

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Januar 2019 (10.01.2019)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/008128 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2018/068316

(22) Internationales Anmeldedatum:
05. Juli 2018 (05.07.2018)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

17001166.2	07. Juli 2017 (07.07.2017)	EP
17001167.0	07. Juli 2017 (07.07.2017)	EP
18162666.4	19. März 2018 (19.03.2018)	EP

(71) Anmelder: AVA LIFESCIENCE GMBH [DE/DE]; Ferdinand-Porsche Str. 5/1, 79211 Denzlingen (DE).

(72) Erfinder: BIRSNER, Ulrich; Riesenweg 33, 79110 Freiburg i. Br. (DE). JUMAA, Hassan; Brühlweg 1/3, 89143 Blaubeuren (DE). KLAPPROTH, Holger; Kehlerstr. 12, 79018 Freiburg i. Br. (DE). KESSEMEIER, Marc A.; An der Rothhalde 9/1, 79312 Emmendingen (DE).

(74) Anwalt: STÜRKEN, Joachim; Kirchenhölzle 18, 79104 Freiburg im Breisgau (DE).

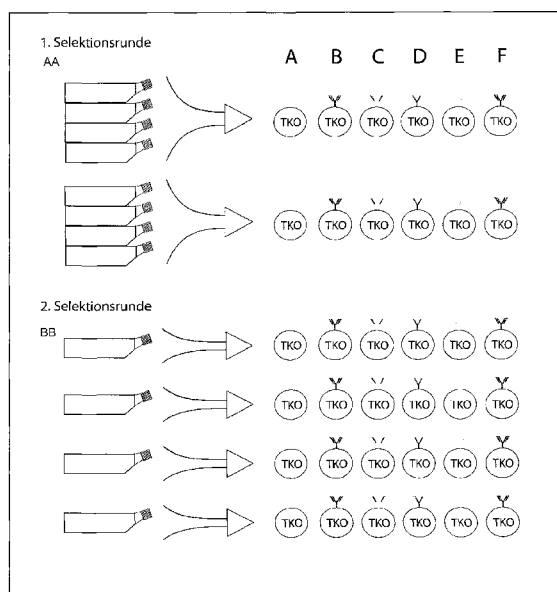
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: DIAGNOSTIC METHOD

(54) Bezeichnung: DIAGNOSTISCHES VERFAHREN

Figur 1



AA Selection round 1
BB Selection round 2

(57) Abstract: The invention relates to the field of producing, identifying and selecting biological binding molecules, such as antibodies or fragments thereof, as well as diagnostic methods using same within the context of diagnosing cancer diseases, such as, in particular, malignant B-cell neoplasms. The binding molecules are able to selectively bind to autonomously active or autonomously activated B-cell receptors, wherein the autonomously active or autonomously activated B-cell receptors are characterised by the presence of structural domains, to which the binding molecule selectively binds and which bring about the autonomously active or autonomously activated state of the B-cell receptors.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Herstellung, Identifizierung und Selektion von biologischen Bindemolekülen wie Antikörpern oder Fragmenten derselben, sowie diagnostische Verfahren unter Verwendung derselben im Rahmen der Diagnose von Krebserkrankungen wie insbesondere malignen B-Zell Neoplasien. Die Bindemoleküle sind in der Lage, selektiv an autonom aktive oder autonom aktivierte B-Zell Rezeptoren zu binden, wobei die autonom aktiven oder autonom aktivierten B-Zell Rezeptoren durch das Vorhandensein von strukturellen Domänen charakterisiert sind, an die das Bindemolekül selektiv bindet und die für den autonom aktiven oder autonom aktivierten Zustand der B-Zell Rezeptoren ursächlich sind.

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Diagnostisches Verfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Herstellung, Identifizierung und Selektion von Antikörpern oder Fragmenten derselben, sowie deren Verwendung im Rahmen der Diagnose von
5 Krebserkrankungen wie insbesondere malignen B-Zell Neoplasien.

Mit malignen B-Zell Neoplasien werden allgemein maligne Erkrankungen des blutbildenden oder des lymphatischen Systems bezeichnet. Sie umfassen Krankheitsbilder wie beispielsweise die Leukämie und zählen im weiteren Sinne zu den
10 Krebserkrankungen. Leukämien zeichnen sich durch eine stark vermehrte Bildung von funktionsuntüchtigen Vorläuferzellen der weißen Blutzellen aus, welche auch Leukämiezellen genannt werden. Diese Zellen breiten sich im Knochenmark aus, verdrängen dort die übliche Blutbildung und akkumulieren in der
15 Regel auch stark vermehrt im peripheren Blut. Sie können Leber, Milz, Lymphknoten und weitere Organe infiltrieren und dadurch deren Funktion beeinträchtigen. Die Störung der Blutbildung führt zu einer Verminderung der normalen Blutbestandteile, wodurch eine Anämie durch Mangel an Sauerstoff
20 transportierenden roten Blutkörperchen, ein Mangel an blutungsstillenden Blutplättchen, und ein Mangel an reifen funktionstüchtigen weißen Blutzellen entstehen können.

Je nach Krankheitsverlauf unterscheidet man zwischen akuter und chronischer Leukämie. Akute Leukämien sind lebensbedrohliche
25 Erkrankungen, die unbehandelt in wenigen Wochen bis Monaten zum Tode führen. Chronische Leukämien hingegen verlaufen meist über mehrere Jahre und sind im Anfangsstadium häufig symptomarm.

Die wichtigsten Leukämieformen sind:

- akute myeloische Leukämie (AML)
- 30 • chronische myeloische Leukämie (CML)
- akute lymphatische Leukämie (ALL)

- chronische lymphatische Leukämie (CLL).

Üblicherweise werden Leukämien im Rahmen einer Chemotherapie behandelt. Neuere Therapieformen setzen dabei vermehrt auf die Verwendung von monoklonalen Antikörpern wie z.B. GA101 (Obinutuzumab), der ähnlich wie Rituximab und Ofatumumab als CD20-Antikörper wirkt und zur Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) eingesetzt wird. Durch Verwendung dieser Antikörper kann die remissionsfreie Zeit um ca. 10 Monate verlängert werden.

- 10 Weitere maligne Erkrankungen des blutbildenden oder des lymphatischen Systems (maligne B-Zell Neoplasien) betreffen Lymphome, wie z.B. das Hodgkin Lymphom und die B-Zell Varianten der Non-Hodgkin Lymphome.

Werden Antikörper gegen Rezeptoren generiert, so werden in der Regel Tiere mit dem Rezeptor (aufgereinigt, kloniert, oder als Peptidfragmente) immunisiert und Hybridomazellen erzeugt. Diese Hybridomazellen produzieren Antikörper, die dann mittels ELISA oder mittels exprimierter Rezeptoren in Zellsystemen getestet werden. Dazu werden herkömmlich etablierte Zelllinien verwendet, da sich nur diese einfach kultivieren lassen. Dabei können Antikörper erzeugt werden, die relativ spezifisch an einen bestimmten Rezeptortyp (z.B. Anti-IgG1, Anti-IgE) binden. Hierbei kommt es jedoch häufig zu Kreuzreaktionen mit anderen Rezeptoren oder anderen Epitopen.

- 25 Für eine diagnostische Anwendung von BCR-Antikörpern ist es zumeist nicht ausreichend, nur einen Antikörper gegen den BCR im allgemeinen einzusetzen, da ein solcher Breitbandeinsatz zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Vielmehr wäre es wünschenswert, einen Antikörper bereitzustellen, der selektiv an einen Rezeptor bindet, der eine (pathophysiologische) Aktivierung wie insbesondere eine autonome Aktivierung aufweist. Ein solcher Antikörper ist im Stand der Technik nicht bekannt und ein
- 30

Verfahren zu dessen Herstellung oder Gewinnung durch Selektion existiert nicht.

Die Therapien des Standes der Technik zur Behandlung von Leukämien sind für den Patienten sehr belastend. Generell kann
5 man zusammenfassen, dass die unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie und die oftmals nicht ausreichende Wirkung der Medikamente zu einer hohen Todesrate dieser Erkrankung führen, denn es werden nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde Zellen des Immunsystems geschädigt. Zudem kommt es oftmals
10 nicht zu einer Heilung, sondern nur zur Schaffung eines gewissen Zeitraums, in welchem die Erkrankung demissionsfrei verläuft. Daher ist es wichtig für die Bestimmung und Auswahl zu behandelnder Patienten sowie für die Erstellung eines individuellen Therapieplans, diagnostische Mittel und
15 diagnostische Verfahren unter Verwendung derselben zur Verfügung zu haben, mit denen sich bestimmte Formen maligner B-Zell Neoplasien differenziell nachweisen lassen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher in der Bereitstellung alternativer Konzepte und Mittel wie
20 insbesondere alternativer Antikörper zur diagnostischen Verwendung, mit denen die bestehenden Probleme des Standes der Technik überwunden werden.

