

Peter Wirtz

**Rationales Antikörper engineering über die
Methode der Konsensus-Sequenz Approximation**

Ein Ansatz zur Darstellung stabilisierter
und humanisierter Antikörper



Herbert Utz Verlag · Wissenschaft
München

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation
in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte
bibliografische Daten sind im Internet über
<http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugleich: Dissertation, München, Univ., 2003

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch
begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung,
des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der
Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem
Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen bleiben – auch bei nur auszugsweiser Verwen-
dung – vorbehalten.

Copyright © Herbert Utz Verlag GmbH 2003

ISBN 3-8316-0278-6

Printed in Germany

Herbert Utz Verlag GmbH, München

Tel.: 089/277791-00 – Fax: 089/277791-01

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteine	1
1.2	Immunglobuline	4
1.3	Antikörper als universelle Erkennungsmodule	6
1.4	Antikörper <i>engineering</i>	8
1.4.1	Das Prinzip der Konsensus-Sequenz Approximation	10
1.5	Humane Antikörper	11
1.6	Aufgabenstellung	13
2	Material	15
2.1	Bakterien und Phagen	15
2.1.1	<i>E.coli</i> Stämme	15
2.1.2	Bakteriophagen	16
2.2	DNA	16
2.2.1	Vektoren	16
2.2.2	Oligodesoxynukleotide	17
2.2.2.1	Sequenzierung	17
2.2.2.2	V_H -Stabilisierung	17
2.2.2.3	ScFvAR-Konstruktion	17
2.2.2.4	V_H -Modifizierung	17
2.2.2.5	Restriction Selection	18
2.2.2.6	Modifizierung des B3-Antikörpers	18
2.2.2.7	ScFvHC2-Gensynthese	19
2.2.2.8	Antikörperbibliothek-Darstellung	20
2.3	Enzyme und andere Proteine	20
2.4	Geräte	21
2.5	Chemikalien	21

2.6 Allgemeiner Laborbedarf	23
2.7 Kits und Standards	23
3 Methoden	25
3.1 Kultivierung und Aufbewahrung von <i>E.coli</i>	25
3.2 Molekularbiologische Methoden	26
3.2.1 Plasmid - DNA Präparation	26
3.2.1.1 Alkalische Lyse	26
3.2.1.2 Qiagen® Plasmid-DNA Präparation	27
3.2.2 Einzelstrang-DNA-Präparation	27
3.2.3 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden (Kinasierung)	28
3.2.4 Ortsspezifische Mutagenese	28
3.2.5 Restriktionsendonukleaseverdau von Plasmid-DNA	29
3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese	31
3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	32
3.2.9 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA	32
3.2.10 Elektroporation von Plasmid-DNA in elektrokompetente <i>E.coli</i>	33
3.2.11 DNA-Sequenzierung	35
3.3 Produktion rekombinanter Antikörperdomänen	35
3.3.1 Periplasmatische Expression von Immunglobulin-Domänen	35
3.3.2 Lösliche, cytoplasmatische Expression von Immunglobulin Domänen	36
3.3.3 Expression in <i>inclusionbodies</i>	37
3.3.4 Expression eines anti-His-tag-scFv-Fragments	38
3.4 Proteinchemische Methoden	39
3.4.1 Proteinaufreinigung über His ₆ -tag an Ni-NTA-Matrix	39
3.4.2 Rückfaltung	41
3.4.3 Oxidation der Cysteine	41
3.4.4 Analyse des Oxidationszustands von Proteinen	41
3.4.5 Dialyse und Konzentration von Proteinlösungen	42
3.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.4.7 Bestimmung der thermischen Stabilität reduzierter AK-Domänen	44
3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	45
3.5.1 Western-Blotting	46
3.5.2 Proteingelfärbung	47

