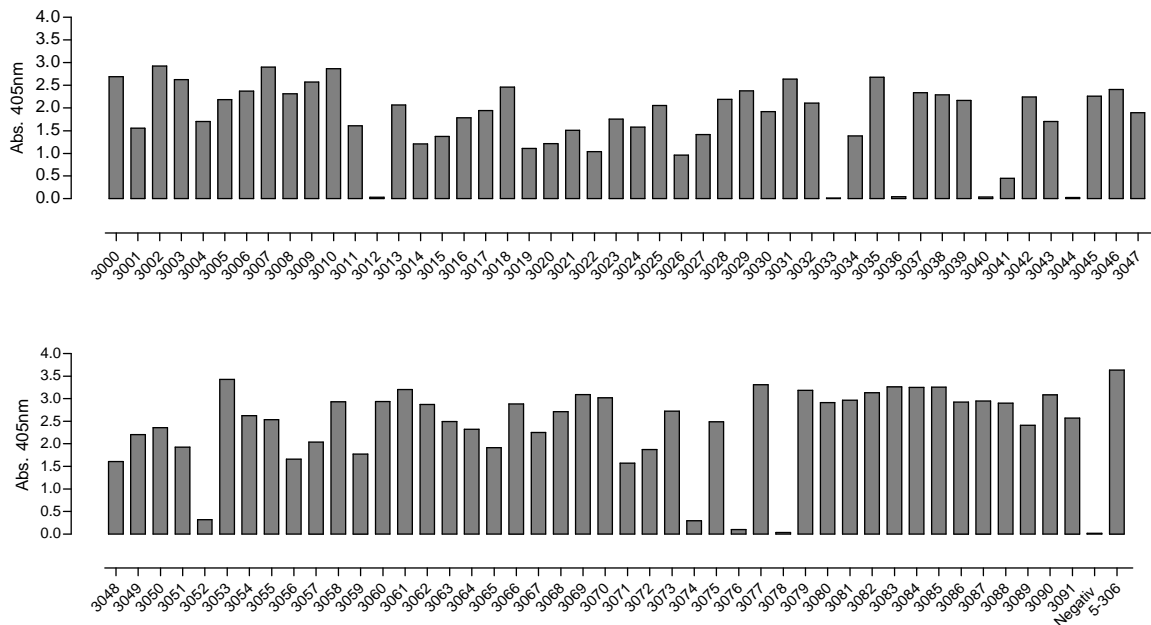


Abb. 13: hGMCSF-Bindung von periplasmatischen Extrakten im ELISA

Von jeweils 160 Klonen nach der vierten Selektionsrunde auf (A) *S. cerevisiae*- (Leukine®) bzw. (B) *E. coli*-produziertem hGM-CSF wurden periplasmatische Extrakte hergestellt und diese direkt im ELISA auf Bindung an hGM-CSF (Leukine®) getestet. Hier sind beispielhaft je 91 Klone dargestellt. Als Negativkontrolle diente PBS, als Positivkontrolle wurde der Klon 5-306 mitgeführt. Die Detektion gebundener scFv-Antikörper erfolgte über einen anti-Flag-Antikörper, gefolgt von einem POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper. Aus der Selektion auf Leukine® zeigten über 50% ein positives ELISA-Signal, aus der Selektion auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF waren es über 80%.

4.3.3 Charakterisierung der selektierten humanen hGM-CSF-bindenden scFv-Antikörper

4.3.3.1 Sequenzanalyse

Es sollte nun die Frage untersucht werden, ob mit der deutlichen Anreicherung von Bindern in der vierten Selektionsrunde auch eine Fokussierung auf eine oder wenige bestimmte Sequenzen stattgefunden hatte.

Dazu wurden die DNA-Sequenzen von zehn Klonen mit starkem ELISA-Signal aus der vierten Selektionsrunde auf Leukine® und dreizehn Klonen aus der vierten Selektionsrunde auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF bestimmt.

Aus diesen insgesamt 23 Klonen konnten zehn verschiedene VH-Sequenzen identifiziert werden. Es war also trotz der beobachteten Anreicherung an Bindern eine recht hohe Diversität im Sequenzpool nach der vierten Selektionsrunde erhalten geblieben. Gleichzeitig war aber auch ein bevorzugtes Auftreten einzelner Klone zu beobachten: die Sequenz des Klons 3077 trat insgesamt siebenmal auf, die der Klone 2042 und 3080 jeweils viermal und diejenige von 3152 zweimal. Alle anderen Klone (2057, 2103, 2130, 3035, 3152) wurden nur einmal identifiziert. Anzumerken ist außerdem, dass zwei der mehrmals identifizierten Sequenzen (3152 und 2042) sowohl in der Selektion auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF wie auch auf Leukine® gefunden wurden. Der dominante Klon 3077 wie auch der Klon 3080 wurden dagegen nur in der Selektion auf *E. coli*-produziertem hGM-CSF identifiziert.

Aufgrund der ausreichenden Diversität nach der vierten Selektionsrunde wurde auf Sequenzierung von Bindern nach der dritten Selektionsrunde verzichtet.

Die zehn identifizierten Sequenzen wurden mit der V-Base-Datenbank verglichen, um die am nächsten verwandte humane Keimbahn-Sequenz zu ermitteln. Alle Sequenzen waren vom Gen VH-1 1-O2 abgeleitet und wiesen einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad untereinander auf (85-98% Identität). Es ließen sich drei Gruppen von Klonen erkennen, deren Sequenzen sich besonders ähnlich waren: 3035, 3077 und 3080 (95-98% Identität), 2042, 2130 und 3132 (93-96% Identität) sowie 2103 und 3152 (94% Identität). Mit der VH-Region des parentalen Ratten-Antikörpers betrug die Identität dagegen erwartungsgemäß nur 63-67%.

Als interessant erwies sich der Vergleich der Sequenzen von CDR1- und CDR2-Regionen der neu selektierten Klone und der parentalen VH (Abb. 14). Zunächst fiel auf, dass es keine Längenvarianz in den CDR-Regionen gab. Im CDR1 trugen fast alle selektierten Klone in Übereinstimmung mit der parentalen Sequenz an Position 31 (erste AS-Position im

CDR1) ein Aspartat (D). Ausnahme ist lediglich Klon 3132, der an dieser Position ein Asparagin (N) aufwies. In der Keimbahnsequenz VH-1 1-O2 ist diese Position jedoch mit einem Glycin besetzt. Es ist anzunehmen, dass es sich hier um eine für die Bindung des Antigens wichtige Position handelt.

Auch bei der Analyse der CDR2 Sequenzen ließen sich interessante Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen selektierter Klone und der parentalen Sequenz erkennen: die Klone 3077, 3035 und 3080 haben in Position 52 bis 56 die identische Sequenz wie die parentale VH. Für diesen Bereich sind Variationen in der dreidimensionalen Struktur (kanonische Strukturen) von CDR2 beschrieben. Es kann daher angenommen werden, dass diese Gruppe von Klonen im CDR2-Bereich eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem Ursprungs-Antikörper hat.

Der CDR3-Bereich sollte für alle Klone identisch mit dem der VH-Kette des Ursprungs-Antikörpers sein. Im Klon 3039 wurde allerdings eine Abweichung festgestellt. In dieser Sequenz ist das Glycin an Position 95 durch ein Serin ersetzt. Diese Abweichung kommt durch einen Nukleotidaustausch zustande, der vermutlich auf die PCR-Amplifikation des Fragments zurückzuführen ist.

Durch Verwendung von exprimierten humanen VL-Regionen und humanen VH-Segmenten inklusive der Angleichung des VH FR4 an die humane Keimbahnsequenz bestehen die selektierten scFv-Fragmente mit Ausnahme der VH CDR3-Region ausschließlich aus humanen Sequenzen. Durch die hohe Sequenzvariabilität im VH CDR3 ist dort keine speziesspezifische Zuordnung möglich. Demzufolge determinieren alle anderen Sequenzbereiche die Spezies des Antikörpermoleküls. Damit können die selektierten scFvs als humane Antikörperspezifitäten bezeichnet werden.

Kabat	Framework 1			Framework 2			Framework 3			Framework 4	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	12345678901234567890	1234567890123456789	012a3456789012345	67890123456789012345	67890123456789012abc345678901234	567890ab12	34567890123		
2042	EVQLLES	GAEVKKPGASVKVSKASGY	PFS	DYLIIH	WVRQAPGQGLEWMG	WINPNSGDTKYAKKFQG	RVTMTRDTSISTAYMEL	SRLRSDDTAVYYCAR	SGLIAVYFDY	WGQGTMTV	VSS
2057	-----	-----	N	--Y--	-----	M	---GG-S-S--Q---	-----	T-----	RS-----	M-----
2103	-----	-----	-----	--Y--	-----	M	---SG-S-S--Q---	-----	T--V----	S--E-----	-----
2130	-----	-----	D	-----	-----	M	-----G--Q---	-----	N-----	S--E-----	-----
3035	-----	-----	F	---T	-----	V	-L--Y---N--Q---	-----	T--V----	-----	T-----
3039	-----	-----	-----	T	--Y--	-----	-----G-N--Q---	--S-----	N-----	G-T-----	-S-----
3077	-----	-----	F	---T	---L-	-----	V	-L--Y---N--Q---	-----	-----	T-----
3080	-----	-----	F	---T	---L-	-----	V	-L--Y---N--Q---	D	--I-----	-----
3132	-----	-----	-----	N	-----	M	-----G--Q---	-----	-----	-----	-----
3152	-----	-----	-----	T	--Y--	-----	M	---S--RTS--Q---	S	--L-----	T-----
Keimbahn VH 1-02/JH3											
	Q---VQ-	-----	-----	T	G-YM-	-----	-----	G-N--Q---	-----	-----	A--I
parentale VH											
	-L-V--QS--ALV--D--M-----	P-T	--IV-	--K-SHGKS-D-I-	Y---Y-----	FNE--KS	KATLTV-K-S-----	F--T-E-S-I-----	-----	-----	T-----

Abb. 14: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Phage-Display-selektierten Klone untereinander sowie mit der nächstverwandten humanen Keimbahnsequenz VH1-1-02 und der VH-Region des parental Antikörpers. Übereinstimmende Aminosäurepositionen sind durch einen Bindestrich gekennzeichnet. Die Einteilung der Framework und CDR-Regionen erfolgte nach Kabat et al.,1991.

4.3.3.2 Bestimmung der Affinität

Zur Charakterisierung und zum Vergleich der identifizierten hGM-CSF-Binder wurde ihre Dissoziationskonstante bestimmt.

Die Dissoziationskonstante beschreibt das Reaktionsgleichgewicht der Bindung des Antikörpers an das Antigen. Für ihre Bestimmung werden zwei kinetische Konstanten ermittelt, aus denen nachfolgend die Dissoziationskonstante errechnet wird: die Assoziationsrate (k_a) gibt an, wieviele Antikörpermoleküle pro Zeiteinheit an das Antigen binden. Sie wird pro Mol und Sekunde angegeben [$M^{-1} s^{-1}$]. Die Dissoziationsrate (k_d) ist ein Maß dafür, wie schnell sich die Antikörpermoleküle wieder vom Antigen lösen und wird pro Sekunde angegeben [s^{-1}]. Der Quotient aus Dissoziationsrate und Assoziationsrate definiert die Dissoziationskonstante K_D , die in Mol angegeben wird:

$$K_D [M] = k_d [s^{-1}] / k_a [M^{-1}s^{-1}]$$

Je höher die Assoziationsrate und je kleiner die Dissoziationsrate eines Antikörpers, d.h. je mehr Moleküle pro Zeiteinheit an das Antigen binden und je langsamer sie sich wieder von ihm lösen, desto größer ist die Affinität eines Antikörpers. Daraus ergibt sich: je kleiner die Dissoziationskonstante desto höher ist die Affinität des Antikörpers.

Die Ermittlung von Assoziations- und Dissoziationsrate erfolgte über eine Oberflächenplasmonresonanz-Analyse am Biacore-Gerät. Dazu wurde die Bindung von scFv-Antikörpern in einer Verdünnungsreihe an einen mit Leukine® beschichteten Sensorchip gemessen. Es wurde stets aufgereinigter (Ni-NTA-Säule und anschließende Gelfiltration), monomerer scFv-Antikörper in die Messung eingesetzt. Zur Auswertung der Messdaten wurde das Bia-Evaluation-Programm verwendet.

In Tab. 5 sind die ermittelten Assoziations- und Dissoziationsraten sowie die errechneten Dissoziationskonstanten aufgelistet. Die Dissoziationskonstante der meisten Moleküle lag im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-9} M. Nur ein scFv-Antikörper (3039) hatte eine deutlich niedrigere Affinität von $1,7 \times 10^{-6}$ M. Interessanterweise war dies das Molekül mit einem Aminosäureaustausch im VH CDR3. Aufgrund des hohen Einflusses des VH CDR3 auf die Bindungseigenschaften des Antikörpers lag die Vermutung nahe, dass eben dieser Austausch die auffallend niedrige Affinität dieses Moleküls begründete.

scFv	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [M]
2042	$3,1 \pm 4,0 \times 10^5$	$1,1 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$3,5 \pm 4,6 \times 10^{-8}$
2057	$0,7 \pm 0,4 \times 10^5$	$2,8 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$3,8 \pm 1,8 \times 10^{-7}$
2103	$0,4 \pm 0,3 \times 10^5$	$4,3 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$9,9 \pm 7,9 \times 10^{-8}$
2130	$4,8 \pm 4,0 \times 10^5$	$8,5 \pm 0,3 \times 10^{-3}$	$1,8 \pm 1,5 \times 10^{-8}$
3035	$1,6 \pm 1,1 \times 10^5$	$1,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$0,9 \pm 0,7 \times 10^{-8}$
3039	$0,6 \pm 0,4 \times 10^4$	$9,6 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$1,7 \pm 1,1 \times 10^{-6}$
3077	$1,7 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \pm 0,7 \times 10^{-9}$
3080	$1,0 \pm 0,5 \times 10^5$	$3,5 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	$3,0 \pm 2,0 \times 10^{-8}$
3132	$6,1 \pm 7,3 \times 10^5$	$2,3 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$3,8 \pm 4,5 \times 10^{-9}$
3152	$1,5 \pm 0,7 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$1,7 \pm 0,9 \times 10^{-8}$

Tab. 5: Bindungskonstanten der selektierten humanen scFv

Assoziations- und Dissoziationsraten der aufgereinigten scFv-Antikörper wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gemessen und nachfolgend die Dissoziationskonstante $KD = kd/ka$ errechnet. Die Messung erfolgte in einer Verdünnungsreihe an einem mit Leukine® beschichteten CM5-Sensorchip im Biacore-Gerät. Es wurden 10 µl der Proteinlösung über einen Zeitraum von 100 s in die Flusszelle injiziert (Assoziation). Anschließend wurde mit Laufpuffer HBS-EP gewaschen (20 µl/s) und die Dissoziation über einen Zeitraum von 100 s beobachtet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte (nach Langmuir) mit der BIA-Evaluation-Software unter Bestimmung des Mittelwertes aus 4-8 Einzelmessungen unterschiedlicher scFv-Konzentrationen.

4.3.3.3 Charakterisierung des Neutralisierungspotentials

Größtes Interesse galt der Frage, ob die hGM-CSF-neutralisierende Eigenschaft in den selektierten humanen scFv-Antikörperfragmenten erhalten geblieben war. Um dies zu klären, wurde die Inhibition der Proliferation der hGM-CSF-abhängig wachsenden TF-1-Zellen untersucht und die für die halbmaximale Inhibition der Proliferation (IC50) notwendige scFv-Konzentration bestimmt. Die Durchführung erfolgte wie bereits für die Charakterisierung von scFv 5-306 beschrieben (siehe 4.2.2.2.2). TF-1-Zellen wurden in Gegenwart von 0,3 ng/ml Leukine® in 96-well Platten ausgesät. Zu den Zellen wurde außerdem scFv-Antikörper in einer Verdünnungsreihe zugegeben. Es wurde stets aufgereinigter (Ni-NTA-Säule und anschließende Gelfiltration) monomerer scFv-Antikörper für die Tests eingesetzt. Zur

Quantifizierung der Proliferation der TF-1-Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 72 h das WST-1 Reagenz zugegeben, das von den mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zu einem gelben Farbstoff umgesetzt wird und so durch Absorptionsmessung bei 450 nm quantifizierbar ist.

Abb. 15 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse: es wurde stets die Absorption bei 450 nm gegen die Konzentration des scFv-Antikörpers aufgetragen. Mit Hilfe der Prism-Software wurde eine nicht-lineare Regressionskurve erstellt anhand derer die Konzentration der halbmaximalen Inhibition der Proliferation errechnet wurde.

Die Effizienz der einzelnen scFv-Moleküle, die hGM-CSF-abhängige Proliferation von TF-1-Zellen zu neutralisieren, differierte sehr stark. Die Klone 3152, 2130, 2103, 3132 konnten die hGM-CSF-abhängige TF-1-Proliferation gar nicht oder nur minimal inhibieren.

Durch die Klone 2042, 2057, 3080 und 3039 wurde die Proliferation wesentlich effizienter inhibiert, der stärkste neutralisierende Effekt wurde jedoch durch die Klone 3077 und 3035 erzielt. Diese beiden Klone zeigten hervorragende Neutralisierungseigenschaften im nanomolaren Bereich.

