

**Rekombinante Antikörper
gegen tumorassoziiertes MUC1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Lars Toleikis
aus Worms

Dezember 2003

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Lars Toleikis
aus Worms

Dezember 2003

Tag der mündlichen Prüfung:

Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Dübel
PD Dr. Frank Breitling

Im Andenken an meinen Vater

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel von der Technischen Universität Braunschweig für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die ständige Bereitschaft zur Diskussion. Ich möchte mich ausdrücklich bedanken für seine uneingeschränkte Rückendeckung, den persönlichen Einsatz und die ermutigenden Worte in einer für mich sowohl beruflich als auch persönlich sehr schwierigen Zeit.

Herrn PD Dr. Frank Breitling danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Gunther Bastert von der Universitätsfrauenklinik Heidelberg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Des weiteren danke ich Herrn Dipl. Biologe Olaf Broders für die zahlreichen freundschaftlichen und fachlichen Diskussionen sowie Frau Dr. Petra Rohrbach für die kollegiale Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Diverse Arbeitsmaterialien wurden von Herrn PD Dr. Sepp Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung in einer für uns alle schwierigen Zeit.

Ganz besonders danke ich Tine für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.
Schön, dass es Dich gibt.

Zusammenfassung

In Adenokarzinomen wie dem Mammakarzinom wird das tumorassoziierte Antigen MUC1 überexprimiert, dessen extrazelluläre Domäne zum größten Teil aus einem als VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Region bezeichneten Abschnitt besteht. Aufgrund einer im Vergleich zu normalem MUC1 veränderten, weniger starken Glykosylierung der VNTR-Region entstehen in tumorassoziiertem MUC1 neue antigene Determinanten auf Basis der Peptidsequenz und der veränderten Glykosylierung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten aus dem Blut von Mammakarzinom-Patientinnen, die wiederholt mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid der VNTR-Region immunisiert worden waren, rekombinante *single chain* Fv-Antikörperfragmente (scFv-Fragmente) mit spezifischer Bindung an die VNTR-Region von tumorassoziiertem MUC1 gewonnen werden.

Ausgehend von cDNA, die aus den peripheren Lymphozyten von mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Mammakarzinom-Patientinnen gewonnen wurde, konnten mittels PCR die für die variablen schweren und leichten Antikörperketten (VH und VL) kodierenden Gene amplifiziert werden. Durch Klonierung der VH- und VL-Gene in das Phagemid pSEX81 wurden rekombinante scFv-Antikörpergenbibliotheken hergestellt, die anschließend für eine *in vitro*-Selektion mit Hilfe des Phagendisplay eingesetzt wurden. Aus einer der generierten Antikörpergenbibliotheken konnte durch ein kombinatorisches Panning auf tumorassoziiertem MUC1 sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid der VNTR-Region ein Antikörperklon mit der gewünschten Spezifität isoliert werden. Die für das isolierte Antikörperfragment kodierenden Gene wurden in den Vektor pOPE101 kloniert, um ein lösliches rekombinantes scFv-Fragment im periplasmatischen Raum von *E. coli* zu exprimieren. Das so produzierte scFv-Fragment IIB6 wurde nach erfolgreicher Affinitätschromatographischer Reinigung aus periplasmatischen Extrakten bezüglich seiner Spezifität und Affinität analysiert. In ELISA-Bindungsstudien sowie einem Immunoblot wurde die spezifische Bindung des scFv-Fragments IIB6 an die VNTR-Region von tumorassoziiertem MUC1 belegt, wobei das minimale Epitop des Antikörperfragments die Aminosäuresequenz TRPAP besitzt. Außerdem wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse gezeigt, dass das Antikörperfragment IIB6 spezifisch an natives, von Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie T47D präsentierte MUC1 bindet. Die mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz ermittelten Affinitäten des generierten scFv-Fragments zu tumorassoziiertem MUC1 und synthetischem MUC1-Glykopeptid betragen $2,75 \times 10^{-7}$ M bzw. $2,28 \times 10^{-7}$ M.

Das generierte scFv-Fragment IIB6 stellt damit ein potentiell geeignetes Ausgangsprodukt für die Herstellung eines vollständig humanen IgG-Antikörpers oder von Antikörperfusionsproteinen zur Behandlung des Mammakarzinoms sowie anderer MUC1-überexprimierender Adenokarzinome dar.

Summary

The tumor-associated antigen MUC1 is overexpressed in adenocarcinomas such as breast cancer. The extracellular portion of MUC1 mainly consists of a variable number of tandem repeats (VNTR). In contrast to MUC1 of healthy humans, tumor-associated MUC1 is underglycosylated exposing new peptide and carbohydrate epitopes. In this study single chain Fv antibody fragments (scFv fragments) specific for the VNTR region of tumor-associated MUC1 had to be isolated from breast cancer patients repeatedly vaccinated with synthetic MUC1 glycopeptides representing the VNTR region.

CDNA was prepared from peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients vaccinated with synthetic MUC1 glycopeptides and used for PCR amplification of the heavy and light chain variable regions (VH and VL) genes. The VH and VL genes were cloned into the phagemid pSEX81 to generate antibody gene libraries, which were subsequently used for *in vitro* selection by phage display. An antibody clone of the desired specificity was isolated from one of the generated antibody gene libraries by panning on tumor-derived MUC1 and synthetic MUC1 glycopeptide. The genes encoding the isolated antibody fragment were cloned into the vector pOPE101 for expression of a soluble recombinant scFv fragment in the periplasmic space of *E. coli*. The produced scFv fragment IIB6 was purified from periplasmic extracts by affinity chromatography, and the specificity and affinity was analysed. The specific binding of the scFv fragment IIB6 to the VNTR region of tumor-associated MUC1 was confirmed by ELISA and immunoblot. The antibody fragment IIB6 recognizes the minimal epitope peptide sequence TRPAP. In addition, it was shown that the antibody fragment IIB6 binds to native MUC1 presented on cells of the breast cancer cell line T47D, as confirmed by flow cytometry. The affinities of the generated scFv fragment to tumor-derived MUC1 and synthetic MUC1 glycopeptide that were determined by surface plasmon resonance are $2,75 \times 10^{-7}$ M and $2,28 \times 10^{-7}$ M, respectively.

The generated scFv fragment IIB6 is potentially useful for the development of a completely human IgG antibody or antibody fusion proteins for the therapy of breast cancer and other adenocarcinomas overexpressing tumor-associated MUC1.

Inhalt

1 Abkürzungen	4
1.1 Allgemeine Abkürzungen	4
1.2 DNA-Basen	6
1.3 Aminosäuren	6
2 Einleitung	7
2.1 Rekombinante Antikörper	7
2.1.1 Antikörper	7
2.1.2 Herstellung von Antikörpern und Antikörperfragmenten	10
2.2 Mammakarzinom	16
2.2.1 Epidemiologie	16
2.2.2 Ätiologie	17
2.2.3 Histologie, Verlauf und Symptomatik	17
2.2.4 Therapie und Prognose	18
2.3 MUC1-basierte Immuntherapie des Mammakarzinoms	21
2.3.1 Das tumorassoziierte Antigen MUC1	21
2.3.2 Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1	23
2.3.3 Vakzinierung mit synthetischen MUC1-Peptiden	24
2.4 Zielsetzung	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Bakterienstämme	28
3.1.2 Phagen	28
3.1.3 Mediengrundbestandteile zur Kultivierung von Bakterien	28
3.1.4 Medienzusätze zur Kultivierung von Bakterien	28
3.1.5 Vektoren	28
3.1.6 Eukaryotische Zellen	29
3.1.7 Proteine	29
3.1.8 Synthetische Oligonukleotide	29
3.1.8.1 Primer zur PCR-Amplifikation humaner Immunglobulin-Gene	29
3.1.8.1.1 Primer zur Amplifikation der VH-Region	29
3.1.8.1.2 Primer zur Amplifikation der VL-Region	30
3.1.8.2 Primer zur PCR-Reamplifikation humaner Immunglobulin-Gene und Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen	31
3.1.8.2.1 Primer zur Reamplifikation der VH-Region	31
3.1.8.2.2 Primer zur Reamplifikation der VL-Region	31
3.1.8.3 Primer zur Sequenzierung humaner Immunglobulin-Gene in pSEX81 und pOPE101	32
3.1.9 Synthetische Peptide und Glykopeptide	32
3.1.10 Eichstandards	33
3.1.11 Enzyme	33
3.1.12 Kit-Systeme	33
3.1.13 Antikörper	34
3.1.14 Sonstiges	34
3.1.15 Chemikalien	34
3.1.16 Verbrauchsmaterialien	34

3.1.17 Laborausstattung	35
3.1.18 Puffer, Lösungen und Medien	36
3.2 Methoden	37
3.2.1 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Patientinnenblut	37
3.2.2 mRNA-Isolierung aus peripheren Lymphozyten	38
3.2.3 Reverse Transkription	38
3.2.4 PCR zur Amplifikation von humanen Antikörpergenen	38
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	39
3.2.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	39
3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA	39
3.2.8 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	39
3.2.9 Präzipitation von DNA	40
3.2.9.1 Präzipitation mit Butanol	40
3.2.9.2 Präzipitation mit Ethanol	40
3.2.9.3 Präzipitation mit Isopropanol	40
3.2.10 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
3.2.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase	41
3.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.2.13 Transformation von Bakterien durch Elektroporation	41
3.2.14 Sequenzierung von DNA	42
3.2.15 Produktion von M13KO7-Helferphagen	42
3.2.16 Produktion von Hyperphagen	43
3.2.17 Phagendisplay	43
3.2.17.1 Verpackung von <i>single chain</i> Fv-Antikörpergenbibliotheken in Phagen	43
3.2.17.2 Panning	44
3.2.17.3 Reinfektion	44
3.2.18 Titration von Phagen	45
3.2.19 Expression von rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragmenten	46
3.2.20 Präparation von periplasmatischen Extrakten	46
3.2.21 Reinigung von rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragmenten durch IMAC	46
3.2.22 Präzipitation von Proteinen	47
3.2.23 Proteinmengenbestimmung	47
3.2.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.2.25 Immunoblot	48
3.2.26 ELISA	48
3.2.26.1 Nachweis der Spezifität von rekombinanten Phagenantikörpern	49
3.2.26.2 Nachweis der Spezifität von rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragmenten	49
3.2.27 FACS-Analyse	50
3.2.28 Epitopkartierung	50
3.2.29 Affinitätsbestimmung	51
4 Ergebnisse	52
4.1 Konstruktion von humanen Antikörpergenbibliotheken in dem Phagemid pSEX81	52
4.1.1 Konstruktion der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ	52
4.1.2 Konstruktion der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ	54
4.2 <i>Screening</i> von humanen Antikörpergenbibliotheken	56
4.2.1 <i>Screening</i> der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ	56

4.2.2 <i>Screening</i> der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ	60
4.3 Analyse von Einzelklonen	64
4.3.1 Analyse von Einzelklonen der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ	65
4.3.2 Analyse von Einzelklonen der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ	66
4.4 Herstellung von rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragmenten	70
4.4.1 Klonierung in den Expressionsvektor pOPE101	71
4.4.2 Expression von rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragmenten	72
4.4.3 Antigenbindungsaktivität von periplasmatischen Extrakten	73
4.5 Sequenzanalyse von rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragmenten	74
4.6 Expression und Reinigung des humanen rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragments IIB6	77
4.7 Analyse der Spezifität des humanen rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragments IIB6	79
4.7.1 ELISA	79
4.7.2 Immunoblot	82
4.7.3 FACS-Analyse	84
4.8 Bestimmung des Epitops des humanen rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragments IIB6	86
4.9 Bestimmung der Affinitäten des humanen rekombinanten <i>single chain</i> Fv-Antikörperfragments IIB6	87
5 Diskussion	92
5.1 Konstruktion der humanen Antikörpergenbibliotheken	93
5.2 <i>Screening</i> der humanen Antikörpergenbibliotheken	96
5.3 Das humane rekombinante <i>single chain</i> Fv-Fragment IIB6	101
5.4 Ausblick	107
6 Literatur	109

1 Abkürzungen

1.1 Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
BMA	Brust-Muzin-Antigen
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Carboxy-
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre DNA)
CDR	<i>complementarity determining region</i> (komplementaritätsbestimmende Region)
cfu	<i>colony forming units</i>
CH	konstante Region der schweren Antikörperkette
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CL	konstante Region der leichten Antikörperkette
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	<i>double strand</i> (Doppelstrang)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Fa.	Firma
Fab	antigenbindendes Fragment
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
Fc	kristallisierbares Antikörperfragment
FR	<i>framework region</i> (Gerüstregion)
Fv	variabler Bereich eines Antikörpers
g	Gramm
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GnRH	<i>gonadotropin releasing hormone</i>
h	Stunde(n)
HAMA	humane anti-Maus-Antikörper
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSA	<i>human serum albumin</i> (humanes Serumalbumin)
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i> (immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampère
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
N	Nukleotid(e) oder Amino-
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
OSP	<i>osmotic shock preparation</i>
Ω	Ohm
p.A.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Pikomol
POD	Peroxidase
PPP	<i>periplasmic preparation</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase/Transkription
s.	siehe
sc	<i>single chain</i> (Einzelketten)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde(n)
SRP	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächen-Plasmon-Resonanz)
ss	<i>single strand</i> (Einzelstrang)
SSP	Säulenstartpuffer
s.u.	siehe unten
SWP	Säulenwaschpuffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
ü.N.	über Nacht
VH	variable Region der schweren Antikörperkette
VL	variable Region der leichten Antikörperkette
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent bezogen auf Volumen

1.2 DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

1.3 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

2 Einleitung

2.1 Rekombinante Antikörper

Im Forschungsgebiet der rekombinanten Antikörpertechnologie beschäftigen sich Wissenschaftler seit etwa 15 Jahren mit der auf gentechnologischen Methoden beruhenden Herstellung von Antikörpern. Dabei steht die Erzeugung von Antikörperfragmenten, die nur aus dem antigenbindenden Teil eines Antikörpermoleküls bestehen, im Mittelpunkt. Diese Fragmente können sowohl mit heterologen Komponenten wie Enzymen oder Toxinen als auch mit anderen Antikörpern genetisch fusioniert werden, was ihnen völlig neue Eigenschaften verleiht und ihre Anwendungsmöglichkeiten in Forschung, Diagnostik und Therapie erweitert. Dabei werden diese rekombinanten Antikörperfragmente und Antikörperfusionsproteine in Prokaryoten oder eukaryotischen Zellsystemen produziert (Rohrbach *et al.*, 2003). Heutzutage erlauben Selektionsmethoden wie das Phagendisplay die Isolierung humaner Antikörper gegen fast alle Typen von Antigenen, sogar gegen giftige oder stark pathogene Antigene (Hoogenboom und Chames, 2000).

2.1.1 Antikörper

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem des Körpers gegen von außen eindringende Fremdstoffe. Antikörper, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden, sind die Erkennungselemente der humoralen Immunantwort der Vertebraten und haben die Aufgabe, körperfremde Substanzen, die sogenannten Antigene, spezifisch zu binden und diese für das restliche Immunsystem zu markieren. Antikörper werden als Antwort auf die Gegenwart eines Antigens von B-Lymphozyten gebildet. B-Lymphozyten erzeugen fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen, welche als IgM, IgD, IgG, IgA und IgE bezeichnet werden. IgM und IgD dienen im Rahmen einer primären Antwort des humoralen Immunsystems der Erkennung und Bindung von Antigenen. Nach dem Antigenkontakt differenzieren sich die B-Lymphozyten zu Plasmazellen und sezernieren gegen das Antigen gerichtete Antikörper. Bei diesem als klonale Selektion bezeichneten Prozess werden im Rahmen einer sekundären Immunantwort IgG, IgA und IgE gebildet. Dabei gehören ca. 80 % aller im humanen Serum enthaltenen Antikörper der IgG-Klasse an (Janeway und Travers, 1997).

Alle Immunglobuline bestehen aus leichten und schweren Ketten, wobei bezüglich der leichten Ketten zwischen zwei Arten (κ und λ) und bezüglich der schweren Ketten zwischen fünf Arten (μ , δ , γ , α und ϵ) unterschieden wird. Die fünf verschiedenen Arten von schweren

Ketten definieren zugleich die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Immunglobulinklasse (IgM (μ), IgD (δ), IgG (γ), IgA (α) und IgE (ϵ)).

Immunglobuline G (IgG) haben eine molekulare Masse von ca. 150 kDa und bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (jeweils ca. 440 AS mit einer molekularen Masse von ca. 50 kDa) und zwei identischen leichten Ketten (jeweils ca. 220 AS mit einer molekularen Masse von ca. 25 kDa). Der Zusammenhalt der vier Polypeptidketten wird durch eine Kombination von kovalenten Bindungen (Disulfidbrücken) und nicht-kovalenten Wechselwirkungen gewährleistet. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils zwei Domänen. Aufgrund der vorgefundenen Primärstrukturen bezeichnet man die N-terminale Region als variable Domäne (VL) und die C-terminale Region als konstante Domäne (CL). Die schweren Ketten besitzen ebenfalls eine N-terminale variable Domäne (VH), der sich jedoch C-terminal drei konstante Domänen anschließen (CH1, CH2 und CH3). Die leichten Ketten sind über ihre CL-Domänen durch Disulfidbrücken kovalent mit den CH1-Domänen der schweren Ketten verbunden. Zwei weitere Disulfidbrücken in der sogenannten *hinge*-Region zwischen den konstanten Domänen CH1 und CH2 sorgen für die kovalente Verknüpfung der schweren Ketten. Außerdem sind alle Domänen eines Immunglobulins der Klasse G, welche jeweils aus ca. 110 Aminosäuren aufgebaut sind, durch zahlreiche hydrophobe Seitenketten und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Auf diese Weise entsteht ein Molekülkomplex mit der charakteristischen Y-förmigen Immunglobulinstruktur (Abb. 1; Janeway und Travers, 1997).

Jedes IgG besitzt zwei identische antigenbindende Bereiche, welche als Fv-Regionen bezeichnet werden und sich jeweils aus einer variablen Domäne der leichten Kette (VL) und einer variablen Domäne der schweren Kette (VH) zusammensetzen. Ein Vergleich von Aminosäuresequenzen dieser Domänen zeigte, dass sowohl die variable Region der leichten Kette (VL) als auch die variable Region der schweren Kette (VH) jeweils drei kurze Peptidabschnitte von ca. 5 bis 15 Aminosäuren besitzen, die eine viel höhere Variabilität aufweisen als die übrigen Bereiche dieser Regionen. Diese sechs hypervariablen Abschnitte bilden im nativen Protein die eigentliche Antigenbindungsstelle, das sogenannte Paratop, und werden auch als komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs) bezeichnet. Die insgesamt sechs CDRs (H1, H2 und H3 von VH sowie L1, L2 und L3 von VL) bilden aufgrund der aus ihrer Aminosäuresequenz resultierenden räumlichen Struktur eine Kontaktfläche zur antigenen Determinanten, dem Epitop, und bestimmen so die Spezifität des Antikörpers (Padlan, 1994). Zwischen diesen CDRs liegen die sogenannten Gerüstregionen (*framework regions*, FRs), die der Strukturstabilisierung dienen.

Die konstanten Regionen der schweren Ketten (CH2 und CH3) bilden die Fc-Domäne eines Antikörpers, welche vielfältige biologische Funktionen vermittelt. Beispielsweise können

Antikörper über ihre Fc-Domäne an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen oder anderen zur Phagozytose befähigten Zellen des Immunsystems binden und so den Prozess der Phagozytose einleiten. Auch das Komplementsystem kann durch die Fc-Domäne aktiviert werden, was schließlich zur Bildung von Poren in der Plasmamembran von Mikroorganismen führt und damit zu deren Lyse (Janeway und Travers, 1997).

Die große Wirksamkeit der von unserem humoralen Immunsystem gebildeten Antikörper beruht also auf der engen Zusammenarbeit mit dem restlichen Immunsystem. Dabei sorgen die variablen Domänen für die spezifische Markierung eines Antigens, während die konstanten Domänen für die Aktivierung des Immunsystems verantwortlich sind.

In Abb. 1 sind ein Immunglobulin G und zwei davon abgeleitete Antikörperfragmente schematisch dargestellt. Das Immunglobulin G kann beispielsweise enzymatisch mit Hilfe von Papain gespalten werden, was die Bildung von Fab-Fragmenten zur Folge hat. Noch kleinere Antikörperfragmente, welche nur aus dem antigenbindenden Teil eines Antikörpers bestehen, können mit rekombinanten Methoden in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen hergestellt werden. Bei einem *single chain* Fv-Antikörperfragment (scFv-Fragment) sind die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette (VH und VL) durch einen Peptidlinker zu einer Polypeptidkette verknüpft.

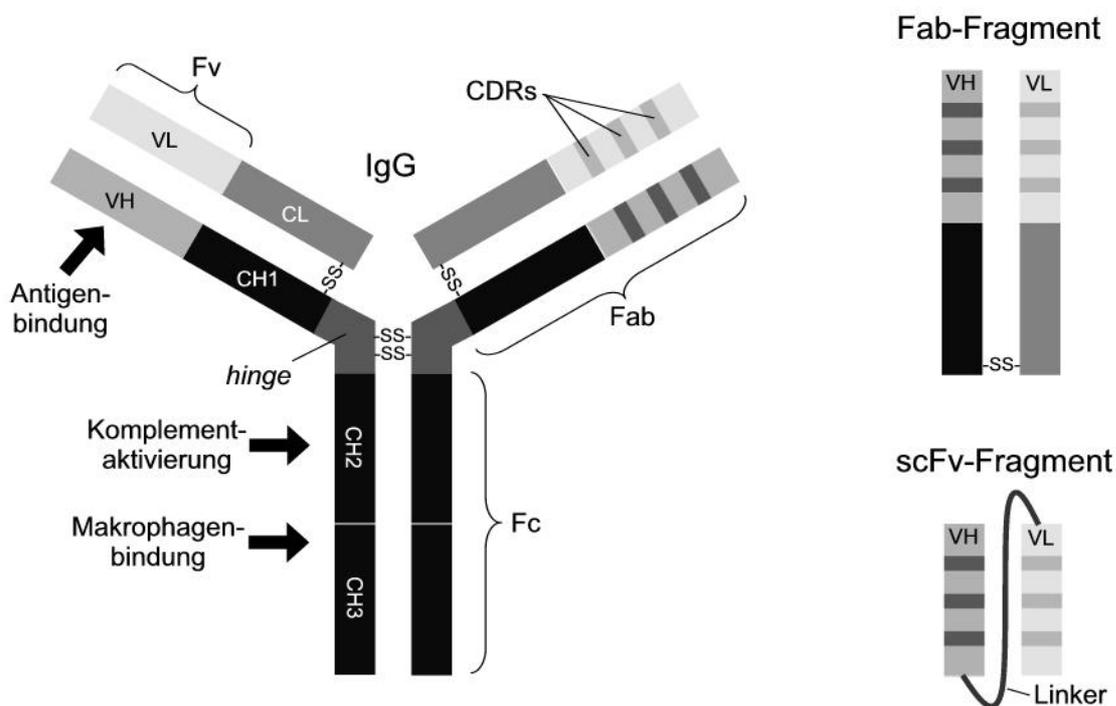


Abb.1 : Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und davon abgeleiteten antigenbindenden Fragmenten. Abkürzungen: VH: variable Region der schweren Kette; VL: variable Region der leichten Kette; CH1-CH3: konstante Regionen der schweren Kette; CL: konstante Region der leichten Kette; *hinge*: *hinge*-Region; Fab: antigenbindendes Fragment; Fc: kristallisierbares Fragment; Fv: variabler Bereich; CDRs: *complementarity determining regions*; Linker: Peptidverbindung zur Verknüpfung von VH und VL; -SS-: Disulfidbrücken.

2.1.2 Herstellung von Antikörpern und Antikörperfragmenten

Seit über 100 Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Frage, wie es möglich ist, Antikörper mit definierter Spezifität zu gewinnen. Die klassische Methode zur Herstellung von spezifischen Antikörpern beruht auf der Immunisierung von Versuchstieren mit einem bestimmten Antigen. Einige Wochen nach der Injektion des Antigens wird das Blutserum des Tieres gesammelt. Dieses Antiserum enthält neben den durch die Immunisierung gebildeten Antikörpern der gewünschten Spezifität auch eine Vielzahl anderer Antikörper. In diesem Gemisch verschiedener Immunglobuline unterschiedlicher Spezifität sind natürlich auch die Antikörper enthalten, die vor der Immunisierung vorhanden waren. Auch die durch die Immunisierung gebildeten Antikörper besitzen meist unterschiedliche Spezifitäten, da die hierfür verwendeten Antigene oft so groß sind, dass mehrere Epitope auf ihrer Oberfläche Platz haben. Das durch die Immunisierung eines Versuchstieres gewonnene Antikörperserum bezeichnet man als polyklonal, da jeder Antikörper definierter Spezifität von einem eigenen B-Lymphozyten produziert wird und die Immunantwort in diesem Fall auf der Vervielfältigung mehrerer verschiedener Zellklone beruht. Die Anwendungsmöglichkeiten von polyklonalen Antikörperseren sind aufgrund der heterogenen Antikörperzusammensetzung begrenzt. Neben den gewünschten sind auch unerwünschte Reaktionen durch unspezifische Antikörper möglich (Liddell und Weeks, 1996).

Mitte der siebziger Jahre wurde mit der Hybridom-Technologie eine Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper entwickelt (Köhler und Milstein, 1975). Bei dieser Methode wird zunächst ebenfalls ein Versuchstier, in der Regel eine Maus, mit einem bestimmten Antigen immunisiert. Anschließend werden aus der Milz des immunisierten Tieres die B-Lymphozyten isoliert und durch Fusion mit Myelomzellen immortalisiert. Aus den so gewonnenen Hybridomzellen werden diejenigen Klone identifiziert und isoliert, die den monoklonalen Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Diese Technik erlaubt die Herstellung von Hybridom-Zelllinien, welche theoretisch beliebige Mengen eines monoklonalen Antikörpers der gewünschten Spezifität bilden können.

Mit Hilfe der Hybridom-Technologie konnten bereits monoklonale Antikörper gegen eine Vielzahl therapeutisch interessanter Antigene, wie beispielsweise Tumorantigene, gewonnen werden. Ihr therapeutischer Nutzen ist jedoch fraglich, da das menschliche Immunsystem innerhalb weniger Tage nach ihrer systemischen Applikation humane anti-Maus-Antikörper (*human anti-mouse antibody* (HAMA) *response*) bildet. Die vom menschlichen Immunsystem gebildeten Antikörper neutralisieren den verabreichten Maus-Antikörper, wodurch dieser seinen potentiellen therapeutischen Nutzen nicht mehr entfalten kann (Courtenay-Luck *et al.*, 1986; Lamers *et al.*, 1995).

Die meisten humanen anti-Maus-Antikörper sind gegen die konstanten Regionen der applizierten monoklonalen Maus-Antikörper gerichtet (Winter und Harris, 1993). Eine Möglichkeit, um die Immunogenität dieser Maus-Antikörper für den Menschen zu reduzieren, ist daher die Herstellung von chimären Antikörpern, welche aus dem antigenbindenden variablen Bereich (Fv) eines monoklonalen Maus-Antikörpers definierter Spezifität und den konstanten Bereichen eines humanen Immunglobulins bestehen (Morrison *et al.*, 1984; Wright *et al.*, 1994). Diese chimären Antikörper binden weiterhin spezifisch ihr Antigen, die HAMA-Antwort fällt jedoch deutlich geringer aus. Trotzdem werden nach Applikation eines chimären Antikörpers immer noch einige humane anti-Maus-Antikörper gebildet, welche gegen den verbliebenen Mausanteil, die variable Region des verabreichten Antikörpers, gerichtet sind (Winter und Harris, 1993; Gavilondo und Larrick, 2000). Um die Immunogenität monoklonaler Maus-Antikörper weiter zu reduzieren, können ihre CDR-Regionen auf ein humanes Fv-Gerüst übertragen werden. Durch dieses als *CDR-grafting* bezeichnete Verfahren werden humanisierte Antikörper generiert, in denen nur noch die CDR-Regionen murinen Ursprungs sind, alle anderen Bereiche sind human (Jones *et al.*, 1986; Winter und Harris, 1993). Die auf diese Weise humanisierten Antikörper haben jedoch oft eine geringere Affinität für das Antigen als ihre Maus-Homologen (Woodle *et al.*, 1992; Adair *et al.*, 1994). Dies ist darauf zurückzuführen, dass auch Aminosäuren außerhalb der CDRs, in den *framework*-Regionen der variablen Domäne, einen großen Einfluss auf die Antigenbindung haben (Foote und Winter, 1992). Durch weitere Veränderungen in den *framework*-Regionen ist es jedoch gelungen, einige humanisierte Antikörper herzustellen, deren Affinität sich kaum noch von der ihrer parentalen Maus-Antikörper unterscheidet (Riechmann *et al.*, 1988; Studnicka *et al.*, 1994).

Vollständig humane Antikörper konnten vereinzelt aus immunisierten SpenderInnen gewonnen werden (Liddell und Weeks, 1996). Auch aus transgenen Mäusen mit humanem Antikörpergenrepertoire können unter Verwendung der bewährten Hybridom-Technologie humane monoklonale Antikörper generiert werden (Jakobovits, 1995, 1998; Fishwild *et al.*, 1996; Brüggemann und Taussig, 1997).

Die dargestellten Methoden zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern für therapeutische Anwendungen sind jedoch sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und durch eine Reihe von weiteren Faktoren limitiert, wie zum Beispiel die Abhängigkeit von Wirbeltierorganismen, die Instabilität von Zelllinien, die geringe Antikörperausbeute aus Hybridom-Zellkulturüberständen sowie medizinische und ethische Grenzen bei der Immunisierung von Menschen. Auch ist es aufgrund der Notwendigkeit, Wirbeltierorganismen zu immunisieren, nicht möglich, Antikörper gegen giftige oder stark pathogene Antigene zu gewinnen.

Um diese Limitierungen zu überwinden, beschäftigen sich Wissenschaftler seit ca. 15 Jahren mit der gentechnologischen Herstellung von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Prokaryoten und eukaryotischen Zellsystemen. Ein großer Durchbruch auf dem Forschungsgebiet der rekombinanten Antikörpertechnologie war die Herstellung von Antikörperfragmenten als rekombinante Proteine im periplasmatischen Raum von *E. coli*, wo das oxidierende Milieu sowie das Vorhandensein von Chaperonen die korrekte Faltung der Antikörperfragmente ermöglicht (Better *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988; Skerra und Plückthun, 1988).

Bei der Generierung rekombinanter Antikörperfragmente steht der antigenbindende, variable Bereich eines Antikörpers im Mittelpunkt. Bei einem *single chain* Fv-Antikörperfragment (scFv-Fragment, Abb. 1) sind die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette (VH und VL) durch einen kurzen Peptidlinker zu einer Polypeptidkette verknüpft. Dabei verbindet dieser Linker den C-Terminus der VH- oder VL-Domäne mit dem N-Terminus der anderen Domäne (Huston *et al.*, 1988; Plückthun, 1991). Die Expression von scFv-Fragmenten erfolgt in der Regel in Prokaryoten, wie zum Beispiel in *E. coli*-Systemen. Auch Fab-Fragmente (Abb. 1) können in *E. coli* als rekombinante Proteine hergestellt werden (Better *et al.*, 1988).

Selbst die Selektion spezifischer Antikörperfragmente kann heute mit Hilfe diverser Display-Techniken vollständig außerhalb von Wirbeltierorganismen durchgeführt werden, wobei die klonale Selektion des Immunsystems imitiert wird. Bei der humoralen Immunantwort exprimieren B-Lymphozyten membranständige Antikörper auf ihrer Oberfläche, wobei jede B-Zelle ausschließlich eine Spezifität besitzt. Im Laufe einer Immunantwort vermehren sich nur durch Bindung eines Antigens stimulierte B-Zellen. Diese B-Zellen differenzieren sich dann zu Plasmazellen, um lösliche und entsprechend spezifisch bindende Antikörper zu produzieren (Janeway und Travers, 1997). In ähnlicher Weise können heute kombinatorische Bibliotheken rekombinanter scFv- oder Fab-Fragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen (*phage display*, Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991; Rader und Barbas, 1997), Bakterien (*bacterial display*, Daugherty, *et al.*, 1998, 1999) oder auch Hefen (*yeast display*, Boder und Wittrup, 1997; Kieke *et al.*, 1997) exprimiert werden.

Das Phagendisplay (*phage display*) zur Selektion antigenbindender scFv-Fragmente aus hochkomplexen Antikörpergenbibliotheken ist dabei die am häufigsten eingesetzte Methode. Als Quelle für die Herstellung humaner Antikörpergenbibliotheken dienen B-Lymphozyten aus dem Blut immunisierter sowie nicht-immunisierter SpenderInnen oder auch genomische DNA, wobei die Komplexität des Antikörpergenrepertoires zunimmt. Die PCR (*polymerase chain reaction*, Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht dabei den Zugriff auf die Antikörpergene. Nach Isolierung der mRNA aus peripheren Lymphozyten und nachfolgender

cDNA-Synthese können die für die variablen schweren und variablen leichten Antikörperketten (VH und VL) kodierenden Gene unter Verwendung spezifischer Oligonukleotidprimer mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Die amplifizierten VH- und VL-Gene werden unter Verwendung gentechnischer Methoden in einen Phagenoberflächenexpressionsvektor kloniert, was schließlich die Präsentation der scFv-Fragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen in Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII erlaubt. Die für die scFv-Fragmente kodierenden Gene sind dabei gleichzeitig im Genom der Phagenpartikel enthalten. Mit einer als Panning bezeichneten Methode ist es möglich, aus einem Gemisch von Phagenpartikeln, welche scFv-Fragmente mit unterschiedlicher Spezifität auf ihrer Oberfläche präsentieren und gleichzeitig genomisch die für diese rekombinanten Proteine kodierenden Gene tragen, spezifisch an ein beliebiges immobilisiertes Antigen bindende Phagenpartikel anzureichern und zu isolieren (Winter und Milstein, 1991).

Die beim Phagendisplay verwendeten filamentöse Bakteriophagen (M13, f1, fd) sind lysogene, fadenförmige Einzelstrang-DNA-Phagen, die F-Pili exprimierende *E. coli*-Bakterien infizieren können. Das zirkuläre DNA-Genom des Phagen, welches aus ca. 6500 Nukleotiden besteht, ist von einer zylinderförmigen Hülle aus ca. 2700 Monomeren des pVIII-Proteins umgeben. Als einzige zusätzliche Bestandteile befinden sich vier andere Hüllproteine in geringer Kopienzahl an den Enden des zylinderförmigen Phagenpartikels, an dem einen Ende pIII und pVI, an dem anderen Ende pVII und pIX (Rasched und Oberer, 1986). Das pIII-Protein ist für die Bindung des Phagenpartikels an den bakteriellen F-Pilus verantwortlich und vermittelt damit die Phageninfektion. Die Replikation der Phagen-DNA erfolgt in drei Phasen. Nach dem Eindringen des einzelsträngigen Phagen-genoms in die Bakterienzelle erfolgt die Synthese eines Komplementärstranges, die zur Bildung der replikativen, doppelsträngigen Phagen-DNA führt. Diese wird im Cytoplasma des Wirtsbakteriums repliziert und dient als Transkriptionsmatrize für die Synthese der Phagenproteine. In der letzten Phase erfolgt der Zusammenbau des Phagenpartikels in der Bakterienmembran, wobei es parallel zum Verpackungsprozess durch die Bakterienmembran ausgeschleust wird. Bei der Replikation filamentöser Phagen werden die Wirtsbakterien nicht lysiert, aber ihre Teilungsrate wird vermindert. Der filamentöse Phagen M13 toleriert eine durch den Einbau zusätzlicher Hüllproteine verursachte Vergrößerung der Phagenhülle und dadurch auch eine Verpackung eines vergrößerten Phagen-genoms. Außerdem können in das Hüllprotein pIII fremde Sequenzen integriert werden, ohne dessen Funktion stark zu beeinträchtigen (Smith, 1985). Diese beiden Eigenschaften werden beim Phagendisplay rekombinanter Antikörperfragmente genutzt. Dabei kommen Phagemidvektoren zum Einsatz, die ein Verpackungssignal der filamentösen Phagen besitzen und für das zu präsentierende scFv-pIII-Fusionsprotein kodieren (Barbas *et al.*,

1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991). Daneben wird ein Helferphagen verwendet, der alle anderen Funktionen eines filamentösen Phagen besitzt, dessen Genom aber eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Verpackungsrate hat. Bei Anwesenheit dieses Helferphagen wird die Phagemid-DNA bevorzugt in die Phagenpartikel eingebaut. Die entstehenden Phagenpartikel tragen neben dem Wildtyp-pIII-Protein auch das scFv-pIII-Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche und können für ein Panning auf einem immobilisierten Antigen zur Anreicherung spezifisch bindender Phagenantikörper eingesetzt werden, um das entsprechende für das Antikörperfragment kodierende Gen zu selektieren.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden das Phagemid pSEX81 (Welschhof *et al.*, 1997) und der M13KO7-Helferphage, ein Derivat des M13-Phagen, verwendet. Alternativ wurde ein Phage ohne funktionelles pIII-Gen eingesetzt. Wird dieser sogenannte Hyperphage für die Verpackung von Antikörpergenbibliotheken verwendet, entstehen rekombinante Phagenpartikel, die das pIII-Protein nur in Fusion mit einem scFv-Fragment auf ihrer Oberfläche tragen. Das pIII-Protein alleine wird nicht präsentiert, da die einzige Quelle für das pIII-Protein das im Phagemid kodierte scFv-pIII-Fusionsprotein ist (Rondot *et al.*, 2001). Die Vorgehensweise bei der Herstellung humaner Antikörpergenbibliotheken und deren Panning auf einem immobilisierten Antigen ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

In jüngster Zeit wurde eine Methode entwickelt, welche die Selektion eines spezifisch bindenden Antikörperfragments vollständig in zellfreien *in vitro*-Systemen ermöglicht. Bei dem als *ribosome display* bezeichneten Verfahren erfolgt die Kopplung von Gen (mRNA) und kodiertem Protein direkt am translatierenden Ribosom (Hanes und Plückthun, 1997; Schaffitzel *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 2001).