Bevor auf die einzelnen Aspekte der vorliegenden Erfindung detailliert eingegangen wird, erfolgt eine Klärung relevanter
25 Begriffe, die im Rahmen der vorliegenden Beschreibung verwendet werden.

Der vorliegend verwendete Begriff „Neoplasie“ bezeichnet generell eine Neubildung von Körpergewebe. Handelt es sich dabei um eine krankhafte oder bösartige Erscheinungsform,
30 spricht man von einer malignen Neoplasie. Bei einer malignen B-Zell Neoplasie handelt es sich also um eine bösartige und unkontrollierte Neugewebusbildung von B-Zellen, wobei diese

Begrifflichkeit alle B-Zell assoziierten Krebserkrankungen wie z.B. Leukämien und B-Zell Lymphome gleichermaßen betrifft.

Unter „biologischen Bindemolekülen“ werden vorliegend beispielsweise, aber nicht ausschließlich, Antikörper inklusive Fusionsproteinen verstanden. Vorteilshafterweise, und daher bevorzugt, ist ein solcher Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem IgG Antikörper, einem IgM Antikörper, einem humanisierten IgG Antikörper, und einem humanen Antikörper, in den die Erkennungssequenz des Epitops eingefügt ist. Ein derartiges Bindemolekül kann auch in Form eines funktionellen Fragments des gesamten Antikörpers bereitgestellt sein, z.B. ein Fab-Fragment. Ein Bindemolekül kann auch noch weitere Bereiche oder zusätzliche Entitäten umfassen, deren Verwendung im Rahmen diagnostischer Anwendungen vorteilhaft ist. Dies können unter Anwendung der Durchflusszytometrie Fluoreszenzfarbstoffe (z.B.: FITC, R-Phycoerythrin (R-PE), Allophycocyanin (APC)) oder auch Biotin sowie andere dem Fachmann bekannte Substanzen sein. Ferner kann ein Bindemolekül im Rahmen immunhistochemischer Verfahren auch zusammen mit substratumsetzenden Enzymen (z.B. HRP) verwendet werden. Des weiteren können für diagnostische Zwecke auch Fusionsproteine bereitgestellt werden, bei denen zur Detektion Fluoreszenzproteine wie z.B. das Green-Fluoreszenz-Protein (GFP) an dem FC-Teil des Antikörpers gekoppelt vorliegen.

Die Aufgabe des B-Zell Rezeptors oder B-Zell Rezeptorkomplexes (BCR) auf der Oberfläche einer B-Zelle ist es, Pathogene zu erkennen und zu binden, weshalb er quasi als membrangebundener Antikörper angesehen werden kann. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung des BCRs, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die letzten Endes zu einer Aktivierung der B-Zelle führt. Der BCR wird in großer Vielfalt in reifenden B-Zellen gebildet.

Die Entwicklung der B-Zellen findet beim Menschen und auch bei einigen anderen Säugern im Knochenmark bzw. in der fetalen Leber statt. Die Signale, die für das Entwicklungsprogramm notwendig sind, erhalten die sich entwickelnden Lymphozyten von so genannten Stromazellen. Bei der B-Zell-Entwicklung ist die Bildung eines funktionierenden B-Zell Rezeptors (die membrangebundene Form des 'Antikörpers') von entscheidender Bedeutung. Nur mit diesem Antigenrezeptor sind reife B-Zellen später in der Lage, fremde Antigene zu erkennen und durch die Bildung von entsprechenden Antikörpern an feindliche Strukturen zu binden. Die Antigenspezifität des Rezeptors wird durch die Verknüpfung bestimmter Gensegmente bestimmt. Die Segmente heißen V-, D- und J-Segmente, weshalb der Prozess als V(D)J-Rekombination bezeichnet wird. Dabei werden diese Segmente, die den Antigen-bindenden Teil des B-Zell-Rezeptors bilden, umgeordnet. Der gesamte Rezeptor besteht aus zwei identischen leichten Proteinketten und zwei identischen schweren Proteinketten, wobei die schweren mit den leichten Ketten jeweils über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Bei der VDJ-Rekombination werden zuerst die V-, D- und J-Segmente der schweren Kette des B-Zell Rezeptors verknüpft, danach die V- und J-Segmente der leichten Rezeptorkette. Nur wenn die Gene dabei erfolgreich umgeordnet werden, was als produktive Genumordnung bezeichnet wird, kann die Zelle in den jeweils nächsten Entwicklungsschritt übergehen.

B-Zellen, die während ihrer Ausreifung im Knochenmark auf körpereigene Antigene reagieren, sterben in den allermeisten Fällen durch Apoptose ab. Im Blut von gesunden Menschen lassen sich geringe Mengen an autoreaktiven Zellen, unter anderem gegen Thyreoglobulin oder auch Kollagen, nachweisen (Abul K. Abbas: *Diseases of Immunity* in Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto : *Robbins and Cotran - Pathologic Basis of Disease*. 7. Auflage. Philadelphia 2005, S. 224f).

Da der Prozess der Generierung eines solchen BCRs auf einer zufälligen Zusammenlagerung von Gensegmenten basiert, kann es vorkommen, dass der neu entstandene BCR unerwünscht körpereigene Strukturen erkennt und so „daueraktiviert“ wird.

5 Um die Entstehung eines derart „dauerhaft aktiven oder aktivierten“ BCRs zu verhindern, existieren verschiedene körpereigene Schutzmechanismen. Werden diese allerdings auf Grund einer krankhaften Veränderung der sich entwickelnden B-Zelle überwunden, kann sich daraus eine maligne oder auch
10 autoimmun manifestierende Erkrankung entwickeln.

Bei einem „autonom aktiven“ oder „autonom aktivierten“ BCR handelt es sich demgegenüber um eine besondere Art eines dauerhaft aktiven BCRs. Während die konventionelle Aktivierung von einem externen Antigen ausgeht (s.o.), resultiert der
15 autonom aktive BCR aus seiner Interaktion mit Membranstrukturen auf der Oberfläche derselben Zelle. Für das Krankheitsbild der CLL konnte eine die autonome Aktivierung auslösende Interaktion zwischen BCRs gezeigt werden, die sich zueinander benachbart auf der Oberfläche derselben Zelle befanden (M. Dühren-von
20 Minden et. al; Nature 2012). Ein weiteres Beispiel für einen autonom aktiven BCR stellt der pre-BCR dar, der im Laufe der Entwicklung einer B-Zelle als Entwicklungsscheck exprimiert wird. Neben der Interaktion benachbarter Rezeptoren (BCR:BCR) kann aber auch eine Interaktion zwischen Rezeptor und einem
25 Membranprotein (BCR:Membranprotein) zu einem autonom aktiven oder aktivierten BCR führen.

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Probleme beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass sich auf Tumorzellen von Patienten mit CLL B-Zell Rezeptoren befinden, die autonom aktiv
30 oder autonom aktiviert sind, und dass diese autonom aktiven oder aktivierten Rezeptoren durch das Vorhandensein gemeinsamer Epitope, die in entsprechenden Rezeptoren von gesunden Zellen desselben Patienten nicht nachgewiesen werden können,

gekennzeichnet sind. Diese Zellen können somit aufgrund der Anwesenheit von autonom aktiven B-Zell Rezeptoren, die durch das Vorkommen der oben genannten Epitope gekennzeichnet sind, durch einen Antikörper spezifisch erkannt und ggfs. therapiert werden, sodass gesunde B-Zellen ohne diese Charakteristik dadurch nicht in Mitleidenschaft gezogen werden, wodurch die Behandlung deutlich spezifischer und mit weniger unerwünschten Nebenwirkungen durchgeführt werden kann.