Zur Charakterisierung der humanen scFv-Konstrukte ist abschließend festzustellen, dass im Phage-Display einige Klone mit hoher bis sehr hoher Bindungsaffinität und ebensolcher hGM-CSF-Neutralisierungseffizienz selektiert werden konnten. Besonders zwei Klone zeichneten sich aus: 3035 und 3077, die im Rahmen der Messgenauigkeit die gleiche Bindungsaffinität (3035: $0,9 \times 10^{-8} \pm 0,7 \times 10^{-8}$ M bzw. 3077: $1,2 \times 10^{-9} \pm 0,7 \times 10^{-9}$ M) und Neutralisierungseffizienz (3035: $IC_{50} = 3,2$ nM bzw. 3077: $IC_{50} = 2,6$ nM) aufwiesen. Aufgrund der in wiederholten Messungen bestätigten, deutlich schnelleren Assoziationsrate des Klons 3077 ($1,7 \times 10^6$ 1/Ms versus $1,6 \times 10^5$ 1/Ms) wurde dieser für weitere Untersuchungen als ausgewähltes Modellkonstrukt verwendet.

Abb. 15: Konzentrationsabhängige Inhibition der hGM-CSF-abhängigen Proliferation von TF-1-Zellen (siehe folgende Seite)

hGM-CSF-abhängig wachsende TF1-Zellen wurden für 72 h in Anwesenheit von 0,3 ng/ml hGM-CSF mit verschiedenen Konzentrationen der zehn zu vergleichenden scFv-Antikörper inkubiert.

Parallel dazu wurden TF-1-Zellen als Kontrolle für die Proliferation und zur Bestimmung der halbmaximalen Effektkonzentration von hGM-CSF mit einer Verdünnungsreihe hGM-CSF (100 ng/ml - 0,5 pg/ml) inkubiert.

Die Proliferation der Zellen wurde im Anschluss indirekt durch Zugabe von WST-1 gemessen. Die Tetrazoliumsalze des WST-1 Reagenz werden durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen umgesetzt, wodurch ein gelber Farbstoff entsteht. Der gemessene Absorptionswert bei 450 nm korreliert so mit der Anzahl lebender Zellen.

Die bei 450 nm gemessene Absorption wurde gegen die Konzentration an scFv-Antikörper (bzw. hGM-CSF) aufgetragen. Mit Hilfe der Prism-Software wurde eine nicht-lineare Regressions-Kurve angepasst und anhand dieser die halbmaximale Inhibition der Proliferation bestimmt.

Abbildungen (A) bis (E) zeigen die Proliferation in Anwesenheit der verschiedenen scFv-Antikörper. Unter (F) sind die zugehörigen Kurven für die konzentrationsabhängige Proliferation in Abwesenheit von neutralisierenden scFv-Antikörpern dargestellt. F1) zeigt die Proliferationskurve zu scFv 2024 und 2057 (A); F2) zeigt die Proliferationskurve zu scFv 2130 und 3152 (B); die restlichen Daten (C) bis (D) wurden alle parallel in einem Ansatz gemessen. Zu diesen Daten gehört die Kurve 3) für die Leukine®-abhängige Proliferation.

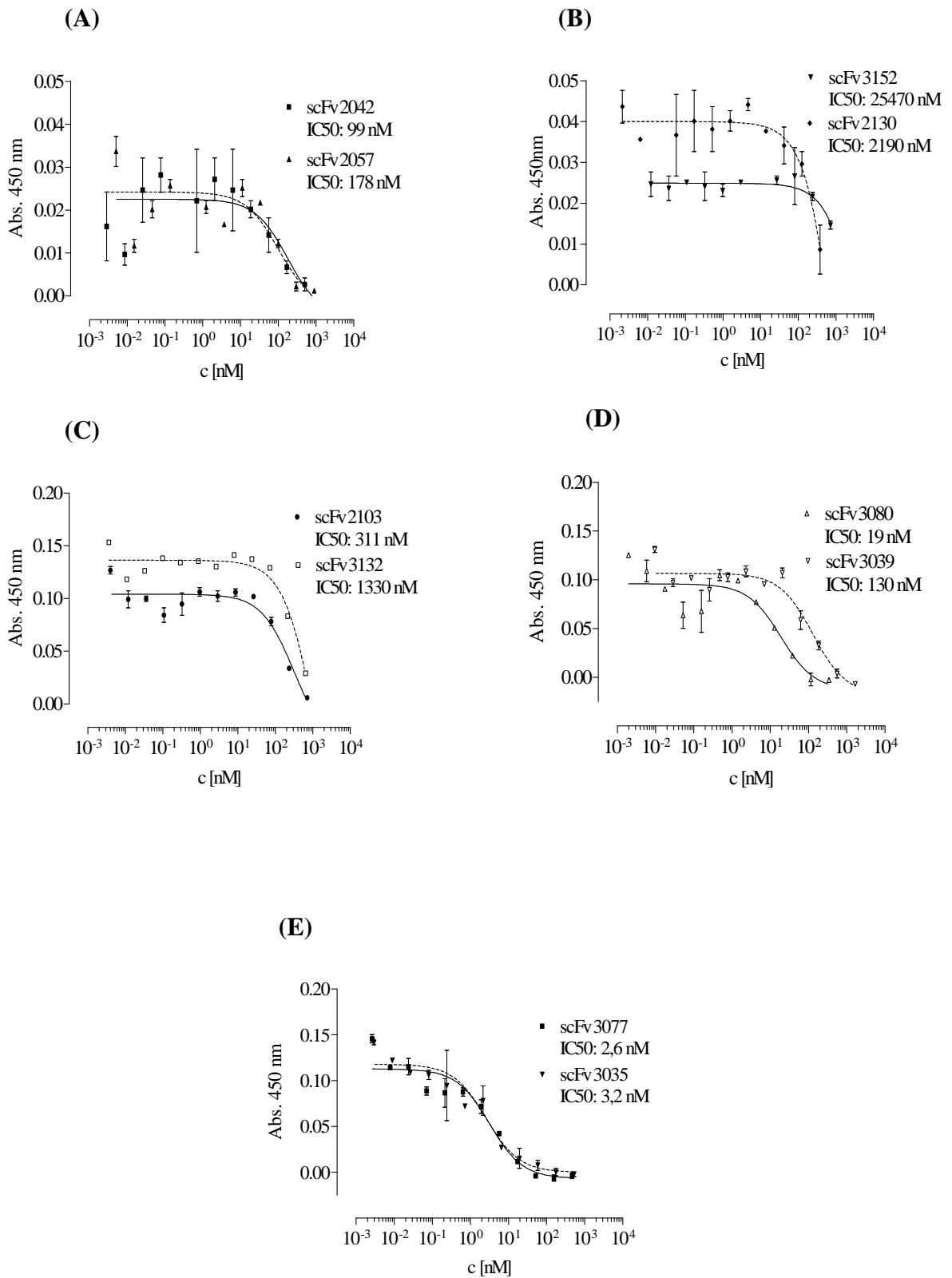


Abb.15 (Beschreibung siehe S. 89)

(F)

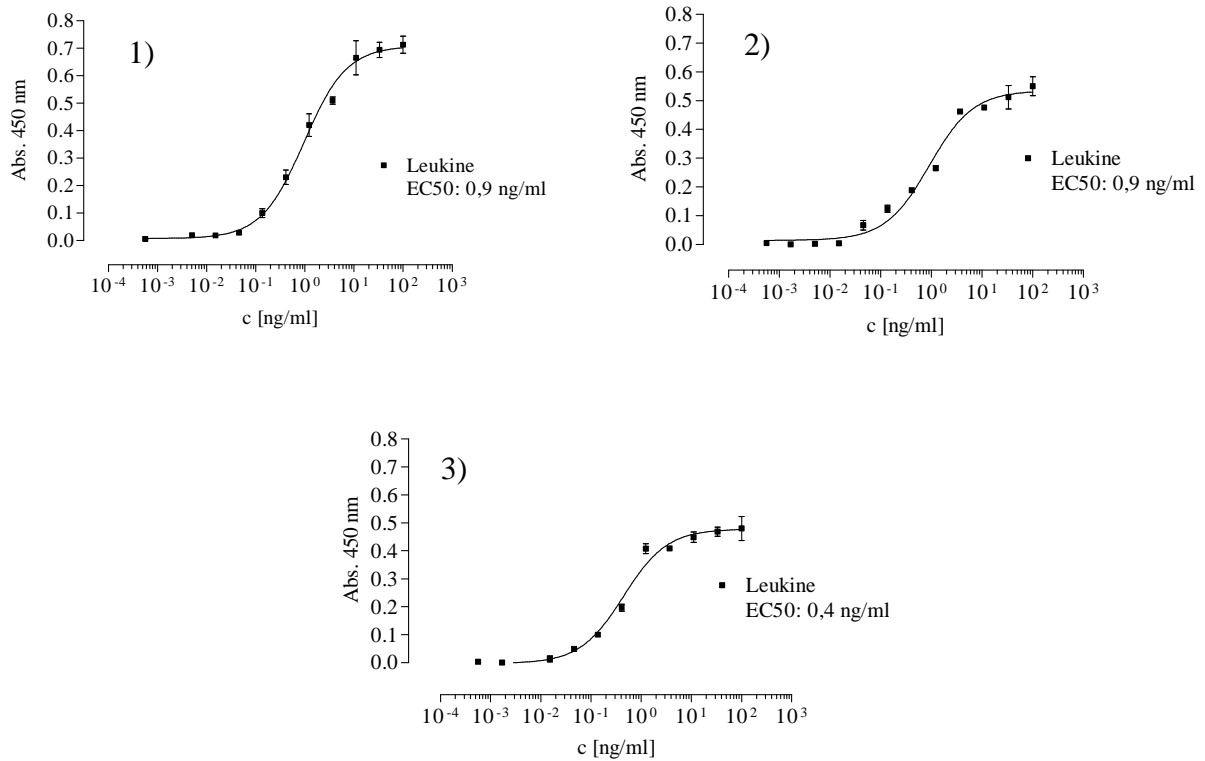


Abb. 15 (Beschreibung siehe S. 89)

4.3.3.4 Thermodynamische Stabilität von scFv 3077

Als weiteres Charakteristikum wurde die thermodynamische Stabilität des scFv 3077 untersucht. Dazu wurde eine Guanidinium Hydrochlorid (GndHCl) Denaturierungskurve erstellt.

Um die Entfaltung des Proteins als Folge ansteigender GndHCl-Konzentrationen zu erfassen, wurde die Fluoreszenz des Proteins durch Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 280 nm angeregt und die Veränderung im Emissionsmaximum bestimmt. Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf aromatischen Aminosäureresten, wobei die Fluoreszenzemission in Proteinen v.a. auf Tryptophanreste zurückzuführen ist. Das

Emissionsmaximum von Tryptophanresten ist von der Umgebung abhängig. Das hat zur Folge, dass die durch Denaturierung herbeigeführte Entfaltung der Proteinkette mit einer messbaren Verschiebung des Emissionsspektrums einhergeht.

Abb. 16 zeigt die durch GdnHCl-induzierte Denaturierungskurve für scFv 3077 nach Normalisierung der Daten. Der zweistufige Verlauf der Kurve lässt darauf schließen, dass die Entfaltung des scFv in zwei Schritten erfolgt. Der erste Entfaltungsschritt erfolgte bei ca. 2,05 M GdnHCl, der zweite bei 4,23 M GdnHCl.

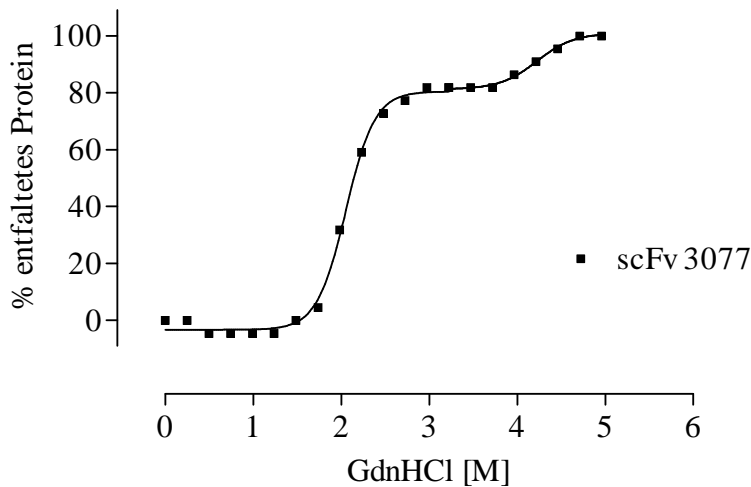


Abb. 16: Denaturierung von scFv 3077 durch Guanidinium Hydrochlorid (GdnHCl)

Die Entfaltung des Proteins mit ansteigender Guanidinium Hydrochlorid-Konzentration wurde anhand der Veränderung im Emissionsmaximum gemessen. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde eine Wellenlänge von 280 nm eingesetzt. Die Daten wurden nachfolgend normalisiert.

4.4 Vergleich von verschiedenen Antikörperformaten derselben Spezifität: scFv, scFv-PEG, IgG

Aufgrund ihrer geringen Größe verfügen scFv-Fragmente über eine vergleichsweise geringe Halbwertszeit im Körper und werden innerhalb weniger Stunden ausgeschieden, was ihren therapeutischen Einsatz für akute Anwendungsbereiche optimiert. Wie anhand von pharmakokinetischen Studien gezeigt wurde, kann die Halbwertszeit solcher Konstrukte jedoch durch die kovalente Konjugation von Polyethylenglycol (PEG) moduliert und deutlich verlängert werden (Lee et al., 1999; Yang et al., 2003). Aus diesem Grund wurde scFv 3077 auch in einer PEGylierten Version hergestellt, auf seine hGM-CSF-bindenden und -neutralisierenden Eigenschaften hin untersucht und mit dem ursprünglichen Molekül scFv 3077 verglichen.

Darüber hinaus wurden die variablen Regionen des scFv 3077 in Fusion mit der konstanten Region eines humanen IgG1-Moleküls kloniert und als vollständiges Antikörpermolekül exprimiert.

Abb. 17 fasst die Generierung des scFv-Fragments 3077 und der davon abgeleiteten Antikörperformate - PEGylierter scFv und IgG1 - in einer schematischen Darstellung zusammen. Die Eigenschaften dieser drei verschiedenen Antikörperformate mit derselben Bindungsspezifität wurden charakterisiert und miteinander verglichen.

4.4.1 Herstellung einer PEGylierten Variante von scFv 3077

Für die PEGylierung wurde eine Methode gewählt, die die gerichtete, kovalente Bindung eines einzelnen PEG-Polymers an das scFv-Molekül ermöglicht. Bei dieser Methodik wird ein mit einer Maleimidgruppe versehenes PEG-Polymer verwendet. Die Koppelung erfolgt durch Reaktion der Maleimidgruppe mit einem Sulfhydrylrest eines freien Cysteins unter Bildung einer Thioetherbindung. In einer typischen VH-VL Sequenz sind vorhandene Cysteine an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt und nicht frei zugänglich. Yang et al. (2003) beschrieben die effiziente PEGylierung eines scFv-Moleküls, das durch ein zusätzliches freies Cystein am C-Terminus modifiziert ist. Da die biologische Halbwertszeit PEGylierter Moleküle mit dem Molekulargewicht des verwendeten PEG-Polymers zunimmt, wurde ein großes, verzweigtes 40kDa PEG für die Konjugation gewählt.

In Abb. 18 ist die Struktur des verwendeten, verzweigten PEG-Maleimid Moleküls sowie die Bildung einer Thioetherbindung zwischen Maleimid und dem freien Cysteinrest des scFv-Moleküls dargestellt.