3.6 Fluoreszenzspektroskopie	47
3.6.1 Fluoreszenzspektren von Proteinen	47
3.6.2 Denaturierungsübergangskurven von Proteinen	47
3.6.3 Messung der Lichtstreuung	48
3.7 Absorptionsspektroskopie	49
3.7.1 DNA Konzentrationsbestimmung	49
3.7.2 Protein Konzentrationsbestimmung	49
3.7.3 Absorptionsspektren von Proteinen	49
3.7.4 Denaturierungsübergangskurven von Proteinen	50
3.7.5 Bestimmung der katalytischen Aktivität	51
3.8 Massenspektroskopie	51
3.9 Computerunterstützte Analysen und Auswertung	52
4 Die Darstellung einer hyperstabilen V_H-Domäne	53
4.1 Die V_H-Domäne IcaH-01	53
4.1.1 Expression und Aufreinigung aus dem Periplasma von <i>E.coli</i>	53
4.1.2 Die Faltungsstabilität von IcaH	55
4.1.2.1 Die Reversibilität der IcaH01-Faltung	57
4.1.2.2 Die IcaH-Domäne im IcaFv-Kontext	59
4.2 Die Stabilisierung der IcaH01-Domäne	63
4.2.1 Die Vorhersage und Überprüfung stabilisierender IcaH01-Punktmutationen	63
4.2.2 Die Kombination stabilisierender IcaH01-Punktmutationen	65
4.2.2.1 Die thermische Stabilität isolierter IcaH-Domänen	66
4.2.2.2 IcaH01 und IcaH-501 - Faltungseigenschaften im Vergleich	69
4.2.2.3 Die Reduktion der Disulfidbrücke in IcaH-501	70
4.3 Die Cytoplasmatische Expression der IcaH-Domänen	72
4.3.1 Die cytoplasmatische IcaH-501-Expression	73
4.3.2 Die Temperaturabhängigkeit der cytoplasmatischen IcaH-Expression	74
4.3.3 Die Korrelation zwischen Expression und Stabilität	75
4.3.4 Das N-terminale Methionin	78
5 IcaFv als funktionaler katalytischer <i>intrabody</i>	79
5.1 Die IcaFv-Konstruktion	79
5.2 Die cytoplasmatische IcaFv-Expression	81

5.3 Der Oxidationsstatus der Cysteine	81
5.4 Die katalytische Aktivität des IcaFv-Fragmentes	82
6 ScFvAR ein <i>framework</i> zur <i>intrabody</i> Konstruktion	85
6.1 Die Darstellung des scFvAR-Fragmentes	85
6.2 Die ScFvAR-Charakterisierung	87
6.2.1 Die Expressionseigenschaften	87
6.2.2 Die scFvAR-Stabilität im reduzierten Zustand	88
6.3 <i>Restriction Selection – eine neue loop grafting Methode</i>	91
6.3.1 Neue <i>intrabodies</i> auf scFvAR-Basis	93
6.3.1.1 Neue <i>intrabodies</i> - Funktion und Anwendung	93
6.3.1.2 Die Charakterisierung der neuen <i>intrabodies</i>	95
7 Die Humanisierung eines B3-Antikörpers	99
7.1 Der B3-Antikörper	99
7.2 Die B3-Humanisierung	101
7.2.1 Humanisierungsstrategien	101
7.2.2 Die Darstellung des humanen Konsensus-Antikörperfragments scFvHC2	103
7.2.2.1 Die Optimierung der <i>codon usage</i> in scFvHC2	103
7.2.2.2 Die Synthese des scFvHC2-Gens	105
7.2.2.3 Die scFvB3Hum8-Darstellung	106
7.3 Das Expressionsverhalten der humanisierten B3 Varianten	106
7.3.1 Die scFv-Fragmente	106
7.3.2 Die V _L - und V _H -Domänen isoliert betrachtet	108
7.3.3 B3-Einzelloop-Varianten	110
8 Die Darstellung einer humanen Antikörper-scFv-Bibliothek	113
8.1 Das scFvHC2-LIB-Gen	113
8.2 Die Auswahl randomisierbarer Positionen in scFvHC2	114
8.3 Die Herstellung der scFvHC2-Bibliothek	118
8.4 Die Validierung der scFvHC2-Bibliothek	122