Im Rahmen der zahlreichen für die vorliegende Erfindung durchgeführten Experimente stellte sich jedoch überraschenderweise heraus, dass Antikörper mit besonderer Spezifität für diese modifizierten Rezeptorbereiche (Epitope) nicht mit üblichen Standardmethoden hergestellt und selektioniert werden können. Erst nachdem die experimentellen Bedingungen derart angepasst wurden, dass im Rahmen von Bindungsstudien gentechnisch veränderte Zellen eingesetzt wurden, deren modifizierte B-Zell Rezeptoren sich in einem nativen und aktivierten Zustand befanden, konnten geeignete Antikörper mit der gewünschten und erforderlichen Spezifität gewonnen werden. Mit anderen Worten ist es für die erfindungsgemäß vorgeschlagenen Lösungen von essenzieller Bedeutung, dass die in Bindungsstudien zur Selektion geeigneter diagnostischer Antikörper eingesetzten Zellen ihre modifizierten Bereiche (Epitope) in weitgehend nativer und aktivierter Form präsentieren. Hierbei zeigte es sich, dass sog. pro-/prä-B-Zellen aufgrund ihrer physiologischen Konstitution besonders geeignet sind. Die Bereitstellung derartig spezifischer Antikörper und funktioneller Fragmente derselben, die ebenfalls über dieses spezifische Bindungsverhalten verfügen, ermöglicht somit eine Tumor-spezifische Diagnose und eine sich ggfs. anschließende Therapie, die durch einen deutlich verbesserten Behandlungserfolg und, dank der Reduktion von unerwünschten systemischen Wirkungen, einen deutlich erhöhten Therapieerfolg gekennzeichnet ist.

Wie bereits erwähnt, werden durch die vorliegende Erfindung diagnostische Verfahren unter Verwendung biologischer Bindemoleküle in Form von Antikörpern oder funktionellen Fragmenten derselben und ein Verfahren zur Herstellung (Identifizierung und Selektion) solcher Bindemoleküle bereitgestellt, welche selektiv an die modifizierten Epitope autonom aktiver membranständiger Immunglobuline von B-Zell Neoplasien binden. Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung binden die biologischen Bindeproteine selektiv an solche autonom aktive B-Zell Rezeptoren auf B-Zellen, die bei immunologischen (z.B. Autoimmun-) Erkrankungen auftreten und mit diesen in ursächlichem Zusammenhang stehen (z.B. Allergien, Colitis ulcerosa, Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose, Psoriasis, Rheumatisches Fieber, Rheumatoide Arthritis, Zöliakie).

Für eine zielgerichtete, d.h. spezifische Immuntherapie stellen membranständige Immunglobuline gut geeignete Ziele dar. Während der B-Zell Entwicklung im Knochenmark generiert jeder einzelne B-Zell Vorläufer durch die Umlagerung von einzelnen Gen-Segmenten seinen eigenen und nahezu einzigartigen B-Zell Rezeptor (BCR).

Es sind zwei Varianten (Subset 2; Subset 4) des autonom aktiven BCRs bekannt, die sich hinsichtlich ihres jeweils charakterisierenden molekularen Motivs (Epitops) voneinander unterscheiden (Minici, C. et al., Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia, Nature Comm. (2017)). Dem Fachmann ist jedoch bekannt, dass es neben CLL-Subset 2 und Subset 4 BCRs auch weitere BCRs mit der Eigenschaft einer autonomen Aktivität gibt. Beide Varianten weisen unterschiedliche kurze Aminosäuresequenzen auf, die für diese Varianten jeweils spezifisch sind. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben den aufgeführten Subsets auch andere CLL-B-Zell Rezeptoren autonom

aktiv sind. Der für die autonom aktive Funktionalität des Rezeptors maßgebliche Bereich von Subset 2 kennzeichnet sich hierbei durch die Aminosäuresequenzen KLTVLRQPKA (SEQ ID NO. 1) und VAPGKTAR (SEQ ID NO. 2) der leichten Kette, während der für die autonom aktive Funktionalität des Rezeptors maßgebliche Bereich von Subset 4 durch die Aminosäuresequenzen PTIRRYYYG (SEQ ID NO. 3) und NHKPSNTKV (SEQ ID NO. 4) des variablen Teils der schweren Kette definiert wird. Die zur Erzeugung der murinen Antikörper im Rahmen der Immunisierung eingesetzten Sequenzen für die Subsets 2 und 4 sind in den SEQ ID NOS. 5 und 6 (vHC; LC) bzw. 7 und 8 (vHC; LC) angegeben. Der Vollständigkeit halber wird in SEQ ID NO. 17 (VSSASTKG) eine weitere Zielsequenz bzw. ein weiteres Epitop mit Spezifität für den variablen Teil der schweren Kette eines BCR des Subsets 4 angegeben. Neben den für die Ausbildung des autonom aktiven Zustand des BCR (Subset 4) verantwortlichen Zielsequenzen (Epitopen) gemäß SEQ ID NOS. 3 und 4 stellt die Sequenz gemäß SEQ ID NO. 17 somit eine weitere für diesen Subset charakteristische Eigenschaft dar.

Es wird darauf hingewiesen, dass das Auffinden und Charakterisieren der Subsets 2 und 4 als zwei Varianten des B-Zellrezeptors in Patienten mit kritischem Krankheitsverlauf auf der Untersuchung zahlreicher Einzelfallstudien beruht und daher nicht bedeutet, dass in einer möglichen Vielzahl anderer Subtypen des BCRs nicht dieselben vorliegend für die beiden bekannten Subtypen kennzeichnenden Zielsequenzen (Epitope) vorhanden sind und mit einem schweren Krankheitsverlauf korrelieren.

Obwohl sich Antikörper gegen beide dieser Subsets grundsätzlich mit Standardmethoden z.B. in Mäusen generieren lassen sollten, wurde überraschenderweise beobachtet, dass eine Immunisierung unter Verwendung von Peptiden nicht zur Bildung der gewünschten spezifischen Antikörper führt. Auch die Immunisierung unter

Verwendung einzelner Ketten des Rezeptors, wie z.B. der Verwendung der die modifizierten Sequenzbereiche umfassenden leichten Kette des BCR, brachte nicht den gewünschten Erfolg, weshalb Mäuse schließlich mit der rekombinant hergestellten löslichen Form des BCRs (vgl. SEQ ID NOS. 5 und 6) immunisiert wurden. Aus diesen Mäusen konnten anschließend Immunzellen mit der gewünschten Spezifität gewonnen und durch Zellfusion in Hybridoma-Zellen transformiert werden. Hierbei zeigte sich überraschenderweise, dass die aktiven Antikörper nicht mittels ELISA Test oder anderen Standard-Verfahren identifiziert werden konnten. Die in einem ersten Schritt mittels ELISA als potenzielle Bindungspartner identifizierten Klone erwiesen sich jedoch nach der Selektion als entweder unspezifisch bindend oder nicht an den autonom aktiven Rezeptor (einschließlich der SEQ ID NOS. 1 und 2) bindend und mussten daher verworfen werden.

Die bis zu dieser Erkenntnis eingesetzten Verfahren umfassten nicht nur Standardmethoden wie ELISA und SPR, sondern auch die intrazelluläre Expression in Fibroblasten mit einer intrazellulären FACS-Färbung als Bindekontrolle.

Nach aufwendigen weiteren Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Selektion erfindungsgemäß geeigneter Bindemoleküle weder mit freien Rezeptoren oder deren Fragmenten noch mit membranständigen oder intrazellulären Rezeptorfragmenten durchgeführt werden kann. Stattdessen wurde beobachtet, dass die Selektion nur unter Verwendung eines Zellsystems gelang, im Rahmen dessen der komplette und funktionelle B-Zell Rezeptor membranständig präsentiert wurde. Dabei ist es von großer Bedeutung, dass der BCR mit seinen modifizierten Bereichen (Epitope) in bzw. auf diesen Zellen autonom aktiv vorliegt bzw. präsentiert wird. Nur mit dieser Vorgehensweise, deren Bedingungen ein weitgehend physiologisch-natives *in situ* Szenario widerspiegeln, konnte ein Antikörper