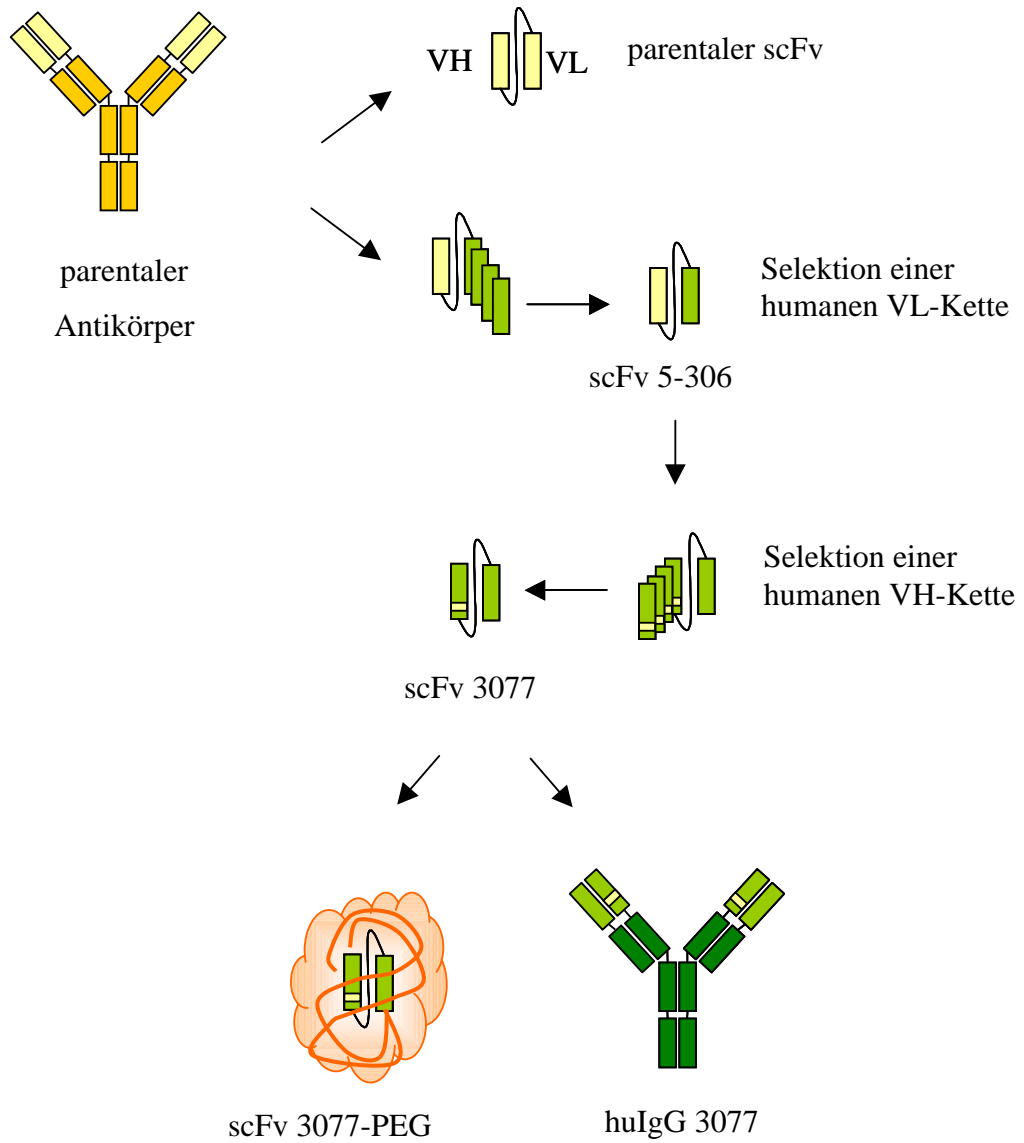
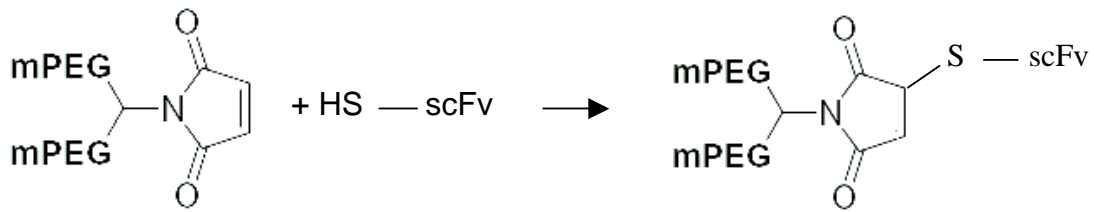


Abb. 17: Schematische Darstellung der Generierung des humanen scFv 3077 und seiner Umwandlung in eine PEGylierte Variante scFv 3077-PEG sowie einen vollständigen humanen IgG-Antikörper



mPEG: $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$

Abb. 18: Bildung einer Thioetherbindung zwischen dem verwendeten, verzweigten mPEG2-Maleimid und dem freien Cysteinrest des scFv-Moleküls

Erster Schritt zur Herstellung eines PEGylierten scFv 3077 war die Klonierung einer Variante mit einem freien Cysteinrest am C-Terminus des Konstrukts. Dazu wurden die kodierenden VH- und VL-Sequenzen von scFv 3077 mit geeigneten Primern amplifiziert, wobei am 3'-Ende das Codon für ein zusätzliches Cystein eingefügt wurde. Als Matrize diente scFv 3077 nach Umklonierung in den Vektor pBad-pelB-Kan, der eine effizientere Proteinexpression ermöglichte. Das Amplifikationsprodukt wurde ebenfalls in diesen Vektor ligiert. Die Expression des so entstandenen Konstrukts scFv 3077_HisCys erfolgte in *E. coli* BL21-AI. Zur Aufreinigung des Proteins aus periplasmatischem Extrakt wurde eine Metall-Affinitäts-Chromatographie (Ni-NTA-Superflow) sowie eine nachfolgende Gelfiltration durchgeführt.

Aufgrund des freien C-terminalen Cysteins konnte es unter oxidativen Bedingungen zur Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken und somit zur Dimerbildung von scFv-Molekülen kommen. Um solche Dimere zu spalten und um sicherzustellen, dass das C-terminale Cystein tatsächlich in freier Form vorlag, wurde nach Durchführung der Affinitätschromatographie ein Reduktionsschritt mit Dithiothreitol (DTT) eingeschoben. Um den reduzierten Status aufrechtzuerhalten, erfolgte die nachfolgende Gelfiltration ebenfalls in Anwesenheit von 2 mM DTT. Hierbei wurde die DTT Konzentration so optimiert, dass die interne strukturelle Disulfidbrücke des scFv-Moleküls nicht, das freie C-terminale Cystein aber sehr wohl reduziert wurde.

Direkt vor der PEGylierung des aufgereinigten scFv-Fragments wurde das DTT wieder aus der Lösung entfernt und das scFv-Fragment mit einem zehnfachen molaren Überschuss an verzweigtem PEG-Polymer mit dem Molekulargewicht 40 kDa (mPEG2 Maleimid) inkubiert. An die Koppelungsreaktion schloss sich eine Ionenaustauschchromatographie an, die zum Ziel hatte, sowohl freies PEG als auch nicht PEGylierten scFv aus der Lösung zu entfernen. Die Reinheit der Präparationen nach Ionenaustauschchromatographie wurde anhand von SDS-PAGE überprüft (Abb. 19) und betrug über 90%.

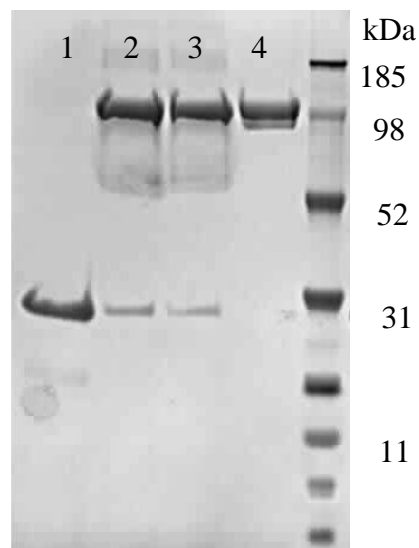


Abb. 19: SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit einer Präparation von scFv 3077-PEG nach Ionenaustauschchromatographie

In Spur 1 wurde nicht-PEGylierter scFv 3077 aufgetragen, dessen freier Cysteinrest durch Ethylmaleimid blockiert wurde; in Spur 2 wurde das PEGylierte, nicht aufgereinigte scFv-Molekül direkt nach der Konjugation von PEG-Mal aufgetragen. Spur 3 zeigt das PEGylierte Molekül nach Umpuffern in den Laufpuffer für die Ionenaustauschchromatographie und Spur 4 zeigt das aufgereinigte scFv-Fragment nach Ionenaustauschchromatographie.

4.4.2 Klonierung und Produktion von 3077 als vollständiger IgG1-Antikörper

Da es in bakteriellen Expressionssystemen nicht möglich ist, vollständige Antikörper funktionell zu produzieren, sollte die Expression eines humanen IgG 3077 in eukaryotischen HEK 293F-Zellen erfolgen.

Zu diesem Zweck wurden die variablen Regionen der leichten (VL) und schweren (VH) Kette getrennt in eukaryotische Expressionsvektoren umkloniert und mit humanen konstanten Regionen (C) der leichten kappa Kette bzw. der schweren gamma-1 Kette verknüpft.

Die Klonierung der leichten Kette erfolgte in zwei Schritten: in einer ersten PCR-Reaktion wurde die VL 5-306 aus scFv 3077 am 5'-Ende um einen Teil der eukaryotischen Leadersequenz verlängert. Gleichzeitig wurden geeignete Schnittstellen für eine Zwischenklonierung in einen Vektor geschaffen, der den noch fehlenden Teil der eukaryotischen Leadersequenz sowie die Sequenz der humanen konstanten kappa Kette enthielt. In einem zweiten Schritt wurde das Fragment VL5-306_C-kappa in Fusion mit der Leadersequenz wieder ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pEF-ADA kloniert.

Zur Klonierung der schweren Kette wurde die VH 3077 aus scFv 3077 in einer PCR-Reaktion amplifiziert und in den Expressionsvektor pEF-DHFR kloniert. Im Anschluss daran wurde 3'-wärts der variablen Region ein Fragment einkloniert, das für die CH1-hinge-CH2-CH3 Domänen des humanen konstanten gamma-1 Fragments kodierte.

Zur Expression der vollständigen Antikörpermoleküle wurden beide Expressionsplasmide transient in HEK 293F-Zellen transfiziert. Diese Kotransfektion resultierte in der Expression von vollständigen Antikörpermolekülen, die in den Kulturüberstand abgegeben wurden (Abb. 20). Nach dreitägiger Kultivierung der transfizierten Zellen bei 37°C, 8% CO₂, 100 rpm wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation geerntet. Aus diesem Kulturüberstand wurde der IgG 3077 affinitätschromatographisch über eine Protein-A Säule aufgereinigt.

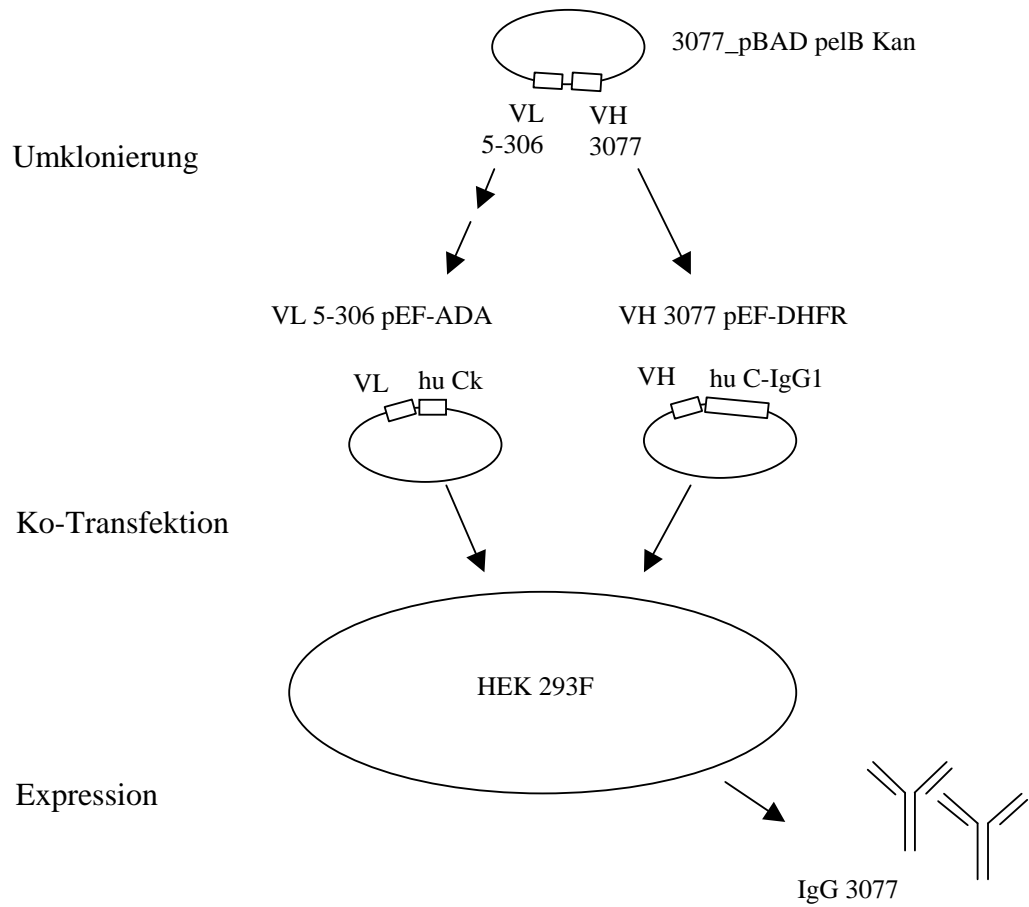


Abb. 20: Klonierung und Produktion des IgG1-Antikörpers 3077

Ausgehend vom scFv-Konstrukt 3077_pBAD-pelB-Kan wurden die VH- und VL-Ketten zunächst einzeln in die eukaryotischen Expressionsvektoren pEF-DHFR bzw. pEF-ADA umkloniert. Im Zuge dieser Umklonierung erfolgte die Fusion der VH-Kette 3077 mit dem humanen konstanten gamma-1 Fragment und der VL-Kette 5-306 mit dem konstanten humanen kappa Fragment. Kotransfektion von beiden eukaryotischen Expressionsvektoren in HEK293F Zellen resultierte in der Produktion eines Antikörpers, der als IgG 3077 bezeichnet wurde.

4.4.3 Vergleich der Konstrukte scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077

4.4.3.1 Bestimmung der Bindungskinetik

Die kinetischen Parameter der Bindung des scFv 3077-PEG und des humanen IgG 3077 wurden durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie am Biacore-Gerät ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Tab. 6 im Vergleich zu scFv 3077 zusammengefasst. Dabei konnte ein durch die PEGylierung vermittelter Abfall in der Assoziationsrate beobachtet werden. Aber während die Assoziationsrate des scFv 3077-PEG im Vergleich zum nackten scFv 3077 um etwa das 60fache erniedrigt war, blieb die Dissoziationsrate durch die PEGylierung unbeeinträchtigt. Dies führte insgesamt zu einer moderaten Verschlechterung der Dissoziationskonstante K_D von $1,2 \times 10^{-9}$ M für den scFv 3077 zu $4,3 \times 10^{-8}$ M für den scFv 3077-PEG.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Berichten von Yang et al. (2003), die ebenfalls eine verringerte Assoziationskonstante nach PEGylierung von scFv-Konstrukten feststellten. Diese Beobachtung lässt sich zumindest teilweise durch das erhöhte Molekulargewicht und den stark vergrößerten hydrodynamischen Radius des PEGylierten Moleküls erklären.

	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [M]
scFv 3077	$1,7 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \pm 0,7 \times 10^{-9}$
scFv 3077-PEG	$2,7 \pm 1,7 \times 10^4$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$4,3 \pm 2,7 \times 10^{-8}$
IgG 3077	$5,3 \pm 2,5 \times 10^5$	$5,3 \pm 8,3 \times 10^{-5}$	$1,0 \pm 0,6 \times 10^{-10}$

Tab. 6: Vergleich der Bindungskinetik von scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077

Assoziations- und Dissoziationsraten der 3077-Varianten wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gemessen und nachfolgend die Dissoziationskonstante $K_D = k_d/k_a$ errechnet. Die Messung erfolgte in einer Verdünnungsreihe an einem mit Leukine® beschichteten CM5-Sensorchip im Biacore-Gerät. Es wurden 10 µl der Proteinlösung über einen Zeitraum von 100 s in die Flusszelle injiziert (Assoziation). Anschließend wurde mit Laufpuffer HBS-EP gewaschen (20 µl/s) und die Dissoziation über einen Zeitraum von 100 s beobachtet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte (nach Langmuir) mit der BIA-Evaluation-Software.

4.4.3.2 Vergleich des Neutralisierungspotentials

Um den Einfluss des Antikörperformats auf die Neutralisierungseffizienz zu untersuchen, wurden Neutralisationstests mit TF-1-Zellen durchgeführt. Dabei wurde die Inhibition der hGM-CSF-abhängigen Proliferation von TF-1-Zellen durch die verschiedenen Konstrukte scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077 miteinander verglichen.

Der Vergleich von scFv 3077 und scFv 3077-PEG zeigte interessanterweise für beide Konstrukte nahezu identische Werte für die halbmaximale Inhibition (IC₅₀) der hGM-CSF vermittelten TF-1-Proliferation (scFv 3077: 15,9 nM bzw. scFv 3077-PEG: 15,1 nM). Die durch die PEGylierung verursachte Verschlechterung in der Gesamtaffinität resultierte also nicht in einer Reduktion der biologischen Effektivität des Moleküls (Abb. 21 A).

Bei einem Vergleich von scFv 3077 mit dem IgG 3077 wurde jedoch ein deutlicher Unterschied in der Neutralisierungseffizienz beider Konstrukte beobachtet. Der IC₅₀-Wert von IgG 3077 lag mit 1,9 nM deutlich unter demjenigen von scFv 3077 (Abb. 21 C).

4.4.3.3 Stabilität

Es war bereits gezeigt worden, dass das scFv-Fragment 3077 eine hohe Resistenz gegenüber Denaturierung durch GdnHCl besitzt. Seine Stabilität sollte nun in weiteren, physiologisch relevanteren Tests mit der Stabilität der beiden anderen Formate verglichen werden.

4.4.3.3.1 Serumstabilität

Da die Resistenz gegenüber Serumproteasen für den klinischen Einsatz eines Antikörpers von besonderer Bedeutung ist, wurde ein Vergleich der Stabilität aller drei Antikörper-Formate in Humanserum durchgeführt.

Dazu wurden scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077 in 50% Humanserum verdünnt und bis zu 7 Tage bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Bioaktivität aller Proben parallel in einem TF-1-Proliferations-Inhibitionstest bestimmt.

Abb. 22 zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. Alle drei Moleküle erwiesen sich als äußerst stabil. Selbst nach einer Inkubation für 7 Tage bei 37°C war kein Verlust in der biologischen Aktivität zu erkennen. Die Neutralisation von hGM-CSF erfolgte mit der gleichen Effizienz wie ohne vorherige Inkubation.