9	Diskussion	127
9.1	Stabilisierung von Antikörperdomänen	127
9.1.1	IcaH-Stabilisierung	129
9.2	Cytoplasmatische Expression von Immunglobulin-Domänen	131
9.3	<i>Intrabody</i> Darstellung	133
9.3.1	IcaFv	134
9.3.2	Loop grafting	136
9.4	Humane Antikörper	137
9.4.1	Antikörperhumanisierung	137
9.4.2	Humane Antikörperbibliotheken	139
9.5	Ausblicke	142
10	Zusammenfassung	143
11	Literaturverzeichnis	145
Anhang		

1 Einleitung

1.1 Proteine

Proteine (griechisch *proteios* = erstrangig) sind neben den Nukleinsäuren die zentralen Moleküle des Lebens. Sie spielen in nahezu allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Als Enzyme katalysieren sie Stoffwechselreaktionen, sie bilden das Cytoskelett und die kontraktilen Elemente der Muskelzellen. Als Signalstoffe steuern sie wichtige Funktionen im Organismus. Sie dienen dem Transport und der Speicherung von Stoffen oder auch der Immunabwehr in Form von Antikörpern. Das Alphabet der Proteine besteht aus 20 L-Aminosäurebausteinen, gilt für jede uns bekannte Lebensform und ist mindestens drei Milliarden Jahre alt.

Proteine sind lineare Aminosäureketten, die eine definierte räumliche Struktur einnehmen. Die biologische Funktion eines Proteins ist dabei unmittelbar an die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur, dem sogenannten *nativen Zustand*, gekoppelt. Die Information, welche distinkte Struktur eine Aminosäurekette annimmt, ist durch ihre Aminosäuresequenz bestimmt.

Die Faltung der nascenten Aminosäurekette in den nativen Zustand erfolgt, wie Anfinsen bereits vor fast 30 Jahren beobachtete (Anfinsen, 1973), in einer spontanen Reaktion der Selbstorganisation. Wie die Proteinstruktur in der Aminosäuresequenz gespeichert ist und in die native Konformation umgesetzt wird, ist bis heute ungeklärt und wird allgemein als das Proteinfaltungsproblem bezeichnet. Es gibt keine einfache Beziehung zwischen der Primärstruktur eines Polypeptids und der prächtigen dreidimensionalen Struktur im gefalteten Protein. Manche Proteine falten in einem kooperativen Vorgang ohne isolierbare Faltungsintermediate so schnell in ihre native Konformation, daß dies durch eine zufällige Suche im Konformationsraum nicht erklärt werden kann (Levinthal, 1968). Nimmt man zum Beispiel eine kurze Polypeptidkette aus 100 Aminosäuren und erlaubt für jede Seitenkette drei Konformationen, ist die gesuchte native Struktur eine unter 5×10^{47} möglichen Konformationen. Bei nur 1ps pro Konformation würde die Suche nach der richtigen Struktur immer noch über 10^{27} Jahre dauern. Es muss also gerichtete Prozesse geben, die die Proteinfaltung vorantreiben.