identifiziert werden, der hochspezifisch und selektiv lediglich an die Tumorzellen bindet, d.h. an B-Zellen, die einen BCR mit einem Epitop auf ihrer Zellmembran exprimieren, welches für den Subset-2 oder Subset-4 dieses Zelltyps charakteristisch ist, nicht jedoch an andere B-Zellen oder deren Rezeptoren (BCRs), die definitionsgemäß keine B-Zellen des Subsets 2 oder 4 darstellen. Mit anderen Worten bindet das erfindungsgemäß vorgeschlagene Bindemolekül selektiv an autonom aktive oder autonom aktivierte B-Zell Rezeptoren, die durch das Vorhandensein von strukturellen Domänen oder Epitopen (Zielsequenzen) charakterisiert und für den autonom aktiven oder aktivierten Zustand der B-Zell Rezeptoren ursächlich sind. Das selektive Bindungsverhalten des erfindungsgemäß zur diagnostischen Verwendung vorgeschlagenen Bindemoleküls bedeutet, dass es nicht an Rezeptoren oder andere Membranstrukturen von B-Zellen bindet, die keine strukturelle Domäne oder kein Epitop aufweisen, die für den autonom aktiven oder aktivierten Zustand der B-Zellen ursächlich sind. Somit bindet das erfindungsgemäß vorgeschlagene Bindemolekül nicht selektiv an Zielsequenzen des B-Zell Rezeptors, die für den Subset 2 oder den Subset 4 nicht charakteristisch sind, und insbesondere nicht an einen B-Zell Rezeptor, der keine der Sequenzen SEQ ID NOS. 1, 2, 3 und/oder 4 aufweist.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Verwendung von arretierten pro-/prä-B-Zellen, die aus 'Triple Knockout'-Mäusen (TKO) gewonnen wurden, trotz der schwierigen Handhabung und der aufwendigen Gewinnung besonders gut geeignet sind, diese Rezeptoren zu exprimieren und im Rahmen eines Testsystems zur Identifikation dieser Rezeptoren verwendet zu werden. Das Stadium der pro-/prä-B-Zellen ist natürlicherweise dazu ausgelegt, die Reifung und Selektion der BCRs durchzuführen, und die Zellen dieses Stadiums sind aufgrund ihrer Enzymausstattung (Chaperone etc.) besonders geeignet, auch „schwierige“ BCR-Komponenten korrekt zu falten und auf Ihrer Oberfläche in hinreichend

physiologisch nativer Form darzustellen. Durch die nachfolgend dargelegten Deletionen (Knockouts) wird verhindert, dass durch eine Rekombination oder die Verwendung der Surrogaten Leichten Kette („surrogate light chain“) eine Veränderung des gewünschten BCR stattfindet. Durch Verwendung dieser Zellen oder dieses Zelltyps arretierter pro-/prä-B-Zellen zur Expression und Präsentation von BCRs im Rahmen einer Selektion von Antikörpern mit selektiv-spezifischem Bindungsverhalten gegenüber autonom aktiven oder aktivierten B-Zell Rezeptoren wird eine Selektionsplattform bereitgestellt, die im Vergleich mit den im Stand der Technik herkömmlich zur Selektion eingesetzten Systemen durch eine sehr viel höhere Qualität gekennzeichnet ist, welche den hohen Aufwand der Verwendung von primären TKO Zellen, bzw. deren Kultivierung über wenige Passagen rechtfertigt.

Nach der zuvor beschriebenen Selektion geeigneter Hybridomazellen konnten die für diagnostische Zwecke geeigneten Antikörper in Form monoklonaler Antikörper in größeren Mengen gewonnen werden. Durch Sequenzierung der DNA dieser Zellen konnte die Bindungsstelle des Antikörpers ermittelt werden (vgl. SEQ ID NOS. 9 und 10). Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und sind auch kommerziell verfügbar. Hierbei ist es vorteilhaft, wenn man eine größere Zahl an Hybridomazellen gewinnt und diejenigen mit der besten Bindeaktivität (Spezifität und Bindestärke/Affinität) auswählt.

Durch die somit erhaltene genetische Information über die Bindungsstelle wurde die kodierende Sequenz in ein Expressionsplasmid eingebracht, um auf üblichem Weg der Rekombination einen monoklonalen Antikörper mit der gewünschten Spezifität zu erzeugen. Diese Antikörper zeigten aufgrund ihrer einzigartigen Spezifität eine im Vergleich mit herkömmlichen diagnostischen Mitteln bessere diagnostische Spezifität. Dem Fachmann ist klar, dass sich diese rekombinanten Antikörper auf biotechnologischem Weg in großen Mengen herstellen lassen. Zur

Aufreinigung der synthetisierten Antikörper können standardisierte Verfahren angewendet werden, wie z.B. Kombinationen aus Präzipitation, Filtration und Chromatographie, was dem Fachmann hinreichend bekannt ist, wobei beachtet werden sollte, die Antikörper nicht zu denaturieren und mögliche Fremdsubstanzen wie z.B. Proteine, Pyrogene und Toxine quantitativ zu entfernen.

Bevorzugt werden die gewünschten Antikörper in Systemen exprimiert, in denen der Antikörper eine Glykosylierung wie insbesondere eine humane Glykosylierung erfährt. Solche Systeme sind dem Fachmann hinreichend bekannt und schließen die Verwendung von Insektenzellen (S2-Zellen), Säugerzellen (CHO-Zellen) und, besonders bevorzugt, humane Zellen wie zum Beispiel Zellen des Typs HEK293T ein.

Der hinreichend aufgereinigte Antikörper kann an sich schon therapeutisch wirksam sein, sofern er einen Isotyp aufweist, der eine spezifische Immunantwort hervorruft, wie z.B. ein IgG Subtyp, der über Fc-Rezeptoren zu einer Immunantwort gegen den Tumor führt.

Der Antikörper kann aber auch als Fragment vorliegen. Wie bei einem vollständigen Antikörper wird das zu verwendende Fragment für eine diagnostischen Verwendung mittels Kopplung an z.B. einen Fluoreszenzfarbstoff, an Biotin, und/oder an eine enzymatische Untereinheit auf üblichem Wege modifiziert.

Zur diagnostischen Verwendung wird der Antikörper bevorzugt in standardisierten Verfahren wie im Rahmen einer Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie eingesetzt. Vorzugsweise weisen die für diagnostische Zwecke vorgeschlagenen Antikörper, biologischen Bindemoleküle oder funktionellen Fragmente derselben ein murines Grundgerüst auf. Eine Detektion im Durchflusszytometer erfolgt vorzugsweise mittels sekundärer Antikörper, oder alternativ bevorzugt

mittels direkt an die Antikörper, biologischen Bindemoleküle oder funktionellen Fragmenten derselben gebundene Fluoreszenzfarbstoffe.

5 Zur stabilen Lagerung kann es von Vorteil sein, den Antikörper oder dessen Fragmente in einer stabilisierten Form bereitzustellen, was dementsprechend auch bevorzugt ist. Dazu kann z.B. eine Trocknung mit einem stabilisierenden Salzpuffer erfolgen. Ein solcher Puffer kann z.B. eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) sein, wie dem Fachmann bekannt ist. Eine
10 geeignete Trocknungsform ist z.B. Gefriertrocknen oder Lyophilisieren.

Einzelne Aspekte der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Bevor detaillierte Erläuterungen zum experimentellen Vorgehen
15 dargelegt werden, sei auf die nachfolgenden Ausführungen verwiesen.

Die Herstellung und Identifizierung von Antikörpern, die selektiv an die modifizierten B-Zell Rezeptoren binden, war von größeren und unvorhergesehenen Problemen gekennzeichnet. Die
20 Erzeugung der Hybridome erfolgte mittels Standardmethoden. Der Überstand von den Hybridomgruppen wurde gepoolt und mittels ELISA auf positive Bindungsereignisse untersucht (lösliche B-Zell Rezeptoren auf der ELISA-Platte). Positive Pools wurden vereinzelt und die individuellen Klone getestet. Dabei wurden
25 im ELISA überraschenderweise keine positiven Klone mehr identifiziert. Die positiven ELISA Signale der Poole stellten sich im Nachhinein als unspezifische Bindungen heraus.

Um bessere Epitope für die Erkennung der Antikörper zu schaffen, wurde nun die leichte Kette des BCRs in Fibroblasten
30 exprimiert. Dies sollte die korrekte Faltung des Proteins gewährleisten, welches das für das autonome Signal verantwortliche Motiv (Epitop) trägt. Mit diesen Zellen wurden

intrazelluläre FACS-Analysen durchgeführt. Es konnte kein positiver Klon (Antikörper) identifiziert werden.

Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Experiment RAMOS Zellen (humane Burkitt Lymphom Zelllinie) modifiziert, so dass
5 diese funktionelle modifizierte BCRs aufwiesen. Damit sollte die vollständig korrekte Biosynthese, Faltung und Modifikation des BCRs gewährleistet sein. Dazu wurde der zelleigene BCR mittels CRISPR deletiert und dann der „CLL-Rezeptor“ molekularbiologisch rekonstituiert (Elektroporation von CMV-
10 Vektoren). Diese Zellen wurden zum Testen von positiven Bindungsereignissen verwendet. Auch hier war mittels FACS kein positiver Klon nachweisbar.