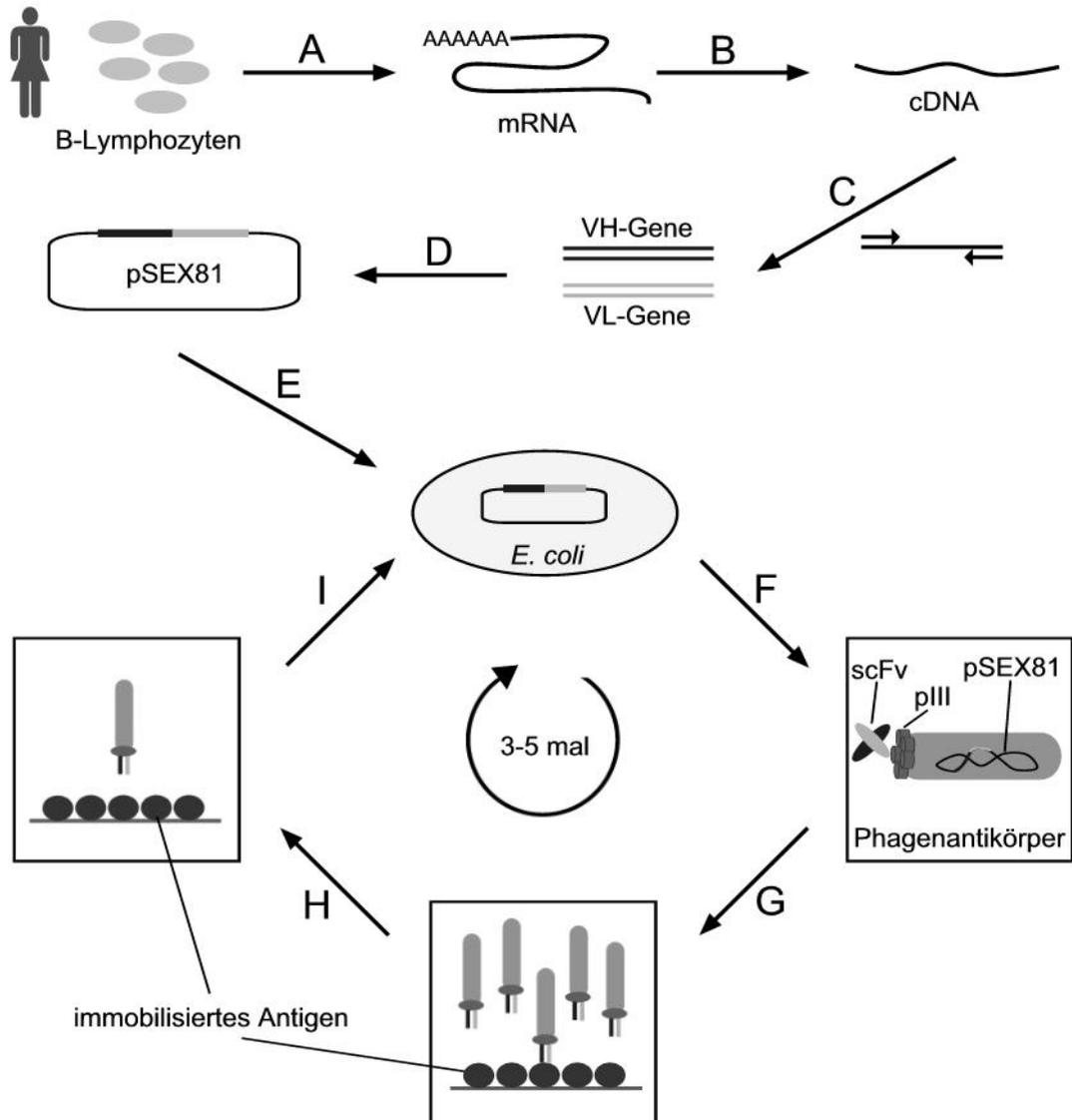


Abb. 2: Schema der Herstellung humaner Antikörpergenbibliotheken und deren Panning auf einem Antigen. A: Isolierung von mRNA aus peripheren Lymphozyten von immunisierten oder nicht-immunisierten PatientInnen; B: Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA; C: PCR-Amplifikation der für die variablen schweren und variablen leichten Antikörperketten (VH und VL) kodierenden Gene; D: Klonierung der VH- und VL-Gene in ein Phagemid (z.B. pSEX81); E: Transformation der Antikörpergenbibliothek in *E. coli*; F: Verpackung der Antikörpergenbibliothek in Phagenpartikel; G: Affinitätsanreicherung von Phagenantikörpern auf einem immobilisierten Antigen; H: Waschen, anschließend Elution gebundener Phagenantikörper; I: Reinfektion und Amplifikation eluierter Phagen in *E. coli*.

Seit der Entwicklung dieser Technologien ist es möglich, Antikörperfragmente gegen praktisch alle potentiellen Antigene herzustellen. So können heute Antikörper gegen hochtoxische oder pathogene Antigene generiert werden, mit denen eine Immunisierung unmöglich ist (Hoogenboom und Chames, 2000). Außerdem kann für die Analyse und Modifikation der Antikörper-DNA die gesamte Technologie der modernen Genetik genutzt werden. Rekombinante Antikörperfragmente können beispielsweise mit heterologen

Proteindomänen wie Enzymen oder Toxinen genetisch fusioniert werden, was ihnen völlig neue Eigenschaften verleiht. Des Weiteren lassen sich zwei unterschiedliche Antikörperfragmente genetisch koppeln, wodurch bispezifische Antikörper entstehen. Die Herstellung dieser Antikörperfusionsproteine eröffnet ein völlig neues Nutzungspotential für Antikörper, sowohl für die Forschung und Diagnostik als auch für die Therapie (Rohrbach *et al.*, 2003).

2.2 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom, auch als Brustkrebs bezeichnet, ist eine maligne Erkrankung der Brust und geht aus Epithelzellen des Drüsengewebes der Brustdrüse (*Mamma*) hervor.

2.2.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom macht etwa 18 % aller malignen Erkrankungen der Frau aus und ist damit die häufigste weibliche Tumorerkrankung. Weltweit erkranken jährlich etwa eine Million Frauen an einem Mammakarzinom (McPherson *et al.*, 2000). In der Bundesrepublik Deutschland gibt es jährlich etwa 45000 Neuerkrankungen, was etwa ein bis zwei Neuerkrankungen pro 1000 Frauen entspricht. So erkranken ca. 10 % aller deutschen Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (Robert Koch Institut, 2003). Die meisten Patienten erkranken zwischen der vierten und siebten Lebensdekade, wobei das mittlere Erkrankungsalter in den Jahren 1996 und 1997 bei 61,9 Jahren lag (Engel *et al.*, 2000). Männer sind mit einem Anteil von etwa 1 % aller auftretenden Fälle selten betroffen. In Deutschland versterben jährlich rund 18000 Frauen an einem Mammakarzinom, was einer Mortalitätsrate von etwa 43 je 100000 Frauen entspricht (Statistisches Bundesamt, 1997, 1998). Diese Erkrankung gilt als die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr (McPherson *et al.*, 2000). Das Mammakarzinom ist viel häufiger in Nordamerika, Nord- und Mitteleuropa zu beobachten als in Asien oder Afrika (McPherson *et al.*, 2000).

2.2.2 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung des Mammakarzinoms sind nicht genau bekannt. Nur bei etwa fünf bis zehn Prozent der an Mammakarzinom erkrankten Frauen werden genetische Faktoren als Ursache diskutiert. Dabei spielen vor allem Mutationen in den beiden Brustkrebsgenen BRCA1 (*breast cancer gene 1*) und BRCA2 (*breast cancer gene 2*) eine Rolle. Bei diesen beiden Genen handelt es sich um Tumorsuppressorgene, die auf den Chromosomen 17 bzw. 13 lokalisiert sind. Die Genprodukte beider Gene interagieren mit Genprodukten anderer Tumorsuppressorgene und unterstützen diese bei der Reparatur von DNA-Schäden (McPherson *et al.*, 2000; Nathanson *et al.*, 2001). Das Alter spielt bei der Entstehung eines Mammakarzinoms eine wichtige Rolle. So verdoppelt sich bis zur Menopause alle zehn Jahre das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Zu den weiteren Risikofaktoren, an einem Mammakarzinom zu erkranken, zählen eine frühe Menarche, eine späte Menopause und Kinderlosigkeit. Auch spielt das Alter der ersten vollständig ausgetragenen Schwangerschaft eine Rolle. Frauen, die ihr erstes Kind erst nach dem 30. Lebensjahr gebären, haben beispielsweise ein doppelt so hohes Risiko, zu erkranken, als Frauen, die bei der Geburt ihres ersten Kindes das 20. Lebensjahr noch nicht erreicht haben. Frauen, die ihr erstes Kind nach dem 35. Lebensjahr gebären, haben sogar ein höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken als kinderlose Frauen. Weiterhin scheint die Ernährungsweise bedeutsam zu sein. So wird eine fettreiche Ernährung und der Konsum von Alkohol mit einem erhöhten Risiko in Zusammenhang gebracht. Außerdem wird die Hormoneinnahme als Risikofaktor diskutiert. So scheint die hormonale Substitutionstherapie zur Behandlung von Beschwerden während des Klimakteriums das Erkrankungsrisiko zu erhöhen, wohingegen die hormonale Kontrazeption keinen Einfluss hat (McPherson *et al.*, 2000).

2.2.3 Histologie, Verlauf und Symptomatik

Das Mammakarzinom stellt eine maligne Veränderung des Drüsengewebes der Brustdrüse (*Mamma*) dar. Das Drüsengewebe ist aus Drüsenläppchen (Lobuli) aufgebaut, welche die Muttermilch produzieren und in kleine Kanäle (Ductus) münden. Diese verbinden sich zu großen Ausgängen und führen zur Brustwarze (*Papilla mammae* oder *Mamilla*). Die Lobuli und Ductus sind von Epithelzellen ausgekleidet. Die Einteilung oder Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgt histologisch, wobei zwischen duktalem und lobulärem Mammakarzinom sowie zwischen nichtinvasivem und invasivem Mammakarzinom unterschieden wird. Das duktales Mammakarzinom geht aus Epithelzellen der Drüsenausgänge hervor,

während das lobuläre Mammakarzinom aus Epithelzellen der Drüsenläppchen entsteht. Andere, seltenere Formen des Mammakarzinoms, sind der Morbus Paget, ein Karzinom der Brustwarze, oder der Phylloide Tumor. Neben Karzinomen gibt es aber auch Sarkome, die vom Bindegewebe der *Mamma* ausgehen. Bei nichtinvasiven oder *in situ* Mammakarzinomen sind die malignen Veränderungen auf einen abgekapselten kleinen Bereich im Drüsengewebe begrenzt. Die Tumorzellen breiten sich in diesem Fall innerhalb der Drüsenläppchen oder Milchgänge aus, wachsen jedoch nicht ins benachbarte Gewebe ein. Von einem invasiven Mammakarzinom spricht man, wenn die Tumorzellen das Drüsengewebe durchbrechen und sich im Brustgewebe ansiedeln. Ab diesem Stadium besteht das Risiko einer Metastasierung (Pschyrembel, 1998; Roche Lexikon Medizin, 1999; Sainsbury *et al.*, 2000).

Die Metastasierung ist in der frühen Phase kanalikulär und auf die *Mamma* begrenzt. Die weitere Metastasierung erfolgt dann lymphogen in die regionären Lymphknoten wie beispielsweise in die axillären oder retrosternalen Lymphknoten. Die Fernmetastasierung erfolgt hämatogen in das Skelettsystem, die Lunge, die Leber, das Gehirn oder andere Organsysteme (Pschyrembel, 1998; Roche Lexikon Medizin, 1999; Sainsbury *et al.*, 2000).

Als Leitsymptom gilt in 75 % der Fälle ein schmerzloser, derber Knoten bzw. Verhärtungen in der Brust. In selteneren Fällen werden eine sezernierende *Mamilla*, ein lokales Ödem oder die Einziehung der *Mamilla* beobachtet. Die genannten Symptome sind Erstsymptome eines schon fortgeschrittenen Karzinoms. Frühsymptome sind verdächtige Tastbefunde bei der Krebsfrüherkennungsuntersuchung sowie bei der regelmäßigen Selbstuntersuchung der Brust. Weitere klinische Symptome sind die Einziehung der Haut, die Unverschieblichkeit der Haut über Verhärtungen, die Grobporigkeit der Haut (Orangenschalenhaut als Folge eines Lymphödems) sowie offene Ulzerationen (Pschyrembel, 1998; Roche Lexikon Medizin, 1999).

2.2.4 Therapie und Prognose

Ausschlaggebend für die Wahl der Therapiemaßnahmen sind die Tumorgöße, die histologischen Eigenschaften des Tumors, der Lymphknotenstatus, der Hormonrezeptorstatus, der Metastasierungsgrad sowie der Menopausenstatus. Die Primärtherapie erfolgt lokal und besteht aus einer operativen Behandlung sowie einer Strahlentherapie. Die radikale Mastektomie, also die Mammaamputation, muss heute nur noch bei etwa einem Drittel der Patientinnen erfolgen. Sie sollte immer nur dann durchgeführt werden, wenn der Tumor im Verhältnis zum noch gesunden Gewebe zu groß ist oder ungünstige histologische Eigenschaften vorliegen, wie beispielsweise der Nachweis mehrerer Krebsherde

(Multizentrität). Bei etwa zwei Drittel der Patientinnen wird eine brusterhaltende Operation durchgeführt. Voraussetzung hierfür ist eine günstige Relation von Tumorgröße zu Brustvolumen. Außerdem sollte keine Multizentrität vorliegen. Unabhängig vom Ausmaß der Operation müssen die axillären Lymphknoten der betroffenen Seite entfernt und auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht werden. Die Strahlentherapie ist bei der Behandlung des Mammakarzinoms von großer Bedeutung. Nach einer brusterhaltenden Operation muss immer eine Strahlentherapie der Restbrust erfolgen. Nach einer Mastektomie muss aufgrund histologischer Faktoren individuell geprüft werden, ob eine Strahlentherapie notwendig ist. Die Strahlentherapie vermindert das Auftreten von Lokalrezidiven deutlich. Um das Risiko eines Lokalrezidivs und einer Metastasierung weiter zu vermindern, wird heute eine adjuvante, systemische Therapie durchgeführt. Die adjuvante Therapie besteht aus einer Hormontherapie, einer Chemotherapie oder einer Kombination aus beiden und erfolgt im Anschluss an die Primärtherapie. Die Hormontherapie, die auch als endokrine Therapie bezeichnet wird, ist beschränkt auf Frauen mit nachgewiesenen spezifischen Hormonrezeptoren (Östrogen- und Progesteronrezeptoren) im Tumorgewebe. Zur endokrinen Therapie stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung, die sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Bisher besteht die Therapie der Wahl in der Gabe des Antiöstrogens Tamoxifen, welches die Bindung von Östrogen an die Östrogenrezeptoren verhindert indem es selbst an die Östrogenrezeptoren bindet und diese damit blockiert. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit im Rahmen einer Hormontherapie besteht darin, die natürliche Bildung von Östrogenen in den Ovarien zu unterbinden. Eine Hemmung der Östrogenproduktion ist beispielsweise durch eine Ovariectomie, einer operativen Entfernung der Eierstöcke, möglich. Es können auch *gonadotropin releasing hormone* (GnRH)-Analoga verabreicht werden, die ebenfalls die Östrogenproduktion hemmen. Außerdem werden Aromatasehemmer eingesetzt. Diese neuartigen Medikamente hemmen das Enzym Aromatase, das Hormonvorstufen in Östrogene umwandelt, und dadurch die Östrogenproduktion. Bei der zytostatischen Chemotherapie zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms werden verschiedene Zytostatika in Kombination verabreicht. Die klassische Chemotherapie beim Mammakarzinom erfolgt mit den Substanzen Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil. Eine Alternative zu diesem Schema ist die anthrazyklinhaltige Chemotherapie mit Epirubicin oder Doxorubicin (Pschyrembel, 1998; Sainsbury *et al.*, 2000; Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

Das Wiederauftreten einer Mammakarzinomerkrankung kann als lokales oder lokoregionales Rezidiv oder als Fernmetastasierung in anderen Organsystemen stattfinden. Das lokoregionale Rezidiv kann isoliert als Lokalrezidiv auftreten, d.h. im Bereich der *Mamma* nach einer brusterhaltenden Therapie oder an der Brustwand nach einer Mastektomie. Als regionales Rezidiv wird der Tumorbefall der homolateralen regionalen Lymphknoten

bezeichnet. Die Bildung von Fernmetastasen erfolgt vorzugsweise im Skelettsystem, in der Lunge, in der Leber oder im Gehirn. Auch kombinierte Rezidivformen sind möglich. Lokalrezidive treten mit einer Häufigkeit von 8 % nach brusterhaltender Operation und Bestrahlung der Restbrust auf. Die Fünfjahres-Überlebensrate beträgt 65 %. Rezidive an der Thoraxwand nach Mastektomie werden in 4 % und Rezidive in den axillären Lymphknoten in 1 % der Fälle beobachtet und weisen eine Fünfjahres-Überlebensrate von 50 % bzw. 55 % auf. An verschiedenen Stellen gleichzeitig auftretende lokoregionale Rezidive werden mit einer Häufigkeit von 16 % beobachtet und sind mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von 21 % verbunden (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

Die Therapie von Lokalrezidiven nach brusterhaltender Operation besteht in der erneuten operativen Intervention. Dabei wird meist eine Mastektomie durchgeführt. Im Einzelfall, insbesondere bei kleinen Tumoren oder nach einem langen rezidivfreien Intervall, besteht die Möglichkeit, erneut brusterhaltend vorzugehen. Die Behandlung eines Rezidivs an der Thoraxwand nach einer primären Mastektomie besteht in der Resektion der Thoraxwand. Das metastasierte Mammakarzinom wird in der Regel systemisch therapiert. Dabei muss abgewogen werden, ob eine Hormontherapie, eine Chemotherapie oder eine Kombination aus beiden eingesetzt werden soll. Bei positivem Hormonrezeptorstatus sollte die Hormontherapie grundsätzlich bevorzugt werden, da diese weniger toxisch als eine Chemotherapie ist. Bei negativem Hormonrezeptorstatus wird eine Chemotherapie durchgeführt. Sowohl die Hormon- als auch die Chemotherapie erfolgen dabei nach den selben Prinzipien wie in der adjuvanten Therapie beschrieben (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

In jüngster Zeit wird ein neuartiges Medikament für die Immuntherapie des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt. Bei diesem Medikament handelt es sich um den humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der gegen Her-2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) gerichtet ist. Her-2/neu ist ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren, der auf der Oberfläche von Tumorzellen von etwa einem Drittel der Mammakarzinome verstärkt exprimiert wird. Trastuzumab blockiert diesen Rezeptor und hemmt so das Wachstum von Her-2/neu-überexprimierenden Tumoren. Dieser Antikörper wird sowohl alleine als auch in Kombination mit zytostatischen Chemotherapeutika eingesetzt. Da Trastuzumab selektiv nur Her-2-exprimierende Zellen angreift, sind die Nebenwirkungen, verglichen mit denen einer Chemotherapie, weniger stark ausgeprägt. Die Wirksamkeit dieses Medikaments bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms konnte in klinischen Studien gezeigt werden. (Goldenberg, 1999; Bange *et al.*, 2001; Baselga, 2001; Slamon *et al.*, 2001; Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

2.3 MUC1-basierte Immuntherapie des Mammakarzinoms

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen für die Behandlung des Mammakarzinoms gewinnt die Immuntherapie immer mehr an Bedeutung. So wird, wie bereits beschrieben, der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der gegen das tumorassoziierte Antigen Her-2/neu gerichtet ist, seit einigen Jahren erfolgreich für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt (Baselga, 2001; Slamon *et al.*, 2001). Ein weiteres tumorassoziiertes Antigen, das ein vielversprechendes Zielmolekül für eine gerichtete Immuntherapie des Mammakarzinoms sowie anderer Adenokarzinome darstellt, ist MUC1 (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000a).

2.3.1 Das tumorassoziierte Antigen MUC1

Das MUC1-Molekül ist ein transmembranes Glykoprotein, das im Drüsengewebe verschiedener Organe (z.B. Brust, Magen, Pankreas und Blase) normalerweise auf der apikalen Oberfläche von Epithelzellen exprimiert wird (Zotter *et al.*, 1988). Das für dieses Transmembran-Glykoprotein kodierende MUC1-Gen ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Swallow *et al.*, 1987). Das Genprodukt MUC1 hat eine molekulare Masse von über 400 kDa und besteht aus einem 69 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Abschnitt, einer transmembranen Domäne und einer stark glykosylierten extrazellulären Domäne (Abb. 3A). Die für die zytoplasmatische und transmembrane Domäne kodierenden Regionen sind hochkonserviert, was auf die funktionelle Wichtigkeit dieser Domänen hinweist. Die C-terminale zytoplasmatische Domäne bindet an Mikrofilamente des Zytoskeletts und interagiert mit intrazellulären Proteinen, die eine Rolle bei Prozessen der zellulären Signalübertragung spielen (Parry *et al.*, 1990; Spicer *et al.*, 1991; Carraway *et al.*, 2003). Die N-terminale extrazelluläre Domäne besteht hauptsächlich aus einem als VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Region bezeichneten Abschnitt mit Wiederholungsdomänen aus einer Abfolge von jeweils 20 Aminosäuren. Bei fünf dieser Aminosäuren handelt es sich um Serin und Threonin, an deren OH-Gruppen über eine O-Glykosylierung Zuckerreste angeheftet werden können (Gendler *et al.*, 1988, 1990; Stadie *et al.*, 1995). Die Anzahl der Wiederholungsdomänen variiert zwischen 25 und 100 (Gendler *et al.*, 1990).

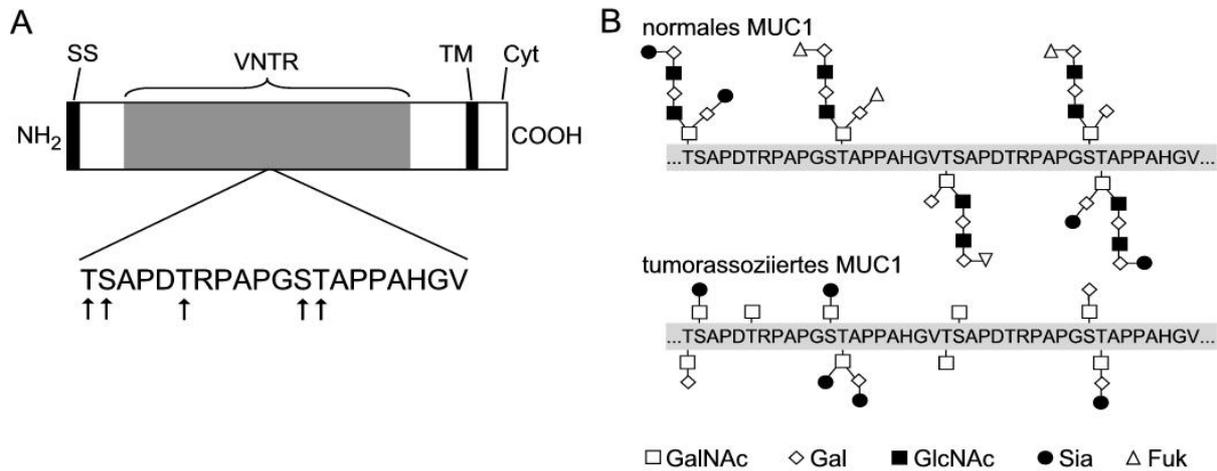


Abb. 3: Schematische Darstellung von MUC1 sowie der Glykosylierung der VNTR-Domäne von normalem MUC1 und tumorassoziertem MUC1. A: MUC1-Molekül. Abkürzungen: SS: Signalsequenz; VNTR: *variable number of tandem repeats*; TM: transmembrane Domäne; Cyt: zytoplasmatische Domäne; Pfeile: Aminosäurereste, an deren OH-Gruppen über eine O-Glykosylierung Oligosaccharidketten angeheftet werden können. B: Glykosylierung der VNTR-Domäne von normalem MUC1 und tumorassoziertem MUC1. Abkürzungen: GalNAc: N-Acetylgalaktosamin; Gal: Galaktose; GlcNAc: N-Acetylglukosamin; Sia: Sialinsäure; Fuk: Fucose.

In Karzinomen, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, wird MUC1 auf der gesamten Oberfläche der Epithelzellen überexprimiert (Zotter *et al.*, 1988; Girling *et al.*, 1989; Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999). Dieser Verlust der polarisierten Expression geht mit einer veränderten Glykosylierung von MUC1 einher (Abb 3B). Im normalen Drüsengewebe ist die VNTR-Region von MUC1 mit langen und stark verzweigten Oligosaccharidketten besetzt, wobei im Durchschnitt nur die Hälfte der insgesamt fünf pro *repeat* für eine O-Glykosylierung geeigneten Aminosäurereste glykosyliert sind. Dagegen sind in tumorassoziertem MUC1 die Oligosaccharidketten kurz, kaum verzweigt und fast alle fünf pro *repeat* für eine O-Glykosylierung potentiellen Aminosäurereste mit Zuckerresten besetzt. Das im Vergleich zu normalem MUC1 unterschiedliche Glykosylierungsmuster von tumorassoziertem MUC1 ist wahrscheinlich auf ein verändertes Expressionsprofil der für die Anheftung der Zuckerreste im Golgi-Apparat verantwortlichen Enzyme zurückzuführen (Müller *et al.*, 1997, 1999; Hanisch *et al.*, 1999). Aufgrund dieses veränderten Glykosylierungsmuster entstehen in der VNTR-Region des tumorassozierten MUC1-Moleküls neue antigene Determinanten auf Basis der Peptidsequenz, die im normalen MUC1 durch die langen und stark verzweigten Oligosaccharidketten maskiert ist. Da die Oligosaccharidketten von tumorassoziertem MUC1 eine im Vergleich zu normalem MUC1 unterschiedliche Zuckerzusammensetzung besitzen, entstehen auch neue Epitope auf Basis dieser unterschiedlichen Kohlenhydratzusammensetzung.

Das tumorassozierte MUC1-Molekül stellt aufgrund seiner im Vergleich zu normalem MUC1 veränderten Eigenschaften ein vielversprechendes Zielantigen für eine passive oder aktive Immuntherapie des Mammakarzinoms oder anderer Adenokarzinome dar (Taylor-

Papadimitriou *et al.*, 1999). So gibt es bereits eine Vielzahl von monoklonalen Maus-Antikörpern, die gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtet sind und dabei die durch die veränderte Glykosylierung entstehenden Epitope erkennen (Prize *et al.*, 1998; Xing *et al.*, 2001). Auch eine aktive Immuntherapie auf der Basis von synthetischen MUC1-Peptiden scheint vielversprechend zu sein (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000a).

2.3.2 Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1

Seit etwa 20 Jahren werden mit Hilfe der Hybridom-Technologie monoklonale Antikörper gegen das tumorassoziierte Antigen MUC1 hergestellt. Die monoklonalen Maus-Antikörper sind in der Regel gegen die VNTR-Domäne von MUC1 gerichtet, wobei das Epitop der meisten dieser Antikörper innerhalb der PDTRPAP-Peptidsequenz liegt (Prize *et al.*, 1998; Schol *et al.*, 1998). Einige MUC1-spezifische monoklonale Antikörper wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt. Der monoklonale Antikörper HMFG1 diente als Träger radioaktiver Substanzen für die Therapie von Ovarialkarzinom-Patientinnen (Maraveyas *et al.*; 1994; Nicholsson *et al.*, 1998). Ein anderer MUC1-spezifische Antikörper, der monoklonale Antikörper BrE-3, wurde ebenfalls als Träger radioaktiver Substanzen verwendet und für die Behandlung von Mammakarzinom-Patientinnen eingesetzt (DeNardo *et al.*, 1997). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde für die notwendigen Kontrollversuche der MUC1-spezifische monoklonale Maus-Antikörper BM7 verwendet (Brümmendorf *et al.*, 1995). Das minimale Epitop dieses Antikörpers besteht aus einem Glykopeptid der VNTR-Domäne und umfasst die Aminosäuren PDTRPAPG, wobei der Threoninrest mit N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) glykosyliert ist. Das nicht-glykosylierte Peptidepitop wird von dem BM7-Antikörper nicht erkannt. Dieser Antikörper wurde im Rahmen von Heilversuchen für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt und sorgte bei sieben Patientinnen für eine Eliminierung von Tumorzellen im Knochenmark (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Ein Problem beim therapeutischen Einsatz von MUC1-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern ist jedoch, wie bereits beschrieben, die Bildung von humanen anti-Maus-Antikörpern (HAMA). Einen Ausweg eröffnet die Chimärisierung oder Humanisierung dieser für eine Immuntherapie potentiell interessanten MUC1-spezifischen Maus-Antikörper. So konnte beispielsweise der HMFG1-Antikörper erfolgreich humanisiert werden (Verhoeyen *et al.*, 1993).

Das tumorassoziierte MUC1 ist auch im Menschen selbst immunogen. IgM- und IgG-Antikörper, die gegen Peptidepitope der VNTR-Domäne von tumorassoziiertem MUC1

gerichtet sind, konnten in PatientInnen mit Mamma-, Kolon-, Pankreas- oder Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Kotera *et al.*, 1994; Petrarca *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1998; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 1998). MUC1-spezifische B-Zellen wurden aus tumorbefallenen Lymphknoten von Ovarialkarzinom-Patientinnen isoliert (Petrarca, *et al.*, 1999). In Patientinnen mit Mamma- und Ovarialkarzinomen konnten in Immunkomplexen mit zirkulierendem MUC1 gebundene MUC1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Gourevitch *et al.*, 1995). Auch in nicht von Adenokarzinomen betroffenen, gesunden Menschen konnten MUC1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Bon *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 1998; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 1998).

Mit Hilfe des Phagendisplays ist es möglich, humane monoklonale Antikörperfragmente gegen die unterschiedlichsten Antigene zu gewinnen, wie beispielsweise gegen tumorassoziierte Antigene. So konnten aus einer humanen Antikörpergenbibliothek, die aus dem Blut nicht-immunisierter, gesunder SpenderInnen generiert wurde, erstmals humane, gegen die VNTR-Domäne von MUC1 gerichtete scFv-Fragmente isoliert werden (Henderikx *et al.*, 1998). Vor kurzem wurde der vollständige und komplett humane, gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtete IgG-Antikörper PH1-IgG1 beschrieben und charakterisiert. Seine variable Domäne stammt aus einer humanen Fab-Antikörpergenbibliothek, welche ebenfalls aus dem Blut nicht-immunisierter, gesunder SpenderInnen generiert wurde (de Haard *et al.*, 1999; Henderikx *et al.*, 2002).

Die durch eine humorale Immunantwort gegen MUC1 gebildeten humanen Antikörper sind gegen andere Peptidpitope der VNTR-Domäne gerichtet als die Mehrzahl der mit Hilfe der Hybridom-Technologie generierten monoklonalen Maus-Antikörper (von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000a). Die humanen MUC1-spezifischen Antikörper, die in Patientinnen mit Mamma- und Ovarialkarzinom nachgewiesen wurden, sind mit einem aus den Aminosäuren APPAH bestehenden Peptidpitop der VNTR-Domäne reaktiv (Petrarca *et al.*, 1996). Zwei humane scFv-Fragmente, die aus einer aus dem Blut nicht-immunisierter SpenderInnen generierten, humanen Antikörpergenbibliothek stammen, erkennen die Aminosäuresequenzen PAPG(S) und TRPAPGSTAPPAH der VNTR-Domäne von MUC1 (Henderikx *et al.*, 1998). Die variable Domäne des mit Hilfe rekombinanter Techniken generierten, vollständig humanen Antikörpers PH1-IgG1 ist gegen ein aus den Aminosäuren PAP bestehendes Peptidpitop gerichtet (de Haard *et al.*, 1999; Henderikx *et al.*, 2002).

2.3.3 Vakzinierung mit synthetischen MUC1-Peptiden

Ein anderer immuntherapeutischer Ansatz für die Behandlung des Mammakarzinoms sowie anderer Adenokarzinome ist die Vakzinierung von betroffenen PatientInnen mit

synthetischen MUC1-Peptiden, um eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen tumorassoziiertes MUC1 zu induzieren oder zu verstärken. Die in mehreren klinischen Vakzinierungsstudien verwendeten synthetischen MUC1-Peptide repräsentierten die VNTR-Domäne von tumorassoziiertem MUC1. In drei klinischen Phase I-Studien wurden Mammakarzinom-Patientinnen mehrfach mit synthetischen MUC1-Peptiden der VNTR-Domäne von MUC1 immunisiert. Die dabei verwendeten 30mer-, 33mer- und 106mer-MUC1-Peptide waren kovalent mit KLH konjugiert und wurden gemeinsam mit einem weiteren Adjuvans verabreicht, um die Immunantwort der Patientinnen zu verstärken. Die Immunisierungen mit synthetischen MUC1-Peptiden induzierten in den Patientinnen hohe MUC1-spezifische IgG- und IgM-Antikörpertiter (Adluri *et al.*, 1999; Gilewski *et al.*, 2000; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000b). Die in diesen Patientinnen induzierten Antikörper konnten *in vitro* eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) gegenüber MUC1-überexprimierenden Tumorzellen vermitteln (Snijdewint *et al.*, 2001). In einer anderen klinischen Phase I-Studie wurden von einem metastasierten Mamma-, Magen-, oder Kolonkarzinom betroffene PatientInnen wiederholt mit einem aus fünf *repeats* bestehenden und an Mannan gekoppelten MUC1-Fusionsprotein immunisiert. Auch in dieser Studie verursachte die verabreichte Vakzine in den PatientInnen eine verstärkte Bildung von MUC1-spezifischen IgG-Antikörpern. Die induzierten MUC1-spezifischen Antikörper waren mit den Aminosäuresequenzen STAPPAHG und PAPGSTAP der VNTR-Domäne reaktiv (Karanikas *et al.*, 1997). Die Immunisierungen von Karzinom-PatientInnen mit synthetischen MUC1-Peptiden induzieren in erster Linie eine starke humorale Immunantwort, wohingegen eine zelluläre Immunantwort nur in Einzelfällen beschrieben wurde und kontrovers diskutiert wird. Auch ein therapeutischer Nutzen dieser Vakzinierungsstudien konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden (von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000a; Musselli *et al.*, 2002).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde Blut von sieben Mammakarzinom-Patientinnen verwendet, die mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid im Rahmen eines Heilversuches immunisiert worden waren (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Diese sieben Patientinnen waren alle von einem metastasierten Mammakarzinom betroffen und befanden sich zu Beginn dieses Heilversuches in einem gesundheitlich stabilen Zustand. Für die Immunisierungen wurde ein synthetisch hergestelltes MUC1-Glykopeptid verwendet, welches kovalent mit dem Adjuvans KLH konjugiert war, um die Immunantwort der Patientinnen gegenüber dem verabreichten MUC1-Glykopeptid zu verstärken. Das synthetische MUC1-Glykopeptid hatte die Aminosäuresequenz APDT(GalNAc)RPAPGSTAPPA, wobei ein Threoninrest mit N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) glykosyliert war. Es repräsentierte somit die VNTR-Domäne von tumorassoziiertem MUC1. Die Patientinnen erhielten jeweils mehrere Immunisierungen

mit dieser synthetisch hergestellten Vakzine, wobei der zeitliche Abstand zwischen zwei Immunisierungen eine Woche betrug. Die Entwicklung der Antikörpertiter im Serum der Patientinnen wurde mit Hilfe von ELISAs untersucht (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Dabei kamen verschiedene Antigene zum Einsatz, das Glykopeptid 460, welches dem für die Immunisierungen verwendeten Glykopeptid entsprach, KLH und Brust-Muzin-Antigen (BMA). BMA wurde aus der MUC1-exprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie T47D präpariert und unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers BM7 affinitätschromatographisch gereinigt. Es stellte somit tumorassoziiertes MUC1 dar (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Tab. 1 zeigt eine Zusammenfassung der Serumtiterentwicklung der sieben mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Patientinnen nach Abschluss der Immunisierungen.

Tab. 1: Serumtiterentwicklung der sieben mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Patientinnen. Dargestellt ist die Anzahl der Immunisierungen sowie die Reaktivität der im Serum der Patientinnen enthaltenen IgG- und IgM-Antikörper gegenüber verschiedenen Antigenen nach Abschluss der Immunisierungen. Als Antigene dienten ein synthetisches MUC1-Glykopeptid (460), das dem für die Immunisierungen verwendetem MUC1-Glykopeptid entsprach, KLH und MUC1 (BMA). ++: sehr starke Reaktivität; +: starke Reaktivität; -: keine Reaktivität.

Patientin	Anzahl der Immunisierungen	IgG/IgM-Antikörper im Serum		
		460	KLH	BMA
S	4	++	++	-
1	5	+	+	-
2	6	++	+	-
3	4	+	+	-
4	5	+	+	-
5	8	+	+	-
6	5	+	+	-

Im Serum aller immunisierten Patientinnen konnten IgG- und IgM-Antikörper nachgewiesen werden, die gegen das für die Immunisierungen verwendete, synthetische MUC1-Glykopeptid gerichtet waren. Auch KLH-spezifische Antikörper wurden in allen Patientinnen nachgewiesen. BMA-spezifische Antikörper, also Antikörper, die an tumorassoziiertes MUC1 binden, konnten jedoch nicht detektiert werden. In den Patientinnen wurden durch die Immunisierungen Antikörper induziert, die an die für die Immunisierungen verwendeten Komponenten, synthetisches MUC1-Glykopeptid sowie KLH, binden konnten. Diese durch die Immunisierungen induzierten Antikörper zeigten aber keine Reaktivität gegenüber tumorassoziiertem MUC1 (BMA) (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung).

2.4 Zielsetzung

Von einem metastasiertem Mammakarzinom betroffene Patientinnen wurden im Rahmen eines Heilversuches mit einem synthetischen Glykopeptid, das die VNTR-Region von tumorassoziiertem MUC1 repräsentierte, immunisiert. Aus dem Blut dieser Patientinnen sollten humane rekombinante Antikörperfragmente mit spezifischer Bindung an tumorassoziiertes MUC1 gewonnen werden. Zu diesem Zweck sollten scFv-Antikörpergenbibliotheken in einen Phagemid kloniert und für eine *in vitro*-Selektion mit Hilfe des Phagendisplays eingesetzt werden. Ein so isoliertes Antikörpergen sollte in einen *E. coli*-Expressionsvektor umklontiert werden, um ein funktionelles *single chain* Fv-Antikörperfragment (scFv-Fragment) zu produzieren. Dieses scFv-Fragment sollte gereinigt und bezüglich seiner Spezifität und Affinität analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue

recA1 endA1 gyr A96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacI^qZΔM15Tn10* (Tet^r)]
(Stratagene, La Jolla, USA)

E. coli DH5α/pIII [M13KO7ΔpIII] (Rondot *et al.*, 2001)

3.1.2 Phagen

M13KO7 Helferphage
Hyperphage

New England Biolabs, Frankfurt
Rondot *et al.*, 2001

3.1.3 Mediengrundbestandteile zur Kultivierung von Bakterien

Agar
Bacto-Trypton
Hefe-Extrakt
SOC-Medium

Qbiogene, Carlsbad, USA
Qbiogene, Carlsbad, USA
Qbiogene, Carlsbad, USA
Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Medienzusätze zur Kultivierung von Bakterien

Ampicillin
Glukose
IPTG
Kanamycin
Tetracyclin

Calbiochem, Schwalbach
Qbiogene, Carlsbad, USA
Qbiogene, Carlsbad, USA
Calbiochem, Schwalbach
Stratagene, La Jolla, USA

3.1.5 Vektoren

pSEX81
pOPE101-215(Yol)

Welschhof *et al.*, 1997
Schmiedl *et al.*, 2000

3.1.6 Eukaryotische Zellen

Fibroblasten

Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik
Heidelberg

T47D-Zellen

Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik
Heidelberg

3.1.7 Proteine

Brust-Muzin-Antigen (BMA), gereinigtes MUC1

Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik
Heidelberg

Biotin-konjugiertes Brust-Muzin-Antigen (BMA-Bio)

Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik
Heidelberg

3.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

3.1.8.1 Primer zur PCR-Amplifikation humaner Immunglobulin-Gene

(Rohrbach, 2000)

3.1.8.1.1 Primer zur Amplifikation der VH-Region

Reverse Primer (konstante Region)

IgG 5'-GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA-3'

Forward Primer (variable Region)

VH-1a 5'-CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT-3'

VH-1b 5'-CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT-3'

VH-1c 5'-CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT-3'

VH-1d 5'-GAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT-3'

VH-1e 5'-CAG ATG CAG CTG GTA CAG TCT-3'

VH-2a 5'-CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT-3'

VH-2b 5'-CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT-3'

VH-3a 5'-GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT-3'

VH-3b 5'-CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT-3'

VH-3c 5'-GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT-3'

VH-4a 5'-CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG-3'

VH-4b 5'-CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG-3'
 VH-4c 5'-CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG-3'
 VH-5 5'-GAA GTG CAG CTG GTG CAG TCT-3'
 VH-6 5'-CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA-3'
 VH-7 5'-CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT-3'

3.1.8.1.2 Primer zur Amplifikation der VL-Region

Reverse Primer (konstante Region)

V_k constant 5'-GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT-3'
 V_λ constant 5'-GGA CGG CGG GAA CAG AGT GAC-3'

Forward Primer (variable Region)

V_k-1a 5'-GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1b 5'-AAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1c 5'-GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1d 5'-GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1e 5'-GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1f 5'-GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1g 5'-GCC ATC CAG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-2a 5'-GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT-3'
 V_k-2b 5'-GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT-3'
 V_k-2c 5'-GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT-3'
 V_k-3a 5'-GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT-3'
 V_k-3b 5'-GAA ATT GTG ATG ACG CAG TCT-3'
 V_k-3c 5'-GAA ATT GTA ATG ACG CAG TCT-3'
 V_k-4 5'-GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-5 5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT-3'
 V_k-6a 5'-GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT-3'
 V_k-6b 5'-GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT-3'
 V_λ-1a 5'-CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCA-3'
 V_λ-1b 5'-CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG-3'
 V_λ-2 5'-CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT-3'
 V_λ-3a 5'-TCC TAT GAG CTG ACA CAG CCA-3'
 V_λ-3b 5'-TCC TCT GAG CTG ACA CAG GAC-3'
 V_λ-3c 5'-TCC TAT GTG CTG ACA CAG CCA-3'
 V_λ-3d 5'-TCC TAT GAG CTG ACA CAG CTA-3'
 V_λ-3e 5'-TCC TAT GAG CTG ATG CAG CCA-3'
 V_λ-4a 5'-CTG CCT GTG CTG ACT CAG CCC-3'
 V_λ-4b 5'-CAG CCT GTG CTG ACT CAA TCA-3'
 V_λ-4c 5'-CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG-3'
 V_λ-5a 5'-CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA-3'
 V_λ-5b 5'-CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG-3'
 V_λ-6 5'-AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC-3'
 V_λ-7a 5'-CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAG-3'
 V_λ-7b 5'-CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG-3'
 V_λ-8 5'-CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG-3'
 V_λ-9 5'-CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA-3'
 V_λ-10 5'-CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA-3'

3.1.8.2 Primer zur PCR-Reamplifikation humaner Immunglobulin-Gene und Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen

(Rohrbach, 2000)

3.1.8.2.1 Primer zur Reamplifikation der VH-Region

Reverse Primer (konstante Region) (HindIII)

IgG 5'-AGC CAG AAG CTT GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA-3'

Forward Primer (variable Region) (NcoI)

VH-1a 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT-3'
 VH-1b 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT-3'
 VH-1c 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT-3'
 VH-1d 5'-TGG ACG CCC ATG GCG GAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT-3'
 VH-1e 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG ATG CAG CTG GTA CAG TCT-3'
 VH-2a 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT-3'
 VH-2b 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT-3'
 VH-3a 5'-TGG ACG CCC ATG GCG GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT-3'
 VH-3b 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT-3'
 VH-3c 5'-TGG ACG CCC ATG GCG GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT-3'
 VH-4a 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG-3'
 VH-4b 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG-3'
 VH-4c 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG-3'
 VH-5 5'-TGG ACG CCC ATG GCG GAA GTG CAG CTG GTG CAG TCT-3'
 VH-6 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA-3'
 VH-7 5'-TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT-3'

3.1.8.2.2 Primer zur Reamplifikation der VL-Region

Reverse Primer (konstante Region) (NotI)

V_k constant 5'-GGG CGG CAG GGC GGC CGC GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT-3'

V_λ constant 5'-GGG CGG CAG GGC GGC CGC GGA CGG CGG GAA CAG AGT GAC-3'

Forward Primer (variable Region) (MluI)

V_k-1a 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1b 5'-CCT ACA GAA CGC GTA AAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1c 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1d 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1e 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1f 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-1g 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GCC ATC CAG ATG ACC CAG TCT-3'
 V_k-2a 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT-3'
 V_k-2b 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT-3'
 V_k-2c 5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT-3'

Vκ-3a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT-3'
Vκ-3b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTG ATG ACG CAG TCT-3'
Vκ-3c	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTA ATG ACG CAG TCT-3'
Vκ-4	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT-3'
Vκ-5	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT-3'
Vκ-6a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT-3'
Vκ-6b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT-3'
Vλ-1a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCA-3'
Vλ-1b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG-3'
Vλ-2	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT-3'
Vλ-3a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GAG CTG ACA CAG CCA-3'
Vλ-3b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA TCC TCT GAG CTG ACA CAG GAC-3'
Vλ-3c	5'-CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GTG CTG ACA CAG CCA-3'
Vλ-3d	5'-CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GAG CTG ACA CAG CTA-3'
Vλ-3e	5'-CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GAG CTG ATG CAG CCA-3'
Vλ-4a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CTG CCT GTG CTG ACT CAG CCC-3'
Vλ-4b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG CCT GTG CTG ACT CAA TCA-3'
Vλ-4c	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG-3'
Vλ-5a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA-3'
Vλ-5b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG-3'
Vλ-6	5'-CCT ACA GAA CGC GTA AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC-3'
Vλ-7a	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAG-3'
Vλ-7b	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG-3'
Vλ-8	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG-3'
Vλ-9	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA-3'
Vλ-10	5'-CCT ACA GAA CGC GTA CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA-3'

3.1.8.3 Primer zur Sequenzierung humaner Immunglobulin-Gene in pSEX81 und pOPE101

DP-1	5'-ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACC A-3'
NSEX	5'-AAA GCT TGA AGA AGG TGA A-3'
NSEX-a	5'-TTC ACC TTC TTC AAG CTT T-3'
pSEX B	5'-GGT CGA CGT TAA CCG ACA AAC AAC AGA TAA-3'
1204+3	5'-GTA TCA CGA GGC CCT TTC-3'
SEQIII	5'-CGT CTT TCC AGA CGT TAG TAA ATG-3'

3.1.9 Synthetische Peptide und Glykopeptide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide und Glykopeptide wurden von Dr. Nastainczyk (Universität Homburg) bezogen.