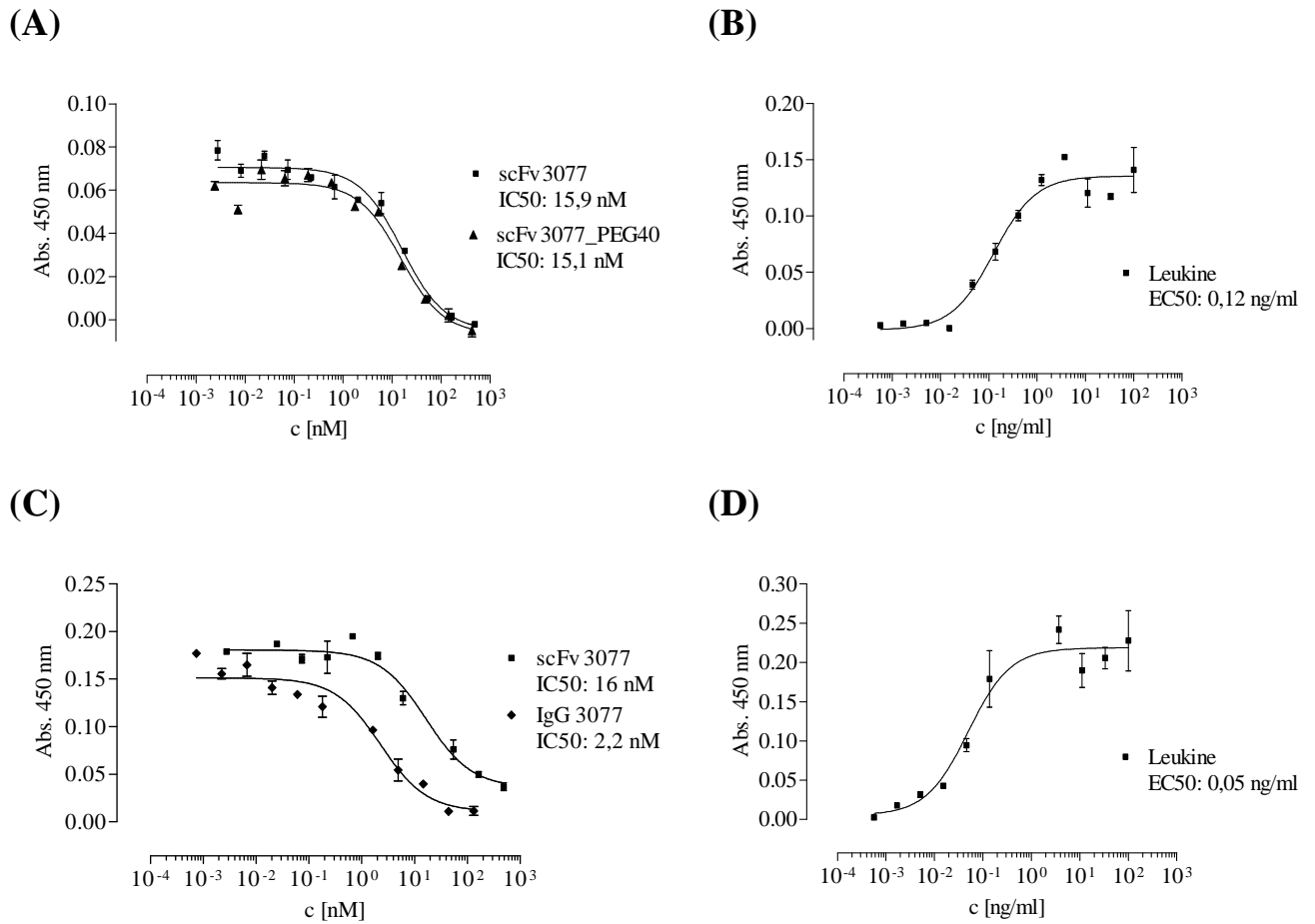


Abb. 21 : Vergleich der hGM-CSF Neutralisationseffizienz von scFv 3077 mit der PEGylierten Variante 3077-PEG und dem vollständigen Antikörper IgG 3077

hGM-CSF-abhängig wachsende TF-1-Zellen wurden für 72 h in Anwesenheit von 0,3 ng/ml hGM-CSF mit verschiedenen Konzentrationen der zu vergleichenden scFv-Antikörper 3077 und seiner PEGylierten Variante 3077-PEG bzw. des vollständigen Antikörpermoleküls IgG 3077 inkubiert.

Parallel dazu wurden TF-1-Zellen als Kontrolle für die Proliferation und zur Bestimmung der halbmaximalen Effektorkonzentration von hGM-CSF mit einer Verdünnungsreihe hGM-CSF inkubiert.

Die Proliferation der Zellen wurde anhand der durch Zugabe von WST-1 Reagenz hervorgerufenen Farbreaktion quantifiziert. Die bei 450 nm gemessene Absorption wurde gegen die Konzentration an scFv-Antikörper (bzw. hGM-CSF) aufgetragen. Mit Hilfe der Prism-Software wurde eine nicht-lineare Regressionskurve angepasst und anhand dieser die halbmaximale Inhibition der Proliferation bestimmt.

In Abbildungen (A) und (C) ist die Inhibition der Proliferation von TF-1-Zellen in Anwesenheit einer Konzentrationsreihe der zu vergleichenden Antikörper bzw. Antikörperfragmente gezeigt. (B) und (D) zeigen die parallel dazu gemessene, von der hGM-CSF-Konzentration abhängige Proliferation der TF-1-Zellen.

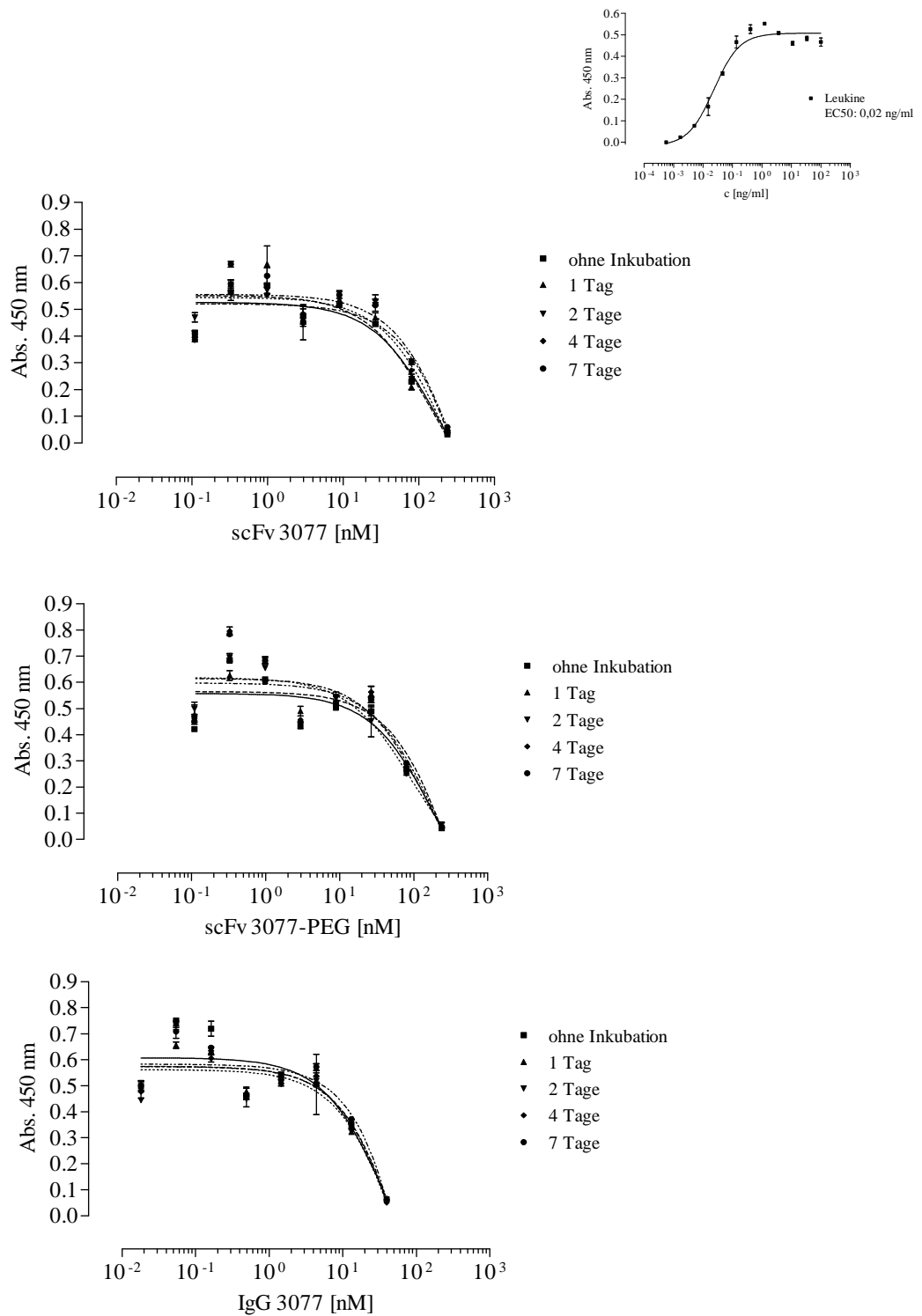


Abb. 22: Vergleich der Stabilität von scFv 3077 mit der PEGylierten Variante 3077 und dem vollständigen Antikörper IgG3077

scFv 3077 (A), scFv 3077-PEG (B) und IgG3077 (C) wurden jeweils für 1, 2, 4 oder 7 Tage bei 37°C in Anwesenheit von 50% humanem Serum inkubiert, nachfolgend bei -80°C eingefroren und schließlich im TF-1-Proliferations-Inhibitionstest auf ihre hGM-CSF-neutralisierende Aktivität getestet.

4.4.3.3.2 Thermische Stabilität

Um den Einfluss des Antikörperformates auf thermische Stabilität zu untersuchen, wurde monomerer scFv 3077, seine PEGylierte Variante scFv 3077-PEG und der vollständige IgG 3077 ansteigenden Temperaturen ausgesetzt und anschließend auf ihre biologische Aktivität hin überprüft.

Zunächst wurden alle drei Proteine für 5 min auf Temperaturen von 40 – 100°C erhitzt. Nach dem Erhitzen wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt und ein TF-1-Proliferations-Inhibitionstest durchgeführt. Als Kontrolle für die Inhibition der Proliferation wurde nicht hitzebehandeltes scFv 3077, scFv 3077-PEG bzw IgG 3077 mitgeführt.

Wie Abb. 23 zeigt, war die Sensitivität der Fragmente gegenüber Inaktivierung durch Hitzeeinwirkung unterschiedlich ausgeprägt. Der scFv 3077 verlor bereits ab 65°C zunehmend an Aktivität, während dies bei scFv 3077-PEG erst ab 75°C der Fall war. Vollständiger Verlust der GM-CSF-neutralisierenden Aktivität war für scFv 3077 nach Inkubation bei 85°C zu beobachten. Die PEGylierte Variante war erst ab 95°C vollständig inaktiv. Das IgG 3077 Molekül war bis zu einer Temperatur von 75°C gleichbleibend aktiv. Anders als bei den scFv-Molekülen verlor der IgG-Antikörper nicht graduell mit zunehmender Temperatur an Aktivität, sondern war bereits ab einer Inkubation bei 85°C vollständig inaktiv (Abb. 23).

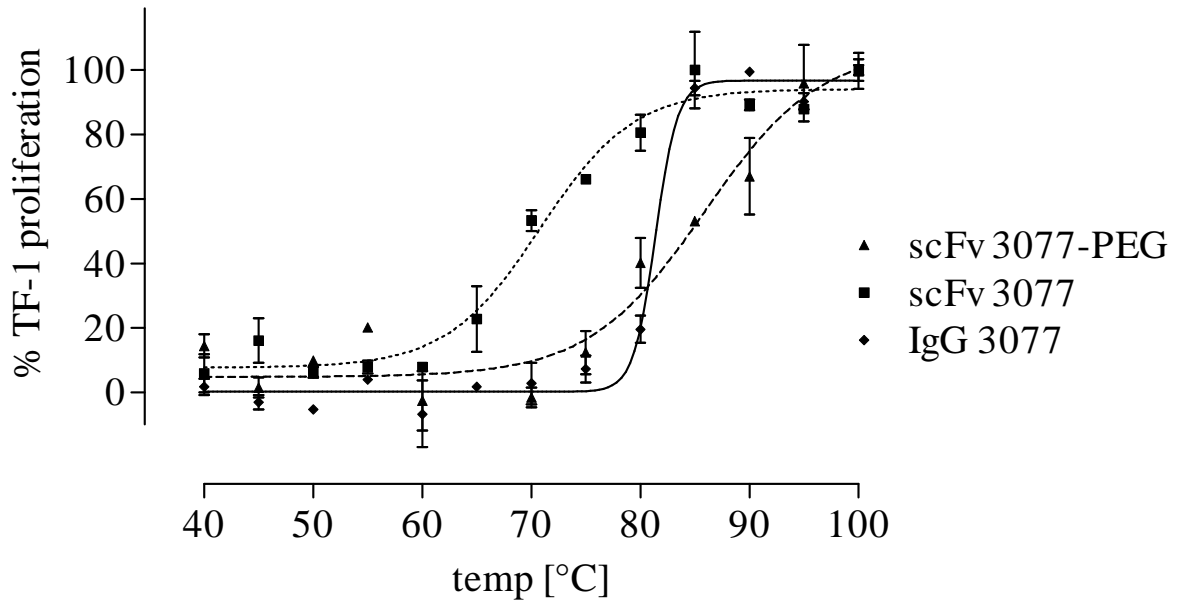


Abb. 23: Vergleich der thermischen Stabilität von scFv 3077 mit der PEGylierten Variante 3077-PEG und dem vollständigen Antikörper IgG 3077

scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077 wurden für jeweils 5 min verschiedenen Temperaturen (40 – 100°C) ausgesetzt und nachfolgend in einem TF-1-Proliferations-Inhibitionstest auf ihre Neutralisierungsfähigkeit hin überprüft.

5. DISKUSSION

5.1 Der Austausch der leichten Kette führt zur erfolgreichen funktionellen Expression eines zunächst nicht löslich produzierbaren scFv-Antikörpers

Diese Arbeit beschreibt die erfolgreiche Selektion eines humanen scFv-Antikörpers mit nanomolarer Neutralisationseffizienz für humanes GM-CSF (hGM-CSF). Ausgangspunkt der Selektion war ein Ratten-Antikörper mit hGM-CSF-neutralisierender Bindungsspezifität. Die VH- und VL-Regionen dieses Antikörpers wurden im Format eines scFv-Antikörpers kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das Protein war allerdings bei periplasmatischer Expression nicht nachweisbar und die Expression im Zytoplasma von *E. coli* führte zur Aggregation von unlöslichem Protein in Einschlusskörperchen. Durch Rückfaltung des Proteins *in vitro* erhielt dieses Material jedoch hGM-CSF-neutralisierende, biologische Aktivität. Dieses Ergebnis bestätigte, dass tatsächlich funktionelle schwere und leichte Ketten kloniert worden waren. Da mRNA Moleküle von nicht-funktionellen, nicht-produktiven V-Regionen in Hybridomen sehr oft auftreten, stellen sie ein Problem bei der Klonierung der genetischen Information von Antikörpern dar (Krebber et al., 1997). Die Bestätigung der Funktionalität des rückgefalteten Materials war daher essentiell, bevor mit der Weiterentwicklung und der Optimierung der Exprimierbarkeit des parentalen scFv-Moleküls begonnen werden konnte.

Die Expression von scFv-Antikörpern erfolgt in *E. coli* bevorzugt periplasmatisch. Das scFv-Fragment wird dabei durch eine N-terminale Leader-Sequenz in den periplasmatischen Raum zwischen äußerer und innerer Membran des Bakteriums dirigiert. Aufgrund der dort herrschenden oxidierenden Bedingungen können sich die intramolekularen Disulfidbrücken der schweren und leichten Ketten ausbilden, wodurch die korrekte Faltung der Antikörperfragmente begünstigt wird und das Protein eine lösliche, funktionelle Form erlangt (Charlton, 2004). Während mit einigen Konstrukten große Ausbeuten an löslichem funktionalem scFv-Fragment im Milligramm Bereich pro Liter Kultur erzielt werden können, lassen sich manche Fragmente nicht auf diese Art im Periplasma, sondern nur unlöslich in zytoplasmatischen Einschlusskörperchen („*inclusion bodies*“) exprimieren.

Die Tatsache, dass Schwierigkeiten bei der Expression von scFv-Antikörpern in Prokaryoten öfter beobachtet werden, spiegelt sich in einer Reihe von Publikationen wider. So wurde z.B. berichtet, dass die periplasmatische Expression eines scFv-Fragments gegen das Hepatitis B Oberflächenantigen (HbsAg) als VL-VH Fusion effizienter ist als in der VH-VL

Konformation (Ayala et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen konnten die lösliche Expression von scFv-Fragmenten im Zytoplasma (Bach et al., 2001) oder Periplasma (Muramatsu et al., 2005) durch Fusion mit Maltose-bindendem Protein (*E. coli*) fördern. Das Maltose-bindende Protein wirkt dabei als Chaperon bei der Faltung des Fusionspartners (Kapust und Waugh, 1999).