Überraschenderweise brachte dagegen die Verwendung von murinen TKO ('Triple Knock-out') Zellen (arretierte pro-/prä-B-Zellen),
15 in die der CLL-Rezeptor mittels eines Genshuttles eingebracht wurde, einen positiven Klon. Und das, obwohl das humane Zellsystem dies nicht gewährleisten konnte. Diese Zellen weisen als Besonderheit folgende Knockouts in ihrem Genom auf:

- der Knockout von RAG2 verhindert die somatische
20 Rekombination von eigenen schweren und leichten Immunglobulinketten, weshalb die endogene Bildung eines BCR ausgeschlossen ist. Dies führt zu einer Arretierung, einem Blockieren oder 'Einfrieren' entsprechend behandelter B-Zellen in diesem Entwicklungsstadium. Es ist bekannt, dass
25 RAG1 und RAG2 einen Komplex bilden, der das übliche VDJ-Rearrangement erst ermöglicht, weshalb ein Knockout von RAG1 ein gleich wirkendes Mittel und somit eine Alternative zum Knockout von RAG2 darstellt und von der erfindungsgemäßen Lehre umfasst ist.
- 30 - die Deletion von Lambda5, einem Teil der Surrogaten Leichten Kette, verhindert die Formation eines prä-BCR. Da der prä-BCR autonom aktiv ist, würde dies den Nachweis

eines autonom aktiven Rezeptors stören. Da hier ein neuer BCR in die Zelle kloniert wird, ist ein prä-BCR unerwünscht, da dieser mit der erwünschten Schwere Kette (HC) in Verbindung mit der unerwünschten Surrogaten Leichten Kette auf der Oberfläche erscheinen und die Selektion stören würde.

- der Knockout von SLP65, einem Adapterprotein von zentraler Bedeutung im BCR-Signalweg, verhindert die Aktivierung der TKO Zelle durch einen eventuell rekonstruierten BCR.

Die Kombination der Knockouts von RAG2 oder RAG1 und Lambda5 führt zu einer Blockade im Übergang von dem pro-B Zell-Stadium hin zum prä-B Zell-Stadium, welches klassischerweise mit der beginnenden Umlagerung der VDJ-Segmente der schweren Kette (HC) gekennzeichnet ist. Daher handelt es sich um pro-/prä-B Zellen.

Für die Expression des BCR und Selektion des geeigneten Antikörpers ist der Knockout von RAG2 oder RAG1 und Lambda5 ausreichend. Durch die Rekonstitution mit dem induzierbaren SLP65 kann die Aktivität des BCR gemessen werden.

Die Methode der Wahl hierbei ist die Messung des Ca-flux nach Induktion des SLP65 mittels FACS-Analyse und der Verwendung eines Ca^{2+} abhängigen Farbstoffes wie Indo-1. Diese Methoden sind dem Fachmann bekannt (s. (M. Dühren-von Minden et. al; Nature 2012)).

Durch die ersten beiden Knockouts wurde sichergestellt, dass nur der „BCR of Interest“ auf der Oberfläche exprimiert wird. Durch die Verwendung eines induzierbaren SLP-65, mit welchem die Zellen rekonstituiert wurden, können überdies die Funktion der exprimierten BCRs charakterisiert und somit der autonom aktive Zustand der BCRs auf der Oberfläche vor der Selektion verifiziert werden.

Mit diesen Zellen als „Target“ gelang es nun mittels FACS, einen Antikörper zu identifizieren, der an den modifizierten

Bereich, durch welchen die autonome Aktivierung des BCR begründet und gekennzeichnet ist, spezifisch bindet. Und dies, obwohl eine Bindung an den gleichen Rezeptortyp in RAMOS Zellen nicht erfolgreich war!

5 Dazu wurden die Zellen, welche den „BCR of Interest“ auf der Oberfläche trugen, zunächst mit den gepoolten Überständen inkubiert, und nach einigen Waschschritten wurden die gebundenen Antikörper mittels Sekundärantikörpern detektiert. Für eine spezifische Selektion wurden TKO-Zellen (TKOs)
10 verwendet, welche verschiedene Versionen des „BCR of Interest“ exprimierten. Die in Figur 1 dargestellte Selektionsmatrix ist exemplarisch für die Selektion eines CLL-Subset 2 BCRs und diente der Identifizierung und Selektion positiver Klone. Zur einfacheren Identifikation wurden die Überstände der Hybridome
15 gepoolt und gemessen. Die Gruppen, die eine Bindung zeigten, wurden vereinzelt und die Überstände der jeweiligen Hybridome auf Bindung getestet.

Die Bestätigung, dass der selektierte Antikörper spezifisch an den modifizierten BCR und nicht an andere BCR Varianten bindet,
20 erfolgte mittels zweier Blindproben, d.h. mit Zellen ohne BCR (s. Figur 1 A) sowie mit Zellen mit Non-CLL-BCR (s. Figur 1 E). Primäre B-Zellen aus dem Blut von Leukämiepatienten wurden mittels FACS auf Bindung untersucht. Der selektionierte Antikörper war in der Lage, spezifisch diejenigen BCRs zu
25 identifizieren, welche die Zielstruktur aufwiesen. Dies wurde auf genomischer Ebene bestätigt. Proben ohne diese Zielstruktur wiesen keine Bindung auf.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen unter Berücksichtigung der Figur 1 näher erläutert.

Beispiel 1

Den Ausgangspunkt für die Herstellung von Triple-Knockout-Zellen (TKO) bilden transgene Mäuse, welche einen jeweiligen Knockout für die Gene Lambda5, RAG2 und SLP-65 aufweisen
5 (Dühren von Minden et al., 2012, Nature 489, p309-313). Die Erstellung solcher Mäuse ist dem Fachmann bekannt und gehört zum Stand der Technik. Für die Gewinnung der Zellen wurde den Mäusen nach ihrer Tötung das Knochenmark der Oberschenkelknochen extrahiert. Die so gewonnenen Zellen wurden
10 anschließend unter Bedingungen in Kultur genommen, die das Überleben von pro-/prä-B-Zellen begünstigen (37°C, 7,5% CO₂, Iscoves Medium, 10% FCS, P/S, murinem IL7). Nach mehreren Passagen wurden zur Kontrolle eine FACS-Sortierung durchgeführt, die pro-/prä-B-Zellen sortiert und anschließend
15 wieder in Kultur genommen. Die dazu verwendeten Marker sind dem Fachmann bekannt.

Für die Rekonstitution mit einem 'BCR of Interest' wurden die entsprechenden, für die schweren (HC) und leichten (LC) Ketten kodierenden Sequenzen synthetisiert und dann jeweils in einen
20 CMV-Promotor aufweisende Expressionsvektoren kloniert. Diese wurden mittels Lipofektion in die Verpackungszelllinie (Phoenix-Zelllinie) eingebracht. Nach einer 36 Stunden andauernden Inkubation wurde der Virusüberstand abgenommen und für eine Spinfektion der TKO Zellen verwendet. Sowohl die
25 Arbeiten zur Gewinnung der Überstände als auch die Spinfektion der TKO sind weitläufig bekannte Verfahren und dem Fachmann bekannt.

Die strukturellen Besonderheiten von Subset-2 B-Zell Rezeptoren wurden der entsprechenden Literatur entnommen (s.o.).
30 Exemplarische CLL-Subset 2 VH und vollständige LC DNA-Segmente wurden von einem Lohnhersteller in einem Standardverfahren synthetisiert. Diese wurden dann mit einem murinen IgG1-Konstantensegment mittels PCR fusioniert und in einen CMV-

Vektor kloniert. Die Sequenz des fertigen Vektors wurde mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt.

CLL-Subset 2 VH (SEQ ID NO. 5):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIISSSSYIYYADS

5 VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDQNAMDVWGQGTTVTVSS

CLL-Subset 2 LC (SEQ ID NO. 6):

SYELTQPPSVSVAPGKTARITCAGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSG

SNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHPWVFGGGTKLTVLRQPKAAPSVTLFPPSSE

ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK

10 SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Für die Expression des CLL-Subsets 2 IgG1 wurde ein humanes zelluläres Expressionssystem basierend auf HEK293T Zellen genutzt. Für die Transfektion wurde ein auf Polyethylenimin (PEI) basierendes Protokoll angewendet. Nach mehreren Passagen wurde der Überstand gepoolt, und das in dem vereinigten Zellüberstand enthaltende Medium wurde mittels Protein G Säulchen aufgereinigt. Die Reinheit und Qualität der löslichen Subset-2 IgG1 wurde mittels Westernblot bestimmt.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgte nach dem Standardverfahren in Mäusen und der anschließenden Generierung von Hybridoma-Zellen. Das Screening nach positiven Klonen erfolgte nicht wie herkömmlich mittels ELISA. Da es sich bei der Zielstruktur um einen membranständigen Rezeptor handelt, ist es von zentraler Bedeutung, die Bindung der potentiellen Antikörper auch in einem zellulären System, d.h. unter weitgehender Wahrung der für diesen Zelltyp nativen zellphysiologischen Zustände, zu validieren. Es wurden zunächst Gruppen von gepoolten Überständen mittels FACS-Analyse auf Bindungsereignisse untersucht. Dazu wurden verschiedene CLL-Subset 2 BCR Varianten auf der Oberfläche einer Zelllinie (TKO) exprimiert, welche selber keinen BCR exprimieren kann. So

konnten zunächst die Überstände identifiziert werden, deren Antikörper eine Bindung aufzeigten. Anschließend wurden die Überstände der einzelnen Hybridom-Klone hinsichtlich ihrer Bindung eingehender untersucht, um auf diese Weise
5 hochspezifische Klone mit hoher Affinität zu identifizieren.