438	NH ₂ -APDTRPAPGSTAPPAC-COOH
438-galn	NH ₂ -APDT(GalNAC)RPAPGSTAPPAC-COOH
454	NH ₂ -APDTRPAPGSTAPPAC-COOH
454*	NH ₂ -APDT(GalNAC)RPAPGSTAPPAC-COOH
460	NH ₂ -APDT(GalNAC)RPAPGSTAPPAC-COOH
506	NH ₂ -PDT(GalNAC)RPAPGC-COOH

583 NH₂-RLEKEKHEKGAQKTDC-COOH
 r-M24 NH₂-RTDPASTVGHAPPATSGPAPRTDP-COOH
 Alle (Glyko-) Peptide, mit Ausnahme des Glykopeptids 454*, lagen mit HSA oder BSA konjugiert vor.

Membranstreifen mit 15mer-(Glyko-) Peptiden der VNTR-Region von MUC1 mit einem Versatz von einer Aminosäure

3.1.10 Eichstandards

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range	Bio-Rad, München
Kaleidoscope Prestained Standard	Bio-Rad, München

3.1.11 Enzyme

Expand™ High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
ProofStart DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Alkalische Phosphatase (Calf Intestinal Mucosa)	Amersham Pharmacia, Freiburg
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonuklease <i>Bst</i> NI	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonuklease <i>Hind</i> III	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonuklease <i>Mlu</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonuklease <i>Nco</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonuklease <i>Not</i> I	New England Biolabs, Frankfurt

Alle Enzyme wurden mit den vom Hersteller gelieferten Puffern und Zusätzen verwendet.

3.1.12 Kit-Systeme

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Oligotex mRNA Mini Kit for Purification of poly A ⁺ RNA from total RNA	Qiagen, Hilden
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Silver Stain Plus	Bio-Rad, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
DC Protein Assay	Bio-Rad, München

Alle Kits wurden nach Anleitung des Herstellers verwendet.

3.1.13 Antikörper

Monoklonaler Maus-anti-pIII-Antikörper (IgG)	MoBiTec, Göttingen
Monoklonaler Maus-anti-pVIII-Antikörper B62-FE2 (IgG)	Progen, Heidelberg
Monoklonaler Maus-anti-(His) ₅ -Antikörper (IgG)	Qiagen, Hilden
Monoklonaler HRP-konjugierter Maus-(His) ₅ -Antikörper (IgG)	Qiagen, Hilden
Monoklonaler Maus-anti-MUC1-Antikörper BM7 (IgG)	Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg
HRP-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg

3.1.14 Sonstiges

BM blue, POD-Substrat, löslich	Roche, Mannheim
Chelating Sepharose TM Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Coomassie solution Brilliant Blue R-250 (1x)	Bio-Rad, München
Destain solution Coomassie Brilliant Blue R-250 (1x)	Bio-Rad, München
DNA Probenpuffer (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ficoll-Isopaque	Amersham Pharmacia, Freiburg
Laemmli Probenpuffer (2x)	Bio-Rad, München
NovaRED Substrat Kit	Vector, Burlingame, USA
RNAlater	Qiagen, Hilden

3.1.15 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Biozym (Hessisch Oldendorf), Calbiochem (Schwalbach), Fluka (Steinheim), Linaris (Wertheim-Bettingen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).

3.1.16 Verbrauchsmaterialien

Deep-well Mikrotiterplatten	Beckman Coulter, Mannheim
Dialysemembranen	Medicell, London, Großbritannien
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvetten (1 mm, 2 mm, steril)	Bio-Rad, München
Filter-Papier	Bio-Rad, München
Immunotubes, 5 ml	Nunc, Karlsruhe
Leukosept-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten Maxisorp, 96-well	Nunc, Karlsruhe
Multidish-Platten, 24-well	Nunc, Karlsruhe
Nitrocellulose-Filter	Bio-Rad, München

Nitrocellulose-Membran Protean BA85	Schleicher und Schuell, Dassel
Petrischalen	Nunc, Karlsruhe
Pipettenspitzen, bis 1000 µl (Safeseal tips, steril)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, 1-200 µl (Safeseal tips, steril)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, 1-20 µl (Safeseal tips, steril)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, 0,1-10 µl (Safeseal tips, steril)	Biozym, Hessisch Oldendorf
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, steril)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Spritzen-Filter, steril (0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Steril-Filter Steritop (0,22 µm, 500 ml)	Millipore, Eschborn
Tris-HCl Ready Gele (7,5 %, 10 %, 12 %)	Bio-Rad, München
Zentrifugen-Röhrchen (10 ml, 50 ml, 150 ml, steril)	Nunc, Karlsruhe

3.1.17 Laborausstattung

8-Kanal Pipette	Finnpipette Labsystems, Vantaa, Finnland
Brutschrank Heraeus B12	Heraeus, Hanau
Dokumentationssystem Gene Genius	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad, München
ELISA-reader Titertek Multiskan Plus	Finnpipette Labsystems, Vantaa, Finnland
Gelelektrophorese-Apparaturen sowie Zubehör	Biometra, Göttingen
Heizrührer IKA MAG RET-G	Bio-Rad, München
Kühlschränke	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop TM2	Liebherr, Ochsenhausen
Mikrowelle R-2r14	Nikon, Düsseldorf
Netzgerät 1000/500	Sharp, Haar
Netzgerät Powerpack P24	Bio-Rad, München
pH-Meter CG 820	Biometra, Göttingen
Photometer Ultrospec III	Schott, Hofheim
Pipettierhilfe R.301	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipettierhilfen Pipetman P-2, P-20, P-200, P-1000	Tecnomara, Walliselle, Schweiz
Schüttelplattform ELM1 S3.01	Gilson, Middleton, USA
Schüttler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Thermocycler PTC-200 Peltier	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	MJ Research, Watertown, USA
Tischzentrifuge Biofuge 13	Eppendorf, Hamburg
Vortex REAX 2000	Heraeus, Hanau
Waage MDBA 200	Heidolph, Schwabach
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q UF Plus	Sartorius, Göttingen
Wasserbad D8	Millipore, Eschborn
Zentrifuge Minifuge RF	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
	Heraeus, Hanau

3.1.18 Puffer, Lösungen und Medien

2xYT-Medium	16 g/l Bacto-Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und autoklavieren.
Elutionspuffer (IMAC)	PBS, pH 7,5 100 mM EDTA
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH 7,3
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3
LB-Agar	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl 15 g/l Agar in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und autoklavieren.
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und autoklavieren.
MPBS	2 % (w/v) Milchpulver in PBS
PBS	137 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
PBS, 0,5 % BSA	0,5 % (w/v) BSA in PBS
PBST	0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
PEG/NaCl	200 g/l PEG 6000 146,1 g/l NaCl in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und autoklavieren.
<i>phage dilution buffer</i>	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 20 mM NaCl 2 mM EDTA
Schocklösung	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 20 % (w/v) Saccharose 1 mM EDTA (pH 8,0)

SOB-Agar	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 15 g/l Agar 0,58 g/l NaCl 0,19 g/l KCl in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 10 mM MgCl ₂ und 10 mM MgSO ₄ zusetzen.
SSP (IMAC)	PBS, pH 7,5 10 mM Imidazol 1 M NaCl
SWP (IMAC)	PBS, pH 7,5 50 mM Imidazol 1 M NaCl
TAE (1x)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
Transferpuffer (Immunoblot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Patientinnenblut

Alle Schritte zur Isolierung peripherer Lymphozyten aus Patientinnenblut wurden bei RT durchgeführt. 50 ml Leukosept-Röhrchen wurden mit 15 ml Ficoll-Isopaque gefüllt und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. 25-30 ml Patientinnenblut wurden auf die Filterscheibe gegossen und für 15 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und verworfen. Die Lymphozyten, die sich in der Bande über der Trennscheibe befanden (Interphase), wurden abgesaugt und mit 40 ml PBS, 0,5 % BSA gemischt und für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS, 0,5 % BSA auf ein Gesamtvolumen von 50 ml gebracht und für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Das resultierende Zellpellet, das die peripheren Lymphozyten enthielt, wurde in 1-1,5 ml RNAlater aufgenommen und bei -80 ° C gelagert.

3.2.2 mRNA-Isolierung aus peripheren Lymphozyten

Die Isolierung von mRNA aus peripheren Lymphozyten wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde aus den peripheren Lymphozyten einer Patientin unter Verwendung des RNeasy Mini Kits die gesamte RNA präpariert. Dabei wurden die Zellen mittels QIAshredder homogenisiert. In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kits aus der gesamten RNA die mRNA isoliert. Die Isolierung von mRNA aus peripheren Lymphozyten erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit der SuperScript™ II Reverse Transkriptase (RT) (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. 32 µl mRNA aus Lymphozyten einer Patientin wurden mit 2 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer und 4 µl 10 mM dNTP gemischt und für 5 min bei 65 °C und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Zu diesem Gemisch aus mRNA und Primer wurde eine Mischung aus 8 µl 10x RT-Puffer, 16 µl 25 mM MgCl₂, 8 µl 0,1 M DTT und 4 µl RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor hinzugefügt und für 5 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl (200 U) SuperScript™ II RT erfolgte die cDNA-Synthese für 50 min bei 42 °C. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation für 15 min bei 70 °C gestoppt. Durch Zugabe von 4 µl *E. coli* RNase H (8 U) und nachfolgender Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde die restliche mRNA aus der Lösung entfernt. Die so synthetisierte cDNA ist einzelsträngig und kann bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.2.4 PCR zur Amplifikation von humanen Antikörpergenen

Für die enzymatische Amplifikation von Gensegmenten mittels PCR (*polymerase chain reaction*) wurden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die gegenläufig mit komplementären DNA-Strängen hybridisierten und den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Die PCR bestand aus der zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten: Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA, Hybridisierung der zwei Oligonukleotid-Primer an die *template*-DNA und Synthese des komplementären Stranges durch die verwendete DNA-Polymerase. Ein Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl und bestand aus 5 µl 10x Expand™ High Fidelity PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 25 pmol *forward* Primer, 25 pmol *reverse* Primer, 2-10 µl *template*-DNA, 0,7 µl Expand High Fidelity-Polymerase

(2,45 U) und H₂O. Dieser PCR-Ansatz wurde zunächst für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend zyklisch 30 mal 45 sec bei 95 °C, 45 sec bei 55-57 °C und 90 sec bei 72 °C inkubiert. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch für 10 min bei 72° C inkubiert.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Agarose-Gelelektrophoresen wurden in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Der Nachweis von DNA erfolgte mit Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers. Zur Elution der gereinigten DNA-Fragmente wurde H₂O verwendet.

3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden das QIAprep Spin Miniprep Kit und das HiSpeed Plasmid Midi Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der isolierten DNA erfolgte mit H₂O.

3.2.8 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration einer verdünnten Lösung erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer. Dabei wurde die genaue Konzentration nach folgenden Formeln ermittelt:

mRNA: Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$ [$\mu\text{g/ml}$]

ssDNA: Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30$ [$\mu\text{g/ml}$]

dsDNA: Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$ [$\mu\text{g/ml}$]

3.2.9 Präzipitation von DNA

Nukleinsäuren haben die Eigenschaft, in geeigneten Lösungsmitteln mit hohen Kationen-Konzentrationen auszufallen.

3.2.9.1 Präzipitation mit Butanol

Diese Präzipitationstechnik fand hauptsächlich bei Ligationsansätzen Anwendung. Nach der Ligation von DNA-Fragmenten wurde die DNA durch Zugabe von 10 Volumen Butanol gefällt. Anschließend wurde für 30 min bei RT mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde nach dem Trocknen in H₂O aufgenommen und vollständig für eine Transformation von elektrokompetenten Bakterien verwendet.

3.2.9.2 Präzipitation mit Ethanol

Der DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte für 60 min bei 4 ° C. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei 4 ° C mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H₂O aufgenommen.

3.2.9.3 Präzipitation mit Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und für 30 min bei RT mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H₂O aufgenommen.

3.2.10 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden mit den gelieferten Puffern und Zusätzen nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Ein analytischer Reaktionsansatz hatte in der Regel ein Gesamtvolumen von 10 µl und bestand aus 0,5-1 µg DNA, 1x NEB-Puffer, gegebenenfalls 100 µg/ml BSA und 5-10 U eines Restriktionsenzym. Dieser Ansatz wurde

für 2-3 h bei einer für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Für präparative Reaktionsansätze wurden entsprechend höhere Volumina eingesetzt.

3.2.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Alkalischer Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase diente zur Entfernung von 5'-Phosphatresten von DNA-Fragmenten, um eine Religation von mit Restriktionsendonukleasen geschnittener DNA zu verhindern. Die zu dieser Dephosphorylierung verwendete Alkalische Phosphatase wurde mit dem gelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl und bestand aus der zu dephosphorylierenden Vektor-DNA, 1x Reaktions-Puffer und 0,1 U Alkalische Phosphatase pro 1 µg Vektor-DNA. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf 85 °C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren.

3.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die kovalente Verknüpfung freier 3'-Hydroxyenden mit 5'-Phosphatenden von DNA. Ein Ligations-Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und bestand aus 20-50 ng geschnittener Vektor-DNA, 2-5 mol geschnittener Insert-DNA pro mol Vektor-DNA, 1x Ligase-Puffer und 1 U T4 DNA Ligase. Dieser Ansatz wurde für 16-20 h bei 16 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Butanol gefällt, in H₂O aufgenommen und vollständig für die Transformation elektrokompenter Bakterien eingesetzt.

3.2.13 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Die Elektroporation diente der Transformation von Bakterien mit DNA. Dazu wurde die mit Butanol präzipitierte und in eiskaltem H₂O aufgenommene DNA eines Ligations-Ansatzes mit auf Eis aufgetauten elektrokompenten Zellen des Stamms *XL1-Blue* versetzt. Anschließend wurde diese DNA-Bakterien-Suspension mit einem Gesamtvolumen von 50 µl in eine auf Eis vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette gegeben und mit einem Elektroporator einem Elektroschock (1,8 kV, 200 Ω, 25 µF) ausgesetzt. Die transformierten Bakterien wurden in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOG-Medium aufgenommen, für 45 min

bei 37 ° C mit 230 rpm geschüttelt, auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37 ° C inkubiert.

Bei der Herstellung von Antikörpergenbibliotheken wurden für jeden in pSEX81 zu klonierenden Antikörper-DNA-Pool mehrere Ligations-Ansätze gemacht, welche entsprechend in mehreren einzelnen Ansätzen in Zellen des Stamms XL1-*Blue* mittels Elektroporation transformiert wurden.

3.2.14 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Hierzu wurden für einen Sequenzierungs-Ansatz in einem Gesamtvolumen von 7 µl 600 ng *template*-DNA in H₂O und 20 pmol eines Sequenzierungs-Primers gemischt und in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß per Post verschickt.

3.2.15 Produktion von M13KO7-Helferphagen

Die Produktion von M13KO7-Helferphagen wurde mit *E. coli* XL1-*Blue* durchgeführt. Die Bakterien wurden in 2xYT-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin bei 37 ° C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 kultiviert. Es erfolgte die Zugabe von M13KO7-Helferphagen (MOI = 20) und eine Inkubation von 15 min bei 37 ° C ohne Schütteln. Anschließend wurden die Bakterien für 45 min bei 37 ° C und 230 rpm geschüttelt und für 15 min bei RT mit 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in dem gleichen Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin aufgenommen. Die Phagenproduktion erfolgte für 12-16 h bei 37 ° C und 230 rpm. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min bei 4 ° C und 3000 rpm pelletiert. Die im Kulturüberstand enthaltenen Phagenpartikel wurden mit 1/5 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) PEG/NaCl für 12-16 h auf Eis gefällt und für 1 h bei 4 ° C und 6000 rpm pelletiert. Nach dem vollständigen Abnehmen des Überstands wurde das Phagenpellet in 1/100 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) eiskaltem *phage dilution buffer* resuspendiert und für 10 min bei 4 ° C und 13000 rpm zentrifugiert, um Bakterienreste zu entfernen. Der Phagenüberstand wurde in frische Röhrchen gegeben und konnte bei 4 ° C (für mehrere Monate) oder -80 ° C (für Jahre) gelagert werden. Aus 1000 ml Bakterienkultur wurden ca. 5×10^{13} Phagenpartikel gewonnen.

3.2.16 Produktion von Hyperphagen

Für die Produktion von Hyperphagen wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α /pIII [M13KO7 Δ pIII] (Rondot *et al.*, 2001) verwendet. Die Bakterien wurden in 2xYT-Medium mit 100 mM Glukose und 100 μ g/ml Kanamycin bei 37 °C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,01 kultiviert. Nach der Induktion durch IPTG (0,5 mM Endkonzentration) wurden die Phagen für 24 h bei 30 °C und 200 rpm produziert. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min bei 4 °C und 3000 rpm pelletiert. Die im Kulturüberstand enthaltenen Phagenpartikel wurden mit 1/5 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) PEG/NaCl für 24 h auf Eis gefällt und für 1 h bei 4 °C und 6000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Phagenpellets wurden in 1/100 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) eiskaltem *phage dilution buffer* resuspendiert. Um Bakterienreste zu entfernen, wurde die Phagensuspension für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Phagenüberstand wurde in frische Röhrchen gegeben und konnte bei 4 °C für mehrere Monate gelagert werden. Aus 1000 ml Bakterienkultur wurden ca. 10¹³ Phagenpartikel gewonnen.

3.2.17 Phagendisplay

Ausgangsmaterial waren humane *single chain* Fv-Antikörpergenbibliotheken in dem Phagemid pSEX81.

3.2.17.1 Verpackung von *single chain* Fv-Antikörpergenbibliotheken in Phagen

Die mit einer pSEX81-Antikörpergenbibliothek transformierten Bakterien wurden zu 2xYT-Medium mit 100 mM Glukose und 100 μ g/ml Ampicillin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,025 gegeben. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 kultiviert. Es erfolgte die Zugabe von M13KO7-Helferphagen oder Hyperphagen (MOI = 20) und eine Inkubation von 15 min bei 37 °C ohne Schütteln. Anschließend wurden die Bakterien für 45 min bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt und für 15 min bei RT mit 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in dem gleichen Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) 2xYT-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin aufgenommen. Die Produktion von rekombinanten Phagenantikörpern erfolgte für 5-8 h bei 37 °C und 230 rpm oder ü.N. bei 30 °C und

230 rpm. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min bei 4 ° C und 3000 rpm pelletiert. Die im Kulturüberstand enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper wurden mit 1/5 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) PEG/NaCl für mindestens 1 h auf Eis gefällt und für 1 h bei 4 ° C und 6000 rpm pelletiert. Nach dem vollständigen Abnehmen des Überstands wurde das Pellet in 1/100 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) eiskaltem *phage dilution buffer* resuspendiert und für 10 min bei 4 ° C und 13000 rpm zentrifugiert, um Bakterienreste zu entfernen. Der Phagenüberstand wurde in frische Röhrchen gegeben und konnte bei 4 ° C gelagert werden. Die so hergestellten rekombinanten Phagenantikörper wurden nach einer Titerbestimmung für ein Panning eingesetzt.

3.2.17.2 Panning

An die Oberfläche eines *immunotubes* wurde ü.N. bei RT 10-100 µg Antigen in PBS gebunden. Ein weiteres *immunotube* wurde ü.N. bei RT nur mit PBS inkubiert. Die *immunotubes* wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit MPBS für 3 h bei RT abgesättigt. Die *immunotubes* wurden dreimal mit PBS gewaschen, während 10^{10} - 10^{12} rekombinante Phagenantikörper in MPBS für 15 min bei RT inkubiert wurden. Die in MPBS verdünnten und präinkubierten Phagenantikörper wurden in die *immunotubes* (10^{10} - 10^{12} rekombinante Phagenantikörperpartikel pro *immunotube*) gegeben und die Bindung der Phagenantikörper an das Antigen erfolgte für 2 h bei RT. Anschließend wurde jedes *immunotube* 20 mal mit PBST und 20 mal mit PBS gewaschen um nicht gebundene Phagenantikörper zu entfernen. Abschließend wurden die gebundenen Phagenantikörper eluiert. Die mit M13KO7-Helferphagen verpackten Phagenantikörper wurden für 5 min mit 100 mM Triethylamin inkubiert und die Phagen-Lösung wurde mit 1 M Tris-HCl, pH 7,5 neutralisiert. Die mit Hyperphagen verpackten Phagenantikörper wurden für 15 min mit 1 µg/ml Trypsin in PBS inkubiert. Die so eluierten rekombinanten Phagenantikörper wurden für eine Reinfektion von exponentiell wachsenden *E. coli* XL1-Blue genutzt.

3.2.17.3 Reinfektion

Mit den eluierten rekombinanten Phagenantikörpern eines Pannings wurden 20 ml exponentiell wachsende *E. coli* XL1-Blue Bakterien ($OD_{600} = 0,4$) in 2xYT-Medium mit 100 mM Glukose infiziert. Die Phagen wurden vorsichtig zu den Bakterien gegeben und für

15 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 45 min bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt. Da keine M13KO7-Helferphagen oder Hyperphagen vorhanden sind, werden keine Phagenpartikel gebildet. Die Bakterien nehmen lediglich die im Panning selektierten Phagemide auf. Um die Zahl eluierter Phagenantikörper zu bestimmen, wurde dieser 20 ml-Bakterienkultur ein Aliquot entnommen. Ausgehend von diesem Aliquot wurde eine Verdünnungsreihe in 2xYT-Medium mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin hergestellt, auf SOB-Agar-Platten mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin plattiert (Titer-Platten) und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Der Rest der Bakterienkultur wurde für 10 min bei RT und 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien wurden in SOB-Medium mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin aufgenommen, auf mehrere SOB-Agar-Platten mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin verteilt und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Nach der Auswertung der Titerplatten wurden die Bakterien in 2xYT-Medium mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin aufgenommen um erneut rekombinante Phagenantikörper für eine weiteres Panning zu produzieren. Alternativ konnten auch einzelne Bakterienklone untersucht werden.

3.2.18 Titration von Phagen

Von jeder Phagenpräparation wurde die Anzahl infektiöser Phagenpartikel (cfu, *colony forming units*) bestimmt (Koch *et al.*, 2000). Hierzu wurde von einer Phagenpräparation eine Verdünnungsreihe in *phage dilution buffer* hergestellt. Mit 10 µl Phagensuspension einer Verdünnungsstufe wurden 500 µl exponentiell wachsende *E. coli* XL1-Blue Bakterien ($OD_{600} = 0,4$) in 2xYT-Medium mit 10 µg/ml Tetracyclin infiziert und für 45 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden zweimal 5 µl Bakteriensuspension jeder Verdünnungsstufe auf eine mit einer Nitrocellulose-Membran BA85 belegten SOB-Agar-Platte pipettiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Für die Titerbestimmung von M13KO7-Helferphagen- und Hyperphagen-Präparationen wurden SOB-Agar-Platten mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Kanamycin verwendet, während für die Titerbestimmung von rekombinanten Phagenantikörper-Präparationen SOB-Agar-Platten mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin eingesetzt wurden. Durch Auszählen der Bakterienkolonien konnte so die Anzahl infektiöser Phagenpartikel einer Phagenpräparation bestimmt werden.

3.2.19 Expression von rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragmenten

Für die Expression rekombinanter *single chain* Fv-Antikörperfragmente (scFv-Fragmente) wurden Derivate des Expressionsvektors pOPE101 verwendet. Die mit einem pOPE101-Vektor-Derivat transformierten *E. coli* XL1-*Blue* Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin ü.N. bei 37 °C und 230 rpm kultiviert. Diese Übernachtkultur wurde am nächsten Tag im Volumenverhältnis 1:20 in LB-Medium mit 100 mM Glukose und 100 µg/ml Ampicillin verdünnt und bei 37 °C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde der Promotor des pOPE101-Vektor-Derivats durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 50 µM induziert. Nach der Induktion erfolgte die Expression der scFv-Fragmente für 2,5-3 h bei 25 °C und 260 rpm. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4 °C und 3000 rpm pelletiert und für die Präparation periplasmatischer Extrakte eingesetzt.

3.2.20 Präparation von periplasmatischen Extrakten

Für die Präparation periplasmatischer Extrakte aus *E. coli*-Zellen wurden alle benötigten Lösungen auf 4 °C gekühlt, die Präparation selbst wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die pelletierten Bakterien in 1/10 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) Schocklösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert, wobei gelegentlich gevortext wurde. Anschließend wurde für 45 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand war die *periplasmic preparation* (PPP). Das Pellet wurde in 1/10 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Bakterienkultur) 5 mM MgSO₄ resuspendiert, für 20 min unter gelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert und für 45 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand ist die *osmotic shock preparation* (OSP). PPP und OSP wurden vereinigt und ü.N. bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

3.2.21 Reinigung von rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragmenten durch IMAC

Die exprimierten scFv-Fragmente besitzen am C-Terminus der variablen Domäne der leichten Kette sechs Histidinreste ((His)₆-tag), die mit Ni²⁺-Ionen Komplexe bilden. Diese Tatsache lässt sich bei der Reinigung von Proteinen, die über (His)₆-tags verfügen, nutzen. Bei einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (*immobilized metal ion*

affinity chromatography, IMAC) werden an ein Gelmaterial, z.B. Chelating Sepharose Fast Flow, Ni²⁺-Ionen immobilisiert. An diese Ni²⁺-Ionen binden die Oligohistidinreste des zu reinigenden rekombinanten Proteins mit hoher Affinität. Die Wechselwirkung der Histidinreste mit den Metallionen kann durch einen Überschuss an Imidazol kompetitiv gelöst werden. Alternativ kann auch EDTA, das ebenfalls mit Ni²⁺-Ionen Komplexe bildet und so mit Oligohistidinresten um die Bindung konkurriert, für eine Elution verwendet werden.

Die Reinigung rekombinanter scFv-Fragmente über IMAC erfolgte bei 4 °C. Alle dazu benötigten Lösungen mussten entsprechend gekühlt sein. Für 1000 ml einer mit IPTG induzierter Bakterienkultur wurden 4 ml Sepharose benötigt. Das Sepharose-Gel wurde zunächst mit 0,5 Gel-Volumen 0,1 M NiSO₄-Lösung geladen. Nach dem Waschen des Gels mit dreimal 5 Gel-Volumen H₂O, wurde dieses mit einem Gel-Volumen SSP äquilibriert. Das gegen PBS dialysierte periplasmatische Extrakt wurde auf die dieselben Pufferbedingungen (10 mM Imidazol, 1 M NaCl) eingestellt und zu der Ni²⁺-Sepharose gegeben. Die Bindung der in dem periplasmatischen Extrakt enthaltenen rekombinanten scFv-Fragmente an das Ni²⁺-Sepharosegel erfolgte für 30-90 min bei 4 °C oder RT. Anschließend wurde das Gel mit 5 Gel-Volumen SSP, zweimal 5 Gel-Volumen SWP und 5 Gel-Volumen PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit dreimal 2 Gel-Volumen Elutionspuffer. Die während der Reinigung gesammelten Fraktionen konnten durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert werden. Die Fraktionen, die das zu reinigende rekombinante scFv-Fragment enthielten, wurden vereinigt und ü.N. bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

3.2.22 Präzipitation von Proteinen

Die zu präzipitierende Proteinlösung wurde mit 1/4 Volumen 100 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat wurde zweimal mit 1/4 Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Proteinlösung) Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde nach dem Trocknen in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

3.2.23 Proteinmengenbestimmung

Die Bestimmung der Protein-Konzentration einer Lösung erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bradford, 1976). Alternativ wurde der DC Protein Assay (Lowry *et al.*, 1951) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2.24 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine, die denaturiert wurden, ihrer Größe nach auftrennen (Laemmli, 1970). Für die SDS-PAGE wurden Tris-HCl Ready-Gele mit Konzentrationen von 7,5 %, 10 % und 12 % Acrylamid verwendet. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue R250 oder Silver Stain Plus gefärbt oder für einen Immunoblot verwendet.

3.2.25 Immunoblot

Durch einen Immunoblot (Towbin *et al.*, 1979) lassen sich die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferieren. Dort kann ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch durch den Einsatz eines spezifisch bindenden Antikörpers nachgewiesen werden.

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte für 1-2 h bei 1 mA/cm² Gel- bzw. Membranfläche. Nach einem erfolgten Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran ü.N. bei 4 °C mit MPBS abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für 10 min mit PBST und einmal für 10 min mit PBS gewaschen, bevor sie mit einem primären Antikörper oder Antikörperfragment in einer geeigneten Verdünnung in MPBS für 1-2 h bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran erneut zweimal für 10 min mit PBST und einmal für 10 min mit PBS gewaschen. Das nachzuweisende Protein wurde mit einem geeigneten sekundären, HRP-konjugierten Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in MPBS für 1 h bei RT identifiziert. Nach dem Waschen der Membran für dreimal 10 min mit PBST und einmal 10 min mit PBS wurde sie mit dem NovaRed Kit nach Angaben des Herstellers entwickelt.

3.2.26 ELISA

Durch einen ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) können geringe Mengen eines bestimmten Antigens durch spezifisch bindende Antikörper, Antikörperfragmente oder Phagenantikörper nachgewiesen werden.

Es wurden 96-well Mikrotiterplatten ü.N. bei RT mit 100 µl/well Antigen in einer geeigneten Konzentration in PBS inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Blocken mit MPBS (200 µl/well) für 2 h bei RT abgesättigt. Die Platten wurden dreimal mit

PBST gewaschen und zum Nachweis der Spezifität von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Phagenantikörpern eingesetzt.

3.2.26.1 Nachweis der Spezifität von rekombinanten Phagenantikörpern

Durch einen sogenannten Phagen-ELISA konnte überprüft werden, an welche Antigene die in einer Phagenpräparation bzw. einem Phagenüberstand enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper binden. Dazu wurde zunächst von einer Phagenpräparation bzw. einem Phagenüberstand eine Verdünnungsreihe in MPBS hergestellt. Zum Nachweis der Spezifität der rekombinanten Phagenantikörper wurden 100 µl/well der einzelnen Verdünnungsstufen für 2 h bei RT mit einer mit Antigen beschichteten und geblockten Mikrotiterplatte inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBST gewaschen und anschließend für 1,5 h bei RT mit dem monoklonalen anti-pVIII Antikörper B62-FE2 (100 ng/ml MPBS; 100 µl/well) inkubiert. Die Maxisorp-Platte wurde erneut dreimal mit PBST gewaschen, bevor sie mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (100 ng/ml in MPBS; 100 µl/well) für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Platte wurde dreimal mit PBST gewaschen und die Detektion der Bindung von rekombinanten Phagenantikörpern an ein bestimmtes Antigen erfolgte mit 100 µl/well BM blue-Substrat für 10 min bei RT. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl/well 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Extinktion mit einem ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.26.2 Nachweis der Spezifität von rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragmenten

Zum Nachweis der Spezifität von rekombinanten scFv-Fragmenten wurde zunächst von einer scFv-Antikörper-Präparation (periplasmatisches Extrakt oder mittels IMAC gereinigtes Antikörperfragment) eine Verdünnungsreihe in MPBS hergestellt. 100 µl/well der einzelnen Verdünnungsstufen wurden für 2 h bei RT mit einer mit Antigen beschichteten und geblockten Mikrotiterplatte inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBST gewaschen und anschließend für 1,5 h bei RT mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper (200 ng/ml in MPBS; 100 µl/well) inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde dreimal mit PBST gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl/well HRP-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (100 ng/ml in MPBS) und eine Inkubation für 1 h bei RT. Die Platte wurde erneut dreimal mit PBST gewaschen, bevor die Bindung von rekombinanten scFv-Fragmenten an ein

bestimmtes Antigen durch Inkubation mit 100 μ l/well BM blue-Substrat für 10 min bei RT detektiert wurde. Die Farbreaktion wurde mit 100 μ l/well 1 M H_2SO_4 abgestoppt und die Extinktion mit einem ELISA-reader bei 450 nm gemessen.

3.2.27 FACS-Analyse

Das Standardverfahren der FACS (*fluorescence activated cell sorter*)-Analyse erlaubt es, mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gekoppelte Zellen von unmarkierten Zellen abzutrennen. Die in dieser Arbeit durchgeführte FACS-Analyse diente dem Nachweis der Spezifität eines rekombinanten scFv-Fragments (durchgeführt von B. Bartik, Universitätsfrauenklinik Heidelberg). Dazu wurden Zellen (T47D-Zellen und Fibroblasten) in PBS, 1 % BSA aufgenommen und mit dem zu analysierenden scFv-Fragment, verdünnt in PBS, gemischt. Nach Inkubation für 30 min bei RT wurden die Zellen mit PBS, 1 % BSA gewaschen und anschließend für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer PBS, 1 % BSA-Lösung resuspendiert, welche den monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper (200 ng/ml) enthielt, und für 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS, 1% BSA wurde für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einer PBS, 1 % BSA-Lösung aufgenommen, in welcher ein Fluoreszenz-markierter Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper in einer geeigneten Verdünnung vorlag. Die Zellen wurden für 30 min bei RT im Dunkeln mit diesem Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS, 1 % BSA gewaschen, anschließend für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in PBS, 1 % BSA resuspendiert. Danach erfolgte die Messung mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (B. Bartik, Universitätsfrauenklinik Heidelberg).

3.2.28 Epitopkartierung

Für die Epitopkartierung eines rekombinanten scFv-Fragments wurde ein Nitrocellulose-Membranstreifen eingesetzt, auf dem sich 15mer-(Glyko-) Peptide mit einem Versatz von einer Aminosäure befanden (Dr. Nastainczyk, Universität Homburg). Der Membranstreifen wurde mit dem zu analysierenden scFv-Fragment, verdünnt in MPBS, für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Membranstreifen dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des HRP-konjugierten anti-(His)₅-Antikörpers (200 ng/ml in MPBS) und eine Inkubation für 1,5 h bei RT. Der Membranstreifen wurde für dreimal

10 min mit PBST gewaschen, bevor er mit dem NovaRed Kit nach Angaben des Herstellers entwickelt wurde.

3.2.29 Affinitätsbestimmung

Die Affinitätsbestimmungen wurden extern mit Hilfe des Standardverfahrens der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface plasmon resonance*, SRP) unter Verwendung eines BIAcore 2000-Gerätes von der Firma Inventus BioTec (Münster) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion von humanen Antikörpergenbibliotheken in dem Phagemid pSEX81

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung humaner Antikörpergenbibliotheken dienten periphere Lymphozyten von insgesamt sieben Mammakarzinom-Patientinnen, die mit MUC1-Glykopeptiden immunisiert worden waren (Einleitung, Tab. 1). Ausgehend von Blut einer jeden Patientin konnte die RNA aus peripheren Lymphozyten isoliert werden. Aus der RNA wurde anschließend die mRNA präpariert und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA konnte direkt zur PCR-Amplifikation der Gene für die variablen schweren und variablen leichten Antikörperketten (VH und VL) unter Verwendung des in 3.1.8.1 beschriebenen Oligonukleotid-Primersatzes (Rohrbach, 2000) eingesetzt werden.

4.1.1 Konstruktion der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ

Für die Amplifikation der VH-, VL κ - und VL λ -Gene der Patientin S wurden insgesamt 23 PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei pro PCR-Reaktion ein *reverse* Primer (IgG, V κ constant und V λ constant) mit einem, zwei oder mehreren *forward* Primern einer Subgruppe kombiniert wurde (s. 3.1.8.1). PCR-Produkte mit der erwarteten Größe von 350-400 bp konnten in allen 23 Ansätzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die 350-400 bp großen DNA-Fragmente wurden gereinigt und in einer zweiten PCR reamplifiziert, um die für eine Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen unter Verwendung eines zweiten Primersatzes (s. 3.1.8.2) einzuführen. Abb. 4 zeigt das Ergebnis der Reamplifikation der VH-, VL κ - und VL λ -Gene der Patientin S. PCR-Produkte der erwarteten Größe von 350-400 bp befanden sich in allen 23 Ansätzen.

