

DISS. ETH NO. 29875

**Mammalian antibody display platform for deep  
screening of synthetic libraries and natural repertoires**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

BASTIAN ANDREAS WAGNER

M.Sc. in Biotechnology, ETH Zurich

born on 06.02.1990

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sai T. Reddy, examiner

Prof. Dr. Brandon J. DeKosky, co-examiner

Prof. Dr. Randall J. Platt, co-examiner

2024

## Zusammenfassung

Das Gebiet der Entdeckung und Entwicklung therapeutischer Antikörper hat durch die Ausrichtung auf Säugetier-Display-Plattformen, die menschliche Antikörper in ihrer Expression, Faltung und posttranslationalen Modifikation besser imitieren als prokaryotische oder einfachere eukaryotische Systeme, erhebliche Fortschritte erzielt. Diese Entwicklung wurde durch Neuerungen in der Genom-Engineering-Technologie vorangetrieben, die eine genauere und effektivere Modifikation von Säugetiergenomen ermöglichen. Trotz dieser Fortschritte sehen sich aktuelle Säugetier-Display-Plattformen mit gravierenden Limitationen konfrontiert, darunter langsame Zellwachstumsraten, geringe maximale Zelldichten, eine hohe Stressanfälligkeit, komplexe Medienanforderungen und Herausforderungen im Bereich des genetischen Engineerings. Diese Beschränkungen haben die breitere Nutzung von Säugetiersystemen in der Antikörperentdeckung limitiert. Diese Dissertation präsentiert eine Reihe von Innovationen, die darauf abzielen, diese Herausforderungen zu meistern und somit die Lebensfähigkeit und Effizienz von Säugetier-Display-Plattformen für die Erzeugung und Entdeckung therapeutischer Antikörper zu steigern. Durch die Entwicklung einer neuen CHL-Zelllinie mit schneller Verdopplungszeit, hoher Zellüberlebensrate unter Stressbedingungen und einem hoch effizienten Genom-Integrationssystem wurde eine robuste Plattform geschaffen, die die Limitationen früherer Systeme deutlich überwindet. Die Einführung eines GCV-basierten Selektionsmechanismus und eines durch Cre-Rekombinase induzierten Umschalters zwischen Antikörper-Presentation und Sekretion vereinfacht den Prozess der Antikörperentdeckung weiter. Darüber hinaus repräsentieren die LAIC-Klonierungsmethode und das funktionale Einzelzell-Antikörper-Paarungsverfahren signifikante Fortschritte im Aufbau von Bibliotheken und im Screening, die zur erfolgreichen Identifizierung antigenspezifischer Antikörper führen. Diese Verbesserungen markieren einen entscheidenden Schritt in der Anwendung von Säugetier-Display-Plattformen und bahnt den Weg für eine effektivere und effizientere Entdeckung therapeutischer Antikörper.

## **Abstract**

The field of therapeutic antibody discovery and engineering has seen significant progress with the shift towards mammalian display platforms, which more accurately mimic the expression, folding, and post-translational modifications of human antibodies compared to prokaryotic or lower eukaryotic systems. This shift has been facilitated by advancements in genome engineering technologies, allowing for more precise and efficient modifications of mammalian genomes. Despite these advancements, current mammalian display platforms face critical limitations, including slow cellular growth rates, low peak cell densities, sensitivity to stress, complex media requirements, and challenges in genetic engineering. These limitations have restricted the broader application of mammalian systems in antibody discovery. This thesis presents a series of innovations aimed at overcoming these challenges, thereby enhancing the viability and efficiency of mammalian display platforms for the generation and discovery of therapeutic antibodies. Through the development of a novel CHL cell line with rapid doubling time, high cell viability and a highly efficient genome integration system, we have established a robust platform that significantly improves upon the limitations of previous systems. The integration of a GCV-based selection mechanism and a Cre recombinase-mediated switch further streamlines the antibody discovery process. Additionally, the LAIC cloning method and the functional single-cell antibody pairing approach represent significant advancements in library construction and screening, culminating in the successful identification of antigen-specific antibodies. These improvements mark a substantial step forward in the application of mammalian display platforms, paving the way for more effective and efficient therapeutic antibody discovery.