Für das Screening-Verfahren wurden im Rahmen der vorhergehenden Transformation unterschiedliche Vektoren für die folgenden Kombinationen aus schwerer Kette (HC) und leichter Kette (LC) der entsprechenden CLL-BCRs eingesetzt, wobei diese
10 Kombinationen auf der Oberfläche des BCR-Rekonstitutionssystems verwendet wurden:

- Kontrolle (Transformationsvektor ohne BCR) (s. Fig.1 A)
- Vektor mit für den CLL-Subset 2 typischer HC / LC (s. Fig. 1 B)
- 15 • Vektor mit einer non-CLL-Subset 2 HC / einer für den CLL-Subset 2 typischen LC (ohne Zielmotiv; Epitop) (s. Fig. 1 C)
- Vektor mit für den CLL-Subset 2 typischer HC / einer non-CLL-Subset 2 LC (s. Fig. 1 D)
- 20 • Vektor mit einer non-CLL-Subset 2 HC / einer non-CLL-Subset 2 LC (s. Fig. 1 E)
- Vektor mit für den CLL-Subset 2 typischer HC / LC (einschließlich Mutation R110G (Zielmotiv)) (s. Fig. 1 F).

Diese Vorgehensweise der Selektion ist in Figur 1 schematisch
25 am Beispiel der CLL-Subset 2 BCRs veranschaulicht, wobei sich die Bezeichnung 'TKO' auf TKO-Zellen (s.o.) bezieht.

In der 1. Selektionsrunde wurden Überstände mehrerer Klone vereinigt und hinsichtlich ihres Bindungsprofils an die Selektionsmatrix untersucht. Ein positives Bindungsprofil ist

gegeben, wenn sich eine spezifische Bindung an den „BCR-of-
Interesst“ zeigt. Gruppen, die ein solches Profil zeigten,
wurden vereinzelt, und das Bindungsprofil der einzelnen Klone
wurde im Rahmen einer zweiten Selektionsrunde nochmals auf der
5 Selektionsmatrix charakterisiert. Die Bindung der monoklonalen
Antikörper wurde unter Anwendung eines FACS-Bindungsassays
unter Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Anti-Mouse-IgG
Antikörpers verifiziert. Es bezeichnen: A) kein BCR
(Kontrolle); B) ein CLL-Subset2 typischer BCR; C) ein BCR mit
10 willkürlicher schwerer Kette und einer CLL-Subset2 typischen
leichten Kette; D) ein BCR mit einer CLL-Subset2 typischen
schweren Kette und einer willkürlichen leichten Kette; E) ein
BCR mit willkürlicher schwerer und leichter Kette (Kontrolle;
nicht CLL-Subset2 typischer BCR); F) ein CLL-Subset2 typischer
15 BCR mit einer Mutation im Zielmotiv (R110G) (Kontrolle).

Aufgrund des Befundes, dass der Antikörper nur an die Zellen mit
den Zielstrukturen bindet (CLL-Subset2 BCR; Fig. 1B), kann
gefolgert werden, dass hier ein Antikörper vorliegt, der
spezifisch an Zellen mit autonom aktiven Rezeptoren bindet.

20 Hierbei zeigte sich, dass die Verwendung von Zellen, die sich im
pro-/prä-Stadium der B-Zell Entwicklung befinden, für die zum
Nachweis benötigte exakte Expression des BCR notwendig ist. Diese
Zellen sind entwicklungsgenetisch eingerichtet, um neue BCR durch
exakte Faltung und Expression auf ihrer Oberfläche darzustellen.
25 Durch die Inaktivierung (Knockout) von RAG2 und Lambda5 wird die
Expression eines endogenen BCR bzw. prä-BCR verhindert. Die
Deletion von SLP65 und die anschließende Rekonstruktion eines
induzierbaren SLP65 ermöglicht es, das Aktivitätsniveau des "BCR
of Interest" zu charakterisieren.

30 Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz der mittels Selektion
ausgewählten monoklonalen Antikörper wurde aus den einzelnen
Hybridom-Klonen die mRNA isoliert, daraus cDNA generiert und
diese mittels Anchor-PCR amplifiziert (Rapid expression cloning

of human immunoglobulin Fab fragments for the analysis of antigen specificity of B cell lymphomas and anti-idiotypic lymphoma vaccination; Osterroth F, Alkan O, Mackensen A, Lindemann A, Fisch P, Skerra A, Veelken H., J Immunol Methods
 5 1999 Oct 29; 229(1-2):141-53).

Für die Generierung der monoklonalen Antikörper wurden neben den kompletten Immunglobulinen auch synthetische Peptide verwendet, welche die Regionen für die Fähigkeit eines autonomen Signals repräsentierten.

10 Der spezifische monoklonale Antikörper gegen Subset-2 wurde sequenziert. Dabei wurden die folgenden Aminosäuresequenzen bestimmt, wobei die SEQ ID NO. 9 den variablen Teil der schweren Kette (HC), und die SEQ ID NO. 10 den variablen Teil der leichten Kette (LC) betreffen, und wobei die markierten
 15 Bereiche - in der angegebenen Reihenfolge - CDR 1, 2 und 3 bezeichnen.

SEQ ID NO. 9 (AVA-mAb01 HC)

QVQLQQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTSYGIHWVRQSPGKGLEWLGVIIWRGGGTDSNAAF
 MSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARSRYDEEESMNYWGQGTSVTVSS

20 SEQ ID NO. 10 (AVA-mAb01 LC)

QIVLTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFS
 GSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWNTPTPTFGAGTKLELK

Die mit CDR1, CDR2 und CDR3 korrespondierenden Teilsequenzen der schweren Kette gemäß SEQ ID NO. 9 sind in den SEQ ID NOS.
 25 11 bis 13 angegeben, während die mit CDR1, CDR2 und CDR3 korrespondierenden Teilsequenzen der leichten Kette gemäß SEQ ID NO. 10 in den SEQ ID NOS. 14 bis 16 dargestellt sind.

SEQ ID NO. 11 (AVA-mAB01 CDR1 HC)

GFSLT

30 SEQ ID NO. 12 (AVA mAB01 CDR2 HC)

IWRGGGT

SEQ ID NO. 13 (AVA mAB01 CDR3 HC)
ARSRYDEEESMNY

5 SEQ ID NO. 14 (AVA mAB01 CDR1 LC)
GNIHSY

SEQ ID NO. 15 (AVA mAB01 CDR2 LC)
NAKT

SEQ ID NO. 16 (AVA mAB01 CDR3 LC)
QHFWNTPPT

10 Die oben beschriebene Vorgehensweise ist exemplarisch für die Generierung von gegenüber CLL-Subset 2 spezifischen Antikörpern. Der gleiche Prozess wurde auch unter Verwendung von spezifischen Sequenzen und Isotypen für Subset 4 durchgeführt.

15 Exemplarische CLL-Subset 4 VH und vollständige LC DNA-Segmente wurden von einem Lohnhersteller in einem Standardverfahren synthetisiert. Diese wurden dann mit einem murinen IgG1-Konstantensegment mittels PCR fusioniert und in einen CMV-Vektor kloniert. Die Sequenz des fertigen Vektors wurde mittels
20 Sanger-Sequenzierung bestätigt.

CLL-Subset 4 HC (SEQ ID NO. 7):

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWTWIRQSPGKGLEWIGEINHSGSTTYNPSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGDT**PTIRRYYYYG**MDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAQLQSSGLY
25 **SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV****NHKPSNTKV**DKKC

Die fett markierten Bereiche bezeichnen die Zielsequenzen (Epitope) des variablen Teils der schweren Kette des BCR des Subsets 4, die für dessen autonom aktiven Zustand verantwortlich sind (vgl. SEQ ID NOS. 3 und 4).