Um mögliche Faltungswege zu beschreiben, geht man heute oft von einer trichterförmigen Energielandschaft aus (Dill *et al.*, 1997) (Leopold *et al.*, 1992; Onuchic *et al.*, 1995). Das ungefaltete Protein befindet sich in diesem Modell im Energiemaximum am Trichterrand. Die native Struktur liegt im Energieminimum im Inneren des Trichters. Die Faltung wird also in erster Linie als thermodynamisch getriebener Vorgang betrachtet. Der Weg zur nativen Struktur wird dann letztendlich durch eine kleine Differenz zwischen Energiegewinn, durch sich bildende intramolekulare Wechselwirkungen (hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder van der Waals Kräfte) und Entropieverlust durch die erlangte Strukturierung der Polypeptidkette getrieben. Die Ausbildung von Sekundärstruktur-Elementen durch Wechselwirkung benachbarter Reste, die aufgrund der geringen entropischen Kosten begünstigt ist, wird demzufolge zuerst stattfinden. Aktuelle Simulationen der Proteinfaltung gehen davon aus, daß sich Untereinheiten nativ-ähnlicher Struktur (*folding nucleus*) bilden, die dann zu der nativen Gesamtstruktur „kollabieren“ (Fersht, 1997). Man nimmt an, daß es dafür keinen distinkten Faltungsweg gibt, sondern ein Ensemble von Konformationen möglich ist, die aus dem Übergangszustand in die native Struktur falten (Alm *et al.*, 1999; Lazaridis *et al.*, 1997). Faltungshelfer, sogenannte Chaperone (TF, DnaK oder DnaJ) und Chaperonine (GroEL), verhindern dabei die Aggregation oder Fehlfaltung nicht-nativer Peptidketten (Braig, 1998). Sie katalysieren geschwindigkeitsbestimmende Schritte im Faltungsprozeß (Schmid *et al.*, 1993) oder lösen kinetisch stabile Faltungsintermediate wieder auf. Sie liefern jedoch keine zusätzliche Information für die korrekte Faltung eines Proteins. Chaperone (z.B. TF oder DnaK) binden an ausgedehnte hydrophobe Peptidsegmente und stabilisieren dadurch nascente Peptidketten sowohl während der Translation als auch nach deren Lösung vom Ribosom in einer faltungspotenten Form. Die Proteine falten dann entweder spontan in der Umgebung des Cytosols oder abgeschirmt innerhalb eines Chaperonins (GroEL) in die native Struktur (Hartl *et al.*, 2002).

Daß das Verständnis für die Proteinfaltung von medizinischem Interesse sein muß, wird deutlich, seit man weiß, daß viele, wenn nicht sogar alle neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington, durch abnorme Protein-Aggregation von Faltungsintermediaten charakterisiert sind (Bucciantini *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 1999). Bemerkenswert ist in dieser Hinsicht, daß eine erhöhte Anzahl an Hsp70-Chaperonen den Verlauf der Krankheit möglicherweise positiv beeinflussen könnte (Kazemi-Esfarjani *et al.*, 2000).

Die Stabilität eines gefalteten Proteins ist marginal (Branden *et al.*, 1999) und keineswegs optimiert, wie sich durch die Mutagenese-Experimente von Fersht und Serrano zeigte (Fersht *et al.*, 1993). Im Zuge der Evolution findet offensichtlich keine Selektion jenseits eines gewissen Schwellenwertes statt. Man kann spekulieren, ob eine zu hohe Stabilität kontraproduktiv für Proteine ist. Proteinfunktionen, die auf einer Konformationsänderung beruhen, werden möglicherweise durch rigide Strukturen ungünstig beeinflußt. Vorgänge, die eine Entfaltung des Proteins voraussetzen, wie beispielsweise die Proteintranslokation durch Membranen oder der Proteinabbau durch Proteasen, würden erschwert werden. Diese Sichtweise wird durch die Tatsache unterstützt, daß die optimale Wachstums-temperatur thermophiler Organismen deutlich über der Temperatur liegt, bei der die Faltungsgenergie ihrer Proteine maximal ist (Jaenicke *et al.*, 1998). Proteine müssen demzufolge als fragile Gebilde angesehen werden, die dennoch hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion robust sind gegenüber auftretenden Mutationen.

Die Verwendung des Begriffs der Proteininstabilität muß hierbei differenziert betrachtet werden. Im eigentlichen Sinne versteht man darunter die thermodynamische Stabilität. Sie ist definiert als der Energieunterschied zwischen nativem und denaturiertem Zustand eines Proteins und wird auch als freie Faltungsenthalpie ΔG bezeichnet. Sie ist Voraussetzung und Ergebnis des Faltungsprozesses. Mit der Stabilität eines Proteins kann aber auch die Robustheit des nativen Zustandes gegenüber denaturierenden Einflüssen (z.B. erhöhte Temperatur) gemeint sein. Die eigentliche Maßgröße ist hier die benötigte Aktivierungsenergie zur Auflösung der nativen Struktur.