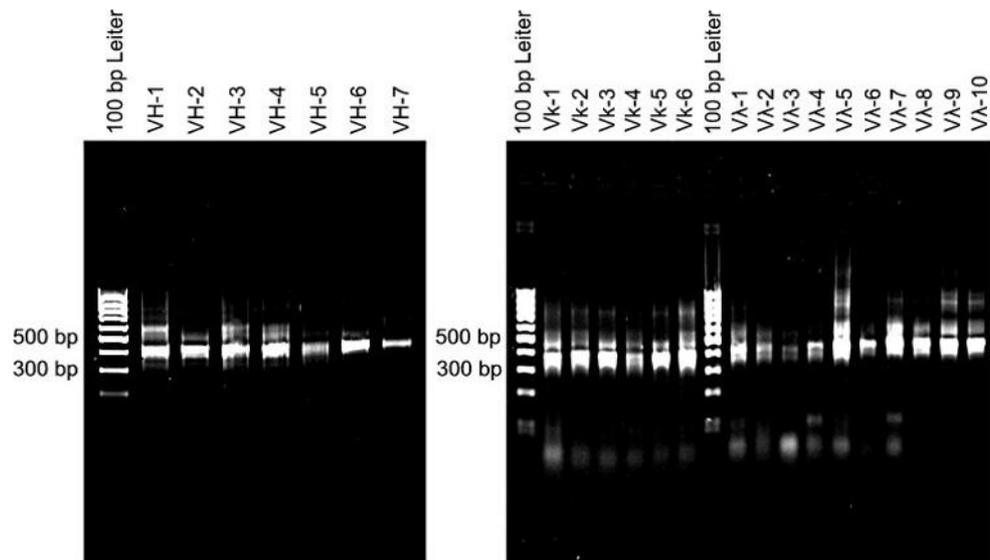


Abb. 4: PCR-Produkte der Reamplifikation der VH-, VL κ - und VL λ -Gene der Patientin S. Ausgehend von cDNA der Patientin S wurden die VH-, VL κ - und VL λ -Gene unter Verwendung von zwei Primersätzen amplifiziert. Die PCR-Produkte der Reamplifikation wurden zur Analyse in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. VH-Fragmente (links), VL κ - und VL λ -Fragmente (rechts).

Die PCR-Reaktionen zur Reamplifikation der VH-Gene sowie der VL κ - und VL λ -Gene der Patientin S wurden vereinigt. Die 350-400 bp großen DNA-Fragmente wurden nach der Reinigung mit Restriktionsenzymen geschnitten, das DNA-Fragment der schweren Ketten (VH) mit *HindIII* und *NcoI* und die DNA-Fragmente der leichten Ketten (VL κ und VL λ) mit *MluI* und *NotI*. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung mittels Gelextraktion isoliert und über korrespondierende Restriktionsschnittstellen in das Phagemid pSEX81 (Welschhof *et al.*, 1997) kloniert. Dabei wurde zunächst das für die schweren Ketten (VH) kodierende Genfragment zur Bildung einer VH-Subbibliothek kloniert. Nach der Präparation der Plasmid-DNA von Einzelklonen der VH-Subbibliothek, konnte durch eine Restriktionsanalyse unter Verwendung der beiden Enzyme *HindIII* und *NcoI* die erfolgreiche Insertion der VH-Gene in das Phagemid pSEX81 gezeigt werden. Anschließend wurden die für die leichten Ketten (VL κ und VL λ) kodierenden Genfragmente über korrespondierende Restriktionsschnittstellen in die VH-Subbibliothek kloniert, um zwei Einzelpatientinnenbibliotheken herzustellen. Die erfolgreiche Insertion der VL-Gene in die VH-Subbibliothek wurde ebenfalls durch eine Restriktionsanalyse unter Verwendung der Enzyme *MluI* und *NotI* überprüft. Es konnten so zwei Einzelpatientinnenbibliotheken generiert werden, wobei eine Bibliothek die VH- und VL κ -Gene enthielt (Antikörpergenbibliothek pSEX81-S-VH/VL κ), während die andere Bibliothek aus den VH- und VL λ -Genen bestand (Antikörpergenbibliothek pSEX81-S-VH/VL λ).

Die Bestimmung der Anzahl unabhängiger Kolonien nach der Klonierung ergab eine maximale Komplexität der beiden Antikörpergenbibliotheken von $1,2 \times 10^5$ (Bibliothek pSEX81-S-VH/VL κ) bzw. $1,4 \times 10^5$ (Bibliothek pSEX81-S-VH/VL λ).

4.1.2 Konstruktion der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ

Für die Herstellung von Mischbibliotheken wurde die cDNA der sechs übrigen Mammakarzinom-Patientinnen (Patientinnen 1-6) vereinigt. Dieser cDNA-Mix diente als *template* für die PCR-Amplifikation der VH-, VL κ - und VL λ -Gene, wobei pro PCR-Reaktion ein *reverse* Primer (IgG, V κ constant und V λ constant) mit einem *forward* Primer kombiniert wurde (s. 3.1.8.1). Die 350-400 bp großen PCR-Produkte einer jeden PCR-Reaktion (Daten nicht gezeigt) wurden gereinigt und in einer zweiten PCR eingesetzt, um die für eine Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen unter Verwendung eines zweiten Primersatzes (s. 3.1.8.2) in die DNA-Fragmente einzuführen. Abb. 5 zeigt das Ergebnis dieser Reamplifikation. PCR-Produkte mit der erwarteten Größe von 350-400 bp befanden sich in einem Großteil der Ansätze. Bezüglich der PCR-Amplifikation der VH-Gene konnte nur mit dem Primerpaar IgG/VH-2b kein PCR-Produkt generiert werden. Auch bei der PCR-Amplifikation der VL-Gene erbrachte nicht jede Reaktion ein PCR-Produkt. Die PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren V κ constant/V κ -2a, V κ constant/V κ -3c, V κ constant/V κ -5, V κ constant/V κ -6a und V κ constant/V κ -6b sowie V λ constant/V λ -7b zeigten kein Amplifikat.

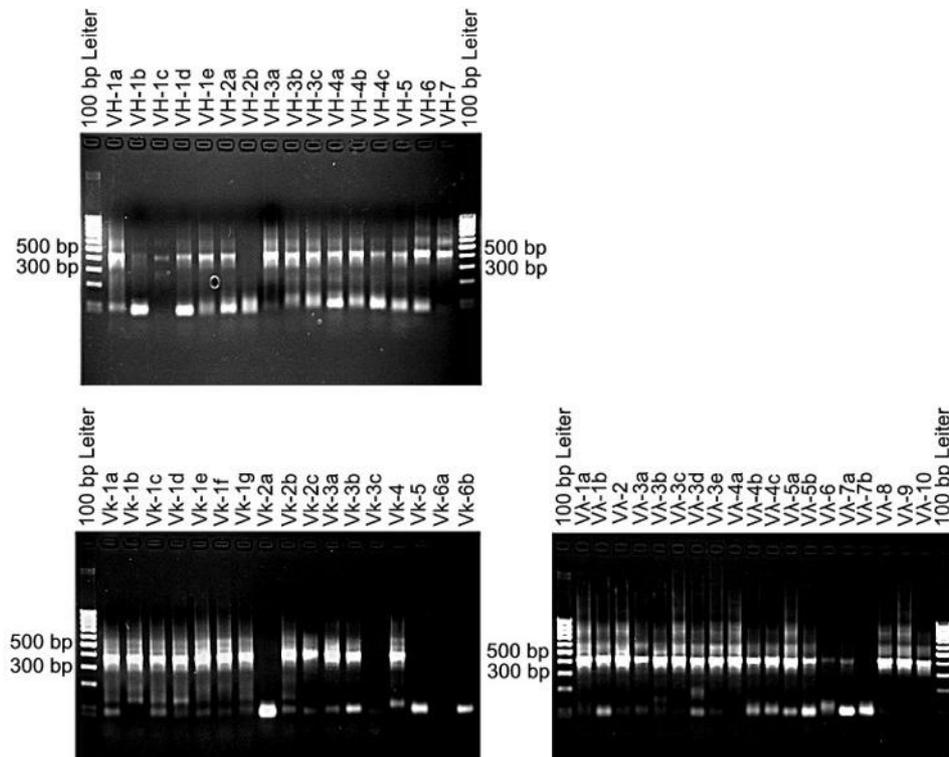


Abb. 5: PCR-Produkte der Reamplifikation der VH-, VL κ - und VL λ -Gene von sechs Mammakarzinom-Patientinnen. Ausgehend vom cDNA-Mix von sechs Mammakarzinom-Patientinnen wurden die VH-, VL κ - und VL λ -Gene unter Verwendung von zwei Primersätzen amplifiziert. Die PCR-Produkte der Reamplifikation wurden zur Analyse in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. VH-Fragmente (oben), VL κ -Fragmente (unten links) und VL λ -Fragmente (unten rechts).

Die PCR-Reaktionen zur Reamplifikation der VH-Gene wurden vereinigt. Das 350-400 bp große DNA-Fragment der schweren Ketten (VH) wurde nach der Reinigung mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NcoI* geschnitten. Das Genfragment wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Gelextraktion isoliert und über korrespondierende Restriktionsschnittstellen in das Phagemid pSEX81 (Welschof *et al.*, 1997) kloniert, um eine VH-Subbibliothek zu generieren. Nach der Präparation der Plasmid-DNA von Einzelklonen der VH-Subbibliothek, konnte durch eine Restriktionsanalyse mit den beiden Enzymen *HindIII* und *NcoI* die erfolgreiche Insertion der VH-Gene in das Phagemid pSEX81 gezeigt werden. Die PCR-Reaktionen zur Reamplifikation der VL κ - sowie der VL λ -Gene wurden ebenfalls vereinigt. Die 350-400 bp großen Genfragmente der leichten Ketten (VL κ - und VL λ) wurden nach ihrer Reinigung mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *NotI* geschnitten. Die beiden mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels Gelextraktion isoliert und konnten anschließend über korrespondierende Restriktionsschnittstellen in die VH-Subbibliothek kloniert werden. Die erfolgreiche Insertion der VL-Gene in die VH-Subbibliothek wurde ebenfalls durch eine Restriktionsanalyse unter Verwendung von *MluI* und *NotI* überprüft. Es wurden so zwei Mischbibliotheken hergestellt. Die eine Bibliothek bestand aus den VH- und VL κ -Genen

(Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ), während die andere Bibliothek die VH- und VL λ -Gene (Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ) der sechs Mammakarzinom-Patientinnen enthielt.

Die Bestimmung der Anzahl unabhängiger Kolonien nach der Klonierung ergab eine maximale Komplexität der beiden Antikörpergenbibliotheken von $6,5 \times 10^5$ (Bibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ) bzw. $1,7 \times 10^6$ (Bibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ).

4.2 Screening von humanen Antikörpergenbibliotheken

Die vier humanen rekombinanten Antikörpergenbibliotheken sollten im Folgenden für eine *in vitro*-Selektion mit Hilfe des Phagendisplays eingesetzt werden, um spezifisch an tumorassoziiertes MUC1 bindende *single chain* Fv-Antikörperfragmente (scFv-Fragmente) zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe von M13KO7-Bakteriophagen bzw. Hyperphagen Phagenantikörper aus den im Phagemid pSEX81 vorliegenden Antikörpergenbibliotheken hergestellt und für ein Panning auf Brust-Muzin-Antigen (BMA) sowie synthetischen MUC1-Glykopeptiden eingesetzt. Das in dieser Arbeit verwendete BMA wurde aus Zellen der MUC1-positiven humanen Mammakarzinom-Zelllinie T47D präpariert und unter Verwendung des MUC1-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers BM7 affinitätschromatographisch gereinigt. BMA stellte somit tumorassoziiertes MUC1 dar (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung).

4.2.1 Screening der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ

Die beiden humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ wurden in Hyperphagen verpackt, um rekombinante Phagenantikörper für ein Panning auf BMA sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid herzustellen. Rekombinante Phagenantikörper beider Einzelpatientinnenbibliotheken wurden in je zwei *immunotubes* gegeben, an deren Oberfläche vorher 1 μ g BMA bzw. 10 μ g 506 (synthetisches MUC1-Glykopeptid) gebunden worden war. Als Negativkontrolle wurden die Phagenantikörper beider Bibliotheken in nur mit PBS behandelten *immunotubes* inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die gebundenen, scFv-Fragmente tragenden Phagenpartikel mit Trypsin (1 μ g/ml in PBS) eluiert. Die so gewonnenen rekombinanten Phagen wurden in *E. coli* XL1-Blue Bakterien amplifiziert und erneut in Hyperphagen

verpackt, um analog weitere Panningrunden auf BMA und 506 durchzuführen. Vor und nach jeder Panningrunde wurden alle im Panning eingesetzten Phagenpräparationen titriert und mittels Immunoblot analysiert, um die Qualität der in den Phagenpräparationen vorhandenen rekombinanten Phagenantikörper durch Nachweis des scFv:pIII-Fusionsproteins zu überprüfen.

Mit beiden Einzelpatientinnenbibliotheken wurden je drei Panningrunden auf BMA sowie 506 durchgeführt. Für jedes Panning wurden pro Bibliothek ca. 10^{11} rekombinante Phagenantikörper-Partikel (10^{11} cfu/immunotube) eingesetzt. Nach jeder Panningrunde wurde die Anzahl eluierter Phagenpartikel bestimmt, um die Anreicherung spezifisch an BMA und an das synthetische MUC1-Glykopeptid 506 bindender Phagenantikörper über die Panningrunden zu verfolgen (Abb. 6). Aus den beiden Einzelpatientinnenbibliotheken konnten keine an BMA bindenden rekombinanten Phagenantikörper angereichert werden. Eine Selektion von an das MUC1-Glykopeptid 506 bindenden rekombinanten Phagenantikörpern konnte jedoch erzielt werden.

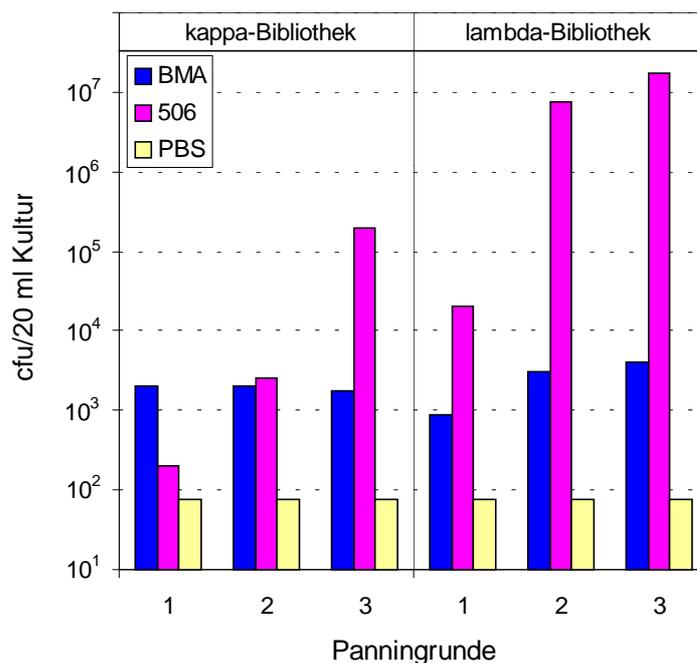


Abb. 6: Anreicherung von Phagen über die Panningrunden. Dargestellt ist die Anzahl eluierter Phagen (cfu/20 ml Kultur) nach jeweils drei Panningrunden auf BMA sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid 506 der beiden Einzelpatientinnenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ (kappa-Bibliothek) und pSEX81-S-VH/VL λ (lambda-Bibliothek). Panningrunden in mit PBS behandelten *immunotubes* dienen als Negativkontrolle.

Von den beiden humanen Einzelpatientinnenbibliotheken wurden die nach jeder Panningrunde amplifizierten rekombinanten Phagenantikörper in einem polyklonalen Phagen-ELISA eingesetzt, um die Spezifität der über die Panningrunden selektierten Phagenantikörper zu analysieren (Abb. 7). Zu diesem Zweck wurden in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten verschiedene Antigene gebunden und unspezifische Bindungsstellen mit MPBS abgesättigt. Die so behandelten Mikrotiterplatten wurden mit rekombinanten Phagenantikörpern (10^8 - 10^9 Phagenpartikel/well verdünnt in MPBS) der einzelnen Panningrunden inkubiert und die Detektion gebundener Phagenantikörper erfolgte mit dem monoklonalen anti-pVIII Antikörper B62-FE2 und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Die über das synthetische MUC1-Glykopeptid 506 angereicherten rekombinanten Phagenantikörper der beiden Einzelpatientinnenbibliotheken konnten im polyklonalen Phagen-ELISA an das synthetische MUC1-Glykopeptid 506 binden. Aus der S-VH/VL λ -Bibliothek konnten bereits nach der ersten Panningrunde auf 506 Phagenantikörper selektiert werden, die eine maximale Bindungsaktivität gegenüber 506 aufwiesen, wohingegen aus der S-VH/VL κ -Bibliothek erst nach drei Panningrunden auf 506 Phagenantikörper angereichert wurden, die eine signifikante Bindung an 506 zeigten. Diese über 506 angereicherten Phagenantikörper beider Bibliotheken zeigten jedoch keine Bindung an BMA. Obwohl nach drei Panningrunden auf BMA noch kein signifikanter Titer-Anstieg bei den beiden Einzelpatientinnenbibliotheken festzustellen war (Abb. 6), wurde dennoch die Antigenbindungsaktivität der Phagenantikörper nach jeweils drei Panningrunden auf BMA im polyklonalen Phagen-ELISA analysiert. Die Phagenantikörper aus den beiden Bibliotheken nach jeweils drei Panningrunden auf BMA zeigten jedoch keine signifikante Bindung an BMA. Somit konnten aus den beiden Einzelpatientinnenbibliotheken keine an BMA bindenden Antikörperfragmente selektiert werden. Die Ergebnisse der ELISA-Bindungsstudien von polyklonalen Phagenantikörperpräparationen der beiden Einzelpatientinnenbibliotheken nach jeweils drei Panningrunden auf BMA sowie 506 (synthetisches MUC1-Glykopeptid) sind in Abb. 7 zusammengefasst.

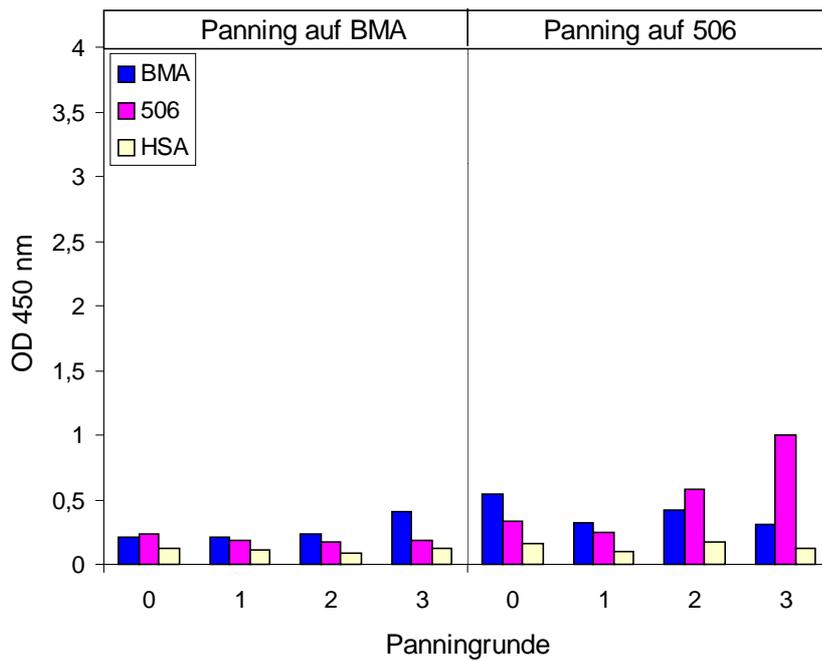
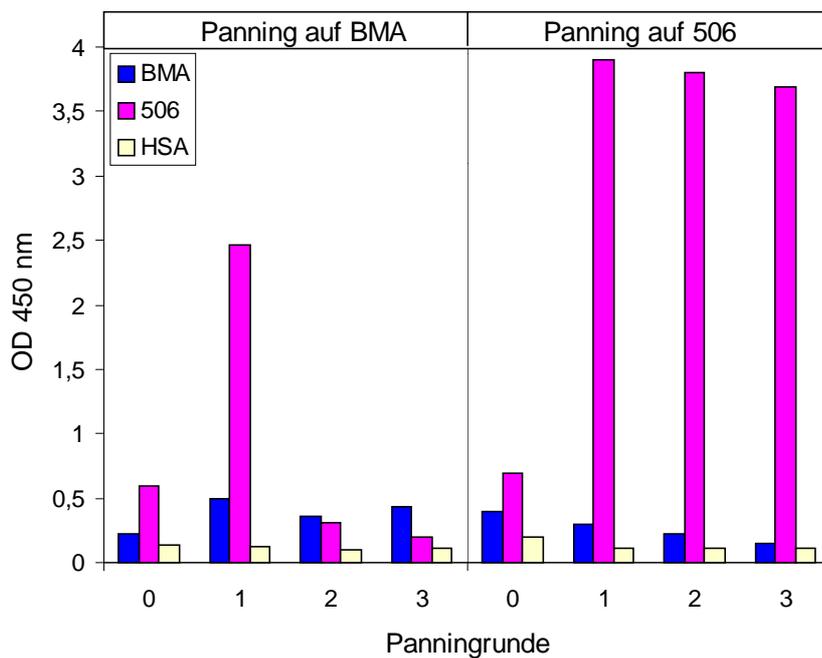
A) Bibliothek S-VH/VL κ B) Bibliothek S-VH/VL λ 

Abb. 7: Polyklonaler Phagen-ELISA zur Analyse der Spezifität der in den Phagenpräparationen enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper der beiden Einzelpatientinnenbibliotheken nach jeweils drei Panningrunden auf BMA und synthetischem MUC1-Glykopeptid 506. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der über die Panningrunden angereicherten rekombinanten Phagenantikörper der beiden Antikörpergenbibliotheken S-VH/VL κ (A) und S-VH/VL λ (B). Als Antigene dienten BMA (ca. 100 ng) und das synthetische MUC1-Glykopeptid 506 (ca. 200 ng) sowie als Negativkontrolle humanes Serumalbumin (HSA, ca. 100 ng). Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen.

4.2.2 Screening der humanen Antikörpergenbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ

Für das *screening* der beiden Mischbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ wurde eine zum *screening* der beiden Einzelpatientinnenbibliotheken alternative Panningstrategie gewählt, um Antikörperfragmente zu isolieren, die sowohl an BMA als auch an synthetisches MUC1-Glykopeptid binden. Die beiden Antikörpergenbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ wurden zunächst in Hyperphagen verpackt, um rekombinante Phagenantikörper für ein Panning auf BMA herzustellen. An die Oberfläche von *immunotubes* wurden zunächst je 10 μg BMA gebunden. Die *immunotubes* wurden anschließend mit rekombinanten Phagenantikörpern je einer Mischbibliothek inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Phagenantikörper beider Bibliotheken in nur mit PBS behandelten *immunotubes* inkubiert. Nach 2 h wurden die gebundenen scFv-Fragmente tragenden Phagenpartikel mit Trypsin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) eluiert. Die so gewonnenen rekombinanten Phagen wurden in *E. coli* XL1-*Blue* Bakterien amplifiziert und alternativ in den Helferphagen M13KO7 verpackt, um zwei weitere Panningrunden auf BMA durchzuführen. Die Elution der mit M13KO7-Helferphagen verpackten Phagenantikörper erfolgte mit Triethylamin. Vor und nach jeder Panningrunde wurden alle im Panning eingesetzten Phagenpräparationen titriert. Außerdem wurden alle Phagenpräparationen mittels Immunoblot analysiert, um die Qualität der in den Phagenpräparationen vorhandenen rekombinanten Phagenantikörper durch Nachweis des scFv:pIII-Fusionsproteins zu kontrollieren.

Beide Mischbibliotheken wurden für je drei Panningrunden auf BMA eingesetzt, wobei für jedes Panning pro Bibliothek ca. 10^{11} rekombinante Phagenantikörper-Partikel (10^{11} cfu/*immunotube*) verwendet wurden. Die Anzahl eluierter Phagenpartikel wurde nach jeder Panningrunde bestimmt, um die Anreicherung spezifisch an BMA bindender Phagenantikörper über die Panningrunden zu untersuchen (Abb. 8). Bei beiden Mischbibliotheken war ein Anstieg des Titers messbar.

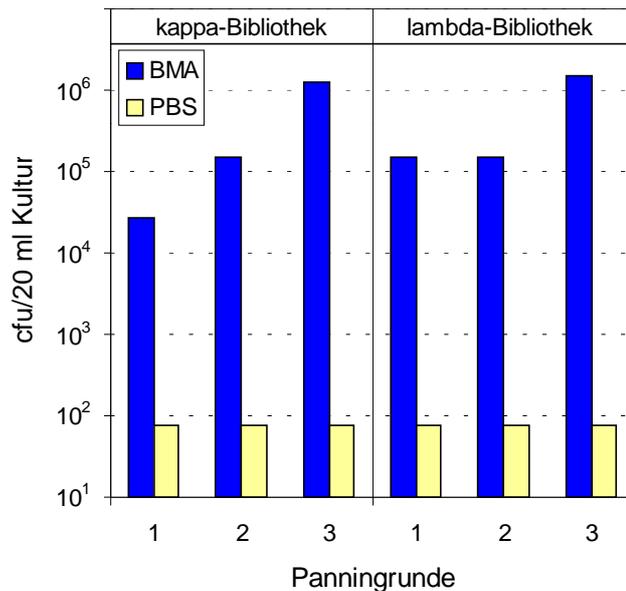


Abb. 8: Anreicherung von Phagen über die Panningrunden. Dargestellt ist die Anzahl eluierter Phagen (cfu/20 ml Kultur) nach jeweils drei Panningrunden auf BMA der beiden Mischbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ (kappa-Bibliothek) und pSEX81-Mix-VH/VL λ (lambda-Bibliothek). Panningrunden in mit PBS behandelten *immunotubes* dienten als Negativkontrolle.

In einem Phagen-ELISA wurden die nach jeder Panningrunde amplifizierte rekombinanten Phagenantikörper beider humaner Mischbibliotheken analysiert, um die Spezifität der über die drei Panningrunden selektierten Phagenantikörper zu überprüfen (Abb. 9). Hierzu wurden Mikrotiterplatten, die mit verschiedenen Antigenen beschichtet und anschließend mit MPBS geblockt worden waren, mit rekombinanten Phagenantikörpern (10^8 - 10^9 Phagenpartikel/well verdünnt in MPBS) der einzelnen Panningrunden inkubiert. Der Nachweis gebundener Phagenantikörper erfolgte mit dem monoklonalen anti-pVIII Antikörper B62-FE2 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Nach bereits zwei Panningrunden auf BMA konnte eine signifikante Erhöhung der Bindungsaktivität der in den einzelnen polyklonalen Phagenpopulationen enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper beider Mischbibliotheken bezüglich BMA festgestellt werden. Aber nur zwei polyklonale Phagenantikörperpopulationen (Mix-VH/VL κ -Bibliothek nach dem 3. Panning und Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach dem 2. Panning) zeigten eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber 460. Die Ergebnisse der ELISA-Bindungsstudien von polyklonalen Phagenantikörperpräparationen der beiden Mischbibliotheken nach drei Panningrunden auf BMA sind in Abb. 9 zusammengefasst.

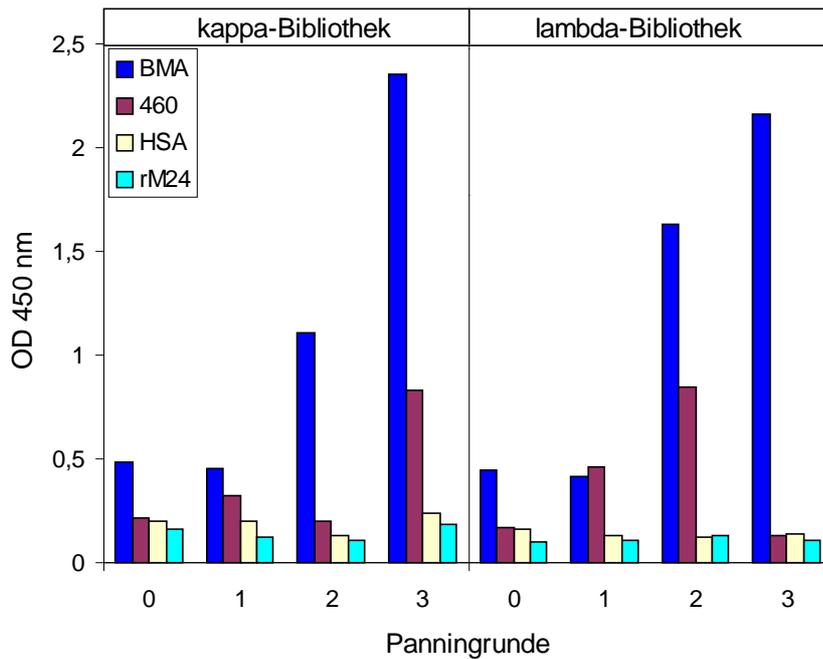


Abb. 9: Polyklonaler Phagen-ELISA zur Analyse der Spezifität der in den Phagenpräparationen enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper der beiden Mischbibliotheken nach drei Panningrunden auf BMA. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der über die Panningrunden angereicherten rekombinanten Phagenantikörper der beiden Antikörpergenbibliotheken Mix-VH/VL κ (kappa-Bibliothek) und Mix-VH/VL λ (lambda-Bibliothek). Als Antigene dienten BMA (ca. 100 ng) und das synthetische MUC1-Glykopeptid 460 (ca. 200 ng) sowie als Negativkontrollen humanes Serumalbumin (HSA, ca. 100 ng) und ein Kontrollpeptid (rM24, ca. 100 ng). Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen.

Da Antikörperfragmente selektiert werden sollten, die sowohl an BMA als auch an synthetisches MUC1-Glykopeptid binden, wurden die folgenden zwei angereicherten Antikörpergenbibliotheken für weitere Analysen verwendet: Mix-VH/VL κ -Bibliothek nach dem 3. Panning auf BMA sowie Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach dem 2. Panning auf BMA. Zu diesem Zweck wurden die beiden auf BMA angereicherten und in dem Helferphagen M13KO7 verpackten Bibliotheken für 2 h in *immunotubes* inkubiert, an deren Oberfläche vorher jeweils 100 μ g des synthetischen MUC1-Glykopeptids 460 gebunden worden war. Als Negativkontrolle wurden die rekombinanten Phagenantikörper für 2 h in nur mit PBS behandelten *immunotubes* inkubiert. Die Elution gebundener Phagenantikörper erfolgte mit Triethylamin. Die eluierten Phagenpartikel wurden in *E. coli* XL1-*Blue* Bakterien amplifiziert und erneut in den Helferphagen M13KO7 verpackt. Alle Phagenpräparationen wurden titriert und mittels Immunoblot analysiert, um die Qualität der in den Phagenpräparationen vorhandenen rekombinanten Phagenantikörper durch Nachweis des scFv:pIII-Fusionsproteins zu überprüfen. Für das Panning auf 460 wurden pro Bibliothek ca. 10^{11} rekombinante Phagenantikörper-Partikel (10^{11} cfu/*immunotube*) eingesetzt. Nach dem Panning wurde zunächst die Anzahl eluierter Phagenpartikel bestimmt (Tab. 2). Außerdem

wurden die nach dem Panning amplifizierten rekombinanten Phagenantikörper in einem polyklonalen Phagen-ELISA eingesetzt, um die Spezifität der im Panning auf 460 selektierten Phagenantikörper zu analysieren (Abb. 10). Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit verschiedenen Antigenen beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit MBPS abgesättigt. Anschließend wurden die Phagenantikörper der zu analysierenden Phagenpopulationen zugegeben (10^8 - 10^9 Phagenpartikel/well verdünnt in MPBS). Die Detektion gebundener Phagenantikörper erfolgte mit dem monoklonalen anti-pVIII Antikörper B62-FE2 und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Aus der Mischbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ konnten nach drei Panningrunden (zwei Panningrunden auf BMA und eine nachfolgende Panningrunde auf 460) rekombinante Phagenantikörper angereichert werden, die sowohl an BMA als auch an die synthetischen MUC1-Glykopeptide 460 und 506 banden. Aus der Mischbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ wurden nach vier Panningrunden (drei Panningrunden auf BMA und eine nachfolgende Panningrunde auf 460) hingegen nur an BMA bindende rekombinante Phagenantikörper angereichert (Tab. 2 und Abb. 10).

Tab. 2: Anzahl eluierter Phagen der angereicherten Mischbibliotheken nach einer Panningrunde auf synthetischem MUC1-Glykopeptid. Als Antigene für das Panning dienten das synthetische MUC1-Glykopeptid 460 sowie als Negativkontrolle nur mit PBS behandelte *immunotubes*.

Angereicherte Mischbibliothek	Anzahl eluierter Phagen [cfu]	
	460	PBS
Mix-VH/VL κ nach 3. Panning auf BMA	$2,8 \times 10^3$	$<10^2$
Mix-VH/VL λ nach 2. Panning auf BMA	5×10^6	$<10^2$

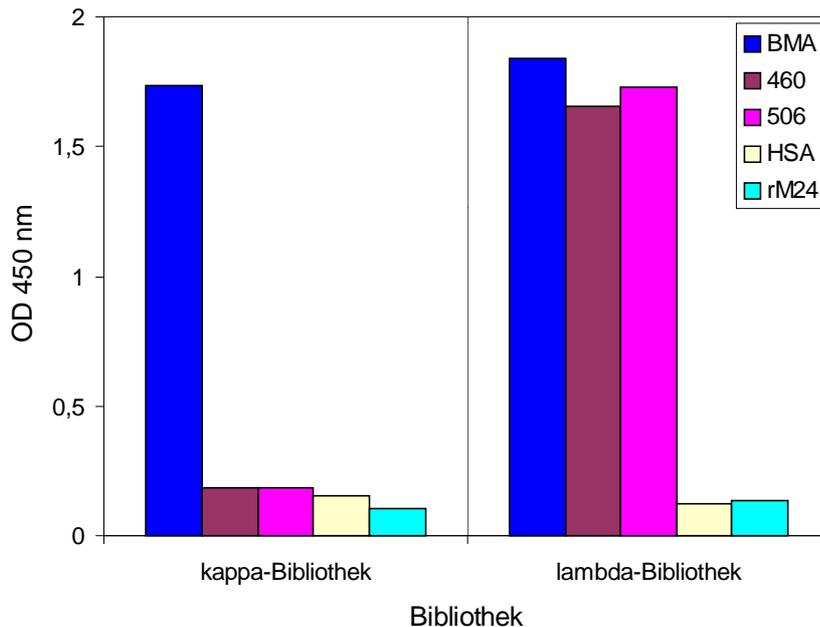


Abb. 10: Polyklonaler Phagen-ELISA zur Analyse der Spezifität der in den Phagenpräparationen enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper der beiden auf BMA angereicherten Mischbibliotheken nach einem nachfolgenden Panning auf synthetischem MUC1-Glykopeptid. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der auf BMA und nachfolgend auf dem synthetischen MUC1-Glykopeptid 460 angereicherten rekombinanten Phagenantikörper der beiden Antikörpergenbibliotheken Mix-VH/VL κ (kappa-Bibliothek) und Mix-VH/VL λ (lambda-Bibliothek). Als Antigene dienten BMA (ca. 100 ng) und die beiden synthetischen MUC1-Glykopeptide 460 und 506 (ca. 200 ng) sowie als Negativkontrollen humanes Serumalbumin (HSA, ca. 100 ng) und ein Kontrollpeptid (rM24, ca. 200 ng). Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen.

4.3 Analyse von Einzelklonen

Von beiden humanen Mischbibliotheken sollten im Folgenden Einzelklone isoliert und anschließend analysiert werden mit dem Ziel der Selektion von monoklonalen humanen Antikörperfragmenten, die sowohl BMA als auch synthetisches MUC1-Glykopeptid spezifisch binden.

4.3.1 Analyse von Einzelklonen der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ

Die durch drei Panningrunden auf BMA angereicherte Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ sollte nun genauer analysiert werden, da die in dieser Population enthaltenen rekombinanten Phagenantikörper in Phagen-ELISA-Bindungsstudien eine erhöhte Antigenbindungsaktivität bezüglich MUC1 sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid zeigten (Abb. 9). Zu diesem Zweck wurden zunächst 46 Einzelklone dieser Population isoliert und die im Phagemid pSEX81 vorliegenden Antikörpergene eines jeden Einzelklons in den Helferphagen M13KO7 verpackt, um monoklonale rekombinante Phagenantikörper herzustellen. Die Phagenantikörper der 46 Einzelklone wurden anschließend mit Hilfe eines monoklonalen Phagen-ELISAs bezüglich ihrer Spezifität analysiert (Abb. 11). Hierzu wurden Mikrotiterplatten, die vorher mit verschiedenen Antigenen beschichtet und anschließend mit MPBS geblockt worden waren, mit rekombinanten Phagenantikörpern der 46 Einzelklone inkubiert. Der Nachweis gebundener Phagenantikörper erfolgte mit dem monoklonalen anti-pVIII Antikörper B62-FE2 und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Die rekombinanten Phagenantikörper der meisten der insgesamt 46 Einzelklone der durch drei Panningrunden auf BMA angereicherten Mix-VH/VL κ -Bibliothek zeigten eine signifikante Bindung an BMA. Die Phagenantikörper dieser Klone konnten jedoch nicht an das synthetische MUC1-Glykopeptid 460 binden (Abb. 11). Aus der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ konnten keine Antikörperfragmente selektiert werden, die sowohl BMA als auch synthetisches MUC1-Glykopeptid binden.

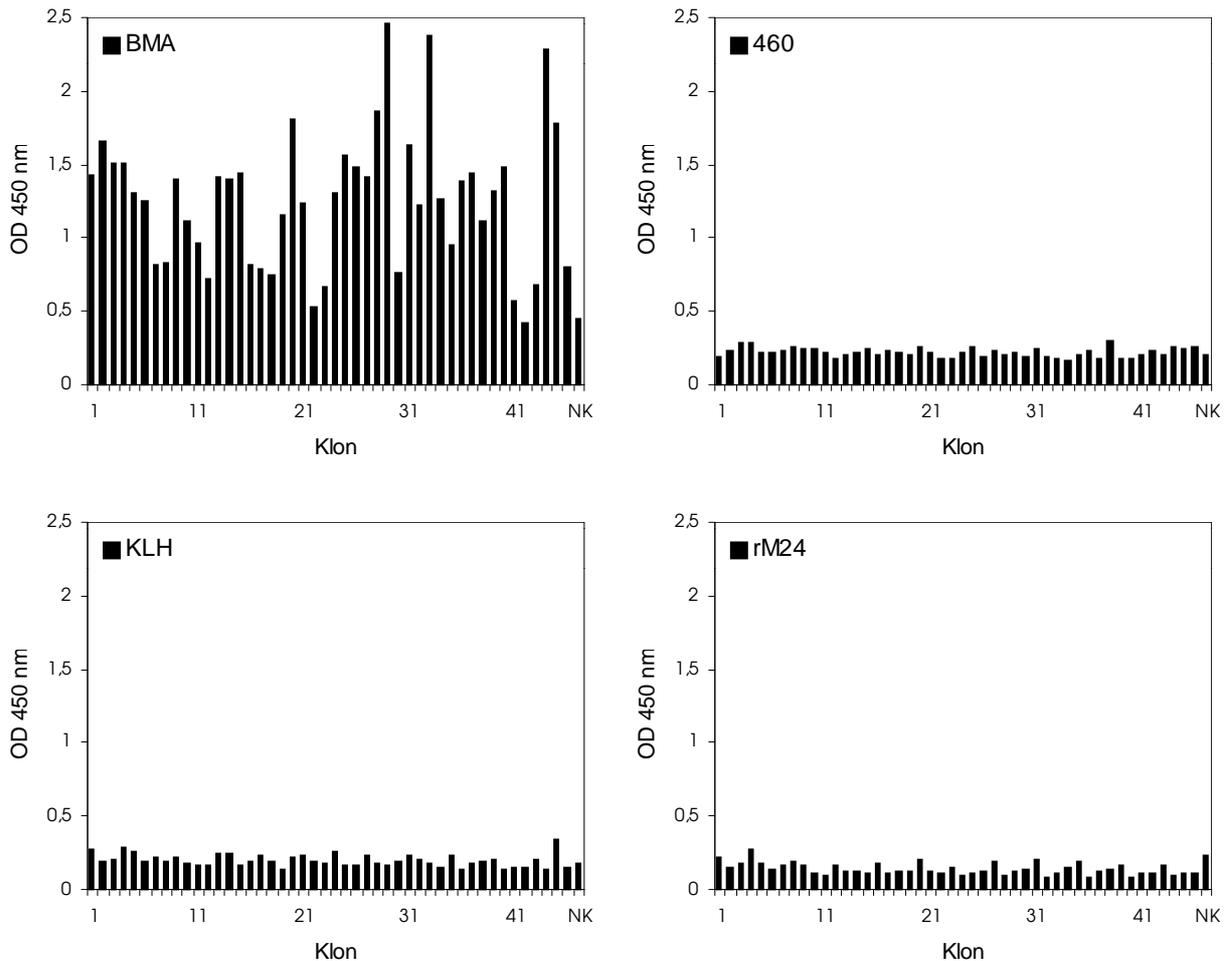


Abb. 11: Monoklonaler Phagen-ELISA zur Analyse der Spezifität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Mix-VH/VL κ -Bibliothek nach drei Panningrunden auf BMA. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL κ nach drei Panningrunden auf BMA. Als Antigene dienten BMA (ca. 100 ng) und das synthetische MUC1-Glykopeptid 460 (ca. 200 ng) sowie als Negativkontrollen KLH und ein Kontrollpeptid (rM24, ca. 200 ng). Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Als weitere Negativkontrolle wurde nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert (NK).