CLL-Subset 4 LC (SEQ ID NO. 8):

DIVMTQSPLSLPVTILGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSDRDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQGTHWPPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
5 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Beispiel 2

Unter Anwendung der erfindungsgemäßen Lehre wurde einem Patienten eine geringe Menge peripheres Blut entnommen. Für die
10 Analyse wurden 100 µl Blut in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml PBS-BSA Pufferlösung aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe in einer Eppendorf Zentrifuge 5804 bei 1500 U/Min für eine Zeitdauer von fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment wurde gut durchgemischt.
15 Anschließend wurde der Antikörper hinzugegeben. Gegen folgende Oberflächenparameter wurde gefärbt: 1) CD19-FITC, 2) CD5-PE, und 3) der CLL SubSet-2 spezifische Antikörper (APC), bevor die Ansätze 15 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Danach wurde die Lyse eingeleitet, und die Erythrozyten
20 wurden lysiert. Wie zuvor schon beschrieben, wurde zwei mal mit PBS-BSA Pufferlösung gewaschen, und die Zellen wurden in 500 µl 0,1% PBS-BSA Pufferlösung aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur Messung am Durchflusszytometer bei 2-8°C im Dunkeln aufbewahrt.

25 Die Analyse am FACS erfolgte auf einem BD Calibur. Die Einstellung der einzelnen Laser- und Detektionsparameter erfolgte nach Anweisung des Geräteherstellers und ist dem Fachmann hinreichend bekannt. Die Rohdaten der Analyse wurden anschließend mittels FlowJo-Analyse Software ausgewertet.
30 Zunächst wurde die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC-Blot ausgewählt und markiert. Für diese Auswahl wurde sich dann auf die CD19-positiven B-Zellen fokussiert und nach der Bindung des

Subset-2 spezifischen Antikörpers hin analysiert. In Abbildung 2 ist exemplarisch eine solche Analyse am Beispiel der Verwendung des Subset-2 spezifischen Antikörpers dargestellt. In einem ersten Schritt wurden die CD19 positiven B-Zellen für die weitere Analyse ausgewählt (linkes Panel). Diese wurden dann auf die Bindung des spezifischen Antikörpers hin untersucht (rechtes Panel).

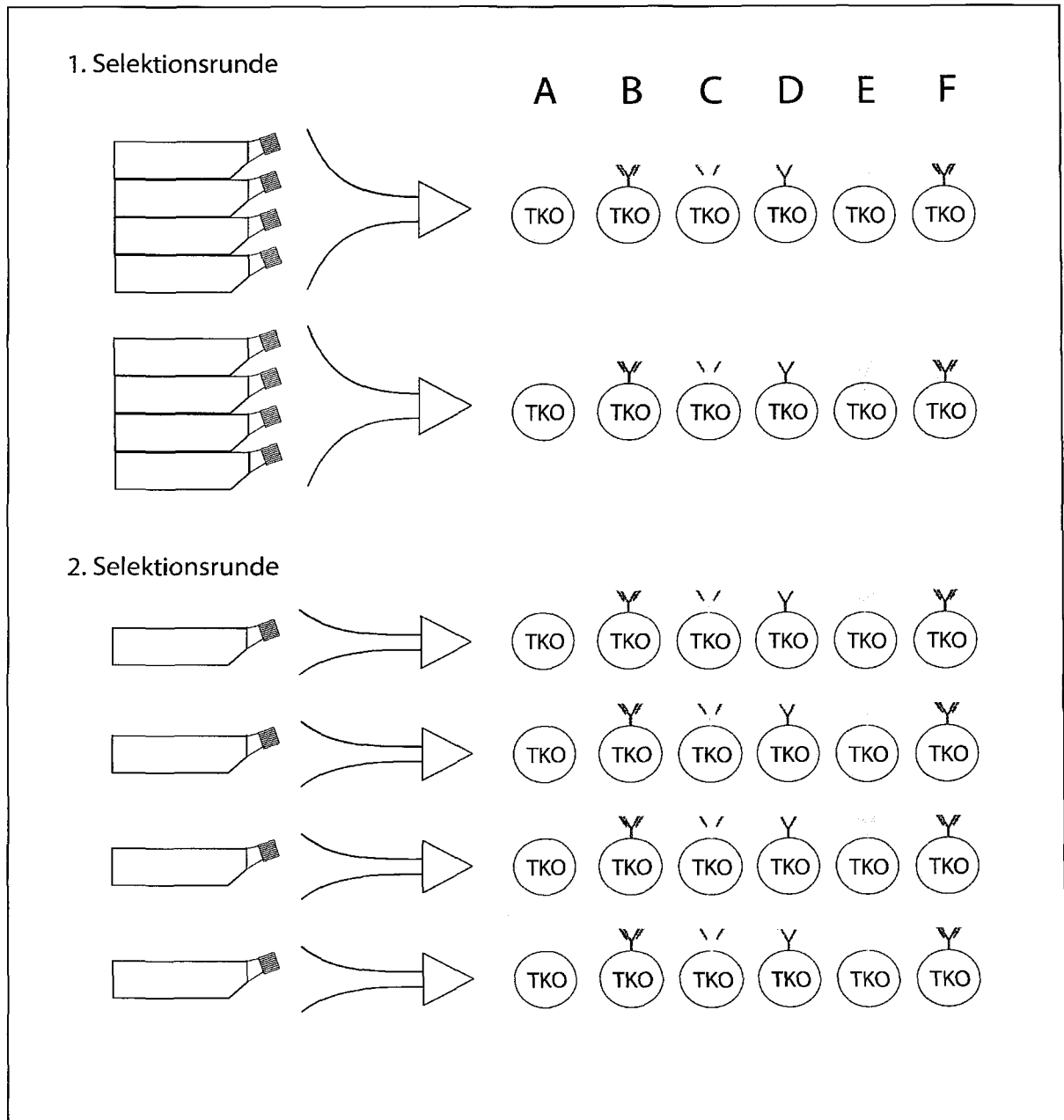
Patentansprüche

1. Diagnostisches Verfahren zur Erkennung autonom aktiver oder autonom aktivierter B-Zell Rezeptoren in einer Probe unter Verwendung eines biologischen Bindemoleküls, welches
5 selektiv an autonom aktive oder autonom aktivierte B-Zell Rezeptoren bindet, wobei die autonom aktiven oder autonom aktivierten B-Zell Rezeptoren durch das Vorhandensein von strukturellen Domänen oder Epitopen charakterisiert sind, an die das Bindemolekül selektiv bindet und die für den
10 autonom aktiven oder autonom aktivierten Zustand der B-Zell Rezeptoren ursächlich sind.
2. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül selektiv an Zielsequenzen des B-Zell Rezeptors bindet, die für den
15 Subset 2 oder den Subset 4 charakteristisch sind.
3. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül an einen Bereich des B-Zell Rezeptors bindet, der durch das Vorhandensein einer Aminosäuresequenz charakterisiert ist, welche ausgewählt
20 ist aus der Gruppe bestehend aus
- (i) KLTVLRQPKA (SEQ ID NO. 1),
 - (ii) VAPGKTAR (SEQ ID NO. 2),
 - (iii) PTIRRYYYG (SEQ ID NO. 3), und
 - (iv) NHKPSNTKV (SEQ ID NO. 4).
- 25 4. Diagnostisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül ein Antikörper oder ein funktionelles Fragment desselben ist.
- 30 5. Diagnostisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül mindestens einen Fluoreszenzfarbstoff umfasst.