Man kennt aktuell (September 2002) die Struktur von annähernd 40.000 Protein-Domänen, die sich in 686 verschiedene Faltungstypen (SCOP Datenbank Murzin *et al.*, 1995) einteilen lassen, abhängig davon, in welcher Form sie sich aus den Sekundärstruktur-Elementen von α -Helices, β -Faltblättern und Schleifen-Regionen zusammensetzen.

Die in den letzten Jahren explosionsartig steigende Fülle an Daten ermöglicht es heute, Strukturen und Sequenzen mit Hilfe von geeigneten Datenbanken (PDB Datenbank Bernstein *et al.*, 1977) und Algorithmen BLAST oder PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) zu vergleichen. Ähnlichkeiten aber auch distinkte Unterschiede in Struktur oder Sequenz können ermittelt werden. Dies bietet die Möglichkeit, anhand der Struktur auf eine mögliche Funktion oder, anhand einer Sequenz, auf eine potentielle Struktur zu schließen.

1.2 Immunglobuline

Immunglobuline (Antikörper) sind Proteine, die als Antwort auf eine Fremdsubstanz, sogenannte Antigene (Proteine, Polysaccharide oder Nukleinsäuren), vom Immunsystem in Vertebraten gebildet werden. Sie werden auf B-Lymphozyten membranständig präsentiert und in der humoralen Immunantwort zur Bekämpfung von Viren, Bakterien oder Parasiten von Plasmazellen sezerniert, die von B-Lymphozyten abstammen. Antikörper binden mit hoher Affinität spezifisch an die Antigene und bewirken die Eliminierung der körperfremden Strukturen aus dem Organismus.

Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten (L, *light*) und zwei identischen schweren (H, *heavy*) Ketten, die zu einem Tetramer L_2H_2 vereinigt sind (Abb. 1.1). Man unterscheidet zwei Typen der leichten Kette, κ und λ , sowie fünf Hauptvarianten der schweren Kette γ , μ , α , δ und ϵ , durch welche die Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE definiert sind.

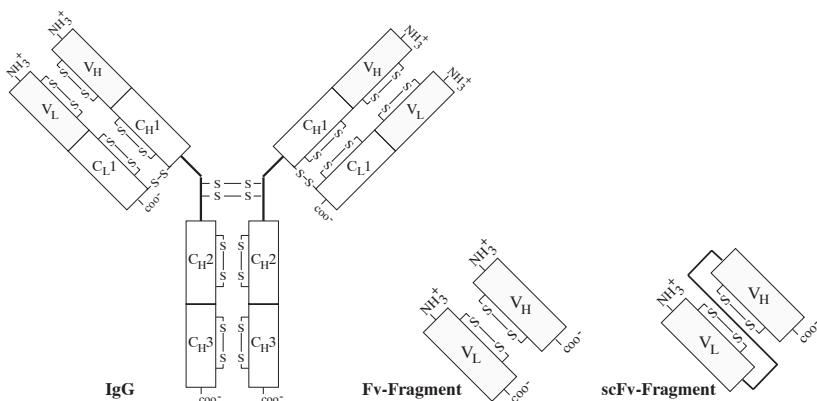


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau eines Antikörpermoleküls vom IgG-Typ und der Fv-Fragmente. Die L-Ketten bestehen aus zwei Domänen und sind über eine Disulfidbrücke an ihrem C-Terminus mit der H-Kette verknüpft. Die H-Ketten sind ihrerseits aus vier Domänen aufgebaut und werden untereinander über mindestens eine Disulfidbrücke verbunden. Am N-Terminus sowohl der leichten als auch der schweren Kette befindet sich eine in der Aminosäuresequenz wenig konservierte Domäne, die deshalb auch als variable Domäne (V_L bzw. V_H) bezeichnet wird. Diese Domänen tragen je drei kurze, hypervariable Peptidabschnitte, als CDR-Regionen bezeichnet, die die Antikörperspezifität determinieren (Wu *et al.*, 1971). Das V_L - V_H -Dimer, auch variables Fragment (Fv) genannt, stellt die kleinste aktive antigenbindende Einheit dar. Biotechnologische Bedeutung hat das scFv-Fragment (*single chain*), in dem die V-Domänen durch einen Peptidlinker künstlich verbunden sind. Die übrigen Antikörperdomänen sind in ihrer Sequenz sehr konserviert und werden daher auch als konstante Domänen (C_L , C_H1 , C_H2 und C_H3) bezeichnet. Sie sind für die Vermittlung von Effektorfunktionen (wie z.B. der Komplement- oder Rezeptorbindung) verantwortlich.