Ein ausschlaggebender Faktor für die Exprimierbarkeit von scFv-Fragmenten im Periplasma von *E. coli* scheint zu sein, in welchem Ausmaß Zwischenprodukte, die beim Faltungsprozess des Proteins entstehen, zur Aggregatbildung neigen. Bei der Klonierung eines Hybridantikörpers als scFv-Fragment gelangen hydrophobe Bereiche, die im vollständigen Antikörper an der Interaktionsfläche zwischen konstanten und variablen Domänen verborgen sind, an die Außenseite des scFv-Moleküls. Dadurch werden intermolekulare, hydrophobe Wechselwirkungen möglich und fördern die Aggregation der Moleküle. Ausmaß und exakte Lage dieser hydrophoben Bereiche scheinen die periplasmatische Exprimierbarkeit der scFv-Moleküle in *E. coli* entscheidend zu beeinflussen (Nieba et al., 1997).

Zwar wurden einige Schlüsselpositionen in der scFv-Sequenz identifiziert, die deutlichen Einfluss auf die Exprimierbarkeit haben (Ewert et al., 2003a), die Optimierung von einzelnen scFv-Antikörpern durch Einführung von Mutationen bleibt jedoch ein aufwändiges und langwieriges Unterfangen. Daher wurde eine einfachere und gleichwohl effiziente Strategie entwickelt, ein exprimierbares scFv-Fragment zu generieren. Mit diesem Ziel wurde in der vorliegenden Arbeit die aus dem Ratten-Hybridantikörper stammende leichte Kette des initialen, nicht exprimierbaren scFv-Moleküls durch ein humanes V-kappa Repertoire ersetzt. In einem nachfolgenden Selektionsprozess auf hGM-CSF-Bindung wurden mit Hilfe der Phage-Display-Technologie hGM-CSF-spezifische scFv-Antikörper identifiziert, die sich effizient im Periplasma von *E. coli* exprimieren ließen. Dies zeigt, dass der Austausch der VL-Kette, unter Beibehaltung der VH-Region eine geeignete Methode darstellt, um aus zunächst nicht löslich produzierbaren scFv-Molekülen, funktionell exprimierbare Antikörperfragmente gleicher Spezifität zu generieren.

Diese Beobachtung wird durch eine kürzlich publizierte Arbeit (Rojas et al., 2004) bestätigt, die die Klonierung eines scFv-Antikörpers ausgehend von einem Hybridantikörper mit Bindungsspezifität gegen N-glycolyl GM3-Gangliosid beschreibt. Dazu wurden aus Hybridomzellen isolierte VH- und VL-Fragmente direkt in einen Phagemidvektor kloniert, um diese im scFv-Format auf der Oberfläche von Phagen zu exprimieren und die N-glycolyl GM3-Gangliosid-bindende Spezifität zu identifizieren. Aufgrund fehlender

periplasmatischer Expression waren die scFv-Fragmente nicht auf der Phagenoberfläche darstellbar. Nach Austausch der leichten Kette wurden mittels Phage-Display jedoch verschiedene N-glycolyl GM3-Gangliosid-bindende Spezifitäten selektiert. Dies gelang unabhängig davon, ob das VL-Repertoire murinen oder humanen Ursprungs war. Die Verwendung eines humanen V kappa-Repertoires führte dabei zu einer deutlich höheren Zahl bindender Klone als die Verwendung eines V lambda-Repertoires.

5.2 Phage-Display-Selektion führt zur Isolierung eines hGM-CSF-neutralisierenden scFv-Fragments, dessen leichte V-Kette dieselbe kanonische Struktur ausbildet wie die parentale VL-Region

In der hier beschriebenen Selektion auf hGM-CSF-Bindung wurde im Austausch gegen die parentale VL-Kette ein humanes V-kappa Repertoire gewählt. Da die parentale leichte Kette dem V-kappa Typ angehörte, war davon auszugehen, dass die VH-Kette des Ursprungsantikörpers mit einer leichten Kette dieses Typs eine antigenspezifische Kombination bilden kann.

Die beiden aus dieser Selektion identifizierten leichten Ketten wurden einem Datenbankvergleich unterzogen und konnten beide der V-kappa 1 Familie zugeordnet werden. Es spricht für einen starken Ausleseprozess, dass beide selektierten VL-Ketten außerdem von demselben Keimbahnsegment O12 abgeleitet sind und sehr hohe Sequenzübereinstimmung untereinander aufweisen.

Die Sequenzübereinstimmung zur parentalen VL-Kette beträgt dagegen nur 60%. Die theoretisch nach Al-Lazikani et al. (1997) erwartete kanonische Struktur der selektierten VL-Sequenzen entspricht jedoch der kanonischen Struktur der parentalen VL-Region. Eine Präferenz für V-Gene mit gleicher kanonischer Struktur in „*Guided Selection*“-Prozessen wurde bereits beschrieben (Jespers et al., 1994; Klimka et al., 2000) und bestätigt sich in der hier vorliegenden Arbeit.

Diese wiederholte Übereinstimmung belegt, dass die dreidimensionale Struktur von VH- und VL-Ketten, ein wichtiges Kriterium für ihre Kombinierbarkeit zu einem antigenbindenden Molekül bestimmter Spezifität darstellt.

Ein weiterer Grund für die Selektion einer VL-Kette vom V-kappa 1 Typ könnte die hohe biophysikalische Stabilität dieser Fragmente sein. Nur V-kappa 3 Fragmente sind stabiler (Ewert et al., 2003b). Möglicherweise waren die selektierten VL-Ketten aufgrund

dieser intrinsischen Stabilität in der Lage, die parentale VH-Kette bei der Expression in *E. coli* zu stabilisieren und so ein funktionell exprimierbares scFv-Molekül zu bilden.

Von beiden isolierten Klonen wurde der Klon 5-306 mehrmals identifiziert und dominierte gegenüber dem zweiten Klon. Dies war ein eindeutiges Zeichen für die überlegenen Eigenschaften dieses Moleküls hinsichtlich Bindungsstärke und Exprimierbarkeit. Der Test auf Inhibition der hGM-CSF-Bindung bestätigte diese Annahme und zeigte, dass der Klon 5-306 gute Neutralisierungseigenschaften besitzt. Aus diesem Grund wurde die leichte V-Kette dieses Klons als Leitstruktur für die Selektion einer humanen VH-Kette eingesetzt.

5.3 Phage-Display-Selektion einer schweren Kette unter Beibehaltung der CDR3 Sequenz

Da Antikörper und Antikörperfragmente humanen Ursprungs bei der therapeutischen Anwendung ein deutlich geringeres immunogenes Potential aufweisen als nicht-humane Spezifitäten, wurde das chimäre Ratten/human-Molekül 5-306 einer weiteren Phage-Display-Runde unterzogen. In Kombination zu der vorselektierten humanen VL-Kette wurden humane VH-Sequenzen isoliert, die zu einem hGM-CSF-neutralisierenden scFv-Molekül führten.

Die variable Region der schweren Kette leistet einen höheren Beitrag zur Bindungsspezifität als die der leichten Kette (Kabat und Wu, 1991; Merchant et al., 1998; Sidhu et al., 2004), weshalb die Selektion neuer Kombinationen zu einer bestehenden VL-Kette meist anspruchsvoller ist als die umgekehrte Situation.

In den meisten Fällen bleibt bei Phage-Display-Selektionen mit der „*Guided Selection*“-Methode das Bindungsepitop erhalten (Raum et al., 2001; Thomas et al., 1996). Es gibt in der Literatur jedoch auch Berichte, dass es trotz des Einsatzes einer leichten oder schweren V-Kette als Leitstruktur zu einer deutlichen Epitopverschiebung kommt (Kang et al., 1991; Ohlin et al., 1996). Dieser Effekt wird als „*Epitope Drift*“ bezeichnet (Ohlin et al., 1996).

Die Neutralisierung von hGM-CSF erfordert die Bindung des Antikörpers in einem sehr genau umschriebenen Bereich an der Interaktionsfläche von hGM-CSF mit seinem Rezeptor. Aus diesem Grund war es wichtig, die Wahrscheinlichkeit für eine *Epitope Drift* bei der VH-Selektion so gering wie möglich zu halten. Da die CDR3-Region der VH-Kette besonders grossen Einfluss auf die Feinspezifität der Epitoperkennung hat (Xu und Davis, 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit die parentale VH CDR3-Region beibehalten. Das Integrieren einer oder mehrerer CDR-Sequenzen in eine Selektionsbibliothek wurde bereits mehrfach als

zielführend bei der Konservierung der Bindungsspezifität von Antikörperfragmenten beschrieben (Klimka et al., 2000; Rader et al., 1998; Steinberger et al., 2000).

Die DNA-Sequenz der CDR3-Region der VH-Kette entsteht durch somatische Rekombination von drei separaten Gensegmenten (V-, D- und J-Gensegmente), die gemeinsam die vollständige variable Region der schweren Immunglobulin-Kette bilden. Spezielle Rekombinationsmechanismen sorgen für zusätzliche Diversität im Bereich der Verbindungsstellen zwischen diesen Gensegmenten (Sanz, 1991). Damit ist die CDR3-Region der schweren Kette der Bereich mit der am stärksten ausgeprägten Sequenzvariabilität innerhalb des Antikörpers.

Aufgrund dieser hohen Diversität der VH CDR3-Region ist es meist nicht möglich, die Aminosäuresequenz von CDR3 einer bestimmten Spezies zuzuordnen. Damit determiniert das humane VH-Gerüst und die Kombination mit einer humanen VL-Kette die Spezieszugehörigkeit des selektierten Antikörperfragments. Die selektierten scFv-Fragmente können somit als human betrachtet werden.

5.4 Die VH-Selektion führt zur Identifikation von zehn verschiedenen, teils hochaffinen hGM-CSF-Bindern

Der Selektionsprozess fand parallel einerseits mit *E. coli*-produziertem, nicht glycosyliertem und andererseits mit in Hefe produziertem, glycosyliertem hGM-CSF statt. In beiden Fällen führte die Selektion nach vier Phage-Display-Runden zu einer starken Anreicherung Antigenbindender scFv-Fragmente.

Die zehn verschiedenen, anhand von Sequenzdaten identifizierten Klone wiesen untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad auf. Datenbank-Vergleiche zeigten, dass alle zehn Klone der VH1-Subfamilie angehören und von einem einzigen Keimbahnfragment (VH1 1-O2) abstammen. Dies lässt, wie bereits bei der Selektion der VL-Kette beobachtet, auf einen starken Selektionsdruck schließen, der diese Sequenzfamilie begünstigte.

Dafür spricht auch, dass eine Reihe von selektierten Klonen eine ausgeprägte Bindungsaffinität für hGM-CSF zeigen. Die anhand von Oberflächenplasmonresonanz-Messung ermittelten Dissoziationskonstanten lagen für drei von zehn Klonen (3035, 3132, 3077) sogar im nanomolaren Bereich (1×10^{-9} M bis 9×10^{-9} M). Die niedrigste Dissoziationskonstante (1×10^{-9} M) wurde für den Klon 3077 ermittelt, der nachfolgend auch als Modellkonstrukt in andere Antikörperformate überführt wurde.

Diese Bindungsstärken der scFv-Moleküle liegen im hochaffinen Bereich und wie für die hier angewandten Selektionsbedingungen erwartet. Es wurde beschrieben, dass bei einge-

setzten Antigenkonzentrationen von 1-10 nM, scFv-Fragmente mit Affinitäten von $0,1 - 100 \times 10^{-9}$ M selektiert werden können (Dennis, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine hGM-CSF-Konzentration von 10 nM für die Selektion der humanen VH-Ketten verwendet. Die Affinität des stärksten Binders von 1×10^{-9} M (3077) liegt damit bereits im oberen Bereich der erwarteten Bindungsstärke.

Interessanterweise wurde auch ein Klon, Nr. 3039, identifiziert, dessen Dissoziationskonstante mit $1,7 \times 10^{-6}$ M deutlich ungünstiger war. Im Vergleich mit den Sequenzdaten ergibt sich eine schlüssige Erklärung für dieses Ergebnis. Klon 3039 hatte im Sequenzbereich der VH CDR3-Region einen Nukleotidaustausch, der auf Aminosäureebene zum Austausch eines Glycins gegen ein Serin führte. Vermutlich kam diese Mutation durch einen Fehler bei der PCR-Amplifikation der VH-Fragmente zustande. Da der VH CDR3-Region besondere Bedeutung für die Bindungseigenschaften eines Antikörpermoleküls zukommt (Xu und Davis, 2000), ist die hohe Dissoziationskonstante des Klons 3039 auf diesen Aminosäureaustausch zurückzuführen. Dieser Klon konnte vermutlich nur deshalb noch in der vierten Selektionsrunde gefunden werden, da die Konkurrenz um freie Bindungsstellen während der Selektion noch nicht so ausgeprägt war. Theoretisch wäre zu erwarten, dass dieser Klon in weiteren Selektionsrunden von Bindern der höher affinen, dominanteren Klone verdrängt würde.

5.5 Auswahl des Testsystems für die Neutralisierung von humanem GM-CSF

Neben der Affinität war die Neutralisierungseffizienz das ausschlaggebende Auswahlkriterium für die hGM-CSF-Binder. Mit dem zur Identifikation der halb-humanen Zwischenstufe verwendeten, durchflußzytometrischen Neutralisationstest konnte lediglich die Inhibition der hGM-CSF-Bindung auf der Zelloberfläche verfolgt werden. Für die Charakterisierung der vollständig humanen scFv-Fragmente wurde dagegen ein Zell-basierter Test für die Neutralisierung von hGM-CSF eingesetzt. Als Maß für die biologische Aktivität von hGM-CSF wurde die Proliferation der hGM-CSF-abhängigen Zelllinie TF-1 gemessen. Dieser Test ist dem durchflußzytometrischen Test aus folgenden Gründen vorzuziehen: die Bindung von FITC-markiertem hGM-CSF an TF-1-Zellen erschien bei Messung am Durchflußzytometer nur als schwaches Signal. Diese geringe Signalstärke erschwert die Erfassung von feinen Abstufungen in der Wirksamkeit, mit der die hGM-CSF-Bindung durch unterschiedliche scFv-Antikörper inhibiert wird und damit die Quantifizierung der Neutralisierung.

Für eine therapeutische Anwendung ist es essentiell, dass die Moleküle bei physiologischen Temperaturen stabil und funktionell sind. Der entscheidende Vorteil des Proliferations-Inhibitionstests ist daher, dass diese Eigenschaften der scFv-Fragmente mit in das Testergebnis einfließen. Für die Inhibition der TF-1-Proliferation ist nicht nur die Affinität ausschlaggebend, mit der das neutralisierende Antikörperfragment an das mit dem Rezeptor interagierende Epitop bindet. Vielmehr muss die Interaktion von hGM-CSF mit seinem Rezeptor über einen langen Zeitraum bei einer Temperatur von 37°C verhindert werden. Ein zellulärer Neutralisierungsassay simuliert daher deutlich genauer als der durchflußzytometrische Test die *in vivo* Situation, in der sich ein therapeutisches scFv-Molekül bewähren müsste.

5.6 Die humanen hGM-CSF bindenden scFv-Fragmente zeigen sehr unterschiedliches Neutralisationsverhalten

Die Analyse der Neutralisationseffizienz zeigte tatsächlich deutliche Unterschiede in der Fähigkeit der einzelnen Klone, die hGM-CSF-abhängige Proliferation von TF-1-Zellen zu hemmen. Während die Klone 3152, 2130, 2103 und 3132 minimale bis gar keine Inhibition der hGM-CSF-abhängigen TF-1-Proliferation zeigten, waren 2042, 2057, 3080 und 3039 mittelmäßig aktiv. Die effizienteste Neutralisierung der proliferativen Aktivität von hGM-CSF wurde für 3077 und 3035 gemessen. Diese beiden Klone zeigten hervorragende Neutralisierungseigenschaften im nanomolaren Bereich.

Ein Vergleich von Affinität und Neutralisationseffizienz ließ keinen eindeutigen Zusammenhang der Eigenschaften erkennen. Klone mit annähernd gleicher Bindungsaffinität wiesen deutliche Unterschiede in der Neutralisationseffizienz auf. Die Dissoziationskonstanten der Klone 3152, 2042 und 3080 lagen in derselben Größenordnung (1,7 bis $3,5 \times 10^{-8}$ M), während ihr Neutralisierungspotential klar differierte: 3152 zeigte minimale Neutralisation, 2042 dagegen war ein mittelmäßiger (IC₅₀: 99 nM) und 3080 (IC₅₀: 19 nM) sogar ein recht guter Neutralisierer.

Es gibt prinzipiell zwei Erklärungsmöglichkeiten für diese Beobachtung: zum einen kann eine Verschiebung des Bindungsepitops (*Epitope Drift*) zu einer schwächeren Neutralisierung führen. Dies ist aufgrund der Aufrechterhaltung des CDR3-Bereichs der VH-Kette nicht sehr wahrscheinlich, kann jedoch auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Zum anderen können auch Unterschiede in der Stabilität der scFv-Fragmente zu diesem Ergebnis führen. Sequenzabweichungen in den Gerüstregionen und auch den CDR1- und CDR2-Regionen der

verschiedenen Konstrukte dürften deren thermodynamische Stabilität beeinflussen. Vermutlich manifestieren sich diese Unterschiede in der Affinitätsbestimmung durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, die bei Raumtemperatur durchgeführt wird, nicht. Die Inkubation bei 37°C für einen Zeitraum von 72 Stunden wie beim Proliferations-Inhibitionstest mit TF-1-Zellen führt dagegen eher zur Auffaltung weniger stabiler Konstrukte, wodurch diese ihre Bindungsfähigkeit verlieren können.