4.3.2 Analyse von Einzelklonen der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ

Beim *screening* der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ mit Hilfe des Phagendisplays zeigten die rekombinanten Phagenantikörper von zwei angereicherten Populationen in Phagen-ELISA-Bindungsstudien eine Bindung sowohl an BMA als auch an synthetisches MUC1-Glykopeptid: Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach zwei Panningrunden auf MUC1 (Abb. 9) sowie Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach zwei Panningrunden auf MUC1 und einer

nachfolgenden Panningrunde auf synthetischem MUC1-Glykopeptid (Abb. 10). Von diesen beiden Populationen wurden zunächst jeweils 46 Einzelklone isoliert. Um monoklonale rekombinante Phagenantikörper dieser Klone zu produzieren, wurden die im Phagemid pSEX81 integrierten Antikörpergene eines jeden Einzelklons in den Helferphagen M13KO7 verpackt. Die Spezifität der Phagenantikörper von insgesamt 92 Einzelklonen sollte mit Hilfe von monoklonalen Phagen-ELISAs bestimmt werden (Abb. 12 sowie Abb. 13 und 14). Zu diesem Zweck wurden in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten verschiedene Antigene gebunden und unspezifische Bindungsstellen mit MPBS abgesättigt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend mit rekombinanten Phagenantikörpern der 92 Einzelklone inkubiert. Die Detektion gebundener Phagenantikörper erfolgte wie in Abb. 11 beschrieben. Die rekombinanten Phagenantikörper von mehreren nach zwei Panningrunden auf BMA isolierten Klonen der Mix-VH/VL λ -Bibliothek konnten an BMA binden. Die Phagenantikörper der insgesamt 46 Einzelklone zeigten jedoch keine signifikante Reaktivität gegenüber synthetischem MUC1-Glykopeptid 460 (Abb. 12).

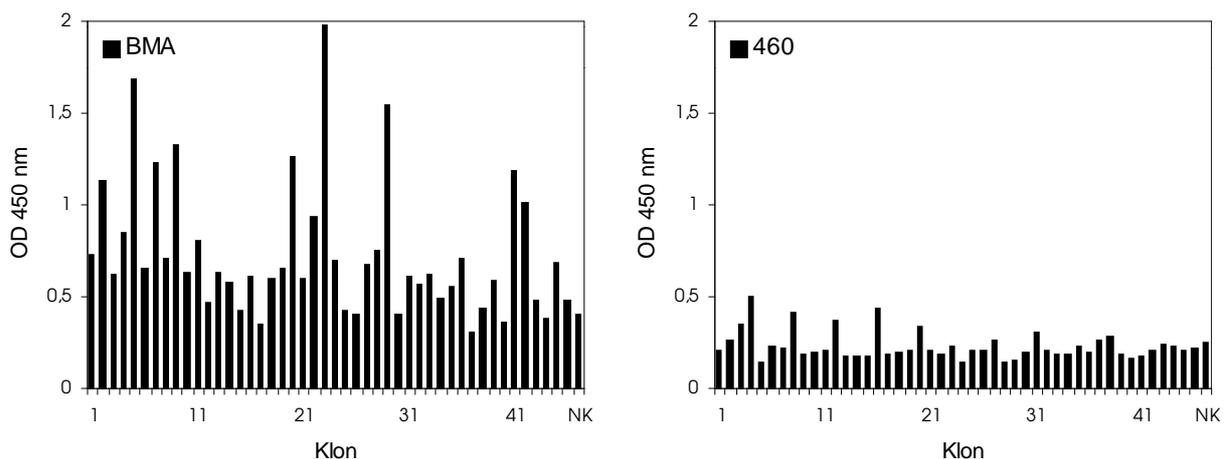


Abb. 12: Monoklonaler Phagen-ELISA zur Analyse der Spezifität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach zwei Panningrunden auf BMA. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Antikörperbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ nach zwei Panningrunden auf BMA. Als Antigene dienten BMA (ca. 100 ng) und das synthetische MUC1-Glykopeptid 460 (ca. 200 ng). Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert (NK).

Die Phagenantikörper von 43 der insgesamt 46 nach zwei Panningrunden auf BMA und einer nachfolgenden Panningrunde auf dem synthetischen MUC1-Glykopeptid 460 isolierten Einzelklone der Mix-VH/VL λ -Bibliothek zeigten im monoklonalen Phagen-ELISA eine Bindung sowohl an BMA als auch an die synthetischen MUC1-Glykopeptide 460 und 506. Die rekombinanten Phagenantikörper der restlichen drei Einzelklone (Klone 20, 27 und 38)

zeigten keine signifikante Antigenbindungsaktivität gegenüber BMA und den beiden synthetischen MUC1-Glykopeptiden (Abb. 13).

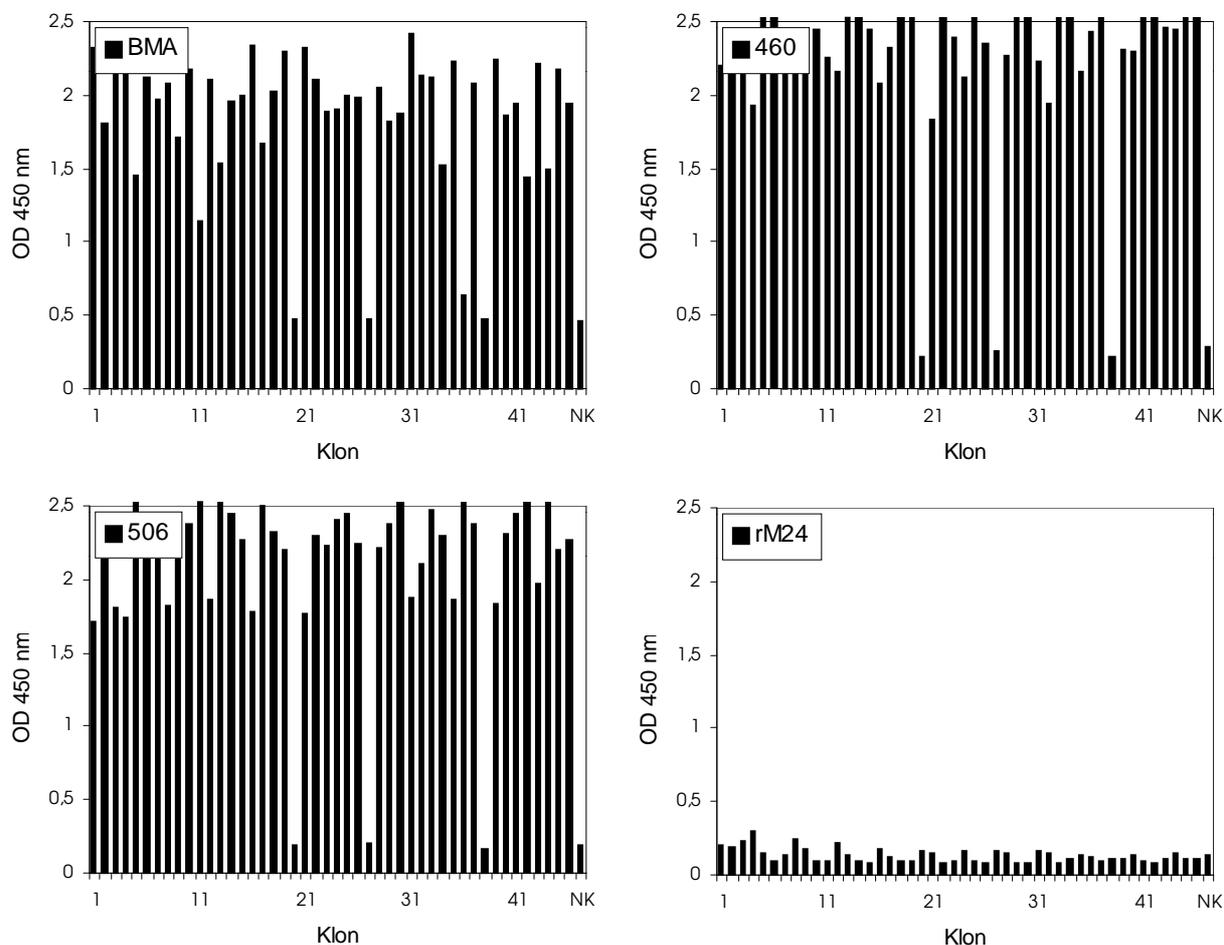


Abb. 13: Monoklonaler Phagen-ELISA zur Analyse der Spezifität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach zwei Panningrunden auf BMA und einer nachfolgenden Panningrunde auf synthetischem MUC1-Glykopeptid. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ nach zwei Panningrunden auf BMA und einem nachfolgenden Panning auf 460. Als Antigene dienen BMA (ca. 100 ng) und die beiden synthetischen MUC1-Glykopeptide 460 und 506 (ca. 200 ng) sowie als Negativkontrolle ein Kontrollpeptid (rM24, ca. 200 ng). Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Als weitere Negativkontrolle wurde nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert (NK).

Um die Spezifität der im monoklonalen Phagen-ELISA mit BMA und synthetischen MUC1-Glykopeptiden reaktiven Klone (Abb. 13) zu verifizieren, wurde ein weiterer monoklonaler Phagen-ELISA durchgeführt. Als Antigene dienen in dieser ELISA-Bindungsstudie das Cytosol von Zellen der MUC1-positiven Mammakarzinom-Zelllinie T47D und als Negativkontrolle das Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten. In diesem ELISA konnten die Phagenantikörper von 42 Einzelklonen an das Cytosol von MUC1-positiven T47D-Zellen binden. Die Phagenantikörper von vier Einzelklonen (Klone 20, 27, 36 und 38) zeigten keine

signifikante Bindung an dieses komplexe Antigen (Abb. 14). Somit waren drei der insgesamt 46 analysierten Einzelklone (Klone 20, 27 und 38) sowohl mit BMA und synthetischen MUC1-Glykopeptiden als auch mit Cytosol von Zellen der MUC1-positiven T47D-Zelllinie negativ, während die anderen 43 isolierten Klone Reaktivität gegenüber MUC1, synthetischen MUC1-Glykopeptiden und T47D-Cytosol zeigten (mit Ausnahme des Klons 36, welcher nur mit MUC1 und synthetischen MUC1-Glykopeptiden positiv war).

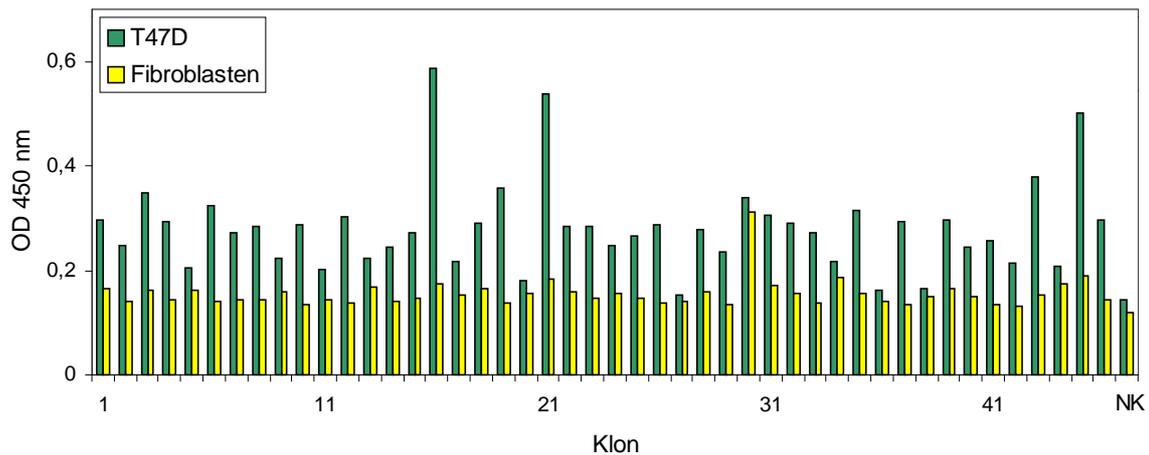


Abb. 14: Bindung der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der durch zwei Panningrunden auf BMA und einer nachfolgenden Panningrunde auf synthetischem MUC1-Glykopeptid angereicherten Mix-VH/VL λ -Bibliothek an das Cytosol von Zellen der MUC1-positiven Mammakarzinom-Zelllinie T47D im monoklonalen Phagen-ELISA. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der rekombinanten Phagenantikörper von 46 Einzelklonen der Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ nach zwei Panningrunden auf BMA und einem nachfolgenden Panning auf 460. Als komplexe Antigene wurden das Cytosol von Zellen der MUC1-positiven Mammakarzinom-Zelllinie T47D und als Negativkontrolle das Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten verwendet. Gebundene Phagenantikörper wurden mit dem monoklonalen Antikörper B62-FE2 und anschließend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper detektiert.

Da 43 der insgesamt 46 isolierten Antikörperklone der durch zwei Panningrunden auf MUC1 und einem nachfolgenden Panning auf synthetischem MUC1-Glykopeptid angereicherten humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ eine vergleichbare Spezifität in den Phagen-ELISA-Bindungstests zeigten, stellte sich die Frage, ob die Antikörpergene dieser Klone identisch sind. Um einen Hinweis auf die Zusammensetzung der angereicherten Bibliothek zu erhalten, wurden die Einzelklone mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Bst*NI analysiert. Dieses Enzym ist durch die polymorphe Verteilung seiner Erkennungssequenz in Antikörper-DNA gekennzeichnet und ermöglicht so die Identifizierung unterschiedlicher Sequenzen (Marks *et al.*, 1991). Von jedem der 46 Einzelklone wurde die DNA des pSEX81-Phagemids, in welches die DNA der Antikörperfragmente integriert ist, präpariert und anschließend mit der Restriktionendonuklease *Bst*NI geschnitten. Zwei der analysierten Klone (Klone 20 und 38) zeigten ein im Vergleich zu den restlichen 44 Klonen

unterschiedliches Restriktionsmuster (Abb. 15). Das Ergebnis der *Bst*NI-Restriktionsanalyse weist darauf hin, dass 44 von insgesamt 46 untersuchten Einzelklonen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit identisch sind. Außerdem zeigten 43 dieser in der *Bst*NI-Restriktionsanalyse potentiell identischen 44 Klone in ELISA-Bindungsstudien eine vergleichbare Reaktivität gegenüber BMA und synthetischen MUC1-Glykopeptiden.

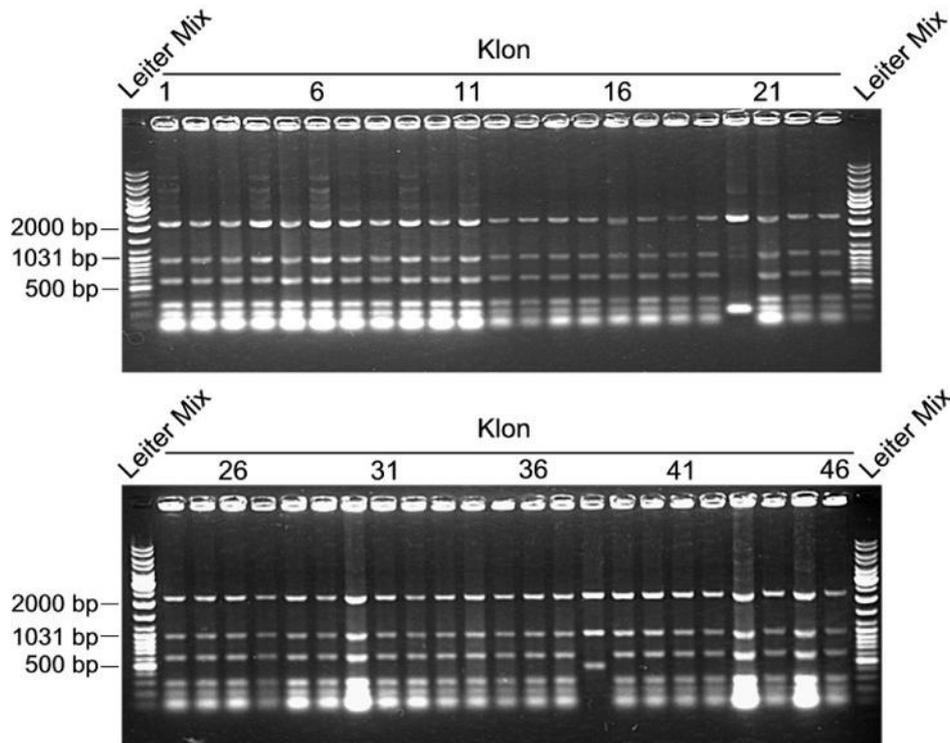


Abb. 15: *Bst*NI-Restriktionsanalyse der 46 isolierten Einzelklone der durch zwei Panningrunden auf BMA und einem nachfolgenden Panning auf synthetischem MUC1-Glykopeptid angereicherten Mix-VH/VL λ -Bibliothek. Die Phagemid-DNA der 46 Einzelklone wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bst*NI geschnitten und zur Analyse in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Klone 1 bis 23 (oben), Klone 24 bis 46 (unten).

4.4 Herstellung von rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragmenten

Die durch zwei Panningrunden auf BMA und einer nachfolgenden Panningrunde auf synthetischem MUC1-Glykopeptid aus der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ selektierte Antikörper-DNA sollte in den *E. coli*-Expressionsvektor pOPE101 (Schmiedel *et al.*, 2000) kloniert werden, um lösliche *single chain* Fv-Antikörperfragmente (scFv-Fragmente) herzustellen.

4.4.1 Klonierung in den Expressionsvektor pOPE101

Da 43 der insgesamt 46 analysierten Einzelklone der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ mit sehr großer Wahrscheinlichkeit identisch sind, wurden nur die Klone 16 (ID4), 21 (IA6) und 45 (IIB6) für die Umklonierung der für die Antikörperfragmente kodierenden DNA ausgewählt. Die für die Antikörperfragmente kodierende DNA besteht aus den DNA-Abschnitten der VH- und VL-Domäne, welche durch einen für ein kurzes Peptid (Yol-Linker) kodierenden DNA-Bereich verknüpft sind. Zunächst wurde die Antikörper-DNA der drei Einzelklone ID4, IA6 und IIB6 mit Hilfe der beiden Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Not*I aus dem zuvor präparierten pSEX81-Phagemid der jeweiligen Einzelklone herausgeschnitten. Die DNA der drei Antikörperfragmente wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Gelextraktion isoliert und über korrespondierende Restriktionsschnittstellen in den Vektor pOPE101 kloniert, der zur periplasmatischen Expression von scFv-Fragmenten in *E. coli* dient (Abb. 16). Der pOPE101-Vektor besitzt das ColE1 *origin of replication* und das β -Lactamase-Gen als Selektionsmarker für die Ampicillinresistenz. Der synthetische lac-Promotor wird durch Zugabe von IPTG induziert. Das Translationsprodukt besitzt das N-terminal fusionierte pelB-Signalpeptid, das die Sekretion des scFv-Fragments in den periplasmatischen Raum gewährleistet. Der 18 Aminosäure umfassende Yol-Linker verbindet im scFv-Fragment den C-Terminus der variablen Domäne der schweren Kette mit dem N-Terminus der variablen Domäne der leichten Kette. Außerdem verfügt das scFv-Fragment über das c-myc-tag, welches nahe dem C-Terminus der VL-Domäne lokalisiert ist und der Detektion dient. Das (His)₆-tag befindet sich am C-terminalen Ende des Fusionsproteins und besteht aus sechs Histidinen zur Reinigung und Detektion des scFv-Fragments

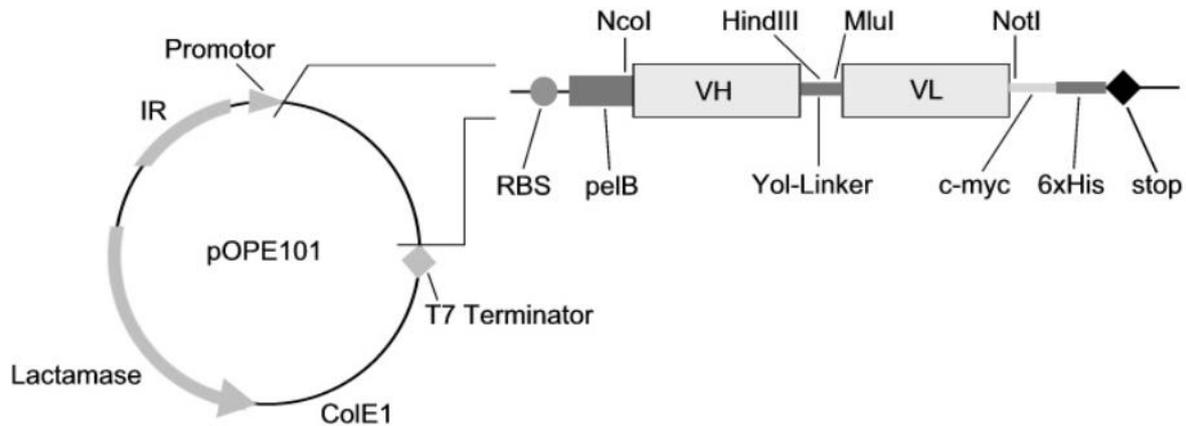


Abb. 16: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pOPE101. Lactamase: β -Lactamasegen für die Ampicillinresistenz; IR: *intergenic region*; ColE1: *origin of DNA replication*; Promotor: synthetischer lac-Promotor; RBS: Ribosombindungsstelle; pelB: Signalsequenz zur Ausschleusung des Translationsprodukts in den periplasmatischen Raum; VH und VL: kodierende Regionen der variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperkette; Yol-Linker: verbindet im Translationsprodukt VH und VL; c-myc: kodiert c-myc-tag; 6xHis: 6 Histidine kodierende Nukleotidsequenz; stop: Stop-Codon; NcoI, HindIII, MluI, NotI: die für eine Klonierung der VH- und VL-Gene notwendigen Restriktionsschnittstellen.

Die erfolgreiche Insertion der für die drei Antikörperfragmente kodierenden Gene in den Vektor pOPE101 wurde durch eine Restriktionsanalyse unter Verwendung der Restriktionsenzyme NcoI und NotI überprüft.

4.4.2 Expression von rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragmenten

Nach der Transformation der drei Vektoren pOPE101-ID4, pOPE101-IA6 und pOPE101-IIB6 in Bakterien des *E. coli*-Stammes XL1-Blue wurde die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 50 μ M IPTG für 3 h zur Sekretion funktioneller scFv-Fragmente in den periplasmatischen Raum induziert. Anschließend wurden Zell-Lysate induzierter und nicht-induzierter Kulturen sowie die periplasmatischen Extrakte induzierter Kulturen der drei Ansätze ID4, IA6 und IIB6 mit Hilfe von SDS-PAGE und nachfolgenden Immunoblots analysiert (Abb. 17). Als Kontrolle wurde ein Klon des bereits charakterisierten scFv-Fragments ‚215‘ verwendet, der gegen die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II von *Drosophila Melanogaster* gerichtet ist (Kontermann *et al.*, 1995; Schmiedl *et al.*, 2000). Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Die Bakterienklone ID4, IA6 und IIB6 exprimierten nach der Induktion mit IPTG scFv-Fragmente, die eine apparente molekulare Masse von ca. 35 kDa hatten. Die Antikörperfragmente

konnten sowohl in totalen Zell-Lysaten als auch in periplasmatischen Extrakten der Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 17).

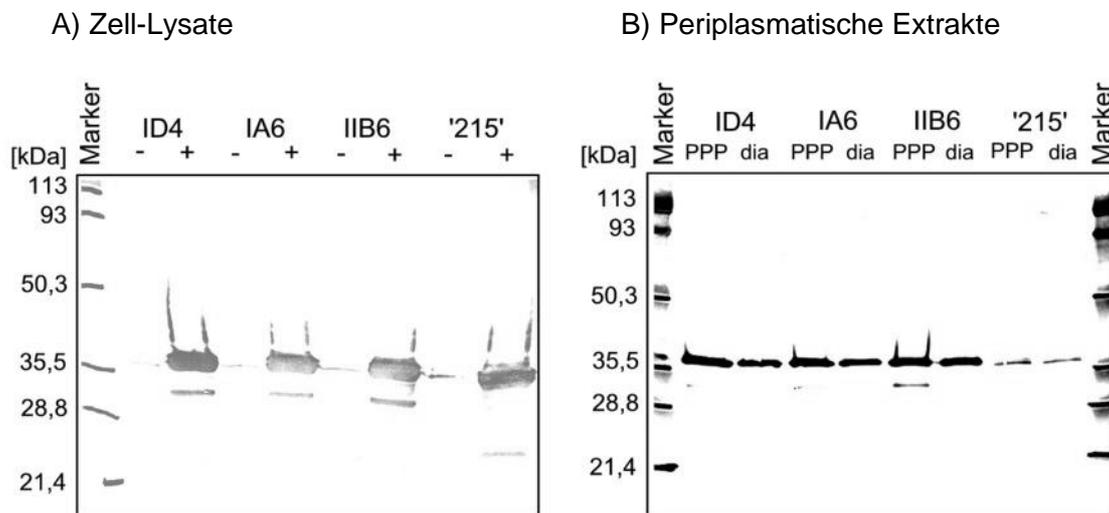


Abb. 17: Analyse der Expression der rekombinanten scFv-Fragmente ID4, IA6 und IIB6. A) Immunoblot-Analyse bakterieller Zell-Lysate von mit IPTG induzierten (+) und nicht-induzierten (-) Kulturen. B) Immunoblot-Analyse periplasmatischer Extrakte induzierter Kulturen vor (PPP) und nach der Dialyse (dia) gegen PBS. Die Proteine der Zell-Lysate und der periplasmatischen Extrakte wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen elektrotransferiert. Die Detektion der scFv-Fragmente erfolgte mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Als Kontrolle diente die Expression des scFv-Fragments '215'.

4.4.3 Antigenbindungsaktivität von periplasmatischen Extrakten

In einer Immunoblot-Analyse periplasmatischer Extrakte konnte gezeigt werden, dass die Bakterienklone ID4, IA6 und IIB6 lösliche Antikörperfragmente produzieren (Abb. 17B). Um die Antigenbindungsaktivität dieser scFv-Fragmente zu überprüfen, wurden periplasmatische Extrakte hergestellt und in einem ELISA analysiert (Abb. 18). Zunächst wurden Mikrotiterplatten mit verschiedenen Antigenen beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit MPBS abgesättigt. Es erfolgte die Zugabe der Periplasma-Extrakte der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 sowie '215' als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper BM7 inkubiert. Gebundene scFv-Fragmente wurden mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Als weitere Negativkontrolle wurde nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert. Die in den periplasmatischen Extrakten der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 enthaltenen löslichen Antikörperfragmente konnten im ELISA an BMA, an das synthetische MUC1-Glykopeptid 438+ und an das synthetische nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid 438- binden. Außerdem zeigten diese scFv-Fragmente eine erhöhte

Antigenbindungsaktivität gegenüber dem Cytosol von MUC1-positiven T47D-Zellen, wohingegen das Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten und das Kontrollpeptid rM24 nicht gebunden wurden (Abb. 18). Die Antikörperfragmente der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 zeigten in dieser ELISA-Bindungsstudie eine mit dem monoklonalen Antikörper BM7 vergleichbare Reaktivität mit dem Unterschied, dass der BM7-Antikörper nur glykosyliertes Antigen erkennt (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung).

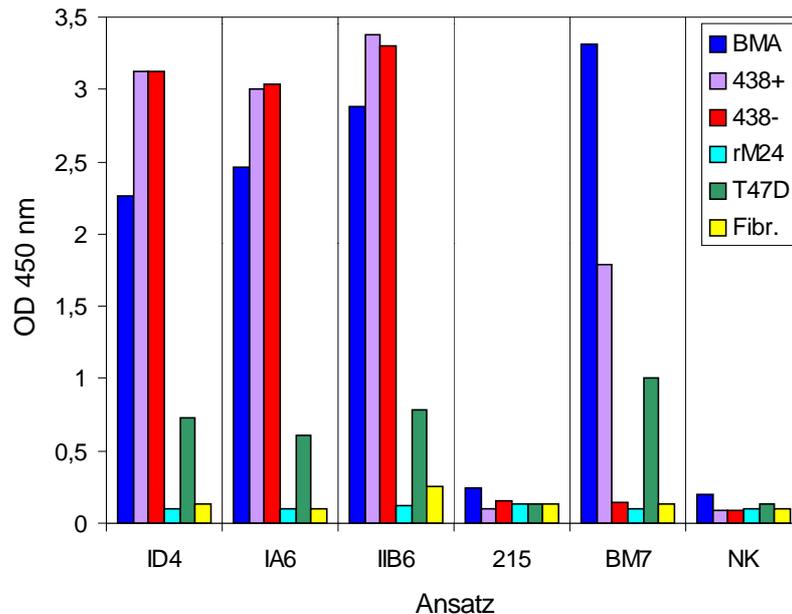


Abb. 18: ELISA zur Analyse der Spezifität der in periplasmatischen Extrakten enthaltenen Antikörperfragmente der Ansätze ID4, IA6 und IIB6. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität der in periplasmatischen Extrakten (1:32-Verdünnung in MPBS) enthaltenen scFv-Fragmente der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 sowie als Negativkontrolle ‚215‘. Als Antigene dienten BMA (ca. 100 ng), das synthetische MUC1-Glykopeptid 438+ (ca. 200 ng), das synthetische nicht-glykosylierte MUC1-Peptid 438- (ca. 200 ng) und das Cytosol von MUC1-positiven T47D-Zellen (T47D, ca. 2 µg Gesamtprotein) sowie als Negativkontrollen ein Kontrollpeptid (rM24, ca. 200 ng) und das Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten (Fibr., ca. 2 µg Gesamtprotein). Der monoklonale Antikörper BM7 (2,5 ng in MPBS) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Gebundene Antikörperfragmente wurden mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Als weitere Negativkontrolle wurde nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert (NK).

4.5 Sequenzanalyse von rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragmenten

Die für die variablen Regionen der schweren und der leichten Antikörperketten kodierenden und in pOPE101 vorliegenden DNA-Segmente der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 sollten sequenziert werden, um die Primärstruktur der variablen Domänen zu ermitteln. Die

Genfragmente für die variablen schweren Antikörperketten der drei Ansätze wurden mit den Primern DP-1 und NSEX-a sequenziert. Unter Verwendung der Primer NSEX und pSEX B wurden die Nukleotidsequenzen der für die variablen leichten Antikörperketten kodierenden Gensegmente bestimmt. Durch Translation der Nukleotidsequenzen wurde die Primärstruktur der variablen Domänen abgeleitet. Außerdem konnten die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) nach Kabat und Wu identifiziert werden (Kabat und Wu, 1991). Bei der Sequenzierung der Klone ID4, IA6 und IIB6 wurden bezüglich der VH- und der VL-Domäne jeweils identische Nukleotidsequenzen identifiziert (Abb. 19 und 20). Die drei mittels Phagendisplay aus der Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ selektierten und anschließend in den Expressionsvektor pOPE101 klonierten Antikörper-Genfragmente waren somit identisch.

N AS (Kabat)	Sequenz															
1 1 1	CAG Q 1	ATG M	CAG Q	CTG L	GTA V	CAG Q	TCT S	GGG G	GCT A	GAG E	GTG V	AAG K	AAG K	CCT P	GGG G 15	
46 16 16	GCC A 16	TCA S	GTG V	AAG K	GTC V	TCC S	TGC C	AAG K	GCT A	TCT S	GGA G	TAC Y	ACC T	TTC F	ACC T 30	
91 31 31	GGC G 31	CAC H	TAT Y	ATG M	CAC H	TGG W	GTG V	CGA R	CAG Q	GCC A	CCT P	GGA G	CAA Q	GGG G	CTT L 45	
136 46 46	GAG E 46	TGG W	ATG M	GGA G	TGG W	ATC I	GAC D	CCT P	GTC V	ACT T	GGT G	GGC G	ACA T	AAG K	TAT Y 59	
181 61 60	GCC A 60	CAG Q	AAC N	TTT F	CAG Q	GGC G	TGG W	GTC V	ACC T	ATG M	ACC T	AGG R	GAC D	ACG T	TCC S 74	
226 76 75	ATC I 75	AGA R	ACA T	GCC A	TAC Y	ATG M	GAA E	CTG L	AGC S	AGG R	CTG L	AGA R	TCT S	GAC D	GAC D 86	
271 91 87	ACG T 87	GCC A	ATG M	TAT Y	TAC Y	TGT C	GCG A	AGA R	GAG E	GTC V	ACT T	GGG G	GAT D	CGG R	GGA G 100A	
316 106 100B	CAA Q 100B	TTT F 100C	GAC D 101	AAG K	TGG W	GGC G	CAG Q	GGA G	ACC T	CTG L	GTC V	ACC T	GTC V	GCC A	TCA S 113	

Abb. 19: Nukleotidsequenz der in pOPE101 klonierten Antikörper-Genfragmente der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 und der daraus abgeleiteten Primärstruktur der variablen Region der schweren Kette. Die Nummerierung erfolgte nach Kabat (Martin, 1996; <http://www.bioinf.org.uk>). Die CDR-Regionen sind farbig markiert (CDR-H1: rot; CDR-H2: grün; CDR-H3: blau). Abkürzungen: N: Nukleotide; AS: Aminosäuren.

N AS (Kabat)	Sequenz															
1 1 1	CAG Q 1	TCT S	GTG V	CTG L	ACG T	CAG Q	CCA P	CCC P	TCG S 9	GTG V 11	TCA S	GTG V	GCC A	CCA P	GGA G 16	
46 16 17	AAG K 17	ACG T	GCC A	AGG R	ATT I	ACC T	TGT C	GGG G	GGA G	AAC N	AAC N	ATT I	GGA G	AGT S	AAA K 31	
91 31 32	AGT S 32	GTG V	CAC H	TGG W	TAC Y	CAG Q	CAG Q	AAG K	CCA P	GGC G	CAG Q	GCC A	CCT P	GTG V	CTG L 46	
136 46 47	GTC V 47	ATC I	TAT Y	TAT Y	GAT D	AGC S	GAC D	CGG R	CCC P	TCA S	GGG G	ATC I	CCT P	GAG E	CGA R 61	
181 61 62	TTC F	TCT S	GGC G	TCC S	AAC N	TCT S	GGG G	AAC N	ACG T	GCC A	ACC T	CTG L	ACC T	ATC I	AGC S 76	
226 76 77	AGG R 77	GTC V	GAA E	GCC A	GGG G	GAT D	GAG E	GCC A	GAC D	TAT Y	TAC Y	TGT C	CAG Q	GTG V	TGG W 91	
271 91 92	GAT D 92	AGT S	AGT S	AGT S	GAT D	TGG W	GTG V	TTC F	GGC G	GGA G	GGG G	ACC T	AAG K	CTG L	ACC T 105	
316 106 106	GTC V 106	CTA L 106A	GGT G 107	CAG Q	CCC P 109											

Abb. 20: Nukleotidsequenz der in pOPE101 klonierten Antikörper-Genfragmente der Ansätze ID4, IA6 und IIB6 und der daraus abgeleiteten Primärstruktur der variablen Region der leichten Kette. Die Nummerierung erfolgte nach Kabat (Martin, 1996; <http://www.bioinf.org.uk>). Die CDR-Regionen sind farbig markiert (CDR-L1: rot; CDR-L2: grün; CDR-L3: blau). Abkürzungen: N: Nukleotide; AS: Aminosäuren.

Die für die VH- und die VL-Domäne kodierenden Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe von im Internet zugänglichen Datenbanken (*V-Base*, <http://www.mrc.cam.ac.uk>; Datenbanken am EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>, Pearson und Lipman, 1988) analysiert. Das mittels Phagendisplay selektierte VH-Gen gehört zu der VH1-Genfamilie und zeigt eine 95,6 %ige Homologie zu dem *germline*-Gen DP-8, welches zugleich die ähnlichste in den Datenbanken gefundene Gensequenz darstellt (*Accession No.* Z12310, Tomlinson *et al.*, 1992). Das zur V λ 3-Genfamilie gehörende VL-Gen ist zu 95,8 % mit dem *germline*-Gen IGLV3S2 homolog (*Accession No.* X71966, Fripiat und Lefranc, 1994). Bei der zum VL-Gen am nächsten verwandten Gensequenz handelt es sich um ein V λ -Gen aus einer cDNA-Bibliothek, welche aus humanen peripheren Lymphozyten generiert wurde (*Accession No.* Z85052, Ignatovich *et al.*, 1997). Die Homologie beträgt 98,5 %.

4.6 Expression und Reinigung des humanen rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragments IIB6

Durch Sequenzierung der in pOPE101 integrierten VH- und VL-Gene der Klone ID4, IA6 und IIB6 konnte gezeigt werden, dass diese drei aus der Bibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ selektierten Antikörpergenfragmente identisch waren. Daher wurde für die Expression und Reinigung eines humanen rekombinanten scFv-Fragments zum Zweck weiterer Analysen der Klon IIB6 ausgewählt. Wie vorangegangene Untersuchungen (4.4.2 und 4.4.3) zeigten, konnte der Bakterienklon IIB6 ein lösliches und funktionelles Antikörperfragment produzieren, welches im Folgenden aus den periplasmatischen Extrakten gereinigt werden sollte. Zu diesem Zweck wurden mit dem Vektor pOPE101-IIB6 transformierte Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-*Blue* erneut durch Zugabe von 50 μ M IPTG für 3 h zur Sekretion eines scFv-Fragments in den periplasmatischen Raum induziert. Das rekombinante scFv-Fragment IIB6 besitzt an seinem C-terminalen Ende ein (His)₆-tag, welches die Reinigung des Fusionsproteins mit Hilfe einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aus den periplasmatischen Extrakten ermöglicht. Die beiden periplasmatischen Extrakte PPP und OSP wurden nach ihrer Vereinigung und einer anschließenden Dialyse gegen PBS zum Säulenmaterial gegeben. Nach einer Inkubationsphase von 60 min, in der das in den periplasmatischen Extrakten enthaltene rekombinante Antikörperfragment an das mit Ni²⁺-Ionen beladene Gel binden sollte, wurde mit SSP, SWP und PBS gewaschen. Die Elution der an die Gelmatrix gebundenen Proteine erfolgte mit 100 mM EDTA in PBS. Die Elutions-Fractionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Die Zell-Lysate der induzierten und nicht-induzierten Kultur, die periplasmatischen Extrakte der induzierten Kultur sowie die während der Reinigung mittels IMAC gesammelten Fractionen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Mit Hilfe der IMAC konnte aus den periplasmatischen Extrakten der mit IPTG induzierten Bakterienkultur des Klons IIB6 ein Protein mit der apparenten molekularen Masse von ca. 35 kDa angereichert werden. In den Elutions-Fractionen wurden keine weiteren Proteinbanden detektiert, was auf eine hohe Reinheit des angereicherten Proteins im Eluat hinweist (Abb. 21).