Immunglobulin-Domänen sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich. Sie bestehen aus etwa 110 Aminosäuren, die zwei ausgedehnte, aufeinanderliegende β -Faltblattstrukturen mit antiparallelen Strängen bilden. Die β -Faltblattabschnitte werden über eine streng konserve Disulfidbrücke verknüpft. Die typische Faltungstopologie für Proteine der IG-Superfamilie wird als *Immunglobulinfaltung* oder *greek key fold* bezeichnet (Abb. 1.2). Antikörper-Domänen sind ein gutes Beispiel für die Degeneriertheit des Proteinfaltungskodes. So kennt man beispielsweise tausende verschiedener $V_L(\kappa)$ -Sequenzen, die alle zu sehr ähnlichen Strukturen falten.

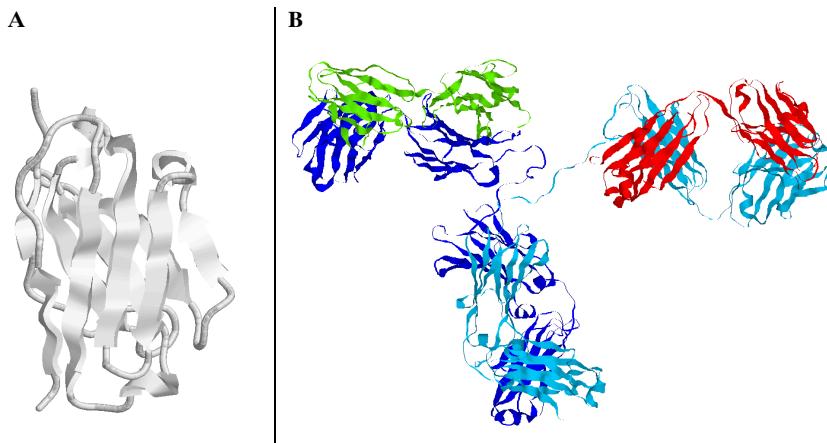


Abb. 1.2: **A:** typische Faltungstopologie für Immunglobulin-Domänen am Beispiel der VH-Domäne 11GT. **B:** Struktur des gesamten IgG-Moleküls; 11GT (Harris *et al.*, 1997). Die leichten Ketten sind rot bzw. grün; die schweren Ketten sind blau gefärbt.

Die natürliche Antikörper-Diversität eines Organismus wird durch die Kombination eines breiten Keimbahnrepertoires mit somatischer Rekombination und somatischer Mutation erreicht. Unterschiede in der Aminosäuresequenz treten dabei hauptsächlich in den antigenbindenden CDR-Regionen auf. Das übrige Gerüst (*framework*) bleibt weitgehend konstant. Das Repertoire des humanen Immunsystems besteht aus 10^9 - 10^{11} verschiedenen Antikörpern, mit denen jedes denkbare Antigen gebunden werden kann.

Als Paradigmen der molekularen Erkennung sind Antikörper wegen ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in Forschung, Diagnostik und Therapie seit jeher Gegenstand intensiver Untersuchungen. Ziel ist die Konstruktion von Immunreagenzien mit maßgeschneiderten Eigenschaften.

Eine interessante Variante der *bindenden* Antikörper sind solche mit *katalytischen* Eigenschaften. Man erhält sie durch Immunisierung oder Selektion mit Verbindungen, die strukturell dem Übergangszustand einer chemischen Reaktion entsprechen. Analog zu Enzymen beruht ihre Katalyse auf der Stabilisierung des energiereichen Übergangszustands. Katalytische Antikörper dienen zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen und sind als künstliche Enzyme technologisch hochinteressant (Smithrud *et al.*, 1997).