Einen Hinweis auf den entscheidenden Einfluss der Stabilität könnten die für den Klon 3039 ermittelten Werte liefern: für diesen Klon ist eine deutliche Diskrepanz von kinetischen Bindungseigenschaften und Neutralisierungseffizienz festzustellen. Die Dissoziationskonstante dieses Klons wurde mit $3,5 \times 10^{-6}$ M bestimmt, während sein IC50 Wert mit 130 nM im mittleren Bereich lag. Dass dieses Konstrukt dennoch effektiver erscheint als andere, höher affine könnte an einer entsprechend stärker ausgeprägten Stabilität des Klones liegen.

Festzuhalten ist, dass zwei Klone mit hoher Sequenzübereinstimmung – 3035 und 3077 - identifiziert wurden, die beide hervorragende kinetische Bindungseigenschaften und eine gute Neutralisierungseffizienz bewiesen. Da sich der Klon 3077 durch eine etwa zehnfach schnellere Assoziationsrate auszeichnet, wurde dieser Klon ausgewählt, um nachfolgend verschiedene Antikörperformate vergleichend zu analysieren.

5.7 ScFv-Fragment 3077 zeigt hohe thermodynamische Stabilität

Wie vorstehend ausgeführt, war davon auszugehen, dass ein Konstrukt mit guten Neutralisierungseigenschaften im TF-1-Proliferations-Inhibitionstest über eine hohe Stabilität verfügt. Diese Hypothese konnte durch die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität des scFv-Fragments 3077 anhand einer Guanidinium-Hydrochlorid (GdnHCl) induzierten Übergangskurve bestätigt werden. Die Denaturierung des scFv-Fragments durch das GdnHCl erfolgte in zwei Schritten und die mittlere GdnHCl-Konzentration der beiden Übergänge wurde mit 2,0 M bzw. 4,2 M GdnHCl bestimmt. Die beobachtete 2-phasige Denaturierung lässt auf eine Zwischenstufe zwischen nativem und vollständig denaturiertem Protein schließen, die bei Einstellung des Reaktionsgleichgewichts auftritt (Wörn und Pluckthun, 2001). Durch den Vergleich mit publizierten Daten zur Stabilität von scFv-Fragmenten gegenüber GdnHCl-induzierter Denaturierung lässt sich scFv 3077 als scFv-Fragment mit hoher thermodynamischer Stabilität einordnen (Ramm et al., 1999; Wörn und Pluckthun, 1998).

5.8 Umwandlung von scFv 3077 in ein humanes IgG-Molekül und in ein PEGyliertes scFv-Fragment

Aus der geringen Größe der scFv-Antikörperfragmente, die die schnelle Verteilung im Körper und ein besseres Eindringen der Moleküle in Gewebe begünstigen, ergeben sich auch Eigenschaften, die einen therapeutischen Einsatz limitieren. So liegt die Halbwertszeit von scFv-Antikörpern im Blut im Bereich von wenigen Stunden (Fitch et al., 1999; Larson et al., 1997). Sie werden damit deutlich schneller aus der Zirkulation eliminiert als ganze Antikörper. Die Ausscheidung der kleinen scFv-Moleküle erfolgt v.a. durch glomeruläre Filtration in den Nieren. Die Poren der Nierenglomeruli wirken dabei wie ein Sieb und halten größere Moleküle im Blutstrom zurück, während die kleineren filtriert werden. Da scFv-Moleküle kleiner sind als die Ausschlussgröße dieser Poren werden sie rasch aus dem Blut eliminiert (Kang et al., 2000). Die Bedeutung der renalen Ausscheidung wird auch durch die Beobachtung verdeutlicht, dass sich die Halbwertszeit eines scFv-Fragments mit Spezifität für ein humanes Fibrin-Fragment in Kaninchen durch Nephrektomie von 10 min auf 110 min verlängerte (Laroche et al., 1991).

Es ist anzunehmen, dass sich im Falle eines therapeutischen Einsatzes eine rasche Elimination des hGM-CSF-neutralisierenden scFv-Moleküls limitierend auf seine Effizienz auswirkt. Es sollten daher Varianten der selektierten Spezifität mit potentiell längerer Verweildauer im Körper hergestellt werden.

Zum einen wurde das scFv-Fragment 3077 in ein vollständiges IgG-Molekül umgewandelt. Dazu wurden die variablen Regionen des scFv-Fragments 3077 auf DNA-Ebene mit konstanten Regionen eines humanen IgG1-Antikörpers fusioniert und als vollständiger Antikörper exprimiert. Antikörper vom IgG1-Typ haben eine Serum-Halbwertszeit von bis zu 21 Tagen (Janeway et al., 2002).

Zum anderen wurde das scFv-Format selbst so modifiziert, dass ein Molekül mit potentiell längerer Serumhalbwertszeit resultierte. In der Literatur werden verschiedene Strategien beschrieben, um die biologische Halbwertszeit kleiner Antikörperfragmente im Blut zu verlängern. So wurde z.B. die genetische Fusion an Serumalbumin (Smith et al., 2001) als Möglichkeit aufgezeigt, um die Verweildauer eines scFv-Fragments im Körper zu verlängern. Eine für Pharmazeutika erprobte Methode zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit ist die Koppelung an Polyethylenglycol (PEG). Diese polymeren organischen Substanzen sind nicht toxisch und zeigen keine Immunogenität (Harris und Chess, 2003).

Durch die Bindung dieser Polymere, die in Lösung eng mit Wassermolekülen assoziiert vorliegen, können Proteine vor degradierenden Enzymen, renaler Ausscheidung und Zelloberflächenproteinen abgeschirmt werden. Diese Abschirmung und die mit der PEGylierung einhergehende Erhöhung der molekularen Masse führt zu einer veränderten Pharmakokinetik der Proteine und zu verlängerten biologischen Halbwertszeiten. Auch die Immunogenität wird durch den Abschirmungseffekt im Vergleich zu nicht-PEGyliertem Protein reduziert.

Es können sowohl nieder- (< 20 kDa) als auch hochmolekulare (bis zu 60 kDa) Formen dieser Polymere an Proteine und Peptide konjugiert werden. Bei einer vergleichenden Studie mit PEG-Polymeren verschiedenen Molekulargewichts, wurde gezeigt, dass hochmolekulare PEG-Polymere, die Mäusen intravenös verabreicht wurden, länger in der Blutzirkulation verbleiben als niedermolekulare und die renale Ausscheidungsrate mit zunehmender Polymergröße abnimmt (Yamaoka et al., 1994). Die Halbwertszeit eines PEG-Polymers mit einem Molekulargewicht von 40 kDa im Blutplasma wurde dabei auf acht bis neun Stunden geschätzt.

Neben linearen Polymeren gibt es verzweigte PEG-Polymere. Diese führten gegenüber linearen PEG-Polymeren zu einer weiteren Verbesserung der Schutzwirkung gegenüber proteolytischen Enzymen und damit zu einer weiteren Reduzierung der Immunogenität (Harris und Chess, 2003). Für Antikörperfragmente wurde eine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit durch die Konjugation mit PEG beobachtet (Chapman, 2002; Chapman et al., 1999; Lee et al., 1999). Meist wurde die Konjugation von PEG-Polymeren über die Bindung an Amingruppen von Lysinresten durchgeführt. Anzahl und Bindungsort der konjugierten Polymere war dabei abhängig von der Proteinsequenz. Da die zugänglichen Lysinreste oft nahe der Antigenbindungsstelle liegen, führte diese Methode häufig zu deutlichen Verlusten in der Effizienz der Antigenbindung (Chapman, 2002). Durch eine in den letzten Jahren entwickelte Methode zur gezielten Koppelung von PEG-Molekülen an Antikörperfragmente scheint dieses Problem jedoch lösbar zu sein.

Das Verfahren der gezielten Konjugation eines PEG-Polymers an ein freies Cystein von Antikörperfragmenten wurde zunächst für Fab-Fragmente beschrieben (Chapman et al., 1999). Ein generalisierter Ansatz durch rekombinantes Anfügen eines zusätzlichen, ungepaarten Cysteinrestes am C-Terminus eines scFv-Moleküls wurde von Yang et al. (2003) beschrieben und in einer kürzlich erschienenen Publikation bestätigt (Natarajan et al., 2005). Da die in typischen VH- und VL-Sequenzen auftretenden Cysteine stets an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt und daher kaum zugänglich sind (Padlan, 1994), ist es möglich

ein einzelnes PEG-Polymer gezielt an dieses zusätzlich angefügtes Cystein zu koppeln. So scheint die Bindungsaktivität bei scFv-Fragmenten, die auf diese Art und Weise PEGyliert werden, kaum eingeschränkt zu sein.

Um eine deutlich verlängerte biologische Halbwertszeit zu erreichen, wurde das anti-GM-CSF scFv-Fragment 3077 in der vorliegenden Arbeit kovalent mit einem hochmolekularen verzweigten Polymer von 40 kDa konjugiert. Die kodierende Sequenz des scFv 3077 wurde so modifiziert, dass das Protein ein freies ungepaartes Cystein am C-Terminus aufwies. Über dieses erfolgte die gerichtete Koppelung des PEG-Polymers.

Alle drei Formate des 3077-Moleküls - scFv 3077, scFv 3077-PEG und IgG 3077 - wurden *in vitro* auf ihre Eigenschaften in Hinsicht auf Bindungskinetik, Neutralisierungseffizienz und Stabilität verglichen.

5.9 Das PEGylierte scFv-Fragment 3077 zeigt moderat reduzierte, IgG 3077 deutlich erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zum unkonjugierten scFv-Fragment

Im direkten Vergleich von nicht-PEGyliertem und PEGyliertem scFv 3077 zeigte sich eine leicht reduzierte Assoziationsrate (sechsfach) der PEGylierten Variante, während seine Dissoziationsrate unverändert blieb. Daraus resultierte ein moderater Anstieg in der Dissoziationskonstante. Die verlangsamte Assoziationsrate des PEGylierten scFv 3077 kann auf verschiedene Einflüsse zurückgehen: u.a. wird sie durch die Größe des Moleküls beeinflusst. Durch die Konjugation des 40 kDa PEG-Polymers wird der hydrodynamische Radius des Moleküls vergrößert, was nach der Stokes-Einstein Gleichung eine reduzierte Diffusionsrate zur Folge hat. Zum anderen kann die Zugänglichkeit der Antigenbindungsstelle für ein großes PEG-Polymer erschwert sein. Beide Effekte können zu einer reduzierten Assoziationsrate führen. Die Dissoziationsrate des scFv-Fragments blieb jedoch von der PEGylierung unbeeinträchtigt. Daraus lässt sich ableiten, dass das konjugierte PEG-Polymer die Geschwindigkeit der Assoziation verringert; sobald die Bindung des Antigens erfolgt ist, übt es aber keinen Einfluss auf die Bindung mehr aus. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den bei Yang et al. (2003) publizierten Ergebnissen. Dort wurde ein TNF- α -neutralisierendes scFv-Fragment über ein C-terminales freies Cystein an ein 40 kDa PEG-Polymer konjugiert, was zu einer zehnfach reduzierten Assoziationsrate führte, während die Dissoziationsrate unverändert blieb. Damit bestätigt sich die These, dass die Konjugation von PEG an ein zusätzlich angefügtes Cystein die Bindungsaktivität von scFv-Molekülen nur minimal

beeinträchtigt und daher ein allgemein anwendbares Prinzip darstellt (Natarajan et al., 2005; Yang et al., 2003).

Für den vollständigen Antikörper ergibt sich erwartungsgemäß ein etwas anderes Bild. Es zeigte sich, dass die Dissoziationskonstante des IgG-Antikörpers 3077 etwa um das Zehnfache geringer war als die des scFv-Fragments 3077, was sich aus einer dreifach reduzierten Assoziationsrate und einer 30fach reduzierten Dissoziationsrate im Vergleich zum scFv-Fragment erklärt. Eine Diskrepanz in der Bindungskinetik zwischen mAK und davon abgeleiteten scFv-Fragmenten wird regelmäßig beschrieben, wobei die Dissoziationskonstante des scFv-Fragments dabei stets höher war, d.h. das scFv-Molekül hatte eine geringere Affinität als der vollständige Antikörper (Choi et al., 2004; Krauss et al., 2003; Muramatsu et al., 2005). Dabei ist zu beachten, dass ein vollständiger Antikörper anders als ein scFv-Fragment zwei Antigenbindungsstellen hat. Daher können auch Aviditätseffekte bei der Bestimmung der Bindungskinetik eine Rolle spielen. Vor allem aber die höhere Gesamtstabilität des IgG sowie diejenige der aus der VH- und VL-Kette gebildeten Antigenbindungsstelle des IgG-Antikörpers sind als Grund für die bessere Bindungskinetik anzusehen.

5.10 Der Antikörper IgG 3077 neutralisiert hGM-CSF besser als das scFv-Fragment 3077, während die Neutralisierungseffizienz durch PEGylierung unverändert bleibt

Bei der Untersuchung des Neutralisierungspotentials der verschiedenen 3077-Fragmente zeigte sich eine deutliche Überlegenheit des IgG-Antikörpers. Dieses Molekül hatte eine etwa zehnmal höhere Effizienz in der Inhibition der TF-1-Zell-Proliferation als das nicht PEGylierte scFv-Fragment 3077 – ein Effekt der vermutlich durch die höhere Affinität und die zweite Bindungswalenz des IgG-Antikörpers zu erklären ist.

Interessanterweise konnte in den Neutralisierungstests kein Unterschied in der Effizienz des PEGylierten und des nicht-PEGylierten scFv-Fragments festgestellt werden. Beide Moleküle waren im Hinblick auf die Hemmung der Proliferation von TF-1-Zellen gleich potent. Zusammen mit den Daten zur Bindungskinetik lässt dies den Schluss zu, dass die Dissoziationsrate den bedeutenderen Einfluss auf die Neutralisierung von hGM-CSF hat als die Assoziationsrate. Möglicherweise gleicht auch ein Stabilitätsgewinn durch PEGylierung die reduzierte Assoziationsrate aus. Damit wäre eine Parallele zu den Daten der verschiedenen scFv-Fragmente nach Selektion der VH-Kette zu erkennen. Auch dort war ersichtlich, dass

eine ähnliche Bindungskinetik nicht zwingend zur gleichen Neutralisierungseffizienz führt, sondern dass diese durch weitere Eigenschaften des Moleküls beeinflusst wird.

5.11 Alle molekularen Formate des 3077-Moleküls zeigen eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber Serumproteasen

Da klinisch relevante Antikörper und scFv-Fragmente bei Körpertemperatur stabil und resistent gegenüber Serumproteasen sein müssen, wurde ihre Stabilität durch die Bestimmung der verbliebenen Neutralisierungsaktivität nach Inkubation in humanem Serum bei 37°C getestet. Es zeigte sich eine außerordentlich hohe Resistenz aller drei Molekülformate gegenüber der Inkubation in humanem Serum bei 37°C. Dieses Ergebnis war für das IgG-Molekül 3077 nicht so unerwartet wie für die beiden scFv-Varianten, da IgG-Moleküle *in vivo* bekanntermaßen eine Halbwertszeit von bis zu 21 Tagen haben.

Anhand der GdnHCl-Denaturierungskurve war bereits gezeigt worden, dass das scFv-Fragment 3077 ein Molekül mit relativ hoher thermodynamischer Stabilität ist. Durch die Ergebnisse aus dem Test der Serumstabilität wurde dies eindeutig bestätigt: selbst nach einem Zeitraum von sieben Tagen, war keine nennenswerte Reduktion in der Neutralisierungseffizienz im Proliferations-Inhibitionstest mit TF-1-Zellen zu erkennen. Es gibt in der Literatur durchaus Beispiele für scFv-Moleküle mit vergleichbarer Serumstabilität. Krauss et al. (2003) beschrieben hochstabile scFv-Fragmente, die nach Inkubation in Humanserum bei 37°C für sechs Tage eine fast unveränderte Bindungsaktivität gegen humanes CD22 zeigten. Diese Fragmente waren durch Übertragung von CDR-Regionen eines murinen Antikörpers auf ein besonders stabiles, humanes scFv-Gerüst generiert worden. In einer anderen Publikation wurde gezeigt, dass die Serumstabilität eines anti-EGP-2 scFv-Fragments durch Übertragung der CDR-Regionen auf eine stabile Gerüstregion deutlich gesteigert werden konnte. Das ursprüngliche scFv-Fragment verlor bereits nach 4-stündiger Inkubation in Humanserum fast 100% seiner Bindungsaktivität. Das scFv-Fragment mit stabilisierter Gerüstregion war nach Inkubation über Nacht in Humanserum bei 37°C noch zu 36% aktiv (Willuda et al., 1999). Ein Vergleich mit diesen Daten macht deutlich, dass die Serumstabilität des scFv-Fragments 3077 außerordentlich hoch ist. Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität von VH/VL-Kombinationen verschiedener Keimbahnfamilien haben gezeigt, dass scFv-Fragmente mit den Kombinationen VH3/VLκ3, VH1b/VLκ3, VH5/VLκ3, VH3/VLκ1 am stabilsten sind (Ewert et al., 2003b). Die variablen Regionen des

scFv-Fragments 3077 wurden jedoch per Datenbankvergleich den Keimbahnfamilien VH1/VL κ 1 zugeordnet.

Aufgrund der hohen Stabilität des nicht-PEGylierten scFv-Fragments war es nicht möglich in diesem Testsystem den erwarteten Stabilitätsgewinn durch PEGylierung nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Test durchgeführt, bei dem die Moleküle kurzzeitig auf unphysiologisch hohe Temperaturen erhitzt wurden.