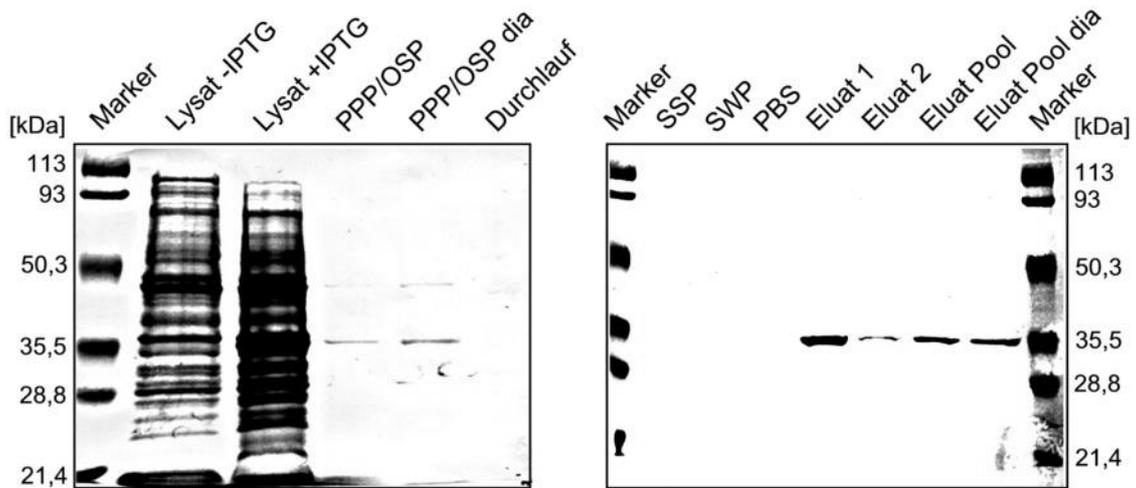


Abb. 21: Analyse der Reinigung des rekombinanten scFv-Fragments IIB6. SDS-PAGE-Analyse (10 %, Coomassie Brilliant Blue) der Expression und der nachfolgenden Reinigung des scFv-Fragments IIB6. Untersucht wurden bakterielle Zell-Lysate der mit IPTG induzierten (Lysat +IPTG) und nicht-induzierten (Lysat -IPTG) Kultur, das vereinigte periplasmatische Extrakt vor (PPP/OSP) und nach der Dialyse (PPP/OSP dia) gegen PBS sowie die einzelnen Fraktionen der Reinigung mittels IMAC (Durchlauf, Wasch-Fractionen SSP, SWP und PBS, Eluate 1 und 2, vereinigt Eluat, vereinigt Eluat nach der Dialyse gegen PBS).

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem mittels IMAC gereinigten Protein um das scFv-Fragment IIB6 handelte, wurden Zell-Lysate der induzierten und nicht-induzierten Kultur, die periplasmatischen Extrakte der induzierten Kultur sowie einige IMAC-Fractionen mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion des Antikörperfragments erfolgte mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Das scFv-Fragment IIB6 konnte sowohl im totalen Zell-Lysat und in den periplasmatischen Extrakten der mit IPTG induzierten Kultur als auch in den IMAC-Elutions-Fractionen nachgewiesen werden (Abb. 22).

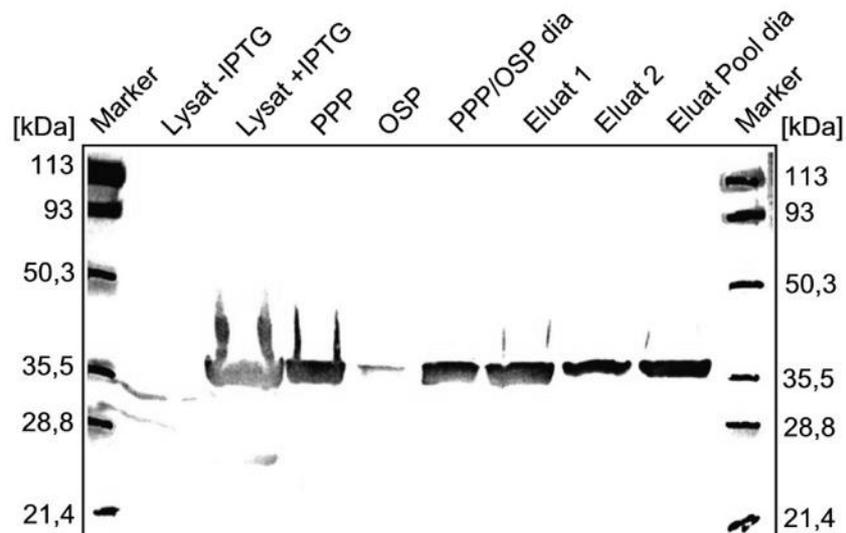


Abb. 22: Immunoblot-Analyse zum Nachweis des exprimierten und gereinigten scFv-Fragments IIB6. Untersucht wurden bakterielle Zell-Lysate der mit IPTG induzierten (Lysat +IPTG) und nicht-induzierten (Lysat -IPTG) Kultur, die periplasmatischen Extrakte PPP und OSP, das vereinigte periplasmatische Extrakt nach der Dialyse gegen PBS (PPP/OSP dia) und die IMAC-Elutions-Fractionen (Eluate 1 und 2, vereinigt Eluat nach der Dialyse gegen PBS). Die Proteine der einzelnen Präparationen und Fractionen wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran elektrotransferiert. Die Detektion des scFv-Fragments IIB6 erfolgte mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper.

4.7 Analyse der Spezifität des humanen rekombinanten *single chain Fv*-Antikörperfragments IIB6

Die Spezifität des humanen rekombinanten scFv-Fragments IIB6 sollte mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde das mittels IMAC gereinigte Antikörperfragment in ELISA-Bindungsstudien, einem Immunoblot und einer FACS-Analyse eingesetzt.

4.7.1 ELISA

In einer vorangegangenen ELISA-Bindungsstudie mit periplasmatischen Extrakten von mit IPTG induzierten Bakterienkulturen konnte bereits die Fähigkeit des scFv-Fragments IIB6 zur Bindung an BMA und synthetische MUC1-Peptide gezeigt werden (4.4.3, Abb. 18). In dieser

Untersuchung lag das bezüglich seiner Spezifität zu analysierende rekombinante Antikörperfragment jedoch nicht in gereinigter Form vor, denn die verwendete Präparation war durch eine Vielzahl von *E. coli*-Proteinen kontaminiert. Um einen Einfluss dieser Kontaminationen auf die Antigenbindungseigenschaften des scFv-Fragments IIB6 auszuschließen, wurde ein weiterer ELISA mit gereinigtem und in seiner Menge definiertem IIB6-Antikörperfragment durchgeführt (Abb. 23). Als Antigene dienten in dieser Bindungsstudie BMA, das synthetische MUC1-Glykopeptid 438+, das synthetische nicht-glykosylierte MUC1-Peptid 438- und das Cytosol von MUC1-positiven T47D-Zellen sowie als Negativkontrollen ein Kontrollpeptid und das Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten. Die verschiedenen Antigene wurden zunächst an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach dem Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit MPBS wurden definierte Mengen des scFv-Fragments IIB6 zugegeben. Als Positivkontrolle wurde mit dem monoklonalen Antikörper BM7 inkubiert. Das gebundene scFv-Fragment wurde mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziegenanti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Das Antikörperfragment IIB6 konnte in dieser Bindungsstudie sowohl an BMA als auch an die synthetischen MUC1-Peptide 438+ und 438- binden. Auch gegenüber dem Cytosol von T47D-Zellen war das scFv-Fragment reaktiv. In dieser Bindungsstudie zeigte das IIB6-Antikörperfragment, wie auch schon im ELISA mit periplasmatischen Extrakten (4.4.3, Abb. 18), eine mit dem monoklonalen Antikörper BM7 vergleichbare Reaktivität. Der murine BM7-Antikörper erkennt jedoch kein glykosyliertes Antigen. Es fiel auf, dass sich das ELISA-Signal bezüglich des Antigens BMA mit abnehmender Menge des eingesetzten Antikörperfragments signifikant verringerte, was bei den synthetischen MUC1-Peptiden 438+ und 438- nicht beobachtet wurde (Abb. 23).

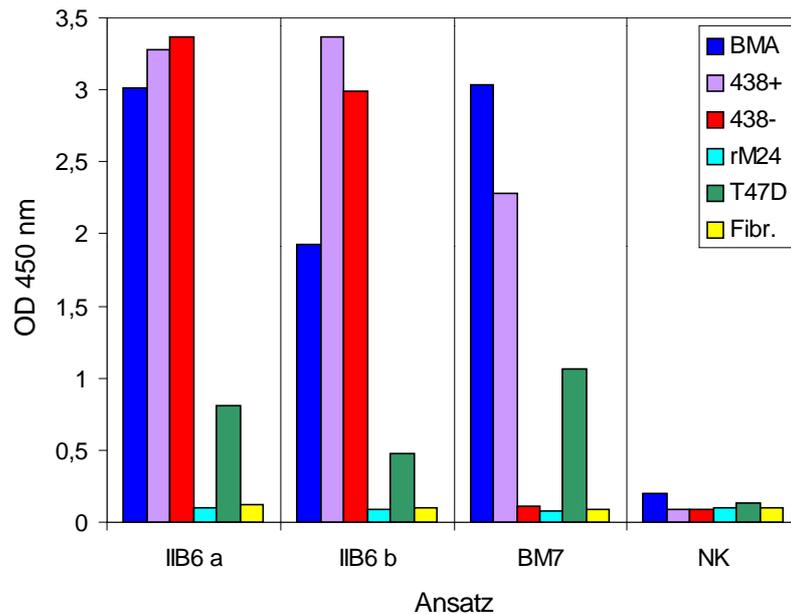


Abb. 23: ELISA zur Analyse der Spezifität des rekombinanten scFv-Fragments IIB6. Dargestellt ist die Antigenbindungsaktivität von 500 ng (IIB6 a) und 125 ng (IIB6 b) des rekombinanten Antikörperfragments IIB6. Der monoklonale Antikörper BM7 (12,5 ng) diente als Positivkontrolle. Die Antikörper wurden auf folgenden Antigenen getestet: BMA (ca. 100 ng); synthetisches MUC1-Glykopeptid 438+ (ca. 200 ng); synthetisches nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid 438- (ca. 200 ng); Cytosol von MUC1-positiven T47D-Zellen (ca. 2 µg Gesamtprotein); Kontrollpeptid rM24 (ca. 200 ng); Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten (Fibr., ca. 2 µg Gesamtprotein). Gebundene Antikörperfragmente wurden mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Als weitere Negativkontrolle wurde nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert (NK).

Die in diesem ELISA scheinbar unterschiedlich starke Bindung des scFv-Fragments an BMA und synthetische MUC1-Peptide (438+ und 438-) lässt sich nicht allein durch den Einsatz unterschiedlicher Antigen-Mengen, 100 ng BMA im Vergleich zu 200 ng synthetische MUC1-Peptide, erklären. Bei BMA handelt es sich um ein ca. 400 kDa großes Makromolekül, das aus T47D-Zellen präpariert und unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers BM7 affinitätschromatographisch gereinigt wurde und dadurch noch geringfügige Kontaminationen aufwies (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Die verwendeten Peptide hingegen haben eine molekulare Masse von ca. 1,5 kDa, sind synthetisch hergestellt und liegen in reiner Form vor. Um einen Hinweis auf die genaue Antigenbindungsaktivität des scFv-Fragments IIB6 gegenüber der beiden Antigene BMA und synthetisches MUC1-Glykopeptid bzw. -Peptid zu erhalten, sollte in einer weiteren ELISA-Bindungsstudie die Bindung des Antikörperfragments an näherungsweise gleiche Stoffmengen der beiden Antigene BMA und synthetisches MUC1-Peptid analysiert werden (Abb. 24). Zu diesem Zweck wurden verschiedene Stoffmengen (Konzentrationen von 0,5 nM bis 100 nM) der beiden Antigene BMA und 438- an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit

MPBS. Nach der Inkubation mit definierten Mengen (250, 100 und 25 ng) des scFv-Fragments IIB6 wurde das gebundene Antikörperfragment mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper nachgewiesen. Das scFv-Fragment IIB6 zeigte in diesem ELISA bis zu einer Antigenkonzentration von 25 nM eine ungefähr gleich starke Bindung an näherungsweise gleiche Stoffmengen der beiden Antigene BMA und synthetisches MUC1-Peptid (438-). Eine weitere Erhöhung der Antigenkonzentrationen (50 und 100 nM) führte bezüglich des Antigens 438- auch zu einer Erhöhung der ELISA-Signale, wohingegen bei dem Antigen BMA keine signifikante Signalverstärkung zu beobachten war (Abb 24).

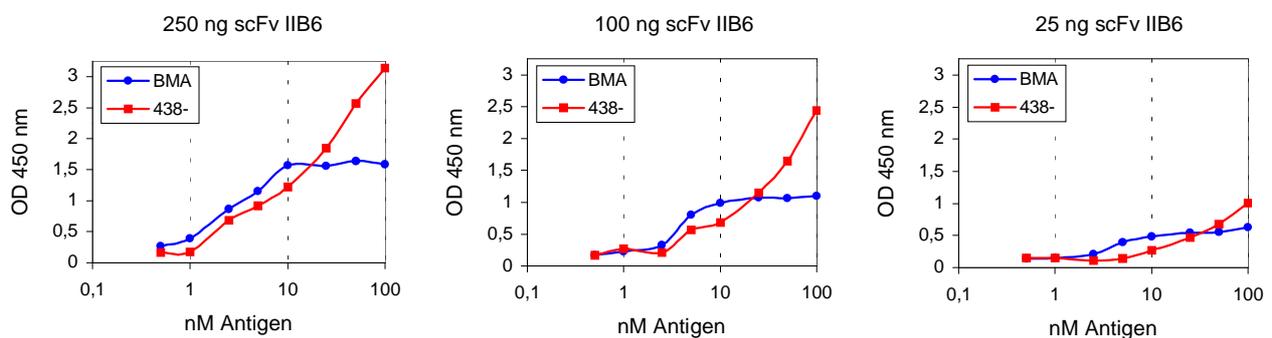


Abb. 24: Antigenbindungsaktivität des rekombinanten scFv-Fragments IIB6 in Abhängigkeit der Antigenkonzentration. Dargestellt ist die Bindung von 250, 100 und 25 ng des Antikörperfragments IIB6 an jeweils näherungsweise gleiche Stoffmengen (Konzentration in nM) der beiden Antigene BMA und synthetisches nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid (438-), wobei verschiedene Antigenkonzentrationen eingesetzt wurden. Das gebundene scFv-Fragment wurde mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper detektiert.

4.7.2 Immunoblot

Mit Hilfe eines Immunoblots sollte analysiert werden, ob das humane rekombinante scFv-Fragment IIB6 an denaturiertes MUC1 bindet. Als Antigene in dieser Studie dienten BMA und das Cytosol von Zellen der MUC1-positiven Mammakarzinom-Zelllinie T47D sowie als Negativkontrolle das Cytosol von MUC1-negativen Fibroblasten. Die in der BMA-Präparation und in den Cytosol-Präparationen enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose-Membranen elektrotransferiert. Die einzelnen Membranen wurden dann mit dem periplasmatischen Extrakt einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur des Klons IIB6 und mit gereinigtem scFv-Fragment IIB6 inkubiert. Als Positivkontrolle diente der monoklonale Antikörper BM7. Als Negativkontrolle wurde ein periplasmatisches Extrakt einer ebenfalls mit IPTG induzierten Bakterienkultur des Klons ,215' verwendet. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit dem

monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper und nachfolgend mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Das scFv-Fragment IIB6 zeigte in diesem Immunoblot ein mit dem monoklonalen Antikörper BM7 vergleichbares Bindungsmuster. Das IIB6-Antikörperfragment konnte sowohl an BMA als auch an im Cytosol von T47D-Zellen enthaltenes MUC1 binden (Abb. 25). Das unscharf erscheinende Färbemuster wird durch die Vielfalt der unterschiedlich stark glykosylierten MUC1-Isoformen hervorgerufen. Diese MUC1-Varianten haben aufgrund ihrer Glykosylierung eine molekulare Masse, die deutlich oberhalb der anhand der MUC1-Polypeptidsequenz errechneten molekularen Masse liegt. Die im Vergleich zu BMA schwächere Färbung gegenüber in T47D-Cytosol enthaltenem MUC1 ist auf eine geringere MUC1-Konzentration im T47D-Cytosol zurückzuführen, welches neben MUC1 eine Vielzahl von anderen Proteinen enthält. Dies scheint unter anderem ein Grund für die nur sehr schwache Anfärbung des in T47D-Cytosol enthaltenem MUC1 durch das periplasmatische Extrakt einer induzierten Bakterienkultur des Klons IIB6 gewesen zu sein, zumal das Antikörperfragment in dieser Periplasma-Präparation nur leicht angereinigt und zusammen mit kontaminierenden *E. coli*-Proteinen vorlag. Mit Hilfe dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das in diesem Nachweisverfahren als denaturiertes Antigen vorliegende MUC1-Molekül von dem scFv-Fragment IIB6 gebunden wird.

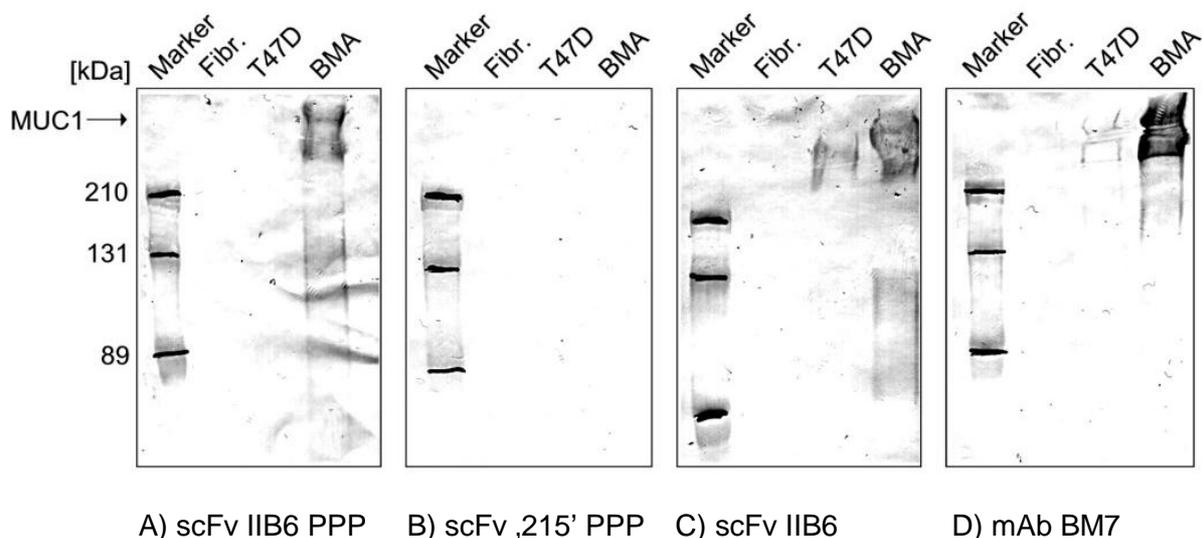


Abb. 25: Immunoblot zur Analyse der Bindungsaktivität des scFv-Fragments IIB6 bezüglich denaturiertem MUC1-Antigen. Proteine der BMA-Präparation (BMA), des Cytosols von MUC1-positiven T47D-Zellen (T47D) und des Cytosols von MUC1-negativen Fibroblasten (Fibr.) wurden mittels SDS-PAGE (7,5 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen elektrotransferiert. Die Membranen wurden anschließend mit folgenden Antikörpern inkubiert: A) periplasmatisches Extrakt einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur des Klons IIB6 (1:3-Verdünnung in MPBS); B) periplasmatisches Extrakt einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur des Klons ,215' als Negativkontrolle (1:3-Verdünnung in MPBS); C) gereinigtes scFv-Fragment IIB6 (5 µg/ml in MPBS); D) monoklonaler Antikörper BM7 als Positivkontrolle (5 µg/ml in MPBS). Die Detektion gebundener Antikörperfragmente (IIB6 und ,215') erfolgte mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Pfeil: Region, in der das durch die Glykosylierung unscharf wandernde MUC1-Antigen zu erwarten ist.

4.7.3 FACS-Analyse

Um zu testen, ob das scFv-Fragment IIB6 an natives MUC1 binden kann, wurde eine Analyse mit Hilfe eines *fluorescence activated cell sorters* (FACS) durchgeführt (Abb. 26). In diesem Nachweisverfahren wurden Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinie T47D verwendet, welche auf ihrer Oberfläche das tumorassoziierte Antigen MUC1 exprimieren. Als Negativkontrolle wurden MUC1-negative Fibroblasten verwendet. Zunächst wurden Zellsuspensionen beider Zelltypen mit dem Antikörperfragment IIB6 inkubiert. Der Nachweis der Antigenbindungsaktivität erfolgte anschließend mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper und nachfolgend mit einem Fluoreszenz-markierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden sowohl die T47D-Zellen als auch die Fibroblasten nur mit den Detektionsantikörpern inkubiert (B. Bartik, Universitätsfrauenklinik Heidelberg). Die Auswertung der FACS-Analyse zeigte, dass das scFv-Fragment IIB6 auch an natives, von T47D-Zellen präsentiertes MUC1 bindet, wobei 41,4 % der eingesetzten T47D-Zellen ein Fluoreszenzsignal zeigten (Abb. 26F). Die Reaktion war wahrscheinlich aufgrund der Monovalenz des Antikörperfragments geringer als bei einem bivalenten monoklonalen Antikörper zu erwarten.

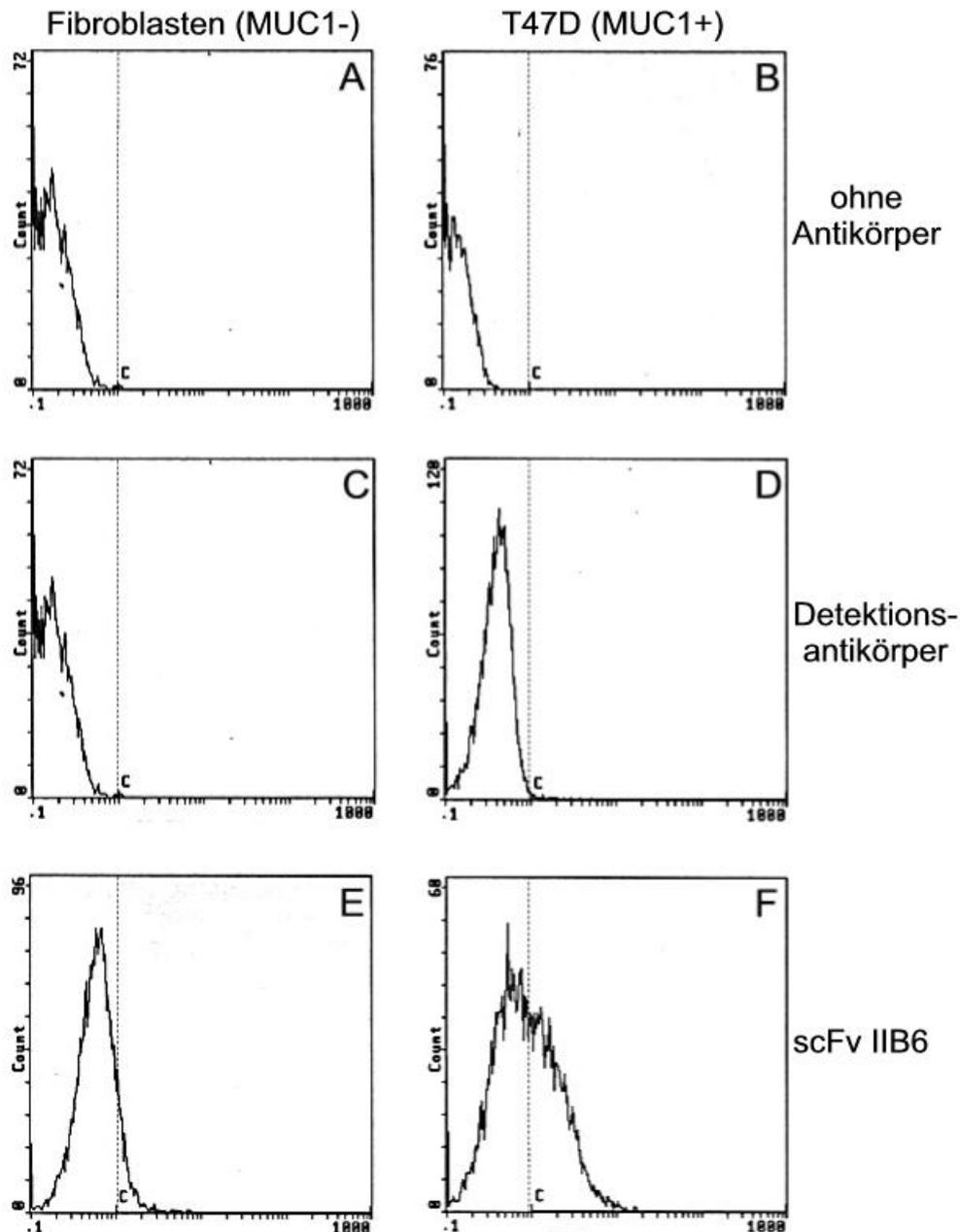


Abb. 26: FACS zur Analyse der Bindungsaktivität des scFv-Fragments IIB6 bezüglich nativem, zellgebundenem MUC1-Antigen (durchgeführt von B. Bartik, Universitätsfrauenklinik Heidelberg). Dargestellt ist die Bindung von 2 μg des gereinigten rekombinanten Antikörperfragments IIB6 an Zellen der MUC1-positiven Mammkarzinom-Zelllinie T47D. Als Negativkontrolle dienen MUC1-negative Fibroblasten. Gebundenes scFv-Fragment wurde mit dem monoklonalen anti-(His)₅-Antikörper in Kombination mit einem Fluoreszenz-markierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper detektiert. Folgende Reaktionen wurden durchgeführt: A) Fibroblasten (MUC1-) ohne Antikörper; B) T47D-Zellen (MUC1+) ohne Antikörper; C) Fibroblasten (MUC1-) und Detektionsantikörper; D) T47D-Zellen (MUC1+) und Detektionsantikörper; E) Fibroblasten (MUC1-) und scFv IIB6 und Detektionsantikörper; F) T47D-Zellen (MUC1+) und scFv IIB6 und Detektionsantikörper. Pro Ansatz wurden 2×10^5 Zellen verwendet.

4.8 Bestimmung des Epitops des humanen rekombinanten *single chain* Fv-Antikörperfragments IIB6

In den vorangegangenen Studien zur Analyse der Spezifität wurde gezeigt, dass sowohl denaturiertes als auch natives, zellgebundenes MUC1-Antigen von dem humanen rekombinanten scFv-Fragment IIB6 erkannt wird. Außerdem konnte das betreffende Antikörperfragment in ELISA-Bindungsstudien an synthetische glykosylierte und nicht-glykosylierte MUC1-Peptide binden, deren Aminosäuresequenz in den 20 Aminosäuren umfassenden *repeats* der VNTR-Region der extrazellulären Domäne von tumorassoziiertem MUC1 zu finden ist. Somit ist gezeigt, dass die antigene Determinante des IIB6-Antikörperfragments in der VNTR-Region von MUC1 liegt. Das scFv-Fragment IIB6 wurde zur Bestimmung seines Epitops auf den synthetischen Peptiden, und damit auch auf dem MUC1-Antigen, für eine Inkubation mit überlappenden (Glyko-) Peptiden der VNTR-Region eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde ein Nitrocellulose-Membranstreifen, auf dem sich 20 15mer-(Glyko-) Peptide mit einem Versatz von einer Aminosäure sowie ein zu diesen reverses 15mer-Glykopeptid als Kontrolle befanden, mit dem Antikörperfragment IIB6 inkubiert. Für die Detektion des gebundenen Antikörperfragments wurde der monoklonale, HRP-konjugierte anti-(His)₅-Antikörper verwendet. Abb. 27 zeigt das Ergebnis dieser Bindungsstudie auf (Glyko-) Peptiden der VNTR-Region von MUC1. Das humane Antikörperfragment IIB6 war mit elf der insgesamt 20 verwendeten (Glyko-) Peptide reaktiv. Dadurch konnte die Abfolge der für die Bindung des scFv-Fragments IIB6 essentiellen Aminosäuren auf den (Glyko-) Peptiden bestimmt werden (Abb. 28). Das Epitop des IIB6-Antikörperfragments umfasste die Aminosäuren TRPAP, wobei der Threonin-Rest in dieser Studie mit N-Acetylgalaktosamin glykosyliert war. In vorangegangenen ELISA-Bindungsstudien konnte eine Bindung des betreffenden scFv-Fragments an nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid nachgewiesen werden (Abb. 18, 23 und 24), was zeigt, dass die Glykosylierung am Threonin-Rest für die Bindung des scFv-Fragments IIB6 an das fünf Aminosäure umfassende Epitop in der VNTR-Region von MUC1 offenbar nicht notwendig ist, aber auch keinen störenden Einfluss hat.



Abb. 27: Bestimmung des Epitops des humanen rekombinanten scFv-Fragments IIB6. Das humane Antikörperfragment IIB6 (1 µg/ml in MPBS) wurde mit auf einem Nitrocellulose-Membranstreifen befindlichen (Glyko-) Peptiden der VNTR-Region von MUC1 inkubiert. Die 20 15mer-(Glyko-) Peptide (Nr. 1 bis Nr. 20) hatten einen Versatz von einer Aminosäure und deckten die 20 Aminosäure umfassende VNTR-Region des MUC1-Antigens ab. Als Negativkontrolle befand sich ein reverses Glykopeptid (Nr. 21) auf dem Membranstreifen. Die Detektion des gebundenen scFv-Fragments erfolgte mit dem monoklonalen, HRP-konjugierten anti-(His)₅-Antikörper.

Nr.	(Glyko-) Peptidsequenz																																					
VNTR	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	X	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D				
14	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	X																							
15		T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	X	R																						
16			A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	X	R	P																					
17				P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	X	R	P	A																				
18					P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	X	R	P	A	P																			
19						A	H	G	V	T	S	A	P	D	X	R	P	A	P	G																		
20							H	G	V	T	S	A	P	D	X	R	P	A	P	G	S																	
1								G	V	T	S	A	P	D	X	R	P	A	P	G	S	T																
2									V	T	S	A	P	D	X	R	P	A	P	G	S	T	A															
3										T	S	A	P	D	X	R	P	A	P	G	S	T	A	P														
4											S	A	P	D	X	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P													
5												A	P	D	X	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A												
6													P	D	X	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H											
7														D	X	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G										
8															X	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V									
9																R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T								
10																	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S							
11																		A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A						
12																			P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P					
13																					G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D			

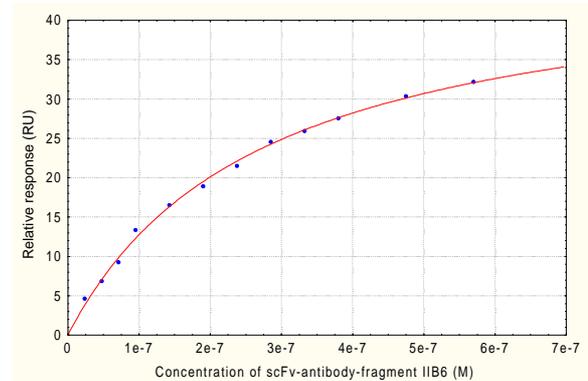
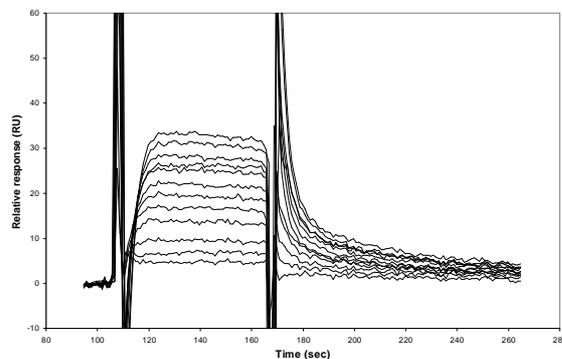
Abb. 28: Auswertung der Epitopkartierung des humanen rekombinanten scFv-Fragments IIB6. Dargestellt sind die Sequenzen der für die Bestimmung des Epitops des Antikörperfragments IIB6 verwendeten (Glyko-) Peptide. Die Sequenzen der mit dem scFv-Fragment IIB6 reaktiven Glykopeptide sind grau unterlegt (Abb. 25), die das potentielle Epitop umfassenden Aminosäuren sind eingerahmt. VNTR: Sequenz der VNTR-Region von MUC1, wobei die Aminosäuren eines einzigen *repeats* unterstrichen sind; X: T-GalNAc (Threonin mit N-Acetylgalaktosamin glykosyliert).

4.9 Bestimmung der Affinitäten des humanen rekombinanten *single chain Fv*-Antikörperfragments IIB6

Mit Hilfe des Standardverfahrens der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface plasmon resonance*, SRP) unter Verwendung eines BIAcore 2000-Gerätes wurden die Wechselwirkungen des humanen Antikörperfragments IIB6 mit BMA sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid untersucht. Außerdem wurden als Kontrolle die Wechselwirkungen des monoklonalen Antikörpers BM7 mit MUC1 sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid analysiert. Diese Untersuchungen zur Bestimmung der Affinitäten des Antikörperfragments

IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 zu den beiden Antigenen BMA und synthetisches MUC1-Glykopeptid wurden extern durchgeführt (Dr. Specht, Fa. Inventus Biotec, Münster). Für die Bestimmung der Affinitäten der beiden Antikörper zum MUC1-Antigen wurde zunächst biotinyliertes BMA auf einem Streptavidin-Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an scFv-Fragment IIB6 und monoklonalem Antikörper BM7 über die Sensoroberfläche geleitet, wobei mit jedem Antikörper zwei Messungen durchgeführt wurden. Die generierten Signale korrelierten mit den jeweils eingesetzten Konzentrationen des Antikörperfragments IIB6 (Abb. 29) bzw. des monoklonalen Antikörpers BM7 (Abb. 30). Mit Hilfe der in den Messungen ermittelten Daten konnten die Affinitäten des Antikörperfragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 zu immobilisiertem BMA bestimmt werden (Tab. 3).

A) Messung 1



B) Messung 2

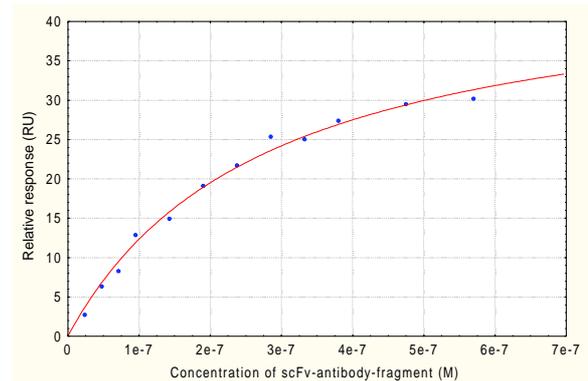
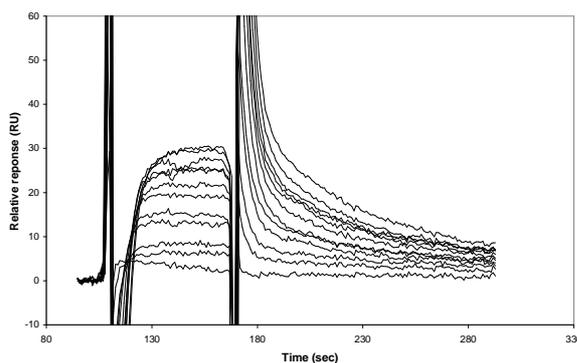
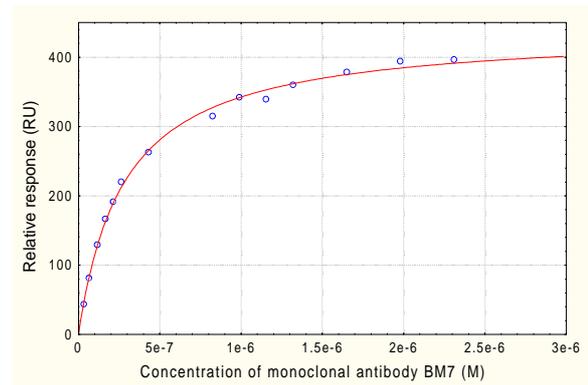
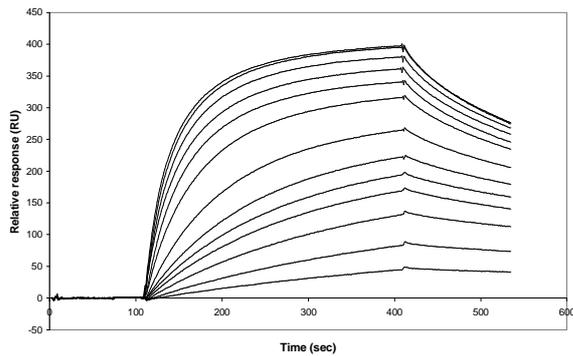


Abb. 29: BIAcore-Messungen zur Analyse der Wechselwirkung des humanen scFv-Fragments IIB6 mit immobilisiertem BMA (durchgeführt von Dr. Specht, Fa. Inventus Biotec, Münster). Dargestellt sind die Overlap-Plots (links) der zwei BIAcore-Messungen sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung (rechts). In beiden Overlap-Plots sind 12 Sensorgramme dargestellt, welche die Assoziation und Dissoziation des scFv-Fragments IIB6 bei verschiedenen scFv-Konzentrationen zeigen. Folgende Konzentrationen an Antikörperfragment wurden eingesetzt (von unten nach oben): 24 nM, 48 nM, 71 nM, 95 nM, 143 nM, 190 nM, 238 nM, 285 nM, 333 nM, 380 nM, 475 nM, 570 nM. Menge an immobilisiertem BMA: 43,8 pg (A), 43,9 pg (B). Die beiden grafischen Auswertungen zeigen die am Ende der Assoziationsphase der jeweiligen Messung erhaltenen Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an scFv-Fragment.

A) Messung 1



B) Messung 2

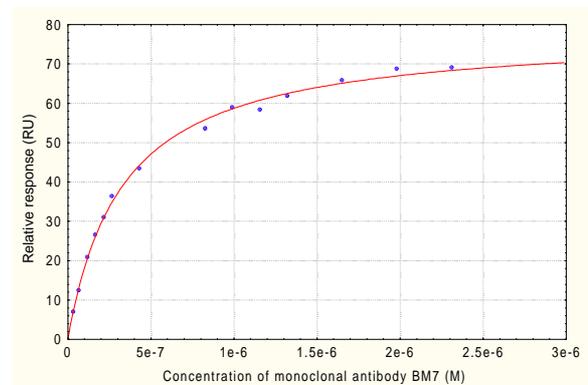
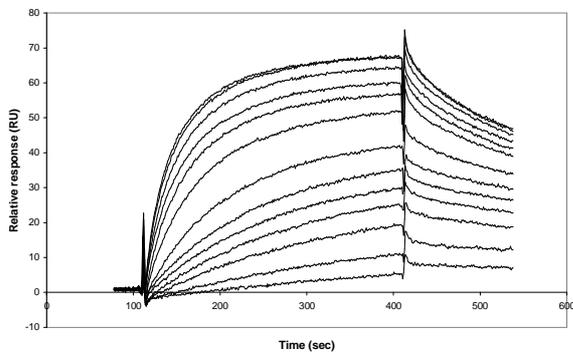


Abb. 30: BIAcore-Messungen zur Analyse der Wechselwirkung des monoklonalen Antikörpers BM7 mit immobilisiertem BMA (durchgeführt von Dr. Specht, Fa. Inventus Biotech, Münster). Dargestellt sind die Overlap-Plots (links) von zwei BIAcore-Messungen sowie die jeweils dazugehörige grafische Auswertung (rechts). In beiden Overlap-Plots sind 13 Sensorgramme dargestellt, welche die Assoziation und Dissoziation des monoklonalen Antikörpers BM7 bei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen zeigen. Folgende Konzentrationen an Antikörper wurden verwendet (von unten nach oben): 33 nM, 66 nM, 116 nM, 165 nM, 215 nM, 264 nM, 430 nM, 825 nM, 1155 nM, 1320 nM, 1650 nM, 1980 nM, 2310 nM. Menge an immobilisiertem BMA: 95,9 pg (A), 19,2 pg (B). Die beiden grafischen Auswertungen zeigen die am Ende der Assoziationsphase der jeweiligen Messung erhaltenen Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an BM7-Antikörper.