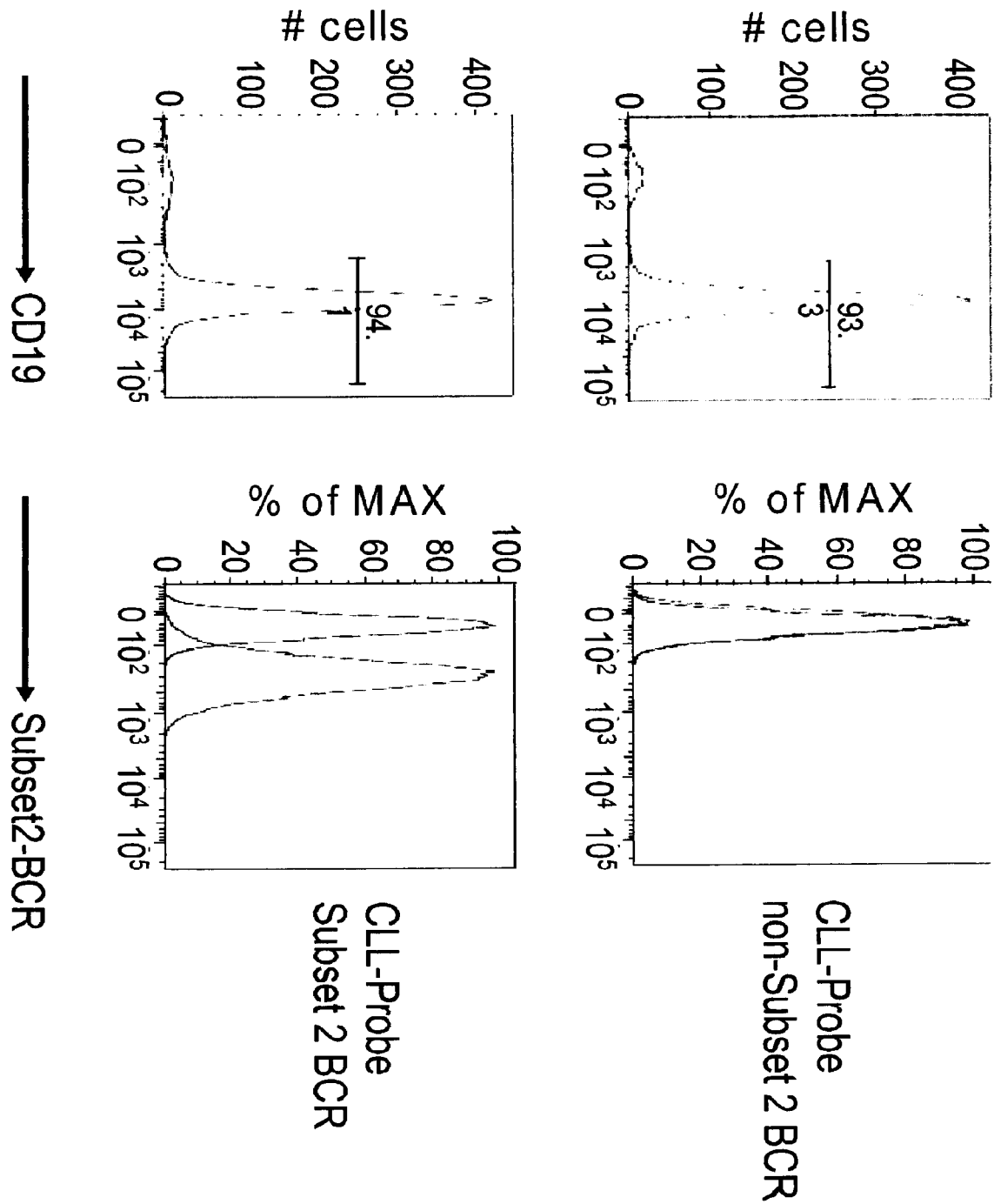
6. Diagnostisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül nicht an Rezeptoren oder andere Membranstrukturen von B-Zellen bindet, die keine strukturelle Domäne oder kein Epitop aufweisen, die für den autonom aktiven oder autonom aktivierten Zustand der B-Zell Rezeptoren ursächlich sind.
7. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül nicht an Zielsequenzen des B-Zell Rezeptors bindet, die für den Subset 2 oder den Subset 4 nicht charakteristisch sind.
8. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül nicht an einen B-Zell Rezeptor bindet, der keine der Sequenzen gemäß Darlegung in Anspruch 3 aufweist.
9. Diagnostisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Diagnose von malignen B-Zell Neoplasien.
10. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Bindemoleküls gemäß Definition in einem der Ansprüche 1 bis 9 in üblicher Weise, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül durch Immunisieren mit einem IgG Molekül, welches die Aminosäuresequenzen des variablen Teils der schweren Kette des Subset 2 (SEQ ID NO. 5) und der leichten Kette des Subset 2 (SEQ ID NO. 6) aufweist, und anschließende Herstellung von Hybridomazellen gewonnen wird.
11. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Bindemoleküls gemäß Definition in einem der Ansprüche 1 bis 9 in üblicher Weise, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül durch Immunisieren mit einem IgG Molekül, welches die Aminosäuresequenzen des variablen Teils der schweren Kette des Subset 4 (SEQ ID NO. 7) und der leichten Kette des Subset 4 (SEQ ID NO. 8) aufweist, und anschließende Herstellung von Hybridomazellen gewonnen wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bindemolekül ein Antikörper oder ein funktionelles Fragment desselben ist.

Figur 1



Figur 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2018/068316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2006.01)i; A61P 35/02 (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CLAUDIA MINICI ET AL. "Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia" <i>NATURE COMMUNICATIONS</i> , Vol. 8, 09 June 2017 (2017-06-09), page 15746 DOI: 10.1038/ncomms15746 XP055481551 page 2, paragraphs 3 and 4 , right column, figure 2a; page 3, figure 1, right and left column and page 6, figure 4;page 1	1-12
Y	MARCUS DÜHREN-VON MINDEN ET AL. "Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling" <i>NATURE</i> , GB, Vol. 489, No. 7415, 12 August 2012 (2012-08-12), pages 309-312 DOI: 10.1038/nature11309 ISSN: 0028-0836, XP055481577 abstract, p.309, left column, page 311, right column; page 311, right column;page 6, figure 4, b) and crystal structures, page 2, "Results";page 311, column 2, paragraph 2 abstract	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2018		Date of mailing of the international search report 03 September 2018
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Klee, Barbara Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2018/068316

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	JOSE L. SANCHEZ-TRINCADO ET AL. "Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction" <i>JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH</i> , Vol. 2017, 28 December 2017 (2017-12-28), pages 1-14 DOI: 10.1155/2017/2680160 ISSN: 2314-8861, XP055469700 page 1 - page 9	1-12
A	BOJARCZUK KAMIL ET AL. "B-cell receptor signaling in the pathogenesis of lymphoid malignancies" <i>BLOOD CELLS, MOLECULES AND DISEASES, LAJOLLA, US</i> , Vol. 55, No. 3, 11 July 2015 (2015-07-11), pages 255-265 DOI: 10.1016/J.BCMD.2015.06.016 ISSN: 1079-9796, XP029252301 page 5, column 1, paragraph 5 - page 5, column 2, paragraph 4	1-12
A	WO 2014179714 A1 (UNIV TEXAS [US]) 06 November 2014 (2014-11-06) claims 1-25	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2018/068316

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2014179714	A1	06 November 2014	US	2016067333	A1	10 March 2016
				WO	2014179714	A1	06 November 2014

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. A61K39/395 A61P35/02
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 A61K A61P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>CLAUDIA MINICI ET AL: "Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia", NATURE COMMUNICATIONS, Bd. 8, 9. Juni 2017 (2017-06-09), Seite 15746, XP055481551, DOI: 10.1038/ncomms15746 Seite 2, Absatz 3 und 4, rechte Spalte, Figur 2a; Seite 3, Figur 1, rechte und linke Spalte und Seite 6, Figur 4; Seite 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. August 2018

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/09/2018

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Klee, Barbara

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>MARCUS DÜHREN-VON MINDEN ET AL: "Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling", NATURE, Bd. 489, Nr. 7415, 12. August 2012 (2012-08-12), Seiten 309-312, XP055481577, GB ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature11309 Zusammenfassung, S.309, linke Spalte, Seite 311, rechte Spalte; Seite 311, rechte Spalte; Seite 6, Figur 4, b) und Kristallstrukturen, Seite 2, "Results"; Seite 311, Spalte 2, Absatz 2 Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	1-12
A,P	<p>JOSE L. SANCHEZ-TRINCADO ET AL: "Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction", JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH, Bd. 2017, 28. Dezember 2017 (2017-12-28), Seiten 1-14, XP055469700, ISSN: 2314-8861, DOI: 10.1155/2017/2680160 Seite 1 - Seite 9</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>BOJARCZUK KAMIL ET AL: "B-cell receptor signaling in the pathogenesis of lymphoid malignancies", BLOOD CELLS, MOLECULES AND DISEASES, LAJOLLA, US, Bd. 55, Nr. 3, 11. Juli 2015 (2015-07-11), Seiten 255-265, XP029252301, ISSN: 1079-9796, DOI: 10.1016/J.BCMD.2015.06.016 Seite 5, Spalte 1, Absatz 5 - Seite 5, Spalte 2, Absatz 4</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>WO 2014/179714 A1 (UNIV TEXAS [US]) 6. November 2014 (2014-11-06) Ansprüche 1-25</p> <p>-----</p>	1-12

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP2018/068316

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

Mitglied(er) der Patentfamilie

Datum der
Veröffentlichung

WO 2014179714	A1	06-11-2014	US	2016067333	A1	10-03-2016
			WO	2014179714	A1	06-11-2014