5.12 PEGylierung führt zu einer Erhöhung der thermischen Stabilität

Im Thermostabilitätsvergleich zeigten die drei verschiedenen Molekülformate anders als bei der Serumstabilität deutliche Unterschiede. Das IgG-Molekül verlor bei einer Temperatur von 80°C etwa 20% seiner Neutralisierungsfähigkeit und war nach Inkubation bei 85°C vollständig inaktiv. Der Verlust an Aktivität war bei den scFv-Molekülen dagegen bereits bei niedrigeren Temperaturen zu erkennen. Die Abnahme der Aktivität erfolgte jedoch graduell über einen Bereich von mindestens 20°C.

Das nicht-PEGylierte scFv-Fragment 3077 verlor ab 65°C an Neutralisierungseffizienz und war nach Inkubation bei 85°C vollständig inaktiv. Das PEGylierte scFv-Fragment 3077 war deutlich resistenter gegenüber hohen Temperaturen. Dieses Molekül zeigte erst nach Inkubation bei 75°C einen geringen Verlust an Aktivität, und war nur durch Inkubation bei 100°C vollständig zu inaktivieren. Die Temperaturtoleranz des scFv-Fragments 3077 wurde also durch die PEGylierung um etwa 10°C erhöht. Dieser Effekt kommt vermutlich durch die Abschirmung des scFv-Proteins durch das große PEG-Polymer zustande. Eine vorübergehende Öffnung des scFv-Moleküls an der Interaktionsfläche von VH und VL, bei der hydrophobe Bereiche zugänglich werden, kann die Aggregation und Inaktivierung von scFv-Fragmenten zur Folge haben (Wörn und Pluckthun, 2001). Das PEG-Polymer verhindert vermutlich ein solches Aufklappen der beiden V-Domänen und kann so eine höhere thermische Stabilität vermitteln.

Dieser stabilisierende Effekt des PEG-Polymers könnte neben der Vergrößerung des Moleküls auch ein Grund für die in vielen Studien beobachtete Verlängerung der biologischen Halbwertszeit sein.

5.13 Klinische Relevanz der drei Moleküle

Alle drei Antikörper bzw. Antikörperfragmente IgG 3077, scFv 3077 und scFv 3077-PEG binden spezifisch an das humane pro-inflammatorische Zytokin GM-CSF. Jede der Varianten ist in der Lage, die hGM-CSF-abhängige Proliferation von TF-1-Zellen in nanomolarer Konzentration zu inhibieren, wobei das IgG-Molekül gegenüber den beiden scFv-Fragmenten eine zehnfach höhere Neutralisierungseffizienz aufweist.

Die beobachteten biophysikalischen Eigenschaften des scFv-Fragments 3077 und seiner PEGylierten Variante, vor allem die hohe Stabilität gegenüber Serumproteasen und die Resistenz gegenüber dem Einfluss hoher Temperaturen, lassen erwarten, dass sich diese Proteine auch *in vivo* unempfindlich gegenüber Degradation zeigen und sie somit auch während der Zirkulation im Organismus aktiv bleiben. Die Serum-Halbwertszeit des PEGylierten scFv-Fragments sollte gegenüber dem nicht-PEGylierten scFv-Fragment deutlich erhöht sein. Alle Literaturdaten weisen darauf hin, dass das Molekül aufgrund der Massenzunahme nicht mehr innerhalb weniger Stunden über die Nieren ausgeschieden wird, sondern für längere Zeit im Körper verbleibt und dort über einen längeren Zeitraum hGM-CSF neutralisieren kann.

Aufgrund ihres humanen Ursprungs dürfte die Immunogenität aller drei Antikörpermoleküle sehr gering sein. Da das scFv-Fragment 3077 zusätzlich durch das PEG-Polymer gegen humorale und zelluläre Immunreaktionen geschützt ist, dürfte seine Immunogenität sogar noch weiter reduziert sein.

Die im Vergleich beste Aktivität, die auf der höheren Bindungsaffinität gegenüber hGM-CSF beruht, lässt das IgG-Molekül als den am besten geeigneten Kandidaten für den klinischen Einsatz erscheinen. Aufgrund seiner längeren Dissoziationsrate kann er hGM-CSF über einen längeren Zeitraum besser abfangen und so dessen negative Auswirkungen im chronisch inflammatorischen Krankheitsbild unterbinden. Denn während eine zu hohe Affinität die Wirksamkeit von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern und scFv-Fragmenten in der Therapie von soliden Tumoren beeinträchtigt, da die Penetration ins Tumorgewebe erschwert wird (Adams et al., 2001), ist dies bei einem löslichen Zielantigen nicht anzunehmen. Um hGM-CSF effektiv und möglichst quantitativ abzufangen, ist vielmehr eine möglichst hohe Affinität des neutralisierenden Antikörpers wünschenswert.

Der nicht-PEGylierte scFv 3077 sollte nur dann Anwendung finden, wenn lediglich eine sehr kurzfristige Aktivität notwendig ist oder bei direkter Verabreichung in ein Körperkompartiment, das für eine schnelle renale Ausscheidung wenig zugänglich ist.

Der Einsatz des PEGylierten scFv-Moleküls erscheint dann sinnvoll, wenn entzündete Gewebe mit hohem GM-CSF-Spiegel für das kleinere scFv-Molekül besser zugänglich sind als für einen vollständigen Antikörper. Für spezielle Indikationen könnte die PEGylierung dabei einen weiteren Vorteil vermitteln. Ähnlich wie für Nanopartikel gezeigt, könnte die PEGylierung den Transport über die Blut-Hirn-Schranke und die Verteilung im Gehirn fördern (Harris und Chess, 2003).

Für eine intravenöse Applikation bei Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis oder auch Asthma erscheint das 3077-Molekül als ganzer IgG-Antikörper jedoch der am besten geeignete Kandidat.

Insgesamt lassen die Eigenschaften des 3077-Moleküls als ganzer Antikörper und als PEGyliertes scFv-Fragment annehmen, dass ihr Einsatz bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen ähnlich positive Effekte zeigt, wie sie in Tierexperimenten mit einem neutralisierenden Antikörper gegen murines GM-CSF erzielt werden konnten.

6. SUMMARY

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) plays a central role in inflammatory processes. Treatment with antibodies neutralizing murine GM-CSF showed significant effects in mouse models of rheumatoid arthritis, lung inflammation, autoimmune encephalomyelitis and psoriasis.

This work describes the generation of the first human single-chain antibody (scFv) potently neutralizing human GM-CSF (hGM-CSF). This human scFv fragment was constructed by phage display technology starting from a rat monoclonal antibody with hGM-CSF neutralizing activity. In a first step the VH domain of the parental rat antibody was combined with a human light chain variable (V) repertoire. After phage display selection one dominant clone was identified which encoded a chimeric rat/human scFv antibody neutralizing hGM-CSF with a low nanomolar half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀).

The human light chain of this clone was then combined with a human heavy chain V repertoire. The latter preserved the complementary determining region (CDR) 3 of the parental rat VH domain to retain binding specificity to the neutralizing binding area on the antigen. After phage display selection, several human single-chain antibody fragments were identified that efficiently neutralized human GM-CSF at low nanomolar concentrations.

The most potent GM-CSF neutralizing human scFv fragment (3077) was further engineered to different antibody formats with relevance for therapeutic application. On the one hand, the scFv fragment was conjugated to a branched 40 kDa polyethylene glycol (PEG) polymer via an additional C-terminal cysteine residue. On the other hand, the scFv fragment was converted to a human IgG1/kappa-antibody by fusion with human constant immunoglobulin domains. The naked scFv, the PEGylated scFv and the IgG antibody of identical specificity were then compared to each other in terms of binding affinity, neutralizing activity and stability *in vitro*.

PEG conjugation had a negligible effect on the *in vitro* neutralizing potential of the scFv fragment although it caused a significant drop in binding affinity due to a reduced on-rate. The human IgG1 antibody variant showed an improved equilibrium dissociation constant as well as neutralizing activity superior to the non-PEGylated and the PEGylated scFv fragment. We also demonstrated that PEGylation mediates a significant increase in thermal stability of about 10°C as compared to the naked scFv fragment.

Because of the high neutralizing activity and stability the IgG1 3077 antibody as well as the PEGylated scFv fragment 3077 both are - in different clinical settings - potential candidates to treat pro-inflammatory human diseases.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) spielt eine zentrale Rolle in entzündlichen Prozessen. Die Behandlung mit Antikörpern, die murines GM-CSF neutralisieren, zeigte signifikante Behandlungseffekte in Maus-Modellen für Rheumatoide Arthritis, Autoimmune Enzephalomyelitis, entzündliche Erkrankungen der Lunge und Psoriasis.

Diese Arbeit beschreibt die Generierung des ersten vollständig humanen Einzelketten (scFv)-Antikörpers, der effektiv humanes GM-CSF (hGM-CSF) neutralisiert. Dieser humane scFv-Antikörper wurde mit Hilfe der Phage-Display-Technologie, ausgehend von einem monoklonalen Ratten-Antikörper mit hGM-CSF-neutralisierender Aktivität, konstruiert. In einem ersten Schritt wurde die VH-Domäne des parentalen Ratten-Antikörpers mit einem humanen leichte Ketten V-Repertoire kombiniert. Nach Phage-Display-Selektion wurde ein dominanter Klon identifiziert, der für ein chimäres Ratte/Human scFv-Fragment kodiert. Dieser scFv-Antikörper neutralisiert hGM-CSF mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC50) im nanomolaren Bereich.

Die humane leichte Kette dieses Klons wurde dann mit einem humanen schwere Ketten V-Repertoire kombiniert. Um die Bindungsspezifität des Ursprungsantikörpers für den neutralisierenden Bereich auf dem Antigen zu erhalten, enthielt dieses Repertoire die Komplementaritäts-bestimmende Region 3 (CDR3) der parentalen VH-Domäne. Nach Phage-Display-Selektion wurden mehrere scFv-Antikörper identifiziert, die hGM-CSF im niedrig nanomolaren Konzentrationsbereich neutralisierten.

Das scFv-Fragment mit der höchsten hGM-CSF-neutralisierenden Aktivität (3077) wurde in verschiedene therapeutisch relevante Antikörperformate überführt. Zum einen wurde das scFv-Fragment über einen zusätzlichen C-terminalen Cystein-Rest an ein verzweigtes, 40 kD-grosses Polyethylenglycol (PEG) –Polymer konjugiert. Zum anderen wurde das scFv-Fragment durch Fusion mit humanen konstanten Immunglobulin-Domänen zu einem ganzen IgG1/kappa-Antikörper vervollständigt. Die so generierten Konstrukte mit identischer Spezifität wurden dann *in vitro* im Hinblick auf Bindungsaffinität, Neutralisierungsaktivität und Stabilität untersucht.

Die Konjugation des PEG-Polymers hatte einen vernachlässigbaren Effekt auf das Neutralisierungspotential des scFv-Fragments *in vitro*, obwohl sie aufgrund einer verlangsamten Assoziationsrate eine reduzierte Bindungsaffinität verursachte. Der humane IgG1-Antikörper zeigte sowohl eine verbesserte Bindungsaffinität als auch eine erhöhte

Neutralisierungsaktivität im Vergleich zum nicht-PEGylierten wie auch zum PEGylierten scFv-Fragment. Wir konnten außerdem zeigen, dass die PEGylierung in der thermischen Stabilität des scFv-Antikörpers einen deutlichen Anstieg um 10°C vermittelte.

Aufgrund der hohen Neutralisierungsaktivität und Stabilität des IgG1-Antikörpers 3077 wie auch des PEGylierten scFv-Fragments 3077 sind beide Moleküle - in unterschiedlichen klinischen Anwendungsbereichen - potentielle Kandidaten für eine Behandlung humaner entzündlicher Erkrankungen.

8. LITERATUR

- Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D., Weiner, L.M., 2001. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res* 61, 4750-4755.
- Adkins, K.K., Levan, T.D., Miesfeld, R.L., Bloom, J.W., 1998. Glucocorticoid regulation of GM-CSF: evidence for transcriptional mechanisms in airway epithelial cells. *Am J Physiol* 275, L372-378.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., Chothia, C., 1997. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273, 927-948.
- Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J., Brown, C.B., Kaushansky, K., Firestein, G.S., 1991. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 146, 3365-3371.
- Ayala, M., Balint, R.F., Fernandez-de-Cossio, L., Canaan-Haden, J.W., Larrick, J.W., Gavalondo, J.V., 1995. Variable region sequence modulates periplasmic export of a single-chain Fv antibody fragment in Escherichia coli. *Biotechniques* 18, 832, 835-838, 840-832.
- Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D.L., Benhar, I., 2001. Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol* 312, 79-93.
- Balbi, B., Bason, C., Balleari, E., Fiasella, F., Pesci, A., Ghio, R., Fabiano, F., 1997. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 10, 846-850.
- Barbas, C.F., 3rd, Kang, A.S., Lerner, R.A., Benkovic, S.J., 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7978-7982.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.

- Bozinovski, S., Jones, J., Beavitt, S.J., Cook, A.D., Hamilton, J.A., Anderson, G.P., 2004. Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L877-885.
- Brekke, O.H., Sandlie, I., 2003. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2, 52-62.
- Campbell, I.K., Bendele, A., Smith, D.A., Hamilton, J.A., 1997. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice. *Ann Rheum Dis* 56, 364-368.
- Campbell, I.K., Novak, U., Cebon, J., Layton, J.E., Hamilton, J.A., 1991. Human articular cartilage and chondrocytes produce hemopoietic colony-stimulating factors in culture in response to IL-1. *J Immunol* 147, 1238-1246.
- Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., Dunn, A.R., Grail, D., Hamilton, J.A., 1998. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* 161, 3639-3644.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., Shepard, H.M., 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4285-4289.
- Cebon, J., Nicola, N., Ward, M., Gardner, I., Dempsey, P., Layton, J., Duhrsen, U., Burgess, A.W., Nice, E., Morstyn, G., 1990. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J Biol Chem* 265, 4483-4491.
- Chapman, A.P., 2002. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 531-545.
- Chapman, A.P., Antoniow, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S., King, D.J., 1999. Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotechnol* 17, 780-783.
- Charlton, K.A. (2004) Expression and Isolation of Recombinant Antibody Fragments in *E. coli*. In *Antibody Engineering - Methods and Protocols*, p. 245-254. Humana Press.
- Choi, G.H., Lee, D.H., Min, W.K., Cho, Y.J., Kweon, D.H., Son, D.H., Park, K., Seo, J.H., 2004. Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 35, 84-92.

- Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B.J., Choudhury, A., Batra, S.K., 1998. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q J Nucl Med* 42, 225-241.
- Cook, A.D., Braine, E.L., Campbell, I.K., Rich, M.J., Hamilton, J.A., 2001. Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res* 3, 293-298.
- Culpitt, S.V., Rogers, D.F., Fenwick, P.S., Shah, P., De Matos, C., Russell, R.E., Barnes, P.J., Donnelly, L.E., 2003. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* 58, 942-946.
- de Bono, J.S., Rha, S.Y., Stephenson, J., Schultes, B.C., Monroe, P., Eckhardt, G.S., Hammond, L.A., Whiteside, T.L., Nicodemus, C.F., Cermak, J.M., Rowinsky, E.K., Tolcher, A.W., 2004. Phase I trial of a murine antibody to MUC1 in patients with metastatic cancer: evidence for the activation of humoral and cellular antitumor immunity. *Ann Oncol* 15, 1825-1833.
- DeNardo, G.L., Mirick, G.R., Kroger, L.A., Bradt, B.M., Lamborn, K.R., DeNardo, S.J., 2003. Characterization of human IgG antimouse antibody in patients with B-cell malignancies. *Clin Cancer Res* 9, 4013S-4021S.
- Deng, L.W., Malik, P., Perham, R.N., 1999. Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli. *Virology* 253, 271-277.
- Dennis, M.S. (2005) Selection and screening strategies. In *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*, p. 134-164. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC.
- DiPersio, J., Billing, P., Kaufman, S., Eghtesady, P., Williams, R.E., Gasson, J.C., 1988. Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* 263, 1834-1841.
- Ernst, J.F., Mermod, J.J., Richman, L.H., 1992. Site-specific O-glycosylation of human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor secreted by yeast and animal cells. *Eur J Biochem* 203, 663-667.
- Ewert, S., Honegger, A., Pluckthun, A., 2003a. Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry* 42, 1517-1528.
- Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., Pluckthun, A., 2003b. Biophysical properties of human antibody variable domains. *J Mol Biol* 325, 531-553.