Polyklonale Antikörper gegen gewünschte Substanzen gewinnt man durch Immunisierung von Tieren. Die Hybridomtechnik macht es inzwischen möglich, aus der Immunisierung monoklonale Antikörper zu erhalten. Eine Weiterentwicklung zur Selektion spezifischer Antikörper *in vitro* sind künstlich hergestellte *phage-display* Bibliotheken (Wells *et al.*, 1992; Winter *et al.*, 1994) mit bis zu 10^{10} unabhängigen Klonen. Durch Genfusion werden scFv-Fragmente auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentiert. Genotyp und Phänotyp sind auf diese Weise direkt miteinander verknüpft.

Die Produktion von Antikörpern gelingt durch die rekombinante Expression in Prokaryonten (Better *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1988). Für die Produktion im industriellen Maßstab gibt es optimierte Fermentationstechniken oder beispielsweise Ansätze zur Produktion von Antikörpern in Pflanzen (Epicyte Pharmaceutical Inc. San Diego, CA USA).

1.3 Antikörper als universelle Erkennungsmodule

Spezifische Antikörper lassen sich gegen jedes beliebige Epitop herstellen. Alleine diese Tatsache macht Antikörper universell einsetzbar. Dabei bleibt das Prinzip der Anwendung von Antikörpern immer identisch. Der Antikörper wird als Erkennungsmodul mit einem Effektormodul fusioniert, über das dann eine spezifische Reaktion induziert (Zelltod) oder ein Signal (Licht oder Farbreaktion) zum Nachweis oder zur Lokalisation ausgelesen werden kann. In Analytik und Diagnose verwendet man markierte Antikörper (z.B. alkalische Phosphatasekonjugate, Fusionen mit Radioisotopen oder Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen) für den selektiven Nachweis in Blots oder zur Lokalisation verschiedenster Antigene in Gewebeschnitten oder Zellkulturen, sowie als Immunoassay zur Quantifizierung.

Aufgrund der gewachsenen Kenntnisse über die molekularbiologischen Vorgänge in gesunden und pathogenen Zellen versprechen Antikörperkonjugate breite Anwendungsmöglichkeiten speziell in der Medizin. Derzeit (September 2002) befinden sich über 400

rekombinante Antikörperfragmente in klinischen Tests oder bereits in ärztlicher Anwendung (Carter, 2001; Holliger *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 1998). Neben Krebs ist hier besonders die Behandlung cardiovaskulärer- oder Autoimmunerkrankungen sowie von Entzündungen und Virus-infektionen zu erwähnen. Antikörper-Fusionen können als Medikament-Fähren verwendet werden und finden beispielsweise auch in der Gentherapie Einsatz (Curiel *et al.*, 1999). Das Hauptaugenmerk liegt im Moment aber bei der Erkennung und Behandlung von Krebserkrankungen. Es gibt zahlreiche Antikörper gegen krebszellspezifische Epitope, die in klinischen Studien untersucht werden (Übersichtsartikel (Carter, 2001)). Ein sehr vielversprechendes Konzept sind sogenannte *Diabodies*, bivalente bispezifische Fv(antiCD19)-Fv'(anti-CD3) Konstrukte, um T-Zellen an die Tumorzellen zu dirigieren (Kipriyanov *et al.*, 2002). Immunotoxine, das sind Fusionen aus Antikörpern mit einem Toxin, erkennen über den Antikörper Krebszellen und binden daran. Das Toxin wird über Endozytose in die Zelle eingeschleust und tötet sie schließlich ab. Ein Beispiel für ein Immunotoxin ist die Fusion „anti-B3-PE38“. Der B3-Antikörper erkennt das sogenannte Le^Y Kohlenhydrat, das z.B. bei Haut-, Lungen- oder Darmkrebs auf der Oberfläche maligner Zellen präsentiert wird (Pastan *et al.*, 1991). Das bakterielle Toxin *Pseudomonas* Exotoxin A (PE) katalysiert, in eine Zelle eingeschleust, die ADP-Ribosylierung des Elongations Faktors 2 (EF-2) (Carroll *et al.*, 1987). Dies führt zu einer Inaktivierung von EF-2 und bringt die Proteinbiosynthese einer Zelle zum Erliegen. Im Falle des B3-Immunotoxins konnte in Versuchen an Xenotransplantaten in Mäusen eine komplette Zurückbildung eines humanen Hauttumors erreicht werden (Benhar *et al.*, 1995). Analoge Immunotoxine werden ebenfalls zur Behandlung von CD25⁺-Leukämie, Lymphdrüsenerkrankungen oder der Hodgkinschen Krankheit verwendet.