Tab. 3: Affinitäten für die Interaktionen des scFv-Fragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 mit BMA (bestimmt von Dr. Specht, Fa. Inventus Biotech, Münster). Dargestellt sind die mit Hilfe von BIAcore-Messungen ermittelten Affinitäten des Antikörperfragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 zu immobilisiertem BMA. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte von jeweils zwei Messungen. K_A : Affinitätskonstante; K_D : Dissoziationskonstante.

Antikörper	K_A [1/M]	K_D [M]
scFv IIB6	$3,65 \times 10^6$	$2,75 \times 10^{-7}$
mAb BM7	$3,29 \times 10^6$	$3,06 \times 10^{-7}$

Für die Bestimmung der Affinitäten des scFv-Fragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 zu synthetischem MUC1-Glykopeptid wurde das MUC1-Glykopeptid 454* über seine C-terminale Aminosäure Cystein kovalent auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an scFv-Fragment IIB6

und monoklonalem Antikörper BM7 über die Sensoroberfläche geleitet. Die generierten Signale korrelierten mit den jeweils eingesetzten Konzentrationen des Antikörperfragments IIB6 (Abb. 31) bzw. des monoklonalen Antikörpers BM7 (Abb. 32). Mit Hilfe der in den Messungen ermittelten Daten konnten die Affinitäten des Antikörperfragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 zu immobilisiertem MUC1-Glykopeptid 454* bestimmt werden (Tab. 4).

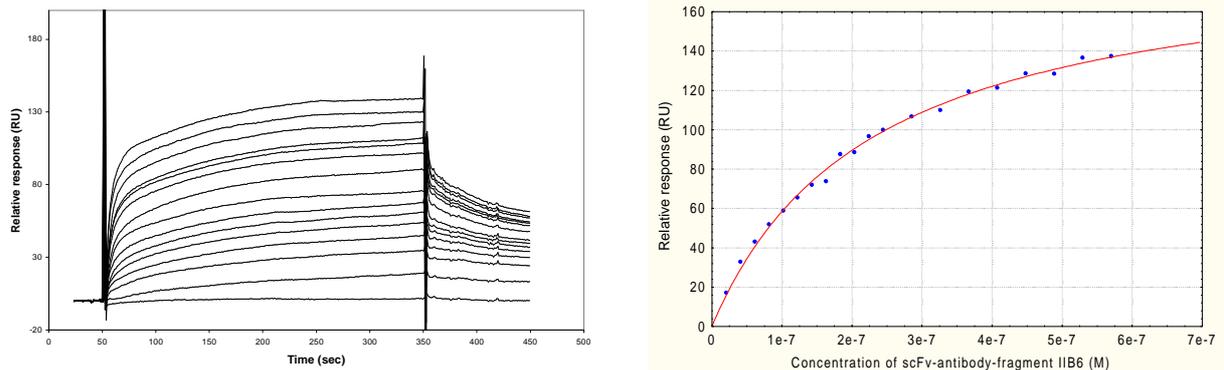


Abb. 31: BIAcore-Messung zur Analyse der Wechselwirkung des humanen scFv-Fragments IIB6 mit immobilisiertem MUC1-Glykopeptid 454* (durchgeführt von Dr. Specht, Fa. Inventus Biotec, Münster). Dargestellt ist der Overlap-Plot (links) der BIAcore-Messung sowie die dazugehörige grafische Auswertung (rechts). In dem Overlap-Plot sind 15 Sensorgramme dargestellt, welche die Assoziation und Dissoziation des scFv-Fragments IIB6 bei verschiedenen scFv-Konzentrationen zeigen. Folgende Konzentrationen an Antikörperfragment wurden verwendet (von unten nach oben): 20 nM, 41 nM, 61 nM, 81 nM, 102 nM, 122 nM, 163 nM, 204 nM, 224 nM, 244 nM, 285 nM, 326 nM, 407 nM, 489 nM, 570 nM. Die grafische Auswertung zeigt die am Ende der Assoziationsphase erhaltenen Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an scFv-Fragment.

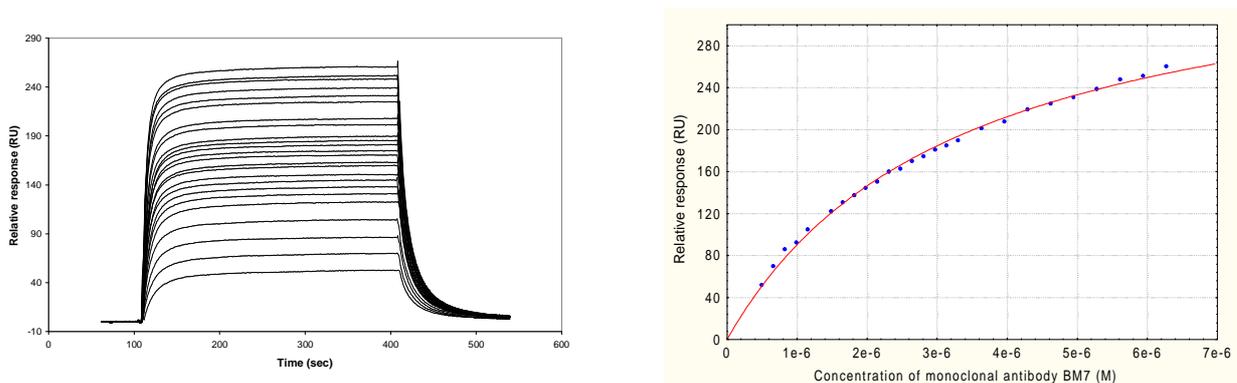


Abb. 32: BIAcore-Messung zur Analyse der Wechselwirkung des monoklonalen Antikörpers BM7 mit immobilisiertem MUC1-Glykopeptid 454* (durchgeführt von Dr. Specht, Fa. Inventus Biotec, Münster). Dargestellt ist der Overlap-Plot (links) der BIAcore-Messung sowie die dazugehörige grafische Auswertung (rechts). In dem Overlap-Plot sind 23 Sensorgramme dargestellt, welche die Assoziation und Dissoziation des monoklonalen Antikörpers BM7 bei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen zeigen. Folgende Konzentrationen an Antikörper wurden eingesetzt (von unten nach oben): 495 nM, 660 nM, 825 nM, 1490 nM, 1650 nM, 1820 nM, 1980 nM, 2150 nM, 2310 nM, 2480 nM, 2640 nM, 2810 nM, 2970 nM, 3140 nM, 3300 nM, 3630 nM, 3960 nM, 4620 nM, 4950 nM, 5280 nM, 5610 nM, 5940 nM, 6270 nM. Die grafische Auswertung zeigt die am Ende der Assoziationsphase erhaltenen Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an BM7-Antikörper.

Tab. 4: Affinitäten für die Interaktionen des scFv-Fragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 mit synthetischem MUC1-Glykopeptid (bestimmt von Dr. Specht, Fa. Inventus Biotec, Münster). Dargestellt sind die mit Hilfe von BIAcore-Messungen ermittelten Affinitäten des Antikörperfragments IIB6 und des monoklonalen Antikörpers BM7 zu immobilisiertem MUC1-Glykopeptid 454*. K_A : Affinitätskonstante; K_D : Dissoziationskonstante.

Antikörper	K_A [1/M]	K_D [M]
scFv IIB6	$4,38 \times 10^6$	$2,28 \times 10^{-7}$
mAb BM7	$3,06 \times 10^5$	$3,27 \times 10^{-6}$

5 Diskussion

Das transmembrane Glykoprotein MUC1 wird im Drüsengewebe verschiedener Organe normalerweise auf der apikalen Oberfläche von Epithelzellen exprimiert (Zotter *et al.*, 1988). Die extrazelluläre Domäne von MUC1 ist stark glykosyliert und besteht hauptsächlich aus einem als VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Region bezeichneten Abschnitt mit Wiederholungsdomänen aus einer Abfolge von 20 Aminosäuren (Gendler *et al.*, 1988, 1990; Stadie *et al.*, 1995). In Adenokarzinomen, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, wird MUC1 mit einer veränderten, weniger starken Glykosylierung auf der gesamten Oberfläche der Epithelzellen überexprimiert (Burchell *et al.*, 1987; Zotter *et al.*, 1988; Girling *et al.*, 1989; Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999). Das veränderte Glykosylierungsmuster von tumorassoziiertem MUC1 lässt neue antigene Determinanten auf Basis der Peptidsequenz und der unterschiedlichen Zuckerzusammensetzung entstehen. Aufgrund seiner im Vergleich zu normalem MUC1 veränderten Eigenschaften stellt tumorassoziiertes MUC1 ein vielversprechendes Zielantigen für eine passive oder aktive Immuntherapie des Mammakarzinoms oder anderer Adenokarzinome dar (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000a).

Mit Hilfe der Hybridom-Technologie (Köhler und Milstein, 1975) konnte bereits eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern gewonnen werden, die gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtet sind und für die Tumordiagnostik verwendet werden (Prize *et al.*, 1998; Xing *et al.*, 2001). Ein therapeutischer Einsatz dieser monoklonalen Maus-Antikörper im Rahmen einer passiven Immuntherapie des Mammakarzinoms oder anderer Adenokarzinome ist jedoch problematisch, da das menschliche Immunsystem wenige Tage nach deren systemischer Applikation humane anti-Maus-Antikörper (*human anti-mouse antibody (HAMA) response*) bilden würde, was die Neutralisation der verabreichten Maus-Antikörper zur Folge hätte (DeNardo *et al.*, 1997).

Mit Hilfe des Phagendisplays können die Limitierungen der Hybridoma-Technologie überwunden werden. Ausgehend von Blut humaner SpenderInnen wurden rekombinante Antikörpergenbibliotheken generiert, aus denen in einem als Panning bezeichneten Vorgang humane Antikörperfragmente gegen ein beliebiges Antigen selektiert werden können (Winter und Milstein, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1992, 1998; Winter *et al.*, 1994). So konnten mit Hilfe des Phagendisplays erstmals humane Antikörperfragmente aus Antikörpergenbibliotheken isoliert werden, die gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtet sind. Die hierfür verwendeten humanen Antikörpergenbibliotheken wurden aus dem Blut nicht-immunisierter, gesunder SpenderInnen generiert (Vaughan *et al.*, 1996; Henderikx *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999). Auf der Basis eines so isolierten Fab-Fragments konnte ein vollständiger und komplett

humaner IgG-Antikörper hergestellt werden, der spezifisch tumorassoziertes MUC1 bindet und somit ein potentielles Agens für eine zielgerichtete Therapie von MUC1-überexprimierender Adenokarzinome darstellt (Henderikx *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten humane rekombinante Antikörperfragmente gegen die VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1 gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst humane Antikörpergenbibliotheken aus dem Blut von Mammakarzinom-Patientinnen, die mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisiert worden waren, hergestellt.

5.1 Konstruktion der humanen Antikörpergenbibliotheken

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung der humanen Antikörpergenbibliotheken stand Blut von insgesamt sieben Mammakarzinom-Patientinnen zur Verfügung, die im Rahmen eines Heilversuches mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisiert worden waren. Diese Patientinnen waren zu Beginn dieses Heilversuches von einem metastasierten Mammakarzinom betroffen. Das für die Immunisierungen verwendete Glykopeptid wurde synthetisch hergestellt und hatte die Aminosäuresequenz APDT(GalNAc)RPAPGSTAPPA, wobei ein Threoninrest mit N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) glykosyliert war. Somit repräsentierte es die VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1. Die Patientinnen erhielten jeweils mehrere Immunisierungen mit dieser synthetisch hergestellten Vakzine (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung), um Antikörper gegen tumorassoziertes MUC1 zu induzieren. Dabei sollten die Patientinnen durch die wiederholte Applikation des synthetischen MUC1-Glykopeptids im Rahmen einer humoralen Immunantwort verstärkt IgG-Antikörper gegen die verabreichte Vakzine bilden (Janeway und Travers, 1997).

Im Rahmen mehrerer klinischer Studien wurde eine auf MUC1-Peptiden basierende Vakzinierung erprobt. Dabei wurden von einem Mammakarzinom oder einem anderen Adenokarzinom betroffene PatientInnen mit synthetischen MUC1-Peptiden unterschiedlicher Länge immunisiert, wobei die MUC1-Peptide die VNTR-Region repräsentierten und mit einem Adjuvans konjugiert waren, um die Immunantwort der PatientInnen gegenüber der verabreichten Vakzine zu verstärken (Xing *et al.*, 1995; Goydos *et al.*, 1996; Karanikas *et al.*, 1997; Reddish *et al.*, 1998; Adluri *et al.*, 1999; Gilewski *et al.*, 2000; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000b). In einigen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass Immunisierungen mit synthetischen MUC1-Peptiden in den PatientInnen hohe MUC1-spezifische IgG-Antikörpertiter induzierten. Die für diese Vakzinierungen verwendeten MUC1-Peptide

bestanden aus 30, 33, 100 oder 106 Aminosäuren (Karanikas *et al.*, 1997; Adluri *et al.*, 1999; Gilewski *et al.*, 2000; von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000b).

Das in dem Heilversuch verwendete MUC1-Glykopeptid war kovalent mit dem Adjuvans KLH konjugiert. Die sieben für diese Arbeit relevanten Patientinnen erhielten jeweils mehrere Immunisierungen mit der synthetisch hergestellten und mit KLH konjugierten Vakzine. Die Entwicklung der Antikörpertiter in den Patientinnen wurde mit Hilfe von ELISAs untersucht. In allen Patientinnen wurden durch die Immunisierungen IgG- und IgM-Antikörper induziert, die an die für die Vakzinierungen verwendeten Komponenten, synthetisches MUC1-Glykopeptid und KLH, binden konnten. Diese induzierten Antikörper zeigten jedoch keine Reaktivität gegenüber dem Brust-Mucin-Antigen (BMA) (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). BMA wurde aus der MUC1-exprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie T47D präpariert und unter Verwendung des MUC1-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers BM7 affinitätschromatographisch gereinigt. BMA stellte somit tumorassoziertes MUC1 dar (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Dass die durch die Immunisierungen induzierten und mit dem synthetischen MUC1-Glykopeptid reaktiven IgG- und IgM-Antikörper im Serum der immunisierten Patientinnen in ELISAs keine Bindung an tumorassoziertes MUC1 zeigten, könnte mit der Länge des für die Immunisierungen verwendeten MUC1-Glykopeptids zusammenhängen. Dieses bestand aus einer Abfolge von insgesamt 15 Aminosäuren und repräsentierte damit nur einen Teil eines einzigen *repeats* der VNTR-Domäne von tumorassoziertem MUC1. Die VNTR-Domäne als immundominante Region von tumorassoziertem MUC1 nimmt in synthetischen Peptiden ihre native Konformation jedoch erst ab einer Länge von mehr als zwei *repeats* an. Mehrere *repeats* sorgen für eine erhöhte Stabilität dieser nativen Konformation in synthetischen MUC1-Peptiden (Fontenot *et al.*, 1993, 1995). In einer anderen Studie wurden 16 von einem metastasierten Mammakarzinom betroffene Patientinnen mit einem aus 16 Aminosäuren bestehenden MUC1-Peptid immunisiert. Das Peptid repräsentierte die VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1 und war mit KLH sowie einem weiteren Adjuvans konjugiert. Nur drei der insgesamt 16 vakzinieren Mammakarzinom-Patientinnen entwickelten geringe MUC1-spezifische IgG-Antikörpertiter (Reddish *et al.*, 1998). Die Länge, d.h. die Anzahl der *repeats*, des applizierten MUC1-(Glyko-) Peptids scheint daher von großer Bedeutung für die Induktion von gegen tumorassoziertes MUC1 gerichteten IgG- und IgM-Antikörpern zu sein.

Wie bereits diskutiert, konnten im Serum der sieben im Rahmen eines Heilversuches mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Mammakarzinom-Patientinnen keine Antikörper nachgewiesen werden, die an tumorassoziertes MUC1 binden. Es ist jedoch theoretisch möglich, dass ein geringer Anteil der in diesen Patientinnen durch die Vakzinierungen induzierten Antikörper spezifisch an tumorassoziertes MUC1 bindet und

dass diese Antikörper serologisch unter Verwendung konventioneller ELISAs nicht detektiert werden konnten. Mit Hilfe der Phagendisplay-Technologie (Winter und Milstein, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1992, 1998; Winter *et al.*, 1994) sollte es möglich sein, diese eventuell vorhandenen Antikörper, die spezifisch an tumorassoziiertes MUC1 binden, zu selektieren.

Da durch die MUC1-Glykopeptid-Immunisierungen nachweislich eine starke humorale Immunantwort mit der Bildung von IgG-Antikörpern in den Patientinnen ausgelöst wurde, sollten scFv-Antikörpergenbibliotheken auf der Basis von γ -Ketten aus den aktivierten B-Zellen dieser Patientinnen für ein Phagendisplay-*screening* generiert werden. Alle Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme hohe MUC1-Glykopeptid-spezifische IgG-Antikörpertiter (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Nach der Isolierung der peripheren Lymphozyten einer jeden Patientin konnte aus diesen die mRNA präpariert werden. Die mRNA wurde mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als *template* für die PCR-Amplifikation der für die variablen schweren und variablen leichten Antikörperketten (VH und VL) kodierenden Gene. Dabei konnten unter Verwendung von zwei Primersätzen (Rohrbach, 2000) die für die variablen Regionen kodierenden Gene der γ -, κ - und λ -Ketten amplifiziert werden. Die für die VH (γ) und VL (κ und λ) kodierenden Gene wurden anschließend in das Phagemid pSEX81 kloniert (Welschhof *et al.*, 1997). In dem Phagemid pSEX81 konnten zwei Einzelpatientinnenbibliotheken und zwei Mischbibliotheken hergestellt werden. Die beiden Einzelpatientinnenbibliotheken enthielten die für die variablen Antikörperketten kodierenden Gene der Patientin S, wobei eine Bibliothek die VH- und VL κ -Gene enthielt (Antikörpergenbibliothek pSEX81-S-VH/VL κ), während die andere Bibliothek aus den VH- und VL λ -Genen bestand (Antikörpergenbibliothek pSEX81-S-VH/VL λ). Die Komplexität dieser beiden Bibliotheken, d.h. die Anzahl unabhängiger Kolonien nach der Klonierung, betrug $1,2 \times 10^5$ für die κ -Bibliothek und $1,4 \times 10^5$ für die λ -Bibliothek. Die beiden Mischbibliotheken bestanden aus den für die variablen Antikörperketten kodierenden Genen der sechs übrigen mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Mammakarzinom-Patientinnen, wobei analog zu den beiden Einzelpatientinnenbibliotheken die VL κ - und VL λ -Gene voneinander getrennt in die vorher generierte VH-Subbibliothek kloniert wurden (Antikörpergenbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ). Die Komplexität der beiden Mischbibliotheken betrug $6,5 \times 10^5$ für die κ -Bibliothek und $1,7 \times 10^6$ für die λ -Bibliothek.

Die für die VL κ - und VL λ -Ketten kodierenden Gene wurden voneinander getrennt kloniert, um eine genauere genetische Analyse der in den Patientinnen durch die Immunisierungen induzierten IgG-Antikörper während des später durchgeführten Phagendisplay-*screenings* zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, aus Patientinnen, die nach MUC1-Glykopeptid-Immunisierungen nachweislich hohe MUC1-Glykopeptid-spezifische IgG-

Antikörpertiter hatten, eventuell vorhandene Antikörperfragmente zu selektieren, die sowohl synthetisches MUC1-Peptid als auch tumorassoziiertes MUC1 spezifisch binden. Da von B-Lymphozyten aus dem Blut immunisierter Spenderinnen ausgegangen wurde, erschienen die Komplexitäten der hergestellten Antikörpergenbibliotheken ausreichend, um die gewünschten rekombinanten Antikörperfragmente zu isolieren (Breitling und Dübel, 1997), zumal die für die VL κ - und VL λ -Ketten kodierenden Gene bei der Herstellung der Bibliotheken getrennt voneinander kloniert worden waren.

5.2 Screening der humanen Antikörpergenbibliotheken

Die vier humanen Antikörpergenbibliotheken wurden für ein Panning auf BMA, das tumorassoziiertes MUC1 repräsentierte, und auf synthetischen MUC1-Glykopeptiden der VNTR-Region von MUC1 eingesetzt, um humane Antikörperfragmente zu selektieren, die spezifisch die VNTR-Region von tumorassoziiertem MUC1 binden.

Die beiden Einzelpatientinnenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ , die aus dem Blut der mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid der VNTR-Region von MUC1 immunisierten Mammakarzinom-Patientin S generiert worden waren, wurden für jeweils drei Panningrunden auf BMA und auf dem synthetischen MUC1-Glykopeptid 506 eingesetzt. Dabei wurden die beiden Bibliotheken für jede einzelne Panningrunde mit dem Hyperphagen verpackt (Rondot *et al.*, 2001). Bei dem Hyperphagen handelt es sich um einen Phagen, der kein funktionelles pIII-Gen besitzt, aber aufgrund seines Wildtyp-pIII-Phänotyps in der Lage ist, F-Pili exprimierende *E. coli*-Bakterien zu infizieren. Hyperphagen werden von der *E. coli*-Zelllinie DH5 α /pIII [M13KO7 Δ pIII] produziert, in deren Genom das für den Wildtyp-pIII-Phänotyp des Hyperphagen notwendige pIII-Gen integriert ist. Wird der Hyperphage für die Verpackung von einer in einem Phagemid vorliegenden scFv-Antikörpergenbibliothek verwendet, entstehen rekombinante Phagenpartikel, die mehrere scFv-Fragmente jeweils in Fusion mit einem pIII-Protein auf ihrer Oberfläche tragen. Im Gegensatz zur Verwendung von konventionellem M13KO7-Helferphagen wird das pIII-Protein alleine nicht präsentiert, da die einzige Quelle für das pIII-Protein das im Phagemid kodierte scFv-pIII-Fusionsprotein ist. Durch den Einsatz von Hyperphagen bei der Verpackung von scFv-Antikörpergenbibliotheken wird daher, im Vergleich zur Verwendung von konventionellen M13KO7-Helferphagen, die Antigenbindungsaktivität jedes einzelnen rekombinanten Phagenantikörper-Partikels während eines Pannings erhöht. Diese Eigenschaft von Hyperphagen bei der Verpackung von Antikörpergenbibliotheken lässt sich genau dann nutzen, wenn zu erwarten ist, dass die Anzahl potentieller für das gewünschte Antigen

spezifischer Antikörperklone in einer Antikörpergenbibliothek sehr gering ist (Rondot *et al.*, 2001). Dies war der Fall bei den zu analysierenden Einzelpatientinnenbibliotheken pSEX81-S-VH/VL κ und pSEX81-S-VH/VL λ , wie auch bei den beiden Mischbibliotheken pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ .

Beide Einzelpatientinnenbibliotheken wurden aus dem Blut der Patientin S generiert, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen sehr hohen, gegen das für die Immunisierungen verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid gerichteten IgG-Antikörpertiter hatte. Im Serum dieser Patientin konnten jedoch keine IgG-Antikörper mit spezifischer Bindung an tumorassoziiertes MUC1 mittels konventioneller ELISAs detektiert werden (Dr. Kaul, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, persönliche Mitteilung). Auch nach drei Panningrunden auf BMA, das tumorassoziiertes MUC1 darstellte, konnten keine BMA-spezifischen scFv-Fragmente tragenden Phagen aus den beiden Einzelpatientinnenbibliotheken angereichert werden. Eine Anreicherung von Phagenantikörpern mit spezifischer Bindung an das für die Immunisierungen verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid aus diesen beiden Bibliotheken konnte, wie erwartet, erzielt werden. Die durch ein Panning auf synthetischem MUC1-Glykopeptid angereicherten Phagenantikörper zeigten in polyklonalen Phagen-ELISA-Bindungsstudien eine zum Teil sehr starke Bindung an das für das Panning verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid, das zugleich auch einen Teil des für die Immunisierungen der Patientin S verwendeten synthetischen MUC1-Glykopeptids der VNTR-Region repräsentierte. Diese so angereicherten Phagenantikörper konnten jedoch in polyklonalen Phagen-ELISAs nicht an tumorassoziiertes MUC1 (BMA) binden.

Auffallend war, dass aus der λ -Bibliothek bereits nach der ersten Panningrunde auf dem synthetischen MUC1-Glykopeptid 506 solche Phagenantikörper selektiert wurden, die eine starke maximale Bindungsaktivität gegenüber diesem Glykopeptid aufwiesen. Aus der κ -Bibliothek hingegen konnten erst nach drei Panningrunden auf dem Glykopeptid 506 Phagenantikörper mit einer signifikanten MUC1-Glykopeptid-spezifischen Bindung angereichert werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die meisten der durch die MUC1-Glykopeptid-Immunisierung in der Patientin S induzierten und mit diesem Glykopeptid reaktiven IgG-Antikörper leichte Ketten des λ -Typs besitzen könnten. Aber auch Probleme bei der korrekten Faltung von humanen leichten Antikörperketten des λ -Typs im Vergleich zu humanen leichten Ketten des κ -Typs in *E. coli* während der Verpackung von Antikörpergenbibliotheken können nicht ausgeschlossen werden. So hatte auch die Mehrzahl der von Little *et al.* (1999) aus einer humanen scFv-Antikörpergenbibliothek gewonnenen scFv-Fragmente aus nicht geklärten Gründen leichte Ketten des λ -Typs.

Selbst mit Hilfe des Phagendisplays unter Verwendung des Hyperphagen, der eine im Vergleich zu konventionellem M13KO7-Helferphagen verbesserte Präsentation von scFv-

Fragmenten im Phagendisplay erlaubt (Rondot *et al.*, 2001), konnten keine scFv-Fragmente mit spezifischer Bindung an tumorassoziertes MUC1 (BMA) aus den beiden Einzelpatientinnenbibliotheken selektiert werden. Die mit Hilfe des Phagendisplays gewonnenen Daten bestätigen die Beobachtungen, dass die durch MUC1-Glykopeptid-Immunisierungen in der Patientin S induzierten IgG-Antikörper zwar an das für die Immunisierungen verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid binden, jedoch nicht an tumorassoziertes MUC1 (BMA).

Für das *screening* der beiden Mischbibliotheken (pSEX81-Mix-VH/VL κ und pSEX81-Mix-VH/VL λ), welche die scFv-Antikörpergene der übrigen sechs mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Mammakarzinom-Patientinnen enthielten, wurde eine im Vergleich zum *screening* der beiden Einzelpatientinnenbibliotheken alternative Panningstrategie gewählt. Für die erste Panningrunde auf tumorassoziertem MUC1 (BMA) wurden beide Mischbibliotheken mit Hilfe des Hyperphagen verpackt. Da bereits nach dieser Panningrunde eine signifikante Anreicherung von Phagenantikörpern erzielt werden konnte, wurden für alle nachfolgenden Panningrunden auf BMA sowie synthetischem MUC1-Glykopeptid die jeweils angereicherten Mischbibliotheken konventionell mit M13KO7-Helferphagen verpackt. Durch eine solche Verpackung wird im Gegensatz zu einer Verpackung mit Hyperphagen, bei welcher es aufgrund der oligovalenten scFv-Expression auf der Oberfläche der Phagenpartikel zu unerwünschten Aviditätseffekten kommen kann, die Selektion von hochaffinen scFv-Fragmenten begünstigt (Rondot *et al.*, 2001).

Aus beiden Mischbibliotheken konnten an BMA bindende Phagenantikörper angereichert werden. Aber nur zwei Phagenantikörperpopulationen (pSEX81-Mix-VH/VL κ -Bibliothek nach dem 3. Panning auf BMA und pSEX81-Mix-VH/VL λ -Bibliothek nach dem 2. Panning auf BMA) der beiden jeweils über drei Panningrunden auf BMA angereicherten Mischbibliotheken zeigten in polyklonalen Phagen-ELISAs eine signifikant erhöhte Bindungsaktivität gegenüber dem synthetischen MUC1-Glykopeptid 460, das dem für die Immunisierungen der sechs Mammakarzinom-Patientinnen verwendeten synthetischen MUC1-Glykopeptid der VNTR-Region entsprach. Diese beiden angereicherten Bibliotheken wurden für jeweils eine weitere Panningrunde auf synthetischem MUC1-Glykopeptid eingesetzt. Dabei konnten nur aus der λ -Bibliothek Phagenantikörper angereichert werden, die in einem polyklonalen Phagen-ELISA sowohl an synthetisches MUC1-Glykopeptid als auch an tumorassoziertes MUC1 (BMA) banden. Somit zeigten die folgenden drei Phagenantikörperpopulationen der beiden durch zwei oder mehrere Panningrunden angereicherten Mischbibliotheken in polyklonalen Phagen-ELISA-Bindungsstudien eine signifikante Bindung sowohl an das für die Immunisierungen verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid als auch an tumorassoziertes MUC1 (BMA): κ -Bibliothek nach dem

3. Panning auf BMA, λ -Bibliothek nach dem 2. Panning auf BMA sowie λ -Bibliothek nach dem 2. Panning auf BMA und einem nachfolgenden Panning auf synthetischem MUC1-Glykopeptid. Aus diesen drei angereicherten Bibliotheken wurden jeweils 46 Einzelklone analysiert, um humane monoklonale Antikörperfragmente zu selektieren, die durch die MUC1-Glykopeptid-Immunisierungen in den Mammakarzinom-Patientinnen induziert wurden und spezifisch an die VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1 binden.

Aus der κ -Mischbibliothek konnten keine Antikörperfragmente mit der gewünschten Spezifität selektiert werden. Die mit der BMA-Präparation reaktiven Klone dieser angereicherten Bibliothek banden offenbar nicht an die VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1, sondern entweder an andere Bereiche dieses transmembranen Glykoproteins oder an noch in dieser BMA-Präparation vorhandene kontaminierende Komponenten. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete MUC1-Präparation (BMA) wurde aus der MUC1-positiven humanen Mammakarzinom-Zelllinie T47D gewonnen und unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers BM7 affinitätschromatographisch gereinigt und wies daher noch geringfügige Kontaminationen auf.

Auch die 46 analysierten Einzelklone aus der durch zwei Panningrunden auf BMA angereicherten λ -Mischbibliothek konnten nicht an die VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1 binden, und hatten zum Teil wahrscheinlich eine ähnliche Spezifität wie die aus der κ -Mischbibliothek analysierten, mit der BMA-Präparation reaktiven Einzelklone. Eine erfolgreiche Selektion von monoklonalen Antikörperfragmenten mit der gewünschten Spezifität gelang erst durch ein nachfolgendes Panning der durch zwei Panningrunden auf BMA angereicherten λ -Mischbibliothek auf synthetischem MUC1-Glykopeptid. 42 der insgesamt 46 aus dieser Population analysierten Einzelklone produzierten Phagenantikörper, die in monoklonalen Phagen-ELISAs an synthetische MUC1-Glykopeptide, an BMA sowie an das Cytosol der MUC1-positiven Mammakarzinom-Zelllinie T47D binden konnten. Durch eine Restriktionsanalyse unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *Bst*NI konnte gezeigt werden, dass diese 42 Einzelklone mit der gewünschten Bindungsspezifität sehr wahrscheinlich identisch sind. Das Restriktionsenzym *Bst*NI ist durch die polymorphe Verteilung seiner Erkennungssequenz in Antikörper-DNA gekennzeichnet und ermöglicht so die Identifizierung unterschiedlicher Sequenzen (Marks *et al.*, 1991). Die kleinen Unterschiede bezüglich der absoluten Antigenbindungsaktivität in monoklonalen Phagen-ELISAs der 42 potentiell identischen Klone sind auf unterschiedliche Phagenantikörper-Titer der einzelnen in den ELISAs eingesetzten Phagenüberstände zurückzuführen. Letztlich hätten alle 42 Antikörperklone jedoch sequenziert werden müssen, um eine eindeutige Aussage bezüglich ihrer Identität machen zu können. Die für die variablen Regionen der schweren und der leichten Antikörperketten kodierenden Gene von drei dieser 42 Klone

wurden nach ihrer Umklonierung in den *E. coli*-Expressionsvektor pOPE101 sequenziert, wodurch die Identität von mindestens drei scFv-Antikörperklonen sicher belegt werden konnte.

Die beiden Mischbibliotheken wurden auch für ein ausschließlich auf synthetisches MUC1-Glykopeptid konzentriertes Panning eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Dieses Phagendisplay-*screening* ergab für beide Mischbibliotheken ein mit dem *screening* der κ -Einzelpatientinnenbibliothek vergleichbares Ergebnis. Aus beiden Mischbibliotheken konnten bereits nach einer Panningrunde Phagenantikörper angereichert werden, die in polyklonalen Phagen-ELISAs eine sehr starke Bindung an das für die Immunisierungen verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid zeigten. Eine Bindung dieser Phagenantikörper an tumorassoziiertes MUC1 (BMA) konnte jedoch nicht detektiert werden.

Selbst durch den Einsatz eines sehr aufwendigen, auf zwei unterschiedliche Antigene (synthetisches MUC1-Glykopeptid und BMA, welches tumorassoziiertes MUC1 darstellte) konzentriertes, kombinatorisches Panning konnte mit Hilfe des Phagendisplays nur ein scFv-Antikörperklon mit der gewünschten Spezifität aus den vier Antikörpergenbibliotheken selektiert werden.

Auch die aus dem Phagendisplay-*screening* der beiden Mischbibliotheken gewonnenen Daten bestätigen die Beobachtungen, dass die durch MUC1-Glykopeptid-Immunisierungen in den Mammakarzinom-Patientinnen induzierten IgG-Antikörper zwar an das für die Immunisierungen verwendete synthetische MUC1-Glykopeptid binden konnten, jedoch nicht an tumorassoziiertes MUC1 (BMA). Dies könnte, wie bereits diskutiert, mit der Länge des für die Vakzinierungen verwendeten MUC1-Glykopeptids zusammenhängen. Das synthetische MUC1-Glykopeptid bestand aus einer Abfolge von insgesamt 15 Aminosäuren und repräsentierte damit nur einen Teil eines einzigen *repeats* der VNTR-Domäne von tumorassoziertem MUC1. Da die VNTR-Domäne als immundominante Region von tumorassoziertem MUC1 in synthetischen Peptiden ihre native Konformation jedoch erst ab einer Länge von mehr als zwei *repeats* annimmt (Fontenot *et al.*, 1993, 1995), ist anzunehmen, dass die Mehrzahl der von dem applizierten MUC1-Glykopeptid präsentierten Epitope aufgrund einer unterschiedlichen Faltung nicht mit den normalerweise von der VNTR-Region von tumorassoziertem MUC1 präsentierten Epitopen äquivalent waren.

Die bereits beschriebenen und charakterisierten humanen, gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichteten Antikörperfragmente wurden mit Hilfe des Phagendisplays unter Verwendung eines 100mer-MUC1-Peptids aus nativen Antikörpergenbibliotheken selektiert. Dabei bestand das für die Selektion verwendete Peptid-Antigen aus fünf *repeats* der VNTR-Region von MUC1 und lag gelöst, mit Biotin konjugiert vor (Henderikx *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse stehen mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten im Einklang, wonach nur längere, aus mehreren *repeats* bestehende Peptide der VNTR-Region

von MUC1 eine Konformation annehmen, die mit der nativen Struktur von tumorassoziiertem MUC1 vergleichbar ist.

5.3 Das humane rekombinante *single chain Fv*-Fragment IIB6

Die für die variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperketten (VH und VL) kodierenden Gene der aus der humanen Antikörpergenbibliothek pSEX81-Mix-VH/VL λ isolierten Einzelklone ID4, IA6 und IIB6 konnten erfolgreich in den Vektor pOPE101 (Schmiedl *et al.*, 2000) kloniert werden, der zur periplasmatischen Expression von *single chain Fv*-Fragmenten (scFv-Fragmenten) in *E. coli* dient. Mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse sowie einer ELISA-Bindungsstudie periplasmatischer Extrakte konnte gezeigt werden, dass sich die drei aus der λ -Mischbibliothek isolierten Antikörperklone nach ihrer Umklonierung in pOPE101 als lösliche rekombinante scFv-Fragmente im periplasmatischen Raum von *E. coli* unter Beibehaltung der gewünschten Spezifität funktionell exprimieren lassen.

Durch die Sequenzierung der für die VH und VL kodierenden Gene der Klone ID4, IA6 und IIB6 konnte die Identität dieser Antikörperklone belegt werden. Das VH-Gen gehört zu der VH1-Genfamilie und zeigt eine 95,6 %ige Homologie zu dem ähnlichsten *germline*-Gen DP-8. Das zur V λ 3-Genfamilie gehörende VL-Gen ist zu 95,8 % mit dem ähnlichsten *germline*-Gen IGLV3S2 homolog. Verglichen mit den VH- und VL-Genen von Antikörperfragmenten, die aus nativen humanen Antikörpergenbibliotheken (Vaughan *et al.*, 1996; de Haard *et al.*, 1999) selektiert wurden, ist die Frequenz der Aminosäure-Mutationen bezüglich der jeweiligen *germline*-Sequenzen etwas höher. Dies ist jedoch nicht überraschend, da das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Antikörperfragment aus einer unter Verwendung von IgG-spezifischen Primern hergestellten Antikörpergenbibliothek stammt, welche aus immunisierten Spenderinnen generiert wurde. Die isolierten VH- und VL-Gene könnten von einem, jedoch eher von zwei B-Zellklonen abstammen, die im Rahmen einer sekundären Immunantwort von einer bzw. zwei der sechs Patientinnen eine Affinitätsreifung mit erhöhter Mutationsrate durchlaufen haben. Bei einem Vergleich der VH- und VL-Gene der beiden von Henderikx *et al.* (1998) isolierten MUC1-spezifischen scFv-Fragmente 10A und 10B mit dem von Griffiths *et al.* (1993) isolierten MUC1-spezifischen scFv-Fragment α MUC1-1 fiel auf, dass diese drei Antikörperfragmente bezüglich der VH-Region von FR1 bis CDR2 dieselbe *germline*-Sequenz besitzen, obwohl sie in ihrer Feinspezifität sehr unterschiedlich sind (Henderikx *et al.*, 1998). Die humanen scFv-Fragmente 10A und 10B wurden aus einer sehr komplexen nativen scFv-Bibliothek unter Verwendung eines biotinylierten 100mer-MUC1-Peptids der VNTR-Region in Lösung selektiert (Vaughan *et al.*, 1996; Henderikx *et al.*, 1998),

wohingegen das humane Antikörperfragment α MUC1-1 aus einer weniger komplexen nativen scFv-Bibliothek mit Hilfe eines 20mer-MUC1-Peptids affinitätschromatographisch isoliert wurde (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993). Die drei scFv-Fragmente 10A, 10B und α MUC1-1 besitzen alle eine leichte Kette des λ -Typs, nutzen jedoch unterschiedliche λ -*germline*-Sequenzen (Henderikx *et al.*, 1998). Das im Rahmen dieser Arbeit isolierte scFv-Fragment hat, bis auf die Nutzung einer leichten Kette des λ -Typs, keine derartigen sequenzspezifischen Gemeinsamkeiten mit den MUC1-spezifischen Antikörperfragmenten 10A, 10B und α MUC1-1.

Das scFv-Fragment IIB6 konnte mit Hilfe einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) erfolgreich aus periplasmatischen Extrakten angereichert werden. Da eine Analyse der IMAC-Fractionen durch SDS-PAGE und Immunblot eine ausreichende Reinheit des scFv-Fragments IIB6 in den IMAC-Eluaten belegte, wurde auf einen weiteren Reinigungsschritt verzichtet.