- Fiehn, C., Wermann, M., Pezzutto, A., Hufner, M., Heilig, B., 1992. [Plasma GM-CSF concentrations in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and spondyloarthritis]. *Z Rheumatol* 51, 121-126.
- Fitch, J.C., Rollins, S., Matis, L., Alford, B., Aranki, S., Collard, C.D., Dewar, M., Elefteriades, J., Hines, R., Kopf, G., Kraker, P., Li, L., O'Hara, R., Rinder, C., Rinder, H., Shaw, R., Smith, B., Stahl, G., Shernan, S.K., 1999. Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 100, 2499-2506.
- Fleisig, A.J., Verrier, E.D., 2005. Pexelizumab -- a C5 complement inhibitor for use in both acute myocardial infarction and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Expert Opin Biol Ther* 5, 833-839.
- Gasson, J.C., 1991. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77, 1131-1145.
- Ghetie, V., Ward, E.S., 2000. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol* 18, 739-766.
- Harris, J.M., Chess, R.B., 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2, 214-221.
- Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., Day, J., Greenwood, A., McPherson, A., 1992. The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature* 360, 369-372.
- Hawkins, R.E., Russell, S.J., Winter, G., 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226, 889-896.
- Hayashida, K., Kitamura, T., Gorman, D.M., Arai, K., Yokota, T., Miyajima, A., 1990. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9655-9659.
- Helms, C., Pelsue, S., Cao, L., Lamb, E., Loffredo, B., Taillon-Miller, P., Herrin, B., Burzenski, L.M., Gott, B., Lyons, B.L., Keppler, D., Shultz, L.D., Bowcock, A.M., 2005. The Tetratricopeptide repeat domain 7 gene is mutated in flaky skin mice: a model for psoriasis, autoimmunity, and anemia. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 659-667.
- Her, E., Frazer, J., Austen, K.F., Owen, W.F., Jr., 1991. Eosinophil hematopoietins antagonize the programmed cell death of eosinophils. Cytokine and glucocorticoid

- effects on eosinophils maintained by endothelial cell-conditioned medium. *J Clin Invest* 88, 1982-1987.
- Hershberger, R.E., Starling, R.C., Eisen, H.J., Bergh, C.H., Kormos, R.L., Love, R.B., Van Bakel, A., Gordon, R.D., Popat, R., Cockey, L., Mamelok, R.D., 2005. Daclizumab to prevent rejection after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 352, 2705-2713.
- Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., et al., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-5883.
- Hwang, W.Y., Foote, J., 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36, 3-10.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M., 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-1702.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2002) *Immunologie*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
- Jespers, L.S., Roberts, A., Mahler, S.M., Winter, G., Hoogenboom, H.R., 1994. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)* 12, 899-903.
- Johnson, G., Wu, T.T., 2000. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res* 28, 214-218.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* 147, 1709-1719.
- Kang, A.S., Jones, T.M., Burton, D.R., 1991. Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11120-11123.

- Kang, N., Hamilton, S., Odili, J., Wilson, G., Kupsch, J., 2000. In vivo targeting of malignant melanoma by ¹²⁵Iodine- and ^{99m}Techneium-labeled single-chain Fv fragments against high molecular weight melanoma-associated antigen. *Clin Cancer Res* 6, 4921-4931.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S., 1999. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8, 1668-1674.
- Kashmiri, S.V., De Pascalis, R., Gonzales, N.R., Schlom, J., 2005. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. *Methods* 36, 25-34.
- Kay, A.B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S.R., Moqbel, R., Wardlaw, A.J., Hamid, Q., 1991. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 173, 775-778.
- Khazaeli, M.B., Conry, R.M., LoBuglio, A.F., 1994. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother* 15, 42-52.
- Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F., 1989. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140, 323-334.
- Klimka, A., Matthey, B., Roovers, R.C., Barth, S., Arends, J.W., Engert, A., Hoogenboom, H.R., 2000. Human anti-CD30 recombinant antibodies by guided phage antibody selection using cell panning. *Br J Cancer* 83, 252-260.
- Kohler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Krauss, J., Arndt, M.A., Martin, A.C., Liu, H., Rybak, S.M., 2003. Specificity grafting of human antibody frameworks selected from a phage display library: generation of a highly stable humanized anti-CD22 single-chain Fv fragment. *Protein Eng* 16, 753-759.
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R., Pluckthun, A., 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 201, 35-55.

- Laroche, Y., Demaeyer, M., Stassen, J.M., Gansemans, Y., Demarsin, E., Matthyssens, G., Collen, D., Holvoet, P., 1991. Characterization of a recombinant single-chain molecule comprising the variable domains of a monoclonal antibody specific for human fibrin fragment D-dimer. *J Biol Chem* 266, 16343-16349.
- Larson, S.M., El-Shirbiny, A.M., Divgi, C.R., Sgouros, G., Finn, R.D., Tschmelitsch, J., Picon, A., Whitlow, M., Schlom, J., Zhang, J., Cohen, A.M., 1997. Single chain antigen binding protein (sFv CC49): first human studies in colorectal carcinoma metastatic to liver. *Cancer* 80, 2458-2468.
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K., Rennick, D., 1985. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4360-4364.
- Lee, L.S., Conover, C., Shi, C., Whitlow, M., Filpula, D., 1999. Prolonged circulating lives of single-chain Fv proteins conjugated with polyethylene glycol: a comparison of conjugation chemistries and compounds. *Bioconjug Chem* 10, 973-981.
- Lonberg, N., 2005. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117-1125.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., Bernard, C.C., 2001. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 873-882.
- Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., Carter, P., 1998. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol* 16, 677-681.
- Meredith, R.F., Khazaeli, M.B., Grizzle, W.E., Orr, R.A., Plott, G., Urist, M.M., Liu, T., Russell, C.D., Wheeler, R.H., Schlom, J., et al., 1993. Direct localization comparison of murine and chimeric B72.3 antibodies in patients with colon cancer. *Hum Antibodies Hybridomas* 4, 190-197.
- Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., Koeffler, H.P., 1986. Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature* 323, 79-82.
- Muramatsu, H., Yoshikawa, K., Hayashi, T., Takasu, S., Kawada, Y., Uchida, K., Sato, S., Takahashi, T., Saga, S., Ueda, R., 2005. Production and characterization of an active single-chain variable fragment antibody recognizing CD25. *Cancer Lett* 225, 225-236.

- Natarajan, A., Xiong, C.Y., Albrecht, H., DeNardo, G.L., DeNardo, S.J., 2005. Characterization of site-specific ScFv PEGylation for tumor-targeting pharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 16, 113-121.
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., Pluckthun, A., 1997. Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng* 10, 435-444.
- Ohlin, M., Owman, H., Mach, M., Borrebaeck, C.A., 1996. Light chain shuffling of a high affinity antibody results in a drift in epitope recognition. *Mol Immunol* 33, 47-56.
- Padlan, E.A., 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.
- Perrella, O., Carrieri, P.B., De Mercato, R., Buscaino, G.A., 1993. Markers of activated T lymphocytes and T cell receptor gamma/delta+ in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 33, 152-155.
- Rader, C., Cheresch, D.A., Barbas, C.F., 3rd, 1998. A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8910-8915.
- Rajewsky, K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Ramm, K., Gehrig, P., Pluckthun, A., 1999. Removal of the conserved disulfide bridges from the scFv fragment of an antibody: effects on folding kinetics and aggregation. *J Mol Biol* 290, 535-546.
- Raum, T., Gruber, R., Riethmuller, G., Kufer, P., 2001. Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: a novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens. *Cancer Immunol Immunother* 50, 141-150.
- Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B., Dewitz, M.C., 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23, 1073-1078.
- Rojas, G., Talavera, A., Munoz, Y., Rengifo, E., Krenzel, U., Angstrom, J., Gavilondo, J., Moreno, E., 2004. Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside. *J Immunol Methods* 293, 71-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sanz, I., 1991. Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 147, 1720-1729.
- Schon, M., Denzer, D., Kubitzka, R.C., Ruzicka, T., Schon, M.P., 2000. Critical role of neutrophils for the generation of psoriasiform skin lesions in flaky skin mice. *J Invest Dermatol* 114, 976-983.
- Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C., Marks, J.D., 1998. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6157-6162.
- Shen, S., Forero, A., LoBuglio, A.F., Breitz, H., Khazaeli, M.B., Fisher, D.R., Wang, W., Meredith, R.F., 2005. Patient-specific dosimetry of pretargeted radioimmunotherapy using CC49 fusion protein in patients with gastrointestinal malignancies. *J Nucl Med* 46, 642-651.
- Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C., Fuh, G., 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338, 299-310.
- Smith, B.J., Popplewell, A., Athwal, D., Chapman, A.P., Heywood, S., West, S.M., Carrington, B., Nesbitt, A., Lawson, A.D., Antoniwi, P., Eddelston, A., Suitters, A., 2001. Prolonged in vivo residence times of antibody fragments associated with albumin. *Bioconjug Chem* 12, 750-756.
- Smith, K.A., Nelson, P.N., Warren, P., Astley, S.J., Murray, P.G., Greenman, J., 2004. Demystified...recombinant antibodies. *J Clin Pathol* 57, 912-917.
- Smith, M.R., 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359-7368.
- Steinberger, P., Sutton, J.K., Rader, C., Elia, M., Barbas, C.F., 3rd, 2000. Generation and characterization of a recombinant human CCR5-specific antibody. A phage display approach for rabbit antibody humanization. *J Biol Chem* 275, 36073-36078.
- Thiel, M.A., Coster, D.J., Standfield, S.D., Brereton, H.M., Mavrangelos, C., Zola, H., Taylor, S., Yusim, A., Williams, K.A., 2002. Penetration of engineered antibody fragments into the eye. *Clin Exp Immunol* 128, 67-74.

- Thomas, T.C., Rollins, S.A., Rother, R.P., Giannoni, M.A., Hartman, S.L., Elliott, E.A., Nye, S.H., Matis, L.A., Squinto, S.P., Evans, M.J., 1996. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol* 33, 1389-1401.
- Thorens, B., Mermoud, J.J., Vassalli, P., 1987. Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through posttranscriptional regulation. *Cell* 48, 671-679.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J., Johnson, K.S., 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14, 309-314.
- Waldmann, T.A., 2003. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 9, 269-277.
- Walter, M.R., Cook, W.J., Ealick, S.E., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P., Bugg, C.E., 1992. Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Mol Biol* 224, 1075-1085.
- Ward, C., Hannah, S., Chilvers, E.R., Farrow, S., Haslett, C., Rossi, A.G., 1997. Transforming growth factor-beta increases the inhibitory effects of GM-CSF and dexamethasone on neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans* 25, 244S.
- Watters, J.M., Telleman, P., Junghans, R.P., 1997. An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* 3, 21-29.
- Weisman, M.H., Moreland, L.W., Furst, D.E., Weinblatt, M.E., Keystone, E.C., Paulus, H.E., Teoh, L.S., Velagapudi, R.B., Noertersheuser, P.A., Granneman, G.R., Fischkoff, S.A., Chartash, E.K., 2003. Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther* 25, 1700-1721.
- Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P.A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., Pluckthun, A., 1999. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* 59, 5758-5767.
- Worn, A., Pluckthun, A., 1998. Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry* 37, 13120-13127.

- Worn, A., Pluckthun, A., 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 305, 989-1010.
- Xu, J.L., Davis, M.M., 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13, 37-45.
- Yamada, K., Yamakawa, M., Imai, Y., Tsukamoto, M., 1997. Expression of cytokine receptors on follicular dendritic cells. *Blood* 90, 4832-4841.
- Yamaoka, T., Tabata, Y., Ikada, Y., 1994. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 83, 601-606.
- Yang, K., Basu, A., Wang, M., Chintala, R., Hsieh, M.C., Liu, S., Hua, J., Zhang, Z., Zhou, J., Li, M., Phyu, H., Petti, G., Mendez, M., Janjua, H., Peng, P., Longley, C., Borowski, V., Mehlig, M., Filpula, D., 2003. Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. *Protein Eng* 16, 761-770.
- Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, M., Schlom, J., 1992. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52, 3402-3408.
- Zhan, Y., Lieschke, G.J., Grail, D., Dunn, A.R., Cheers, C., 1998. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* 91, 863-869.

9. ABKÜRZUNGEN

AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Carb	Carbenicillin
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDR	<i>Complementarity determining region</i>
CH	Konstante Region der schweren Antikörperkette (<i>heavy chain</i>)
CL	Konstante Region der leichten Antikörperkette (<i>light chain</i>)
C-terminal	carboxyterminales Ende von Proteinen
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-nucleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC50	halbmaximale Effektorkonzentration
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>antigen binding fragment</i>
FACS	Fluorescence activated cell scan
Fc	<i>crystallizable fragment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FR	<i>framework region</i>
Gdn-HCl	Guanidinium Hydrochlorid
hGM-CSF	<i>human Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
IC50	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
mAk	Monoklonaler Antikörper
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>plaque forming units</i>
POD	Peroxidase
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single-chain fragment of variable domains</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
VH	variable Region der schweren Antikörperkette (<i>heavy chain</i>)
VL	variable Region der leichten Antikörperkette (<i>light chain</i>)
x g	x- fache Erdbeschleunigung

Aminosäuren

A	Ala Alanin
C	Cys Cystein
D	Asp Asparaginsäure
E	Glu Glutaminsäure
F	Phe Phenylalanin
G	Gly Glycin
H	His Histidin
I	Ile Isoleucin
K	Lys Lysin
L	Leu Leucin
M	Met Methionin
N	Asn Asparagin
P	Pro Prolin
Q	Gln Glutamin
R	Arg Arginin
S	Ser Serin
T	Thr Threonin
V	Val Valin
W	Trp Tryptophan
Y	Tyr Tyrosin

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Eva-Maria Krinner

Geboren am: 05.05.1972 in Freising

Familienstand: ledig

Bildungsweg

1978-1982

Grundschule

1982-1991

Dom-Gymnasium Freising

Abschluss: Abitur

1991-1997

Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Studienschwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie, Virologie und Immunbiologie, Biochemie

Diplomarbeit am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg mit dem Thema: „Untersuchungen zum Status persistierender Polyomavirus-Infektionen in humanen peripheren Blutzellen“

Juni 1997

Diplom

2003-2006

Dissertation bei der Micromet AG in München unter Betreuung von PD Dr. P. Kufer (Micromet AG) mit dem Thema: „Generierung humaner Antikörper-Spezifitäten zur Therapie entzündlicher Erkrankungen“.

Betreuung an der Fakultät für Biologie in Würzburg durch Prof. Dr. G. Krohne

Anstellungen

1998-2001

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Immunologie der Universitätsklinik Kiel

2001-2002

Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Creatogen AG in Augsburg

seit 2002

Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Micromet AG in München

Publikationsliste

Eva-Maria Krinner, Julia Hepp, Patrick Hoffmann, Sandra Bruckmaier, Laetitia Petersen, Silke Petsch, Larissa Parr, Ioana Schuster, Susanne Mangold, Stefan Buziol, Inessa Hochheim, Jörg Volkland, Michael Mølhøj, Mirnaalini Sriskandarajah, Markus Strasser, Christian Itin, Andreas Wolf, Amartya Basu, Karen Yang, David Filpula, Poul Sørensen, Peter Kufer, Patrick A. Baeuerle and Tobias Raum (2006): **A highly stable polyethylene glycol-conjugated human single-chain antibody neutralizing granulocyte/macrophage colony-stimulating factor at low nanomolar concentration.**

(zur Publikation eingereicht)

Eva-Maria Krinner, Tobias Raum, Silke Petsch, Sandra Bruckmaier, Ioana Schuster, Laetitia Petersen, Ronny Cierpka, Derege Abebe, Michael Mølhøj, Andreas Wolf, Poul Sørensen, Mathias Locher, Patrick A. Baeuerle and Julia Hepp (2006): **A Human Monoclonal IgG1 Potently Neutralizing the Pro-inflammatory Cytokine GM-CSF**

(zur Publikation angenommen bei Molecular Immunology)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde bei der Micromet AG in München angefertigt.

Bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich hier bedanken:

Herrn Prof. Dr. G. Krohne danke ich ganz herzlich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät und die Übernahme des Gutachtens.

Ich danke der Micromet AG für die Überlassung des Themas und insbesondere Herrn Prof. Baeuerle für seine Unterstützung. Herzlichen Dank auch an PD Peter Kufer für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung, für die Übernahme des Gutachtens und v.a. auch für die sorgfältige Korrektur des Manuskripts.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Tobias Raum, der mir die Möglichkeit bei Micromet zu promovieren eröffnet hat und unter dessen kompetenter Anleitung der größte Teil dieser Arbeit erstellt wurde. Für die engagierte Betreuung, für die stete Unterstützung und unzählige Diskussionen vielen Dank! Ein Dankeschön auch an den Rest der Arbeitsgruppe: Doris Rau, Susanne Mangold, Ronny Cierpka und Majk Kvesic – Danke für eure Hilfe und ein angenehmes Arbeitsklima! Es war `ne schöne Zeit bei Euch!

Mein großer Dank gilt auch Dr. Julia Hepp unter deren engagierter Regie die Charakterisierung der verschiedenen Antikörperfragmente stattfand, die mir in vielen Diskussionen mit Rat und Tat geholfen hat und die mich im vergangenen Jahr so freundlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Danke in diesem Zusammenhang auch an Sandra Bruckmaier, sowie an Laetitia Petersen, Larissa Parr und Ioana Schuster, die alle tatkräftig zur Charakterisierung der Fragmente beigetragen haben.

Vielen Dank auch an Andreas Wolf und seine Arbeitsgruppe (Markus Strasser, Derege Abebe, Stefan Buziol, Michael Mølhøji, Inessa Hochheim) für die Hilfe in Sachen Proteinexpression und die Durchführung der Proteinreinigungen.

Vielen Dank an Patrick Hoffmann, den Fachmann für die PEGylierung, sowie Mirnaalini Sriskandarajah und Silke Petsch für die Durchführung der Protein-Modifikationen. Silke sei auch gedankt für ihre Hilfe beim ganzen IgG-Antikörper, sowie für manchen netten Ratsch!

Danke auch an alle übrigen Mitglieder der ehemaligen SCA-Unit und der präklinischen Abteilung für ein angenehmes Arbeiten!

Und ein extra großes Dankeschön an Wolfgang – für´s da sein und Mut machen!

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Ich versichere, dass ich außer dem Diplom in Biologie keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Eva-Maria Krinner