Limitierend für die Anwendung von Immunglobulinen als Therapeutikum ist ihre oft unzureichende Stabilität (Willuda *et al.*, 1999). Sie führt zu einer schnellen Inaktivierung durch Entfaltung und Abbau oder zu einer Aggregation des Proteins. Um an den Wirkort zu gelangen, muß der Antikörper aber mehrere Stunden oder Tage nach Applikation bei 37°C im humanen Serum seine Aktivität beibehalten. Ein weiteres Problem stellt die Immunantwort des menschlichen Körpers dar, die durch wiederholte Applikation (oft verwendeter) Antikörper nicht-humanen Ursprungs provoziert wird. Beide Probleme können, in meist nicht allgemeingültigen Ansätzen, teilweise behoben werden.

Antikörper können individuell durch gezielte Punktmutationen stabilisiert werden (Ohage *et al.*, 1997). Die künstliche Stabilisierung eines Proteins ist nicht trivial, da sich die Mehrzahl an künstlich eingeführten Mutationen als destabilisierend, oder "letal" für Proteine, herausstellt. Die Humanisierung eines Antikörpers gelingt durch Angleichen der Aminosäuresequenzen an ein humanes Schema (siehe dazu 1.5). Die Problematik hierbei ist, daß durch notwendige Aminosäureaustausche weder ein Stabilitätsverlust noch ein Verlust in der Aktivität entstehen sollte.

Die marginale Stabilität natürlicher Antikörper ist auch der Grund dafür, daß das wichtigste zelluläre Kompartiment, das Cytoplasma, lange Zeit *terra incognita* für die funktionale Expression von Immunglobulin-Domänen war (Hwang *et al.*, 1992). Für die Faltung der Antikörperdomänen ist die Oxidation der beiden Cysteine zur internen Disulfidbrücke essentiell. Das reduzierende Milieu des Cytoplasmas verhindert die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke und führt zu einem Stabilitätsverlust von bis zu 25 kJ/mol, oft einem Großteil der Gesamtstabilität des Proteins (Frisch, 1996; Glockshuber *et al.*, 1992). Dies hat den vollständigen Verlust an funktionalem Protein (Marasco, 1997; Ryabova *et al.*, 1996) und/oder die Belastung der Zellen durch unlösliche Aggregate (Cattaneo *et al.*, 1999) zur Folge. Nur intrinsisch sehr stabile Antikörper Domänen sind in der Lage, im Cytoplasma in ihre aktive Struktur zu falten. Daß die Topologie des *greek key folds* nicht von der Anwesenheit der Disulfidbrücke abhängt, zeigen seltene, natürliche, variable Domänen der schweren Kette, die keine Disulfidbrücke besitzen (Rudikoff *et al.*, 1986).

1.4 Antikörper *engineering*

Antikörper sind in zweierlei Hinsicht ein sehr geeignetes Modellsystem, um Protein *engineering*, die Modifikation einer Proteinsequenz zur gezielten Veränderung der Proteineigenschaften, zu betreiben. Es besteht zum einen das generelle Interesse an Antikörpern mit spezifischen Eigenschaften (die Schlagwörter sind hier Stabilität, Funktion und Expression, siehe dazu 1.3). Zum anderen gibt es in keiner anderen Proteinklasse mehr bekannte Strukturen und Sequenzen, die eine sehr differenzierte Betrachtung und Interpretation individueller Eigenschaften erlauben.

Die unzureichende Antikörperstabilität ist als der limitierende Faktor für die breite Anwendbarkeit von Antikörpern zu sehen. Die Strategien zur Stabilisierung von IG-