Die Spezifität des humanen rekombinanten scFv-Fragments IIB6 wurde mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren analysiert. In einer ELISA-Bindungsstudie konnte das mittels IMAC gereinigte Antikörperfragment an ein synthetisches glykosyliertes sowie an ein synthetisches nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid der VNTR-Region binden. Beide synthetischen MUC1-Peptide hatten identische Aminosäuresequenzen. Das glykosylierte MUC1-Peptid entsprach dabei dem für die Immunisierungen der sechs Mammakarzinom-Patientinnen verwendeten synthetischen MUC1-Glykopeptid, welches an einem Threoninrest mit N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) glykosyliert war. Auch tumorassoziiertes MUC1, das in diesem ELISA gereinigt (BMA) sowie in einer cytosolischen Präparation von T47D-Zellen vorlag, wurde von dem scFv-Fragment IIB6 gebunden. Das humane Antikörperfragment IIB6 konnte im ELISA ungefähr gleich stark an näherungsweise gleiche geringe Stoffmengen der beiden Antigene BMA und synthetisches MUC1-Peptid binden. Da ein Molekül MUC1 aufgrund seiner Wiederholungsdomäne mehrere potentielle Epitope für das rekombinante Antikörperfragment besitzen könnte, ein Molekül des synthetischen MUC1-Peptids jedoch nur ein einziges potentielles Epitop besitzt, könnte aus den ELISA-Daten geschlossen werden, dass nur eines der mehreren potentiellen Epitope auf BMA von dem scFv-Fragment IIB6 erkannt wird. Dies wäre nicht überraschend, denn die BMA-Präparation wurde mit Hilfe einer affinitätschromatographischen Reinigung unter Verwendung des monoklonalen Maus-Antikörpers BM7 aus T47D-Zellen gewonnen und repräsentierte daher nur einen Teil der von T47D-Zellen exprimierten MUC1-Moleküle. Da die humane Mammakarzinom-Zelllinie T47D viele verschiedene MUC1-Glykoformen exprimiert (Hanisch *et al.*, 1996), ist es nicht möglich, unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, welcher aufgrund seines spezifischen Epitops nur bestimmte MUC1-Glykoformen binden kann, alle MUC1-Isoformen aus T47D-

Zellen zu gewinnen. Gegen die These, dass nur eines der mehreren potentiellen Epitope auf BMA von dem scFv-Fragment IIB6 erkannt wird, spricht das im ELISA beobachtete Bindungsverhalten des Antikörperfragments IIB6 an größere Stoffmengen der beiden Antigene BMA und synthetisches MUC1-Peptid. Eine Erhöhung der Antigenkonzentration führte bezüglich des synthetischen MUC1-Peptid-Antigens auch zu einer Erhöhung der ELISA-Signale, wohingegen beim Antigen BMA keine weitere Signalverstärkung zu beobachten war. Diese bezüglich des BMA-Antigens beobachtete Absättigung weist darauf hin, dass ab einer bestimmten BMA-Konzentration alle verfügbaren scFv-Fragmente gebunden vorlagen, während dies bei einer äquivalenten Stoffmenge des synthetischen MUC1-Peptid-Antigens nicht der Fall war. Die in einem Immunoblot beobachtete molekulare Masse des BMA-Antigens lässt auf ein Protein mit maximal 20 *repeats* in dieser Präparation schließen. Die Sequenzen dieser *repeats* sind jedoch in der Regel nicht identisch. So sind in MUC1-Molekülen der Mammakarzinom-Zelllinie T47D, aus der das im Rahmen dieser Arbeit verwendete BMA-Antigen präpariert wurde, die Peptidsequenzen der *repeats* leicht verändert. Die Änderungen sind hauptsächlich an drei Positionen (PAPGSTAPP(\rightarrow A)AHGVTSAPD(\rightarrow E)T(\rightarrow S)R) zu beobachten, wobei die letzten beiden Veränderungen (D \rightarrow E und T \rightarrow S) in etwa 50 % der *repeats* zu finden sind und immer gemeinsam auftreten (Müller, 1999; Hanisch und Müller, 2000). Der Threoninrest ist auch am Epitop des scFv-Fragments IIB6 beteiligt (s.u.). Da Antikörper in der Regel durch Änderung bereits einer einzelnen am Epitop beteiligten Seitenkette in ihrer Bindung zum Antigen beeinträchtigt werden können, kann aus der Anzahl der *repeats* nicht auf die Molarität der Bindungsstellen im BMA-Molekül geschlossen werden. Eine geringe Anzahl potentieller Epitopsequenzen ist jedoch wahrscheinlich. Eine Klärung dieses Sachverhalts wäre hier nur durch Peptidsequenzierung des verwendeten BMA-Antigens und Epitopkartierung zu erlangen.

Die in ELISA-Bindungsstudien gezeigte Reaktivität des scFv-Fragments IIB6 mit tumorassoziertem MUC1 wurde mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse bestätigt. Das Antikörperfragment IIB6 konnte in dieser Analyse an das in einer BMA-Präparation und im Cytosol von T47D-Zellen enthaltene tumorassozierte MUC1 spezifisch binden und zeigte dabei ein mit dem monoklonalen Maus-Antikörper BM7 vergleichbares Bindungsmuster. Das tumorassozierte MUC1-Antigen lag in dieser Analyse denaturiert vor.

Die Bindung an natives, von Tumorzellen präsentiertes MUC1 ist für einen potentiellen therapeutischen Nutzen des im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörperfragments essentiell. Diese Fähigkeit des scFv-Fragments IIB6 konnte mit Hilfe einer FACS-Analyse belegt werden. Zum Einsatz kamen dabei Zellen der MUC1-exprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie T47D, die verschiedene MUC1-Glykoformen exprimiert (Hanisch *et al.*, 1996). Das scFv-Fragment IIB6 konnte T47D-Zellen spezifisch binden, wobei die

Reaktion aufgrund der Monovalenz des Antikörperfragments schwächer war als bei einem bivalenten, monoklonalen Antikörper zu erwarten. Auch Henderikx *et al.* (1998) beobachteten eine im Vergleich zu monoklonalen MUC1-spezifischen Maus-Antikörpern etwas schwächere Bindung des scFv-Fragments 10A an T47D-Zellen.

Somit ist gezeigt, dass das scFv-Fragment IIB6 sowohl an denaturiertes (Immunoblot) sowie eventuell partiell denaturiertes (ELISA) als auch an natives, von Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie T47D präsentiertes (FACS) MUC1-Antigen bindet, wobei die VNTR-Domäne von tumorassoziiertem MUC1 erkannt wird.

Durch Inkubation mit 20 überlappenden 15mer-(Glyko-) Peptiden, die mit einem Versatz von einer Aminosäure die VNTR-Domäne von tumorassoziiertem MUC1 repräsentierten, konnte das Epitop des scFv-Fragments IIB6 bestimmt werden. Es umfasst die Aminosäuren TRPAP und ist damit erwartungsgemäß innerhalb der Aminosäuresequenz des für die Immunisierungen der Mammakarzinom-Patientinnen verwendeten synthetischen MUC1-Glykopeptids zu finden. Der Beitrag jeder einzelnen Aminosäure des Epitops zur Bindung des Antikörperfragments wurde nicht untersucht. Dies wäre beispielsweise mittels Austausch jeder einzelnen Aminosäure durch Glycin (*glycine walk*, Kneissel *et al.*, 1999) zu ermitteln.

Die Vielzahl der bereits charakterisierten monoklonalen Maus-Antikörper erkennen ein Epitop, das innerhalb der PDTRPAP-Peptidsequenz liegt (Prize *et al.*, 1998). Somit erkennt das humane scFv-Fragment IIB6 eine mit den Epitopen der meisten monoklonalen Maus-Antikörper vergleichbare antigene Determinante. Der monoklonale Maus-Antikörper C595 sowie ein von diesem abgeleitetes scFv-Fragment, deren Epitop die Aminosäuren RPAP umfasst, binden spezifisch an Gewebe von Mammakarzinom-Patientinnen. Dieser monoklonale Antikörper bindet besser an synthetische MUC1-Glykopeptide als an synthetische MUC1-Peptide der VNTR-Region. Die Glykosylierung von einigen Serin- und Threoninresten mit GalNAc stabilisiert die Konformation des C595-Epitops (Spencer *et al.*, 1996, 1999; Denton *et al.*, 1997). Die Reaktivität von anderen monoklonalen Antikörpern, die gegen die VNTR-Domäne von tumorassoziiertem MUC1 gerichtet sind, wird durch eine Glykosylierung mit GalNAc nicht beeinflusst (Reis *et al.*, 1998). Auch das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte scFv-Fragment IIB6 konnte im ELISA sowohl an glykosyliertes als auch an nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid mit einer vergleichbaren Reaktivität binden.

Die durch andere MUC1-Peptid-Vakzinierungen in von einem Karzinom betroffenen PatientInnen induzierten Antikörper sind gegen andere Peptidepitope der VNTR-Domäne gerichtet als die Mehrzahl der mit Hilfe der Hybridom-Technologie generierten monoklonalen Antikörper oder des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten scFv-Fragments IIB6. So sind beispielsweise die in Karzinom-PatientInnen durch eine Immunisierung unter Verwendung eines aus fünf *repeats* bestehenden Mannan-MUC1-Fusionsproteins induzierten IgG-

Antikörper mit den Aminosäuresequenzen STAPPAHG und PAPGSTAP der VNTR-Domäne von MUC1 reaktiv (Karanikas *et al.*, 1997).

Die beiden humanen MUC1-spezifischen scFv-Fragmente 10A und 10B, die aus einer aus dem Blut von nicht-immunisierten SpenderInnen generierten Antikörpergenbibliothek isoliert wurden, sind gegen die Aminosäuresequenzen PAPG(S) bzw. TRPAPGSTAPPAH der VNTR-Domäne gerichtet. Das Peptid-Epitop des scFv-Fragments 10B ist sehr lang und umfasst insgesamt 13 von 20 Aminosäuren eines *repeats*. Dieses Antikörperfragment ist mit einem aus fünf *repeats* bestehenden MUC1-Peptid reaktiv, aber nicht mit einem aus einem einzigen *repeat* bestehenden MUC1-Peptid, und erkennt somit wahrscheinlich ein konformationelles Epitop. Die beiden scFv-Fragmente 10A und 10B konnten in immunhistochemischen Analysen verschiedene Karzinomgewebe färben, wohingegen die Bindung an normales Gewebe nur sehr schwach war. Beide Antikörperfragmente erkennen unter- oder nicht-glykosyliertes MUC1, wie es auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden ist (Henderikx *et al.*, 1998). Das Epitop des Antikörperfragments 10A besteht aus den Aminosäuren PAPG(S), wobei die PAP-Sequenz den größten Beitrag zur Bindung leistet (Henderikx *et al.*, 1998). Die Abfolge der Aminosäuren PAP ist auch im Epitop des im Rahmen dieser Arbeit generierten scFv-Fragments IIB6 zu finden, was eventuell auf vergleichbare Bindungseigenschaften bezüglich verschiedener Tumorgewebe hinweisen könnte. Eine Bindung des IIB6-Antikörperfragments an verschiedene Tumorgewebe müsste jedoch noch gezeigt werden.

Der vollständige und komplett humane IgG-Antikörper PH1-IgG1 ist gegen ein aus den Aminosäuren PAP bestehendes Peptidepitop gerichtet. Seine variable Domäne wurde mit Hilfe des Phagendisplays aus einer humanen Fab-Antikörpergenbibliothek isoliert, welche aus dem Blut nicht-immunisierter gesunder SpenderInnen generiert wurde (de Haard *et al.*, 1999; Henderikx *et al.*, 2002). Dieser Antikörper bindet an von Mammakarzinom- und Ovarialkarzinom-Zelllinien präsentiertes MUC1, jedoch nicht an stark glykosyliertes MUC1, wie es auf Zellen von Kolonkarzinom-Zelllinien exprimiert wird. Somit erkennt auch dieser Antikörper unter-glykosyliertes MUC1. In immunhistochemischen Analysen zeigte der Antikörper PH1-IgG1 eine starke Bindung an verschiedene Karzinomgewebe, wohingegen normales Gewebe nicht oder nur schwach angefärbt wurde. Auch eine Internalisierung dieses Antikörpers in Zellen, die tumorassoziiertes MUC1 exprimieren, konnte gezeigt werden. Dabei scheint die Internalisierung MUC1-spezifischer Antikörper von der Feinspezifität, d.h. vom Epitop des Antikörpers abhängig zu sein. Bei einem Vergleich von zwei monoklonalen, MUC1-spezifischen Maus-Antikörpern bezüglich ihrer Internalisierungsrate zeigte sich, dass der monoklonale Antikörper CTMO1, welcher ein aus den Aminosäuren RPAP bestehendes Epitop erkennt, viel besser internalisiert wurde als der monoklonale Antikörper BC2, dessen Epitop aus den Aminosäuren APDTR besteht

(Pietersz *et al.*, 1997). Der humane Antikörper PH1-IgG1 (Epitop PAP) zeigte eine mit der des CTMO1-Antikörpers vergleichbare Internalisierungsrate (Henderikx *et al.*, 2002). Henderikx *et al.* (2002) postulieren, dass MUC1-spezifische Antikörper, die das RPAP-Epitop erkennen, effizient internalisiert werden. Somit könnte dies eventuell auch für das scFv-Fragment IIB6, dessen Epitop die Aminosäuren TRPAP umfasst, gelten. Internalisierende Antikörper sind vor allem dann für eine Immuntherapie interessant, wenn sie mit einer heterologen Komponente, wie beispielsweise einem Enzym, konjugiert sind (Syrigos *et al.*, 1999).

Neben der Spezifität ist die Affinität der zweite wichtige Faktor zur Beurteilung der Qualität eines Antikörpers. Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte monovalente scFv-Fragment IIB6 hat eine Affinität von $2,75 \times 10^{-7}$ M zu BMA und eine praktisch identische Affinität ($2,28 \times 10^{-7}$ M) zu synthetischem MUC1-Glykopeptid. Bezüglich des Antigens BMA hatte das scFv-Fragment IIB6 eine mit dem monoklonalen Antikörper BM7 ($3,06 \times 10^{-7}$ M) vergleichbare Affinität. Die Affinität des Antikörperfragments gegenüber synthetischem MUC1-Glykopeptid war, verglichen mit der des BM7-Antikörpers ($3,27 \times 10^{-6}$ M), jedoch ca. 14 mal höher. Die Bestimmung der Affinitäten des scFv-Fragments IIB6 sowie des monoklonalen Antikörpers BM7 wurden mit Hilfe des Standardverfahrens der Oberflächen-Plasmon-Resonanz unter Verwendung eines BIAcore 2000-Gerätes durchgeführt, wobei bezüglich des BM7-Antikörpers die monovalenten Affinitäten bestimmt wurden (Dr. Specht, Fa. Inventus Biotec, Münster). Der humane, gegen tumorassoziertes MUC1 gerichtete Antikörper PH1-IgG1 wurde auf der Grundlage des aus einer nativen Antikörpergenbibliothek isolierten PH1-Fab-Fragments generiert. Das PH1-Fab-Fragment hat eine Affinität von $1,43 \times 10^{-6}$ M zu synthetischen MUC1-Peptiden (Henderikx *et al.*, 2002). Somit hat das monovalente scFv-Fragment IIB6 eine ca. 16 mal höhere Affinität zu synthetischem MUC1-(Glyko) Peptid als das monovalente PH1-Fab-Fragment. Das auf der Grundlage dieses Fab-Fragments generierte komplette PH1-IgG1-Molekül hatte zu synthetischen MUC1-Peptiden eine Affinität von $8,7 \times 10^{-9}$ M. Die apparente Affinität zu MUC1-Peptiden dieses vollständig humanen IgG-Antikörpers ist damit ca. 160 mal höher als die des PH1-Fab-Fragments. Die, verglichen mit dem PH1-Fab-Fragment, scheinbar höhere Affinität des kompletten PH1-IgG1-Moleküls ist jedoch auf einen Aviditätseffekt zurückzuführen, hervorgerufen durch den Wechsel von einem monovalenten zu einem bivalenten Antikörper (Henderikx *et al.*, 2002). Bei der Herstellung eines vollständigen und komplett humanen IgG-Antikörpers auf der Grundlage des im Rahmen dieser Arbeit generierten, gegen tumorassoziertes MUC1 gerichteten scFv-Fragments IIB6 könnte ein ähnlicher Effekt erwartet werden. Die für das IIB6-Antikörperfragment bestimmten Affinitäten sind mit den Affinitäten von monoklonalen, MUC1-spezifischen Maus-Antikörpern zu synthetischen MUC1-Peptiden vergleichbar

(Karanikas *et al.*, 1998), wobei bezüglich der monoklonalen Maus-Antikörper deren Bivalenz zu berücksichtigen ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen, dass das scFv-Fragment IIB6 spezifisch an tumorassoziertes MUC1 bindet. Eine spezifische Bindung dieses Antikörperfragments an verschiedene Karzinomgewebe, die im Vergleich zu Normalgewebe verändertes MUC1 überexprimieren (Zotter *et al.*, 1988), muss noch gezeigt werden. Aufgrund eines Vergleichs der Feinspezifität des scFv-Fragments IIB6 mit den Feinspezifitäten bereits charakterisierter, MUC1-spezifischer Antikörper und Antikörperfragmente, kann dies jedoch erwartet werden, zumal eine spezifische Bindung an natives, von einer Mammakarzinom-Zelllinie präsentiertes MUC1 belegt werden konnte.

5.4 Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit generierte humane *single chain* Fv-Fragment IIB6, welches tumorassoziertes MUC1 spezifisch bindet, stellt ein potentiell geeignetes Ausgangsprodukt für die Herstellung vollständig humaner Therapeutika zur Behandlung des Mammakarzinoms sowie anderer MUC1-überexprimierender Adenokarzinome dar.

Die für die variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperkette kodierenden Gene des Antikörperfragments IIB6 können in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden, um einen vollständigen und komplett humanen IgG-Antikörper gleicher Spezifität herzustellen. Dabei können verschiedene eukaryotische Expressionssysteme genutzt werden, wie beispielsweise das Baculovirus-Expressionssystem (Poul *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 2001) oder die Expression in CHO-Zellen (Page und Sydenham, 1991; Persic *et al.*, 1997). Ein solcher vollständig humaner IgG-Antikörper, der gegen tumorassoziertes MUC1 gerichtet ist, stellt ein potentielles Agens für eine zielgerichtete Immuntherapie von MUC1-überexprimierender Adenokarzinome dar.

Eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Nutzung ist die Herstellung von Antikörperfusionsproteinen auf Basis des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antikörperfragments. Dieses Antikörperfragment kann sowohl mit heterologen Komponenten wie Enzymen, Toxinen oder Cytokinen als auch mit Antikörperfragmenten anderer Spezifität genetisch fusioniert werden (Rohrbach *et al.*, 2003). Ein Immuncytokin, das aus einem genetisch mit Interleukin-2 fusionierten MUC1-spezifischen Antikörperfragment murinen Ursprungs besteht, hat einen immunstimulierenden Effekt und zerstört MUC1-positive Tumorzellen *in vitro* (Heuser *et al.*, 2003). Auch die Rekrutierung von Zellen des Immunsystems mit Hilfe bispezifischer Antikörper auf Basis eines gegen ein

tumorassoziertes Antigen gerichteten Antikörperfragments hat ein großes Potential für die Krebstherapie (Rohrbach *et al.*, 2003).

6 Literatur

Adair, J.R., Athwal, D.S., Bodmer, M.W., Bright, S.M., Collins, A.M., Pulito, V.L., Rao, P.E., Reedman, R., Rothermel, A.L., Xu, D., *et al.* (1994). Humanization of the murine anti-human CD3 monoclonal antibody OKT3. *Hum. Antibodies Hybridomas* 5, 41-7.

Adluri, S., Gilewski, T., Zhang, S., Ramnath, V., Ragupathi, G. und Livingston, P. (1999). Specificity analysis of sera from breast cancer patients vaccinated with MUC1-KLH plus QS-21. *Br. J. Cancer* 79, 1806-12.

Bange, J., Zwick, E. und Ullrich, A. (2001). Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat. Med.* 7, 548-52.

Barbas, C.F., 3rd, Kang, A.S., Lerner, R.A. und Benkovic, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7978-82.

Baselga, J. (2001). Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer* 37 Suppl. 1, 18-24.

Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R. und Horwitz, A.H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240, 1041-3.

Boder, E.T. und Wittrup, K.D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15, 553-7.

Bon, G.G., Kenemans, P., Verstraeten, R., van Kamp, G.J. und Hilgers, J. (1996). Serum tumor marker immunoassays in gynecologic oncology: establishment of reference values. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174, 107-14.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.

Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. und Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, 147-53.

Breitling, F. und Dübel, S. (1997). *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Brüggemann, M. und Taussig, M.J. (1997). Production of human antibody repertoires in transgenic mice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 455-8.

Brümmendorf, T.H., Kaul, S., Schuhmacher, J., Baum, R.P., Kliveny, G., Matys, R., Eichler, A., Guckel, B., Beldermann, F. und Bastert, G. (1995). [Immunoscintigraphy of breast cancer xenografts. 99m-Tc-labeled anti-mucin monoclonal antibodies BM-7 and 12H12]. *Nuklearmedizin* 34, 197-202.

Burchell, J., Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Girling, A., Lewis, A., Millis, R. und Lamport, D. (1987). Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res.* 47, 5476-82.

Carraway, K.L., Ramsauer, V.P., Haq, B. und Carothers Carraway, C.A. (2003). Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays* 25, 66-71.

- Courtenay-Luck, N.S., Epenetos, A.A., Moore, R., Larche, M., Pectasides, D., Dhokia, B. und Ritter, M.A. (1986). Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. *Cancer Res.* 46, 6489-93.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L. und Georgiou, G. (1998). Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* 11, 825-32.
- Daugherty, P.S., Olsen, M.J., Iverson, B.L. und Georgiou, G. (1999). Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng.* 12, 613-21.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W. und Hoogenboom, H.R. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* 274, 18218-30.
- DeNardo, S.J., Kramer, E.L., O'Donnell, R.T., Richman, C.M., Salako, Q.A., Shen, S., Noz, M., Glenn, S.D., Ceriani, R.L. und DeNardo, G.L. (1997). Radioimmunotherapy for breast cancer using indium-111/yttrium-90 BrE-3: results of a phase I clinical trial. *J. Nucl. Med.* 38, 1180-5.
- Denton, G., Sekowski, M., Spencer, D.I., Hughes, O.D., Murray, A., Denley, H., Tendler, S.J. und Price, M.R. (1997). Production and characterization of a recombinant anti-MUC1 scFv reactive with human carcinomas. *Br. J. Cancer* 76, 614-21.
- Deutsche Krebsgesellschaft (2003). Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms der Frau. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften. Vorläufige Version Februar 2003. Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Frankfurt/Main. <http://www.deutsche-krebsgesellschaft.de>
- Engel, J., Schmidt, M., Schubert-Fritschle, G., Tretter, W. und Hölzel, D. (2000). Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München – Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren. Zuckschwerdt, München Bern Wien New York.
- Fishwild, D.M., O'Donnell, S.L., Bengoechea, T., Hudson, D.V., Harding, F., Bernhard, S.L., Jones, D., Kay, R.M., Higgins, K.M., Schramm, S.R. und Lonberg, N. (1996). High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 14, 845-51.
- Fontenot, J.D., Tjandra, N., Bu, D., Ho, C., Montelaro, R.C. und Finn, O.J. (1993). Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer Res.* 53, 5386-94.
- Fontenot, J.D., Mariappan, S.V., Catasti, P., Domenech, N., Finn, O.J. und Gupta, G. (1995). Structure of a tumor associated antigen containing a tandemly repeated immunodominant epitope. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 13, 245-60.
- Foote, J. und Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 224, 487-99.
- Frippiat, J.P. und Lefranc, M.P. (1994). Genomic organisation of 34 kb of the human immunoglobulin lambda locus (IGLV): restriction map and sequences of new V lambda III genes. *Mol. Immunol.* 31, 657-70.

- Gavilondo, J.V. und Larrick, J.W. (2000). Antibody engineering at the millenium. *Biotechniques* 29, 128-145.
- Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Rothbard, J. und Burchell, J. (1988). A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263, 12820-3.
- Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N. und Wilson, D. (1990). Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265, 15286-93.
- Gilewski, T., Adluri, S., Ragupathi, G., Zhang, S., Yao, T.J., Panageas, K., Moynahan, M., Houghton, A., Norton, L. und Livingston, P.O. (2000). Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin. Cancer Res.* 6, 1693-701.
- Girling, A., Bartkova, J., Burchell, J., Gendler, S., Gillett, C. und Taylor-Papadimitriou, J. (1989). A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer* 43, 1072-6.
- Goldenberg, M.M. (1999). Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin. Ther.* 21, 309-18.
- Gourevitch, M.M., von Mensdorff-Pouilly, S., Litvinov, S.V., Kenemans, P., van Kamp, G.J., Verstraeten, A.A. und Hilgers, J. (1995). Polymorphic epithelial mucin (MUC-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 72, 934-8.
- Goydos, J.S., Elder, E., Whiteside, T.L., Finn, O.J. und Lotze, M.T. (1996). A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 63, 298-304.
- Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., *et al.* (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12, 725-34.
- Hanes, J. und Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4937-42.
- Hanisch, F.G., Stadie, T.R., Deutzmann, F. und Peter-Katalinic, J. (1996). MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur. J. Biochem.* 236, 318-27.
- Hanisch, F.G., Müller, S., Hassan, H., Clausen, H., Zachara, N., Gooley, A.A., Paulsen, H., Alving, K. und Peter-Katalinic, J. (1999). Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions. *J. Biol. Chem.* 274, 9946-54.
- Hanisch, F.G. und Müller, S. (2000). MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* 10, 439-49.

- Henderikx, P., Kandilogiannaki, M., Petrarca, C., von Mensdorff-Pouilly, S., Hilgers, J.H., Krambovitis, E., Arends, J.W. und Hoogenboom, H.R. (1998). Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res.* 58, 4324-32.
- Henderikx, P., Coolen-van Neer, N., Jacobs, A., van der Linden, E., Arends, J.W., Mullberg, J. und Hoogenboom, H.R. (2002). A human immunoglobulin G1 antibody originating from an in vitro-selected Fab phage antibody binds avidly to tumor-associated MUC1 and is efficiently internalized. *Am. J. Pathol.* 160, 1597-608.
- Heuser, C., Ganser, M., Hombach, A., Brand, H., Denton, G., Hanisch, F.G. und Abken, H. (2003). An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells. *Br. J. Cancer* 89, 1130-9.
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. und Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19, 4133-7.
- Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffiths, A.D. und Winter, G. (1992). Building antibodies from their genes. *Immunol. Rev.* 130, 41-68.
- Hoogenboom, H.R., Henderikx, P. und de Haard, H. (1998). Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 5-31.
- Hoogenboom, H.R. und Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today* 21, 371-8.
- 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, 5879-83.
- Ignatovich, O., Tomlinson, I.M., Jones, P.T. und Winter, G. (1997). The creation of diversity in the human immunoglobulin V(λ) repertoire. *J. Mol. Biol.* 268, 69-77.
- Irving, R.A., Coia, G., Roberts, A., Nuttall, S.D. und Hudson, P.J. (2001). Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J. Immunol. Methods* 248, 31-45.
- Jakobovits, A. (1995). Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 561-6.
- Jakobovits, A. (1998). Production and selection of antigen-specific fully human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig loci. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 33-42.
- Janeway, C.A. und Travers, P. (1997). *Immunologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S. und Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-5.

- Kabat, E.A. und 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, 1709-19.
- Karanikas, V., Hwang, L.A., Pearson, J., Ong, C.S., Apostolopoulos, V., Vaughan, H., Xing, P.X., Jamieson, G., Pietersz, G., Tait, B., Broadbent, R., Thynne, G. und McKenzie, I.F. (1997). Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J. Clin. Invest.* 100, 2783-92.
- Karanikas, V., Patton, K., Jamieson, G., Pietersz, G. und McKenzie, I. (1998). Affinity of antibodies to MUC1 antigens. *Tumour Biol.* 19 Suppl. 1, 71-8.
- Kieke, M.C., Cho, B.K., Boder, E.T., Kranz, D.M. und Wittrup, K.D. (1997). Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng.* 10, 1303-10.
- Kneissel, S., Queitsch, I., Petersen, G., Behrsing, O., Micheel, B. und Dübel, S. (1999). Epitope structures recognised by antibodies against the major coat protein (g8p) of filamentous bacteriophage fd (Inoviridae). *J. Mol. Biol.* 288, 21-8.
- Koch, J., Breitling, F. und Dübel, S. (2000). Rapid titration of multiple samples of filamentous bacteriophage (M13) on nitrocellulose filters. *Biotechniques* 29, 1196-8, 2002.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.
- Kontermann, R.E., Liu, Z., Schulze, R.A., Sommer, K.A., Queitsch, I., Dübel, S., Kipriyanov, S.M., Breitling, F. und Bautz, E.K. (1995). Characterization of the epitope recognized by a monoclonal antibody directed against the largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 473-81.
- Kotera, Y., Fontenot, J.D., Pecher, G., Metzgar, R.S. und Finn, O.J. (1994). Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.* 54, 2856-60.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lamers, C.H., Gratama, J.W., Warnaar, S.O., Stoter, G. und Bolhuis, R.L. (1995). Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb)-targeted cytolysis by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb-targeted activated T-lymphocytes. *Int. J. Cancer* 60, 450-7.
- Liang, M., Dübel, S., Li, D., Queitsch, I., Li, W. und Bautz, E.K. (2001). Baculovirus expression cassette vectors for rapid production of complete human IgG from phage display selected antibody fragments. *J. Immunol. Methods* 247, 119-30.
- Liddell, E. und Weeks, I. (1996). *Antikörper-Techniken*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Little, M., Welschof, M., Braunagel, M., Hermes, I., Christ, C., Keller, A., Rohrbach, P., Kurschner, T., Schmidt, S., Kleist, C. und Terness, P. (1999). Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *J. Immunol. Methods* 231, 3-9.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75.
- Maraveyas, A., Snook, D., Hird, V., Kosmas, C., Meares, C.F., Lambert, H.E. und Epenetos, A.A. (1994). Pharmacokinetics and toxicity of an yttrium-90-CITC-DTPA-HMFG1 radioimmunoconjugate for intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer. *Cancer* 73, 1067-75.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. und Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581-97.
- Martin, A.C. (1996). Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. *Proteins* 25, 130-3.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. und Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-4.
- McPherson, K., Steel, C.M. und Dixon, J.M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj.* 321, 624-8.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A. und Oi, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6851-5.
- Müller, S., Goletz, S., Packer, N., Gooley, A., Lawson, A.M. und Hanisch, F.G. (1997). Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 24780-93.
- Müller, S., Alving, K., Peter-Katalinic, J., Zachara, N., Gooley, A.A. und Hanisch, F.G. (1999). High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18165-72.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt. 1, 263-73.
- Musselli, C., Ragupathi, G., Gilewski, T., Panageas, K.S., Spinat, Y. und Livingston, P.O. (2002). Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. *Int. J. Cancer* 97, 660-7.
- Nakamura, H., Hinoda, Y., Nakagawa, N., Makiguchi, Y., Itoh, F., Endo, T. und Imai, K. (1998). Detection of circulating anti-MUC1 mucin core protein antibodies in patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* 33, 354-61.
- Nathanson, K.L., Wooster, R., Weber, B.L. und Nathanson, K.N. (2001). Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat. Med.* 7, 552-6.
- Nicholson, S., Gooden, C.S., Hird, V., Maraveyas, A., Mason, P., Lambert, H.E., Meares, C.F. und Epenetos, A.A. (1998). Radioimmunotherapy after chemotherapy compared to chemotherapy alone in the treatment of advanced ovarian cancer: a matched analysis. *Oncol. Rep.* 5, 223-6.
- Padlan, E.A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31, 169-217.

- Page, M.J. und Sydenham, M.A. (1991). High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology (N.Y.)* 9, 64-8.
- Parry, G., Beck, J.C., Moss, L., Bartley, J. und Ojakian, G.K. (1990). Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures: the role of cell-cell, cell-substratum, and membrane-cytoskeleton interactions. *Exp. Cell Res.* 188, 302-11.
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2444-8.
- Persic, L., Roberts, A., Wilton, J., Cattaneo, A., Bradbury, A. und Hoogenboom, H.R. (1997). An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 187, 9-18.
- Petrarca, C., Rughetti, A., Rahimi, H., D'Agostini, F., Turchi, V., Apollonj Ghetti, C., Scambia, G., Frati, L. und Nuti, M. (1996). Human antibodies against the polymorphic epithelial mucin in ovarian cancer patients recognise a novel sequence in the tandem repeat region. *Eur. J. Cancer* 32A, 2155-63.
- Petrarca, C., Casalino, B., von Mensdorff-Pouilly, S., Rughetti, A., Rahimi, H., Scambia, G., Hilgers, J., Frati, L. und Nuti, M. (1999). Isolation of MUC1-primed B lymphocytes from tumour-draining lymph nodes by immunomagnetic beads. *Cancer Immunol. Immunother.* 47, 272-7.
- Pietersz, G.A., Wenjun, L., Krauer, K., Baker, T., Wreschner, D. und McKenzie, I.F. (1997). Comparison of the biological properties of two anti-mucin-1 antibodies prepared for imaging and therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 44, 323-8.
- Plückthun, A. (1991). Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology (N.Y.)* 9, 545-51.
- Poul, M.A., Cerutti, M., Chaabihi, H., Ticchioni, M., Deramoudt, F.X., Bernard, A., Devauchelle, G., Kaczorek, M. und Lefranc, M.P. (1995). Cassette baculovirus vectors for the production of chimeric, humanized, or human antibodies in insect cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2005-9.
- Price, M.R., Rye, P.D., Petrakou, E., Murray, A., Brady, K., Imai, S., Haga, S., Kiyozuka, Y., Schol, D., Meulenbroek, M.F., Snijdwint, F.G., von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, R.A., Kenemans, P., Blockzijl, A., Nilsson, K., Nilsson, O., Reddish, M., Suresh, M.R., Koganty, R.R., Fortier, S., Baronic, L., Berg, A., Longenecker, M.B., Hilgers, J., *et al.* (1998). Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. *Tumour Biol.* 19 Suppl. 1, 1-20.
- Pschyrembel (1998). *Klinisches Wörterbuch.* 258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- Rader, C. und Barbas, C.F., 3rd (1997). Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 503-8.
- Rasched, I. und Oberer, E. (1986). Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.* 50, 401-27.
- Reddish, M., MacLean, G.D., Koganty, R.R., Kan-Mitchell, J., Jones, V., Mitchell, M.S. und Longenecker, B.M. (1998). Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *Int. J. Cancer* 76, 817-23.

- Reis, C.A., Hassan, H., Bennett, E.P. und Clausen, H. (1998). Characterization of a panel of monoclonal antibodies using GalNAc glycosylated peptides and recombinant MUC1. *Tumour Biol.* 19 Suppl. 1, 127-33.
- Richards, E.R., Devine, P.L., Quin, R.J., Fontenot, J.D., Ward, B.G. und McGuckin, M.A. (1998). Antibodies reactive with the protein core of MUC1 mucin are present in ovarian cancer patients and healthy women. *Cancer Immunol. Immunother.* 46, 245-52.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. und Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-7.
- Robert Koch Institut (2003). *Krebskrankheiten*. Robert Koch Institut, Berlin. <http://www.rki.de>
- Roche Lexikon Medizin (1999). 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München.
- Rohrbach, P. (2000). Recombinant antibody libraries: construction and use exemplified by the isolation of antibody fragments distinguishing three closely related steroids. Dissertation an der Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Rohrbach, P., Broders, O., Toleikis, L. und Dübel, S. (2003). Therapeutic antibodies and antibody fusion proteins. *Biotech. Gen. Engin. Rev.* 20, 129-55.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. und Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat. Biotechnol.* 19, 75-8.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sainsbury, J.R., Anderson, T.J. und Morgan, D.A. (2000). ABC of breast diseases: breast cancer. *Bmj.* 321, 745-50.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. und Plückthun, A. (1999). Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J. Immunol. Methods* 231, 119-35.
- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C.H., Queitsch, I. und Dübel, S. (2000). Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Methods* 242, 101-14.
- Schol, D.J., Meulenbroek, M.F., Snijdwint, F.G., von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, R.A., Murakami, F., Kenemans, P. und Hilgers, J. (1998). 'Epitope fingerprinting' using overlapping 20-mer peptides of the MUC1 tandem repeat sequence. *Tumour Biol.* 19 Suppl. 1, 35-45.
- Skerra, A. und Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-41.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. und Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783-92.

- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7.
- Snijdewint, F.G., von Mensdorff-Pouilly, S., Karuntu-Wanamarta, A.H., Verstraeten, A.A., Livingston, P.O., Hilgers, J. und Kenemans, P. (2001). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 93, 97-106.
- Spencer, D.I., Price, M.R., Tendler, S.J., De Matteis, C.I., Stadie, T. und Hanisch, F.G. (1996). Effect of glycosylation of a synthetic MUC1 mucin-core-related peptide on recognition by anti-mucin antibodies. *Cancer Lett.* 100, 11-5.
- Spencer, D.I., Missailidis, S., Denton, G., Murray, A., Brady, K., Matteis, C.I., Searle, M.S., Tendler, S.J. und Price, M.R. (1999). Structure/activity studies of the anti-MUC1 monoclonal antibody C595 and synthetic MUC1 mucin-core-related peptides and glycopeptides. *Biospectroscopy* 5, 79-91.
- Spicer, A.P., Parry, G., Patton, S. und Gendler, S.J. (1991). Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism. *J. Biol. Chem.* 266, 15099-109.
- Stadie, T.R., Chai, W., Lawson, A.M., Byfield, P.G. und Hanisch, F.G. (1995). Studies on the order and site specificity of GalNAc transfer to MUC1 tandem repeats by UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from milk or mammary carcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* 229, 140-7.
- Statistisches Bundesamt (1997). Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland. Metzler Poeschel, Stuttgart.
- Statistisches Bundesamt (1998). Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland. Metzler Poeschel, Stuttgart.
- Studnicka, G.M., Soares, S., Better, M., Williams, R.E., Nadell, R. und Horwitz, A.H. (1994). Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Eng.* 7, 805-14.
- Swallow, D.M., Gendler, S., Griffiths, B., Kearney, A., Povey, S., Sheer, D., Palmer, R.W. und Taylor-Papadimitriou, J. (1987). The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Ann. Hum. Genet.* 51, 289-94.
- Syrigos, K.N., Deonarian, D.P. und Epenetos, A.A. (1999). Use of monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Hybridoma* 18, 219-24.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D.W. und Dalziel, M. (1999). MUC1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1455, 301-13.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B. und Winter, G. (1992). The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 227, 776-98.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4.

- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. und Johnson, K.S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.* 14, 309-14.
- Verhoeyen, M.E., Saunders, J.A., Price, M.R., Marugg, J.D., Briggs, S., Broderick, E.L., Eida, S.J., Mooren, A.T. und Badley, R.A. (1993). Construction of a reshaped HMFG1 antibody and comparison of its fine specificity with that of the parent mouse antibody. *Immunology* 78, 364-70.
- von Mensdorff-Pouilly, S., Gourevitch, M.M., Kenemans, P., Verstraeten, A.A., van Kamp, G.J., Kok, A., van Uffelen, K., Snijdwint, F.G., Paul, M.A., Meijer, S. und Hilgers, J. (1998). An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of circulating antibodies to polymorphic epithelial mucin (MUC1). *Tumour Biol.* 19, 186-95.
- von Mensdorff-Pouilly, S., Snijdwint, F.G., Verstraeten, A.A., Verheijen, R.H. und Kenemans, P. (2000a). Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int. J. Biol. Markers* 15, 343-56.
- von Mensdorff-Pouilly, S., Petrakou, E., Kenemans, P., van Uffelen, K., Verstraeten, A.A., Snijdwint, F.G., van Kamp, G.J., Schol, D.J., Reis, C.A., Price, M.R., Livingston, P.O. und Hilgers, J. (2000b). Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *Int. J. Cancer* 86, 702-12.
- Welschof, M., Terness, P., Kipriyanov, S.M., Stanescu, D., Breitling, F., Dörsam, H., Dübel, S., Little, M. und Opelz, G. (1997). The antigen-binding domain of a human IgG-anti-F(ab')₂ autoantibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1902-7.
- Winter, G. und Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-9.
- Winter, G. und Harris, W.J. (1993). Humanized antibodies. *Immunol. Today* 14, 243-6.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. und Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-55.
- Woodle, E.S., Thistlethwaite, J.R., Jolliffe, L.K., Zivin, R.A., Collins, A., Adair, J.R., Bodmer, M., Athwal, D., Alegre, M.L. und Bluestone, J.A. (1992). Humanized OKT3 antibodies: successful transfer of immune modulating properties and idiotype expression. *J. Immunol.* 148, 2756-63.
- Wright, A. und Morrison, S.L. (1994). Effect of altered CH2-associated carbohydrate structure on the functional properties and in vivo fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J. Exp. Med.* 180, 1087-96.
- Xing, P.X., Michael, M., Apostolopoulos, V., Prenzoska, J., Marshall, C., Bishop, J. und McKenzie, I.F.C. (1995). Phase I study of synthetic MUC1 peptides in breast cancer. *Int. J. Oncol.* 6, 1283-89.
- Xing, P.X., Apostolopoulos, V., Pietersz, G. und McKenzie, I.F. (2001). Anti-mucin monoclonal antibodies. *Front. Biosci.* 6, D1284-95.
- Zotter, S., Hageman, P.C., Lossnitzer, A., Mooi, W.J. und Hilgers, J. (1988). Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev.* 11-12, 55-101.